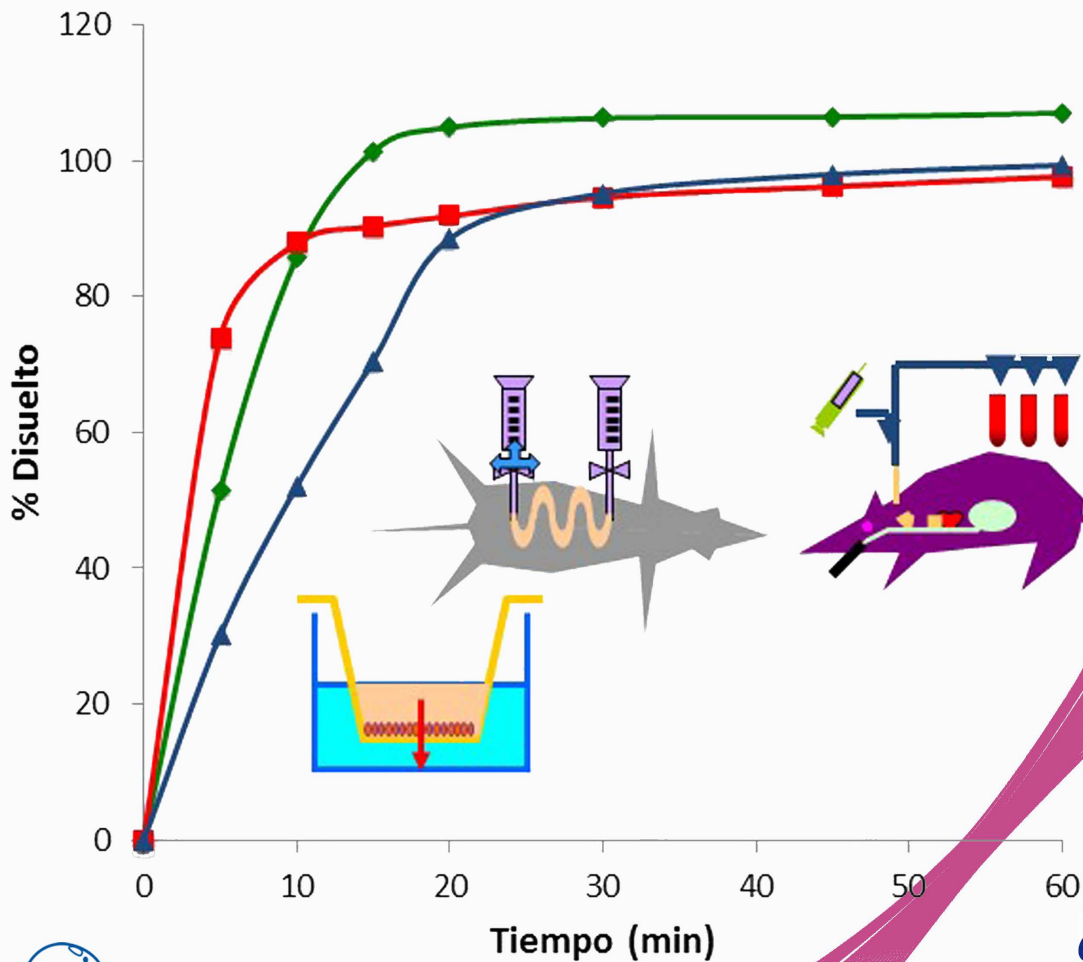


# Metodologías Biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos



Isabel González Álvarez  
Miguel Ángel Cabrera Pérez  
Marival Bermejo Sanz



# Metodologías Biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos

## **Autores:**

Isabel González Álvarez

Miguel Ángel Cabrera Pérez

Marival Bermejo Sanz

## **ISBN:**

978-84-16024-16-2

## **Edita:**

Universidad Miguel Hernández de Elche

## **Maquetación:**

Servicio de Innovación y Apoyo Técnico a la Docencia y a la Investigación UMH

## **Nota del editor:**

Los textos de esta publicación y su revisión ortográfica son responsabilidad de los autores

## **Edición:**

20/04/2015

# Índice de contenidos

## GENERALIDADES

### 1. Absorción gastrointestinal de fármacos

#### 1.1 Absorción gastrointestinal

1.1.1 Anatomofisiología del tracto digestivo

1.1.2 Secreciones digestivas y pH local

1.1.3 Progresión del contenido digestivo

1.1.3.1 Velocidad de vaciado gástrico

1.1.3.2 Motilidad intestinal

1.1.4 Perfusión sanguínea del tracto gastrointestinal

#### 1.2 Procesos de degradación de los fármacos

#### 1.3 Mecanismos de absorción de los fármacos a través de la membrana intestinal

1.3.1 Difusión pasiva y difusión convectiva

1.3.2 Absorción por endocitosis

1.3.3 Mecanismos especializados de transporte

1.3.4 Cinética combinada: difusión pasiva y transporte activo

#### 1.4 Transportadores intestinales

1.4.1 Transportadores SLC

1.4.1.1 Transportadores de oligopéptidos (SLC15A/PEPT)

1.4.1.2 Transportadores de ácidos monocarboxílicos (SLC16A/MCT)

1.4.1.3 Transportadores de solutos orgánicos (SLC22A)

1.4.1.4 Transportadores de aniones orgánicos polipeptídicos (SLC21A/OATP)

1.4.2 Sistemas de secreción de los fármacos (transportadores ABC)

1.4.2.1 Glicoproteína-P (MDR1/ABCB1)

1.4.2.2 Sistema de resistencia múltiple a fármacos (MRP/ABCC)

1.4.2.3 Proteína de resistencia de cáncer de mama (ABCG2/BCRP)

Referencias

### 2. Predicción de la fracción oral absorbida

2.1 Introducción

2.2 Modelos de predicción de la fracción oral absorbida basados en descriptores moleculares y parámetros fisicoquímicos

- 2.3 Modelos de predicción de la fracción oral absorbida tiempo-independientes o en estado estacionario.
- 2.4 Modelos de predicción de la fracción oral absorbida dinámicos.
- 2.5 Conclusión y perspectivas futuras.

Referencias

### **3 Fundamentos científicos del BCS y de la Bioequivalencia *in vitro*: Aspectos teóricos.**

- 3.1 El sistema de clasificación biofarmacéutica
  - 3.1.1 Fundamentos teóricos del BCS
- 3.2 Definición de las magnitudes adimensionales An, Dn y Do.
- 3.3 Clases del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) e implicaciones farmacéuticas.
- 3.4 Solicitudes de Bioexención: Bioequivalencia In Vitro.
- 3.5 Extensiones y aplicaciones futuras del BCS

Referencias

### **4 Fundamentos científicos del BCS y de la Bioequivalencia *in vitro*. Ejemplos de clasificación según el BCS**

- 4.1 Introducción
- 4.2 El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB)
- 4.3 Bioexenciones
  - 4.3.1 Solubilidad
  - 4.3.2 Permeabilidad
  - 4.3.3 Disolución
    - 4.3.3.1 Metodología para determinar las características de disolución de los productos medicamentosos
- 4.4 Ejemplos de clasificación de fármacos según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
  - 4.4.1 Clase 1 del SCB: Verapamilo hidrocloreto
  - 4.4.2 Clase 2 del SCB: Ketoprofeno
  - 4.4.3 Clase 3 del SCB: Pirazinamida
  - 4.4.4 Clase 4 del SCB: Furosemida
- 4.5 Clasificación provisional fármacos esenciales de la OMS

Referencias

## **5 Estrategias tecnológicas para la modulación de la biodisponibilidad de fármacos**

5.1 Introducción

5.2 Metodologías aplicables en la mejora de la biodisponibilidad de fármacos

5.2.1 Reducción del tamaño de partículas

5.2.2 Mezclas eutécticas

5.2.3 Dispersiones sólidas

5.3 Nanosuspensiones

5.4 Fluidos supercríticos-SCF

5.5 Técnicas criogénicas

5.6 Formación de complejos de inclusión

5.7 Formas amorfas y polimorfismo

5.8 Vehículos lipídicos

5.9 Conclusiones

Referencias

## **6 Capacitación en Metodologías Biofarmacéuticas**

6.1 Introducción

6.1.1 Diarrea

6.1.2 Estreñimiento

6.2 Evaluación de actividad en la motilidad intestinal

6.2.1 Tránsito intestinal

6.2.2 Evaluación de la actividad laxante

6.3 Animales

6.3.1 Tránsito intestinal con carbón activo

6.3.2 Tránsito intestinal con carbón activo modificado

6.3.3 Tránsito intestinal en jaula metabólica

Referencias

## **7 Validación de métodos bioanalíticos**

7.1 Historia de las regulaciones sobre métodos analíticos

7.2 Introducción a la validación de métodos bioanalíticos

7.3 Prácticas de validación

7.3.1 Validación completa

7.3.2 Validación parcial

7.3.3 Validación cruzada

7.4 Definiciones, metodología, diseño experimental y criterios de aceptación

7.4.1 Selectividad

7.4.2 Efecto de la matriz

- 7.4.3 Efecto de arrastre
- 7.4.4 Exactitud y precisión
- 7.4.5 Recuperación
- 7.4.6 Curva de calibración
- 7.4.7 Integridad de dilución
- 7.4.8 Estabilidad

Referencias

## **8. Investigación animal para el desarrollo de nuevos fármacos: reducir, refinar o reemplazar**

- 8.1 Introducción
- 8.2 Uso de animales en experimentación en el desarrollo de un medicamento
- 8.3 Aspectos éticos
- 8.4 La regla de las 3 R
  - 8.4.1 Reemplazo
    - 8.4.1.1 Técnicas con material insensible
    - 8.4.1.2 Investigación en sujetos humanos
    - 8.4.1.3 Investigación con organismos inferiores
  - 8.4.2 Reducción
  - 8.4.3 Refinamiento
- 8.5 Legislación
  - 8.5.1 Legislación Europea
  - 8.5.2 Legislación Española
- 8.6 Los comités éticos
  - 8.6.1 Componentes del Comité ético de experimentación animal
  - 8.6.2 Funciones del Comité ético de experimentación animal
  - 8.6.3 Comisión ética de bienestar animal
- 8.7 Conclusiones

Referencias

## **9. Correlaciones *in vitro-in vivo*: conceptos generales, metodologías y su aplicación en las guías regulatorias**

- 9.1 Introducción
- 9.2 Definiciones
- 9.3 Aplicaciones
- 9.4 Niveles de IVIVC
  - 9.4.1 Nivel A de Correlación
  - 9.4.2 Nivel B de Correlación
  - 9.4.3 Nivel C de Correlación
  - 9.4.4 Nivel C Múltiple de Correlación
- 9.5 Sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS)

- 9.6 Evaluación de la predicción de las IVIVC
  - 9.6.1 Validación interna
  - 9.6.2 Validación externa
- 9.7 Recomendaciones de las agencias regulatorias sobre las IVIVC
- 9.8 Factores que afecta a la disolución del fármaco
- 9.9 Metodologías
  - 9.9.1 Métodos en dos etapas
    - 9.9.1.1 Wagner-Nelson
    - 9.9.1.2 Loo-Riegelman
  - 9.9.2 Métodos de deconvolución modelo-independiente
    - 9.9.2.1 Deconvolución de las transformadas analíticas de Laplace
    - 9.9.2.2 Deconvolución por ajustado de los perfiles
    - 9.9.2.3 Deconvolución Punto-Area
  - 9.9.3 Métodos de convolución
  - 9.9.4 Modelos basados en ecuaciones diferenciales
- 9.10 Ventajas y limitaciones de una IVIVC

Referencias

## **10. Sección solubilidad: Solubilidad de principios activos: consideraciones generales y su relación con el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico aplicado a Bioexenciones**

- 10.1 El contexto biofarmacéutico y la importancia de los medicamentos genéricos o multifuentes
- 10.2 Definiciones
- 10.3 La solubilidad y los factores que inciden en ella.
  - 10.3.1 Factores relevantes en la formulación de medicamentos
  - 10.3.2 Factores que condicionan la absorción de los medicamentos
  - 10.3.3 Factores farmacotécnicos que inciden en la solubilidad del API.
    - 10.3.3.1 Disminución del tamaño de partícula
    - 10.3.3.2 Polimorfismo
    - 10.3.3.3 pH y temperatura
- 10.4 Métodos para la determinación de la solubilidad
  - 10.4.1 Shake Flask o método de agitación hasta saturación en matraces.
    - 10.4.1.1 Shake Flash y SCB
  - 10.4.2 Método potenciométrico
    - 10.4.2.1 Identificación y funcionalidad de equipo potenciométrico
- 10.5 Reflexión

Referencias

## **11. Métodos *in silico* para la predicción de la solubilidad de fármacos. Aproximaciones al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico**

- 11.1 Introducción
  - 11.2 Desarrollo de los modelos computacionales para la predicción de la solubilidad
    - 11.2.1 Metodología general para los estudios QSPR
    - 11.2.2 Bases de datos de solubilidad
    - 11.2.3 Descriptores moleculares
    - 11.2.4 Metodologías estadísticas para la obtención de los modelos computacionales
    - 11.2.5 Validación de los modelos computacionales
  - 11.3 Ventajas y desventajas de los modelos computacionales
  - 11.4 Aplicación a la predicción de la solubilidad dentro del BCS
  - 11.5 Clasificación provisional del BCS basado en modelos *in silico* de solubilidad
    - 11.5.1 Selección de la base de datos
    - 11.5.2 Desarrollo de los modelos computacionales
    - 11.5.3 Resultados
  - 11.6 Conclusiones y Perspectivas
  - 11.7 Agradecimientos
- Referencias

## **12. Estudios de permeabilidad en humanos**

- 12.1 Introducción
- 12.2 Métodos para estudiar la permeabilidad intestinal en humanos
  - 12.2.1 Métodos indirectos
    - 12.2.1.1 Estudio de balance de masas farmacocinético
    - 12.2.1.2 Estudio farmacocinético comparativo
    - 12.2.1.3 Cápsulas inteligentes
  - 12.2.2 Métodos directos
    - 12.2.2.1 Método de perfusión abierta
    - 12.2.2.2 Método semiabierto de tubo multi-lumen con un balón de oclusión proximal
    - 12.2.2.3 Método de doble balón con tubo multi-lumen
- 12.3 Cálculo de la permeabilidad
- 12.4 Buenas Prácticas Clínicas en los estudios de permeabilidad en humanos
  - 12.4.1 Personal
  - 12.4.2 Documentos
  - 12.4.3 Instalaciones
- 12.5 Permeabilidad en humanos y datos obtenidos en modelos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* en animales
- 12.6 Aplicaciones de los estudios de permeabilidad en humanos



- 12.7 Permeabilidad en humanos: investigaciones y retos futuros

## Referencias

### 13. Cultivos celulares

- 13.1 Introducción
- 13.2 Ventajas e inconvenientes
- 13.3 Tipos de cultivos
- 13.4 Fases del crecimiento
- 13.5 Acondicionamiento para cultivos celulares
  - 13.5.1 Instalaciones
  - 13.5.2 Equipamiento
  - 13.5.3 Material
  - 13.5.4 Medio de cultivo
  - 13.5.5 Parámetros físicos
- 13.6 Contaminación
- 13.7 Buenas prácticas de trabajo
- 13.8 Los cultivos celulares para ensayos de permeabilidad
  - 13.8.1 Línea celular Caco-2
  - 13.8.2 Factores que afectan a la permeabilidad *in vitro*
    - 13.8.2.1 Factores pre-experimentales
    - 13.8.2.2 Factores experimentales
    - 13.8.2.3 Factores postexperimentales
  - 13.8.3 Aplicaciones de los ensayos de permeabilidad *in vitro*
    - 13.8.3.1 Determinación de la permeabilidad intestinal y mecanismos de transporte
    - 13.8.3.2 Estudios de mecanismos de inhibición
    - 13.8.3.3 Transfección para simular ventanas de absorción
    - 13.8.3.4 Estudio de degradación en lumen intestinal
  - 13.8.4 Correlaciones *in vitro-in vivo*
- 13.9 Otras aplicaciones y usos
  - 13.9.1 Ensayos de proliferación/citotoxicidad
  - 13.9.2 Biología del desarrollo
  - 13.9.3 Animales transgénicos
  - 13.9.4 Infecciones virales
  - 13.9.5 Diagnóstico temprano
- 13.10 Conservación
  - 13.10.1 Congelación
  - 13.10.2 Descongelación
  - 13.10.3 Organización y mantenimiento de un banco de células congeladas
- 13.11 Bancos de almacenaje de líneas celulares

## Referencias

## 14. Sección permeabilidad: Métodos *in vitro* de estimación de la permeabilidad intestinal: membranas PAMPA

- 14.1 Introducción
- 14.2 Diferentes sistemas PAMPA
  - 14.2.1 Sistemas PAMPA comerciales
    - 14.2.1.1 BD Gentest™ Pre-coated PAMPA Plate System
    - 14.2.1.2 Pion Instruments
- 14.3 Factores críticos de los sistemas PAMPA
  - 14.3.1 Composición lipídica de la membrana
  - 14.3.2 Capa de agua estática sobre la superficie de la membrana (UWL)
  - 14.3.3 pH
  - 14.3.4 Condición de sumidero (“sink condition”)
- 14.4 Análisis de los datos

Referencias

## 15. Absorción transdérmica: Modelos *in vitro*

- 15.1 Introducción
- 15.2 Estructura de la piel y sus anexos
- 15.3 Vías de penetración cutánea
- 15.4 Factores implicados en la absorción transdérmica
- 15.5 Técnica *in vitro* para la evaluación del grado de penetración a través de la piel
  - 15.5.1 Piel o membranas alternativas
  - 15.5.2 Realización del ensayo de absorción transdérmica
- 15.6 Cálculo de los parámetros representativos de la difusión

Referencias

## 16. Métodos *in situ* de estimación de la permeabilidad (1). Sistemas de perfusión de un solo paso

- 16.1 Introducción
- 16.2 Biodisponibilidad oral
  - 16.2.1 Factores que afectan la biodisponibilidad oral de un fármaco
- 16.3 Fracción de dosis absorbida ( $f_a$ )
- 16.4 Permeabilidad intestinal efectiva ( $P_{eff}$ )
- 16.5 Perfusión intestinal de un solo paso
  - 16.5.1 Fundamentos de la perfusión intestinal de un solo paso (PISP)
- 16.6 Modelos utilizados para determinar la concentración luminal del fármaco

- 16.6.1 Modelo del tanque bien mezclado
- 16.6.2 Modelo del tubo paralelo
- 16.6.3 Ventajas y limitaciones de la técnica de perfusión intestinal de un solo paso
  - 16.6.3.1 Ventajas
  - 16.6.3.2 Limitaciones
- 16.6.4 Estandarización y validación de la técnica de perfusión intestinal de un solo paso
  - 16.6.4.1 Elección de la velocidad de flujo
  - 16.6.4.2 Corrección de la concentración del fármaco en las muestras de perfundido recolectadas
- 16.6.5 Correlación entre los valores de Peff determinados in situ con la absorción intestinal en humanos
- 16.7. Conclusión

Referencias

## 17. Perfusión in situ sin recirculación

- 17.1 Introducción
- 17.2 Ventajas e inconvenientes
- 17.3 Acondicionamiento
  - 17.3.1 Instalaciones
- 17.4 Equipamiento y material
- 17.5 Personal
- 17.6 Buenas prácticas de trabajo
- 17.7 Tipos de animales
- 17.8 Técnica experimental
- 17.9 Aplicaciones de los ensayos *in situ*
  - 17.9.1 Determinación de la permeabilidad intestinal y mecanismos de transporte
  - 17.9.2 Estudios de mecanismos de inhibición
  - 17.9.3 Detección de ventanas de absorción
  - 17.9.4 Correlaciones
- 17.10 Factores que afectan a la técnica experimental
  - 17.10.1 Factores pre-experimentales
  - 17.10.2 Factores experimentales
  - 17.10.3 Factores post-experimentales
- 17.11 Cálculo de la permeabilidad intestinal

Referencias

## **18. Estudios de balance de masas y estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia. Método de canulación de la vena yugular en rata.**

- 18.1 Introducción
- 18.2 Estudios de balance de masa
  - 18.2.1 Objetivo
  - 18.2.2 Diseño de los estudios
    - 18.2.2.1 Diseño experimental
    - 18.2.2.2 Selección y preparación de la dosis
    - 18.2.2.3 Obtención de muestras experimentales
    - 18.2.2.4 Valoración analítica en las muestras biológicas
  - 18.2.3 Análisis de datos
- 18.3 Estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia
  - 18.3.1 Objetivo
  - 18.3.2 Factores que influyen en la biodisponibilidad
  - 18.3.3 Diseño y análisis de datos
    - 18.3.3.1 Estudios farmacocinéticos
- 18.4 Modelos animales in vivo

Referencias

## **19. Métodos *in silico* para la predicción de la permeabilidad de fármacos. Aproximaciones al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico**

- 19.1 Introducción
- 19.2 Desarrollo de los modelos computacionales para la predicción de la permeabilidad
  - 19.2.1 Metodología general para los estudios QSPR
  - 19.2.2 Bases de datos de solubilidad
  - 19.2.3 Descriptores moleculares
  - 19.2.4 Metodologías estadísticas para la obtención de los modelos computacionales
  - 19.2.5 Validación de los modelos computacionales
- 19.3 Ventajas y desventajas de los modelos computacionales
- 19.4 Aplicación a la predicción de la permeabilidad intestinal dentro del BCS
- 19.5 Clasificación provisional del BCS basado en modelos *in silico* de permeabilidad
  - 19.5.1 Selección de la base de datos
  - 19.5.2 Desarrollo de los modelos computacionales
  - 19.5.3 Resultados
- 19.6 Conclusiones y Perspectivas
- 19.7 Agradecimientos

Referencias

## **20. Sección velocidad de disolución: Metodologías de obtención de perfiles de disolución. Aparatos, parámetros del ensayo. Cinética y comparación**

- 20.1 Disolución
- 20.2 Comparación de perfiles de disolución
- 20.3 Uso del factor de similitud
- 20.4 Aparatos y procedimientos
- 20.5 Validación de los estudios de disolución
- 20.6 Modelos cinéticos

Referencias

## **PARTE APLICADA**

### **21. Validación de métodos analíticos**

- 21.1 Especificidad (selectividad)
- 21.2 Linealidad
- 21.3 Estabilidad de las soluciones
- 21.4 Precisión
- 21.5 Exactitud
- 21.6 Robustez
- 21.7 Resultados
  - 21.7.1 Especificidad
  - 21.7.2 Linealidad
  - 21.7.3 Estabilidad
  - 21.7.4 Precisión
  - 21.7.5 Exactitud
  - 21.7.6 Robustez

Anexo 1

Anexo 2

### **22. Cálculo de fracción absorbida**

- 22.1 Estimación del área bajo la curva concentración plasmática-tiempo
  - 22.1.1 Cálculo del AUC mediante el método de los trapecios (integración numérica).
- 22.2 Estimación de la fracción de dosis absorbida. Método de Wagner-Nelson
- 22.3 Estimación de la fracción de dosis absorbida. Método de Loo-Riegelman

## **23. Cálculos en bioequivalencia**

23.1 Fundamento

## **24. Cálculos de números adimensionales**

## **25. Cálculos de la permeabilidad intestinal *in vitro***

Referencias

## **26. Cálculos de permeabilidad en células de Franz**

## **27. Cálculo de permeabilidad en rata: perfusión de un solo paso**

## **28. Cálculo de permeabilidad en rata: perfusión sin recirculación**

## **29. Cálculos de velocidad de disolución**

29.1 Introducción

29.2 Aparato I y II con reposición de medio

29.3 Aparato I y II sin reposición de medio

29.4 Aparato IV (acumulado)

29.5 Cálculo de resultados promedio y Factor de Similitud ( $f_2$ )

29.5.1 Resultados promedio

29.5.2 Factor de Similitud ( $f_2$ )

Referencias

## **30. Ajuste no lineal por mínimos cuadrados en Excel. Uso de herramienta Solver**

# **ANEXOS**

Anexo A

Anexo B

Anexo C

Anexo D

Anexo E

Anexo F

Anexo G

Anexo H

Anexo I

Anexo J

Anexo K

Anexo L

Anexo M

Anexo N

# **GENERALIDADES**



# 1. Absorción gastrointestinal de fármacos

Virginia Merino Sanjuán<sup>a,b</sup>, Ana Catalán Latorre<sup>a,b</sup>, Vicente Germán Casabó Alós<sup>a</sup>,  
Matilde Merino Sanjuán<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.*

<sup>b</sup> *Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico. Unidad Mixta Universidad Politécnica de Valencia-Universidad de Valencia España*

## 1.1 Absorción gastrointestinal

La vía oral es la más natural y fisiológica, entre las alternativas posibles, para la administración de medicamentos al organismo. Es la utilizada con mayor frecuencia; son excepcionales las situaciones clínicas que estrictamente la contraindican (pacientes en coma grado III-IV); a veces, incluso en estos casos, se recurre al sondaje del paciente mediante sonda nasogástrica y la implantación de catéteres con acceso directo a estómago, soslayando de esta forma la imposibilidad de deglución de algunos pacientes, como algunos oncológicos.

El estudio de los factores condicionantes de la administración oral de fármacos permite abordar el diseño de las formas farmacéuticas de administración por vía oral que garanticen una biodisponibilidad en magnitud y velocidad óptimas de los fármacos que contienen, ya que en determinadas situaciones clínicas (por ejemplo en pacientes transplantados) la biodisponibilidad determina la respuesta al tratamiento, y que faciliten la adherencia de los pacientes al tratamiento farmacoterapéutico crónico.

### 1.1.1 Anatomofisiología del tracto digestivo

El tracto digestivo en su conjunto consta de seis partes bien caracterizadas: *boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado e intestino grueso.*

La *boca* comunica con el exterior a voluntad, gracias al movimiento de las mandíbulas y los labios. La *faringe* comunica con la boca en el lugar en que se cruzan los aparatos respiratorio y digestivo, en la base de la lengua y al nivel de la epiglotis. El *esófago* es un tubo colapsado de unos 25 cm de largo y entre 1 y 3 cm de ancho, que discurre a lo largo del cuello por detrás de la traquea, atraviesa el tórax por el mediastino, penetra en el abdomen y da origen al *cardias*, un esfínter muy débil que se considera ya como la parte inicial del estómago.

El *estómago* es la parte más dilatada del tracto digestivo. Consta de un tramo vertical, algo inclinado (*segmento cardial*) y otra parte, más pequeña, horizontal (*segmento pilórico*). El primero comprende el *fundus*, situado por encima del cardias, y el *cuerno*, que queda por debajo del mismo y se extiende hasta la incisura angular. El segmento pilórico consta de una porción vestibular o *antro* y el *píloro*, o canal pilórico, un esfínter potente que comunica con el *duodeno*, primera fracción del intestino delgado, y regula el tránsito del contenido gástrico hacia éste.

El *intestino delgado* es un tubo que mide, en conjunto, unos 7 metros de largo, anatómicamente dividido en tres partes: el *duodeno*, que es la fracción más corta (20-30 cm), de pared gruesa y profundamente plegada, que describe una curva en forma de C en torno al páncreas antes de enlazar con el yeyuno. A unos 10 cm del píloro, desemboca en el duodeno un conducto común resultante de la unión del *colédoco* (procedente de la vesícula biliar) y el *conducto de Wirsung* (procedente del páncreas), a través de un orificio denominado *esfínter de Oddi*, que regula el vertido de las secreciones de ambas glándulas al duodeno; el *yeyuno* y el *íleon*, miden en conjunto casi 7 m (3 y 4 respectivamente) y su diámetro luminal va decreciendo desde 5 cm en la fracción inicial del yeyuno hasta 2,5 cm en la fracción terminal del íleon situación que es pareja a la disminución del número de pliegues de su pared. Desemboca en el intestino grueso por el *esfínter ileocecal*.

El *intestino grueso*, la parte final del tracto digestivo mide, en conjunto, entre 1,2 y 1,5 m de largo, con un diámetro que oscila entre 2,5 y 7,5 cm. Está diferenciado en *ciego*, *colon* y *recto*. El *ciego*, de unos 8,5 cm de longitud, está situado por debajo del esfínter ileocecal; unido a él se encuentra el *apéndice vermiforme*, rico en tejido linfóide. El *colon* se diferencia en tres zonas: *colon ascendente*, que transita desde el ciego hasta el ángulo superior derecho del abdomen y mide unos 20 cm; *colon transverso*, de unos 45 a 50 cm de longitud, que es la fracción más ancha y discurre horizontalmente algo por debajo del estómago, y *colon descendente*, de unos 30 cm

de largo, que discurre por el lado izquierdo del abdomen y es la fracción más estrecha del intestino grueso; en su zona distal muestra una curvatura en forma de S denominada *colon pélvico o sigmoideo*, que desemboca horizontalmente en el recto. El *recto*, de unos 18 cm de largo comunica con el exterior por el *canal anal*, provisto de dos esfínteres: uno liso e involuntario y otro estriado y voluntario, que cierra el tracto digestivo.

Los factores fisiológicos del tracto digestivo relacionados con la absorción de los fármacos y que condicionan la velocidad y la magnitud de su absorción cuando se administran por vía oral son las secreciones en las distintas partes del mismo, la motilidad y el flujo vascular en el tracto gastrointestinal. Además, los procesos de degradación que se producen en el lumen del tracto gastrointestinal presentan relevancia en determinadas condiciones.

### 1.1.2 Secreciones digestivas y pH local

El tracto digestivo es el sustrato de varias secreciones necesarias para la digestión de los alimentos. En el *estómago* existen – principalmente en la pared fúndica - glándulas que segregan *ácido clorhídrico* y otras que producen *pepsinógeno* que, por acción del anterior, pasa a *pepsina*; también existen células secretoras de *mucina*. El conjunto de todas estas secreciones constituyen el *jugo gástrico* que alcanza un pH del orden de 1,0 unidad cuando el estómago está vacío y que se eleva hasta 3,5 unidades durante las comidas debido al efecto regulador de los alimentos.

En el *intestino delgado* coexisten varios tipos de secreciones, destinadas a neutralizar el pH fuertemente ácido del contenido gástrico y a realizar importantes funciones digestivas. Una de estas secreciones es autóctona, segregada por las células de la pared intestinal y glándulas anejas: el *jugo entérico*, con un pH propio de 7,5-8,0, que contiene elevada proporción de *mucina*, *bicarbonato*, *enteroquinasa* y cierta cantidad de *peptidasas*, *lipasas* y *amilasas*. Pero al intestino delgado vierten también sus secreciones el hígado (*bilis*) y el páncreas (*jugo pancreático*). La *bilis* provee *sales biliares*, *lecitina* y *colesterol*, que actúan como emulsionantes e incluso solubilizantes de las grasas, lo que constituye el paso previo a su descomposición por las lipasas y su ulterior absorción, así como *pigmentos biliares*, en especial *bilirrubina*, que son productos catabólicos procedentes, en general, de la degradación de la hemoglobina. El *jugo pancreático*, con un pH propio de 8,5-9,0, es rico en *bicarbonato*, *lipasas*, *amilasas* y *tripsinógeno*, que pasa a tripsina por acción de la enteroquinasa autóctona; también

continúa la degradación de las proteínas iniciada en el estómago y que finalizará en el propio intestino por acción de las peptidasas.

La alcalinidad de estas secreciones motiva un cambio abrupto de pH respecto al gástrico; en el duodeno y el yeyuno proximal, el pH oscila entre 5,0 y 6,5; en el yeyuno medio y distal entre 6,5 y 7,5 y en íleon de 7,5 a 8,0 unidades de pH, hasta alcanzar un valor del orden de 8,2 en el esfínter íleocecal. Ya en el *intestino grueso* el pH se mantiene entre 7,5 y 8,0 unidades; su principal secreción es la *mucina*. Aparte de ello, el colon es un excelente medio para el crecimiento y desarrollo de *bacterias saprófitas* que actúan eficazmente sobre los carbohidratos y proteínas, completando su digestión.

### 1.1.3 Progresión del contenido digestivo

El acto de tragar recibe el nombre de *deglución* y es en principio voluntario: el material alimenticio es impulsado hacia la faringe mediante contracciones de la lengua y, desde este momento, el proceso es ya involuntario. La epiglotis ocluye la tráquea y el bolo formado se ve forzado a penetrar en el esófago, facilitado por la suavidad de la capa mucosa y la existencia de *ondas peristálticas*; la progresión de los líquidos se debe mayoritariamente a la acción de la gravedad; el cardias no opone resistencia al paso del bolo al estómago. Ya en éste, el contenido es retenido parcialmente y mezclado con el *jugo gástrico* gracias a las contracciones peristálticas que produce su poderosa musculatura. El *quimo* así formado, más fluido, va progresando hacia el duodeno a través del píloro gracias al proceso conocido con el nombre de *vaciado gástrico*, que puede discurrir a mayor o menor velocidad y es uno de los factores que mayor incidencia presenta en la absorción de los fármacos. En el duodeno, el contenido se mezcla con las secreciones digestivas intestinales y va progresando hacia el íleon gracias a la *motilidad intestinal* fundamental para la absorción de los fármacos, puesto que facilita el contacto con la mucosa absorbente y condiciona el tiempo de residencia del fármaco en la zona. El contenido intestinal accede entonces al esfínter íleocecal y penetra en el intestino grueso, cuya motilidad es muy inferior aunque significativa en su tercio anterior, lo que contribuye asimismo al proceso de la absorción de los fármacos.

#### 1.1.3.1 Velocidad de vaciado gástrico

El *vaciado gástrico* es el proceso fisiológico que regula la progresión del contenido gástrico hacia el duodeno y que está influenciado por diversos factores de modo que puede durar desde diez minutos hasta ocho horas.

Cuando se ingieren líquidos o semisólidos en pequeños volúmenes la cinética del vaciado gástrico (medida a partir de los volúmenes de contenido gástrico remanentes en el estómago) es de primer orden. La semivida de vaciado oscila entre 10 y 60 minutos para alimentos líquidos o semisólidos y para sólidos no digeribles es mucho más larga, pudiendo llegar hasta 4 horas.

Puesto que el lugar de absorción habitual de los fármacos que se administran por vía oral es el intestino delgado el proceso de absorción suele producirse a partir del momento que abandonan el estómago y acceden al duodeno. En consecuencia, el tiempo de vaciado gástrico puede influir en el inicio (periodo de latencia) e incluso actuar, cuando el fármaco se absorbe fácilmente y se encuentra disuelto en el contenido gástrico, como factor limitativo de su velocidad de absorción. Este efecto es frecuente, por tanto, para fármacos que poseen una constante de absorción intrínseca elevada en el tramo inicial del intestino delgado, como sucede con paracetamol.

La velocidad de vaciado gástrico está regulada por estímulos de origen exógeno a los que responden los receptores (preprandiales o postpilóricos) que, en general, poseen carácter inhibitor y actúan de forma indirecta, a excepción de los estímulos de origen farmacológico que en algunos casos lo activan. En la Tabla 1 se indican los principales factores que pueden modificar la velocidad de vaciado gástrico.

*Tabla 1. Factores moduladores de la velocidad de vaciado gástrico*

Factores	Efecto sobre la velocidad de vaciado gástrico (VVG) y mecanismo
Volumen de la ingesta	Retarda la VVG por un mecanismo barorreceptor: a mayor volumen mayor tiempo de semivida de vaciado gástrico
Consistencia del contenido	Los líquidos vacían a mayor velocidad que los semisólidos y éstos lo hacen a mayor velocidad que los sólidos
Composición química	Los glúcidos y lípidos retardan la VVG por un mecanismo hormonal (enterogastrona) y los prótidos lo retardan por un mecanismo reflejo
Tonicidad del contenido	Los iones voluminosos retardan la VVG a cualquier concentración (la inhibición aumenta a

	medida que lo hace la concentración). Los iones poco voluminosos en concentración hipotónica activan la VVG y en concentración hipertónica lo inhiben. Ambos por un mecanismo osmorreceptor
pH	Valores extremos de pH retardan la VVG
Temperatura	Baja activa la VVG y elevada retarda la VVG
Posición corporal	Por un mecanismo mecánico la posición decúbito supino izquierdo retrasa la VVG y la posición decúbito supino derecha la activa
Estado psíquico	Los estados de tensión y/o excitación activan la VVG y los estados de fatiga y/o depresión la inhiben
Ejercicio físico	Cuando es intenso disminuye la VVG
Fármacos	Por un mecanismo reflejo los fármacos colinérgicos activan la VVG y los anticolinérgicos la inhiben

Respecto a las formas farmacéuticas que pueden administrarse por vía oral, los líquidos abandonan el estómago a una velocidad más rápida que los semisólidos; los sólidos no digeribles de tamaño superior, incluyendo cápsulas y comprimidos, quedan retenidos en el estómago durante periodos prolongados (entre 3 y 6 horas). Los gránulos recubiertos, pellets y pequeñas esferillas de plástico no se retienen y vacían a una velocidad similar a la de los semisólidos (15 minutos).

Los *fármacos* colinérgicos y simpaticolíticos tienen un efecto activador y los anticolinérgicos, adrenérgicos y bloqueantes ganglionares un efecto inhibitor.

### 1.1.3.2 Motilidad intestinal

Cuando el contenido gástrico accede al intestino delgado encuentra un medio idóneo para la absorción siendo la motilidad intestinal determinante del tiempo de residencia de los fármacos en el mismo y de su aprovechamiento. Un tránsito demasiado rápido puede llevar a una absorción incompleta, en especial si el fármaco tiene una constante de absorción muy baja; por el contrario un tránsito más lento favorecerá su absorción.

Los *movimientos del intestino delgado* más importantes son la *segmentación* y el *peristaltismo*. El primero es de carácter *miogénico* (autoexcitable) y se produce por despolarización rítmica de un grupo de células musculares, lo que origina una

contracción. El segundo es de carácter *neurogénico*, coordinado por los plexos nerviosos de Meissner y de Auerbach y dependiente de estímulos vagales. Las contracciones de *segmentación* son las más frecuentes en el intestino humano; son beneficiosas para la absorción de los principios inmediatos y de los fármacos, no hacen progresar el contenido intestinal, aseguran la mezcla homogénea de éste con los jugos intestinales y favorecen su contacto con la membrana absorbente.

El *peristaltismo*, en cambio, hace progresar el contenido intestinal y es el que condiciona el *tiempo de residencia* del fármaco en el intestino delgado. Entre comidas existe un peristaltismo basal muy débil, caracterizado por ondas que se inician en el duodeno y terminan en el íleon proximal o distal, muy lentas y espaciadas.

Utilizando técnicas de gamma escintigrafía se ha determinado que el tiempo de tránsito intestinal medio es de *3-4 horas*. Este hecho tiene una implicación elevada en el diseño de formas farmacéuticas de liberación sostenida por vía oral, ya que puede condicionar el tiempo disponible para la absorción de fármaco.

La acción que ejerce la *motilidad intestinal* sobre la *biodisponibilidad* de los fármacos se refleja más en la intensidad o magnitud que en la velocidad de absorción. Si la motilidad aumenta excesivamente, el tiempo de permanencia en el tracto gastrointestinal puede no ser suficiente para que el proceso de absorción se complete, en especial para fármacos poco solubles (cuyo proceso de disolución podría ser incompleto), los muy hidrófilos (cuya baja constante de absorción no garantiza que ésta sea completa) y los que se absorben por mecanismos especializados de transporte en lugares muy precisos (ventanas de absorción, que el fármaco atravesaría con demasiada rapidez para que su absorción sea lucrativa). Si los fármacos poseen una buena absorbabilidad en colon, algunos de estos defectos podrán paliarse, pero no es éste el caso general entre los fármacos sensibles a la motilidad intestinal.

En el *colon* el tiempo de residencia del fármaco es más prolongado que en intestino delgado y puede ser superior a las 24 horas.

En el *ciego*, el tránsito del contenido intestinal es rápido y fugaz. En el *colon*, los movimientos de *segmentación* son abundantes y frecuentes, pero *la actividad peristáltica es muy débil*, quedando reducida a contracciones extremadamente espaciadas, aunque enérgicas (2-3 al día), que tienden a evacuar el contenido hacia el recto. Sin embargo, los fármacos englobados en la materia fecal (que ocupa todo el colon descendente y parte del transversal) no pueden absorberse y, en la práctica, el tiempo útil para la absorción en colon (sobre todo en el tramo ascendente) es del

orden de 8-12 horas. Los muy hidrófilos (constante de absorción inferior a  $0,2 \text{ h}^{-1}$ ) y los que se absorben sólo por mecanismos especializados no mejoran, en cambio, su absorción global. Además, la abundante microflora bacteriana que se sitúa de forma autóctona en colon puede degradar determinados fármacos *in situ*, originando productos de descomposición inactivos lo que limita la absorción de fármacos en las fracciones distales del tracto gastrointestinal.

### 1.1.4 Perfusión sanguínea del tracto gastrointestinal

La red de capilares sanguíneos y linfáticos en el tracto gastrointestinal y el peritoneo es elevada. El *flujo sanguíneo* que reciben las vísceras y órganos abdominales (por encima y por debajo del mesocolon transversal), totaliza el 28% del latido cardíaco; esta irrigación, tan rápida y completa, representa un buen medio de drenaje para los fármacos absorbidos tras ser administrados por vía oral. Las pequeñas variaciones circadianas del flujo sanguíneo esplácnico tienen pocas repercusiones en la velocidad y en la magnitud de absorción de los fármacos; sin embargo, estados fisiológicos o patológicos como insuficiencias cardíacas congestivas, hemorragias (traumáticas o quirúrgicas), shocks, desvanecimientos y/o estados de tensión intensa pueden motivar deficiencias en la magnitud y/o retardos sensibles en la velocidad de absorción de los fármacos.

Si la absorción se realiza a través de los capilares linfáticos se evita el paso del fármaco por el hígado en su primer ciclo de circulación. El sistema linfático es importante en la absorción de dietas lipídicas y en consecuencia puede llegar a tener relevancia en la absorción de fármacos lipófilos. Muchos fármacos poco solubles en agua y solubles en aceite y lípidos, se solubilizan en quilomicrones y acceden a la circulación sistémica por vía linfática. Un ejemplo concreto lo constituye la formulación en quilomicrones de bleomicina para su administración por vía oral que se realiza para facilitar la absorción del fármaco por vía linfática.

## 1.2 Procesos de degradación de los fármacos

Los procesos de *degradación de los fármacos* administrados por vía oral, antes o después de la absorción (Tabla 2), pueden conllevar modificaciones en su biodisponibilidad en magnitud. Así, en la luz gastrointestinal, antes de su penetración a través de la membrana absorbente, se pueden ocasionar *pérdidas de la dosis administrada* como resultado de la formación de complejos insolubles debida a la interacción del fármaco con *sustancias endógenas* (mucina, sales



biliares) o con los iones procedentes de la ingesta de alimentos ( $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{2+}$  principalmente). La formación de complejos insolubles puede conseguir la interrupción de la circulación enterohepática de determinados fármacos (metotrexato, anticolinérgicos) por lo que en ocasiones se administran dietas ricas en fibra para facilitar la excreción de los fármacos y así reducir las concentraciones plasmáticas de los mismos.

**Tabla 2.** Procesos de degradación de los fármacos administrados por vía oral que transcurren antes o después de la absorción y modifican su biodisponibilidad en magnitud.

Pérdida de absorbabilidad (Factores que interactúan en la luz intestinal)	Efecto de primer paso (Factores que actúan tras la absorción del fármaco)
Propiedades fisicoquímicas inadecuadas	Excreción activa en la mucosa intestinal
Adsorción a sustancias endógenas	Metabolismo intestinal durante la absorción
Efecto del pH	Metabolismo hepático en el primer ciclo de circulación
Acción enzimática en los fluidos intestinales	
Acción enzimática de la microflora bacteriana	

La *degradación química* por efecto del *pH* del tracto gastrointestinal puede manifestarse sobre la magnitud de absorción de los fármacos administrados por vía oral tanto si éstos se administran en forma sólida como ya disueltos (ampicilina, eritromicina, omeprazol, digoxina). El mismo resultado se deriva del efecto de la *degradación enzimática* del fármaco en el lumen intestinal por la acción de *enzimas procedentes de los fluidos intestinales* o de la *flora bacteriana*. Las proteasas son sin duda el principal inconveniente para la administración oral de fármacos peptídicos, como la *oxitocina*, *calcitonina* o *insulina*, los cuales se descomponen por acción de las mismas en la luz intestinal.

La flora saprofítica efectúa reacciones metabólicas de *hidrólisis* y también de *reducción*. El metabolismo por parte de la microflora intestinal puede ser significativo para los fármacos de absorción lenta y, en un sentido más general, para aquéllos en los que la disolución es el factor limitativo de su absorción, ya que alcanzan sin absorberse las fracciones distales del tracto gastrointestinal.

## 1.3 Mecanismos de absorción de los fármacos a través de la membrana intestinal.

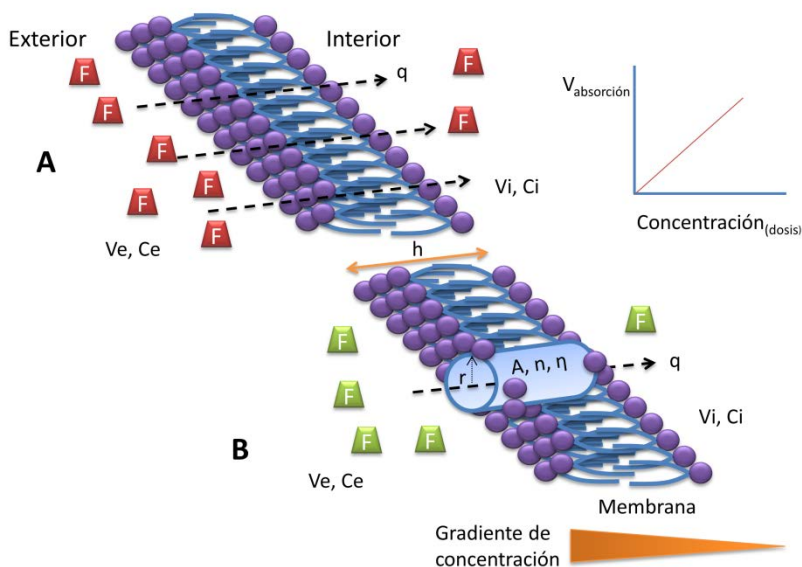
Las membranas absorbentes actúan como barreras selectivas al paso de moléculas de acuerdo con los mecanismos de difusión pasiva a través de membrana lipídica, a través de poros acuosos (difusión convectiva o filtración) o a través de las aberturas que dejan, por su parte superior, las uniones estancas entre las células adyacentes (difusión paracelular), mecanismos especializados de transporte, formación de pares de iones y pinocitosis o endocitosis. En la mucosa gástrica predomina la difusión pasiva. En intestino delgado, que es la zona más especializada en la absorción, pueden tener lugar todos los mecanismos citados. En intestino grueso y en recto predomina la difusión pasiva por membrana, aunque puede producirse endocitosis.

### 1.3.1 Difusión pasiva y difusión convectiva

Son los procesos pasivos que pueden considerarse mayoritarios en la absorción de los fármacos, el primero especialmente en el tracto gastrointestinal pero también por otras vías de administración y el segundo tras administración por vía intramuscular y subcutánea.

La difusión del soluto a través de la **membrana celular** es la vía mayoritaria. La velocidad del transporte neto del sustrato es proporcional a la diferencia de concentración entre ambos lados de la membrana (Figura 1 A). Este mecanismo de absorción depende de las propiedades fisicoquímicas del soluto, especialmente del grado de ionización y de la lipofilia ya que, en general, sólo se absorbe la fracción no disociada de la molécula.

La difusión convectiva o filtración se lleva a cabo a través de **poros acuosos** o acuaporinas (Figura 1 B) es función inversa del tamaño molecular del fármaco y se produce tras administración del fármaco por vía oral en el intestino delgado en la membrana endotelial de los capilares sanguíneos y linfáticos.



**Figura 1.** Representación esquemática de la difusión pasiva a través de membranas lipídicas (A) y difusión convectiva (a través de poros acuoso) (B) y parámetros que definen la cantidad de fármaco que atraviesa la membrana por unidad de tiempo (velocidad de absorción). La velocidad de absorción (C) es proporcional a la concentración de fármaco.  $V_e$ : volumen del compartimento exterior,  $V_i$ : volumen del compartimento interior,  $C_i$ : concentración del fármaco en el compartimento interior,  $h$ : espesor de la membrana,  $k_d$ : Constante de difusión del fármaco,  $q$ : cantidad de fármaco que atraviesa la membrana por unidad de tiempo,  $A$ : superficie del poro,  $n$ : número de poros,  $\eta$ : viscosidad del fluido en el interior del poro,  $r$ : radio del poro.

El modelo más simple que describe el proceso de absorción pasiva es el que considera dos compartimentos acuosos separados por una barrera lipídica, la membrana celular, que el fármaco debe atravesar por difusión. La velocidad de absorción se expresa con la ecuación siguiente:

$$-\frac{dA}{dt} = k_a \cdot A \quad (1)$$

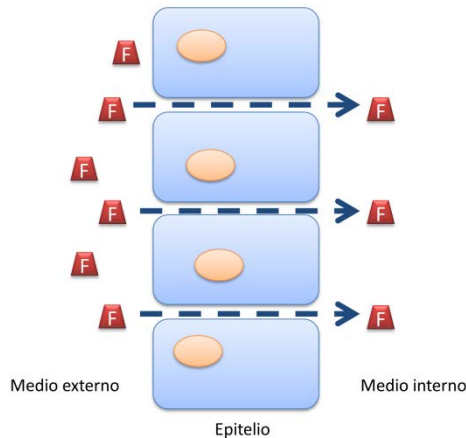
En esta ecuación, la velocidad de desaparición del fármaco del lugar de absorción ( $dA/dt$ ) es proporcional a su concentración ( $A$ ), lo cual indica que se trata de un proceso de primer orden. Al integrar la **ecuación 1** en el intervalo de tiempo definido entre 0 y  $t$ , se obtiene:

$$A = A_0 \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad (2)$$

en la que  $A_0$  representa la concentración del fármaco en el lugar de absorción a tiempo cero,  $A$  la concentración remanente al tiempo  $t$  considerado y  $k_a$  la constante de primer orden representativa del proceso de absorción.

En el caso de fármacos polares, la formación de complejos neutros (**formación de pares iónicos**) puede permitir la difusión pasiva a través de la membrana del complejo, que libera el fármaco en el interior.

Un fármaco puede asimismo difundir entre los espacios intercelulares (**difusión paracelular**) (Figura 2). La difusión se realiza a favor de gradiente de concentración. La velocidad de absorción en estos casos es igualmente proporcional a la concentración (análoga a la difusión pasiva). Esta vía queda restringida a solutos de bajo peso molecular e hidrofiliía elevada.

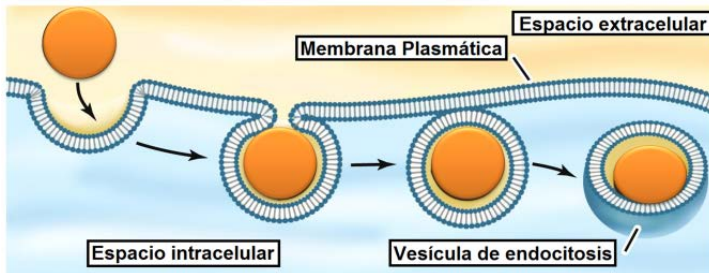


*Figura 2. Mecanismo de transporte de un fármaco por difusión paracelular*

### 1.3.2 Absorción por endocitosis

Se lleva a cabo mediante la formación de vesículas que engloban el material a transportar y lo introducen en el interior de la célula a través de la membrana (Figura 3). Para ello, la membrana se invagina, rodeando bien una gota de líquido extracelular (pinocitosis) o bien una partícula sólida (fagocitosis).

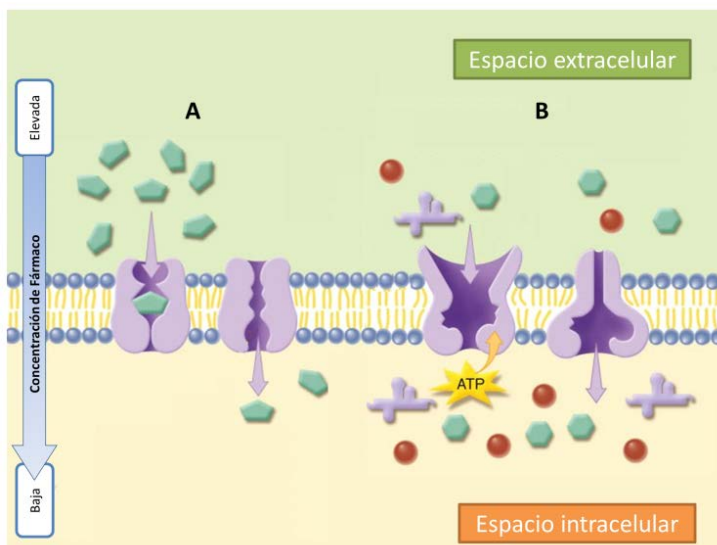
Este mecanismo es el único que posibilita la absorción de fármacos aunque no se encuentren previamente en disolución y es poco habitual. También existe una variedad especial de endocitosis que está mediada por receptores; en este caso, las células sintetizan receptores que reconocen las sustancias a transportar y gracias a ellos se posibilita la formación de las vesículas y la entrada del producto en el interior de la célula.



*Figura 3. Esquema del transporte de un fármaco a través de una membrana por endocitosis.*

### 1.3.3 Mecanismos especializados de transporte

Los mecanismos especializados de transporte engloban la difusión facilitada y el transporte activo. La **difusión facilitada** (Figura 4 **A**) se realiza a favor de gradiente y no requiere consumo de energía metabólica mientras que el **transporte activo** (Figura 4 **B**) se realiza en contra de gradiente electroquímico y de concentración y, por ello, requiere consumo de energía. En ambos casos, el fármaco utiliza portadores para su absorción. Los portadores son componentes de la membrana de naturaleza proteica y se caracterizan por ser selectivos (hay especificidad de unión) y saturables. Tienen la capacidad de tomar moléculas de soluto del lumen intestinal y formar un complejo reversible con ellas. El complejo atraviesa la membrana absorbente hasta llegar al citoplasma donde libera al sustrato y de allí, pasa al torrente sanguíneo. Desde el citoplasma, el portador regresa a la zona mucosa para repetir el proceso. Este mecanismo de transporte se realiza de manera unidireccional. En la fase de absorción los procesos de transporte activo tienen lugar casi exclusivamente tras administración por vía oral en intestino delgado.



**Figura 4.** Representación esquemática de los mecanismos de transporte especializado. A) Difusión facilitada mediante transportadores y B) transporte activo.

El proceso que transcurre mediante mecanismos especializados de transporte se ajusta a una **cinética de Michaelis-Menten** que se define por la siguiente ecuación:

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{V_m \cdot A}{K_m + A} \quad (3)$$

en la que  $dA/dt$  corresponde a la variación instantánea de la concentración de fármaco en el lugar de absorción en función del tiempo,  $A$  es la concentración de soluto remanente en el lugar de absorción,  $V_m$  es la velocidad máxima que puede alcanzar el proceso de absorción y  $K_m$  es la constante de Michaelis-Menten, que corresponde a la concentración a la cual la velocidad del proceso es la mitad de la velocidad máxima.

Esta ecuación permite establecer diferentes aproximaciones en función de la magnitud relativa de  $A$  y  $K_m$ . Cuando la concentración de fármaco ( $A$ ) en el lugar de absorción es muy pequeña, ésta puede considerarse despreciable frente al valor de la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) de manera que la ecuación resulta:

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{V_m}{K_m} \cdot A = k_{ap} \cdot A \quad (4)$$

en la que la velocidad de absorción es proporcional a la concentración del fármaco en el lugar de absorción, resultando una cinética aparente de difusión pasiva. Por consiguiente, este proceso puede tratarse como una cinética de orden uno, en la que  $k_{ap}$  representa la constante aparente de velocidad de absorción de primer orden del fármaco.

Si la concentración del fármaco en el lugar de absorción es elevada,  $K_m$  puede considerarse despreciable frente al valor de la concentración de fármaco ( $A$ ), con lo que el proceso de absorción resulta análogo a una cinética de orden cero, en la que la velocidad aparente de absorción es constante e independiente de la concentración de fármaco en el lumen intestinal, resultando:

$$-\frac{dA}{dt} = V_m = k_0 \quad (5)$$

en la que  $k_0$  representa la constante aparente de velocidad de absorción de orden cero.

### 1.3.4 Cinética combinada: difusión pasiva y transporte activo

Existen sustancias que pueden absorberse simultáneamente por difusión pasiva y por transporte mediado por portadores. En estos casos, la velocidad global de absorción se define por una cinética combinada de ambos procesos, cuya ecuación diferencial es la siguiente:

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{V_m \cdot A}{K_m + A} + k_a \cdot A \quad (6)$$

Para intervalos de tiempo pequeños, y siempre que el proceso global pueda ajustarse a una cinética de orden uno,  $(dA/dt)/A$  equivale a la constante aparente de absorción de primer orden:

$$-\frac{dA/dt}{A} = k_{ap} = \frac{V_m}{K_m + A} + k_a \quad (7)$$

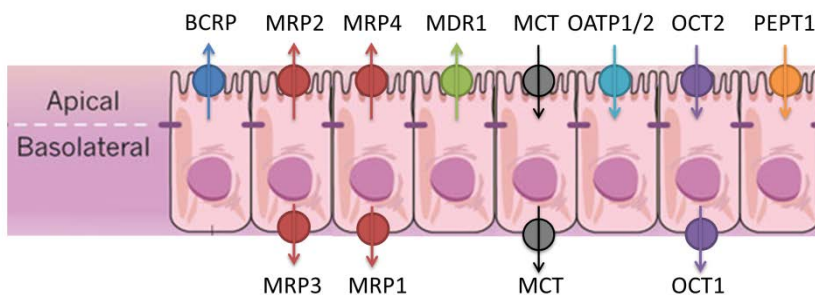
En general, que un proceso prevalezca sobre el otro depende exclusivamente de los valores relativos de  $k_a$ ,  $V_m$ ,  $K_m$  y la concentración de soluto en el lugar de absorción. Para concentraciones pequeñas, resulta más representativo el proceso de absorción activa que la difusión pasiva y para concentraciones elevadas, se saturan los portadores, y por ello, resulta más importante la contribución de la difusión pasiva al proceso de absorción.

## 1.4 Transportadores intestinales

El intestino delgado presenta numerosas estructuras de membrana de carácter proteico que actúan como transportadores específicos de nutrientes (azúcares, aminoácidos, vitaminas...) y compuestos estructuralmente relacionados. Estas proteínas se encuentran en la membrana luminal y/o basal de los enterocitos y pueden facilitar el paso de sustancias a la zona citosólica o serosa. Por tanto, pueden condicionar la absorción o la secreción de sus sustratos (Figura 5).

Estas proteínas de transporte tienen un papel esencial en las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de los fármacos ya que pueden condicionar la absorción oral y por tanto la biodisponibilidad, así como la generación de resistencias a la acción farmacológica y/o toxicidad. Debido a la su importancia y a que cada vez es mayor el número de proteínas identificadas, se hace necesario recurrir a su clasificación.

La mayoría de transportadores de fármacos se clasifican en dos subfamilias genéticas: SLC (Solute Carrier) y ABC (ATP-binding cassette). Los transportadores SLC emplean gradiente electroquímico de solutos inorgánicos/orgánicos, mientras que los ABC utilizan la energía procedente de la hidrólisis de ATP.



**Figura 5.** Localización de los principales sistemas de transporte del epitelio intestinal



## 1.4.1 Transportadores SLC

Son co-transportadores que emplean un voltaje y/o gradiente electroquímico para transportar iones y solutos juntos, por ello participan en el transporte activo secundario de gran número de sustancias, como aminoácidos, oligopéptidos, glucosa y otros azúcares, iones orgánicos, acetilcoenzima A, metales esenciales, aminas biogénicas, neurotransmisores, vitaminas, ácidos grasos y lípidos, nucleósidos, amonio, colina, hormona tiroidea y urea<sup>10</sup>. En esta superfamilia destacan:

### 1.4.1.1 Transportadores de oligopéptidos (SLC15A/PEPT)

El transportador H<sup>+</sup>/oligopéptido PEPT1 (SLC15A1) se expresa en el duodeno, y se localiza en la membrana apical de los enterocitos (Figura 5). La absorción de sustratos está mediada por un gradiente de protones y el potencial de membrana de la superficie apical de las células epiteliales. Por tanto, se trata de un sistema de co-transporte protón-dependiente. Se ha caracterizado como un transportador de baja afinidad/alta capacidad, ya que se satura con altas concentraciones de sustrato. Entre los sustratos transportados por este sistema se incluyen antibióticos β-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas), inhibidores de renina, el agente anticanceroso bestatina, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (captopril) y profármacos ester como enalapril, así como dipéptidos y tripéptidos derivados de la digestión de las proteínas de la dieta. Debido a la gran especificidad de sustrato, se considera un atractivo candidato para mejorar la absorción intestinal de fármacos, similares estructuralmente a los aminoácidos, que puedan convertirse químicamente en derivados péptido-miméticos<sup>11</sup>.

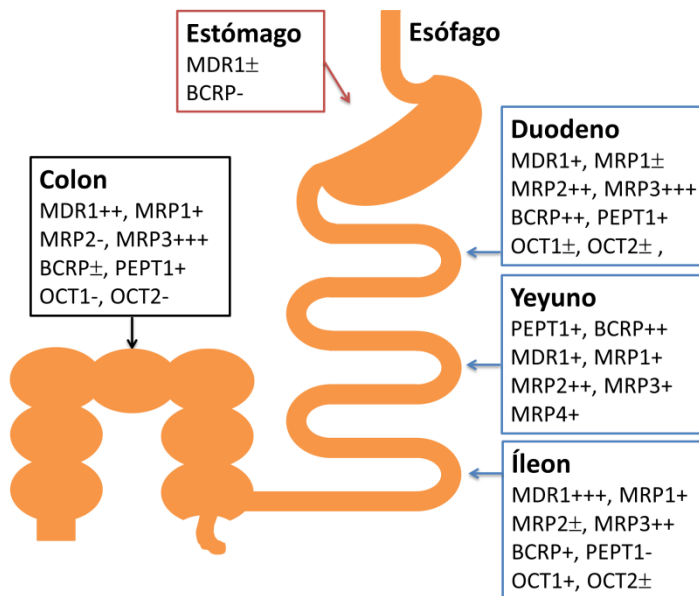
### 1.4.1.2 Transportadores de ácidos monocarboxílicos (SLC16A/MCT)

Se han identificado nueve isoformas, con diferente distribución tisular, cuatro de las cuales están presentes en intestino delgado y células Caco-2: MCT1, MCT4, MCT5 y MCT8. MCT1 es la isoforma más abundante. Se localiza en las membranas apical y basolateral de las células epiteliales absorbentes, lo que sugiere que podría jugar un importante papel en la absorción de ácidos monocarboxílicos en intestino delgado (Figura 5). Transporta no sólo ácidos monocarboxílicos endógenos como ácido láctico y ácido pirúvico, sino también ácido benzoico, ácido nicotínico, ácido salicílico y ácido valproico<sup>11</sup>. Este

transporte se realiza de manera pH-dependiente. Algunos antiinflamatorios no esteroideos (ej. Ibuprofeno) son sustratos de MCT.

### **1.4.1.3 Transportadores de solutos orgánicos (SLC22A)**

Los miembros de la familia de transportadores de aniones/cationes orgánicos se localizan en intestino delgado, hígado, y cerebro, y tienen un importante papel en la farmacocinética de fármacos. Comprende tres subfamilias: transportadores de cationes orgánicos (OCT), transportadores de catión/carnitina orgánico (OCTN) y transportadores de aniones orgánicos (OAT). La mayoría de fármacos de uso terapéutico (antihistamínicos, relajantes del músculo esquelético, antiarrítmicos, agentes bloqueantes de receptores  $\beta$ -adrenérgicos) y aminas bioactivas endógenas (catecolaminas, colina, histamina) son cationes orgánicos y, por tanto, sustratos de transportadores OCT. El transportador OCT1 se localiza en la membrana basolateral de células epiteliales del intestino delgado, y podría estar implicado en la eliminación de compuestos endógenos y/o xenobióticos. Las células Caco-2 también expresan RNAm para este transportador. Por tanto, podría jugar un papel relevante en la excreción al lumen intestinal. El transportador OCTN2 es un transportador  $\text{Na}^+$ -dependiente para carnitina, aunque también transporta varios tipos de cationes orgánicos de manera independiente de  $\text{Na}^+$ . Se localiza en la membrana apical de borde en cepillo de las células del epitelio intestinal. Su expresión en intestino delgado es significativamente más alta que la de otros miembros SLC22 (Figura 5 y Figura 6).



*Figura 6. Localización y expresión de los transportadores de las familias SLC y ABC en diferentes tramos del sistema gastrointestinal humano (de mayor a menor nivel de expresión: +++, ++, +, ±, -)*

#### 1.4.1.4 Transportadores de aniones orgánicos polipeptídicos (SLC21A/OATP)

Hasta la fecha se han identificado pocos transportadores pertenecientes a la familia OATP en el tracto gastrointestinal. La mayoría de estudios de caracterización funcional se han llevado a cabo en cultivos celulares, ya que la evaluación in vivo sobre la posible participación de los OATPs en el transporte intestinal de agentes terapéuticos está obstaculizada por la falta de inhibidores. Por este motivo, los datos in vivo que apoyan el papel de los miembros SLC21A en la absorción oral son todavía muy limitados. Los transportadores SLCO1A2 (OATP-A) y SLCO2B1 (OATP-B) se localizan en la cara apical de las células del epitelio intestinal como transportadores de absorción, sin embargo, su localización subcelular y función concreta es aún desconocida. La especificidad de sustrato de los transportadores OATP1A y OATP2B es muy amplia y se solapa entre miembros de las subfamilias. Participan en el transporte de compuestos endógenos como sales biliares, bilirrubina, hormonas tiroideas y metabolitos conjugados de hormonas esteroideas. Asimismo, se ha identificado un creciente número de fármacos y toxinas sustratos de OATP. Ejemplos de estos fármacos son glucósidos cardiotónicos como digoxina y ouabaína, agentes de contraste de imágenes para resonancia magnética como

gadoxetato, inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa como atorvastatina, antibióticos bencilpenicilinas, rifampicina, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina como enalapril, agentes quimioterápicos como metotrexato, cisplatino y sus derivados, el antihistamínico fexofenadina, el antagonista del receptor de endotelina BQ-123, el inhibidor de trombina CRC-220, agonistas de receptores opioides e incluso algunos fármacos catiónicos orgánicos como quinina y quinidina. Además, pueden mediar la absorción de toxinas como microcistina y ocratoxina A<sub>12</sub>. En general, se puede concluir que los sustratos de OATP son principalmente moléculas aniónicas anfipáticas de alto peso molecular (>450 Da) y alto grado de unión a albúmina bajo condiciones fisiológicas. Poco se conoce acerca del gradiente que media el transporte, aunque está bien establecido que estos transportadores actúan de manera independiente del sodio. Varios sustratos e inhibidores del transportador OATP lo son también de la glicoproteína-P. Un claro ejemplo de ello lo constituyen la fexofenadina y los zumos de frutas. La fexofenadina es absorbida y secretada por OATP-A y glicoproteína-P, respectivamente. Al mismo tiempo, este transporte es inhibido, en ambos sentidos, por los zumos de frutas, aunque la potencia inhibitoria sobre OATP-A es mucho mayor que la ejercida sobre glicoproteína-P<sub>13</sub>. Por tanto, se trata de proteínas de transporte multiespecíficas que tienen un pronunciado papel en la biodisponibilidad, distribución y excreción de una amplia variedad de fármacos, toxinas, compuestos endógenos y sus metabolitos.

## **1.4.2 Sistemas de secreción de los fármacos (transportadores ABC)**

El epitelio intestinal y otras membranas celulares poseen sistemas especializados de transporte que actúan en dirección serosa-mucosa (contratransporte) favoreciendo por tanto la secreción de los fármacos una vez absorbidos hacia el lumen intestinal. Se trata de proteínas transportadoras ATP dependientes<sup>14</sup>. Estos procesos de secreción son saturables y obedecen a una cinética de primer orden cuando la concentración de fármaco en el medio es baja, o por el contrario, a una cinética de Michaelis-Menten cuando aumenta la concentración de sustrato en el medio. Así pues, cuando intervienen procesos de secreción intestinal la ecuación general que describe el proceso de absorción debe incluir un término que cuantifique la ganancia de fármaco en lumen intestinal por efecto de la secreción intestinal. En el caso concreto de que el proceso de absorción siga una cinética de primer orden y el de secreción una cinética de Michaelis-Menten la ecuación que contempla ambos procesos es la siguiente:

$$-\frac{dA}{dt} = k_a \cdot A - \frac{V_m \cdot A}{K_m + A} \quad (8)$$

En la que el término  $(V_m \cdot A/K_m + A)$  cuantifica la ganancia de fármaco en lumen intestinal debida al proceso de secreción.

Dentro de esta superfamilia de transportadores tienen especial importancia la glicoproteína P (MDR1), algunas proteínas de resistencia a fármacos (MRPs) y las proteínas de resistencia a cáncer de mama (BCRP). Estos transportadores pueden estar localizados en la membrana apical o en la basolateral. Los que tienen su expresión en la cara apical transportan el sustrato desde el interior de la célula al espacio luminal (efflux o secreción) pudiendo tener una notable influencia en el proceso de absorción de los fármacos. Otros, como el MRP1, como se verá más adelante, bombean sus sustratos hacia la sangre<sup>15</sup>. En este último caso actúan en el mismo sentido que la difusión pasiva y por ello la ecuación que podría utilizarse para describir el proceso es la ecuación 6. A continuación se resumen brevemente los principales subgrupos.

#### 1.4.2.1 Glicoproteína-P (MDR1/ABCB1)

La glicoproteína-P está codificada por genes que pertenecen al sistema de multiresistencia a fármacos (MDR). Estos genes constituyen una familia génica pequeña que en los humanos se subdivide en dos tipos, MDR1 y MDR2, y están asociados a distintas funciones fisiológicas. La proteína codificada por el gen MDR1 está ligada a la capacidad detoxificadora frente a fármacos (glicoproteína-P), mientras que la codificada por el gen MDR2 parece estar involucrada en el transporte hepático de fosfolípidos<sup>16</sup>.

La glicoproteína-P fue descubierta en varios tumores celulares como causante de las resistencias a fármacos. No obstante, tiene elevado nivel de expresión en variedad de tejidos sanos, entre ellos el intestino. Es, probablemente, el transportador de secreción mejor conocido del intestino. Se localiza en la membrana de borde en cepillo de las células del epitelio intestinal y su expresión aumenta gradualmente desde la región proximal del intestino a la distal<sup>17</sup>.

La unidad central del transportador está constituida por cuatro dominios, dos dominios de unión a nucleótidos citoplasmáticos (NBD) y dos dominios transmembrana (TMD). Los dos NBDs juntos unen e hidrolizan el ATP,

proporcionando así la energía necesaria para el transporte, mientras que los TMDs participan en el reconocimiento del sustrato y su translocación a través de la membrana lipídica.

Estudios de unión a radioligandos usados para caracterizar los sitios de interacción a fármacos revelan la existencia de, al menos, cuatro sitios de unión de fármacos, junto con sitios reguladores que modifican la función de la glicoproteína-P. Se cree que estos sitios de unión constituyen múltiples segmentos transmembrana, lo que conduce a la hipótesis de que la glicoproteína-P une los sustratos a través de un mecanismo de encaje inducido, donde el tamaño y forma del sustrato cambia la disposición (packing) de los segmentos transmembrana.<sup>18</sup> Se trata de una proteína transmembrana dependiente de ATP y de la temperatura, e independiente del sodio y protones. Asimismo, sufre inhibición, dependiente de la dosis, por competidores específicos.

Es un transportador inespecífico, que presenta afinidad por amplia variedad de fármacos, de múltiples clases terapéuticas y diferentes estructuras y actividades farmacológicas. El único rasgo característico común en todos los sustratos transportados por la glicoproteína-P es su carácter anfipático. Estos sustratos presentan un peso molecular comprendido entre 300 y 2000 Da y pueden ser básicos, ácidos o sin carga. Los fármacos que son transportados por la glicoproteína-P pueden actuar como sustratos o como moduladores (inhibidores o activadores)<sup>19</sup>. Entre estos compuestos se encuentran fármacos anticancerosos (paclitaxel), (3-bloqueantes (celiprolol y talinolol), otros fármacos cardiovasculares (quinidina), antibióticos, antivirales, corticosteroides, antihistamínicos (fexofenadina), antieméticos, estatinas, bloqueantes de canales de calcio, agentes inmunosupresores y otros compuestos como loperamida.<sup>20</sup> Numerosos estudios han intentado establecer una relación entre estructura e interacción. Los mecanismos descritos incluyen: interacción directa con uno o más de los sitios de unión, actuando como inhibidor competitivo o no competitivo; interacción con el ATP, ya sea inhibiendo la unión de éste, su formación o su acoplamiento en la translocación del sustrato e interacción con la membrana lipídica de las células, ya sea por modificación del entorno celular o por interacción de la unión fármaco-membrana.

La actividad de la glicoproteína-P está íntimamente relacionada con la de la enzima metabolizadora CYP3A4. Ambas proteínas detoxificadoras comparten sustratos y, aunque las regiones de expresión son algo diferentes (la primera se expresa mayoritariamente en la zona distal del intestino delgado y la segunda, en la zona proximal), forman un mecanismo coordinado de defensa frente a compuestos exógenos nocivos y fármacos.

### 1.4.2.2 Sistema de resistencia múltiple a fármacos (MRP/ABCC)

Los transportadores MRP, que constituyen la familia C de la superfamilia ABC, tienen capacidad para mediar el transporte transmembrana de muchos compuestos y fármacos (conjugados). Desafortunadamente se conoce poco sobre el proceso de transporte mediado por ABCC que ocurre en la membrana apical o basolateral del epitelio intestinal (Figura 5 y Figura 6)<sup>19</sup>. Se han caracterizado trece miembros, entre los que destaca MRP2, también llamado cMOAT. Son proteínas transmembrana con un peso molecular aparente de 190 kDa que pueden dividirse en dos grupos según presenten o no el dominio transmembrana cero (TMD<sub>0</sub>).

La distribución de MRP 1 (ABCC 1) en el organismo es amplia, con altos niveles en intestino. Se localiza en la membrana basolateral de células epiteliales polarizadas y su función fisiológica es proteger dichas células frente a sustratos tóxicos por su expulsión a la sangre. Además, su actividad es más efectiva cuando se acopla con la glicoproteína-P. Diversos estudios con líneas celulares cancerígenas han demostrado la capacidad de MRP 1 para conferir resistencia a fármacos antineoplásicos como doxorubicina, vincristina y daunorubicina. También transporta aniones de metales pesados, péptidos citotóxicos, fármacos hidrofóbicos y conjugados de glutatión (GSH), glucuronato o sulfato<sup>20</sup>. La participación de MRP 1 en la disposición intestinal de fármacos aún no ha sido aun claramente establecida y no se conocen inhibidores eficientes y selectivos.

El transportador MRP2 (ABCC2) por el contrario, se expresa en la membrana apical de los enterocitos. Los niveles incrementan desde la cripta hasta las vellosidades. La expresión es más elevada en la región proximal del intestino y decrece hacia el íleon distal. Es una bomba que media la resistencia celular de muchos citotóxicos y transporta inhibidores de la proteasa VIH, fosfonatos de nucleósidos, ácido p-aminohipúrico y antibióticos fluoroquinolonas<sup>21</sup>. La expresión y función de MRP2 está regulada por la coadministración de fármacos, por productos naturales y por estados de enfermedad como el síndrome de Dubin-Johnson. Desempeña un papel funcional en la secreción intestinal de muchos fármacos entre los que se incluyen compuestos aniónicos conjugados y no conjugados, cotransporte de fármacos de bases débiles con GSH y/o metabolitos. También transporta constituyentes de la dieta como los flavonoides. Los compuestos transportados por MRP2 muestran una gran similitud con los transportados por la glicoproteína-P, aunque no hay un solapamiento completo en los sustratos. La co-localización de ambas proteínas en la membrana apical de importantes tejidos en la disposición de fármacos representa una excelente barrera para los mismos. Existen muchos estudios que revelan la participación de MRP2 en detoxificación de fármacos y limitación de la absorción oral de sus ligandos por

expulsión al lumen intestinal. Sin embargo, y en contraste a la glicoproteína-P, las investigaciones clínicas acerca de la influencia en la biodisponibilidad oral de sus sustratos son escasas. Los sustratos aniónicos de MRP2 actúan como inhibidores competitivos cuando se aplican en sistemas celulares *in vitro* y, además, la mayoría de sustratos MRP2 son también transportados por otros transportadores como los SLCs. Las enzimas de conjugación de fase II, UDP-glucuroniltransferasa y glutatión S-transferasa, muestran un patrón de distribución similar a la expresión de MRP2 en intestino<sup>22</sup>. Por tanto, es posible que actúen de manera sinérgica en la detoxificación y excreción intestinal de fármacos.

El MRP3 (ABCC3) se expresa principalmente en hígado, pero también está presente en intestino delgado y colon. Se localiza en la membrana basolateral. En intestino su expresión es mayor en íleon y colon y aumenta desde la cripta hasta la cima de los villi. Comparte sustratos con MRP2, ya que transporta una amplia variedad de sales biliares, aniones orgánicos no conjugados y conjugados glucurónidos. Su afinidad por las sales biliares y su expresión en intestino hacen pensar una posible participación de MRP3 en la reabsorción de las mismas, como parte del ciclo enterohepático<sup>23</sup>. Al mismo tiempo, MRP3 intestinal es regulada por la exposición de sales biliares. También, puede conferir resistencia a fármacos anticancerosos como etopósido y metotrexato.

MRP4 (ABCC4) se encuentra, en bajos niveles, en yeyuno. Transporta ácido fólico, ácido folínico, metotrexato, cAMP, cGMP, estradiol-17 $\beta$ -glucurónido y ácidos biliares. También se ha propuesto un posible papel fisiológico en la liberación celular de prostaglandina E. A pesar de expresarse en la membrana apical de las células del yeyuno, la función exacta de MRP4 en el transporte intestinal de fármacos no ha sido clarificada. Se cree que podría limitar la absorción intestinal de análogos fosfonatos de nucleósidos contribuyendo a su baja biodisponibilidad oral.

#### **1.4.2.3 Proteína de resistencia de cáncer de mama (ABCG2/BCRP)**

La proteína BCRP pertenece a la subfamilia ABCG. Es una proteína de 655 aminoácidos y 72 kDa, que presenta sólo un dominio de unión a nucleótidos en el segmento amino terminal y un único dominio transmembrana, con seis segmentos transmembrana, en el carboxilo terminal. Por tanto, BCRP es un "medio" transportador ABC<sup>s</sup>.

Se expresa en células tumorales donde media el transporte de secreción de fármacos y tiene un importante efecto sobre la biodisponibilidad oral de fármacos



anticancerosos. También se encuentra en células sanas de intestino delgado y colon entre otros, presentando una mayor expresión en yeyuno. Se localiza en la membrana de borde en cepillo y desempeña una importante función en la expulsión al lumen intestinal de conjugados de glucuronato y sulfato formados en los enterocitos. Estudios in vivo demuestran que BCRP secreta los mismos sustratos que la glicoproteína-P. Por otro lado, compuestos que interactúan con la glicoproteína-P pueden modular la actividad in vitro de BCRP, inhibiéndola<sup>22</sup>. Por tanto, BCRP y la glicoproteína-P podrían desarrollar una función similar en la regulación de la absorción y disposición de fármacos sustratos.

---

<sup>1</sup> Hills, B. A., Butler, B. D. & Lichtenberger, L. M. "Gastric mucosal barrier: hydrophobic lining to the lumen of the stomach." *American Journal of Physiology*, Vol. 244, No. 5, Issn 0002-9513. 1988, 561-568.

<sup>2</sup> Jiménez Torres, N. V., Merino Sanjuán, M., Ordovas Bainés, J. P. & Casabó Alós, V. G.. "Interacciones entre medicamentos y alimentos: bases farmacoterapéuticas", (1), Convaser CEE, Valencia. 1999.

<sup>3</sup> Jiménez Torres, N. V., Merino Sanjuán, M. & Porta Oltra, B. "Interrelaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas en el paciente subsidiario de soporte nutricional", in *Interrelación entre fármacos y nutrientes en situaciones fisiopatológicas determinadas*, M. V. Calvo Hernández & M. Planas Vilá, Issn 0002-9513. 2008, 17-30

<sup>4</sup> Bertau, M., Mosekilde, E. & Westerhoff, H. V. "Correlation between in vitro in situ and in vivo models", in *Biosimulation in Drug Development* (1), Wiley-VCH, Isbn 9783527622689, Weinheim. 2008, 540-550

<sup>5</sup> Jiménez, N. V., Plá, J. M. & Martín, A. "Factores Fisiológicos en la Absorción Gastrointestinal (I)", in *Biofarmacia y farmacocinética volumen II: biofarmacia*, J. Domenech, J. Martínez & J. M. Plá, Síntesis, Isbn 8477386129, Madrid. 1998, 163-187

<sup>6</sup> Swaan, P. W., Oie, S. & Szoka, F. C. "Carrier Mediated Oral Drug Delivery" *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 20, No. 1, 1995, 1-3

<sup>7</sup> Klaassen, C. D. & Aleksunes, L. M. "Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: function and regulation". *Pharmacological Reviews*, Vol. 62, No. 1, 2010, 1-96

<sup>8</sup> Oostendorp, R. L., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. "The biological and clinical role of drug transporters at the intestinal barrier". *Cancer Treatment Reviews*, Vol. 35, No. 2, 2008, 137-147

<sup>9</sup> Makhey, V. D., Guo, A., Norris, D. A., Hu, P., Yan, J. & Sinko, P. J. "Characterization of the regional intestinal kinetics of drug efflux in rat and human intestine and in Caco-2 cells". *Pharmaceutical Research*, Vol. 15, No. 8, 1998, 1160-1167

- 
- <sup>10</sup> He, L., Vasiliou, K. & Nebert, D. W. "Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily". *Human Genomics*, Vol. 3, No. 2, 2009, 195-206
- <sup>11</sup> Sugiura, T., Kato, Y. & Tsuji, A. "Role of SLC xenobiotic transporters and their regulatory mechanisms PDZ proteins in drug delivery and disposition". *Journal of Controlled Release*, Vol. 116, No. 2, 2006, 238-246
- <sup>12</sup> Leuthold, S. D. "Structure-function Relationship of Organic Anion Transporting Polypeptides", , Zürich ETH, 2007
- <sup>13</sup> Dresser, G. K., Bailey, D. G., Leake, B. F., Schwarz, U. I., Dawson, P. A., Freeman, D. J. & Kim, R. B. "Fruit juices inhibit organic anion transporting polypeptide-mediated drug uptake to decrease the oral availability of fexofenadine". *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, Vol. 71, No. 1, 2002, 11-20
- <sup>14</sup> Scherrmann, J. M. "Transporters in absorption, distribution, and elimination". *Chemistry & Biodiversity*, Vol. 6, No. 11, 2009, 1933-1942
- <sup>15</sup> Chan, L. M., Lowes, S. & Hirst, B. H. "The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 21, No. 1, 2004, 25-51
- <sup>16</sup> Smit, J. J., Schinkel, A. H., Oude Elferink, R. P., Groen, A. K., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C. A., Ottenhoff, R., van der Lugt, N. M., van Roon, M. A. "Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease". *Cell*, Vol. 75, No. 3, 1993, 451-462
- <sup>17</sup> Spahn-Langguth, H., Baktir, G., Radschuweit, A., Okyar, A., Terhaag, B., Ader, P., Hanafy, A. & Langguth, P. "P-glycoprotein transporters and the gastrointestinal tract: evaluation of the potential in vivo relevance of in vitro data employing talinolol as model compound". *International Journal of Clinical Pharmacology*, Vol. 36, No. 1, 1998, 16-24
- <sup>18</sup> Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I. & Gottesman, M. M. "Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter". *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol. 39, No., 1999, 361-398
- <sup>19</sup> Vasiliou, V., Vasiliou, K. & Nebert, D. W., 2009. "Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family". *Human Genomics*, Vol. 3, No. 3, 2005, 281-290
- <sup>20</sup> Colabufo, N. A., Berardi, F., Contino, M., Niso, M. & Perrone, R. "ABC pumps and their role in active drug transport". *Current Topics in Medicinal Chemistry*, Vol. 9, No. 2, 2009, 119-129
- <sup>21</sup> Deeley, R. G., Westlake, C. & Cole, S. P. "Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins". *Physiological Reviews*, Vol. 86, No. 3, 2006, 849-899

---

<sup>22</sup> Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G. & Varadi, A. “Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system”. *Physiological Reviews*, Vol. 86, No. 4, 2006, 1179-1236

<sup>23</sup> Litman, T., Druley, T. E., Stein, W. D. & Bates, S. E., 2001. “From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance”. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 58, No. 7, 2001, 931-959

## 2. Sección Generalidades: Predicción de la fracción oral absorbida

Victor Mangas-Sanjuan<sup>a</sup>, Isabel Gonzalez-Alvarez<sup>a</sup>, Marta Gonzalez-Alvarez<sup>a</sup>,  
Marival Bermejo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Ingeniería. Área de Farmacia y Tecnología. Universidad Miguel Hernández.

### 2.1 Introducción

La vía oral de administración es la más usada por su conveniencia, comodidad y correspondencia con procesos fisiológicos. Por ello en la predicción de la absorbabilidad oral de cualquier fármaco es uno de los aspectos más relevantes en la etapa de desarrollo. La biodisponibilidad oral (F) se define como la fracción de la dosis administrada que accede a la circulación sistémica y la velocidad a la que ocurre dicho acceso. Puesto que una vez que el fármaco cruza la barrera intestinal es conducido a través de la vena porta al hígado antes de acceder a la circulación sistémica, la biodisponibilidad oral en magnitud es el resultado de tres componentes, la fracción oral absorbida, es decir la fracción de la dosis que se atraviesa la membrana intestinal ( $f_a$ ), la fracción que escapa a los posibles procesos metabólicos en los enterocitos intestinales ( $f_e$ ) y la fracción que escapa a los procesos metabólicos en hígado ( $f_h$ ) o expresado en términos matemáticos:

$$F = f_a * f_e * f_h \quad (1)$$

Muchos factores influyen en la cuantía y la velocidad de la absorción. Estos factores pueden clasificarse en tres categorías relacionadas con el fármaco, la forma farmacéutica y es sustrato biológico:

**Físico-químicos:** como  $pK_a$ , solubilidad, lipofilia, tamaño y forma molecular, forma cristalina, inestabilidad química y capacidad de formación de enlaces de hidrógeno.

**Fisiológicos:** flujo sanguíneo esplácnico, pH del fluido intestinal, velocidad de vaciado gástrico, tiempo de tránsito intestinal y mecanismos de absorción implicados.

**Factores que dependen de la forma farmacéutica** y determinan la velocidad de liberación a partir de la misma.

A pesar de la complejidad del problema, se han hecho numerosos intentos en cuanto a la predicción de las potencialidades de absorción de los candidatos a fármacos, por la repercusión de la misma en la biodisponibilidad.

## 2.2 Modelos de predicción de la fracción oral absorbida basados en descriptores moleculares y parámetros fisicoquímicos

Uno de los modelos más sencillos para obtener una estimación de la fracción oral absorbida es el llamado “Potencial de Absorción” (“Absorption Potential” AP). Este concepto se basa en la teoría del pH-reparto de Brodie y col., pero considera no solo el pKa del fármaco sino otros factores como la solubilidad y la dosis. La ecuación propuesta es la siguiente:

$$AP = Ln\left(\frac{P \cdot F_{ni}}{D_o}\right) \quad (2)$$

donde AP es el potencial de absorción P representa el coeficiente de reparto,  $F_{ni}$  la fracción no-ionizada a pH 6.5 y  $D_o$  representa el número de dosis ( $D_o = \text{Dosis}/250 \cdot C_s$ ) siendo  $C_s$  la solubilidad.

Con el fin de establecer una relación cuantitativa entre el potencial de absorción y la fracción oral absorbida ( $F_a$ ) Macheras y Symillides, propusieron la siguiente ecuación

$$F_a = \frac{(10^{AP})^2}{(10^{AP})^2 + F_{ni} \cdot (1 - F_{ni})} \quad (3)$$

En la que se asume un límite máximo para AP de 1000 y en el caso de número de dosis superior a la unidad ( $D_o > 1$ ) se utiliza  $D_o = 1$ .

Otro modelo sencillo para estimar la absorbabilidad de una sustancia es el cálculo de la dosis máxima absorbible (maximum absorbable dose) o MAD. Este concepto fue propuesto por Johnson y Swindell. Brevemente, MAD permite calcular la cantidad

total de fármaco que podría absorberse si una disolución saturada del mismo con solubilidad  $C_s$  en el volumen intestinal  $V_i$  se absorbiera con una constante de velocidad de absorción  $K_a$  durante un tiempo equivalente al tiempo de tránsito intestinal ( $T_{si}$ )

$$MAD = C_s * K_a * V_i * T_{si} \quad (4)$$

Un concepto similar se describe en el marco del sistema de desarrollabilidad farmacéutico (Developability Classification System)<sup>4</sup> que describe la “Dosis absorbible limitada por solubilidad” (Solubility Limited aAbsorbable Dose) SLAD como

$$SLAD = C_s * 500 * A_n \quad (5)$$

Expresión similar a la de MAD en la que se considera un volumen intestinal de 500 mL y la relación  $K_a * T_{si}$  representa el número de absorción  $A_n$ .

En ambos casos la relación MAD/Dosis o SLAD/Dosis representan una aproximación de la máxima fracción absorbida posible en ausencia de limitaciones debidas al proceso de disolución.

Otro grupo de modelos derivados de la teoría del pH-reparto son los modelos compartimentales de Wagner –Sedman e Higuchi –Ho. En estos modelos la membrana lipídica y las fases acuosas a ambos lados de la misma se consideran compartimentos y la difusión del fármaco de uno a otro se describe como función de parámetros fisicoquímicos (lipofilia fundamentalmente)<sup>5,6,7</sup>

Un ejemplo de la aplicación del modelo de Higuchi-Ho para predecir la permeabilidad (constante de velocidad de absorción) de una serie de fluoroquinolonas en función de su coeficiente de reparto y peso molecular se representa en la figura 1 En este modelo la constante de velocidad de absorción ( $k_a$ ) de cada candidato depende de su constante de velocidad de difusión a través de la capa acuosa estática adyacente a la membrana ( $k_{aq}$ ) y a través de la membrana lipídica. La constante de velocidad de absorción global  $k_a$  es la suma de  $k_{aq}$  y  $k_{mem}$  ya que representan resistencias en serie.  $K_{aq}$  disminuye de los elementos más hidrófilos a los más lipófilos en función del peso molecular de los mismos (MW).

$$k_{aq} = J / \sqrt{MW} \quad (6)$$

donde J es una constante. Por otra parte  $k_{mem}$  es función de la lipofilia expresada por ejemplo como coeficiente de reparto (P)

$$k_{mem} = C \cdot P^d \quad (7)$$

Donde C y d son los parámetros de la correlación. Esta ecuación se deriva de la relación de Collander que relaciona coeficientes de reparto obtenidos con diferentes disolventes orgánicos. Al combinar ambas ecuaciones se obtiene la siguiente relación absorción-lipofilia:

$$k_a = \frac{C \cdot P^d}{1 + E \cdot \sqrt{MW} \cdot P^d} \quad (8)$$

En la que  $E=C/J$ .

Para los elementos más lipófilos la difusión a través de la capa acuosa estática se convierte en el paso limitante o factor limitativo que conduce a la “meseta” de la correlación absorción lipofilia.

El modelo de Pla-Delfina y Moreno incorpora muchos de los principios de los modelos compartimentales mencionados anteriormente pero además proporciona una interpretación global de correlaciones absorción lipofilia muy diversas obtenidas con diferentes familias de compuestos en distintos segmentos del tracto gastrointestinal. Los principales supuestos del modelo que se describen en la figura 2, implican la aceptación de que la absorción por difusión pasiva es el resultado de dos procesos paralelos, la absorción a través de la membrana ( $k_1$ ) y la absorción a través de las uniones intercelulares ( $k_2$ ). La correlación entre absorción y lipofilia puede entonces describirse mediante la suma de dos funciones hiperbólicas, una directa para describir la absorción por membrana y una inversa para la difusión paracelular, con dos valores asintóticos  $k_m$  para la difusión por membrana y  $k_p$  para la difusión paracelular. Este modelo es de aplicación en intestino delgado en el que ambas vías de difusión están disponibles y para candidatos con peso molecular lo bastante pequeño para usar la vía paracelular. En colon donde la vía paracelular está más restringida o para compuestos con peso molecular mayor de 250 daltons la correlación incluye únicamente la hipérbola de la difusión por membrana.  $K_m$  representa el valor límite de  $k_a$  para compuestos de elevada lipofilia en los que la difusión en la capa acuosa estática es el paso limitante. Ejemplos de correlaciones absorción lipofilia se muestran en la figura 3.

Además de la lipofilia otros descriptores moleculares como el peso molecular, superficie polar y capacidad de formar puentes de hidrógeno se utilizan para predecir

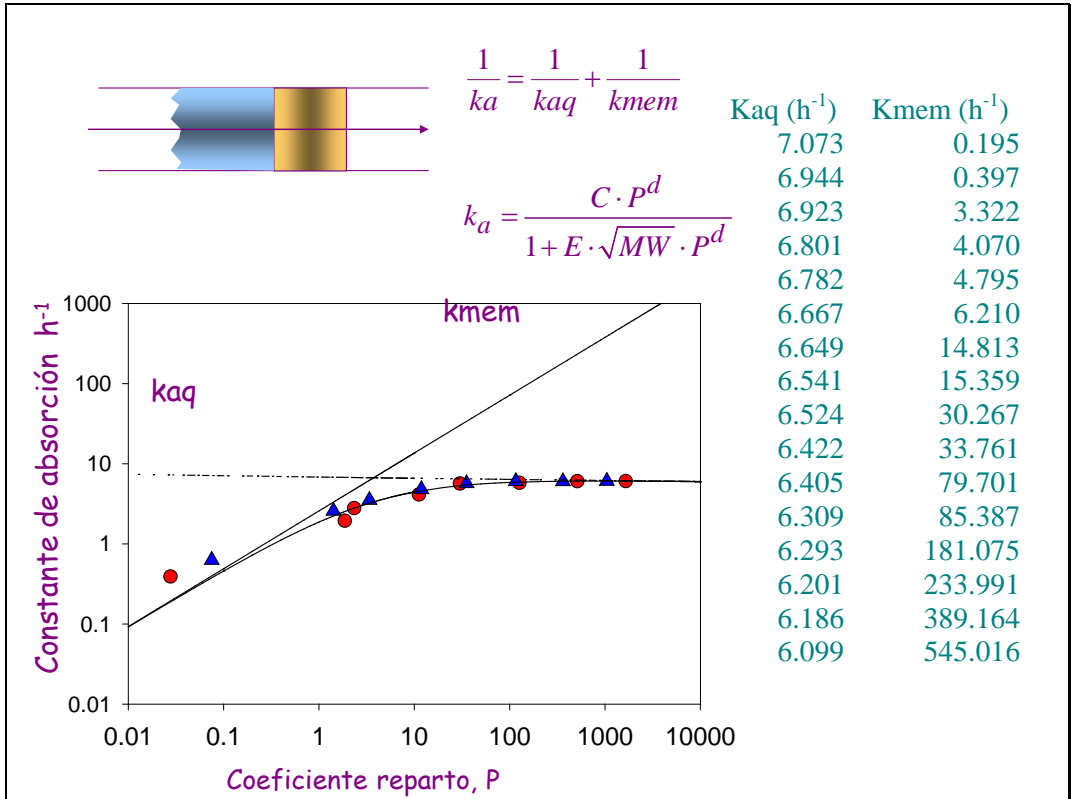
propiedades farmacocinéticas como la absorción. En la tabla 1 se resumen estos descriptores moleculares y su relación con la absorción oral.

*Tabla 1. Descriptores moleculares utilizados para predecir la permeabilidad intestinal*

Descriptor Molecular	Referencia
<u>Lipofilia:</u> Dado que el reparto en la membrana es imprescindible para el transporte la lipofilia se usa como predictor de la permeabilidad. La lipofilia se relaciona con el tamaño molecular y con la capacidad de formar puentes de hidrógeno. Este parámetro se ha usado para predecir la permeabilidad en modelos animales y humano con correlaciones lineales o hiperbólicas.	(Kamm y col) <sup>8</sup> (Stenberg y col) <sup>9</sup> (Casabo y col) <sup>10</sup> (Dowty y Dietsch) <sup>11</sup>
<u>Peso Molecular:</u> Es un componente de la lipofilia y del coeficiente de difusión en la membrana. Se ha utilizado como predictor de la permeabilidad junto con otros descriptores. Existe una marcada dependencia entre peso molecular y difusión paracelular. Compuestos con MW < 200 daltons pueden usar la vía para y transcelular. Compuestos con MW > 250 solo usan la vía transcelular y pesos moleculares superiores a 500 conducen a una disminución de la difusión en membrana.	(Camenisch y col) <sup>12</sup>
<u>Capacidad de formar puentes de hidrógeno.</u> Esta propiedad influye puesto que le primer paso para entrar en la membrana es la desolvatación de la molécula. La mayor capacidad formadora de puentes de hidrógeno es perjudicial para el transporte en la membrana.	(Norinder y col) <sup>13</sup>

<u>Area de superficie polar.</u> (PSA) se define como el área de la superficie de Van der Waals resultante de la presencia de oxígeno y nitrógeno más la superficie de los átomos de hidrógeno unidos a estos heteroátomos. Esta por tanto relacionada con la capacidad de formar puentes de hidrógeno. Fármacos con PSA < 60 Å <sup>2</sup> se absorberían completamente (Fa > 90%). Fármacos con PSA > 140 Å <sup>2</sup> se absorben menos del 10%.	(Palm y col) <sup>14,15</sup> (Clark) <sup>16,17</sup>
--	---





**Figura 1.** Correlación absorción lipofilia mediante el modelo de Higuchi-Ho para una familia de fluoroquinolonas.

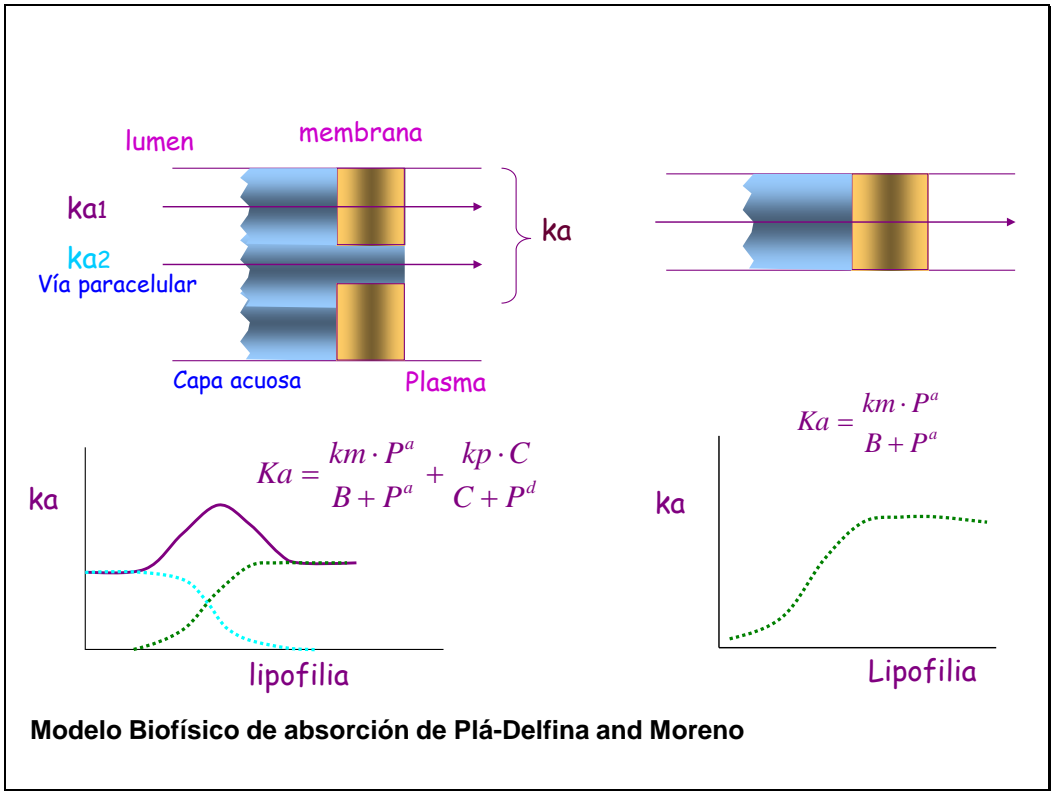
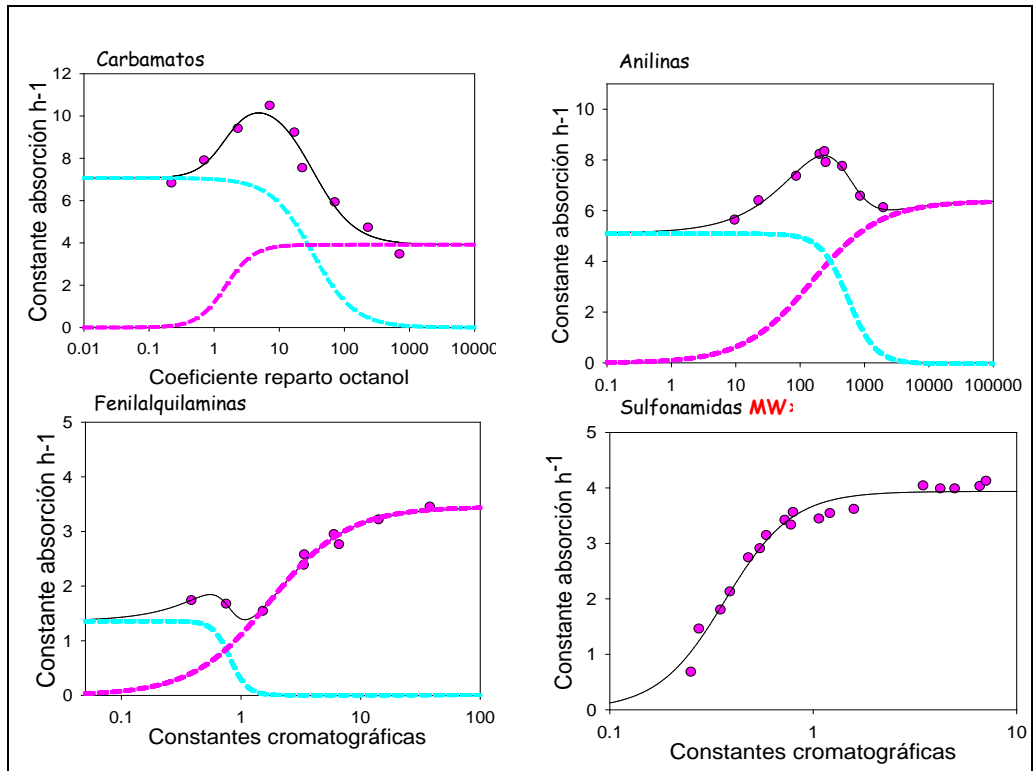


Figura 2. Esquema del modelo biofísico de absorción de Pla-Delfina y Moreno

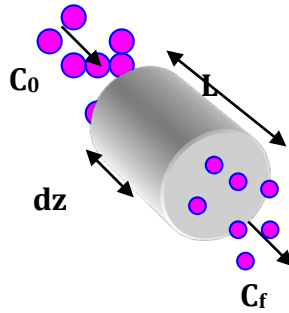


*Figura 3. Ejemplos de correlaciones absorción lipofilia obtenidas en intestino delgado para varias familias homólogas de diversos compuestos*

## 2.3 Modelos de predicción de la fracción oral absorbida tiempo-independientes o en estado estacionario.

El planteamiento teórico de estos modelos se basa en establecer el balance de masas en el lugar de absorción.

Se asume que el intestino delgado es un cilindro de superficie  $2 \cdot \pi \cdot r \cdot L$ , en el que  $r$  es el radio y  $L$  la longitud. Se considera al estómago como reservorio del cual sale el fármaco a velocidad constante:



**Figura 4.** Esquema del tránsito del fármaco en el intestino.

Considerando la zona o segmento intestinal donde el fármaco se absorbe, la cantidad de fármaco que entra en el dicho lugar de absorción menos la cantidad de fármaco que sale del lugar de absorción es igual a la cantidad de fármaco absorbido. La expresión matemática de este proceso sería:

$$-\frac{dm}{dt} = Q \cdot (C_0 - C_f) = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot P_e \cdot \int_0^L C \cdot dz \quad (9)$$

donde:

dm/dt: cantidad de fármaco absorbido

Q: flujo volumétrico (mL/min)

C<sub>0</sub>: concentración inicial de fármaco

C<sub>f</sub>: concentración de fármaco al salir del lugar de absorción

P<sub>e</sub>: coeficiente de permeabilidad in vivo

r: radio del segmento intestinal

C: concentración en cada punto del cilindro

dz: longitud del cilindro de absorción (varía entre 0 y L)

En condiciones de estado estacionario, es decir, cuando la velocidad de desaparición del fármaco del lumen corresponde con su velocidad de absorción, la fracción absorbida f corresponde a:

$$f = 1 - \frac{C_f}{C_0} \quad (10)$$

La integral de la ecuación 9 es diferente en función de la relación entre C<sub>0</sub> y C<sub>f</sub> con la solubilidad del fármaco (C<sub>s</sub>). Considerando el caso más sencillo, en que ambas son menores de este valor:

$$f = 1 - e^{-2A_n} \quad (11)$$

donde  $A_n$  es el denominado “número de absorción” que es una variable adimensional que corresponde a:

$$A_n = \frac{T}{r/P_e} \quad (12)$$

siendo T el tiempo medio de tránsito intestinal. Según el modelo experimental utilizado, los valores de T, r y  $P_e$  varían para una misma molécula.

Una ecuación similar se puede deducir, de una manera mucho más sencilla desde el punto de vista matemático, como se describe a continuación.

Se parte de que en cualquier segmento, del intestino, el fármaco se absorbe con una constante de velocidad de orden uno, al menos aparente, característica, que es  $k_a$ , y cuando el fármaco sale de este lugar, no se absorbe, perdiéndose finalmente con las heces.

El segundo aspecto a considerar es el tiempo útil de absorción, de acuerdo con el concepto de superficie útil de absorción o ventana de absorción. El fármaco sólo se absorbe mientras permanece en el lugar del tracto digestivo en el cual está situada esta superficie útil.

Para muchas series de fármacos esta superficie útil de absorción es la del intestino delgado solamente. El tiempo útil de absorción es pues, el tiempo en que la disolución de fármaco permanece en dicho lugar y es función de la longitud del mismo, de la velocidad de tránsito y, tal vez, del propio volumen administrado, pero se acepta que a volúmenes pequeños esta variable no influye. Puede escribirse entonces:

$$T = \frac{L_{ua}}{V_{trans}} \quad (13)$$

Expresión en la que T, es el tiempo de tránsito a lo largo del intestino delgado, es decir, el tiempo útil de absorción,  $L_{ua}$ , longitud útil de absorción, es, en realidad, la longitud del intestino delgado, pues se supone que todo él es zona de absorción, y  $V_{trans}$  es la velocidad de tránsito característica de este lugar, regulada por el sistema

nervioso autónomo y dependiente de las características fisiológicas y físico-químicas del contenido intestinal.

El tercer aspecto importante a considerar es que, mientras el fármaco permanezca en el lugar de absorción (el intestino delgado), la cantidad remanente a cualquier tiempo inferior a T viene dada por la ecuación:

$$Q_0 = D \cdot e^{-k_a \cdot t} \quad (14)$$

Cuando el fármaco está a punto de salir de la zona útil de absorción, lo que ocurre cuando ha transcurrido un tiempo igual a T, la cantidad remanente se puede calcular mediante la ecuación:

$$Q_{trans} = D \cdot e^{-k_a \cdot T} \quad (15)$$

Esta cantidad es, precisamente, la que saldrá del lugar de absorción perdiéndose con las heces. Por consiguiente, la cantidad absorbida será:

$$Q_{abs} = D - Q_{trans} = D - D \cdot e^{-k_a \cdot T} \quad (16)$$

Y la fracción absorbida f, o biodisponibilidad en magnitud, en ausencia de cualquier otra fuente de pérdida persistémica, viene representada por el cociente:

$$f = \frac{Q_{abs}}{D} = \frac{D - Q_{trans}}{D} \quad (17)$$

$$f = \frac{D - D \cdot e^{-k_a \cdot T}}{D} = 1 - e^{-k_a \cdot T} \quad (18)$$

Estos modelos en estado estacionario permiten estimar la fracción absorbida de un fármaco que se encuentre en disolución, una vez estimada su  $k_a$ , asumiendo un tiempo de tránsito intestinal determinado.

En la siguiente tabla se indican otras soluciones de la ecuación 9 cuando el fármaco no se encuentra disuelto y según su disolución se complete o no durante el tiempo de tránsito.

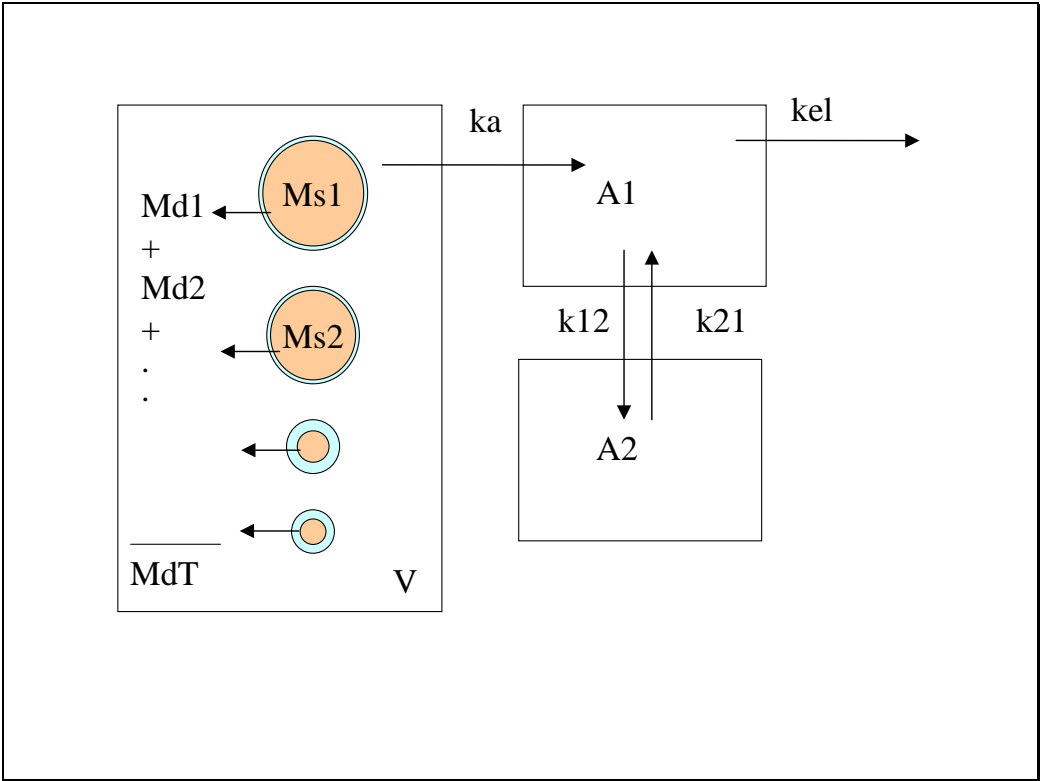
**Tabla 2.** Soluciones para la ecuación 9.  $C_s$  es la solubilidad del fármaco.  $C_o$  y  $C_f$  son las concentraciones al inicio y al final del segmento intestinal respectivamente.  $An$  es el número de absorción;  $Do$  es el número de dosis cuya definición se detalla en el texto.

Comentario	Condiciones	Integral
Fármacos altamente solubles La permeabilidad es el principal parámetro para determinar $F_a$	$C_o \leq C_s$ y $C_f \leq C_s$	$F_a = 1 - e^{-2 \cdot An}$
Fármacos en forma sólida (suspensión). Si la disolución es más rápida que la absorción, la concentración es $C_s$ .	$C_o > C_s$ y $C_f > C_s$	$F_a = \frac{2 \cdot An}{Do}$
Fármacos en los que la disolución ocurre durante el tránsito intestinal	$C_o > C_s$ y $C_f \leq C_s$	$F_a = 1 - \frac{1}{Do} \cdot e^{-2 \cdot An + Do - 1}$

## 2.4 Modelos de predicción de la fracción oral absorbida dinámicos.

Los modelos en estado estacionario son útiles para predecir la fracción oral absorbida. Los modelos dinámicos van un paso más allá y permiten a su vez predecir la velocidad de absorción. Ello permite integrarlos con modelos farmacocinéticos para predecir el perfil de concentraciones plasmáticas.

En estos modelos el tracto gastrointestinal se considera como un tanque o contenedor bien agitado desde el cual el fármaco se absorbe o bien una serie de tanques conectados por procesos de transferencia lineales. Numerosos autores han construido modelos de estas características.<sup>18,19,20</sup> En la figura 5 se muestra un ejemplo.



*Figura 5. Ejemplo de un modelo de tanque bien agitado para describir la absorción*

El fármaco sólido se asume con una determinada distribución de tamaño de partícula. Cada rango de tamaños se modela separadamente. Para simplificar se consideran las partículas esféricas (aunque otras geometrías pueden fácilmente incorporarse al modelo). La disolución de las partículas se describe mediante la ecuación de Noyes-Whitney. La capa acuosa estática adyacente a la superficie sólida se considera de espesor constante para partículas de tamaño superior a las 30 micras mientras que para partículas de menos de 30 micras el espesor de la capa coincide con el radio de la partícula. El desarrollo de las ecuaciones de disolución se describe en numerosas publicaciones<sub>20</sub>

La siguiente serie de ecuaciones diferenciales enlazadas entre si se utiliza para describir los procesos de disolución, absorción y disposición del fármaco.



$$\frac{dMs_i}{dt} = -\frac{3D(M_{0i})^{1/3} \cdot (Ms_i)^{2/3}}{\rho \cdot h_i \cdot r_{0i}} \cdot (C_s(t) - \frac{Md_T}{V(t)}) \quad (19)$$

$$\frac{dMd_i}{dt} = +\frac{3D(M_{0i})^{1/3} \cdot (Ms_i)^{2/3}}{\rho \cdot h_i \cdot r_{0i}} \cdot (C_s(t) - \frac{Md_T}{V(t)}) - ka(t) \cdot Md_i \quad (20)$$

$$Md_T = \sum_{i=1}^n Md_i \quad (21)$$

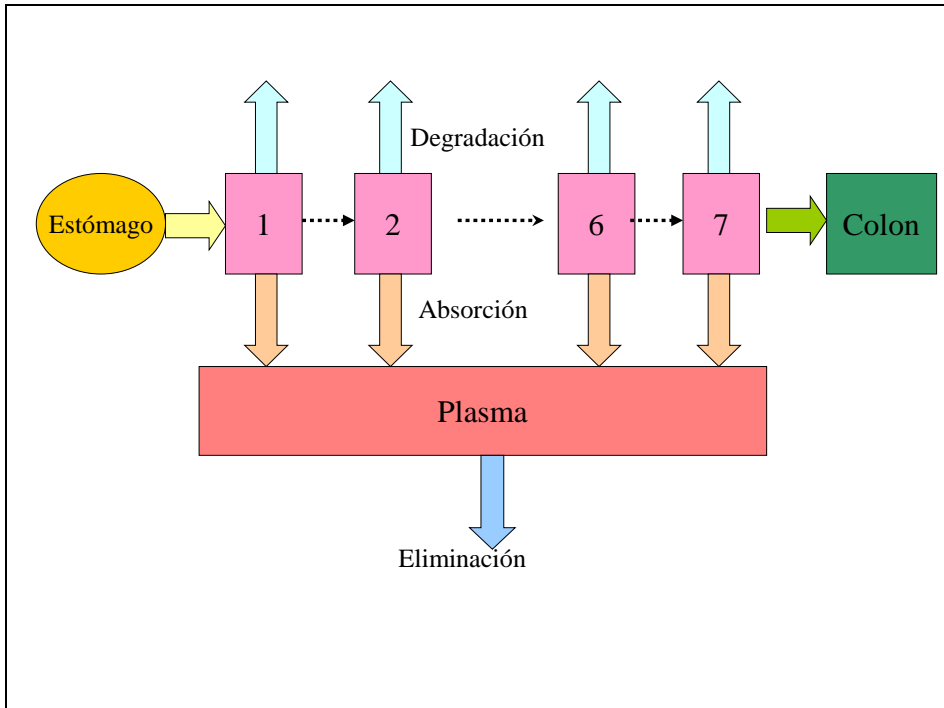
$$\frac{dA1}{dt} = ka(t) \cdot F \cdot Md_T - (kel + k12) \cdot A1 + k21 \cdot A2 \quad (22)$$

$$\frac{dA2}{dt} = k12 \cdot A1 - k21 \cdot A2 \quad (23)$$

Donde  $Ms_i$  es la cantidad de fármaco en estado sólido en la fracción de tamaño  $i$ ,  $Mo_i$  es la cantidad inicial en esa fracción  $I$ ,  $Md_i$  es la cantidad de fármaco disuelto,  $D$  es el coeficiente de difusión,  $\rho$  es la densidad del fármaco,  $r_{0i}$  es el radio inicial de las partículas en la fracción  $i$ ,  $h_i$  es el espesor de la capa acuosa estática alrededor de la partícula,  $Md_T$  es la suma de cantidades disueltas a partir de todas las fracciones de partículas,  $V(t)$  es el volumen de disolución,  $A1$  es la cantidad de fármaco en el compartimento central y  $A2$  la cantidad de fármaco en el compartimento periférico,  $k12$  y  $k21$  son las microconstantes de distribución (acceso y retorno desde compartimento periférico) y  $kel$  la constante de velocidad de eliminación desde compartimento central.  $ka(t)$  corresponde con la constante de velocidad de absorción, el paréntesis  $(t)$  significa que el parámetro puede hacerse tiempo-dependiente. Este modelo se ha utilizado por ejemplo para predecir el perfil plasmático de nifedipina en una forma de liberación controlada (GITS-gastrointestinal therapeutic system), utilizando los parámetros de disposición que eran conocidos de la administración intravenosa

Los modelos de tanques agitados son simples e intuitivos pero su principal desventaja es la falta de fundamentos físicos para asumir que desde el punto de vista fisiológico el tracto gastrointestinal pueda considerarse como un tanque homogéneo y bien agitado aunque supuestos similares se han usado clásicamente y con éxito en el modelado farmacocinético compartimental. Por otra parte el número de tanques agitados puede afectar los resultados si bien mediante simulación se ha concluido que el número óptimo de tanques para simular el flujo a través del intestino es de 7.

El modelo se denominó CAT (Compartimentos de Absorción y Tránsito). El modelo inicial incorporaba absorción lineal y degradación en lumen<sup>21 22</sup> y se completó posteriormente para acomodar los procesos de absorción saturable<sup>23</sup>. El modelo se utiliza no solo para estimar la fracción absorbida sino también para predecir la curva de concentración plasmática tiempo. Se describe brevemente a continuación y se ilustra en la figura 6.



*Figura 6. Modelo Compartmental de absorción y tránsito CAT*

Como se ilustra en la figura el intestino se divide en siete segmentos además del estómago y el colon. Cada segmento se considera un compartimento en el que el fármaco transita de uno a otro siguiendo una cinética lineal mientras se absorbe. En el primer modelo CAT la absorción a partir de estómago y colon se consideró insignificante y el proceso de disolución instantáneo. Las ecuaciones diferenciales describiendo el cambio de cantidad con el tiempo en cada segmento son las siguientes:

Estómago:

$$\frac{dM_s}{dt} = -K_{se} \cdot M_s \quad (24)$$

$K_{se}$  es la constante de vaciado gástrico y  $M_s$  un porcentaje de la dosis.  
Intestino Delgado:

$$\frac{dM_n}{dt} = K_t \cdot M_{n-1} - K_a \cdot M_n - K_d M_n \quad (25)$$

$M_n$  ( $n=1, 2, \dots, 7$ ) son los porcentajes de dosis en cada segmento,  $K_t$ ,  $K_a$ ,  $K_d$  son las constantes de tránsito, absorción y degradación. Se considera que las constantes son las mismas a lo largo de todo el tracto gastrointestinal.

La velocidad de absorción se describe igualmente a partir de cada compartimento:

$$\frac{dM_a}{dt} = \sum_{n=1}^{n=7} K_a \cdot M_n \quad (26)$$

De un modo similar se estima la cantidad total de fármaco degradado en lumen,  $M_d$ . La cantidad de fármaco que sale del último segmento,  $M_c$  accede al colon donde se considera insignificante la absorción.

A tiempo  $t \rightarrow \infty$ , la cantidad de fármaco en estómago e intestino tiende a cero y por tanto:

$$100\% = M_a + M_c + M_d \quad (27)$$

La fracción absorbida se calcula con la siguiente expresión:

$$F_{a_{t \rightarrow \infty}} = \frac{M_a}{100} = \int_0^{\infty} \sum_{n=1}^{n=7} M_n \cdot K_a \cdot dt / 100 \quad (28)$$

El paso final es predecir las concentraciones plasmáticas para lo que se enlaza el proceso de absorción con el de disposición. Por ejemplo en un fármaco monocompartimental:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{D}{100} \left( \frac{dM_a}{dt} \right) \cdot \frac{1}{V} - k_{el} \cdot C \quad (29)$$

donde  $k_{el}$  es la constante de velocidad de eliminación de primer orden y  $V$  es el volumen aparente de distribución,  $C$  es la concentración plasmática y  $D$  la dosis administrada.

El modelo CAT original no incluía el proceso de disolución y la solubilidad dependiente del pH de los electrolitos débiles. Por otra parte la constante de absorción se modelaba como parámetro único sin considera los cambios en superficie de absorción, nivel de expresión de transportadores y otros parámetros regionales del tracto intestinal. El modelo CAT puede mejorarse considerando el colon como otro compartimento de absorción. Esto es en particular útil para fármacos de baja solubilidad y baja permeabilidad y para formulaciones de liberación controlada para los que la absorción en colon puede ser muy relevante.

Modificaciones del modelo CAT se han implementado en programas de ordenador como, GastroPlus™, basado en el CAT avanzado (ACAT)<sup>24</sup> y la versión 7 y 8 de Simcyp que utiliza el modelo avanzado de disolución absorción y metabolismo.

El modelo ACAT permite el cambio en las constantes de absorción, tránsito y degradación a lo largo de los diferentes segmentos intestinales. El modelo utiliza el gradiente de concentraciones a ambos lados de la membrana apical y basolateral del enterocito para calcular la velocidad de paso hacia y desde el enterocito en cada segmento intestinal ello permite incorporar absorción y secreción saturable y el proceso de metabolismo intestinal. Para estimar la permeabilidad y los parámetros de los procesos metabólicos se pueden utilizar datos provenientes de modelos in vitro que son transformados al sistema in vivo mediante los parámetros de escala fisiológicos adecuados.

El modelo avanzado de disolución, absorción y metabolismo ADAM implementado en la versión 7 del programa SimCyp es capaz de predecir la velocidad y magnitud de absorción y metabolismo intestinal así como su variabilidad interindividual.<sup>25</sup> El modelo es una representación mecanicista fisiológica poblacional que incorpora la heterogeneidad dentro del tracto gastrointestinal y considera los procesos de disolución, la dinámica de los fluidos gastrointestinales en cada segmento, la permeabilidad de la membrana y la degradación en lumen y en enterocito así como los procesos activos de transporte. La variabilidad fisiológica se aplica a los parámetros de superficie absorbente, tiempos de tránsito y a la secreción de fluidos, su volumen y la absorción en cada segmento mediante la aproximación de Monte Carlo. Para describir la disolución Simcyp utiliza el modelo de Wang y Flanagan en lugar de la ecuación de Noyes-Whitney.

## 2.5 Conclusión y perspectivas futuras.

En la pasada década se han desarrollado modelos de absorción mecanicistas para predecir la velocidad y magnitud de absorción. Los más recientes han mejorado su capacidad predictiva al incorporar la descripción del proceso de disolución y degradación en lumen, el vaciado gástrico, el proceso de tránsito intestinal, los procesos metabólicos de primer paso y la presencia de transportadores activos así como los cambios fisiológicos a lo largo del tracto gastrointestinal. Gracias a ello estos modelos han podido utilizarse para predecir el efecto de la presencia de alimentos, explorar correlaciones in vitro in vivo y predecir las interacciones fármaco-fármaco.

Sin embargo no existe el modelo perfecto capaz de capturar toda la complejidad del proceso de absorción oral. En general las predicciones más exactas se logran con fármacos que se absorben por difusión pasiva. En el caso de fármacos con procesos de transporte (absorción o secreción) activos o aquellos que sufren efecto de primer paso intestinal o hepático la discrepancia con los datos in vivo es mayor puesto que los factores de escala para traducir parámetros obtenidos en modelos in vitro a sus correspondientes parámetros in vivo aun requieren su validación con bases de datos más extensas.

En el desarrollo de modelos futuros o el perfeccionamiento de los actuales las características heterogéneas del tracto gastrointestinal deben incorporarse como por ejemplo diferencias en flujo sanguíneo, distribución de los volúmenes acuosos en "bolsillos", patrones de distribución de expresión de enzimas y transportadores. El proceso de disolución en los fluidos luminales tanto en ayunas como en presencia de alimentos debe ser incorporado a los modelos con una descripción más fisiológica de su composición, su capacidad solubilizante y sus aspectos hidrodinámicos y volúmenes. Finalmente los cambios en procesos patológicos y la variabilidad intra e interindividual debe incorporarse para dotar de significación estadística y clínica a las simulaciones.

---

<sup>1</sup> Shore, P.A., Brodie, B.B., Hogben, C.A. "The gastric secretion of drugs: a pH-partition hypothesis". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1957, 361-369

<sup>2</sup> Macheras, P.E., Symillides, M.Y. "Toward a quantitative approach for the prediction of the fraction of dose absorbed using the absorption potential concept". *Biopharm Drug Dispos*, 1989, 43-53

- 
- <sup>3</sup> Johnson KC, Swindell AC. "Guidance in the setting of drug particle size specification to minimize variability in absorption". *Pharm Res (NY)*, 1996, 13:1795-1798
- <sup>4</sup> Butler Jm, Dressman JB. "The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development". *J Pharm Sci*, 2010, 99(12):4940-4954
- <sup>5</sup> Higuchi, W.I., et al., "Rate limiting steps and factors in drug absorption", , *Drug absorption*: Falcon House: Edimburgo. 1981 35-80.
- <sup>6</sup> Wagner, J.G. and A.J. Sedman, "Quantitation rate of gastrointestinal and buccal absorption of acidic and basic drugs based on extraction theory". *J. Pharmacokin. Biopharm.*, 1973. 1: 23-50
- <sup>7</sup> Casabo, V.G., et al., "Studies on the reliability of a bihyperbolic functional absorption model. II. Phenylalkylamines". *J Pharmacokinet Biopharm*, 1987. 15(6): 633-664
- <sup>8</sup> Kamm, W., et al., "Prodrug approach for alphaIIbeta3-peptidomimetic antagonists to enhance their transport in monolayers of a human intestinal cell line (Caco-2): comparison of in vitro and in vivo data". *Pharm Res*, 1999. 16(10):1527-1533
- <sup>9</sup> Stenberg, P., et al., "Prediction of the intestinal absorption of endothelin receptor antagonists using three theoretical methods of increasing complexity". *Pharm Res*, 1999. 16(10):1520-1526.
- <sup>10</sup> Casabo, V.G., et al., "Studies on the reliability of a bihyperbolic functional absorption model. II. Phenylalkylamines". *J Pharmacokinet Biopharm*, 1987. 15(6): 633-643.
- <sup>11</sup> Dowty, M.E. and C.R. Dietsch, "Improved prediction of in vivo peroral absorption from in vitro intestinal permeability using an internal standard to control for intra- and inter-rat variability". *Pharm Res*, 1997. 14(12):1792-1797.
- <sup>12</sup> Camenisch, G., G. Folkers, and H. van de Waterbeemd, "Review of theoretical passive drug absorption models: historical background, recent developments and limitations". *Pharm Acta Helv*, 1996. 71(5):309-327.
- <sup>13</sup> Norinder, U., T. Osterberg, and P. Artursson, Theoretical calculation and prediction of intestinal absorption of drugs in humans using MolSurf parametrization and PLS statistics. *Eur J Pharm Sci*, 1999. 8(1):49-56.
- <sup>14</sup> Palm, K., et al., Correlation of drug absorption with molecular surface properties. *J Pharm Sci*, 1996. 85(1):32-39.
- <sup>15</sup> Palm, K., et al., Polar molecular surface properties predict the intestinal absorption of drugs in humans. *Pharm Res*, 1997. 14(5):568-571.
- <sup>16</sup> Clark, D.E., Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 2. Prediction of blood-brain barrier penetration. *J Pharm Sci*, 1999. 88(8):815-821.

- 
- <sup>17</sup> Clark, D.E., Rapid calculation of polar molecular surface area and its application to the prediction of transport phenomena. 1. Prediction of intestinal absorption. *J Pharm Sci*, 1999. 88(8):807-814.
- <sup>18</sup> Dressman, J.B., D. Fleisher, and G.L. Amidon, "Physicochemical model for dose-dependent drug absorption". *J Pharm Sci*, 1984. 73(9):1274-1279.
- <sup>19</sup> Oberle, R.L. and G.L. Amidon, "The influence of variable gastric emptying and intestinal transit rates on the plasma level curve of cimetidine; an explanation for the double peak phenomenon". *J Pharmacokinet Biopharm*, 1987. 15(5):529-544
- <sup>20</sup> Dressman, J.B. and D. Fleisher, "Mixing-tank model for predicting dissolution rate control or oral absorption". *J Pharm Sci*, 1986. 75(2) 109-116.
- <sup>21</sup> Yu, L.X., et al., "Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption". *Advanced drug delivery reviews*, 1996, 19(3): 359-376.
- <sup>22</sup> Yu, L.X. and G.L. Amidon, "A compartmental absorption and transit model for estimating oral drug absorption". *International journal of pharmaceutics*, 1999. 186(2):119-125.
- <sup>23</sup> Yu, L.X. and G.L. Amidon, "Saturable small intestinal drug absorption in humans: modeling and interpretation of cefatrizine data". *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 1998. 45(2):199-203
- <sup>24</sup> Agoram, B., W.S. Woltosz, and M.B. Bolger, "Predicting the impact of physiological and biochemical processes on oral drug bioavailability". *Advanced drug delivery reviews*, 2001. 50 Suppl 1:S41-67
- <sup>25</sup> Dokoumetzidis, A., L. Kalantzi, and N. Fotaki, "Predictive models for oral drug absorption: from in silico methods to integrated dynamical models". *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 2007. 3(4):491-505.

### **3. Sección Generalidades: Fundamentos científicos del BCS y de la Bioequivalencia *in vitro*: Aspectos teóricos.**

Sarin Colon<sup>a,b</sup>, Isabel Gonzalez-Alvarez<sup>b</sup>, Marta Gonzalez-Alvarez<sup>b</sup>, Marival Bermejo<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Ingeniería. Área de Farmacia y Tecnología. Universidad Miguel Hernández.*

<sup>b</sup> *Departamento de Análisis y Control. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Venezuela*

#### **3.1 El sistema de clasificación biofarmacéutica**

Los efectos terapéuticos o tóxicos de un medicamento no dependen únicamente de las características fisicoquímicas y farmacológicas del principio activo sino también de la forma farmacéutica en que es administrado. La vía oral es la más conveniente, fisiológica y la más extendida en uso, en consecuencia, conocer cuáles son los factores determinantes de la absorción por esta vía y en qué manera el perfil de liberación desde la forma farmacéutica condiciona el grado de aprovechamiento es uno de los aspectos fundamentales en el desarrollo de nuevos medicamentos.

El *Sistema de Clasificación Biofarmacéutica*, (BCS), es un método que permite clasificar los principios activos de acuerdo a su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal y que sirve en primer lugar como herramienta para entender los factores limitantes de la absorción oral y en segundo lugar para establecer cuando los ensayos de disolución *in vitro* pueden utilizarse como predictivos del comportamiento *in vivo*. El BCS considera la permeabilidad intestinal y la solubilidad acuosa en combinación con la velocidad de disolución como los tres factores más importantes que modulan la velocidad y cuantía de la absorción de un principio activo y por tanto su biodisponibilidad a partir de formas farmacéuticas sólidas de uso oral de liberación inmediata.



### 3.1.1 Fundamentos teóricos del BCS

La “primera ley de la absorción” se basa en considerar el proceso de permeación a través de la membrana intestinal en términos difusionales. Si se considera la primera ley de Fick para definir la velocidad de difusión a través de la membrana tal y como se representa en la figura siguiente, suponiendo el intestino como un tubo de radio R y longitud L en el cual la forma farmacéutica libera el fármaco, que se disuelve en los fluidos intestinales produciendo un determinado perfil de concentración en la vecindad de la membrana intestinal, el proceso de absorción está definido por la siguiente ecuación:

$$\frac{dQ}{dt \cdot dA} = J = P \cdot C \quad (1)$$

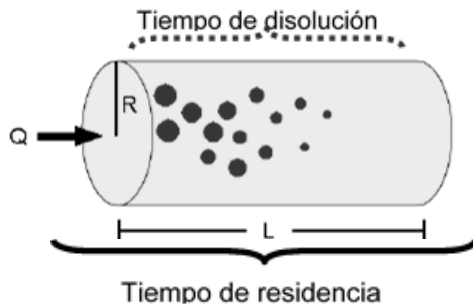
Donde:

$P$ = Permeabilidad efectiva

$J$ = Flujo de difusión a través de la pared intestinal (masa/área/tiempo).

$C$ = Concentración del fármaco en la vecindad de la membrana.

#### Tránsito, disolución y absorción en un tubo



Ecuación para la partícula:

$$\frac{dr}{dz} = -\frac{D\pi R^2 (C_s - C_i)}{Q_p r}$$

Ecuación para la solución:

$$\frac{dC_i}{dz} = \frac{DN_o}{V} \frac{4\pi R^2}{Q} r(C_s - C_i) - \frac{P_{\text{eff}} 2\pi R}{Q} C_i$$

**Figura 1.** Representación del flujo del fármaco a través de un segmento intestinal. Tomado de Amidon y Bermejo Modern Biopharmaceutics Version española 6.0 2005.

En la ecuación se asumen condiciones de máximo gradiente o sumidero (“sink”) al considerar como nula la concentración en el interior de la membrana, lo que se justifica desde el punto de vista fisiológico por actuar el flujo sanguíneo como mecanismo de drenaje continuo del fármaco. Esta ecuación es válida para unas coordenadas determinadas y en un instante concreto (x,y,z, t)

La velocidad de absorción del principio activo en cantidad o masa por unidad de tiempo, es decir la velocidad de desaparición del lumen intestinal, (excluyendo reacciones de descomposición *in situ*) a cualquier tiempo t, se puede expresar de acuerdo a la ecuación 2:

$$\frac{dQ}{dt} = \iint_A P \cdot C \cdot dA \quad (2)$$

Donde:

A= Área superficial.

La doble integral representa la superficie total del intestino. Para obtener la cantidad total de principio activo absorbida a tiempo t se debe integrar la ecuación anterior, y se obtiene la ecuación 3:

$$Q = \int_0^t \iint_A P \cdot C \cdot dA \cdot dt \quad (3)$$

A partir de estas ecuaciones se deducen los siguientes principios:

La velocidad de absorción depende de la permeabilidad y de la concentración en los fluidos intestinales, así pues la máxima velocidad de absorción se dará cuando la concentración alcance su límite máximo, es decir, su solubilidad en el fluido intestinal. La concentración del fármaco en los fluidos lumenales además de estar limitada por la solubilidad está condicionada por la velocidad de disolución desde la forma farmacéutica. Por otra parte la cantidad total absorbida dependerá de los factores anteriores y del tiempo que dure el proceso de absorción, que se haya limitado por el tiempo de tránsito intestinal. Adicionalmente del esquema anterior puede deducirse el siguiente principio.

*Si dos medicamentos que contengan el mismo principio activo producen el mismo perfil de concentración a lo largo del tiempo en la vecindad de la membrana intestinal, tendrán la misma velocidad y magnitud de absorción y serán por ello necesariamente bioequivalentes.*

Dos condiciones adicionales deben cumplirse para que la afirmación anterior sea cierta y es que la velocidad de disolución *in vivo* de ambas formulaciones es la misma en todas las condiciones luminales y que ninguna de ellas contenga excipientes que puedan alterar la permeabilidad o la velocidad de tránsito intestinal.

En resumen, se concluye que la solubilidad la permeabilidad intestinal y la velocidad de disolución son los principales factores biofarmacéuticos que afectan la velocidad y la magnitud de absorción intestinal de un fármaco.

### **3.2 Definición de las magnitudes adimensionales $An$ , $Dn$ y $Do$ .**

A fin de desarrollar un modelo cuantitativo para predecir la velocidad y magnitud de la absorción se debe describir los procesos de tránsito de las partículas de fármaco, su disolución en el intestino y su absorción. Para ello se considera un segmento del intestino delgado como un tubo de longitud  $L$  y radio  $R$  en el que la permeabilidad es constante y las partículas aun sin disolver del fármaco avanzan con un flujo laminar. Se asume que las interacciones entre partículas son insignificantes (es decir no hay agregación), y la disolución se encuentra en el límite inferior del tamaño de partículas. (lo que implica considerar que el espesor de la capa acuosa límite alrededor de las mismas coincide con su radio). Estos supuestos se esquematizan en la figura 2.

El siguiente paso es describir el balance de masa en este sistema, considerando los procesos que hacen aparecer el fármaco en el fluido luminal, es decir la disolución de las partículas y los procesos responsables de su desaparición, es decir el tránsito y la absorción. Así pues se define el cambio de tamaño de las partículas por disolución y el cambio de concentración del fármaco por disolución y absorción a lo largo del segmento tal y como se representa en la figura. En ese modelo, la ecuación que describe el cambio de tamaño de la partícula por disolución es la siguiente

$$\frac{dr}{dz} = \frac{D \cdot \pi \cdot R^2}{Q \cdot \rho} \cdot \frac{(C_s - C_l)}{r} \quad (4)$$

R=radio del segmento intestinal; Q= flujo de fluido;  $\rho$ = densidad de las partículas;  $C_s$ =solubilidad;  $C_l$ = concentración en lumen; r=radio de las partículas; D=coeficiente de difusión;  $dz=dt \cdot v_z$  siendo  $v_z$  la velocidad axial del fluido.

El cambio en la concentración de la disolución:

$$\frac{dC}{dz} = \frac{D \cdot N_o}{V} \cdot \frac{4\pi \cdot R^2}{Q} \cdot r \cdot (C_s - C_l) - \frac{P_{ef} \cdot 2\pi \cdot R}{Q} \cdot C_l \quad (5)$$

$N_o$ = número inicial de partículas en la dosis,

V volumen en lumen,

$P_{ef}$ =permeabilidad efectiva.

Por conveniencia, para la integración estas ecuaciones se transforman en adimensionales a través de tres importantes parámetros también adimensionales: el *número de absorción* ( $An$ ), el *número de disolución* ( $Dn$ ) y el *número de Dosis* ( $Do$ ), que se definen a continuación

El número de dosis ( $Do$ ) se estima mediante la siguiente expresión

$$Do = \frac{D/V}{C_s} \quad (6)$$

Donde:

D = Dosis contenida en la unidad de dosificación, expresada en mg

V= Volumen administrado con la dosis en mL, en general se toma como valor 250 mL (1 vaso de agua)

$C_s$ = Solubilidad expresada en mg/mL.

El número de dosis es una magnitud adimensional pero el resultado numérico representa de manera intuitiva el número de vasos de agua necesarios para disolver la dosis de principio activo contenida en la unidad de dosificación. Si el número de dosis es inferior a la unidad para todo el perfil de solubilidad-pH del fármaco dentro del ámbito fisiológico ello significa que la dosis se disolverá sin problema de manera completa en los 250 mL y que por tanto la solubilidad no es uno de los parámetros críticos para determinar la fracción absorbida.

El número de disolución ( $Dn$ ) se define mediante la ecuación 7 y esquemáticamente en la figura:

$$D_n = \frac{\text{Tiempo de residencia}}{\text{Tiempo de disolución}} = \frac{2 \cdot D \cdot C_s}{\rho \cdot r_0^2} \cdot t_{res} = \frac{t_{res}}{t_{dis}} \quad (7)$$

En la que:

D= Coeficiente de difusión;  $r_0$ = radio inicial de la partícula;  $\rho$  =densidad del fármaco;  $t_{res}$  = tiempo de residencia en el intestino delgado =  $\pi R^2 L/Q$ ;  $t_{dis}$ = tiempo necesario para la disolución de la partícula.

Al ser una relación de tiempos también carece de dimensiones. De la expresión se deduce que un número de disolución pequeño inferior a la unidad implica que el fármaco no se disuelve completamente durante el tránsito y por tanto la absorción no será completa.

El número de Absorción ( $A_n$ ) se define mediante la ecuación 8,

$$A_n = \frac{\text{Tiempo de residencia}}{\text{Tiempo de absorción}} = \frac{P_{ef}}{R} \cdot t_{res} = \frac{t_{res}}{t_{abs}} \quad (8)$$

En la que :

$t_{abs}^{-1} = k_{abs} = \text{Constante de velocidad de absorción} = (A/V) P_{ef} = 2 \cdot P_{ef}/R$ ; A es el área superficial del cilindro y V el volumen del mismo.

Los fármacos de elevada permeabilidad intestinal presentan números de absorción superiores a la unidad y en ausencia de otros factores limitantes su absorción es lucrativa.

**Tabla 1:** Cocientes y relaciones necesarias para transformar en adimensionales las ecuaciones 4 y 5

$C^* = C_i/C_s$	$z = v_z \cdot t$
$r^* = r/r_0$	$dz = v_z \cdot dt$
$z^* = z/L$	$t_{res} = L/ v_z$
$t^* = t/t_{res}$	$t_{diss} = r_0^2 \cdot \rho / 2 \cdot D \cdot C_s$

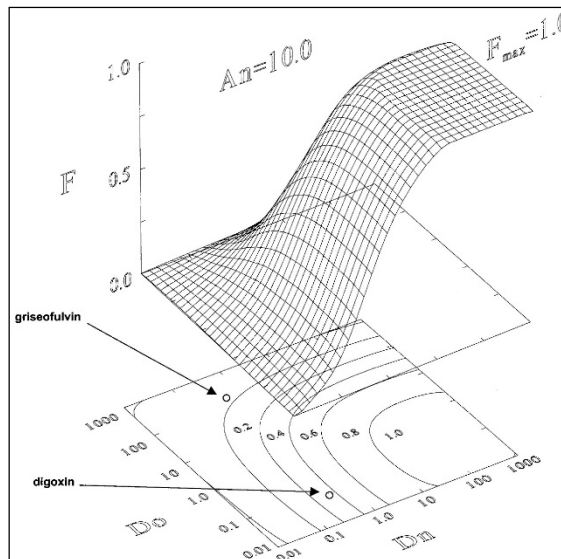
Además de  $A_n$ ,  $D_n$  y  $D_o$  para hacer adimensionales las ecuaciones se definen las relaciones expresadas en la Tabla 1: Finalmente, las ecuaciones 4 y 5 se transforman en las siguientes:

$$\frac{dr^*}{dt^*} = -\frac{D_n}{2} \cdot \frac{(1-C^*)}{r^*} \quad (9)$$

$$\frac{dC^*}{dt^*} = \frac{3}{2} \cdot D_o \cdot D_n \cdot r^* \cdot (1 - C^*) - 2A_n \cdot C^* \quad (10)$$

Estas ecuaciones representan el balance de masa en el tubo y mediante su integración se puede estimar la fracción oral absorbida a partir del número de dosis  $D_o$ , número de disolución  $D_n$  y número de absorción  $A_n$ .

En la figura 2 se representa en un gráfico tridimensional la dependencia de la fracción oral absorbida del número de dosis y del número de disolución para un principio activo de alta permeabilidad ( $A_n=10$ ),



**Figura 2** Representación de la fracción oral absorbida para fármacos con número de absorción elevado,  $A_n=10$  en función del número de dosis  $D_o$  y del número de disolución  $D_n$ . Se muestran los valores de fracción absorbida interpolados a partir de  $D_o$  y  $D_n$  en la gráfica para la digoxina (58%) y para la griseofulvina (18%). Adaptado de Lobenberg R y Amidon GL 2000.

La gráfica pone de manifiesto la gran dependencia de la fracción absorbida respecto de estas magnitudes adimensionales cuando sus valores se encuentran en rangos críticos (alrededor de 1) para un fármaco de alta permeabilidad. En la figura también se observa que a elevados números de dosis (es decir para fármacos de muy baja solubilidad), la magnitud de la absorción es sólo débilmente dependiente del número de disolución. La solución límite de las ecuaciones 9 y 10 para esta región es  $F_a=2A_n/D_o$  y es independiente de la velocidad de disolución. Esta es la denominada

región de absorción limitada por *solubilidad*. Por otro lado, en la zona de números de dosis moderados, sólo una disolución muy rápida garantiza la absorción completa y la magnitud de la absorción depende en gran medida del número de disolución, de forma que aumentos de la velocidad de disolución (cambios en  $Dn$  de 0.1 a valores superiores a 1) suponen incrementos de fracción absorbida de 0.2 a 0.8. Esta es la región de absorción limitada por la *disolución*.

Para estimar la absorción *in vivo*, sería necesario conocer la solubilidad *in vivo* en los fluidos luminales, no obstante como aproximación se recomienda utilizar una estimación del número de dosis obtenido a partir de la solubilidad mínima del fármaco, en el ámbito fisiológico de pH (1-8) y temperatura.

**Tabla 2.** Parámetros adimensionales calculados para algunos principio activos.

<b>Principio Activo</b>	<b>Dosis (mg)</b>	<b>Cs<sup>min</sup> (mg/mL)<sup>a</sup></b>	<b>V sol (mL)<sup>b</sup></b>	<b>Do<sup>c</sup></b>	<b>Dn<sup>d</sup></b>
Piroxicam	20	0,007	2857	11,4	0,15
Glyburida	10	0,0034	2941	11,6	0,074
Cimetidina	800	6,000	133,3	0,53	129
Hidroclorotiazida	500	0,786	636	2,54	17,0
Digoxina	0,5	0,024	20,8	0,08	0,52
Griseofulvina	500	0,015	33333	133	0,32
Carbamazepina	200	0,260	769	3,08	5,61

a: las solubilidades fisiológicas mínimas fueron determinadas en el rango de pH fisiológico (1-8) y a temperatura corporal.

b: Volumen de disolvente necesario para disolver completamente la dosis a la mínima solubilidad fisiológica.

c:  $Do = Dosis/Vo/Csmin$ , volumen gástrico inicial de 250 mL.

d: Se asume:  $r_0 = 25 \text{ um}$ ,  $D = 5 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{seg.}$ ,  $\rho = 1,2 \text{ gm/cm}^3$ , (tres) = 180 min.

La tabla 2 presenta los datos de dosis, solubilidad, número de dosis y número de disolución estimados para algunos principios activos escogidos con objeto de ilustrar el significado de los mencionados parámetros adimensionales. Por ejemplo la griseofulvina y la digoxina presentan solubilidades similares (0,015 mg/mL y 0,024

mg/mL, respectivamente). Sin embargo ello no se corresponde con similares fracciones absorbidas. El número de dosis es bajo para la digoxina 0.08 y muy elevado para la griseofulvina, 133 lo que indica que la dosis de digoxina se disuelve completamente en los fluidos gastrointestinales y su fracción oral absorbida puede alcanzar el 100% con el tamaño de partícula adecuado (i.e. si la velocidad de disolución no es limitante), pero no así la de la griseofulvina cuya absorción es incompleta (limitada por solubilidad) pero puede incrementarse en un factor de 1.7 por micronización o con su administración en presencia de alimentos de forma que la presencia de sales biliares incremente su solubilidad *in vivo*. Por otro lado este ejemplo ilustra como el dato de solubilidad no puede interpretarse de manera aislada sino que su relevancia para la absorción debe ponerse en contexto considerando la dosis a administrar. Es importante darse cuenta que la solubilidad, y por lo tanto la dosis y el número de disolución de un principio activo *in vivo* son difíciles de estimar, precisamente debido a que el potencial de agregación de las partículas y la solubilidad en los fluidos lumenales son desconocidas. De aquí que la absorción *in vivo* de un compuesto sólo puede estimarse de forma aproximada dentro de un ámbito de valores, dependiendo del área superficial y grado de solubilización que se asuman. Sin embargo este análisis permite realizar comparaciones entre diferentes formas farmacéuticas de un mismo principio activo dado un valor estimado de solubilidad y área intestinal.

### **3.3 Clases del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) e implicaciones farmacéuticas.**

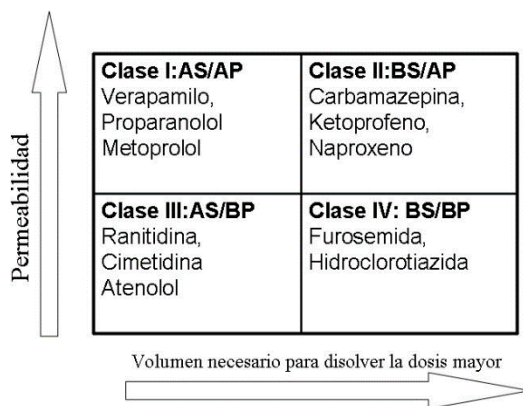
El análisis anterior sugiere que la permeabilidad y la solubilidad son los parámetros claves que controlan la magnitud y velocidad de absorción de un fármaco. De esta manera, como ya se señaló, los principios activos se pueden dividir en diferentes clases, de acuerdo a su solubilidad y permeabilidad (alta/baja). La combinación de estos dos factores y sus dos niveles conduce a las cuatro clases del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) como se muestra en la figura 3. De esta forma es sencillo identificar los factores limitantes de la absorción y establecer cuando será posible encontrar correlaciones entre la disolución *in vitro* de la forma de liberación inmediata y su absorción *in vivo* según se resume en la tabla 3.

**Tabla 3.** *Correlaciones in vitro- in vivo (IVIV) esperadas para productos orales de liberación inmediata, sobre la base de la clasificación biofarmacéutica.*



Clase	Solubilidad	Permeabilidad	Correlación <i>IVIV</i> * esperada
I	Alta	Alta	Correlación <i>IVIV</i> si la velocidad de disolución es menor que la velocidad de vaciamiento gástrico. De lo contrario la correlación es limitada o bien no existe.
II	Baja	Alta	Se espera correlación <i>IVIV</i> si la velocidad de disolución <i>in vitro</i> es similar a la velocidad de disolución <i>in vivo</i> , exceptuando los casos en que la dosis sea muy elevada.
III	Alta	Baja	La absorción (permeabilidad) es el paso determinante y limitante, o no existe correlación <i>IVIV</i> con la etapa de disolución.
IV	Baja	Baja	La correlación <i>IVIV</i> es limitada, o simplemente no existe.

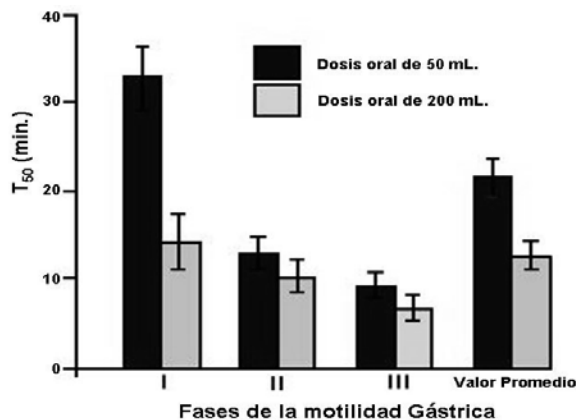
\*Una correlación limitada significa que la velocidad de disolución no es el proceso determinante debido a que puede ser similar con la velocidad de absorción. El grado de correlación dependerá de las velocidades relativas



**Figura 3:** Sistema de clasificación biofarmacéutica y ejemplos de fármacos pertenecientes a cada una de las clases. AS: alta solubilidad; BS: baja solubilidad; AP: alta permeabilidad; BP: baja permeabilidad.

**Clase I: Principios activos de alta solubilidad y alta permeabilidad:** Este es el caso el principio activo se absorbe bien (aunque su biodisponibilidad sistémica puede ser

baja debido al metabolismo de primer paso) y el paso limitante de la absorción, sería la velocidad de disolución o el vaciado gástrico, si es que la disolución es muy rápida. Para formas farmacéuticas de liberación inmediata que se disuelven muy rápidamente, la velocidad de absorción estará controlada por la velocidad de vaciamiento gástrico. Por lo tanto, no se esperan correlaciones con la velocidad de disolución (IVIVC). En estado de ayunas, la velocidad de vaciado gástrico es dependiente del volumen y de la fase de motilidad gastrointestinal, con una semivida de vaciado promedia entre 12 y 22 minutos después de la administración de volúmenes de 50 y 200 mL respectivamente como se ilustra en la figura 4. Ello implica que con una especificación de disolución de más del 85% en menos de 15 minutos para distintas formas farmacéuticas de liberación inmediata conteniendo el mismo principio activo se puede garantizar que se produce el vaciado de una disolución del principio activo con las correspondientes implicaciones a la hora de establecer la bioequivalencia entre las mismas que se comentarán más adelante.



**Figura 4** Gráfico de medidas de semividas de vaciado gástrico,  $T_{50}$ , en función de la fase de motilidad gástrica en estado de ayuno tras la administración de volúmenes de 50mL. y 200 mL. de agua. Adaptado de Amidon, G.L. et al 1995

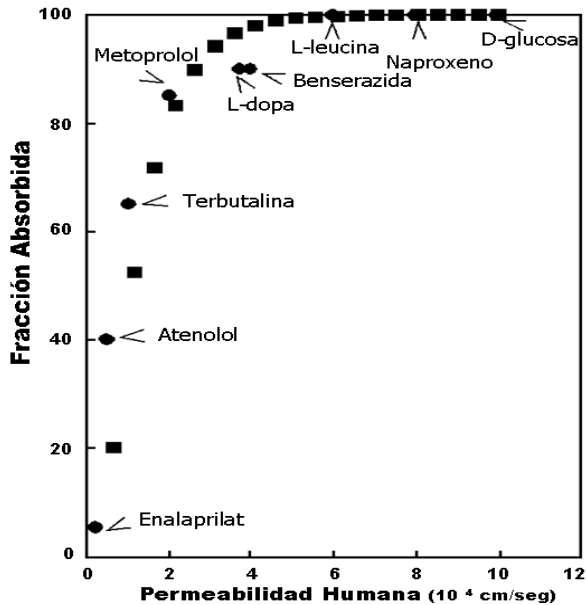
**Clase II: Fármacos de baja solubilidad y alta permeabilidad:** Para estos fármacos, el valor de su hidrosolubilidad ( $C_s$ ) es bajo y por ello también presentan un valor de  $D_n$  bajo, ya que este índice está indirectamente relacionado con el tiempo de disolución que es en este caso elevado. En estas condiciones, la velocidad de disolución del fármaco in vivo es el factor limitativo de su absorción (salvo que la dosis sea muy elevada). Los estudios de velocidad de disolución in vitro deberán realizarse desde un punto de vista global, no puntual; es decir, estudiando el perfil completo del proceso de disolución (con a lo menos 4-6 puntos y para al menos un

85% de disolución a diferentes pH fisiológicos.). Es posible obtener correlaciones *in vitro/in vivo*, si el proceso de velocidad de disolución *in vitro* es similar al que se desarrolla *in vivo*. Puede esperarse que los principios activos pertenecientes a esta clase tengan una absorción variable y dependiente de las diferentes formulaciones, y sobre todo del tamaño de partícula, al afectar potencialmente la formulación al perfil de disolución tanto *in vitro* como *in vivo*. En este caso, el medio de disolución y los métodos que reflejan los procesos fisiológicos *in vivo*, son particularmente importantes, si se desea obtener buenas correlaciones *in vivo-in vitro*.

*Clase III: Fármacos de alta solubilidad y baja permeabilidad:* para esta clase de principios activos, la permeabilidad es el paso limitante de la absorción. A pesar de que el perfil de disolución debe ser bien definido, la simplificación en las especificaciones de disolución, tal como en los fármacos de clase I, es aplicable para las formas farmacéuticas de liberación inmediata en las cuales la llegada del principio activo al intestino depende de la velocidad de vaciado gástrico. Para esta clase de fármacos, tanto la velocidad como la cuantía de la absorción del principio activo pueden ser altamente variables. Sin embargo, si la disolución es rápida, es decir el 85% se disuelve en 15 minutos, esta fluctuación se deberá a la variabilidad del tránsito gastrointestinal, al contenido luminal y a la permeabilidad de las membranas, más que a factores dependientes de la forma farmacéutica.

*Clase IV: Fármacos de baja solubilidad y baja permeabilidad:* Esta clase de principios activos presentan problemas significativos para una liberación oral efectiva. El número de fármacos que caen en esta clase dependerá de los límites precisos que se empleen para la clasificación de permeabilidad y solubilidad.

Generalmente, la solubilidad y las dosis de los fármacos se encuentran fácilmente disponibles en la literatura y, en ocasiones, la información respecto del tamaño de partículas. Por el contrario, las permeabilidades de los principios activos en la especie humana se conocen para un número muy limitado de principios activos. No obstante el desarrollo de técnicas de intubación que se describirán en el siguiente epígrafe permitió establecer la relación entre la permeabilidad intestinal y la fracción oral absorbida en ausencia de cualquier otro factor limitante (es decir con el fármaco e disolución) que se representa en la figura 5.



*Figura 5 Representación de la fracción oral absorbida frente a la permeabilidad intestinal humana. Adaptado de: Amidon G., 2001*

Los principios científicos del BCS se reflejan en las guías tanto de la FDA, como de la EMEA, con objeto de establecer el método más apropiado para establecer la bioequivalencia entre formulaciones farmacéuticas orales de liberación inmediata de un mismo principio activo. En estas guías se introduce el concepto de bioexención (“Biowaiver”) entendiéndose como tal la posibilidad de realizar los estudios de bioequivalencia mediante comparación de perfiles de disolución in vitro. Es decir, se exime del uso de datos en humanos y se autoriza su sustitución por datos in vitro de disolución aunque en última instancia la bioequivalencia entre las dos formulaciones debe quedar establecida. Aunque el debate científico continúa abierto sobre qué clases del BCS y en qué condiciones serían candidatas a una bioexención, en la actualidad las guías admiten esta alternativa sólo para *principios activos de clase 1 en formulaciones orales de liberación inmediata*. En este caso se acepta que la elevada solubilidad del principio activo y su rápida disolución garantizan que estará disuelto antes de vaciar del estómago, de forma que es éste parámetro fisiológico el que limita la absorción y por tanto al llegar disuelto al intestino desde ambas formulaciones en comparación nada se opone a admitir que serán bioequivalentes. Lo que debe establecerse a continuación es cuáles son los límites

formales para realizar la clasificación y de qué manera debe llevarse a cabo el ensayo de bioequivalencia *in vitro*. Los procedimientos experimentales para establecer la clasificación y los límites de permeabilidad y solubilidad se describen con detalle en el próximo capítulo. Se indican a continuación los requisitos mínimos para la realización de un ensayo de bioequivalencia *in vitro*.

### **3.4. Solicitudes de Bioexención: Bioequivalencia In Vitro.**

Para realizar una solicitud de bioexención, además de los requisitos del principio activo, es decir su clasificación en el sistema BCS según se ha descrito en los epígrafes anteriores, las formas farmacéuticas en comparación deben cumplir con unos requisitos adicionales en cuanto a su composición y a su velocidad de disolución.

*Disolución:* Se considera el producto rápidamente soluble, cuando se disuelve no menos del 85% de la cantidad total de fármaco que contenga el producto, en un tiempo no superior a 30 minutos, usando los aparatos de la Farmacopea de Estados Unidos (aparato I a 100 RPM. o aparato II a 50 RPM), utilizando un volumen de 900 mL de los siguientes medios:

- 1) HCL 0,1 N o fluido gástrico simulado USP sin enzimas
- 2) Buffer pH 4,5
- 3) Buffer pH 6,8 o fluido intestinal simulado USP sin enzimas

Tomando como base los fundamentos científicos del BCS y la caracterización de las formulaciones farmacéuticas la FDA reflejo en su guía el concepto de bioexención “biowaiver” que consiste en la demostración de la bioequivalencia mediante la demostración de la similitud de los perfiles de disolución del producto problema y la formulación de referencia de fármacos pertenecientes a la clase 1<sub>7</sub> y también aceptable para fármacos de Clase 3 según la guía europea<sub>8</sub>. Esto permite al producto problema prescindir de los estudios clínicos en humanos (*in vivo*) y establecer la bioequivalencia *in vitro*. Esta alternativa se fundamenta en que según se ha descrito con anterioridad para los fármacos de la Clase I (altamente solubles y altamente permeables) y Clase 3 (altamente solubles y poco permeables) en formulaciones que se disuelvan rápido (y sin excipientes que alteren la motilidad intestinal), el paso limitante de la absorción es el vaciado gástrico (estimado en ayunas en aproximadamente 15-20 minutos) y que aunque no es esperable ninguna correlación IVIV, como clásicamente se definía, la bioequivalencia entre formulaciones distintas está asegurada porque se puede garantizar que el perfil de concentración a lo largo

de la membrana intestinal será el mismo para todas las formulaciones y sus concentraciones plasmáticas han de ser necesariamente similares en ese caso.

El método recomendado para la comparación de los perfiles de disolución es el denominado factor de similitud  $f_2$  que responde a la ecuación:

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \frac{100}{\sqrt{1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2}} \right\} \quad (11)$$

En que  $R_t$  y  $T_t$  son los porcentajes promedios disueltos en cada uno de los  $n$  tiempos de muestreo seleccionado, correspondiente al producto de referencia y al producto en estudio, respectivamente.  $f_2$  es inversamente proporcional al promedio de la diferencia al cuadrado entre los dos perfiles y cuantifica la proximidad entre los mismos. Cuando los dos perfiles son idénticos,  $f_2 = 100$ . Una diferencia promedio de 10% en todas las mediciones a los diferentes tiempos, se traduce en un valor  $f_2$  de 50%. La FDA ha establecido un valor estándar de  $f_2$  entre 50-100 para indicar similitud entre dos perfiles de disolución. El cálculo de este parámetro debe hacerse utilizando para el ensayo de disolución al menos 12 unidades de cada producto, un mínimo de tres tiempos de muestreo y sólo puede incluirse en el cálculo un tiempo una vez una de las formulaciones alcance el 85% disuelto. Adicionalmente se requiere que el coeficiente de variación de las cantidades promedias disueltas no supere el 10% aunque para los primeros tiempos de muestreo (10-15 minutos) las diferentes guías (EMEA, FDA) permiten coeficientes de variación superiores (p.ej 20%).

Los perfiles de disolución de la formulación problema y referencia deben obtenerse a 3 pH's diferentes en el ámbito 1-7.5 en los siguientes aparatos y medios de disolución:

Aparato I a 100 RPM. o aparato II a 50 RPM, utilizando un volumen de 900 mL de: HCL 0,1 N o fluido gástrico simulado USP sin enzimas; tampón pH 4,5 y tampón pH 6,8 o fluido intestinal simulado USP sin enzimas.

### **3.5. Extensiones y aplicaciones futuras del BCS:**

En la actualidad las “bioexenciones” basadas en el BCS se aceptan únicamente para fármacos clase 1 sin embargo se ha propuesto su extensión a otras clases. Para fármacos clase 3 en formulaciones de disolución rápida puede aceptarse al igual que para los de clase 1 que en ausencia de excipientes que afecten a la membrana intestinal la formulación no interfiere con su absorción. En el caso de los fármacos clase 3 el factor limitativo es su propia permeabilidad, que es una característica del fármaco y no de la formulación (en ausencia de excipientes que afecten a la misma) por lo tanto desde el punto de vista científico serían igualmente candidatos a bioexenciones<sup>9, 10, 11</sup>. Este principio ha sido incorporado a las recomendaciones de la OMS y la la reciete guía europea sobre bioequivalencia<sup>8</sup> aunque en este caso la especificación sobre velocidad de disolución se hace más estricta (más del 85% en 15 minutos) con objeto de garantizar que es el fármaco disuelto lo que vacía del estómago<sup>12, 13</sup>. Se han propuesto asimismo bioexenciones para fármacos clase 2 de baja solubilidad en estómago pero de solubilidad elevada a pH intestinal (6.8) que presenten disolución muy rápida (más del 85% en 15 min) en estas condiciones.<sup>14</sup>

La posibilidad de demostrar la bioequivalencia y por tanto garantizar la calidad de los medicamentos accesibles a la población mediante estudios in vitro de disolución en base a los criterios científicos del BCS es un aspecto de especial relevancia para los países en vías de desarrollo. Por otro lado han de considerarse las implicaciones éticas de realizar un estudio en voluntarios humanos cuando desde el punto de vista científico no es esencial para el objetivo final (demostrar la bioequivalencia). En cierta manera el BCS supone la aplicación de la política de las tres R (reducir, refinar, remplazar) nacida para la experimentación animal, a la experimentación en humanos. Por ello, un análisis relevante es evaluar cuantos principios activos serían potenciales candidatos a las mencionadas bioexenciones. Con este fin se realizó una clasificación *provisional* de los principios activos contenidos en la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud, OM<sup>15</sup>. La clasificación se realizó a partir de datos de solubilidad obtenidos de fuentes bibliográficas fácilmente accesibles y de los datos de permeabilidad humana de 29 fármacos modelo y su correlación con sus coeficientes de reparto. Tomando el dato de solubilidad se calcularon los números de dosis de los 123 principios activos contenidos en los medicamentos orales de liberación inmediata de la lista. Se encontró un 67% de fármacos con  $Do < 1$ , es decir de alta solubilidad. Para la clasificación de permeabilidad se tomó la correlación entre las permeabilidades humanas conocidas de 29 fármacos y su Log P o cLogP estimado. Se tomó como referencia el metoprolol y se clasificó como de alta permeabilidad a todos aquellos fármacos cuyo LogP o cLogP fuera superior al del metoprolol. Un total de 53% (43.1%) y 62 (50.4%) fármacos presentaban LogP y cLogP respectivamente superiores al metoprolol y se consideraron de alta permeabilidad. Los porcentajes promedios (según se use LogP o CLogP) de fármacos en cada clase del BCS hallados

fueron los siguientes 23% de clase 1, 17% de clase 2, 32% en la clase 3, 11% en clase 4 y un 17% quedó sin clasificar por no poder calcular su LogP o cLogP. Resultados muy similares fueron obtenidos por otros autores que recopilaban datos experimentales de solubilidad y permeabilidad de diversas fuentes bibliográficas.<sup>16</sup> Estos resultados sugieren que de admitirse las bioexenciones para los fármacos clase 3 como propone el reciente documento de la OMS y ya se ha implementado en algunos países latinoamericanos un 55% de los fármacos esenciales de la OMS serían candidatos a demostrar su bioequivalencia *in vitro* lo que comporta repercusiones éticas y económicas importantes en los países en vías de desarrollo para los que es esencial garantizar la accesibilidad de su población a los medicamentos sin perder las garantías de calidad esencial.

En resumen el BCS establece la solubilidad del principio activo, su velocidad de disolución *in vivo* y su permeabilidad a través de la membrana intestinal como los parámetros condicionantes de la magnitud y velocidad de absorción y finalmente, de la biodisponibilidad oral (BA) del principio activo.<sup>2,5</sup> Se ha propuesto recientemente una modificación del BCS, el Sistema de clasificación de disposición biofarmacéutico, BDDCS (“Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System”) <sup>17,18</sup> basado en la observación de que los fármacos de alta permeabilidad son en general fármacos con eliminación por metabolismo, de forma que se propone como criterio para clasificar un fármaco en la clase 1 poseer una tasa de metabolismo igual o superior al 90% (lo que implica necesariamente una fracción absorbida superior a ese valor). Las estrategias tecnológicas para incrementar la biodisponibilidad de una molécula dependen, por tanto, de cuál de las tres características mencionadas es el factor limitante de la absorción. De esta manera el BCS y el BDDCS constituyen hoy en día una valiosa herramienta durante el proceso de desarrollo de un medicamento, ya que permite establecer si será o no posible incrementar la biodisponibilidad de la molécula en desarrollo y en su caso seleccionar la tecnología a utilizar<sup>19</sup>. Aunque en su desarrollo original el BCS se utilizó como herramienta para establecer la posibilidad de demostrar la bioequivalencia mediante estudios *in vitro* de disolución (*in vitro* BE) sus bases científicas presentan numerosas implicaciones de aplicación en la fase de desarrollo clínico y preclínico<sup>20</sup> puesto que la clasificación del principio activo establece el tipo de factor limitativo para la absorción gastrointestinal, puede informar sobre la posibilidad de interacciones fármaco alimento, ayuda a establecer criterios para decidir sobre la formulación óptima y sobre la posibilidad de utilizar el fármaco en formas de liberación controlada o, como se ha visto, sobre la posibilidad de establecer de correlaciones *in vitro in vivo*.



---

<sup>1</sup> Amidon, G. L y Bermejo, M. *Modern Biopharmaceutics* V. 6.0. J. Price, Tsrl, inc. 2005

<sup>2</sup> Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P., y col. "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability". *Pharm Res*, 1995, 12(3): 413-420.

<sup>3</sup> Lobenberg, R. y Amidon, G. L. "Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards". *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50(1): 3-12.

<sup>4</sup> Oh, D. M., Curl, R. L. y Amidon, G. L. "Estimating the fraction dose absorbed from suspensions of poorly soluble compounds in humans: a mathematical model". *Pharm Res*, 1993,10(2): 264-270.

<sup>5</sup> FDA. "Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System". 2000

<sup>6</sup> EMEA. CPMP/EWP/QWP/1401/98 "Note for Guidance On Investigation Of Bioavailability. and Bioequivalence." 2000

<sup>7</sup> FDA guidance for industry. "Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System". 2000

<sup>8</sup> Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency (EMA). "Guideline on the Investigation of Bioequivalence", London, 2010.

<sup>9</sup> Yu, L. X., Amidon, G. L., Polli, J. E., y col. "Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions." *Pharm Res*, 2000, 19(7): 921-925.

<sup>10</sup> Tubic-Grozdanis, M., Bolger, M. B. y Langguth, P. "Application of gastrointestinal simulation for extensions for biowaivers of highly permeable compounds". *Aaps J* 2008, 10(1): 213-226.

<sup>11</sup> Blume, H. H. y Schug, B. S. "The biopharmaceutics classification system (BCS): class III drugs - better candidates for BA/BE waiver?" *Eur J Pharm Sci*, 1999, 9(2): 117-121.

<sup>12</sup> WHO. "Multisource (generic) pharmaceutical products: Guidelines on registration requirements to establish interchangeability". *Technical Report Series, No 937, 40th Report, Annex 7* WHO. Geneva. 2006

<sup>13</sup> WHO. "Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms". *Technical Report Series, No 937, 40th Report, Annex 8*. WHO. Geneva. 2006

<sup>14</sup> Rinaki, E., Dokoumetzidis, A., Valsami, G., y col. "Identification of biowaivers among Class II drugs: theoretical justification and practical examples". *Pharm Res* 2004. 21(9): 1567-1572.

---

<sup>15</sup> Kasim, N. A., Whitehouse, M., Ramachandran, C., y col. “Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification”. *Mol Pharm* 2004, 1(1): 85-96.

<sup>16</sup> Lindenberg, M., Kopp, S. y Dressman, J. B. “Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system”. *Eur J Pharm Biopharm* 2004, 58(2): 265-278.

<sup>17</sup> Benet, L. Z., Amidon, G. L., Barends, D. M., y col. “The use of BDDCS in classifying the permeability of marketed drugs”. *Pharm Res* 2008, 25(3): 483-488.

<sup>18</sup> Wu, C. Y. y Benet, L. Z. “Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system.” *Pharm Res* 2005, 22(1): 11-23.

<sup>19</sup> Lennernas, H. y Abrahamsson, B. “The use of biopharmaceutic classification of drugs in drug discovery and development: current status and future extension”. *J Pharm Pharmacol*, 2005, 57(3): 273-285.

<sup>20</sup> Polli, J. E., Yu, L. X., Cook, J. A., y col. “Summary workshop report: biopharmaceutics classification system--implementation challenges and extension opportunities”. *J Pharm Sci* 2004, 93(6): 1375-1381.

# 4. Sección generalidades: Fundamentos científicos del BCS y de la Bioequivalencia *in vitro*. Ejemplos de clasificación según el BCS

Gladys E. Granero

*Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Argentina*

## 4.1. Introducción

Una gran preocupación mundial es la garantía al acceso de los medicamentos a la mayoría de la población y en este contexto, los medicamentos “genéricos” cobran gran importancia. Los medicamentos genéricos deben demostrar que son “bioequivalentes” con un comparador para poder asegurar su intercambio, y requieren para ello la realización de estudios en voluntarios sanos, lo que involucra un problema de tipo ético y un alto costo financiero asociado a ello. Estos costos se reflejan en el precio del medicamento, pues el paciente es quien finalmente los cubre. En este marco de referencia se iniciaron numerosas investigaciones con la finalidad de encontrar alternativas efectivas a los estudios *in vivo*.<sup>1</sup>

Amidon y col. propusieron un sistema de clasificación biofarmacéutico en 1995, que clasificó a las sustancias medicamentosas en base a sus propiedades de solubilidad y permeabilidad.<sup>2</sup>

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) propuesto por Amidon y col. constituye un sólido fundamento científico, que establece la posibilidad de reemplazar los estudios realizados *in vivo* por ensayos *in vitro* (bioexención), siempre y cuando el fármaco reúna ciertas condiciones y se presente como una forma farmacéutica sólida de liberación inmediata (IR). Las agencias regulatorias y las organizaciones de salud han utilizado este sistema de clasificación para permitir utilizar los datos de disolución *in vitro* para establecer bioequivalencia (BE) para fármacos muy solubles y permeables.<sup>3</sup>

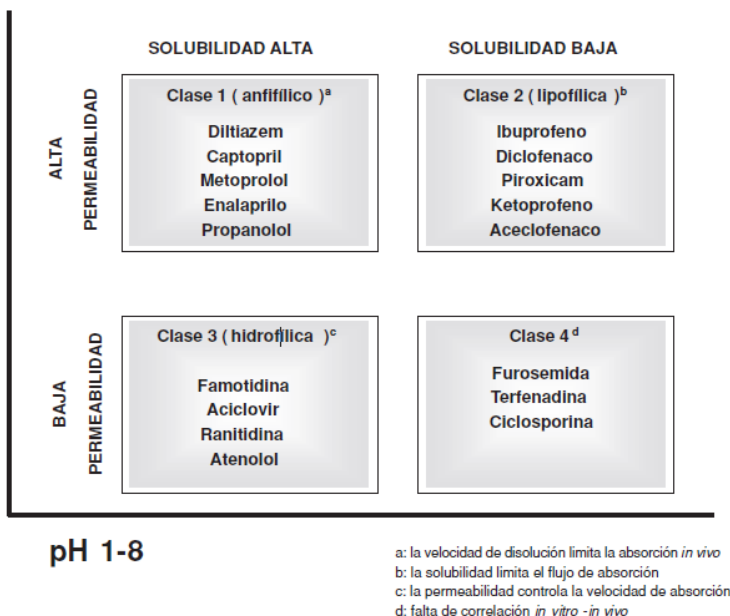
## 4.2. El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB)

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (SCB) es un marco científico para clasificar las sustancias medicamentosas en base a su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal. Cuando se combina con la disolución del producto medicamentoso, el SCB toma en cuenta tres factores principales que gobiernan la velocidad y el alcance de la absorción del fármaco a partir de formas posológicas orales sólidas de IR: disolución, solubilidad y permeabilidad intestinal.

*Tabla 1.* Según el SCB, las sustancias medicamentosas se clasifican de la siguiente manera:

CLASE	SOLUBILIDAD	PERMEABILIDAD
1	ALTA	ALTA
2	ALTA	BAJA
3	BAJA	ALTA
4	BAJA	BAJA

Además, se clasifican las formas posológicas orales sólidas de IR por su disolución rápida o lenta. Dentro de este marco, cuando se cumplen ciertos criterios, se puede usar el SCB como herramienta de desarrollo del fármaco para ayudar a los patrocinadores a justificar sus solicitudes de bioexenciones.



## **4.2 Bioexenciones**

Es posible que las diferencias observadas *in vivo* entre la velocidad y el alcance de la absorción de un fármaco entre dos productos orales sólidos farmacéuticamente equivalentes se deban a diferencias en la disolución del fármaco *in vivo*. Sin embargo, cuando la disolución *in vivo* de una forma posológica oral sólida de IR es rápida en relación con el vaciamiento gástrico y el fármaco tiene alta permeabilidad, es poco probable que la velocidad y el alcance de la absorción del fármaco dependan de la disolución y/o tiempo de tránsito gastrointestinal del mismo. Bajo tales circunstancias, es posible que no haga falta la demostración de biodisponibilidad (BA) o bioequivalencia (BE) *in vivo* para los productos medicamentosos que contienen sustancias medicamentosas de la Clase I según el SCB, siempre que los excipientes usados en la forma posológica no afecten significativamente la absorción de los ingredientes activos. En estos casos, el SCB se puede usar para justificar bioexenciones para sustancias medicamentosas altamente solubles y altamente permeables (Clase 1) en formas posológicas orales sólidas de IR que exhiben una disolución *in vitro* rápida usando el métodos de prueba recomendado.<sup>45</sup>

### **4.2.1 Solubilidad**

El límite de la clase de solubilidad se basa en la mayor concentración posológica del producto de IR objeto de una solicitud de bioexención.

Una sustancia medicamentosa se considera altamente soluble cuando la mayor concentración posológica es soluble en 250 ml o menos de medio acuoso en el rango de pH 1 – 7,5 (FDA) o 1 – 6,8 (EMA) a 37°C, en este último caso se requiere la investigación de al menos tres soluciones tamponadas en este rango (preferiblemente a pH 1,2, 4,5 y 6,8).

El cálculo del volumen de 250 ml se deriva de protocolos de estudios de BE típicos que prescriben la administración de un producto medicamentoso a voluntarios humanos en ayunas con un vaso (aproximadamente 8 onzas) de agua.

### **4.2.1 Permeabilidad**

El límite de la clase de permeabilidad se basa indirectamente en la medida de absorción (fracción de dosis absorbida, no BA sistémica) de una sustancia medicamentosa en el hombre y directamente en mediciones de la velocidad de transferencia de masa por la membrana intestinal humana, BA absoluta o perfusión intestinal.

Como alternativa, se puede usar sistemas no humanos capaces de predecir la medida de absorción del fármaco en el hombre como:

Perfusión intestinal *in vivo* o *in situ* en un modelo animal apropiado (por ejemplo, ratas)

Métodos de permeabilidad *in vitro* usando tejidos intestinales extirpados.

Capas simples de células epiteliales apropiadas.

Ante la ausencia de evidencia que sugiera inestabilidad en el sistema gastrointestinal, se considera que la sustancia medicamentosa es altamente permeable cuando se determina que la medida de absorción en el hombre es del 90% (FDA) o 85% (EMA) o más de una dosis administrada en base a una determinación de balance de masa o en comparación con una dosis de referencia intravenosa.

### 4.2.3 Disolución

Las formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata (IR) pueden clasificarse de acuerdo a que presenten rápida, muy rápida o lenta velocidad de disolución. Cuando se cumplen determinados criterios, el SCB puede ser usado como una herramienta para rusticar la demostración de equivalencia mediante estudios *in vitro* (bioexenciones).

Se considera que un producto medicamentoso de IR es de disolución rápida cuando no menos del 85% de la cantidad marcada de la sustancia medicamentosa se disuelve dentro de 30 minutos (FDA) o 15 minutos (EMA), usando el aparato I (aparato concanastilla) de la Farmacopea estadounidense (USP) a 100 rpm (o el Aparato II, aparato con paleta, a 50 rpm) en un volumen de 900 ml (FDA) o 500 ml (EMA) o menos en cada uno de los siguientes medios:

0,1 N de HCl o Fluido Gástrico Simulado USP sin enzimas

Tampón de pH 4,5

Tampón de pH 6,8 o Fluido Intestinal Simulado sin enzimas.

#### **4.2.3.1 Metodología para determinar las características de disolución de los productos medicamentosos**

Además de la prueba de control de calidad rutinaria, se han utilizado las pruebas de disolución comparativa para la exención de los requisitos de bioequivalencia (bioexenciones) para concentraciones menores de una forma de dosificación. Para las bioexenciones, se deberá generar y evaluar un perfil de disolución utilizando comparaciones de perfiles de disolución. Por lo general se proveen bioexenciones para concentraciones múltiples tras la aprobación de un estudio de BE realizado en una concentración, utilizando los siguientes criterios:

Para concentraciones múltiples de productos de IR de cinética lineal, se puede realizar el estudio de BE en la concentración más alta y se puede otorgar exenciones de estudios *in vivo* para concentraciones menores, en base a una prueba de disolución adecuada, siempre que las concentraciones menores sean proporcionalmente similares en comparación.

Similar también puede interpretarse para entender que las diversas concentraciones de los productos están dentro del alcance de los cambios permitidos bajo la categoría de “Componentes y composición” tratada en la guía de SUPaC-IR.

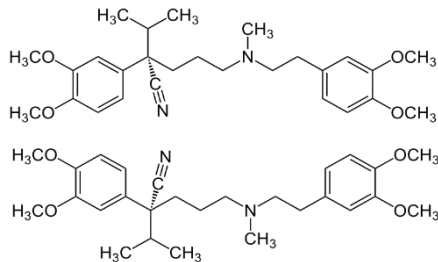
En todos los casos, la aprobación de las concentraciones adicionales se basa en comparaciones de perfiles de disolución entre estas concentraciones adicionales y la concentración de la tanda utilizada en el estudio de BE fundamental.

CRITERIOS DEL SISTEMA DE CLASIFICACION BIOFARMACEUTICA		
<b>DISOLUCION</b>	<b>Disolución rápida:</b> cuando el 85% o más de la cantidad de fármaco establecida en la etiqueta se disuelve durante 30 min (FDA) o 15 min (EMA) usando el aparato I de la USP a 100 rpm o aparato tipo II a 50 rpm (FDA).	<b>Disolución rápida:</b> asegura que la disolución in vivo no sea la etapa determinante del proceso de absorción
<b>SOLUBILIDAD</b>	<b>Solubilidad alta:</b> cuando la dosis más alta del fármaco es soluble en 250 ml o menos de medio acuoso en la gama de pH 1 - 7,5 (FDA) o 1 - 6,8 (EMA)	<b>Solubilidad alta:</b> asegura que la solubilidad no sea la etapa determinante de la disolución y por lo tanto el paso determinante de la absorción.
<b>PERMEABILIDAD</b>	<b>Permeabilidad alta:</b> cuando el grado de absorción del fármaco en humanos es más del 90 % (FDA) o 85% (EMA) de la dosis administrada determinada usando un estudio de balance de masas en ausencia de inestabilidad gastrointestinal (TGI)	<b>Permeabilidad alta:</b> asegura que el fármaco es completamente absorbido durante el tiempo de tránsito limitado a través del TGI

Figura 2. Resumen criterios de Bioexenciones.

## 4.3. Ejemplos de clasificación de fármacos según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

### 4.3.1 Clase 1 del SCB: Verapamilo hidrocloreuro.



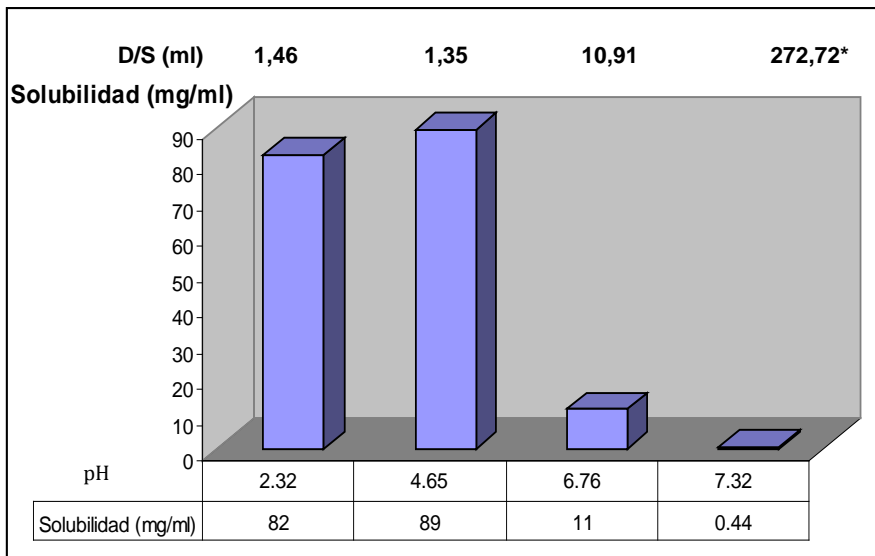


**Figura 3:** (RS)-2-(3,4-dimetoxifenil)-5-[[2-(3,4-dimetoxifenil)etil-(metil)amino)]-2-prop-2-ilpentanitrilo

**Indicación:**

El verapamilo es un medicamento bloqueador de canales de calcio tipo L, indicado para el tratamiento de la hipertensión, angina de pecho, trastornos del ritmo cardíaco y, recientemente, para los dolores de cabeza.

Dosis disponibles: 40, 80 y 120 mg.



**ALTAMENTE SOLUBLE**

**Figure 4.** Datos de solubilidad de verapamilo obtenidos en agua a diferentes valores de pH a temperatura ambiente, Datos considerando la dosis de 120 mg. D/S = relación dosis/solubilidad. \*A pH 7,32 la relación D/S es superior a la mínima requerida (250 ml), sin embargo, la mayor fracción de este fármaco se absorbe en la parte superior del TGI donde el valor de pH es neutro a 7,32, en consecuencia este límite en la solubilidad de verapamilo no es un problema para la absorción de este compuesto.

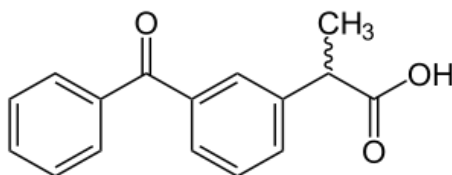
## PERMEABILIDAD

- Fracción de dosis absorbida ~ 90%
- Transportado en forma pasiva
- Sustrato de la *Pgp*
- Permeabilidad efectiva ( $P_{\text{eff}}$ ) determinada *in situ* con el método de perfusión intestinal e *in vitro* con la línea celular Caco-2  $> 2 \times 10^{-4}$  cm/s

**ALTAMENTE PERMEABLE**

*Figura 5. Datos de absorción y permeabilidad de verapamilo.*

### 4.3.2 Clase 2 del SCB: Ketoprofeno,

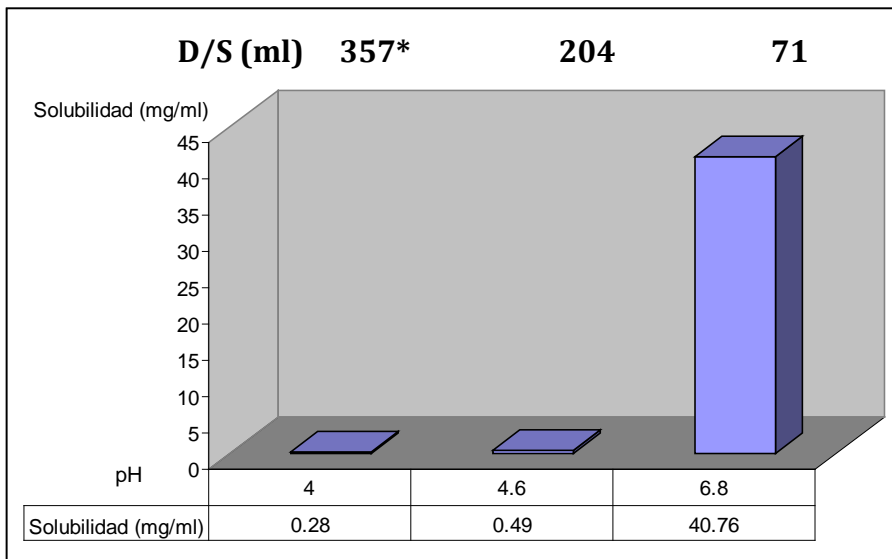


*Figura 6: Ácido fenil-propanoico*

Indicación:

El ketoprofeno es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo.

Dosis disponibles: 25, 50, 75 y 100 mg.



**POCO SOLUBLE**

**Figura 7.** Datos de solubilidad de ketoprofeno determinados a 37 °C. D/S = dosis/solubilidad.  
 \*Ketoprofeno debe clasificarse como un compuesto de baja solubilidad ya que no cumple con los criterios de alta solubilidad a los valores de pH menos a 4.

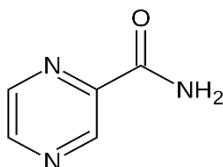
## PERMEABILIDAD

- Fracción de dosis absorbida > 90%
- Transportado en forma pasiva
- Permeabilidad efectiva ( $P_{\text{eff}}$ ) determinada *in situ* con el método de perfusión intestinal e *in vitro* con la línea celular Caco-2 >  $2 \times 10^{-4}$  cm/s

## ALTAMENTE PERMEABLE

*Figura 8. Datos de absorción y permeabilidad de ketoprofeno.*

### 4.3.3 Clase 3 del SCB: Pirazinamida

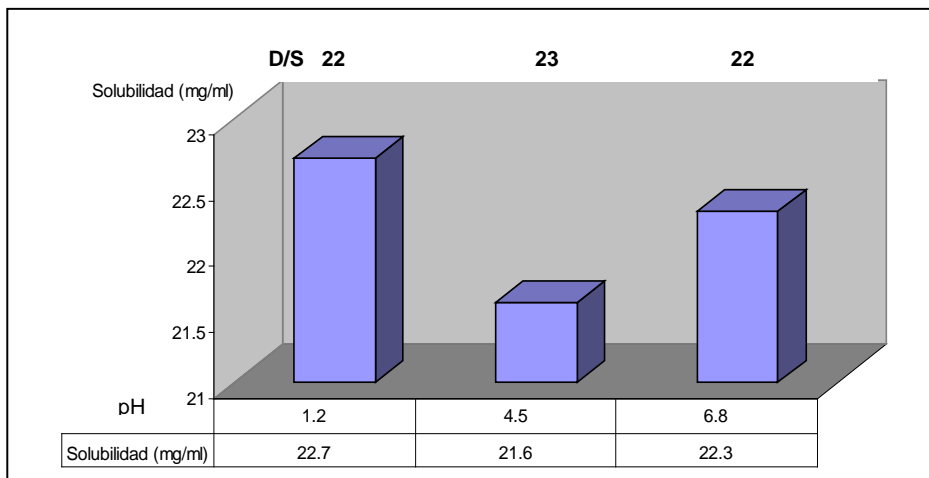


*Figura 9: Piridina-4-carbohidrazida*

Indicación:

Es un antibiótico usado en el tratamiento de la tuberculosis.

Dosis disponibles: 500 mg



### ALTAMENTE SOLUBLE

*Figura 10. Datos de solubilidad de pirazinamida determinados a 37 °C.*

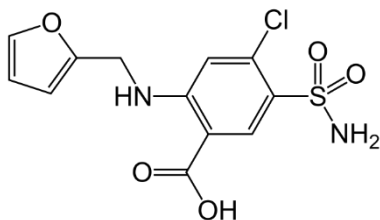
## PERMEABILIDAD

- ~ 40% dosis recuperada en orina luego de su administración oral a las 48 horas
- No se disponen de datos de BA

## POCO PERMEABLE

*Figura 11. Datos de absorción y permeabilidad de pirazinamida.*

#### 4.3.4 Clase 4 del SCB: Furosemida.

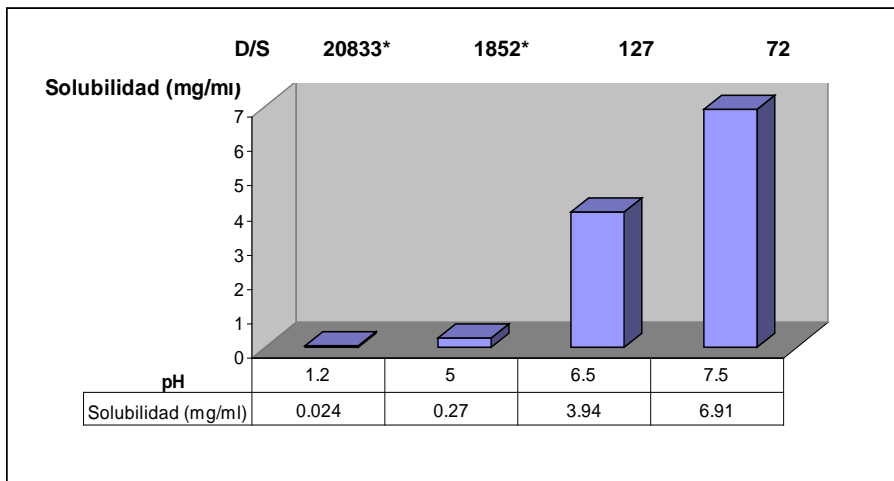


*Figura 12: Ácido 5-(aminosulfonyl)-4-cloro-2-[(2-furanilmetil)amino]benzoico*

Indicación:

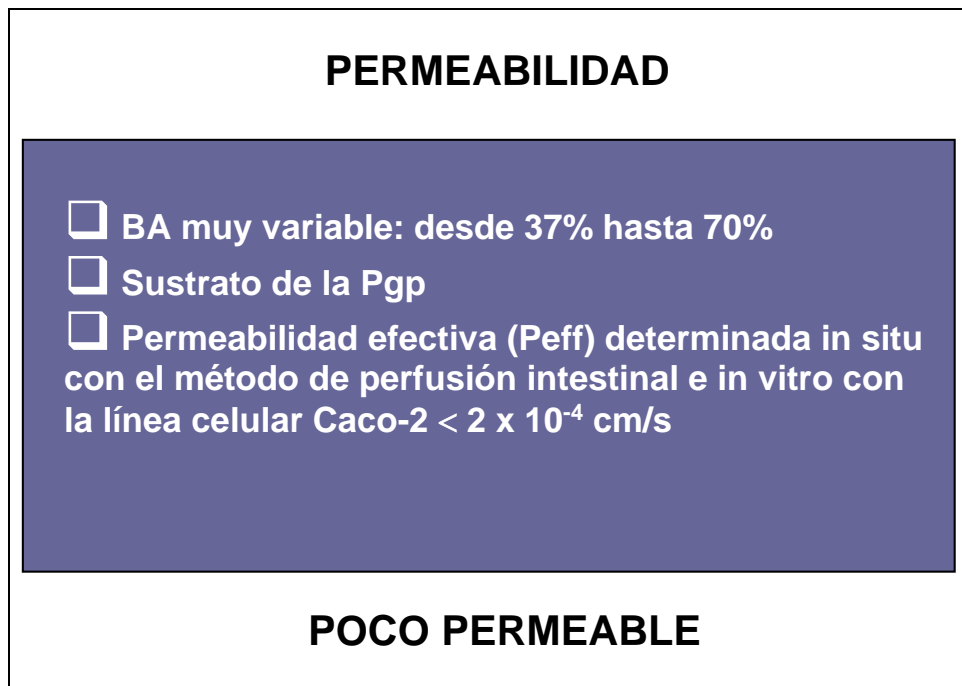
La furosemida es un diurético de asa utilizado en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, hipertensión y edema.

Dosis disponibles: 20, 40 y 500 mg



#### POCO SOLUBLE

*Figura 13. Datos de solubilidad de furosemida determinados a 37 °C. D/S = dosis/solubilidad. Considerando una dosis de 500 mg, \*furosemida debe clasificarse como un compuesto de baja solubilidad ya que no cumple con los criterios de alta solubilidad a los valores de pH menos a 6.5.*



*Figura 14. Datos de absorción y permeabilidad de furosemida.*

#### **4.4. Clasificación provisional fármacos esenciales de la OMS<sub>10</sub>**

La disponibilidad de los medicamentos se ve comprometida en los países en desarrollo por varios factores, tales como los deficientes sistemas de suministro y distribución, las escasas inversiones en salud y el elevado costo de los medicamentos. El establecimiento de una lista de medicamentos esenciales para las necesidades de atención sanitaria de la población puede ayudar a los países a establecer prioridades con respecto a la compra y distribución de los medicamentos, reduciendo así los costos para el sistema de salud.

Se consideran esenciales los medicamentos que cubren las necesidades de atención de salud prioritarias de la población. Su elección se hace atendiendo a la prevalencia de las enfermedades y a su seguridad, eficacia y costo-eficacia comparativa.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publica un listado de Medicamentos Esenciales que consta de más de 350 medicamentos para atender afecciones prioritarias. Este listado se actualiza cada dos años mediante un proceso transparente basado en datos probatorios.

Los países pueden utilizar la Lista Modelo de la OMS como guía para elaborar sus propias listas nacionales de medicamentos esenciales.

Las listas nacionales de medicamentos esenciales pueden servir de base para la adquisición y suministro de medicamentos en los sectores público y privado, para los planes de reembolso del costo de los medicamentos, para las donaciones de medicamentos y para la producción local de medicamentos.

El objetivo de este listado de Medicamentos Esenciales es que, en el contexto de los sistemas de salud existentes, los Medicamentos Esenciales estén disponibles en todo momento, en cantidades suficientes, en las formas farmacéuticas apropiadas, con una calidad garantizada, y a un precio asequible para las personas y para la comunidad.

El listado de Medicamentos Esenciales lista más de 350 medicamentos que ofrece opciones terapéuticas basadas en las mejores pruebas disponibles para afecciones prioritarias tales como el paludismo, el VOH/sida, la tuberculosis, los problemas relacionados con la reproducción o enfermedades crónicas como el cáncer y la diabetes.

---

<sup>1</sup> IV conferencia panamericana sobre armonización de la reglamentación farmacéutica. República Dominicana. 2-4 marzo, 2005. Conclusiones y recomendaciones

<sup>2</sup> Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P., Crison, J. R. "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability". *Pharmaceutical Research*, 12 (3), 1995, 413-419

<sup>3</sup> Basanta Kumar Reddy, B. and Karunakar A. "Biopharmaceutics classification system: a regulatory approach." *Dissolution Technologies*, 2011, 31-37

<sup>4</sup> Guidance for Industry; U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).



---

Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. U.S. Government Printing Office: Washington, DC, August 2000. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070246.pdf>.

<sup>5</sup> European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use. 2010. "Guideline on the investigation of bioequivalence". Accessed August 20, 2010, at: <http://www.ema.europa.eu/docs/enGB/document library/Scientificguideline/2010/01/WC500070039.pdf>.

<sup>6</sup> Vogelpoel, H., Welink, J., Amidon, G.L., Junginger, H.E., Midha, K.K., Möller, H., Olling, M., Shah, V.P., Barends, D.M. "Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on Biopharmaceutics Classification System (BCS) literature data: Verapamil hydrochloride, propranolol hydrochloride, and atenolol". *Journal of Pharmaceutical Science*, 93, 2004, 1945–1956

<sup>7</sup> Shohin, I.E., Kulinich, J.I., Ramenskaya, G.V., Abrahamsson, B., Kopp, S., Langguth, P., Polli, J.E., Shah, V.P., Groot, D.W., Barends, D.M., Dressman, J.B. "Biowaiver Monographs for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Ketoprofen". *Journal of Pharmaceutical Science*, 101, 2012, 3593–3603

<sup>8</sup> Becker, C., Dressman, J.B., Amidon, G.L., Junginger, H.E., Kopp, S., Midha, K.K., Shah, Stavchansky, S.V.P., Barends, D.M. "Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Pyrazinamide". *Journal of Pharmaceutical Science*, 97, 2008, 3709–3720

<sup>9</sup> Granero, G.E., Longhi, M.R., Mora, M.J., Junginger, H.E., Midha, K.K., Shah, S., Stavchansky, V.P., Dressman, J.B., Barends, D.M. "Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Furosemide". *Journal of Pharmaceutical Science*, 99, 2010, 2544–2556

<sup>10</sup> World Health Organization (WHO). "Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO Model List of Essential Medicines immediate-release, solid oral dosage forms". Technical Report Series, No. 937, 40th Report, Annex 8 of WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Accessed August 20, 2010, at: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO TRS 937 eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_937_eng.pdf), 2006

# 5. Sección generalidades: Estrategias tecnológicas para la modulación de la biodisponibilidad de fármacos

Anselmo Gomes de Oliveira, Maria Virginia Scarpa

UNESP-Universidad Estatal Paulista, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Departamento de Fármacos y Medicamento

## 5.1 Introducción

La biodisponibilidad de los fármacos puede caracterizarse como directamente dependiente de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia. Así, los fármacos poco solubles en agua pueden ser absorbidos por vía oral pero poseen una biodisponibilidad muy limitada. Los sistemas de administración que aumentan la solubilidad de estos fármacos, generalmente también actúan de forma favorable mejorando la biodisponibilidad.

Al analizar el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) aplicable a los fármacos<sup>12</sup>, podemos identificar que los fármacos clasificados como clase IV, los cuales poseen una baja solubilidad y una baja permeabilidad, son los que presentan un perfil de biodisponibilidad inadecuado (p.ej. hidroclorotiazida, furosemda, tobramicina); que los de clase III, con baja solubilidad y alta permeabilidad, pueden ser problemáticos (p.ej. aciclovir, captopril, enalapril); que los de clase I, con baja solubilidad y alta permeabilidad, son aceptables (p.ej. Nifedipino, ketoconazol, glibenclamida), mientras que los de clase II con alta solubilidad y alta permeabilidad poseen un perfil adecuado de biodisponibilidad (p.ej. propranolol, metoprolol, verapamilo). De esta forma, el equilibrio entre las propiedades de permeabilidad y solubilidad es el parámetro responsable del control del proceso de la biodisponibilidad (Figura1)

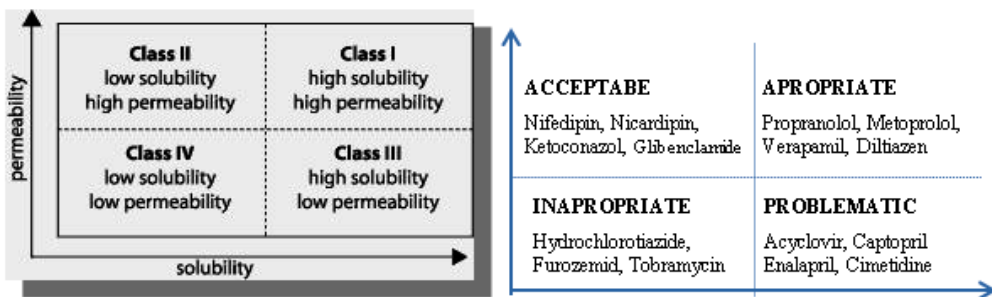


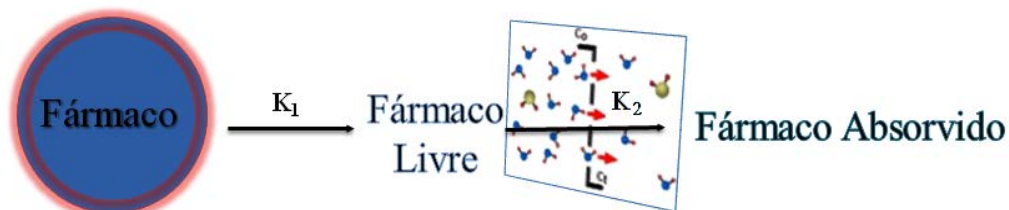
Figura 1. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica y características de los fármacos.

Considerando la clasificación biofarmacéutica de las sustancias y el comportamiento de las sustancias en lo que se refiere a sus respectivas biodisponibilidades, es posible prever el diseño de algunas formas farmacéuticas capaces de mejorar la biodisponibilidad de los fármacos.

Así, los fármacos de clase I, con propiedades de solubilidad y permeabilidad más favorables son los candidatos a las formas farmacéuticas de liberación inmediata, líquida o sólida, tales como soluciones y comprimidos, entre otros. Los fármacos de clase III, con alta solubilidad y permeabilidad limitada,

también son candidatos a las formas farmacéuticas de liberación inmediata, pero con intensificadores de absorción, cuando se trata de formas farmacéuticas sólidas. Los fármacos de clase IV con permeabilidad y solubilidad limitada, son los que más necesidad tienen de interferencias tecnológicas para la adecuación de la biodisponibilidad. Así, técnicas tales como modificaciones en la estructura cristalina de las sustancias, la inclusión de sustancias tensioactivas en formas farmacéuticas sólidas, la reducción del tamaño de las partículas, la amorfización, formación de complejos solubles, formulaciones lipídicas o modificaciones de pH son las tecnologías más usuales aplicables en estos casos. Para los fármacos de clase II los procedimientos son similares a los de la clase IV.

Es muy poco probable que un fármaco pueda administrarse en el organismo sin que esté estructurado en una forma farmacéutica. Las formas farmacéuticas más simples, como por ejemplo las soluciones, son aplicables a las sustancias con propiedades biofarmacéuticas más favorables, mientras que las formas farmacéuticas más complejas, como las nanoemulsiones o dispersiones sólidas, lo son para las sustancias con perfil menos favorable.



*Figura 2. Representación esquemática de la interrelación entre los procesos de liberación in vitro y de absorción in vivo.*

En términos generales, cuando la sustancia contenida en una forma farmacéutica se administra en el organismo para que sea absorbida, es necesario que en un primer paso el fármaco abandone el entorno restringido influenciado por la composición de la formulación, y en un segundo paso, que se presente libre en el medio biológico para que pueda ser absorbido por el organismo. El primer paso está guiado por una constante de liberación del fármaco del sistema de administración, definida como  $K_1$ , cuyo valor refleja directamente la influencia de la formulación en el proceso de absorción. El segundo paso, que contempla la presencia del fármaco libre (ya liberado) en el nivel de la membrana, está guiado por la constante de absorción definida como  $K_2$ , la cual refleja directamente la influencia de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia en el proceso de absorción (Figura 2).

De esta forma, si  $K_1$  fuese mayor que  $K_2$ , las formas farmacéuticas representativas del proceso son las de liberación inmediata y no ejercerán ningún efecto significativo en el proceso de absorción de la sustancia. Sin embargo, si la velocidad de liberación fuese menor que la velocidad de absorción ( $K_1 < K_2$ ), entonces no existiría acumulación de fármaco libre en el nivel de la membrana de absorción y la forma farmacéutica ejercerá un efecto intenso en la biodisponibilidad, constituyendo el paso limitante de todo el proceso de absorción.

Un concepto semejante puede aplicarse a los fármacos poco solubles, apuntando únicamente que el proceso de absorción sería limitado por la velocidad de disolución del fármaco y, así, cualquier modificación de parámetro tecnológico que favorezca el aumento de solubilidad de la sustancia implicaría también una mejora de la biodisponibilidad.

Las posibilidades tecnológicas para la modificación de la biodisponibilidad incluyen métodos aplicables directamente en modificaciones morfológicas de los fármacos, tales como la disminución del tamaño de las partículas, y métodos relacionados con las innovaciones tecnológicas, tales como las formas farmacéuticas que aumentan la solubilidad aparente y que, por consiguiente, interfieren en el paso de absorción de los fármacos.

## 5.2. Metodologías aplicables en la mejora de la biodisponibilidad de fármacos

Entre las metodologías disponibles para mejorar la biodisponibilidad de los fármacos, se pueden abordar algunos procedimientos tradicionales tales como la reducción del tamaño de las partículas,

la preparación de dispersiones sólidas, nanosuspensiones, obtención de complejos moleculares y formas polimórficas y amorfas, además de otros más recientes, como la tecnología de fluidos supercríticos, las tecnologías criogénicas, y algunos vehículos lipídicos como las nanopartículas lipídicas sólidas.

### 5.2.1. Reducción del tamaño de partículas

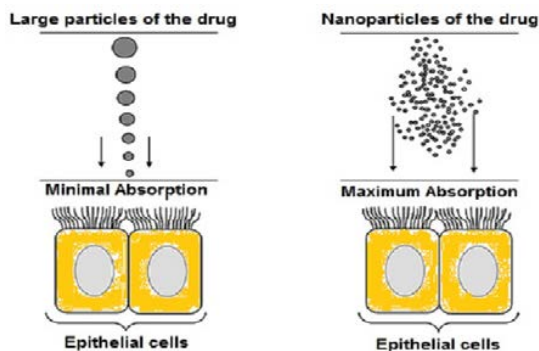
Éste método está relacionado con el aumento del área interfacial (S) entre las partículas sólidas y el medio de dispersión o el aire, lo cual puede ser descrito por la ecuación 1. Dicho aumento del área interfacial creado por la disminución de las dimensiones de las partículas proporciona un contacto intenso entre cada partícula del fármaco y el medio biológico o medio de disolución.

$$S = n \cdot 4 \cdot \pi \cdot r^2 \quad (1)$$

*Tabla 1. Variación del área interfacial en función del diámetro de las partículas*

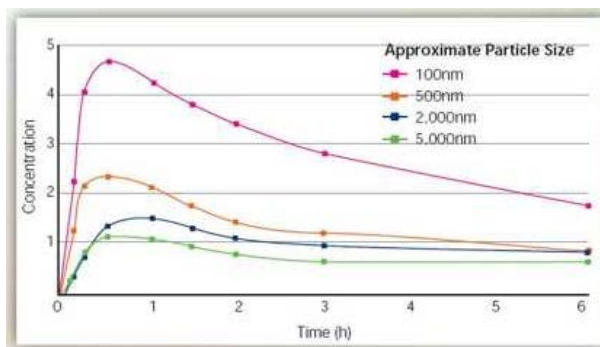
Número de partículas	Diámetro	Área Interfacial
10 <sup>6</sup>	300µm	1.1m <sup>2</sup>
10 <sup>9</sup>	30µm	11m <sup>2</sup>
10 <sup>12</sup>	3µm	110m <sup>2</sup>
10 <sup>15</sup>	300nm	1100m <sup>2</sup>
10 <sup>18</sup>	30nm	110.000m <sup>2</sup>

Los datos de la Tabla 1 muestran que 10<sup>6</sup> partículas con diámetros del orden de 300µm, y que presentan un área interfacial de 1.1m<sup>2</sup>, tienen el área interfacial aumentada por el factor de 100.000 veces cuando la partícula tiene su tamaño reducido a 30nm.



*Figura 3. Dibujo esquemático del efecto del tamaño de las partículas en el proceso de absorción in vivo.*

Aunque esa reducción de tamaño de las partículas no suponga la modificación del coeficiente de solubilidad del fármaco, la mayor área de contacto del fármaco con los líquidos biológicos en la superficie de la membrana de absorción, modifica substancialmente la cinética de disolución, favoreciendo la biodisponibilidad (Figura 3).

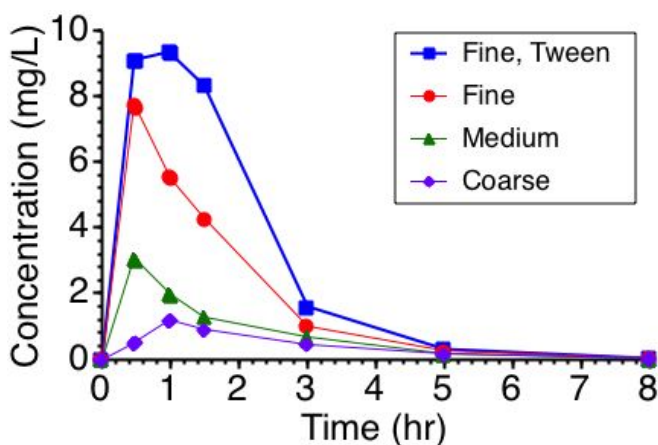


**Figura 4.** Ejemplo hipotético del efecto del tamaño de las partículas en el perfil de la cinética de disolución.

Los datos de la Figura 4 muestran un intenso favorecimiento de la absorción con la disminución del diámetro de las partículas del fármaco por un factor aproximado de cinco veces.

La micronización/nanonización de fármacos puede realizarse mediante técnicas de molienda, usando molinos coloidales de chorro de alta presión, molinos coloidales con rotores estatores. El método no resulta adecuado para substancias que necesitan una dosis elevada, ya que ésta no cambia el coeficiente de solubilidad del fármaco, únicamente la cinética de disolución. Puede aplicarse para mejorar la biodisponibilidad oral y la eficacia clínica de fármacos como la griseofulvina, progesterona, espirolactona, diosmina y fenofibrato.

Las curvas farmacocinéticas de la fenacetina en el plasma tras la administración oral de 1.5 g en varias formulaciones de suspensiones mostraron diferentes intensidades de absorción en relación con el tamaño de las partículas.



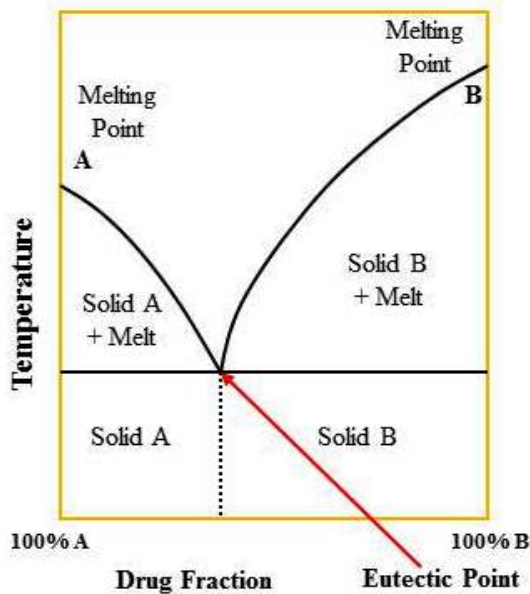
**Figura 5.** Curvas de absorción de la fenacetina en función del tamaño de las partículas tras la administración oral de 1,5 g de fármaco.

Los resultados de la Figura 5 muestran que las curvas de absorción fueron mayores al disminuir el diámetro de las partículas. Además, un gran número de partículas con dimensiones muy reducidas, del orden de nanómetros e incluso algunos micrones, puede sufrir aglomeración dificultando el acceso de los fluidos biológicos, y en este caso la adición de un agente humectante como el tween 80, también mostrará un efecto beneficioso, mejorando el perfil de la absorción en relación al polvo fino libre del tensoactivo.

## 5.2.2. Mezclas eutécticas

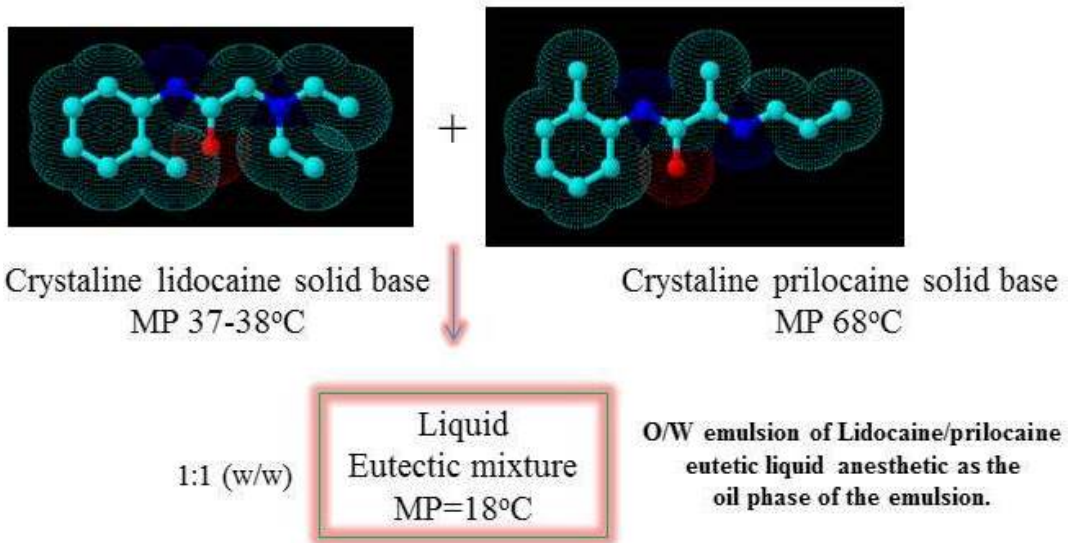
Conceptualmente corresponde a la fracción porcentual de substancias que proporciona un punto de fusión mínimo, menor que las temperaturas de fusión originales de las substancias. En el área

farmacéutica, la formación de la mezcla eutéctica supone generalmente la formación de un líquido cuando se mezclan dos sustancias cristalinas. Pero, la formación de mezcla líquida, a partir de sustancias cristalinas puede observarse fácilmente cuando el punto de fusión del eutéctico es menor o se encuentra muy próximo a la temperatura ambiente. Ya se ha descrito que las mezclas eutécticas son más solubles en agua que el fármaco aislado, debido al menor punto de fusión del eutéctico.<sup>4,5</sup> Algunos ejemplos clásicos de sistemas eutécticos contemplan la mezcla de acetanilida/alcanfor, acetaminofeno/mentol, aspirina/fenol, aspirina/ urea y aminopirina/timol.



*Figura 6. Diagrama de fases para la formación de mezcla eutéctica.*

En la Figura 6. se representa un diagrama binario completo para la formación de la mezcla eutéctica. Para entender el significado de las regiones de transición entre las fases, es necesario analizar la forma en que la temperatura de fusión cambia con la variación de las proporciones de las dos sustancias en la mezcla. En el punto de temperatura mínima las tres fases deben estar presentes en el sistema y a este punto se le denomina eutéctico. Obsérvese que cuando el material está fundido en el punto eutéctico, la temperatura no cambia mientras existe material a fundir. Durante la retirada de calor, al contrario de producirse una caída de la temperatura, se produce la transición de fases. A este calor se le denomina calor latente de cristalización. Por citar un ejemplo específico, la mezcla eutéctica de los anestésicos lidocaína cristalina, con temperatura de fusión de 37-38°C, y prilocaína cristalina, con temperatura de fusión de 68°C ha sido utilizada para la agregación de tecnología en una forma farmacéutica emulsionada de uso tópico. La proporción de 1:1 (m / m) proporciona la formación de un eutéctico con una temperatura de fusión de 18°C, por lo tanto, líquido a temperatura ambiente (Figura 7).



*Figura 7. Estructura de los anestésicos locales y formación de mezcla eutéctica*

Dada la hidrofobicidad de las dos sustancias y la característica fisicoquímica de la mezcla eutéctica, la misma fue utilizada para la preparación de una emulsión de aceite en agua que contiene un 2,5% de lidocaína y un 2,5% de prilocaína en la que el eutéctico líquido de los anestésicos, de carácter lipofílico, se utilizó como fase oleosa dispersa de la emulsión. Esta emulsión se conoce comercialmente como EMLA (Eutectic Mixture of Local Anesthetics), comercializado por APP Pharmaceuticals.

### 5.2.3. Dispersiones sólidas

El concepto de dispersión sólida se propuso a principios de los años 60, durante la investigación de los perfiles de disolución de mezclas eutécticas sólidas de sulfonamida y un adyuvante farmacotécnico hidrofílico.<sup>67</sup> La dispersión sólida consiste en un grupo de compuestos formados a partir de al menos dos componentes, por lo general un fármaco hidrófobo y una matriz hidrofílica. Los transportadores hidrofílicos más utilizados en dispersiones sólidas incluyen el PVP, PEG y Plasdona S630 (copolímero de 60% de vinilpirrolidona, 40% de acetato de vinilo). Los tensoactivos también pueden utilizarse en la formación de dispersiones sólidas, como el Tween 80, MIRJ 52, Pluronic F-68, dioctilsulfosuccinato de sodio y lauril sulfato de sodio.

La aplicación en la mejora de la biodisponibilidad incluye fármacos tales como el celecoxib, halofantrina, ritonavir e indometacina cuya solubilidad se puede aumentar mediante dispersiones sólidas obtenidas con transportadores hidrofílicos, son los ejemplos más comunes.

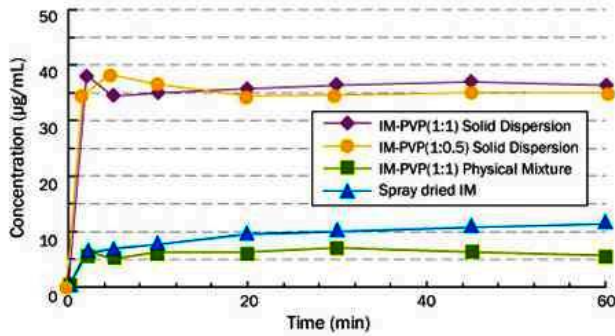


Figura 8. Efecto de la dispersión sólida en la disolución *in vitro* de la indometacina.

En el caso específico de la indometacina (Figura 8), la dispersión sólida puede obtenerse utilizando el polímero hidrofílico polivinilpirrolidona (PVP). Las proporciones de indometacina de 1:1 y 1:0.5 proporcionan perfiles de disolución *in vitro* semejantes, pero con un factor aproximadamente 6 veces mayor, si se comparan con la disolución *in vitro* del fármaco seco por spray drying o con la mezcla física de los componentes.

Técnicas de preparación de Dispersiones Sólidas

Método de fusión:

En este método la mezcla física del fármaco y del polímero soluble en agua debe calentarse hasta la fusión. La mezcla fundida se solidifica en un baño de hielo, bajo un agitado intenso. La masa final del producto se pulveriza y el polvo se estandariza por tamizado. Este polvo puede ser formulado en forma de cápsulas, comprimidos u otra forma farmacéutica derivada. El punto de fusión de la mezcla binaria depende de la razón fármaco / polímero. Un requisito importante es la miscibilidad entre el fármaco y el polímero en estado fundido y la estabilidad térmica tanto del fármaco como del polímero.

Método de la Fusión-extrusión:

El método es semejante al método de fusión, excepto en que debido a la intensa mezcla de los componentes en la extrusora minimiza los problemas de miscibilidad del fármaco y del polímero. Las altas fuerzas de cizallamiento provocan una alta temperatura local en la extrusora y esto puede constituir un gran problema para los materiales termosensibles. El producto puede ser manipulado fácilmente porque la secuencia puede adaptarse para el próximo paso antes de la pulverización.

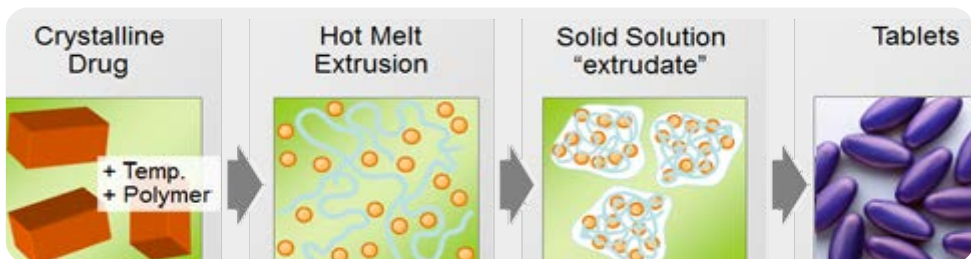
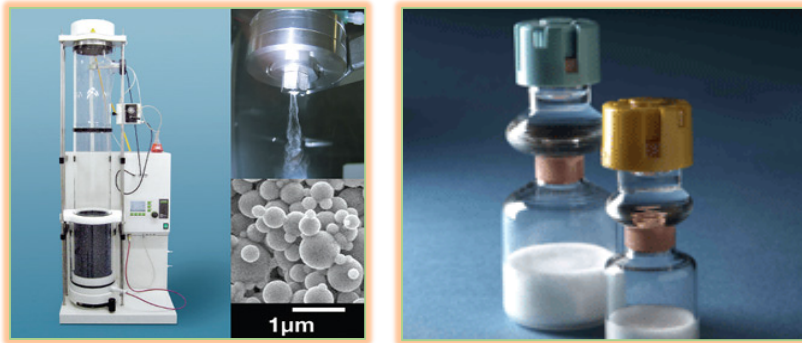


Figura 9. Esquema de la secuencia de preparación de dispersiones sólidas por fusión-extrusión.

Método de la Evaporación del Disolvente: El fármaco y el polímero deben disolverse en un disolvente común y el disolvente debe evaporarse hasta su completa eliminación. Considerando los diferentes métodos de secado, puede o no existir la necesidad de pulverización y estandarización del polvo. El secado por aspersión (Spray drying) y algunas situaciones de liofilización ya producen



partículas micrométricas o nanométricas, que no requieren pulverización / estandarización, mientras que el secado en evaporadores rotatorios generalmente requiere estos procedimientos. Pero, sea cual sea el camino, la mezcla final generalmente produce mezclas amorfas.<sup>10</sup>



Spray dryer

Polvo amorfo

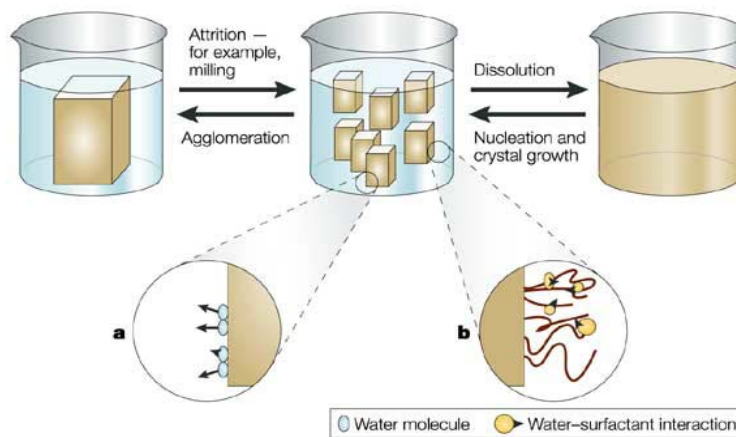
*Figura 10. Equipo de spray dryer usado en la preparación de dispersión sólida y aspecto macroscópico del polvo amorfo resultante.*

### 5.3. Nanosuspensiones

La técnica de nanosuspensión fue originalmente desarrollada para modificar las propiedades de liberación de sustancias poco solubles, tanto en agua como en vehículos oleosos (Figura 11). Conceptualmente, la nanosuspensión farmacéutica corresponde a un sistema bifásico en el que el fármaco con dimensiones nanométricas se encuentra en una dispersión estabilizada por tensoactivos (Figura 12). La distribución de las partículas sólidas del fármaco generalmente se fija de 200 a 600 nm. Así, el perfil coloidal de la dispersión permite que sea administrado por vía oral, tópica, parenteral y pulmonar.<sup>11</sup>



*Figura 11. Aspecto macroscópico de una nanosuspensión.*

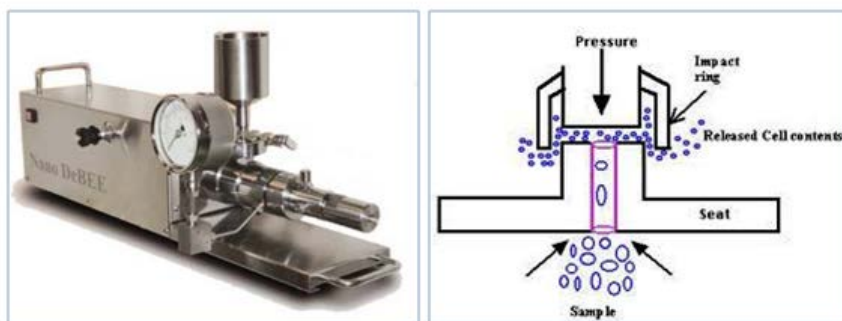


**Figura 12.** (a). El sistema nanodisperso conduce a la aglomeración de las partículas, debido a las condiciones energéticas desfavorables (esquema). (b). La dispersión puede ser estabilizada mediante compuestos tensoactivos los cuales reducen la tensión interfacial disminuyendo la tendencia de aglomeración de las partículas

### Técnicas de preparación de Nanosuspensiones

**Combinación de métodos de Precipitación y Homogeneización:** Generalmente los cristales de los fármacos brutos de partida son muy grandes y difíciles de procesar de manera eficiente mediante homogeneizadores. De esta forma la materia prima debe ser disuelta en un disolvente que tenga una óptima solubilidad, filtrada, esterilizada y entonces se añade un no disolvente para provocar su precipitación. Así se obtienen cristales con morfología de agujas, los cuales pueden pulverizarse fácilmente durante la homogeneización. El proceso proporciona nanopartículas adecuadas para inyecciones parenterales

**Homogeneización en Alta Presión:** En este método, el fármaco mezclado con un compuesto tensoactivo es forzado a pasar bajo presión a través del orificio de una válvula con abertura nanométrica en un homogeneizador de alta presión.



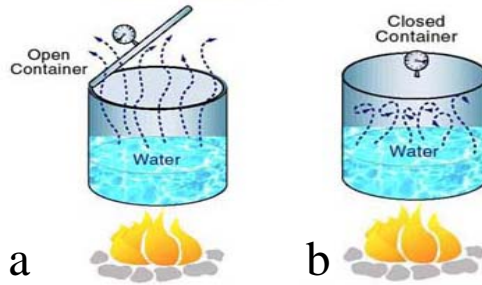
**Figura 13.** Homogeneizador de alta Presión y esquema del flujo interno del equipo.

El principio del método está relacionado con la cavitación en fase acuosa. Las fuerzas de cavitación ejercidas sobre las partículas son lo suficientemente altas como para convertir las partículas del fármaco en nanopartículas. El equipo incluye un recipiente inicial en donde se coloca la suspensión del fármaco, y una vez accionado el equipo, la dispersión se inyecta a presión en una cámara de mezcla en donde se produce la cavitación, siendo después reciclada nuevamente en el recipiente inicial. El número de reciclajes para la obtención de partículas nanométricas depende del tipo de fármaco y de los parámetros del equipo. Pero, generalmente, de 5 a 10 pasadas son suficientes para la obtención de nanopartículas (Figura 13)<sup>12</sup>

## 5.4. Fluidos supercríticos-SCF

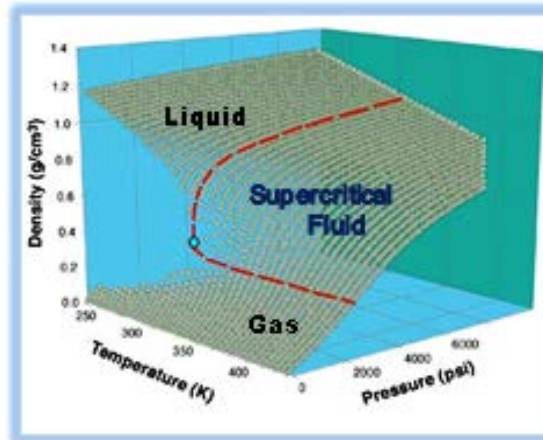
El fluido supercrítico puede definirse como un "fluido no compresible y de alta densidad." La temperatura y la presión de obtención del fluido es mayor que la temperatura crítica ( $T_c$ ) y la presión crítica ( $P_c$ ). Como el fluido supercrítico posee una difusión térmica muy alta, es posible modificar la densidad. Desde una densidad baja, como la de un gas hasta una densidad alta como la de un líquido. Por lo tanto, podemos controlar muchas propiedades, cuya función se expresa por la densidad.<sup>13</sup>

Podemos ejemplificar el proceso mediante un sistema muy simple: Si calentamos un determinado volumen de agua en un recipiente abierto, la temperatura empieza a subir hasta que alcanza la temperatura de ebullición del agua a aproximadamente  $100^\circ\text{C}$  y la presión se aproximará a la presión atmosférica (1 atm). Pero si cerramos herméticamente el recipiente, la temperatura de ebullición superará los  $100^\circ\text{C}$  y la presión también será mayor de 1 atm. (Figura 14).



**Figura 14.** (a) líquido calentado en un recipiente abierto, temperatura de ebullición de aproximadamente  $100^\circ\text{C}$  y presión aproximada de 1 atm. (b) líquido calentado en un recipiente cerrado, temperatura de ebullición  $> 100^\circ\text{C}$  y presión  $> 1\text{ atm}$ .

En estas condiciones aumentará la densidad del vapor de agua y la densidad del agua líquida disminuirá. Si continuamos con el proceso de calentamiento, el sistema tiende a entrar en equilibrio cuando las densidades del vapor de agua y del agua líquida son iguales. En este punto, definimos una temperatura crítica y una presión crítica en las que se forma el fluido supercrítico (Figura 15).



**Figura 15.** Diagrama para la formación de fluido supercrítico.

Para las industrias farmacéuticas y de productos para el cuidado de la salud, el fluido supercrítico de dióxido de carbono resulta especialmente atractivo, dado que los valores de temperatura y presión en su punto crítico son relativamente suaves y fácilmente alcanzados. Las condiciones críticas de temperatura y de presión para el fluido supercrítico de  $\text{CO}_2$  son  $P_c = 1074\text{ psi}$  y  $T_c = 31.1^\circ\text{C}$ . Considerando que las partículas del fármaco se pueden disolver en las condiciones de fluido supercrítico, la sustancia puede ser recristalizada en partículas extremadamente pequeñas. La flexibilidad y la precisión del método permiten la micronización de fármacos dentro de niveles

submicrónicos. Se pueden crear suspensiones nanoparticuladas con partículas en la amplia franja de 5 a 2000 nm de diámetro<sup>14</sup>. Algunas aplicaciones en el área farmacéutica incluyen fármacos como el 5-fluorouracil, tetraciclina, sulfametoxazol, naproxeno, etc.

## 5.5 Técnicas criogénicas

Por lo general, las técnicas criogénicas derivan de técnicas ya consolidadas en el campo farmacéutico, tales como el spray drying y la liofilización. Estas técnicas aumentan la velocidad de disolución de los fármacos creando partículas nanoestructuradas amorfas con un alto grado de porosidad en condiciones de muy baja temperatura. Los líquidos criogénicos, habitualmente empleados incluyen N<sub>2</sub>, Argón, O<sub>2</sub> e hidrofluoroalcanos. Tras el procesamiento criogénico, se puede obtener un polvo seco mediante varios métodos de secado, tales como el spray freeze drying, atmospheric freeze drying, vacuum freeze drying, congelación ultrarrápida.

Más recientemente, se ha desarrollado una técnica de preparación de nanocristales amorfos basada en ultra criomolienda en nitrógeno líquido. Partículas del fármaco son cosuspendidas con pequeñas esferas de hielo seco y molidas mediante agitado. Las esferas de hielo seco mantienen su forma granular sin pulverización y se subliman en el nitrógeno líquido con el progreso de la criomolienda (Figura 16). La técnica se ha aplicado con éxito en fármacos poco solubles, como la fenitoína, el ibuprofeno y el salbutamol<sup>15,16</sup>

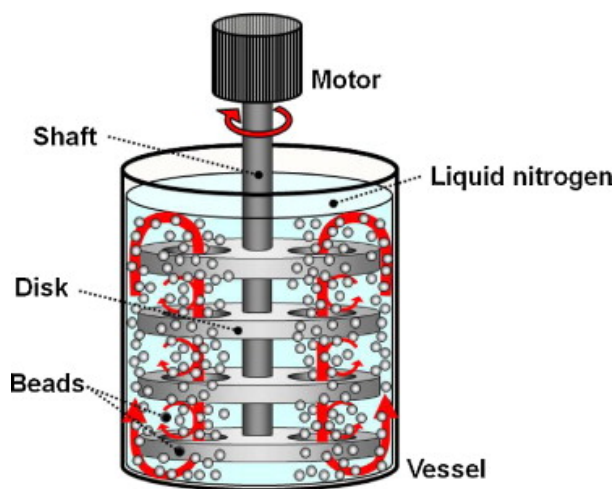


Figura 16. Esquema del equipo usado ultra criomolienda en nitrógeno líquido<sup>15</sup>.

## 5.6 Formación de complejos de inclusión

Los complejos de inclusión se obtienen normalmente por complejación molecular de fármacos poco solubles en agua con ciclodextrinas y derivados. Estructuralmente, las ciclodextrinas son compuestos cíclicos constituidos por 6, 7 u 8 unidades de D-glucopiranosil conectadas por enlaces glicosídicos  $\alpha$ -(1,4), cuyas moléculas definen las ciclodextrinas básicas tradicionales alfa, beta y gama, respectivamente. Estas moléculas poseen una cavidad interior de naturaleza hidrofóbica e hidroxilas dispuestas en la región externa de las moléculas y que permiten una solubilidad limitada de esas moléculas en agua<sup>17,18</sup>

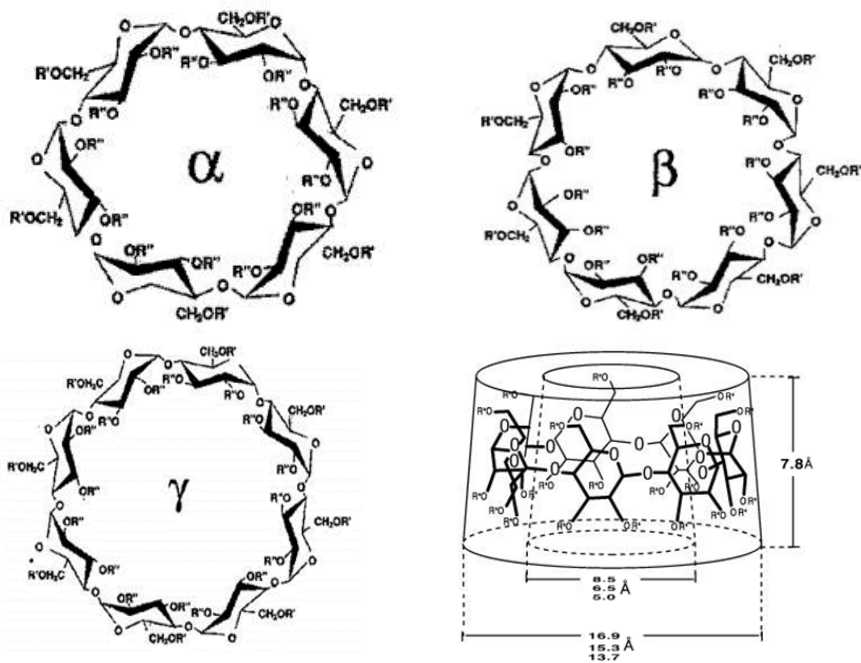
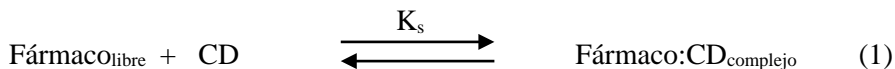


Figura 17. Estructura esquemática de las ciclodextrinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  y la vista lateral de la estructura.

El diámetro interno de la estructura cíclica de las ciclodextrinas depende del número de unidades de glucopiranosil conectadas entre sí y permiten la inclusión de moléculas más o menos voluminosas (Figura. 17).

La formación de los complejos moleculares de fármacos con ciclodextrinas generalmente puede ser definida mediante diagramas de solubilidad, los cuales definen la variación de la solubilidad del fármaco en relación con la concentración de ciclodextrina. A partir del diagrama de solubilidad se puede calcular una constante de asociación o de estabilidad del complejo ( $K_s$ ), la cual describe la intensidad de la complejación molecular de la sustancia con la ciclodextrina.  $K_s$  se expresa generalmente en  $M^{-1}$ . Los valores por debajo de  $100 M^{-1}$  reflejan una interacción débil entre el fármaco y la ciclodextrina mientras que los valores altos por encima de 500 reflejan un grado de intensa interacción del fármaco con la ciclodextrina.<sup>7</sup>

Las constantes de asociación pueden obtenerse mediante el análisis cuantitativo de los resultados del diagrama de solubilidad, usándose los procedimientos del modelo de Higuchi & Connors.<sup>19</sup>



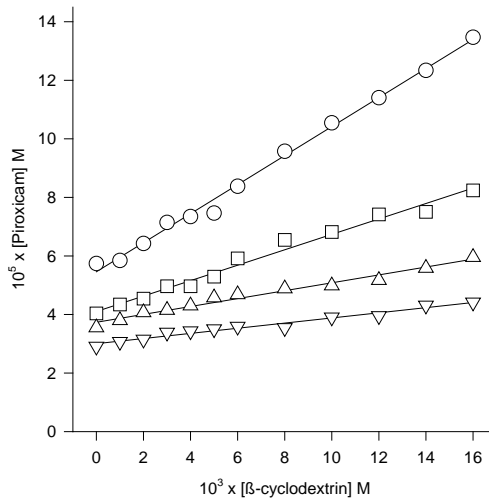
La constante de asociación ( $K$ ) para complejos con estequiometría 1:1, se puede calcular mediante la expresión,<sup>19</sup>

$$K_s = \frac{\alpha}{S_0 \cdot (1-\alpha)} \quad (2)$$

En la que  $S_0$  representa la solubilidad del fármaco en ausencia de ciclodextrina y  $\alpha$  es la inclinación de la recta en el diagrama de solubilidad.

De forma general, las propiedades fisicoquímicas del fármaco son determinantes en el proceso de complejación. Los fármacos poco solubles en agua complejan fácilmente, debido a la contribución de la parte hidrofóbica de la molécula, la cual interactúa favorablemente con la cavidad apolar de las moléculas de ciclodextrina.

Para los fármacos con funciones orgánicas disociables, generalmente la formación del complejo molecular es dependiente de pH (Figura. 18).



**Figura 18.** Diagrama de solubilidad del piroxicam en función de la concentración de  $\beta$ -ciclodextrina en diferentes valores de pH. Tampón citrato 0.01M, fuerza iónica 0.02M, pH's (O) 4.5, (□) 5.0, ( $\Delta$ ) 5.5, ( $\nabla$ ) 6.0<sup>20</sup>

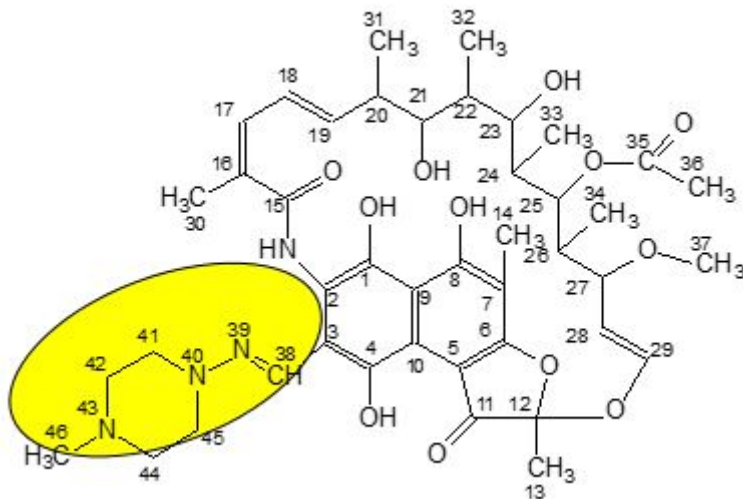
Para el piroxicam, cuyo valor determinado del pKa fue del orden de 5.85, la eficiencia de la complejación molecular disminuye con el aumento del pH, demostrando claramente que la especie no disociada del fármaco (en pH 4.5) interactúa mucho más favorablemente con la ciclodextrina que las especies parcialmente disociadas, con pH's más próximos a pKa (Tabla 2). En este caso la constante de asociación disminuye significativamente con el aumento del valor del pH del medio de disolución<sup>20</sup>

**Tabla 2.** Constantes de asociación del piroxicam, obtenidas en varios pH's, calculados mediante la ecuación 4.

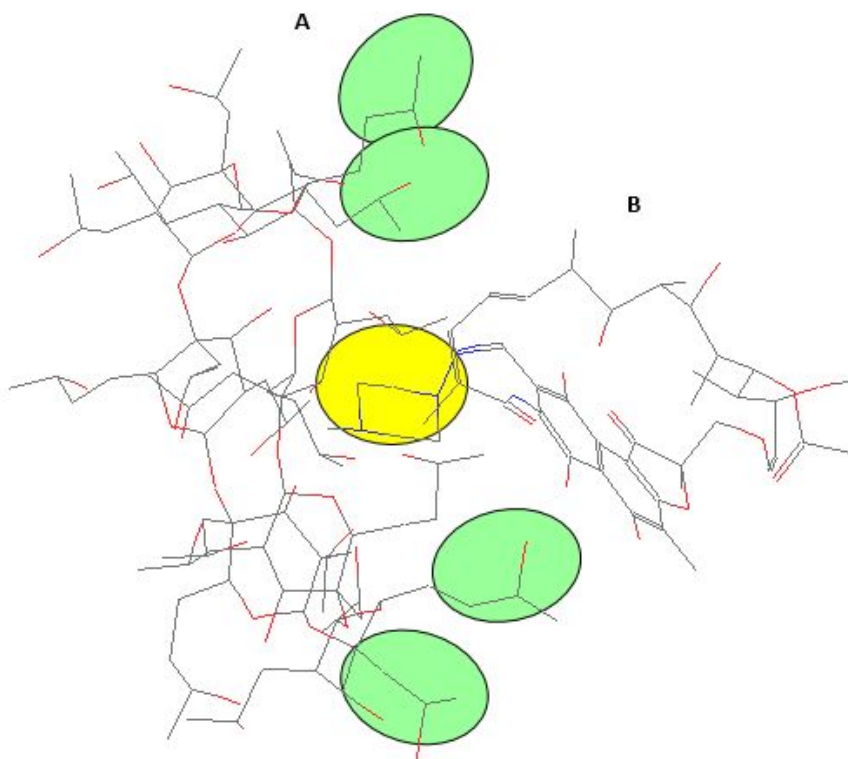
pH	K (M <sup>-1</sup> )
4.5	87.68
5.0	61.94
5.5	30.45
6.0	28.79

La formación de los complejos de inclusión con ciclodextrinas sigue las características de tamaño, polaridad y compatibilidad de las formas geométricas de los fármacos con la dimensión de su cavidad interna. De esta manera, podrá existir algún impedimento en la acomodación del fármaco en esta cavidad, en caso de que la molécula no tenga una disposición molecular favorable o posea una masa molecular muy alta. En estas condiciones, las alternativas para la formación de complejos se puede dar mediante la interacción parcial de la molécula del fármaco o mediante la formación de complejos con una estequiometría distinta de 1:1<sup>21,22</sup>

Por ejemplo, una molécula voluminosa como la de la rifampicina (Figura 19) interactúa con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, a través de la cadena lateral (átomos 38-46) unida al C<sub>3</sub> de la molécula que contiene el anillo de la metilpiperazina. En estas condiciones existe un impedimento estérico a la molécula de la rifampicina, la cual permanece con gran volumen situado en las proyecciones de la región de los grupos hidroxipropil en la superficie de la cavidad de la ciclodextrina (Figura 20)<sup>23</sup>



**Figura 19.** Estructura molecular de la rifampicina destacando la cadena lateral de metilpiperazina



**Figura 20.** Modelo Molecular del complejo de inclusión de la rifampicina-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina. Leyenda: (A) Molécula de la HP- $\beta$ CD; (B) Molécula de la rifampicina. Leyenda: (O) Cadena lateral metilpiperazina de la rifampicina; (O) Proyecciones de cadenas hidroxi-propil de la ciclodextrina

La formación de complejos de inclusión de la anfotericina B con ciclodextrinas, fármaco antifúngico sistémico con hidrosolubilidad irrelevante, es extremadamente dependiente del derivado de ciclodextrina utilizado, siendo que los diferentes perfiles se pueden verificar fácilmente en los respectivos diagramas de solubilidad (Figura 21). Usándose los parámetros de la ecuación 2, las constantes de asociación  $K_s$  se pueden obtener de los datos del diagrama de solubilidad.

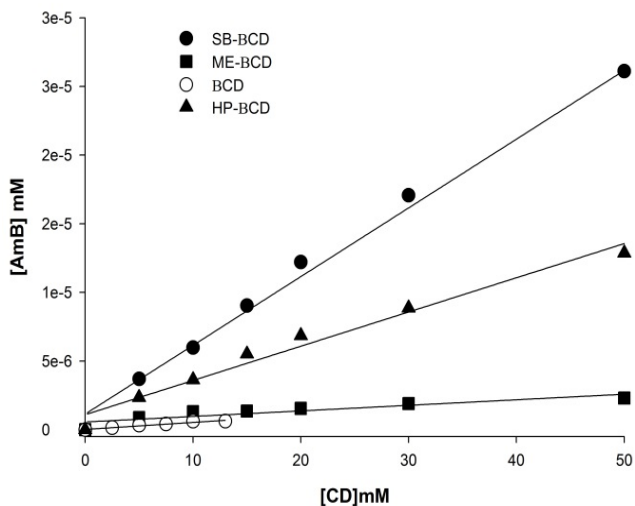


Figura 21. Diagramas de solubilidad de la anfotericina B en relación con diferentes derivados de ciclodextrinas<sub>24</sub>

Tabla 3. Características fisicoquímicas de las ciclodextrinas<sub>24</sub>.

Ciclodextrina	Solubilidad mg/mL	Masa molecular	Factor solubilidad	Ks (mol.L <sup>-1</sup> )
βCD	18.5	1135	1.3	12
ME-βCD	50.0	1312	3.78	41
SB-βCD	650.0	1400	28.33	920
SB-βCD	> 1500.0	2163	42.83	5047

Los valores descritos en la Tabla 3 muestran que la eficiencia de la formación del complejo molecular aumenta de forma significativa con el aumento de la solubilidad del derivado de ciclodextrina, demostrada a través de los factores de máxima solubilidad y de las constantes de asociación.

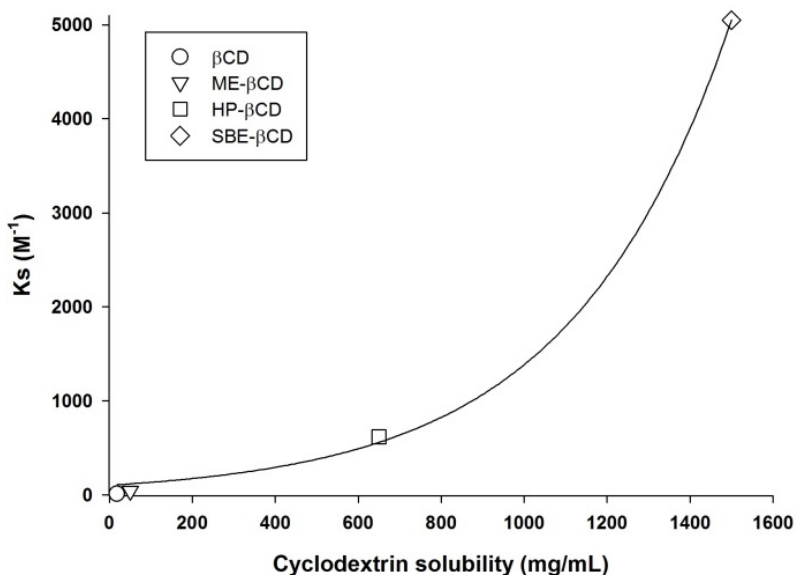


Figura. 22. Relación entre las constantes de asociación de la anfotericina B con la solubilidad de diferentes derivados de ciclodextrinas<sub>24</sub>



En este caso, se puede establecer fácilmente una correlación entre la solubilidad de la ciclodextrina y la constante de asociación de la AmB, considerándose la solubilidad mínima de la SB- $\beta$ CD de 1500 mg/mL (Figura 22)<sup>24</sup>.

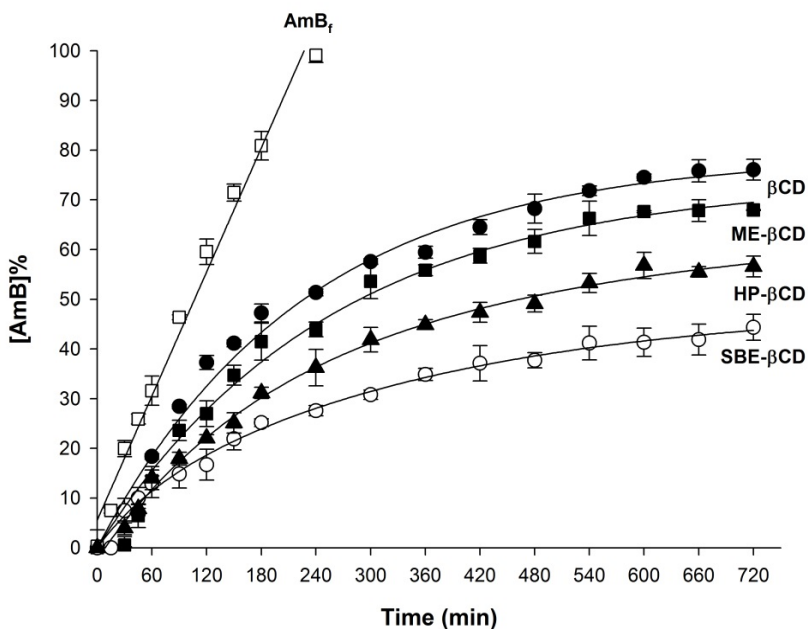


Figura 23. Efecto de diferentes derivados de ciclodextrinas en la disolución *in vitro* de la anfotericina B<sup>24</sup>

También podemos racionalizar que como para la permeación del fármaco a través de membranas es necesario que el complejo de inclusión se deshaga, con la consiguiente liberación de fármaco libre, así cuanto más eficiente sea para la interacción de la molécula de anfotericina con el derivado de ciclodextrina, más lentamente se producirá la permeación. De esta forma, en procesos de liberación *in vitro* que utilizan membranas que separan los compartimentos donante y receptor, las velocidades de liberación deben ser inversamente proporcionales a los valores de las constantes de asociación (Figura 23).

## 5.7 Formas amorfas y polimorfismo

El polimorfismo se caracteriza frecuentemente como la habilidad de los fármacos para existir en dos o más organizaciones cristalinas, las cuales poseen diferentes disposiciones y/o conformaciones de las moléculas en la red cristalina, generando diferentes propiedades fisicoquímicas, incluyendo punto de fusión y solubilidad. El estudio del polimorfismo es importante en el área farmacéutica debido a que muchos medicamentos reciben la aprobación de las Agencias Reguladoras para una forma cristalina específica de un fármaco. Pero el polimorfo específico puede desaparecer dando paso a otro polimorfo más estable, haciendo más difícil que se obtenga esa forma cristalina anterior, menos estable.

Por otra parte, los sólidos amorfos presentan disposiciones desordenadas de las moléculas y no presentan una estructura cristalina distinguible, caracterizándose por la ausencia de organización cristalina en la molécula.

La biodisponibilidad y/o la velocidad de absorción son fenómenos dependientes del polimorfismo. Estudios preclínicos han demostrado el fenómeno del polimorfismo en diversos compuestos de uso terapéutico, entre los cuales se encuentran el palmitato de cloranfenicol, fenilbutazona, amobarbital, cimetidina, ácido mefenámico, clortetraciclina y carbamazepina, entre otros<sup>25</sup>

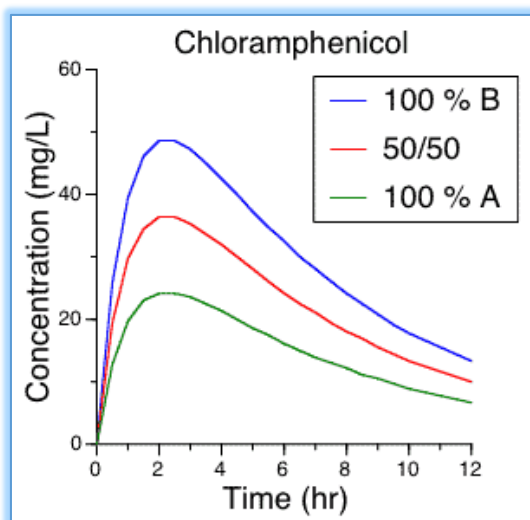


Figura 24. Relación entre los niveles sanguíneos del cloranfenicol y de las mezclas de polimórficas A y B.

Se verifica que el polimorfo B del palmitato de cloranfenicol es significativamente mejor absorbido, con un factor de 8 veces, que el polimorfo A, en humanos. Los resultados de la Figura 24 muestran una relación de proporcionalidad lineal para la relación Forma B/Forma A<sub>26</sub>.

Otro ejemplo bastante conocido de polimorfismo en el área farmacéutica se verificó con el Ritonavir (Novir, Abbot), un fármaco inhibidor del HIV-1 proteasa<sup>185</sup> del virus de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Fue lanzado en 1996, pero las implicaciones de la presencia de diferentes formas polimórficas en las pruebas de disolución *in vitro* determinaron su retirada del mercado. Tras la fase de investigación y desarrollo, y ya durante la producción del fármaco para su comercialización, las pruebas de disolución fallaron. Un nuevo polimorfo mucho menos soluble se detectó en los lotes del medicamento, hecho que lo convertía en menos eficaz. Tras mucho esfuerzo dedicado a un programa de emergencia para que los investigadores pudieran entender en qué condiciones se estaba generando el nuevo cristal y como tenerlo bajo control, además de los gastos considerables, se desarrolló una nueva formulación de ritonavir, con base en el polimorfo más estable, presentada al FDA, aprobada y relanzada en el mercado<sup>27</sup>.

La simvastatina es un medicamento reductor del colesterol que pertenece a la clase II, con baja solubilidad y alta permeabilidad en la clasificación biofarmacéutica de sustancias (BCS). Ésta posee dos polimorfos conocidos, el polimorfo I que es la forma más estable y más conocida, y el polimorfo II que requiere unas condiciones extremas para su formación (Figura 25)

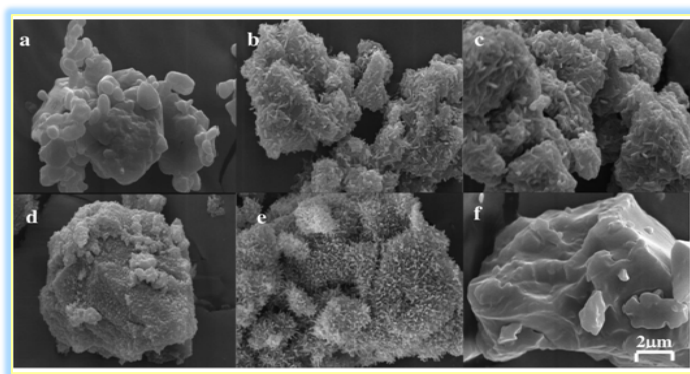
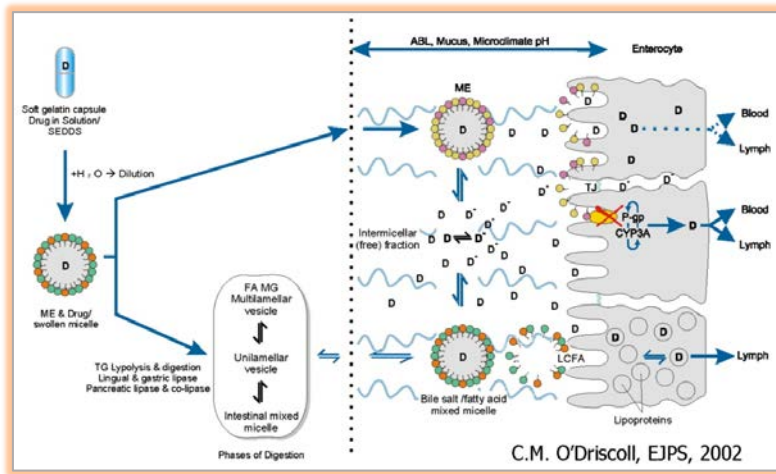


Figura 25. Microscopía electrónica de barrido de las formas de la Simvastatina. (a) Simvastatina cristalina; (b) Criomolidada; (c) Molida a 4°C; (d) Recristalizada y molida; (e) Recristalizada y criomolidada; (f) Fundida y enfriada rápidamente en N<sub>2</sub><sup>28</sup>.

Este fármaco es un ejemplo clásico de aplicación de tecnología en la transformación de una sustancia cristalina en una forma amorfa, con el objetivo de obtener una mejor biodisponibilidad. La forma amorfa de la simvastatina cristalina puede obtenerse mediante varios procedimientos, incluidos los métodos de molienda, criomolienda en un molino de bolas y de fusión seguida de un enfriamiento rápido en nitrógeno líquido.

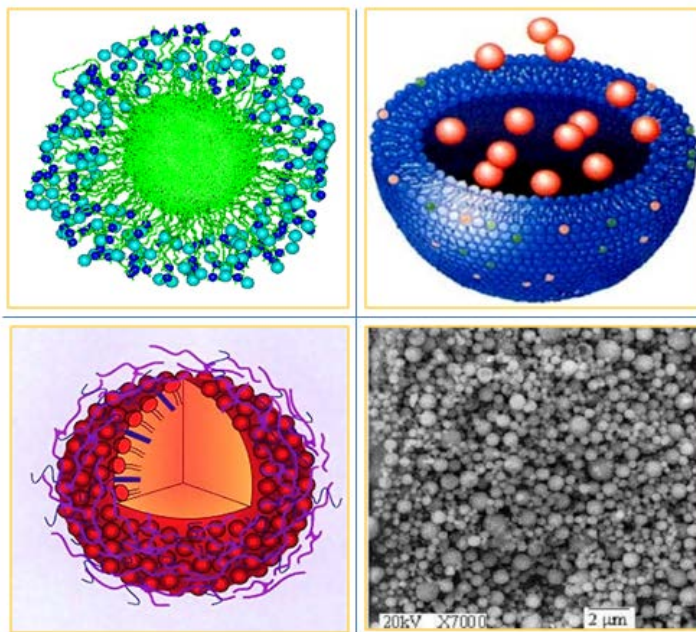
## 5.8 Vehículos lipídicos

Las formulaciones basadas en lípidos pueden producir cambios en la solubilidad de fármacos poco solubles en agua, modificando la biodisponibilidad y disminuyendo la toxicidad<sup>29,30</sup>. Particularmente, puede interactuar con las sales biliares y fosfolípidos del lumen intestinal, formando diferentes estructuras coloidales, incluyendo micelas, emulsiones, nanoemulsiones y microemulsiones (figura 26).



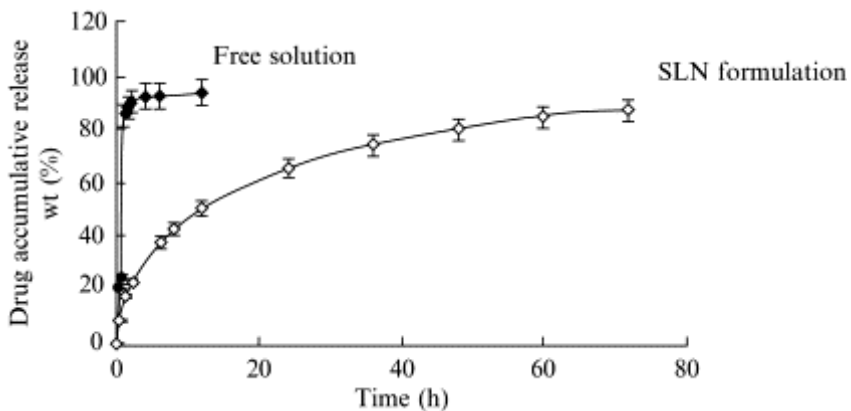
**Figura 26.** Posibles interacciones de formulaciones lipídicas con los tensoactivos del lumen intestinal<sup>31</sup>

Estas interacciones constituyen el principal mecanismo implicado en el aumento de la biodisponibilidad. Además, estos sistemas también pueden promover el transporte linfático intestinal, la reducción del metabolismo de primer paso, y el aumento de la permeabilidad de la pared intestinal. Tales formulaciones se administran normalmente mediante cápsulas de gelatina blanda. Las tecnologías competitivas involucradas en este tipo de formulación incluyen emulsiones y nanoemulsiones lipídicas, cuyas estructuras envuelven núcleos lipídicos líquidos; las micropartículas y nanopartículas lipídicas sólidas, que constituyen formas derivadas de las emulsiones y nanoemulsiones por el hecho de poseer núcleos lipídicos sólidos; y los liposomas que difieren de las estructuras anteriores por poseer un compartimento acuoso interno envuelto por una o más bicapas lipídicas separadas por fases acuosas (Figura 27).



**Figura 27.** Representación esquemática de estructuras de sistemas de administración basados en lípidos

Todos estos sistemas de administración de fármacos permiten también la estructuración de formas derivadas con superficie modificada, revestidas por diferentes tipos de polímeros, entre los cuales se encuentran los polímeros termosensibles, como los plurónicos, polímeros pH sensibles como los carboxivinílicos, polímeros catiónicos, como quitosano, entre otros.



**Figura 28.** Perfil de liberación de la temozolomida en solución salina en tampón fosfato pH 6.8, 37°C. (◆) en solución; (○) en nanopartículas lipídicas sólidas.<sup>32</sup>

Los datos de la Figura 28 muestran que la liberación de la temozolomida (TMZ) en solución es bastante rápida, habiendo sido liberado aproximadamente un 85% del fármaco en tan solo 1 hora. Pero, la liberación de la TMZ de las nanopartículas lipídicas sólidas es bastante lenta y sólo aproximadamente un 17% del fármaco se liberó en 1 hora. Tras 72 horas aproximadamente un 87% de la TMZ fue liberado, demostrando una liberación lenta y constante.<sup>32</sup>

El perfil de liberación del TMZ de las nanopartículas lipídicas sólidas tuvo un reflejo directo en el perfil farmacocinético de la TMZ administrada por vía intravenosa en una dosis de 10 mg/kg en conejos.

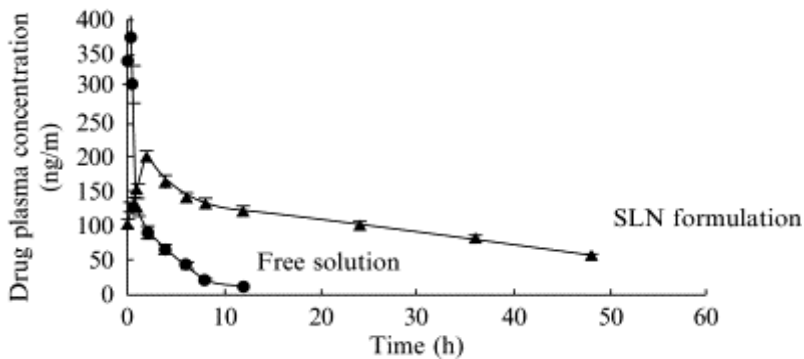


Figura 29. Concentración plasmática de la TMZ en relación con el tiempo, tras la administración de 10mg/kg de TMZ en conejos.

La concentración plasmática del TMZ disminuye rápidamente cuando se administra en forma de solución, pero mantienen una concentración plasmática en nivel de actividad terapéutica durante aproximadamente 48 horas tras la administración de las NLS, tal y como se muestra en la Figura 29.<sup>32</sup> Un ejemplo de fármaco problemático para administración por vía oral es el antifúngico sistémico anfotericina B (AmB). Debido a su baja solubilidad en medio acuoso, este fármaco ha sido bastante estudiado para demostrar la potencialidad de vehículos lipídicos en el aumento de solubilidad, disminución de toxicidad y modificación de biodisponibilidad.<sup>33</sup> Debido a que no se absorbe por vía oral, el antibiótico se utilizó como referencia en el estudio del efecto de vehículos basados en lípidos en la absorción oral.

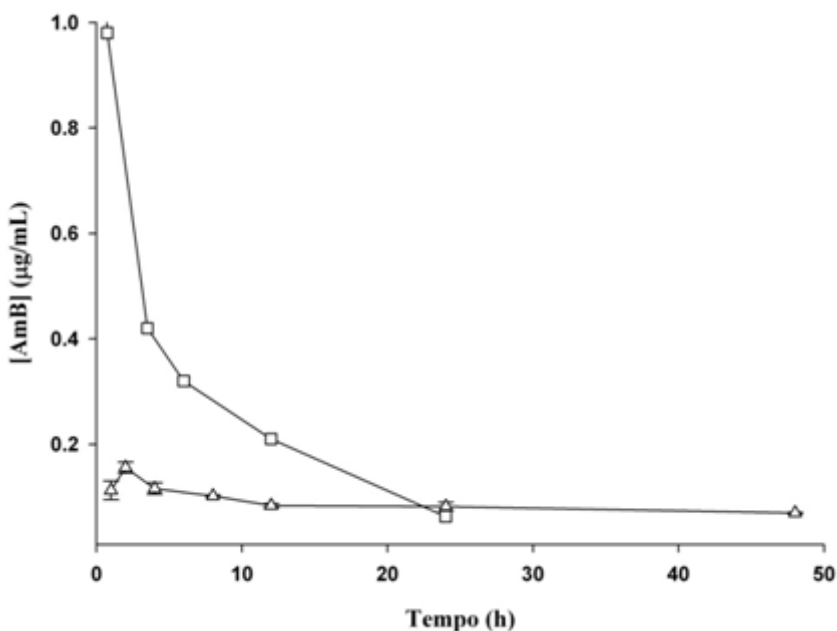


Figura 30. Concentración plasmática de la anfotericina B tras la administración de una única dosis de la solución micelar comercial (Fungizon). (Δ) Administración oral de 50mg/kg; (□) I.V. bolus 1mg/kg (Pestana, 2009).<sup>32</sup>

Utilizándose como referencia la curva plasmática proporcionada por la dosis terapéutica del medicamento convencional, la solución micelar de la AmB en desoxicolato, se estableció la dosis mínima de la AmB micelar capaz de proporcionar la definición de una curva plasmática tras la administración por vía oral. Los datos de la Figura 30 muestran que la dosis administrada por vía oral capaz de proporcionar una absorción mínima medible, fue 50 veces mayor que la administrada por vía intravenosa.

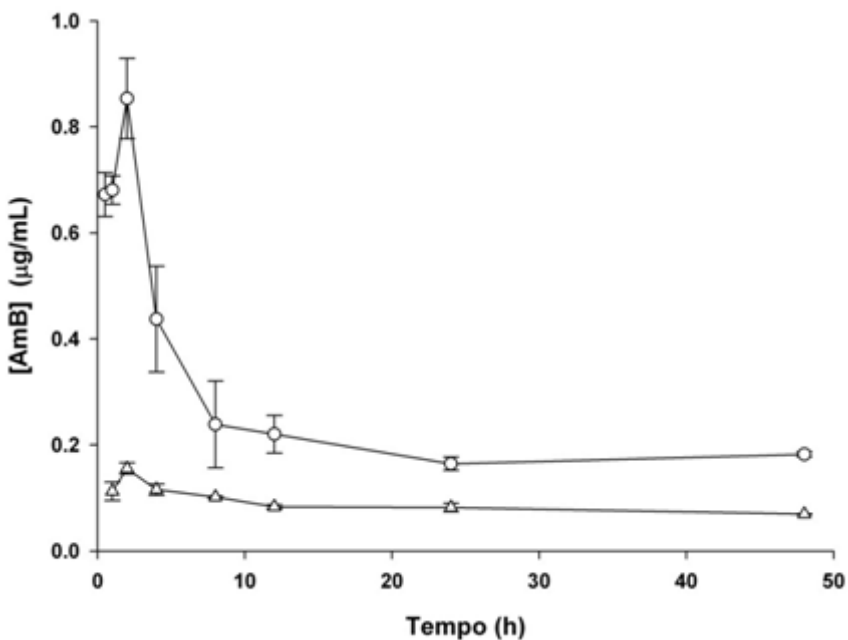


Figura 31. Concentración plasmática de la anfotericina B tras la administración oral de dosis única de 50 mg/kg. ( $\Delta$ ) Micelar-AmB; ( $\circ$ ) ME-AmB).

Los datos de la Figura 31 muestran los resultados comparativos entre la administración de la AmB micelar y la AmB en microemulsión lipídica en una dosis de 50mg/kg. Se verifica que el vehículo de lípidos proporcionó un gran aumento de absorción, elevando el perfil de absorción máxima a niveles cercanos a los de la administración intravenosa de la dosis terapéutica.<sup>32</sup>

## 5.9. Conclusiones

La mejora de la biodisponibilidad se puede obtener mediante el desarrollo de nuevas formulaciones de acuerdo con las características fisicoquímicas específicas de determinado fármaco o mediante la adición de nuevas tecnologías a fármacos antiguos, pero con los consabidos problemas de toxicidad o de biodisponibilidad. El gran avance de la tecnología informática tuvo un reflejo muy favorable en la disponibilidad de nuevos equipos, con reflejo directo en la expansión de métodos aplicables en la mejora de la solubilidad y biodisponibilidad de fármacos. Algunos procedimientos tradicionales, tales como la reducción del tamaño de las partículas, la preparación de dispersiones sólidas y de vehículos lipídicos, la obtención de complejos capaces de transformar fármacos cristalinos en sustancias amorfas, tuvieron un impacto bastante positivo en ese campo. Además, la innovación tecnológica derivada del diseño de nuevas formulaciones basadas en las propiedades específicas de los fármacos, tales como las nanopartículas poliméricas y nanopartículas lipídicas sólidas, así como las nuevas tecnologías de nanonización de sustancias, aplicadas a los fármacos tradicionales con problemas de biodisponibilidad conocidos, proporcionaron la resolución de muchos problemas en los perfiles clínicos y biofarmacéuticos de varias moléculas de interés terapéutico.

<sup>1</sup> Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. "A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability". *Pharmaceutical Research* 12 1995 413-420

<sup>2</sup> Yu LXY, Amidon GL, Polli JE, Zhao H, Mehta MU, Conner DP, Shah VP, Lesko LJ, Chen ML, Lee VHL, Hussain AS. "Biopharmaceutics Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions". *Pharmaceutical Research*. 19, 2002, 921-925

<sup>3</sup> Prescott LF, Steel RF, Ferrier WR. "The effects of particle size on the absorption of phenacetin in man", *Pharmacol. Therap.* 11, 1970, 496-504

- 
- <sup>4</sup> Miguel R. “Eutectic mixture of local anesthetics: not just for kids”. *Reg. Anesth.* 19, 1994, 75–76
- <sup>5</sup> Wagner Jr, RF, Flores CA, Argo LF. “A double-blind placebo controlled study of a 5% lidocaine/prilocaine cream (EMLA) for topical anesthesia during thermolysis”. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 20, 1994, 148–150
- <sup>6</sup> Sekiguchi K, Obi N, Ueda Y. “Studies on absorption of eutectic mixtures”. *Chem. Pharm. Bull.* 12, 1964, 134–144
- <sup>7</sup> Sekiguchi K, Obi, N. “Studies on absorption of eutectic mixture. I. A comparison of the behavior of eutectic mixture of sulfathiazole and that of ordinary sulfathiazole in man”. *Chem. Pharm. Bull.* 9, 1961, 866–872
- <sup>8</sup> Sivert, A., Bérard, V., “New binary solid dispersion of indomethacin with surfactant polymer: from physical characterization to in vitro dissolution enhancement”. *J Pharm Sci.* 99, 2010, 1399-1413
- <sup>9</sup> Gryczke A. Solid Dispersions by Hot-Melt Extrusion. *Pharm. Technol. Europe.* 24, 2012  
<http://www.pharmtech.com/pharmtech/Solid-Dispersions-by-Hot-Melt-Extrusion/ArticleStandard/Article/detail/786299>
- <sup>10</sup> Paudel A, Worku ZA, Meeus J, Guns S, Van den Moote G. “Manufacturing of solid dispersions of poorly water soluble drugs by spray drying: Formulation and process considerations”. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013, 253–284
- <sup>11</sup> Müller RH, Jacobs C, Kayser O. “Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy. Rationale for development and what we can expect for the future”. *Advanced Drug Delivery Reviews* 47, 2001, 3–19
- <sup>12</sup> Van Eerdenbrugh B., Van der Mooter G, Augustijns P “Top-down production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products”  
*Int J Pharm*, 2008 Nov 19;364(1):64-75
- <sup>13</sup> Pasquali I, Bettini R, Giordano F. “Supercritical fluid technologies: an innovative approach for manipulating the solid-state of pharmaceuticals”. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 2008, 399-410
- <sup>14</sup> Perrut M. “Supercritical fluid applications in pharmaceutical industry”. *Innovation in Pharmaceutical Technology*.12, 2001, 18-122
- <sup>15</sup> Niwa T, Nakanishi Y, Danjo K. “One-step preparation of pharmaceutical nanocrystals using ultra cryo-milling technique in liquid nitrogen”. *European Journal of Pharmaceutical Sciences.* 41, 2010, 78-85
- <sup>16</sup> Sugimoto S, Niwa T, Nakanishi Y, Danjo K. “International Development of a novel ultra cryo-milling technique for a poorly water-soluble drug using dry ice beads and liquid nitrogen”. *International Journal of Pharmaceutics* 426, 2012, 162–169
- <sup>17</sup> Loftsson T, Jarho P, Másson M, Järvinen Ti. “Cyclodextrins in drug delivery”. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2, 2005, 335-351
- <sup>18</sup> Astray G, Gonzales Barreiro C, Mejuto JC, Rial Otero R, Simalgándara JA. “Review on the use of cyclodextrins”. *Food Hydrocolloids.* 2009, 23, 631-1640
- <sup>19</sup> Higuchi T, Connors, KA. “Phase-solubility techniques”. *Adv. Anal. Chem. Instr.* 4, 1965, 117-212
- <sup>20</sup> Dalmora MEA, Oliveira AG. “Inclusion complex of piroxicam with b-cyclodextrin and incorporation in hexadecyltrimethylammonium bromide based microemulsion”. *International Journal of Pharmaceutics* 184, 1999, 157–164
- <sup>21</sup> Loftsson T, Másson M, Brewster M E. “Self-Association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes”. *J. Pharm. Sci.* 93, 2004, 1091-1099
- <sup>22</sup> Loftsson T, Duchene D. “Cyclodextrins and their pharmaceutical applications: Historical Perspectives”. *Int. J. Pharm.* 2007, 329, 1-11.
- <sup>23</sup> Ferreira DA, Ferreira AG, Vizzotto L, Feldman Neto A, Oliveira AG. “Analysis of the molecular association of rifampicin with hydroxypropyl-beta-ciclodextrin”. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 40, 2004, 44-51
- <sup>24</sup> Franzini CM. “Complexos de inclusão de anfotericina B com derivados de ciclodextrinas e sua incorporação em microemulsões lipídicas biocompatíveis”. 154f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas Araraquara) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”, 201

- 
- <sup>25</sup> Singhal D, Curatolo W. “Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective”. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 2004, 335– 347
- <sup>26</sup> Aguiar AJ, Krc J, Kinkel AW, Samyn JC, “Effect of polymorphism on the absorption of chloramphenicol from chloramphenicol palmitate”, *J. Pharm. Sci.* 56, 1967, 847– 853
- <sup>27</sup> Bauer J, Spanton S, Henry R, Quick J, Dziki W, Porter W, Morris J. “Ritonavir: An Extraordinary Example of Conformational Polymorphism”. *Pharmaceutical Research*. 18, 2001, 859-866
- <sup>28</sup> Graeser KA, Strachan CJ, Patterson JE, Keith C. Gordon KC, Rades T. “Physicochemical Properties and Stability of Two Differently Prepared Amorphous Forms of Simvastatin”. *Crystal Growth And Design*.8, 2008, 128-135
- <sup>29</sup> Franzini CM, Pestana KC, Molina, EF, Scarpa, MV, Egito, ES, Oliveira, AG. “Structural Properties Induced by the Composition of Biocompatible Phospholipid-Based Microemulsion and Amphotericin B Association”. *J Biomedical Nanotechnology*, 8, 2012, 350–359
- <sup>30</sup> Silva GBRF, Scarpa MV, Rossanezzi G, Egito EST, Oliveira, A.G. “Development and characterization of biocompatible isotropic and anisotropic oil-in-water colloidal dispersions as a new delivery system for methyl dihydrojasmonate antitumor drug”. *International Journal of Nanomedicine* (Online): 2013.
- <sup>31</sup> O’Discoll CM. “Lipid-based formulations for intestinal lymphatic delivery”. *Eur J Pham Sci* 15, 2012, 405-415
- <sup>32</sup> Huang G, Zhang N, Bi X, Dou M. “Solid lipid nanoparticles of temozolomide: Potential reduction of cardiac and nephric toxicity”. *Int. J. Pharm.* 355, 2008, 314–320
- <sup>33</sup> Pestana, KC. “Microemulsões biocompatíveis anfotericina b para administração oral: Liberação in vitro, toxicidade e farmacocinética aplicada à modelo animal”. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas Araraquara) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. 2009



# 6. Capacitación en Metodologías Biofarmacéuticas

Hériida Regina Nunes Salgado

*UNESP-Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Farmacéuticas, Departamento de Fármacos y Medicamento*

## 6.1 Introducción

El vaciado gástrico, una de las funciones motoras más importantes del tracto gastrointestinal, regula la velocidad de absorción de nutrientes y fármacos por controlar las complejas interrelaciones de mecanismos miogénicos neuronales y hormonales. El vaciado gástrico de líquidos y sólidos está controlado por diferentes partes del estómago. La presión intraluminal fúndica controla el vaciado de los líquidos, mientras que las contracciones de la región antral controlan el vaciado de sólidos. El mal funcionamiento de la motilidad intestinal puede desencadenar dos síntomas comunes y antagónicos: la diarrea y el estreñimiento.

### 6.1.1 Diarrea

La diarrea es un síntoma que se caracteriza por el paso rápido de la materia fecal a través del tracto gastrointestinal y que supone tanto el aumento de la motilidad gastrointestinal como el aumento de las secreciones y la disminución de la absorción de los fluidos, por la pérdida de electrolitos, principalmente sodio, y agua. Actualmente la diarrea es la segunda causa principal de muerte en niños menores de 5 años y afecta anualmente a 1,3 millones. Es importante destacar que, desgraciadamente, esta cifra no incluye las muertes en neonatos, es decir, niños con una edad inferior a las 4 semanas de vida. Es uno de los problemas de salud más importantes, causando la mortalidad o la morbilidad, especialmente en países en vías de desarrollo. Existen varios factores asociados a la perpetuación del síndrome diarreico. Se utilizan varios fármacos sintéticos en el tratamiento aunque en muchas ocasiones no se recomiendan. Se describen muchas reacciones adversas en la terapia antidiarreica medicamentosa. En la medicina tradicional se contempla la utilización de muchas plantas para el tratamiento de diarreas y de disenterías, actuando en la reducción de la motilidad gastrointestinal. Recientemente se ha publicado una revisión por Sarin y Bafna, que describe algunas plantas con actividad antidiarreica, así como los modelos experimentales utilizados.

### 6.1.2 Estreñimiento

El cambio en los hábitos alimenticios, consecuencia de la occidentalización y de la industrialización, ha introducido un alto consumo de alimentos refinados desprovistos de fibras alimenticias, contenidas en mayor cantidad en frutas, vegetales y cereales integrales. Por este motivo, en la actualidad existe una alta incidencia de enfermedades que eran poco frecuentes en el pasado, las llamadas "enfermedades de la civilización", formando parte de este elenco el estreñimiento. El hábito intestinal varía de una persona a otra, siendo difícil establecer unos estándares de normalidad. Dos evacuaciones por día es lo que se considera normal.

Existen varios factores que pueden conducir al estreñimiento. Es sabido que este síntoma es más frecuente en las mujeres que en los hombres sin que exista explicación para ello. Las personas

ancianas también sufren estreñimiento con más frecuencia que las personas más jóvenes, lo que puede estar relacionado con la menor ingestión de alimentos, pérdida de la movilidad, debilidad de la musculatura abdominal y pélvica y medicaciones. El estreñimiento es más común en las mujeres, especialmente en aquellas con inactividad física diaria, bajos ingresos, educación de inferior calidad, bajo consumo de líquidos y alimentos ricos en fibras.

La presencia de estreñimiento está asociada a la falta de residuos dentro del colon, a la pérdida de la sensibilidad de los órganos que desencadenan los mecanismos de la defecación, a la pérdida de las contracciones de los músculos implicados en la defecación y a la obstrucción mecánica. Mucho de la exploración clínica y del examen físico se corresponde con las diferentes situaciones relacionadas con tales mecanismos de estreñimiento.

Existe una gran variedad de opiniones individuales acerca de lo que se puede considerar estreñimiento. Algunas personas consideran que sufren estreñimiento cuando no pueden evacuar diariamente, otros cuando las heces son duras o incluso cuando la evacuación es dolorosa. El historial médico del paciente es una pieza clave para evaluar la existencia de estreñimiento, siendo que una buena anamnesis es imprescindible.<sup>5,6,7</sup>

Se puede considerar que menos de tres evacuaciones por semana constituye un cuadro de estreñimiento. Por lo general, el paciente refiere dificultad para evacuar, heces duras, urgencia sin que pueda evacuar, baja frecuencia de evacuaciones y sensación de evacuación incompleta.<sup>6,8</sup>

De acuerdo con los "Criterios de Roma", para que se diagnostique un estreñimiento funcional, es necesario que el individuo presente durante al menos tres meses, en por lo menos 1/4 parte del tiempo, dos o más de los siguientes síntomas: esfuerzo para evacuar, heces endurecidas o fragmentadas, sensación de evacuación incompleta y/o dos o menos evacuaciones por semana. Sin embargo, hay que destacar que esto es un pequeño entendimiento de su definición, pues existen grandes variaciones en los hábitos intestinales normales sin que exista un patrón fisiológico común para definir un funcionamiento intestinal normal.<sup>5</sup>

En unas condiciones de alimentación y de vida normales, un individuo evacúa heces formadas en intervalos que varían entre las 6 y las 72 horas. Al paciente que busca atención médica manifestando padecer estreñimiento, habría que preguntarle lo que hubo en el inicio del síntoma y su evolución. El inicio puede ser insidioso o abrupto, y, en la evolución, puede darse un empeoramiento progresivo. Es importante conocer las circunstancias relacionadas con la aparición de los síntomas, el historial alimentario, en lo que se refiere a volumen, al tipo de alimento ingerido, a la ingestión de fibras, y al volumen de agua consumido al día. La comparación entre el hábito intestinal, actual y pasado, y el uso actual de drogas, son informaciones indispensables.<sup>6</sup>

El estreñimiento puede estar provocado por una causa motora, por trastornos de la motilidad enterocólica, consecuencia de condiciones metabólicas, miopatías y neuropatías, o por una causa mecánica, por suboclusión intestinal. Entre las causas motoras podemos encontrar el síndrome del colon irritable, el uso crónico de laxantes, megacolon, una alimentación inadecuada, lesiones neurológicas, sedentarismo, desequilibrio hidroelectrolítico, factores psicógenos, hipotiroidismo y efectos secundarios de medicamentos como los antiácidos (calcio y aluminio), antiespasmódicos, diuréticos, analgésicos, anticonvulsivos y antidepressivos. Entre las causas mecánicas encontramos tumores benignos y malignos, diverticulitis, colitis isquémica y compresión extrínseca. También se deben considerar algunas afecciones proctológicas tales como fisuras, hemorroides y proctitis, que dificultan la evacuación (Tabla 1).

El estreñimiento, al igual que la diarrea, es un síntoma y no una enfermedad. Puede asociarse, sin que se pueda establecer una relación de causa-efecto, a una infección urinaria, enuresis nocturna e incapacidad para contraer la vejiga. La incidencia es tres veces mayor en los hombres obesos, y dos veces mayor en las mujeres obesas que en la población con un peso normal. Es importante destacar

que la causa más frecuente es la funcional, pero, para que se pueda tener la seguridad de este diagnóstico, deberá excluirse cualquier causa orgánica.

*Tabla 1. Causas del estreñimiento*

Hábitos alimenticios Aspectos culturales Control sistemático de la defecación	Controle sistem da defecação
<b>Funcional</b>	
<b>Efecto de fármacos:</b> Anticonvulsivos, antidepresivos, anticolinérgicos, antihistamínico, ANES, bloqueador de calcio, bloqueador ganglionar, corticosteroide, diuréticos, dopaminérgicos, inactivador del ácido biliar, laxante, litio, miorelajante, psicotrópico, propranolol, suplemento dietético (Fe y Ca)	
<b>Obstrucción mecánica</b> Cáncer de colon Compresión extrínseca Estenosis: divertículo o post-isquemia Rectocele Postoperatorio Megacolon Fisura anal	
<b>Metabólica</b> Diabetes Mellitus Hipotiroidismo Hiperparatiroidismo Hipercalcemia Hipercalcemia Hipomagnesemia Feocromocitoma Uremia Intoxicación con metales pesados	
<b>Miopatías</b> Amiloidosis Esclerodermia	
<b>Neuropatías</b> Enfermedad de Parkinson Traumática: Lesión de la médula espinal Tumor en la médula Enfermedad cerebrovascular Esclerosis múltiple Neuropatía intestino grueso (congénita; adquirida) Neuropatía diabética Síndrome Shy-Drager Tránsito lento (inercia cólica) Disfunción del mecanismo de la defecación	
<b>Otras condiciones</b> Depresión Enfermedad articular degenerativa Neuropatía autonómica Prejuicio cognitivo Inmovilidad Dolencia cardiaca	

En el contexto del estreñimiento crónico, las medidas no medicamentosas constituyen la primera opción para su manejo inicial, haciendo énfasis en el abordaje dietético y los hábitos de vida. Dependiendo del mecanismo generador del problema se han propuesto otros enfoques no medicamentosos. Los laxantes están indicados cuando las primeras alternativas fallan, no mostrando ninguna diferencia significativa de eficacia entre ellos, sobre todo a largo plazo. Cuando se utilizan en esquemas recomendados, su seguridad es equivalente. La loperamida y el difenoxilato no se recomiendan para el tratamiento rutinario de diarreas en los niños, debido a que no se mostraron beneficiosos y han causado serios efectos no deseados, tales como distensión abdominal, parálisis intestinal e incluso parada cardiorrespiratoria, además de náuseas, vómitos, mareos y sedación. Del mismo modo, la fenolftaleína no debe utilizarse de forma rutinaria.

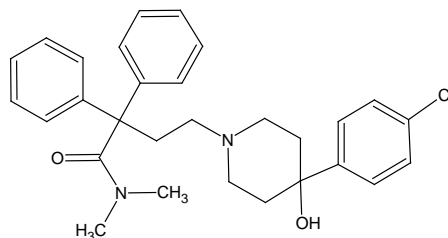
En el contexto de la búsqueda de nuevos productos para el tratamiento de estos dos síntomas, diarrea y el estreñimiento, se han venido estimulando algunas investigaciones para el descubrimiento y el desarrollo de nuevos productos que puedan actuar como remedio de dichos malestares. Así pues, se realizan ensayos biológicos con el fin de conseguir demostrar dichas capacidades en extractos de plantas, fracciones y sustancias aisladas. Los fármacos utilizados como controles positivos en los ensayos son generalmente la loperamida y el difenoxilato, que provocan una disminución de la motilidad intestinal. La fenolftaleína, que provoca un aumento en la motilidad intestinal, se utiliza para aumentar el tránsito intestinal.

- Ensayos in vivo

Existen muchas recomendaciones para que se pueda adoptar el principio de las 3R (refine, replace y reduce) en la experimentación animal, con el fin de optimizar, substituir y reducir el número de animales utilizados. Obviamente, la reducción del número de animales debe mantener los resultados por ensayos estadísticamente validados. Es importante señalar que las informaciones experimentales deben ser publicadas, incluso si se consideran irrelevantes, con el fin de minimizar la repetición de estudios idénticos.

- Clorhidrato de loperamida

El clorhidrato de loperamida es un fármaco antiperistáltico sintético, con una potente y prolongada acción depresora de la motilidad intestinal. Así como el difenoxilato, el clorhidrato de loperamida es un derivado piperidínico, y corresponde a 4-(4-clorofenil)-4-hidroxi-N,N-dimetil- $\alpha,\alpha$ -difeníl-1-piperidinabutiramida. Su estructura química se representa en la Figura 1.



**Figura 1.** Clorhidrato de loperamida.

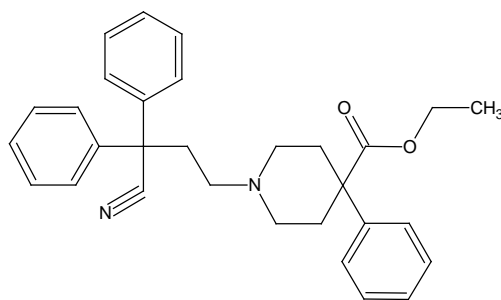
Ha demostrado ser eficaz contra diarreas inducidas por bisacodilo, reína, fenolftaleína y otros, siendo agonista opiáceo y antisecretor<sup>10</sup>. Estudios con control doble ciego han demostrado su eficacia en diarreas de origen diverso, con respuestas significativamente mejores que las obtenidas con el difenoxilato, de estructura similar. Arnold y colaboradores<sup>11</sup> sugieren que la loperamida tendría una acción antiperistáltica directa sobre las terminaciones nerviosas del intestino o de los ganglios intraneuronales o en ambos. Otra explicación para la inhibición del peristaltismo sería la interacción con los mecanismos colinérgicos locales

implicados en el reflujo peristáltico<sup>12</sup>. Verhaeren y colaboradores<sup>10</sup> atribuyen la acción a la alteración de la permeabilidad de la mucosa del colon.

El clorhidrato de loperamida no es muy bien absorbido tras la administración oral. Los picos máximos de concentración plasmática se producen aproximadamente 5 horas después de la administración de cápsulas y 2,5 horas tras la administración de soluciones. Las concentraciones máximas obtenidas son similares para ambas formulaciones. Su vida media biológica es de aproximadamente 10,8 horas. Por lo general, se utiliza como dosis inicial 4 mg.

- Clorhidrato de difenoxilato

El clorhidrato de difenoxilato es un homólogo de la meperidina, que presenta un efecto astringente definido en los seres humanos. Aunque se haya propuesto su empleo en el mantenimiento del tratamiento de la dependencia de opiáceos, su único uso reconocido es en el tratamiento de la diarrea. La estructura química del clorhidrato de difenoxilato se muestra en la Figura 2.



*Figura 2. Clorhidrato de difenoxilato.*

## 6.2. Evaluación de actividad en la motilidad intestinal

### 6.2.1 Tránsito intestinal

La velocidad del tránsito intestinal es uno de los factores que determina la intensidad de absorción del contenido luminal y regula la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral. Siendo así, la medición de la velocidad del tránsito es un paso obligatorio en el estudio de nuevos medicamentos y también se utiliza en la investigación de compuestos inhibidores o estimuladores de la actividad peristáltica. Los métodos clásicos descritos en la literatura incluyen la administración de diferentes marcadores de colores y la evaluación de los mismos en el intestino.

Michelin y Salgado<sup>13</sup> han evaluado la actividad laxante de los extractos de la raíz de *O. macrocarpa* mediante la prueba de la motilidad intestinal con carbón activado. Los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo de la motilidad intestinal de los ratones al compararlos con el grupo control. RAMESH y colaboradores<sup>14</sup> (1998) compararon el efecto laxante de una preparación líquida que contenía 21 especies vegetales diferentes, entre ellas la *Operculina turpethum* (L.) comparándola con un laxante comercial en forma de comprimidos. No existió ninguna diferencia estadísticamente significativa en el grado de acción laxante entre la preparación con los extractos y el comprimido convencional.

### 6.2.2 Evaluación de la actividad laxante

La actividad laxante puede evaluarse a través de diferentes modelos experimentales.

Un modelo ampliamente descrito en la literatura para la determinación de la actividad diarreica (o antidiarreica) en el tránsito intestinal mediante el uso de carbón activado como marcador. Así, la distancia media recorrida por el marcador en el intestino delgado de los animales del grupo muestra se compara con la distancia media del grupo control. Este método es ampliamente utilizado para evaluar la actividad de extractos vegetales<sup>15,16</sup>.

En 2004, Marona & Lucchesi<sup>17</sup> propusieron un modelo alternativo para la determinación de la motilidad intestinal en ratones. Esta técnica utiliza la misma metodología que el primero, sin embargo objetiva el bienestar animal. En este modelo, los animales no son sacrificados, por lo que pueden ser reutilizados posteriormente en otro experimento, hecho que viene a considerar el bienestar animal.

## 6.3. Animales

Se utilizan ratones Swiss (*Mus musculus*), machos, con 30 días de edad y con un peso entre los 22 y los 30 g, los cuales fueron adaptados al bioterio experimental durante 5 días antes del inicio de los ensayos biológicos. Los animales, con libre acceso a la alimentación y al agua, deben mantenerse en un ambiente con una temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , humedad controlada y fotoperiodo de 12 h claro/oscuro. El día del experimento se mantiene en ayunas a los animales durante 3 h y reciben agua ad libitum. Los ratones también pueden ser utilizados.

### 6.3.1 Tránsito intestinal con carbón activo

Este test se describió en 1957 por Janssen y Jagenau<sup>18</sup>, quienes evaluaron la inhibición de la propulsión gastrointestinal con suspensión de carbón en ratones. Posteriormente, Wong y Wai<sup>19</sup> evaluaron el efecto de la aspirina y del paracetamol en la inhibición de la propulsión gastrointestinal inducida por morfina en ratones.

En este ensayo, los animales se separan en grupos de 10 y reciben el tratamiento por vía oral mediante sonda. Transcurridos 45 min., los animales reciben la suspensión de carbón activado 10% en solución de goma arábiga 5%, 0,5 mL / animal, también a través de sonda. Transcurridos 45 minutos, los ratones se sacrifican en una cámara de CO<sub>2</sub> y se realiza la extirpación inmediata del intestino desde el píloro hasta el principio del ciego. Así, se realiza la medición de la longitud total del intestino delgado y de la distancia recorrida por la suspensión de carbón activado. El resultado se expresa en porcentaje de la longitud total del intestino delgado. Los intestinos se pesan individualmente en una balanza analítica. Michelin describe esta técnica en la evaluación del té de *Operculina macrocarpa*<sup>13</sup> (Tabla 1).

*Tabla 2. Porcentaje de la distancia recorrida por el carbón activado en el intestino de los ratones tratados con O. macrocarpa*

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Distancia recorrida por el carbón activado(%)	Peso del intestino (g)
Control	10 mL/kg	72,01 $\pm$ 8,15	2,3983 $\pm$ 0,25

Té	1000	83,74 ± 12,20*	2,2830 ± 0,28
----	------	----------------	---------------

\*p < 0,05

n = 10

El proceso puede verse en las Figuras 3 a 5. Las Figuras 3 y 4 muestran la administración del extracto de la planta en los animales y la administración de la suspensión del carbón activado, respectivamente.



**Figura 3.** Administración de la solución muestra en ratones.



**Figura 4.** Administración de la suspensión de carbón activado en ratones.

En este ensayo los ratones son sacrificados para la retirada del intestino delgado y posterior realización de la medida recorrida por el carbón activado. Este proceso se muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** Retirada del intestino delgado de los ratones y medición de la distancia recorrida por el carbón.

### 6.3.2 Tránsito intestinal con carbón activo modificado<sup>20</sup>.

Este es un modelo de tránsito intestinal que también utiliza carbón activado como marcador, como el anterior, y se modificó en 2004 por Marona & Lucchesi<sup>20</sup> considerando el bienestar animal, ya que en este nuevo modelo propuesto no se sacrifica a los animales y se pueden volver a utilizar en otros experimentos.

Se separa a los ratones en grupos de 10 y reciben el tratamiento por vía oral a través de sonda. Transcurridos 90 minutos, los animales reciben la suspensión de carbón activado 10% en solución de goma arábiga 5%, 0,3 mL/animal, también a través de sonda. Transcurridos 60 minutos, los animales vuelven a tener acceso al agua y al alimento. Los ratones deben ser observados cada 5 minutos durante todo el tiempo hasta la evacuación con presencia de carbón activado, a fin de determinar el tiempo necesario para la eliminación de las primeras heces con este marcador.

Los resultados se presentan en la Tabla 2 y muestran una reducción significativa en el tiempo de eliminación del marcador al compararlo con el grupo control.

**Tabla 3.** Tiempo de eliminación de las heces con marcador de los ratones tratados con *O. macrocarpa*

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Tiempo para eliminación de las heces con marcador (min.)
Control	10 mL/kg	194,6 ± 30,37
Té	1000	65,1 ± 4,70*

\*p < 0,05

n = 10

### 6.3.3 Tránsito intestinal en jaula metabólica

Cabe destacar que en este modelo se aloja a los animales en jaula metabólica y la actividad está determinada por el peso de las heces eliminadas en el período de observación. Así pues, no se sacrifica a los animales y pueden reutilizarse en otros experimentos. Se separa a los animales en



grupos de 5 y reciben el tratamiento por vía oral mediante sonda. Entonces, se aloja a los animales en una jaula metabólica y transcurridas 4 h se pesan las heces y se comparan con el grupo control.

En la Tabla 3 se presentan los resultados, en los cuales se puede observar una diferencia significativa en el peso de las heces del grupo tratado en comparación con el grupo de control, indicando que el Té de *O. macrocarpa* también demostró una actividad estimulante del tránsito intestinal en este modelo experimental testado.

*Tabla 4. Peso de las heces eliminadas por los ratones tratados con O. macrocarpa.*

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Peso de las heces (g)
Control	10 mL/kg	1,80 ± 0,23
Té	1000	3,98 ± 0,71*

\*p < 0,05

n = 10

En este ejemplo, analizando los resultados obtenidos con los tres modelos experimentales testados, se puede concluir que el té de *O. macrocarpa* posee actividad laxante, es decir, aumenta la motilidad intestinal. Estos resultados son de una importancia fundamental ya que confirman el uso tradicional de la especie en estudio en forma de té. Obviamente, se necesitan estudios para evaluar la toxicidad de esta especie vegetal.

#### • Parte experimental

En el modelo experimental clásico, se utiliza la loperamida en el grupo muestra.

Materiales necesarios:

- 1- 20 ratones machos, peso 25 g (10 para el grupo control y 10 para el grupo muestra)
- 2- Guantes
- 3- Mascarillas
- 4- Jeringuillas
- 5- Sondas para administración VO
- 6- Tijeras
- 7- Pinzas
- 8- Algodón
- 9- Vaso Beacker (varios tamaños)
- 10- Bolígrafo de retroproyector
- 11- Recipiente (para pesar ratones)
- 12- Balanza
- 13- Reglas de 60 cm

- 14- Bolsas de plástico (para cubrir el banco)
- 15- Bolsas de plástico blancas (para almacenar a los animales)

Fármaco: LOPERAMIDA en una dosis de 5 mg/kg.

Soluciones:

Solución de goma arábiga al 5 % y carbón activado al 8 %.

Agua estéril – 10 mL/kg.

Cálculo del volumen de solución de loperamida a ser administrada en cada ratón:

$$\begin{array}{r}
 5 \text{ mg} \text{ -----} 1000 \text{ g} \\
 x \text{ -----} 25 \text{ g} \\
 x = 0,125 \text{ mg de loperamida}
 \end{array}$$

solución de loperamida: 0,5 mg/mL

$$\begin{array}{r}
 0,5 \text{ mg} \text{ -----} 1 \text{ mL} \\
 0,125 \text{ mg} \text{ -----} x \\
 x = 0,25 \text{ mL}
 \end{array}$$

volumen a ser administrado en el grupo control:

$$\begin{array}{r}
 25 \text{ g} \text{ -----} 0,25 \text{ mL} \\
 1000 \text{ g} \text{ -----} x \\
 x = 10 \text{ mL/kg}
 \end{array}$$

En el ensayo de tránsito intestinal se utilizan, por ejemplo, dos grupos de animales: grupo de muestra, que recibe la solución test, y grupo control que recibe el vehículo, con el mismo volumen que el grupo muestra. En el caso del extracto vegetal, el extracto seco se solubiliza en agua para su administración en el grupo muestra.

Se recomiendan los ratones Swiss (*Mus musculus*), machos, con 25 días de edad, con un peso entre los 22 y los 28 g, a los cuales se adapta al bioterio experimental durante siete días antes del inicio de las pruebas biológicas. Los animales, mantenidos en libre acceso a la alimentación y al agua, se quedan en ambiente con una temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ , humedad controlada y fotoperiodo de 12 horas claro/oscuras. En la literatura se encuentran diversos períodos para el ayuno de los animales, por lo general alrededor de 18 horas. Sin embargo, nuestro grupo recomienda 3 horas. De esta forma, el día del experimento los animales se mantienen en ayuno durante 3 h y reciben agua ad libitum.

Se constituyen dos grupos de 10 animales, que se tratan con (i) la solución muestra, por ejemplo, en una dosis de 1000 mg/kg; y (ii) que recibe el vehículo (agua estéril) (10 mL / kg). Todos los tratamientos se realizan por vía oral mediante sonda.

Transcurridos 45 minutos, los animales reciben la suspensión de carbón activado 10% en solución de goma arábiga 5% (0,3 mL / animal) también por vía oral, mediante sonda. Transcurridos 45 minutos, los ratones se sacrifican en una cámara de CO<sub>2</sub> y se realiza la extirpación inmediata del intestino desde el píloro hasta el principio del ciego. Así, deberá realizarse la medición de la longitud total del intestino delgado y de la distancia recorrida por la suspensión de carbón activado. El resultado se expresa en porcentaje de la longitud total del intestino delgado.

Los resultados experimentales se expresan como media  $\pm$  desvío estándar. El análisis estadístico indicado para el tratamiento de dos grupos y el test t de Student ( $P < 0,05$ ).

- **Procedimiento resumido**

1 – Utilizar animales con un peso entre los 22 y los 30 g, en ayunas durante 24 horas y recibiendo agua ad libitum, criados y mantenidos en jaulas de polipropileno en el bioterio.

2 - Pesar a los animales, marcar y anotar los pesos.

3 - Administrar el volumen calculado de solución muestra antidiarreica por vía oral (sonda gástrica) en los diez ratones marcados como grupo test.

4 - Administrar el volumen calculado de solución fisiológica por vía oral (sonda gástrica) en los cinco ratones marcados como grupo control.

5 – Transcurridos 90 minutos, administrar la suspensión de carbón activado al 8% (0,3 mL/animal) también por sonda gástrica.

6 – Transcurridos 45 minutos, sacrificar a los ratones para la extirpación inmediata del intestino delgado, desde el píloro hasta el inicio del ciego.

7 – Realizar la medida de la longitud total del intestino y de la distancia recorrida por la suspensión de carbón activado.

- **Análisis estadístico**

Los resultados experimentales se expresan en media  $\pm$  desvío estándar. El análisis estadístico indicado para el tratamiento de dos grupos es el test t de Student ( $P < 0,05$ ).

- **Descripción experimental**

El informe del experimento deberá contener los apartados: objetivo, introducción, materiales y métodos, resultados y discusión, conclusiones y referencias bibliográficas.

El informe del experimento deberá contener los apartados: objetivo, introducción, materiales y métodos, resultados y discusión, conclusiones y referencias bibliográficas.

- **Ejemplo**

CONTROL							
	X	x <sup>2</sup>	y	y <sup>2</sup>	%	P.I.	P.I. <sup>2</sup>
1	52	2704	46	2116	88,46	1,77	3,1329
2	50	2500	50	2500	100,00	1,643	2,69945
3	51	2601	51	2601	100,00	1,647	2,71261
4	52	2704	47	2209	90,38	2,594	6,72884
5	53	2809	53	2809	100,00	1,822	3,31968
6	54	2916	44	1936	81,48	2,228	4,96398

7	56	3136	45	2025	80,35	2,567	6,58949
8	57	3249	48	2304	84,21	1,52	2,3104
9	49	2401	47	2209	95,91	2,072	4,29318
10	50	2500	50	2500	100,00	2,134	4,55396
$\Sigma$	524	27520	481	23209	920,814	19,997	41,3045
$\dot{x}$	52,4	2752	48,1	2320,9	92,0814	1,9997	4,13045

x = tamaño del intestino delgado en cm  
y = distancia recorrida por el carbón en cm  
P.I. = peso del intestino en g  
 $\dot{x}$  = media

$$t_{TAB} = 2,101$$

$$\Sigma X = 524$$

$$\Sigma X^2 = 27520$$

$$SQ_c = \Sigma x^2_c = \Sigma X^2 - \frac{(\Sigma X)^2}{n_c} = 27520 - \frac{(524)^2}{10} = 27520 - 27457,6 = 62,4$$

$$n_c = 10$$

GRUPO MUESTRA							
	X	x <sup>2</sup>	Y	y <sup>2</sup>	%	P.I.	P.I. <sup>2</sup>
1	43	1849	23	529	53,4884	1,66	2,7556
2	58	3364	58	3364	100	1,965	3,86123
3	43	1849	36	1296	83,7209	1,67	2,7889
4	56	3136	43	1849	76,7857	1,818	3,30512
5	57	3249	52	2704	91,2281	2,166	4,69156
6	56	3136	38	1444	67,8571	1,96	3,8416
7	53	2809	47	2209	88,6792	1,875	3,51563
8	47	2209	17	289	36,1702	1,394	1,94324
9	56	3136	41	1681	73,2143	1,835	3,36723
10	53	2809	43	1849	81,1321	1,586	2,5154
$\Sigma$	522	27546	398	17214	752,276	17,929	32,5855
$\dot{x}$	52,2	2754,6	39,8	1721,4	75,2276	1,7929	3,25855

x = tamaño del intestino delgado en cm  
y = distancia recorrida por el carbón en cm  
P.I. = peso del intestino en g  
 $\dot{x}$  = media

$$\Sigma X^2 = 27546$$

$$\Sigma X = 522$$

$$SQ = \Sigma x^2_c = \Sigma X^2 - \frac{(\Sigma X)^2}{n_c} = 27546 - \frac{(522)^2}{10} = 27546 - 27387,6 = 297,6$$

$$n_c = 10$$

$$S_o = \frac{SQ_c + SQ_A}{n_c + n_A - 2} = \frac{62,4 + 297,6}{10 + 10 - 2} = 20$$

$$t = \frac{|Y_A - Y_C|}{\sqrt{\frac{S_O}{n_C} + \frac{S_O}{n_A}}} = \frac{|39,8 - 48,1|}{\sqrt{\frac{20}{10} + \frac{20}{10}}} = \frac{8,3}{2,0} = 4,15$$

$$t = \frac{|Y_A - Y_C|}{\sqrt{\frac{S_O}{n_C} + \frac{S_O}{n_A}}} = \frac{|39,8 - 48,1|}{\sqrt{\frac{20}{10} + \frac{20}{10}}} = \frac{8,3}{2,0} = 4,15$$

$$t = 4,15 > t_{TAB}$$

- Test t para el parámetro peso del intestino:

$$\sum x = 19,997$$

$$\sum(x^2) = 41,305$$

$$SQ_{CP} = \sum x^2_{CP} - \frac{(\sum x_{cp})^2}{n} = 41,305 - \frac{19,997^2}{10} = 41,305 - 39,988 = 1,317$$

$$\sum x = 17,929$$

$$\sum x^2 = 32,5855$$

$$SQ = \sum x^2_c = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n_c} = 32,5855 - \frac{(17,929)^2}{10} = 0,44$$

$$S_O = \frac{SQ_{CP} + SQ_{PA}}{n_C + n_A - 2} = \frac{1,317 + 0,44}{18} = 0,098$$

$$t = 1,48 < t_{TAB}$$

$$t = \frac{|1,793 - 2,0|}{\sqrt{\frac{0,098}{10} + \frac{0,098}{10}}} = \frac{0,207}{0,14} = 1,48$$

Algunos puntos a debatir

Debatir sobre el uso de fármacos astringentes y/o inhibidores del peristaltismo en el tratamiento de la diarrea.

Debatir sobre el uso de fármacos diarreicos y/o motivadores del peristaltismo en el tratamiento del estreñimiento.

Destacar los principales aspectos de los ensayos in vivo para caracterización de nuevas drogas diarreicas o antidiarreicas.

Destacar la importancia de que se realicen estudios de motilidad intestinal con nuevos productos.

---

<sup>1</sup> Lapa, A.J.; Souccar, C.; Lima-Landman, M.T.R.; Castro, M.S.A.; Lima, T.C.M. “Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais”. Porto Alegre: Gráfica Metrópole, 2003.

<sup>2</sup> WHO. World Health Organization. WHO/EMP/MAR/2011.1, World Health Report. Geneva, 2011.

<sup>3</sup> Sarin, R.V.; Bafna, P.A. “Herbal antidiarrhoeals: A Review”. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, v.3, n.2, p.637-649, 2012.

<sup>4</sup> Andre, S.B.; Rodriguez, T.N.; Moraes-Filho, J.P.P. “Constipação intestinal funcional”. *Revista Brasileira de Medicina*, v.57, n.11, p.1240-1252, 2000.

<sup>5</sup> Cota, R.P.; Miranda, L.S. “Associação entre constipação intestinal e estilo de vida em estudantes universitários”. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v.21, n.4, p.296-301, 2006.

<sup>6</sup> Dantas, R.O. “Diarréia e constipação intestinal”. *Medicina*, v.37, p. 262-266, 2004.

<sup>7</sup> Johanson, J.F.; Kralstein, J. “Chronic constipation: a survey of the patient perspective”. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, v.25, p.599–608, 2007.

<sup>8</sup> Melo, M.C.B.; Torres, M.R.F.; Guimarães, E.V.; Figueiredo, R.C.P.; Penna, F.J. “Constipação intestinal”. *Rev. Med. Minas Gerais*, v.13, n.2, p.35-43, 2003.

<sup>9</sup> Puopolo, M. “Biostatistical approaches to reducing the number of animals used in biomedical research”. *Ann Ist Super Sanità*, v.40, p.157-163, 2004.

<sup>10</sup> Verhaeren, E.H.; Dreesen, M.J.; Lemli, J.A. “Influence of 1,8-dihydroxyanthraquinone and loperamide on the paracellular permeability across colonic mucosa”. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.33, n.8, p.526-528, 1996.

<sup>11</sup> Arnold, G.L.; Plaut, A.G. Antidiarrheal agents. In: MILLER, R.R.; GREENBLATT, D.J. (Eds.). “Handbook of drug therapy”. New York, Elsevier, 1979. P.1051-2.

<sup>12</sup> Oga, S. “Fundamentos de Toxicologia”. São Paulo: Atheneu, 1996. 515p.

<sup>13</sup> Michelin, D.C.; Salgado, H.R.N. “Avaliação da atividade laxante de *Operculina macrocarpa* L. Urban (Convolvulaceae)”. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.14, p.105-109, 2004.

<sup>14</sup> Ramesh, P.R.; Suresh Kumar, K.; Rajagopai, M.R.; Balachandran, P.; Warriar, P.K. “Managing morphine-induced constipation: a controlled comparison of an Ayurvedic formulation and Senna”. *Journal of Pain Symptom Manage.*, v.16, n.4, p.240-244, 1998.

<sup>15</sup> Figueiredo, M.E.; Michelin, D.C.; Sannomiya, M.; Silva, M.A.; Santos, L.C.; De Almeida, L.F.R.; Souza-Brito, A.R.M.; Salgado, H.R.N.; Vilegas, W. “Avaliação química e anti-diarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae)”. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.41, p.79-83, 2005.

<sup>16</sup> Salgado, H.R.N.; Roncari, A.F.F.; Michelin, D.C.; Moreira, R.R.D. “Evaluation of antidiarrhoeal effects of *Psidium guajava* L. (Myrtaceae) leaf extract in mice”. *Rev. Ciênc. Farm. Bás. Aplic.*, v.27, n.1, p.89-92, 2006.

<sup>17</sup> Marona, H.R.N.; Lucchesi, M.B.B. “Refining the intestinal motility test in mice to reduce animal stress”. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v.24, n.1, p.79-82, 2003.

<sup>18</sup> Janssen, P.; Jageneau, A.H. “A new series of potent analgesics. Part I – chemical structure and pharmacological activity”. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.9, p.381-400, 1957.

<sup>19</sup> Wong, C.L.; Wai, M.K. “Effects of aspirin and paracetamol on naloxone reversal of morphine-induced inhibition of gastrointestinal propulsion in mice”. *European Journal of Pharmacology*, v.73, p.11-19, 1981.

---

<sup>20</sup> Marona, H.R.N.; Lucchesi, M.B.B. “Protocol to refine intestinal motility test in mice”. *Laboratory Animals*, v.38, p. 1–4, 2004.

# 7. Validación de métodos bioanalíticos

Marcela Longhi<sup>a</sup>, Claudia Garnero<sup>a</sup>, Ariana Zoppi<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Universidad Nacional de Córdoba.  
Argentina.*

## 7.1 Historia de las regulaciones sobre métodos analíticos

La historia de la validación de los métodos bioanalíticos se puede trazar desde 1990 hasta el presente. Anterior a 1990 no había uniformidad en los criterios que adoptaba la industria farmacéutica para la validación de los métodos, por lo tanto no era pareja la calidad de las presentaciones a las agencias regulatorias. El primer workshop sobre validación de métodos bioanalíticos, realizado en diciembre de 1990 en Arlington [Estados Unidos de América (EUA)], reunió a representantes de las siguientes organizaciones: American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS), Food and Drug Administration (FDA) de EUA, International Pharmaceutical Federation (FIP), Health Protection Branch y Association of Analytical Chemists. Este taller, que tuvo como objetivo debatir sobre la armonización de los requisitos y los procedimientos para la validación de los métodos bioanalíticos, fue un éxito, ya que se alcanzaron consensos sobre los parámetros esenciales y los procedimientos requeridos.

El informe de este workshop se convirtió en la referencia para la industria hasta 1999, cuando la FDA publicó el borrador de la guía sobre validación de métodos bioanalíticos, la cual se basó en el documento de 1990.

En el año 2000, luego de la publicación del documento preliminar de la guía, se desarrolló el segundo workshop sobre validación bioanalítica organizado por AAPS y FDA. El objetivo de este taller fue impulsar la discusión sobre la versión preliminar de la guía, así como también la valoración de los avances tecnológicos que acontecieron en la década luego del workshop de 1990. La guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA, publicada en 2001, representa la síntesis final de los dos talleres realizados en 1990 y 2000, ya que incorpora la mayor parte de



las recomendaciones contenidas en los informes de los mismos<sup>3</sup>. A partir de la publicación de la guía FDA en 2001, la AAPS y la FDA continuaron con la organización de talleres, siete hasta el año 2013, para debatir sobre las directrices de la guía y ayudar a la industria a su interpretación, así como también para compartir experiencias y ofrecer posibles soluciones para los problemas actuales en bioanálisis. A partir de las conclusiones y consensos alcanzados en estos workshops se generaron los libros blancos (white papers) de bioanálisis<sup>4,5,6,7,8,9</sup>.

Si bien la guía de la FDA de validación de métodos bioanalíticos, publicada en 2001, es actualmente el documento más reconocido por la industria en diversos países, necesita ser actualizada para adecuarse a los avances registrados en este campo a través de los años.

Por su parte, en julio de 2011, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) emitió su propia guía de validación de métodos bioanalíticos<sup>10</sup>. Para la elaboración de la misma se consideraron la guía de la FDA<sup>3</sup> y los libros blancos de bioanálisis<sup>4,5,6</sup>. Esta guía define los criterios para la validación de los métodos analíticos, utilizados para determinar la concentración de analitos en matrices biológicas (plasma, suero, sangre, orina, etc.), en estudios toxicocinéticos y farmacocinéticos, que se realizan para registrar productos nuevos y/o genéricos, o bien para documentar variaciones introducidas en los existentes.

Las diferencias observadas entre las guías de la EMA y de la FDA 2001 no son significativas, se deben más al avance registrado en la ciencia en los últimos 10 años, como también a una mejor comprensión de las necesidades específicas y los desafíos que presenta el bioanálisis, que a diferencias de criterio entre ambas agencias reguladoras. Debido a que ambas guías, FDA y EMA, son muy similares, se infiere que un proceso de armonización de ambas es factible y bastante sencillo<sup>11</sup>.

## **7.2 Introducción a la validación de métodos bioanalíticos**

Los laboratorios deben demostrar que los métodos analíticos que utilizan proveen resultados fiables y adecuados para la finalidad y el propósito perseguidos, ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos datos proporcionan. La validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fidedignos.

Validar un método consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos requisitos determinados, establecidos previamente por el usuario, para resolver un problema analítico particular. Estos requisitos son los que definen los parámetros o criterios de calidad que debe poseer un método a utilizar para resolver el problema analítico.

Según la norma ISO 17025<sup>12</sup>, los laboratorios deben validar todos los métodos que utilicen, tanto los desarrollados en el mismo ámbito, como aquellos obtenidos de fuentes bibliográficas, o desarrollados por otros laboratorios. Incluso, es aconsejable validar los métodos de referencia, aunque en estos casos, no es necesario realizar una validación completa, sino que se determinarán solo los parámetros más susceptibles a variar, como la exactitud y la precisión. Además, para la validación del procedimiento analítico, el laboratorio debe considerar el rango de concentraciones a ser utilizadas, así como las matrices de las muestras.

La validación debe ser tan exhaustiva como sea necesario para responder a las necesidades de aplicación. La validación debe incluir procedimientos para el muestreo, manejo y transporte, de manera de asegurar la integridad y representatividad de las muestras.

La validación de métodos bioanalíticos es un procedimiento utilizado para demostrar que un método analítico, utilizado para la cuantificación de analitos en una matriz biológica, es fiable y reproducible para lograr su propósito, o sea para cuantificar el analito con un grado de exactitud y precisión apropiado a la tarea.

Los datos de validación, a través de investigaciones de laboratorio específicas, demuestran que el desempeño de un método es adecuado y fiable para las aplicaciones analíticas a las que estará destinado.

Todos estos controles se deben realizar para garantizar la fiabilidad de la selectividad y la sensibilidad del método bioanalítico antes de su aplicación para la evaluación cuantitativa de los fármacos y sus metabolitos. Los datos generados por estos métodos deben ser reproducibles y confiables, ya que tienen un rol significativo en la evaluación y la interpretación de la biodisponibilidad, bioequivalencia, farmacocinética y en estudios preclínicos<sup>13,14,15</sup>. Se deben validar todos los métodos bioanalíticos que emplean técnicas analíticas tales como cromatografía de gases (CG); cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE), espectrometría de masas (EM) como sistema de detección en métodos tales como CLAE-EM, CLAE-EM/EM, CG-EM y CG-EM/EM; o procedimientos inmunológicos y microbiológicos, para la determinación cuantitativa de fármacos

y/o metabolitos en matrices biológicas tales como sangre, suero, plasma, orina, heces, saliva, esputo, líquido cefalorraquídeo, tejidos y muestras de piel.

Los métodos de análisis empleados para la determinación cuantitativa de fármacos y sus metabolitos en muestras biológicas deben generar datos reproducibles y fiables con el fin de permitir la interpretación válida de los estudios que sustentan. Es esencial emplear métodos de análisis bien caracterizados y completamente validados para producir resultados fiables que puedan ser satisfactoriamente interpretados. Se reconoce que las técnicas y los métodos analíticos están sujetos a cambios y mejoras constantes, a la vez que se encuentran a la vanguardia de la tecnología. También es importante destacar que cada técnica analítica tiene sus propias características, que variarán de analito a analito, por lo cual, en algunas oportunidades, es necesario desarrollar criterios de validación específicos para cada analito. Por otra parte, la adecuación de la técnica también puede estar influenciada por el objetivo del estudio.

Si bien la validación de cada método se sustenta en sí misma, pueden existir situaciones en las que sea necesaria la comparación de métodos. Además, cuando el análisis de la muestra para un estudio dado se lleva a cabo en más de un laboratorio, es necesario validar el método analítico en cada sitio y suministrar la información apropiada sobre la validación en cada uno, a fin de establecer la confiabilidad inter-laboratorios.

Se identifican claramente dos fases distintas de validación de métodos bioanalíticos:

1. el desarrollo de los métodos analíticos (validación pre-estudio), mediante lo cual se genera el método bioanalítico apropiado, con sus diversos parámetros especificados y se define el ensayo, y
2. la aplicación del método de bioanálisis a la determinación de muestras reales en estudios de biodisponibilidad, bioequivalencia, o farmacocinético.

Los parámetros esenciales, para asegurar la confiabilidad en el desempeño de un método bioanalítico, son exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad. Las guías de las agencias regulatorias, como FDA y EMA<sup>3,10</sup>, proporcionan la información necesaria para la determinación de estos parámetros. La estabilidad del analito debe establecerse en la matriz biológica, tanto para las condiciones de almacenamiento previstas, así como para las operativas. Las guías también establecen los requisitos para la obtención de la curva de calibración, la cual debe estar basada en la matriz y constar de un mínimo

de 5 puntos estándar, sin incluir los blancos, utilizando muestras simples o replicadas, las cuales deben cubrir todo el rango de concentraciones esperado. Todos estos parámetros deben estar definidos durante la validación completa de un método de bioanálisis. El límite inferior de cuantificación (LIC) puede ser establecido como la concentración menor en la curva de calibración y no debe confundirse con el límite de detección (LD).

Muchos de los principios, procedimientos y requisitos de validación de métodos bioanalíticos son comunes a todos los tipos de metodologías analíticas.

## **7.3 Prácticas de validación**

Se reconoce que el método bioanalítico definido experimente muchas modificaciones durante el transcurso de un programa típico de desarrollo de medicamentos. Estos cambios evolutivos (por ejemplo, la adición de un metabolito, la reducción del LIC) requieren diferentes niveles de validación para demostrar la continuidad de la validez de los resultados de un ensayo. Por otra parte, si un método bioanalítico no se utiliza de forma regular requerirá, antes del análisis de las muestras en estudio, una adecuada revalidación de los datos cuando sea necesario, con el fin de documentar y demostrar que el método sigue siendo válido. Se definen y caracterizan tres niveles o tipos diferentes de validación de métodos: validación completa, validación parcial y validación cruzada, de acuerdo a lo establecido en el manuscrito publicado por Shah y colaboradores.

### **7.3.1 Validación completa**

- La validación completa es necesaria cuando se desarrolla y aplica un método de bioanálisis por primera vez.
- La validación completa se requiere para un nuevo ingrediente farmacéutico activo.
- Si se agregan metabolitos a un ensayo ya existente para cuantificación, entonces será necesaria la validación completa del ensayo para todos los analitos medidos.

### 7.3.2 Validación parcial

Las validaciones parciales se deben realizar cuando se producen modificaciones de métodos bioanalíticos validados, que no requieran necesariamente revalidaciones completas. La validación parcial puede variar, desde algo tan insignificante como la determinación de la precisión y exactitud intra-ensayo, a una validación "casi" completa. Los cambios típicos de un método bioanalítico, que entran en esta categoría incluyen, aunque no se limitan, a:

- Transferencia del método bioanalítico entre laboratorios o analistas.
- Cambio de instrumento y /o plataforma de software.
- Variación de la especie de la que proviene la matriz (por ejemplo, plasma de rata a plasma de ratón).
- Cambios de la matriz dentro de la misma especie (por ejemplo, plasma humano a orina humana).
- Demostración de la selectividad de un analito en presencia de metabolitos específicos.
- Demostración de la selectividad de un analito en presencia de medicación concomitante.
- Cambios en la metodología analítica (por ejemplo, cambios en el sistema de detección).
- Cambio del procedimiento de procesado de la (s) muestra (s).
- Matrices raras.
- Cambio del anticoagulante usado en la toma de muestra del fluido biológico.
- Cambios de volumen limitado (por ejemplo, estudio pediátrico en proyecto).

### 7.3.3 Validación cruzada

La validación cruzada es una comparación de dos métodos bioanalíticos. Las validaciones cruzadas son necesarias cuando dos o más métodos bioanalíticos se utilizan para generar los datos dentro del mismo estudio. Por ejemplo, un método bioanalítico original validado sirve como "referencia" y el método bioanalítico revisado es el "comparador". Las comparaciones deben ser realizadas de ambas maneras. Validación cruzada con la matriz adicionada y muestras reales:

- Debe realizarse en cada sitio o laboratorio para determinar la confiabilidad inter-laboratorio, cuando el análisis de las muestras de un mismo estudio se realice en más de un sitio, o en más de un laboratorio.
- Se considera cuando los datos generados por distintas técnicas analíticas (por ejemplo, CLAE-EM/EM vs ELISA) en diferentes estudios se incluyen en una presentación regular.

De acuerdo a lo establecido en las normativas, se debe hacer una descripción detallada y específica del método bioanalítico. Los siguientes parámetros de validación deben estar definidos en un protocolo, en un plan de estudio o en un procedimiento operativo estándar, junto con los criterios de aceptación, previo a la ejecución de los experimentos: selectividad, efectos de la matriz, exactitud, precisión, reproducibilidad, sensibilidad, linealidad y rango, límite inferior de cuantificación, límite superior de cuantificación y evaluación de la estabilidad.

La validación del método puede incluir un único analito, múltiples analitos, o un compuesto principal y sus metabolitos. En cualquier caso, la validación debe llevarse a cabo utilizando la misma matriz prevista para el análisis de la muestra en estudio.

Todos los temas, mencionados previamente, deben ser abordados a fondo durante el desenvolvimiento del procedimiento analítico, aunque con frecuencia son pasados por alto o abordados inadecuadamente, debido al tiempo insuficiente que se le asigna al desarrollo y validación de los métodos. Debido a ello, es importante destacar que un método bioanalítico mediocre brindará datos erróneos del estudio, los cuales tendrán un impacto significativo sobre la calidad de las decisiones que se tomarán durante el proceso de desarrollo del medicamento.

## **7.4 Definiciones, metodología, diseño experimental y criterios de aceptación**

A pesar de que en la actualidad no existe una guía global armonizada, se hace evidente que las pautas individuales presentan elevada similitud. No obstante, se hace necesario aclarar el significado y la interpretación de criterios bioanalíticos de validación de métodos.

A continuación se hace referencia a los criterios analíticos fundamentales para realizar la validación de métodos bioanalíticos. Se expondrán definiciones, metodología, diseño experimental y criterios de aceptación.

## 7.4.1 Selectividad

Existe una cierta discusión acerca de la interpretación de la terminología de este criterio de validación<sup>16</sup>. Algunas organizaciones definen de manera diferente a los términos especificidad y selectividad, mientras que otras a menudo los emplean de manera indistinta. A pesar de esta controversia, hay un amplio acuerdo de que especificidad /selectividad es la base fundamental de cada método analítico<sup>17</sup>. Por lo tanto, los laboratorios bioanalíticos deben optar por diferenciar selectividad y especificidad en su documentación o considerarlos como términos equivalentes y utilizarlos indistintamente.

Especificidad y Selectividad dan idea de la fiabilidad del método para discriminar el analito de componentes interferentes en la matriz. Entre los potenciales componentes interferentes en una matriz biológica se incluyen los componentes endógenos de la matriz, metabolitos de fármacos, productos de degradación del analito formados durante la preparación de la muestra, cualquier otro fármaco co-administrado y otros xenobióticos exógenos<sup>3,10</sup>.

Este parámetro debe ser evaluado desde el comienzo del desarrollo del método, teniendo en cuenta las propiedades tanto del analito como de la matriz, y puede continuar determinándose durante el análisis de rutina de muestras analíticas. El analista debe usar su experiencia y datos de la literatura con el fin de probar sistemáticamente las interferencias que tienen más probabilidades de afectar el método.

Especificidad se define como la capacidad del método para evaluar inequívocamente al analito en presencia de otros componentes que pueden estar presentes en la matriz. Generalmente, hace referencia a un método que produce respuesta sólo para un analito.

Selectividad se define como la capacidad del método para medir y diferenciar al analito en presencia de otros componentes que pueden estar presentes en la matriz. Generalmente, se utiliza para un método que produce respuestas para diferentes analitos y puede distinguir entre ellos, es decir que mide exactamente un analito en presencia de interferencias.

En general, los métodos analíticos son selectivos, y solamente en algunos casos también son específicos.

Se debe demostrar que el método no se ve afectado por la presencia de interferentes; es decir, que el método permite establecer en forma exacta el

contenido o potencia del analito en la matriz. Si el método es desarrollado para cuantificar más de un analito, cada analito debe ser evaluado para asegurar que no hay interferencias.

Para la validación del método debe utilizarse, siempre que sea posible, la misma matriz biológica en la que se encuentra la muestra analítica. En tanto que matrices de disponibilidad limitada, como médula ósea, pueden ser sustituidas por matrices fisiológicamente apropiadas.

En general la selectividad del método puede ser demostrada y documentada a través de diferentes procedimientos:

- El primero consiste en demostrar la ausencia de señal de detector en una matriz blanco. Deben analizarse por separado de 6 a 10 fuentes independientes de la misma matriz biológica (plasma, orina u otra matriz). Para cada muestra se debe demostrar la ausencia de compuestos que interfieran con la cuantificación del analito.
1. Todas las muestras deberían cumplir el criterio de aceptación.
  2. Si 2 de las muestras blanco no cumplen con el criterio, el método debe volver a la etapa de desarrollo y se debe mejorar su selectividad (aumento de limpieza/etapa de extracción/o separación cromatográfica).
  3. Si 2 de las muestras blanco no cumplen con el criterio, otros 6 a 10 lotes adicionales pueden ser evaluados, y todos deben cumplir con el criterio de aceptación o será necesario un desarrollo adicional para eliminar el origen de la interferencia.
  4. Si 2 de las muestras blanco no cumplen con el criterio, otros 6 a 10 lotes adicionales pueden ser evaluados, y si 2 o más de las muestras adicionales no cumplen con el criterio de aceptación el método debe volver a la etapa de desarrollo y se debe mejorar su selectividad.
- Sin embargo, es evidente que todas las fuentes posibles de interferencia propias de las diversas matrices no estarán presentes en las 6-10 fuentes estudiadas. Por lo tanto, otro enfoque recomienda evaluar muestras blanco de la matriz biológica enriquecida con la máxima concentración probable de posibles metabolitos, productos de degradación, fármacos de uso común y co-administrados en estudios clínicos u otros componentes de la matriz. En caso de productos de degradación desconocidos o que no puedan aislarse, pueden producirse degradaciones forzadas (fotólisis, hidrólisis ácida y básica, oxidación, termólisis) de los analitos.



- Otro planteo propone no demostrar la ausencia completa de interferencias sino que permite una pequeña cantidad de compuestos interferentes. Se requiere analizar hasta 20 fuentes independientes de la matriz biológica enriquecida con potenciales compuestos interferentes así como el analito en estudio en una concentración igual a su límite inferior de cuantificación (LIC)<sup>16</sup>.

En adición, se recomienda considerar dos aspectos relacionados a selectividad:

- Interferencia específica de sustancias fisicoquímicamente similares al analito: deben evaluarse individualmente y en combinación con el analito de interés los siguientes interferentes: metabolitos de reactividad cruzada, fármacos co-administrados o compuestos endógenos.
- Efectos no específicos de la matriz:
  1. Se deberían comparar las curvas del estándar en fluidos biológicos y en solución amortiguadora para detectar efectos de la matriz.
  2. Se debería evaluar el paralelismo de muestras de estudio diluidas con estándares diluidos para detectar efectos de la matriz.
  3. Se deberían determinar uniones no específicas.

Normalmente, el criterio de aceptación establece ausencia de componentes interferentes si:

- La respuesta de señales interferentes es menor al 20% de la respuesta del analito al LIC, o la respuesta del analito a la concentración del LIC es al menos cinco veces mayor que cualquier interferencia en blancos.
- Las respuestas de señales interferentes son 5% menores a la respuesta de la concentración de estándar interno utilizada en el estudio.

Puede resultar necesario reevaluar este parámetro en algunos casos, como el análisis de muestras de diferentes estadios de una enfermedad o modificaciones del método.

### **7.4.3 Efecto de la matriz**

La confirmación del efecto de la matriz es importante para la validación del método. Se debe evaluar utilizando al menos 6 fuentes individuales de matriz

blanco. Si es difícil conseguir la matriz, se pueden utilizar menos de 6 fuentes realizando una justificación adecuada.

La metodología propuesta por Matuszweski y colaboradores para su determinación consiste en medir la respuesta del analito en 3 tipos diferentes de muestras<sup>18</sup>:

- Tipo 1: matriz blanco,
- Tipo 2: matriz blanco extraída de diferentes fuentes y enriquecida con el analito luego de la extracción,
- Tipo 3: matriz blanco extraída de las mismas fuentes y enriquecida con el analito antes de la extracción.

Definen efecto matriz como la relación de la respuesta de muestras Tipo 2 sobre Tipo 1, recuperación, como la relación de la respuesta de muestras Tipo 3 sobre Tipo 2 y eficiencia del proceso, como la relación de la señal del detector para muestras Tipo 3 sobre la señal de Tipo 1.

Esta metodología fue recientemente mejorada por Marchi y colaboradores<sup>19</sup>. Sugiere el análisis de una solución suplementaria (Tipo 4) que permite evaluar el rendimiento de extracción, particularmente útil en caso de determinación de analitos múltiples. Se analiza una cuarta muestra:

- Tipo 4: matriz blanco sometida a extracción.

Definen rendimiento de extracción como la relación de la respuesta de muestras Tipo 4 sobre Tipo 1.

Otra alternativa propuesta para evaluar y medir el efecto de la matriz consiste en comparar la variabilidad de las pendientes de curvas de calibración preparadas con matrices de diferentes fuentes<sup>20</sup>.

Las pautas formuladas por EMA<sup>10</sup> establecen calcular, para cada analito y el estándar interno, el factor de matriz (FM) en cada lote de matriz biológica. Para ello, se calcula la relación entre la respuesta en presencia de matriz (matriz blanco adicionada con analito/estándar interno después de la extracción) y la respuesta en ausencia de matriz (solución pura del analito/estándar interno). Luego, se debe calcular el FM normalizado dividiendo el FM del analito por el FM del estándar interno. El coeficiente de variación del FM normalizado, calculado para las 6 fuentes de matriz, no debe ser superior al 15%. Esta determinación se debe realizar a niveles bajos y altos de concentración.

En caso de que sea necesario administrar a los pacientes o animales una formulación inyectable conteniendo excipientes que se conoce son responsables de efecto de matriz, como polietilenglicol y polisorbato, EMA recomienda evaluar el efecto de matriz empleando una matriz conteniendo dichos excipientes y la matriz blanco. La matriz utilizada para esta determinación se debe obtener de pacientes o animales a los que se les han administrado los excipientes, a menos que se haya demostrado que el excipiente no es metabolizado o transformado *in vivo*. El efecto del excipiente puede ser estudiado mediante la determinación del FM o por dilución de una muestra en estudio de alta concentración con matriz blanco libre del excipiente. Sin embargo, en general, este tipo de investigación no se lleva a cabo ya que se considera innecesaria, pues el impacto, si lo hay, se debe principalmente a la presencia del excipiente y no a su metabolismo o transformación *in vivo*. Además, como diferentes formulaciones podrían ser administradas en varios estudios, se incrementaría el tipo de matrices que deben evaluarse para efecto de la matriz.

En adición, es recomendable estudiar matrices provenientes de poblaciones especiales, como por ejemplo plasma hemolizado o hiperlipidémico. Si se deben analizar muestras de pacientes con fallas hepáticas o renales, se sugiere estudiar el efecto de matriz utilizando matrices obtenidas de dichas poblaciones.

Cuando se utilizan métodos de espectrometría de masas el efecto de la matriz está lejos de ser despreciable. Se recomienda evaluar este efecto durante el desarrollo del método mediante la infusión continua post-columna. Se debe monitorear la disminución o el aumento de la señal del detector cuando eluyen compuestos interferentes de la columna al suprimir o intensificar la ionización, respectivamente<sup>21,22,23</sup>. Estos resultados orientarán en la selección del procedimiento de preparación y limpieza de la muestra.

### **7.4.3 Efecto de arrastre**

Este efecto consiste en la aparición de la señal correspondiente al analito (o al estándar interno) en muestras blanco, causada por su presencia residual proveniente de muestras analizadas anteriormente. Debido a que el efecto de arrastre puede afectar a la exactitud y a la precisión del método, es importante su investigación durante el desarrollo del método. En caso de detectarse este efecto es necesario tomar medidas para garantizar que sea eliminado o minimizado. También debe ser evaluado durante la validación del método. Con este objetivo se procede al análisis de muestras blanco con posterioridad al de muestras de alta concentración o de

patrones de calibración cuya concentración se encuentre en el límite superior de cuantificación (LSC). El porcentaje de arrastre en las muestras blanco no deberá ser mayor al 20% del LIC para el analito y 5% para el estándar interno<sup>10</sup>.

Cuando el efecto de arrastre es inevitable, deben adoptarse procedimientos específicos en la aplicación del método con el objetivo de controlar su efecto.

#### 7.4.4 Exactitud y precisión

Los resultados analíticos en general se pueden ver afectados por la combinación de dos tipos diferentes de errores experimentales: el error sistemático y el error aleatorio. La exactitud describe tanto los errores sistemáticos como aleatorios del método, y se estudia en dos componentes: la veracidad y la precisión<sup>16</sup>. Con respecto a este punto es necesario hacer la aclaración de que en muchos casos, como ocurre en las normas de validación de métodos bioanalíticos de FDA y EMA, el término exactitud es empleado para describir sólo los errores sistemáticos del método, y así será utilizado en este capítulo. Los errores aleatorios se asocian con la precisión del método analítico. A continuación se presenta la definición de exactitud y precisión:

- La exactitud (o veracidad) de un método analítico expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, ya sea como un valor convencional verdadero o como un valor de referencia aceptado, y el valor obtenido al aplicar el método analítico<sup>10</sup>. La exactitud puede informarse como error relativo porcentual (ER%),  $[(\text{valor determinado} / \text{valor real}) - 1] \times 100$ .
- La precisión de un método analítico está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio y corresponde al grado de concordancia, o grado de dispersión, entre los resultados del ensayo individual, cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea<sup>3</sup>. En general, la precisión se expresa como coeficiente de variación [CV,  $(\text{desviación estándar} / \text{media}) \times 100$ ] de una serie de mediciones, también puede expresarse como desviación estándar, varianza o desviación estándar relativa<sup>16</sup>.

La diferenciación de los dos tipos de errores es útil cuando se necesitan tomar medidas que permitan corregir el rendimiento durante la etapa de desarrollo del método bioanalítico. Por ejemplo, la precisión se puede mejorar aumentando el número de repeticiones, sin cambiar el procedimiento de análisis. Sin embargo, si el mal rendimiento del método se debe a errores sistemáticos, el método necesita ser revisado para encontrar el origen de estos errores y permitir el mejoramiento

del mismo. Existen numerosas causas que pueden introducir errores sistemáticos a las mediciones, entre las que pueden mencionarse<sup>24</sup>:

- Errores en la preparación de los patrones de calibración, por ejemplo mediciones erróneas del peso de los patrones de calibración;
- La presencia de moléculas en la muestra que puedan interferir con los reactivos utilizados en el proceso de medición;
- Pérdida del analito durante el proceso de extracción;
- Inestabilidad de la muestra durante el transporte o almacenamiento.

### **Procedimiento y criterios de aceptación**

Las normas internacionales requieren la valoración de la exactitud<sup>3,10</sup> y la precisión<sup>3,10</sup> a dos niveles: intra-ensayo, donde se evalúan estos parámetros en una serie analítica, e inter-ensayo, donde se evalúan estos parámetros con el tiempo en diferentes series analíticas y pueden implicar diferentes analistas, equipos, reactivos, y laboratorios<sup>16</sup>. En forma general cuando se calculan la exactitud y la precisión a nivel inter-ensayo durante la validación del método, es habitual cambiar el tiempo, algunas veces el operador, raramente el instrumento y excepcionalmente el laboratorio<sup>4</sup>.

Para evaluar la exactitud y la precisión se prepararán muestras enriquecidas con cantidades conocidas de analito en la matriz biológica, denominadas muestras de control de calidad (CC).

Se recomienda utilizar un mínimo de 5 muestras por nivel, en un mínimo de 4 niveles de concentración, que cubran todo el rango de la curva de calibración. Por ejemplo, podemos utilizar las concentraciones correspondientes a: el LIC, tres veces el LIC (CC bajo), cercano al 50% del rango de concentración (CC medio) y como mínimo el 75% del patrón de calibrado de mayor concentración de la curva de calibración (CC alto). Para determinar la exactitud y la precisión inter-ensayo, se deberán realizar tres ensayos, en al menos dos días diferentes.

Las concentraciones de las muestras de CC se analizarán utilizando la curva de calibración.

En lo que respecta al criterio de aceptación, la exactitud (intra e inter-ensayo), expresada como ER%, debe estar comprendida entre el  $\pm 15\%$  del valor de la

concentración nominal para las muestras de CC, salvo para el LIC que deberá estar dentro del 20% del valor nominal.

En el caso de la precisión (intra e inter-ensayo) el CV no debe exceder de 15% para las muestras de CC, salvo el LIC que no debe exceder el 20%.

### **7.4.5 Recuperación**

Este parámetro indica la eficiencia en la extracción del analito a partir de la matriz biológica. El conocimiento de la recuperación no es esencial para la validación de un método bioanalítico, pero proporciona información útil sobre la cantidad real de analito que se está analizando. La evaluación de este parámetro en cada etapa del procesamiento de las muestras, en las que puedan producirse pérdidas del analito, proporciona una herramienta útil para mejorar el método, si es necesario.

#### **Procedimiento**

Para determinar la recuperación se compara la respuesta del analito y/o estándar interno, extraído de una matriz biológica y la respuesta de la misma cantidad de analito y/o estándar interno sin extraer (recuperación del 100%). En los casos en que la respuesta del analito se vea afectada por la matriz biológica, se considerará como la recuperación del 100%, a la respuesta de un blanco de la matriz biológica extraída, a la que posteriormente se adicione el analito. Para la determinación de este parámetro se recomienda emplear tres concentraciones diferentes del analito (baja, media y alta) dentro del rango de la curva de calibración.

Es importante señalar que no es necesario que la recuperación del analito sea del 100%, mientras que el grado de recuperación del analito y del estándar interno sea uniforme, preciso y reproducible.

El descubrimiento de diferencias significativas en la recuperación entre el analito y el estándar interno, en las diferentes etapas de procesamiento de las muestras, podría implicar un posible fallo del método durante la validación. La selección del estándar interno es una etapa muy importante en el desarrollo de un método bioanalítico, ya que si es bien elegido, las pérdidas que se produzcan durante el procesamiento de las muestras no tendrán ningún impacto en la cuantificación, ya que será similar para el analito y el estándar interno y por lo tanto se anulan entre sí.

## 7.4.6 Curva de calibración

La curva de calibración para un procedimiento bioanalítico es la relación existente, bajo condiciones específicas, entre los valores de respuesta analítica y los valores conocidos de concentración de analito, denominándose calibración al conjunto de operaciones que establecen dicha relación.

El objetivo de la calibración es el establecimiento de la función de calibración, también llamada función respuesta,  $y=f(x)$ , en la que  $y$  es la respuesta analítica medida (señal, por ejemplo, área bajo la curva, altura del pico, absorción) y  $x$  la concentración en estudio, correspondiente a los patrones de calibración. Entre las posibles funciones de calibración, la función  $y=mx+b$ , correspondiente a la ecuación de una recta (función lineal), será la elegida en lo posible, pero debe tenerse en cuenta que podemos tener funciones respuesta no lineales.

La linealidad se define como la capacidad de un método de producir resultados proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo dado, ya sea directamente o por medio de una transformación matemática definida<sup>25</sup>.

El método de mínimos cuadrados se aplica con frecuencia para obtener la ecuación de la recta. Este método se basa en determinadas suposiciones. La primera es que hay en realidad una relación lineal entre la respuesta medida y la concentración del analito. Además, supone que los valores de  $x$  (concentraciones) tienen una incertidumbre considerablemente menor que los valores del eje  $y$  (respuesta analítica). Este supuesto pone de manifiesto la importancia de que las concentraciones de los patrones de calibración se conozcan con la máxima precisión posible. Es necesario considerar que siempre que haya una incertidumbre importante en los datos de concentración, el análisis básico lineal de mínimos cuadrados podría no dar la mejor recta. En tal caso, sería necesario un análisis de correlación complejo.

Otro supuesto que se hace es que la variancia de la variable  $y$  es aproximadamente constante u homocedástica. Pero en muchos casos, esto no se cumple y los errores en los valores de la respuesta analítica aumentan con el incremento en la concentración del analito. Cuando existe heterocedasticidad, se utilizará el método de mínimos cuadrados ponderados. Este método se basa en dar más importancia (más peso) a los datos con menor error, frente a los de mayor error.

Finalmente, en los casos en que los datos no se ajusten a un modelo lineal, se deberá recurrir a los métodos de regresión no lineal. Algunos de estos utilizan polinomiales o procedimientos de regresión múltiple.

El ajuste de los datos de una curva de calibración se debe realizar comenzando por la regresión más simple posible. La selección de regresiones más complejas deberá ser justificada adecuadamente<sup>3,10</sup>.

Resulta relevante destacar que las funciones de calibración se pueden utilizar dentro de un determinado rango de concentraciones. Se define como rango de un procedimiento analítico al intervalo, entre la concentración superior e inferior de analito (incluidas estas concentraciones), para las que se ha demostrado que el procedimiento analítico cumple con los requisitos de precisión, exactitud y función respuesta. En este contexto se define al límite inferior de cuantificación (LIC) y al límite superior de cuantificación (LSC) como la cantidad más baja y más alta, respectivamente, de un analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud adecuada. Mientras que el Límite de detección (LD) es la mínima concentración de un analito que el procedimiento bioanalítico puede diferenciar del ruido de base de manera confiable<sup>3</sup>.

El estándar más bajo de la curva de calibración es aceptado como el límite de cuantificación, si se cumplen los siguientes requisitos:

- La respuesta del analito en el LIC debe ser por lo menos 5 veces la señal de una muestra blanco, y
- La precisión y exactitud del límite de cuantificación debe ser inferior al 20 % (CV) y  $\pm 20$  % del valor nominal (ER %), respectivamente.

El rango se determinará en base a las concentraciones esperadas en las muestras para las cuales se desarrolló el procedimiento bioanalítico.

### **Procedimiento y criterios de aceptación**

En los métodos bioanalíticos la curva de calibración deberá evaluarse en la matriz biológica para la que se ha desarrollado el método, cubriendo todo el rango de calibración. En el caso de la determinación simultánea de varios analitos, debe haber una curva de calibración para cada analito estudiado.

Para la realización de la curva de calibración se requiere un mínimo de cinco a ocho niveles de concentración, para lo cual se utilizarán patrones de calibración [matrices a las cuales se adiciona concentraciones conocidas del analito y estándar interno (EI)], además de una muestra blanco (matriz procesada sin el EI) y una muestra cero (matriz procesada con el EI). Las muestras blanco y cero no se



utilizan para el cálculo de los parámetros de la curva de calibración, solo se emplean para evaluar la presencia de interferencias.

Durante la validación se deben realizar como mínimo tres curvas de calibrado independientes. Cuando se obtiene una función lineal para la curva de calibración se deben informar los siguientes parámetros: pendiente de la regresión, intercepto y coeficiente de correlación. Además, se informará el error relativo porcentual de cada uno de los patrones de calibración, esto es, la desviación en porcentaje de los valores calculados frente a los teóricos.

La curva de calibración debe cumplir los siguientes criterios para ser aceptada:

- El error relativo porcentual de cada uno de los patrones de calibración no deberá ser superior al 15 % de la concentración nominal, excepto para el LIC, que podrá ser como máximo del 20 %.
- Este criterio deberá cumplirse para al menos el 75 % de los patrones de calibración de cada una de las curvas, con un mínimo de cinco patrones de calibración incluyendo los límites superior e inferior del rango.

### **7.4.7 Integridad de dilución**

Cuando el analito está presente en la muestra a concentraciones superiores al LSC, la muestra debe ser diluida a fin de estar dentro del rango válido de concentración. Se deberá demostrar que esta manipulación adicional de la muestra no afecta la exactitud y la precisión del método.

La metodología propuesta, para demostrar la integridad de la dilución, consiste en adicionar a la matriz biológica blanco una concentración de analito superior a la del LSC y posteriormente, realizar la dilución de esta solución con matriz blanco. Deben realizarse al menos 5 determinaciones por factor de dilución, abarcando el rango de dilución aplicado a las muestras en la utilización de rutina del método.

### **7.4.8 Estabilidad**

Evaluar la estabilidad del analito es un requisito fundamental para obtener un método bioanalítico fiable. Por lo tanto, durante el desarrollo del método es esencial comenzar por investigar la estabilidad del analito. Mediante la evaluación de la estabilidad se debe asegurar que cada etapa, durante la preparación y el

análisis de la muestra, así como las condiciones de almacenamiento, no afectan la concentración de analito. Para ello, cada fase del método analítico, así como las condiciones empleadas en el estudio de estabilidad, deben ser similares a las que se emplearan en el uso de rutina del método. Los estudios deben evaluar la estabilidad durante un período de tiempo igual o superior al que deben permanecer almacenadas las muestras hasta su análisis. No se considera suficiente considerar datos publicados en la literatura, ya que la estabilidad de un fármaco en un fluido biológico es función de las condiciones de almacenamiento, las propiedades químicas del fármaco, la matriz biológica y el sistema contenedor. La estabilidad de un analito, en una matriz biológica y un sistema contenedor particular, sólo es pertinente para dicha matriz y dicho sistema contenedor, y no debe extrapolarse a otras matrices y sistemas contenedores.

Para realizar las determinaciones de estabilidad se debe evaluar al analito en muestras de bajas y altas concentraciones, preparadas a partir de una solución madre fresca del analito en la matriz biológica apropiada, libre de analito e interferencias. Dichas soluciones madres de analito deben ser preparadas en un solvente apropiado, mediante la adición a la matriz blanco del analito a una concentración máxima de 3 veces el LIC y cerca del LSC. Las muestras deben analizarse inmediatamente después de su preparación y luego, después de aplicar las condiciones de almacenamiento que se han de evaluar. Se debe realizar una curva de calibrado con estándares, y analizar las concentraciones obtenidas para las muestras sometidas al estudio mediante comparación con las concentraciones nominales. La concentración media a cada nivel debe estar comprendida dentro del  $\pm 15\%$  de la concentración nominal<sub>0</sub>.

Las normas internacionales<sub>3,10</sub> brindan lineamientos que se toman como base para evaluar la estabilidad del analito en diferentes etapas, abarcando la recolección y manipulación de las muestras. Estas incluyen la evaluación de la estabilidad del analito en la matriz biológica a través de varios ciclos de congelación-descongelación, estabilidad a corto plazo (a temperatura ambiente o a la temperatura de preparación de las muestras), estabilidad a largo plazo (bajo las condiciones de almacenamiento de las muestras hasta su análisis) y la estabilidad de las muestras procesadas (en el muestreador automático). Las condiciones utilizadas en los experimentos de estabilidad deben reflejar las situaciones que puedan presentarse durante la manipulación y el análisis de la muestra en la rutina. El método debe incluir la evaluación de estabilidad del analito en la solución madre.

Se debe evaluar muestras, al menos por triplicado, a 2 niveles de concentración cercanos a los de los controles bajo y alto, considerando las siguientes condiciones:

- Estabilidad luego de ciclos de congelación-descongelación

Se debe determinar la estabilidad del analito después de 3 ciclos de congelación-descongelación. Para ello, se deben almacenar las muestras a la temperatura prevista durante 24 h, luego se permite, sin ayuda, que se descongelen a temperatura ambiente. Cuando se descongelan completamente, las muestras deben ser re-congeladas durante 12 a 24 h bajo las mismas condiciones. El ciclo de congelación-descongelación debe repetirse 2 veces y luego, analizar las muestras en el tercer ciclo. Si el analito es inestable a la temperatura de almacenamiento prevista, las muestras deben congelarse a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante los 3 ciclos de congelación-descongelación.

- Estabilidad a corto plazo

Para evaluar la estabilidad a corto plazo se deben descongelar a temperatura ambiente tres alícuotas a cada una de las concentraciones bajas y altas, mantenerlas a esta temperatura durante 4 a 24 h (según el tiempo previsto para que las muestras se mantengan a temperatura ambiente en el estudio) y luego, se las debe analizar.

- Estabilidad a largo plazo

En la evaluación de la estabilidad a largo plazo el tiempo de almacenamiento debería exceder el período comprendido entre la recolección de la muestra inicial y el análisis de la última muestra. Se deben almacenar al menos tres alícuotas a cada una de las concentraciones bajas y altas, bajo las mismas condiciones previstas para las muestras en el estudio. El volumen de las muestras debe ser suficiente para permitir realizar 3 veces el análisis.

- Estabilidad de soluciones almacenadas

Se debe evaluar la estabilidad de soluciones madre de fármaco y estándar interno, a temperatura ambiente, al menos durante 6 h. Su estabilidad debe ser documentada si las soluciones son refrigeradas o congeladas durante dicho período de tiempo. Después de transcurrido el tiempo de almacenamiento en cuestión, se debe evaluar la estabilidad mediante comparación de la respuesta con la de soluciones recién preparadas. Se debe realizar una dilución apropiada de la solución madre, considerando la linealidad y el rango de medición del detector.

- Estabilidad de muestras procesadas

Se debe determinar la estabilidad de las muestras procesadas, incluyendo el tiempo que residen en el inyector automático. La estabilidad del fármaco y el estándar interno, en las muestras de validación, debería evaluarse durante el

tiempo de ejecución esperado para el tamaño del lote, mediante la determinación de concentración de estándares de calibración originales. Además, se debe evaluar la reproducibilidad de reinyección, para determinar si una serie de análisis se podría volver a analizar en el caso de fallo del instrumento.

Además, se debe evaluar la reproducibilidad de re-inyección, para determinar si una serie de análisis se podría volver a analizar en el caso de fallo del instrumento. En el caso de muestras de volumen pequeño, para las cuales la re-inyección no sería posible, se puede realizar una comparación entre estándares de calibración frescos y las muestras almacenadas.

Los extractos secos generalmente se reconstituyen en el momento del análisis, por lo que no sería necesario evaluar su estabilidad, a menos que exista un problema potencial de estabilidad por la composición química del analito.

En el caso de estudios de muestras conteniendo analitos múltiples y en estudios específicos de bioequivalencia, se debe prestar atención especial a la estabilidad de los analitos en la matriz biológica conteniendo todos los analitos. Este tratamiento se debe aplicar a la determinación de la estabilidad del analito en la matriz biológica, muestreada directamente del paciente o animal que se somete a la preparación, antes del almacenamiento, para asegurar que las concentraciones obtenidas por el método analítico reflejan las concentraciones del analito en el paciente o animal al momento del muestreo.

Recientemente, fueron recopilados datos cuantitativos, provenientes de numerosos laboratorios de servicios bioanalíticos, sobre la estabilidad de la matriz en presencia de fármacos co-formulados o co-administrados. Todos los datos demostraron que la presencia de fármacos co-formulados o co-administrados no afecta la estabilidad. Por lo tanto, el Consejo Global de la Comunidad Bioanalítica recomienda que la realización adicional de tales experimentos de estabilidad, en la validación de rutina del método bioanalítico, debe limitarse a situaciones en las que el compuesto co-formulado o co-administrado puede afectar la estabilidad debido al proceso de recolección.

La inestabilidad del analito puede producirse por diversas razones:

- a) Evaporación de compuestos volátiles.
- b) Reacción de oxidación con el aire.

- c) Interacción con la superficie del sistema contenedor, como adsorción selectiva, adhesión al vidrio o plástico, lixiviación de contaminantes del vidrio o plástico.
- d) Descomposición fotolítica.
- e) Descomposición térmica.
- f) Actividad catalítica y enzimática.
- g) Reacciones fisicoquímicas con otros componentes de la muestra.

Esta dificultad puede ser minimizada o eliminada mediante:

- a) Disminución de la temperatura de almacenamiento para inhibir reacciones de degradación, tanto químicas como enzimáticas.
- b) Trabajar sobre hielo.
- c) Enfriamiento del automuestreador.
- d) Pre-enfriamiento de viales, tubos y sistemas contenedores.
- e) Conservación de las soluciones y muestras analíticas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- f) Proteger al analito de la luz.
- g) Adición de agentes estabilizantes (antioxidantes o anticoagulantes).
- h) Ajuste del pH para minimizar la hidrólisis.
- i) Adición de inactivadores enzimáticos o inhibidores.
- j) Realización de reacciones de derivatización química para estabilizar el analito.

---

<sup>1</sup> Shah, P. V., Midha, K. K., Findlay, J. W. A., Hill, H. M., Hulse, J. D., McGilveray, I. J., McKay, G., Miller, K. J., Patnaik, R. N., Powell, M. L., Tonelli, A., Viswanathan, C. T. & Yacobi, A. Bioanalytical Method Validation – A Revisit with a Decade of Progress. *Pharmaceutical Research*, Vol. 17, No. 12, 2000, pp. (1551–1557).

<sup>2</sup> Shah, P.V., Midha, K.K., Dighe, S., McGilveray, I.J., Skelly, S.P., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C.T., Cook, C.E., McDowall, R.D., Pittman, K.A. & Spector, S. Analytical method validation: bioavailability, bioequivalence and pharmaceutical studies. *Pharmaceutical Research*, Vol. 9, 1992, pp. (588–592).

---

<sup>3</sup> US Department of Health and Human Services, US FDA, Center for Drug Evaluation and Research FDA Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2001, Rockville, MD, USA.

<sup>4</sup> Garofolo, F. Bioanalytical Method Validation, in: Analytical Method Validation and Instrument Performance Verification, Chan, C., Lam, H., Lee, Y., Zhang, X., 2004, pp. (105-138), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

<sup>5</sup> Savoie, N., Booth, B.P., Bradley, T., Garofolo, F., Hughes, N.C., Hussain, S., King, S.P., et al.. The 2nd Calibration and Validation Group Workshop on recent issues in Good Laboratory Practice bioanalysis. *Bioanalysis*, Vol. 1, No. 1, 2009, pp. (19-30).

<sup>6</sup> Savoie N., Garofolo, F., van Amsterdam, P., Booth, B.P., Fast, D.M., Lindsay, M., Lowes, S., Masse, R., Mawer, L., Ormsby, E., Phull, R., Rocci, M.L., Vallano, P.T. & Yin, X. 2009 White Paper on Recent Issues in Regulated Bioanalysis from The 3rd Calibration and Validation Group Workshop. *Bioanalysis*, Vol. 2, No. 1, 2010, pp. (53–68).

<sup>7</sup> Savoie, N., Garofolo, F., van Amsterdam, P., Bansal, S., Beaver, C., Bedford, P., et al.. 2010 White Paper on Recent Issues in Regulated Bioanalysis & Global Harmonization of Bioanalytical Guidance. *Bioanalysis*, Vol. 2, No. 12, 2010, pp. (1945–1960).

<sup>8</sup> Garofolo, F., Rocci, M., Dumont, I., Martínez, S., Lowes, S., et al. 2011 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis and Regulatory Findings from Audits and Inspections. *Bioanalysis*, Vol. 3, No. 18, 2011, pp. (2081–2096).

<sup>9</sup> De Silva, B., Garofolo, F., Rocci, M., Martinez, S., Dumont, I., Landry, F., Dicaire, C., Szekely-Klepser, G., Weiner, R., Arnold, M., Bansal, S., Bateman, K., Bauer, R., Booth, B., Davis, S., Duda, S., Gouty, D., Grundy, J., Haidar, S., Hayes, R., Jemal, M., Kaur, S., Kelley, M., Knutsson, M., Le Blaye, O., Lee, J., Lowes, S., Ma, M., Mitsuoka, T., Tavares Neto, J., Nicholson, R., Ormsby, E., Sailstad, J., Stevenson, L., Tang, D., Welink, J., Viswanathan, C., Wang, L., Woolf, E. & Yang, E. 2012 White Paper on Recent Issues in Bioanalysis and Alignment of Multiple Guidelines. *Bioanalysis*, Vol. 4, 2012, pp. (2213-2226).

<sup>10</sup> EMA. Guideline on Bioanalytical Method Validation. EMA, Committee for Medicinal Products for Human Use, 2011, London, UK.

<sup>11</sup> Garofolo, F., Michon, J., Leclaire, V., Booth, B., Lowes, S., Viswanathan, C.T., Welink, J. & Desilva, B. Conference Report: US FDA/EMA harmonization of their bioanalytical guidance/guideline and activities of the Global Bioanalytical Consortium. *Bioanalysis*, Vol. 4, No. 3, pp. (231–236).

<sup>12</sup> ISO/IEC 17025, General Requirements for the Compliance of Testing and Calibration Laboratories, 1999.

- 
- <sup>13</sup> Brooks, M.A. & Weifeld, R.E. A validation process for data from the analysis of drugs in biological fluids. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, Vol. 11, 1985, pp. (1703–1728).
- <sup>14</sup> Karnes, S.T., Shiu, G. & Shah, V.P. Validation of bioanalytical methods, *Pharmaceutical Research*, Vol. 8, 1991, pp. (421–426).
- <sup>15</sup> Pachla, L.A., Wright, D.S. & Reynolds, D.L. Bioanalytic considerations for pharmacokinetic and biopharmaceutic studies, *Journal of Clinical Pharmacology*, Vol. 26, 1986, pp. (332–335).
- <sup>16</sup> Rozet, E., Marini, R.D., Ziemons, E., Boulanger, B. & Hubert, Ph. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, No. 55, Vol. 4, 2011, pp. (848–858).
- <sup>17</sup> Ermer, J. Performance Parameters, Calculations and Tests, in: *Method Validation in Pharmaceutical Analysis. A Guide to Best Practice*, Ermer, J., McB. Miller, J.H., 2005, pp. (21–194), WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, ISBN: 3-527-31255-2, Weinheim.
- <sup>18</sup> Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L. & Chavez-Eng, C.M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS. *Analytical Chemistry*, Vol. 75, 2003, pp. (3019–3030).
- <sup>19</sup> Marchi, I., Viette, V., Badoud, F., Fathi, M., Saugy, M., Rudaz, S. & Veuthey, J.-L. Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1217, 2010, pp. (4071–4078).
- <sup>20</sup> Matuszewski, B.K. Standard line slopes as a measure of a matrix effect in quantitative HPLC–MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B*, Vol. 830, 2006, pp. (293–300).
- <sup>21</sup> Dams, R., Huestis, M.A., Lambert, W.E. & Murphy, C.M. Matrix effect in bioanalysis of illicit drugs with LC–MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, Vol. 14, 2003, pp. (1290–1294).
- <sup>22</sup> Mallet, C.R., Lu, Z. & Mazzeo, J.R. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Vol. 18, 2004, pp. (49–58).
- <sup>23</sup> Souverain, S., Rudaz, S. & Veuthey, J.L. Matrix effect in LC–ESI–MS and LC–APCI–MS with off-line and on-line extraction procedures. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1058, 2004, pp. (61–66).
- <sup>24</sup> Theodorsson, E. Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry. *Bioanalysis*, Vol. 4, No. 3, 2012, pp. (305–320).
- <sup>25</sup> IUPAC Technical Report. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 74, 2002, pp. (835–855).

## 8. Sección generalidades: Investigación animal para el desarrollo de nuevos fármacos: reducir, refinar o reemplazar.

Marta Gonzalez-Alvarez<sup>a</sup>, Isabel Gonzalez-Alvarez<sup>a</sup>, Inmaculada Noguera<sup>b</sup>, Marival Bermejo<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Ingeniería. Área de Farmacia y Tecnología. Universidad Miguel Hernández.*

<sup>b</sup> *Departamento Farmacia y Tecnología. Universidad de Valencia.  
España*

### 8.1. Introducción

La evolución y desarrollo de la ciencia está unida desde sus comienzos a la investigación animal. Ya desde tiempos remotos se constató que existía cierta similitud anatómica y fisiológica entre el ser humano y otras especies de animales. Este hecho (junto con la menor presión ética y moral que supone la investigación animal respecto a la investigación con humanos) ha posibilitado y, a su vez, justificado el uso de animales de experimentación como modelo para estudiar la anatomía, fisiología del ser humano así como para determinar los aspectos fisiopatológicos de la enfermedad.

Los primeros ensayos con animales de los que se tiene constancia histórica se remontan al año 450 a.C. cuando Acmaeon de Crotona demostró que el nervio óptico era fundamental para la visión ya que al seccionárselo a un animal se producía ceguera. Posteriormente Aristóteles (384-322 a.C.) sentó las bases científicas de la validez de la experimentación animal con afirmaciones como: “...en muchos casos, los atributos descritos para distintas especies son similares, tanto en el caballo, como en el perro y en el ser humano”, o: “los atributos en muchas especies son idénticos y no se observan diferencias” incluidas en el volumen *Historia animalium*. Diversas escuelas médicas como la de Alejandría, que fue una de las más avanzadas de su época, defendían y practicaban de manera habitual la disección y la vivisección de animales para obtener un mayor conocimiento anatómico y conseguir desentrañar los misterios de la fisiología. Fruto de estos ensayos los médicos allí formados realizaron fueron capaces de describir el corazón, la tráquea, el hígado, las vías biliares y del cerebro. A partir del siglo I la Escuela Romana dedicó notables esfuerzos al desarrollo de la medicina que contribuyeron al nacimiento de la Salud Pública y la constatación de la necesidad de concretar aspectos legislativos para regular el ejercicio de la medicina y la enseñanza de la misma. Esta escuela impulsó también la cirugía debido a la necesidad de tratar a los heridos de guerra lo que supuso a un mayor avance en conocimiento del cuerpo humano y de los distintos órganos. Destacan en esta época Asclepiades de Bitinia, Heráclides de Tarento y Apolonio de Citio pero el más importante fue Galeno (130-210 d.C.), el cual realizó una gran cantidad de disecciones a animales de distintas especies y contribuyó a determinar la función de numerosos órganos como los pulmones o el corazón entre otros, la ruta de vasos sanguíneos así como de completar la información que había en la época sobre los nervios sensitivos y motores entre otras. Aunque no todas sus teorías respecto a la función de órganos fueron correctas, sus aportaciones supusieron un gran avance y una base para el desarrollo de la medicina.

La Edad Media fue una época oscura en todos los sentidos y eso se vio reflejado en el desarrollo de las artes y las ciencias. Cabe destacar en esta época el Código de Breslau, con 35 libros, en



uno de los cuales se describen las disecciones efectuadas en cerdos por ser el “animal más parecido al hombre”.

El renacimiento supuso el resurgimiento del espíritu científico y la aparición de una clase intelectual que impulsó los estudios anatómicos entre otros muchos saberes y, con ellos, el conocimiento del cuerpo humano. Entre otras muchas figuras destacadas aparece el médico Richard Lower (1631-1691) que diseñó y fabricó una serie de utensilios para realizar la primera transfusión de sangre de perro a perro y posteriormente de perro a humano sin éxito en este caso o a Robert Boyle (1627-1691) que demostró utilizando animales que el aire es imprescindible para la vida. La ilustración fue una época de gran efervescencia científica que produjo una gran cantidad de descubrimientos científicos de gran relevancia. A modo de ejemplo se puede mencionar a Antoine Laurent de Lavoisier (1743-1794), que utilizó animales para estudiar el fenómeno de la combustión o a Galvani que realizó grandes progresos en el campo de la electrobiología utilizando ranas como modelo animal. Es en esta época cuando surge, por primera vez, la conciencia social del sufrimiento de los animales y aparecen los primeros grupos de defensa de los animales que se oponen a los defensores estos estudios que encuentran en los animales un camino para ahondar en el conocimiento del ser humano y sus patologías así como para encontrar soluciones a las mismas. En esta época aparecen, como consecuencia del dilema moral, los pioneros de los ensayos *in vitro* de la mano de Lazzaro Spallanzani (1729-1799).

Los siglos XVIII y XIX supusieron un gran despegue a nivel científico y en esta época se hizo un uso indiscriminado de los animales de investigación. A esta época pertenecen grandes personalidades de la historia de la ciencia y de la medicina como Robert Koch (1842-1919) que determinó el origen bacteriano de algunas enfermedades como la tuberculosis, Louis Pasteur (1822-1895) que estudió el origen de las enfermedades contagiosas y realizó grandes aportaciones al acervo científico de la época experimentando las vacunas del ántrax en las ovejas, del cólera en las gallinas y de la rabia en perros. Fue Pasteur el que escribió:

*“Yo siento los sufrimientos de los animales tan intensamente que nunca me he dedicado a la caza o al deporte del tiro. El alarido de una alondra me llegaría al alma, pero cuando hemos de investigar los misterios de la vida o conseguir nuevas verdades, la soberanía del propósito se antepone”*

Paul Ehrlich (1854-1919) estudió enfermedades como la meningitis o la sífilis y contribuyó al desarrollo de la histología con sus tinciones de tejidos con anilina, azul de metileno y otros colorantes. No obstante, su contribución más importante a la medicina (por la que recibió el premio Nobel) fue el establecimiento de las bases de la teoría de la “llave y la cerradura” del sistema inmune por lo que se le considera el padre de la inmunología. En la década de 1890, Ivan Pavlov utilizó perros para realizar su famoso experimento sobre condicionamiento clásico y formuló la ley del reflejo condicional. A finales del mismo siglo, R. Magnus pone en marcha una nueva estrategia experimental que posteriormente alcanzaría gran relevancia y trascendencia: el llamado “baño de órganos”.

En el siglo XX tuvo lugar también una enorme expansión de todas las ciencias experimentales. El número de científicos que realizó aportaciones relevantes a las ciencias médicas gracias a la experimentación animal fue enorme e imposible de recoger en este capítulo. Además del gran avance de las ciencias biomédicas el hecho de poder contar con anestésicos que permiten las experiencias indoloras *in vivo*, ha permitido grandes avances con menos sufrimiento animal. Mención especial merece el científico Rudolf Jaenisch que obtuvo los primeros ratones transgénicos al integrar el ADN del virus SV40 en su genoma. Esta rama de la investigación genética progresó rápidamente. Actualmente es posible estudiar la función de los distintos genes mediante inserción, delección o transposición de los mismos. Además, el desarrollo de animales transgénicos ha permitido obtener modelos animales de distintas patologías humanas.

La realización de pruebas toxicológicas también cobró importancia en el siglo XX. Hasta estas fechas, las leyes que regulaban los ensayos requeridos para la comercialización de los medicamentos eran bastante laxas. De hecho, sólo se podía prohibir la comercialización y uso de un medicamento después de que se demostrara que un producto producía daño en los pacientes. Sin embargo, después de la tragedia ocurrida tras la comercialización del Elíxir Sufanilamida de 1937 en la cual murieron más de 100 pacientes como consecuencia de la presencia de un excipiente tóxico en la formulación, se desarrollaron nuevas leyes más estrictas en cuanto ensayos de toxicidad de los medicamentos en animales antes de que pudieran salir al mercado. En la década de los 60, la tragedia de la Talidomida que resultó ser un fármaco teratogénico y que supuso que miles de bebés nacieran con malformaciones hizo que se elaboraran leyes más estrictas que obligaban a la realización de pruebas en animales preñados antes de que el medicamento pueda ser puesto en el mercado.

Actualmente los experimentos con animales se llevan a cabo mayoritariamente en tres ámbitos: Docencia: las prácticas docentes de las ciencias biomédicas requieren del uso de animales de experimentación para facilitar el proceso de enseñanza-aprendizaje de determinados procesos fisiológicos y sobre todo para desarrollar habilidades en la realización de intervenciones quirúrgicas. El uso de animales para estas prácticas ha sido habitual en estudios superiores pero poco a poco se han ido sustituyendo por alternativas tales como modelos virtuales o modelos pedagógicas que facilitan el aprendizaje minimizando el uso de animales

Investigación médica. La investigación de las bases moleculares de enfermedades graves que afectan al ser humano así como la investigación de la eficacia de nuevas moléculas y la determinación de nuevas dianas terapéuticas requiere el uso de animales de experimentación. Aunque el uso de los animales supone un dilema ético se hace necesario su uso en beneficio de la salud pública pero siempre debe estar completamente justificado su uso y se les debe causar el menor sufrimiento posible. En esto sentido, como se verá a continuación se están realizando un verdadero esfuerzo por disminuir o eliminar completamente el uso de animales desarrollando otras estrategias válidas.

Industria farmacéutica y cosmética. El sector industrial ha utilizado animales para testar la acción y la no toxicidad de sus productos ya que la legislación obliga a la realización de una cierta cantidad de estudios preclínicos antes de aprobar la puesta en el mercado de nuevos fármacos para evitar problemas graves en la etapa de postcomercialización. Los animales de laboratorio se utilizan o han utilizado en distintas fases del desarrollo, producción y control de medicamentos y cosméticos. Sin embargo, existe a nivel ético una importante diferencia entre fármacos y cosméticos aunque en este apartado se hayan presentado juntos. Durante algunas décadas se ha realizado ensayos de toxicidad de cosméticos en animales por ingestión o aplicándolos en los ojos o sobre la piel de los mismos. Actualmente, gracias a la presión social, se están empezando a prohibir este tipo de ensayos para testar cosméticos y se está potenciando el uso métodos de cribado alternativos tanto para fármacos como para cosméticos y de técnicas (modelos informáticos, cultivos celulares..) que permitan reducir el número de animales para realizar los estudios aunque, en última instancia, se debe recurrir al empleo de algunos animales ya que los métodos alternativos no se capaces de reproducir a los organismos vivos en toda su magnitud

## **8.2. Uso de animales en experimentación en el desarrollo de un medicamento**

El uso de animales de experimentación en la investigación biomédica y farmacéutica tiene, como ya se ha comentado, el ambicioso objetivo de realizar avances en el estudio de los procesos fisiológicos del cuerpo humano, determinar las causas de las enfermedades y ayudar a desarrollar tratamientos que sean efectivos y seguros mediante el cribado de moléculas con actividad potencial.

Los animales de laboratorio se han utilizado y se utilizan sobre todo como modelos para investigar la causa y los cambios macro y microscópicos que producen las enfermedades llegando a desentrañar sus componentes moleculares y o genéticos. Una de las estrategias para determinar las bases moleculares de enfermedades es el uso de animales modificados genéticamente o animales a los que se les induce la enfermedad objeto de estudio quirúrgica o farmacológicamente. Estos estudios y ensayos permiten caracterizar la diana o dianas terapéuticas que son imprescindibles tanto para prevenir la aparición de las enfermedades como para diseñar el tratamiento adecuado y específico. Asimismo, se requiere el uso de animales para optimizar el tratamiento de enfermedades que afectan al ser humano y a otros animales.

Sin embargo, existen alternativas para obtener información fiable en parte del proceso. Un buen ejemplo de ello sería la selección de compuestos capaces de interactuar con una diana mediante estrategias computacionales, de manera que el primer cribado ni siquiera necesita sintetizar compuestos. Una vez se ha localizado la familia de compuestos que podrían actuar contra una enfermedad, se sintetizan y se inicia la fase de selección para lo cual hay que contrastar su capacidad de interacción con la diana. De nuevo en este caso se pueden usar modelos *in vitro* o si no se dispone de los mismos hay que recurrir a animales de experimentación.

En la tabla 1 se definen con más detalles los sustratos de la investigación y los objetivos precisos de cada fase.

**Tabla 1** Etapas en el desarrollo de nuevos fármacos

	<b>Preclínica</b>	<b>Fase I</b>	<b>Fase II</b>	<b>Fase III</b>	<b>FDA EMEA</b>	<b>Fase IV</b>
<b>Años</b>	3.5	1	2	3	2.5	<b>Ensayos Post-comercialización</b>
<b>Población de ensayo</b>	In vitro y animales	20 a 80 voluntarios	100 a 300 Pacientes	1000 a 3000 Pacientes	Revisión/ Aprobación	
<b>Propósito</b>	Seguridad y eficacia	Seguridad y dosis	Eficacia y efectos adversos	Verificar eficacia y efectos adversos en uso prolongado		
<b>Grado de éxito</b>	5,000	5			1	

En la fase preclínica se caracterizan los candidatos potenciales a distintos niveles  
 Farmacológico, es decir qué hace la molécula al organismo  
 Toxicológico, para determinar son sus efectos adversos sobre otros órganos  
 Farmacocinético, con el fin de establecer cómo evoluciona temporalmente el fármaco en el organismo, qué niveles alcanza, si se acumula en algún órgano y cuánto tarda en eliminarse

Una vez recabada esta información es posible seleccionar los candidatos más prometedores, diseñar sus posibles formulaciones, establecer la vía o vías de administración más convenientes

y validar y caracterizar perfectamente los métodos analíticos de cada fármaco y sus metabolitos en caso de que los hubiera

Las especies animales utilizadas en la etapa preclínica son las ratas y ratones pero, en ocasiones se utilizan otros modelos animales como conejos, perros, cerdos y monos. En general, el número de candidatos que se ensayan es más pequeño cuánto mayor es el tamaño de la especie utilizada para el ensayo.

Como se observa en la tabla, es en la denominada fase preclínica donde se necesita el empleo de animales de experimentación a fin de establecer la seguridad de la sustancia y su eficacia en modelos animales de la enfermedad.

### **8.3. Aspectos éticos**

El uso de animales en investigación supone la aparición de implicaciones éticas, científicas y sociales. Aunque en la conciencia colectiva hay consenso respecto a los cuidados que deben recibir los animales a nivel doméstico no ocurre lo mismo cuando hablamos en términos de investigación. En este ámbito el dilema es patente debido al indudable beneficio que aportan los animales como reactivos biológicos y ecológicos en investigación para la salud humana a costa del sufrimiento al que se les somete. Cualquier acción experimental llevada a cabo sobre un animal puede llegar a suponer un ataque al estado de bienestar del mismo ya que puede causarle angustia dolor o sufrimiento. Esta cuestión es motivo de polémica y controversia en el ámbito científico y sobre todo fuera de él.

En la conciencia social han planteado reflexiones profundas sobre estos temas con el paso del tiempo:

¿Qué derechos tiene el ser humano para utilizar los animales para experimentar?,

¿Cómo deberían llevarse a cabo los ensayos con animales?

¿Qué actitudes se tiene que tener y qué responsabilidades comporta?

Todos los aspectos éticos referidos al empleo de animales de experimentación con fines científicos, están fundamentados en el principio universal del respeto por la vida, del cual se deriva la evitación de cualquier tipo de dolor o sufrimiento. En contraposición nos encontramos con el beneficio que supone el uso de animales para el avance del conocimiento e incluso con la necesidad/obligación legal de realizar ciertos ensayos con animales para la comercialización de agentes terapéuticos. Estas reflexiones han alcanzado tal impacto social que se exige a los científicos una postura concreta respecto al uso de animales en la experimentación lo cual no siempre es sencillo. La comunidad científica actualmente se inclina por realizar en cada caso concreto un balance entre los beneficios reales que se pretenden obtener y el daño que se puede causar. Se debe realizar en cada proyecto de investigación concreto un estudio exhaustivo con el fin de seleccionar la especie animal más adecuada para cada caso, el menor número de individuos posible que permitan obtener un resultado fiable, válido y útil, los procedimientos más adecuados para el propósito determinado que se persigue y una valoración de las posibles alternativas.

Aunque, como hemos visto en el apartado 1, los animales de experimentación se han utilizado desde tiempos inmemoriales, no es hasta mediados del siglo XIX cuando surgen las primeras dudas morales sobre el derecho que tiene el ser humano a causar sufrimiento a otras especies y el trato que se debe dar a los animales. Este movimiento social se materializó de manera legal en Inglaterra con la Ley de protección de los animales promulgada en 1822 que ofrecía protección al ganado frente a prácticas que revestían crueldad. En 1824, también en Inglaterra apareció la primera organización con conciencia sobre los derechos de los animales y en 1835 se promulgó la Ley de Crueldad contra los animales, ampliada posteriormente con la ley de 1849, con el "Acta de la crueldad hacia los animales" de 1876 y la ley de Protección de los animales de 1911. El

objetivo de todas estas leyes era regular el trato que se le debía dar a los animales así como sentar los fundamentos de la polémica experimentación animal. Estas leyes surgieron por la necesidad de regular un debate que estaba abierto en la sociedad y que llegaba a causar enfrenamientos entre los defensores del uso de animales que realizaban o aprobaban la realización de experimentos con animales entre los que encontraba prácticas cruentas como la vivisección con el convencimiento de que eran necesarios para avanzar en el conocimiento de la fisiología y de la ciencia en general y aquellos detractores (sobre todo antiviviseccionistas) para los cuales el sufrimiento animal y las prácticas crueles no se podían justificar en aras del beneficio humano. Estos detractores defendían su postura, además de por causas éticas y morales, poniendo en duda la calidad y fiabilidad de los resultados obtenidos de tales prácticas así como su extrapolabilidad al ser humano. Los detractores de la investigación animal se organizaron en agrupaciones como Sociedad Americana para la Prevención de la Crueldad hacia los Animales (ASPCA) o Sociedad Americana Antiviviseccionista (AAVS) para aunar esfuerzos en el movimiento anti-viviseccionista. Sus esfuerzos se vieron recompensados ya que en 1959, la propia comunidad científica reconoció la necesidad de regular el uso de animales de experimentación con la publicación del libro "The principles of Humane Experimental Technique" de los investigadores Russell y Burch en la que se invitaba a los investigadores a reflexionar sobre el tema objeto de controversia y se proponían tres posibles estrategias posibles para minimizar el impacto del problema que se conocen como "El principio de las 3R": *reemplazar, reducir y refinar* que se basan en reducir la investigación con animales y, en caso de que fuera necesario realizarla, garantizar que se hacía de la forma más respetuosa posible con los animales. Seguramente, esta publicación supuso un acercamiento entre defensores y detractores del uso de animales de experimentación que culminó con la aprobación en 1966 del "Acta para el bienestar animal de los animales de laboratorio" en la que se reconocen los derechos de los animales entre los que se encuentra recogido el derecho moral a la vida.

Durante la segunda mitad del siglo XX los distintos países fueron elaborando sus respectivas normativas en lo referente al trato que se debe dar a los animales y al uso que se puede hacer de ellos en el campo de la investigación y en otros ámbitos. Las leyes recogen aspectos éticos como la calidad de las instalaciones (espacio, ventilación, iluminación, temperatura), la alimentación de los animales o las buenas prácticas de experimentación (analgesia, anestesia, eutanasia...). Así, por ejemplo, en Febrero del 2013 se promulgó en México la "Ley de Maltrato Animal" que restringe el uso de animales de experimentación a los casos estrictamente necesarios que supongan un indudable beneficio y que no se puedan realizar utilizando otras alternativas y exige la aprobación previa de los ensayos por un comité ético de expertos. En España también se ha promulgado una nueva ley sobre experimentación animal que entró en vigor en Marzo de 2013 y que regula estrictamente el uso de animales en todos los ámbitos descritos anteriormente como investigación, docencia y uso comercial. En esta ley se pormenorizan los procedimientos adecuados para mejorar el bienestar y minimizar el sufrimiento de los animales desde su proceso de estabulación hasta los experimentos propiamente dichos. En esta ley se prohíbe expresamente la experimentación animal para investigación en el campo de la cosmética y la medicina estética.

Además de las leyes promulgadas por cada país algunos organismos internacionales como la Organización Mundial de la Salud y la UNESCO han tomado partido en esta cruzada y han participado activamente en la regulación de la investigación con animales y en la defensa de los derechos de los mismos.

Al margen de la polémica y el dilema moral que sigue despertando la experimentación con animales, se observa un acercamiento y una posibilidad de acuerdo entre la comunidad científica y la opinión pública ya que ambos sectores coinciden en la necesidad de establecer una normativa que proteja a los animales, regule el uso y cuidado de los animales de laboratorio y minimice el sufrimiento.

## 8.4 La regla de las 3 R

Como ya se ha comentado, en el año 1959, Russell y Burch introdujeron en su libro “The principles of Humane Experimental Technique”<sup>2</sup> el lema o principio de las tres R: reducción, refinamiento y reemplazo que ha sido la base de las leyes que se han promulgado para regular el uso de animales de experimentación desde entonces<sup>3</sup>. A continuación se va a describir las implicaciones reales de cada una de estas Rs.

### 8.4.1 Reemplazo

La primera R de Reemplazo se refiere a la sustitución de los animales de experimentación por otros métodos alternativos. Esta R es la que más y mejores resultados está proporcionando respecto al objetivo prioritario de disminuir el número de animales. La investigación en este campo ha sido muy activa en los últimos años debido a la confluencia de varios factores:

El esfuerzo de un gran número de científicos y de grupos de investigación que han dedicado sus esfuerzos al desarrollo de modelos experimentales alternativos con un doble objetivo: evitar el sufrimiento animal “evitable” y obtener datos experimentales fiables ya que, tal y como se venía comentando desde siglos anteriores, se ha constatado que los datos obtenidos a partir de ensayos con animales no siempre son extrapolables a humanos.

Aumento de la conciencia social sobre la necesidad de proteger y defender la vida de los animales como seres vivos sensibles que son y de mejorar el trato que reciben en todos los niveles. En este sentido, el movimiento social en defensa a los animales ha adquirido una gran dimensión y ha realizado una presión social importante en lo que se refiere a minimizar el sufrimiento animal y valorar su vida. Estas corrientes éticas proponen la reducción e incluso la eliminación del uso de animales en áreas donde tradicionalmente se han utilizado como docencia o investigación.

Paralelamente al aumento de la presión social y al concienciamiento de la comunidad científica y de la sociedad en general se ha producido un endurecimiento de las leyes referentes al uso de animales de investigación

Se pueden encontrar en artículos de investigación antiguos y recientes y en la red muchísimas alternativas al uso de animales. Prácticamente todas ellas se pueden agrupar en estos grupos:

#### 8.4.1.1 Técnicas con material insensible

- **Métodos físicos y químicos.** Estas técnicas se basan en el uso de modelos fundamentados en la determinación de parámetros fisicoquímicos (tamaño molecular, lipofilia, pKa...) que permitan predecir el comportamiento *in vivo* de determinadas moléculas.

- **Modelos *in silico*:** El uso de estos modelos implica la implantación de métodos informáticos y computacionales que permitan la predicción de parámetros a partir de bases de datos creadas a partir de datos experimentales previamente obtenidos o publicados. Esta propuesta relativamente novedosa encontró en sus comienzos un cierto escepticismo por parte de la comunidad científica por la dificultad que entraña obtener programas informáticos con capacidad de predicción de los resultados *in vivo* debido a la gran complejidad de los sistemas biológicos. No obstante los resultados obtenidos durante su andadura y sus indudables ventajas han demostrado sobradamente su utilidad. Entre las ventajas de estos métodos encontramos que son baratos (requieren muy poco a ninguna infraestructura), rápidos y se pueden analizar gran número de moléculas virtualmente. Además, los métodos *in silico* se pueden implementar en prácticamente todas las fases de investigación: en un primer paso se puede intentar predecir la actividad potencial de un gran número de moléculas (en base a su estructura y parámetros fisicoquímicos) y hacer una selección racional de aquellas que puedan resultar más atractivas como estudio previo antes de sintetizar

las moléculas. Posteriormente, se puede recurrir de nuevo a los modelos computacionales para predecir parámetros de distinta índole tales como toxicidad, permeabilidad y otros parámetros farmacocinéticos. Se ha comprobado que las herramientas informáticas son capaces de realizar predicciones y obtener datos de fiabilidad comparable a las obtenidas por otros métodos. Lógicamente, la calidad de las predicciones viene determinada por la calidad de la base de datos de partida por lo que, en ocasiones, es necesario recurrir a los ensayos *in vivo* ya que los datos recogidos en la bibliografía son insuficientes. Los modelos computacionales están todavía en sus estadios iniciales por lo que se esperan resultados de mejor calidad que los obtenidos hasta la fecha al ir perfeccionando el software y al ir incorporando elementos que permitan reflejar de manera más real y satisfactoria la compleja fisiología humana

• **Técnicas *in vitro***: Consiste en el uso de fracciones celulares, preparaciones de órganos perfundidos, cultivo de tejidos, cultivos celulares o cualquier otra estrategia que permita obtener información a partir de partes de animales o incluso sin utilizar ninguno. El desarrollo de técnicas alternativas ha alcanzado un gran auge en los últimos tiempos y, como ya se ha comentado, hay gran proliferación de artículos publicados en este sentido y de información en la red sobre métodos alternativos. Es tanta la información disponible que resulta complicado encontrar la alternativa más adecuada para los ensayos que se quieren realizar en cada estudio concreto. Es por ello que aparecen organismos como los Comités éticos compuestos por expertos que pueden asesorar a los investigadores sobre las alternativas adecuadas en cada estudio concreto y bases de datos que organizan la información para facilitar la búsqueda de estrategias concretas. Entre ellas cabe destacar la base de datos noruega NORINA que proporciona información exhaustiva sobre alternativas al uso de animales en los distintos ámbitos que hemos comentado anteriormente como docencia, investigación e industria farmacéutica y cosmética. Esta base de datos incluye mucha información sobre estrategias y técnicas para reducir el número de animales utilizados en docencia como videos de gran calidad o visitas virtuales de gran realismo a través de organismos vivos, utilización de animales muertos por otras causas para el estudio de su anatomía, empleo de modelos de plástico como simuladores, estrategias de experimentación en los propios individuos (extracción de muestras sanguíneas, exploración de constantes vitales...etc) entre otros. Aunque estos modelos alternativos han sido en general bien acogidos y son utilizados por gran parte de la comunidad docente de las ciencias experimentales también tiene detractores que detectan un déficit en calidad del proceso de aprendizaje con estos métodos. Es obvio que, si bien este tipo de métodos supone una gran plataforma de trabajo que permite minimizar el empleo de animales no puede sustituir completamente la experimentación sobre organismos vivos en determinadas áreas en las que se necesario trabajar con animales reales.

Otra web que propone estrategias y alternativas para su empleo en la docencia de las ciencias biológicas y biomédicas (Fisiología, Anatomía, Farmacología, Farmacocinética...) es EURCA (European Resource Center for Alternatives in High Education). Esta web ha conseguido recopilar una extensa relación de técnicas validadas y, además, cada una de las técnicas alternativas propuesta va acompañada de la opinión de distintos expertos que ya la han implantado en sus respectivas universidades o centros de trabajo y proporcionan una opinión realista sobre aspectos prácticos como costes, fiabilidad de los resultados, infraestructura requerida, etc. Estas opiniones recogen también las ventajas e inconvenientes de la estrategia comentada respecto a la práctica tradicional por lo que puede ayudar a los profesores y/o investigadores que buscan la realización de estudios sin uso de animales a elegir la mejor opción según los objetivos fijados.

Otros organismos de interés serían el ICCVAM (The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), que se dedica principalmente a la validación de métodos alternativos que se van presentando en la comunidad científica y la revista ATLA (Alternatives To Laboratory Animals), que publica periódicamente artículos de investigación de grupos que trabajan en el desarrollo de estos métodos

Nuestro grupo de investigación, especializado en el estudio de absorción de fármacos y farmacocinética, ha trabajado activamente en la última década con el fin de sustituir los ensayos

en animales por ensayos *in vitro*. Para ello se han puesto en marcha modelos celulares de barrera intestinal con células tumorales Caco-2 y TC7 y modelos de barrera hematoencefálica cada vez más perfeccionados que permiten correlacionar los resultados obtenidos con los que se podrían obtener *in vivo*<sup>4,5,6</sup>. Además de la considerable reducción del empleo de animales que ello conlleva presenta también la ventaja de ser más adecuado para el análisis simultáneo de un número elevado de moléculas (highthroughput screening) una vez que la técnica se ha validado debidamente. Sin embargo, no todo son ventajas. A pesar de que hay un pensamiento generalizado de que los ensayos *in vitro* son más económicos y sencillos que los ensayos *in vivo* no suele ser así. Los ensayos con cultivos celulares requieren una infraestructura considerable y el mantenimiento de aparatos, condiciones de esterilidad, medios de cultivo, etc hacen que el procedimiento sea caro. En este volumen se dedica un capítulo a la descripción de la realización de ensayos con cultivos celulares en el que se analiza de manera más detallada las ventajas e inconvenientes de esta alternativa.

#### 8.4.1.2 Investigación en sujetos humanos

Esta aproximación se basa en utilizar los estudios epidemiológicos realizados de manera habitual en Salud pública como herramienta para la obtención de información respecto a parámetros fisiológicos, bases moleculares de enfermedades, etc. Se contempla la realización de estudios retrospectivos y de ensayos clínicos que permitan obtener información fiable sobre el desarrollo de distintas enfermedades así como la acción de los fármacos en el organismo. Determinados estudios se realizan a partir de una colaboración activa como los que se llevan a cabo con voluntarios sanos como la confirmación de que determinados cosméticos o productos no causan irritación o reacciones alérgicas en la piel. Pero en muchos de los casos, la participación humana es “pasiva” ya que se emplean datos clínicos de los sujetos enfermos o muestras clínicas que se desecharían igualmente. Incluso en estos últimos casos se evita el uso de muchos animales como, por ejemplo, cuando se emplea de piel que sobra después de una intervención quirúrgica para el estudio la absorción transdérmica de fármacos *in vitro*.

#### 8.4.1.3 Investigación con organismos inferiores

La R de reemplazo también contempla la alternativa de utilizar especies menos evolucionadas que no sean sensibles al dolor al no poseer un sistema nervioso maduro o equivalente al de los vertebrados. Dado que los vertebrados compartimos una gran cantidad de material genético con estos organismos inferiores es posible utilizarlos para estudiar una gran cantidad de procesos. En este sentido se ha utilizado moscas o gusanos en el estudio del envejecimiento, estrés oxidativo, cáncer, muerte celular y estructura genética o enfermedades. De hecho, la primera secuencia genómica de un organismo pluricelular que se determinó fue la del gusano *Caenorhabditis elegans* y la mosca común *Drosophila melanogaster* que contiene cuatro pares de cromosomas se utiliza de manera habitual y con éxito en el estudio de gran número de enfermedades humanas de etiología compleja entre las que se encuentran [Parkinson](#) o [Alzheimer](#).

### 8.4.2 Reducción

La segunda R hace referencia al concepto de Reducir. Reducir se refiere a disminuir el número de animales utilizados en un estudio experimental sin que haya una disminución en la calidad, fiabilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos. La reducción implica utilizar métodos o estrategias para obtener la misma información con menos animales o más información usando el mismo o menor número de animales.



Para llevar esta R a la práctica es necesario optimizar el diseño experimental mediante la realización de un análisis estadístico adecuado. El diseño experimental de un estudio se puede mejorar estudiando de manera exhaustiva las alternativas que permitan obtener más información con menos individuos. Una de las estrategias de optimización del rendimiento de los estudios con animales es el empleo de las técnicas no invasivas entre las que destacan las técnicas experimentales basadas en la imagen. El gran desarrollo de estas metodologías ha permitido reducir en gran medida el número de animales de muchos estudios experimentales sobre todo los estudios de cáncer y actividad de agentes antitumorales en los que se debe determinar la velocidad de crecimiento o reducción de tumores. Con los métodos tradicionales, se debía partir de un gran número de animales que se sometían a un proceso determinado y que se tenían que sacrificar a los tiempos prefijados para estudiar la evolución del tumor. Con las técnicas de imagen es posible realizar un seguimiento del tumor de cada animal mientras está vivo lo cual permite reducir de manera considerable el número de animales de partida. En ocasiones es suficiente con cambiar una estrategia experimental por otra que requiera de menos animales como por ejemplo utilizar grupos experimentales tratados simultáneamente con dosis diferentes por un procedimiento secuencial en el que a cada grupo se le aplica una dosis dependiendo de los resultados obtenidos con el grupo anterior. Esta técnica secuencial supone alargar el estudio en el tiempo pero permite reducir el número de animales empleados.

Otro gran logro de la reducción es la determinación del tamaño de muestra. Este parámetro que carecía de importancia ha cobrado gran importancia ya que un cálculo adecuado del tamaño de la muestra permite reducir el número de animales sin que disminuya la calidad de los resultados obtenidos. En la actualidad, los informes que se deben presentar a los comités éticos deben incluir el cálculo del tamaño de muestra. Estos cálculos se realizan a partir de estudios estadísticos inversos que tienen en cuenta resultados experimentales anteriores de manera que a partir de la mortalidad esperada y de la variabilidad de los resultados en los parámetros objeto de estudio se pueda determinar de una manera racional el número de animales de partida. Existen en el mercado softwares especializados para el cálculo de estos parámetros.

Obviamente, el uso de métodos de cribado previo como los ya mencionados estudios *in vitro* e *in silico* permiten reducir el número de experimentos en animales.

### **8.4.3 Refinamiento**

La tercera R es el refinamiento que se refiere a la preocupación por el bienestar animal a todos los niveles. El refinamiento es el gran logro del siglo XXI ya que la mayor conciencia social respecto al sufrimiento animal ha hecho que se dediquen muchos esfuerzos y recursos a la puesta en marcha de métodos de enriquecimiento y mejora del bienestar animal favoreciendo la promoción del estado de salud física y mental. Se han estudiado los factores que influyen en la calidad de vida de los animales y a su capacidad de sentir y expresar dolor, sufrimiento, angustia y daño duradero para optimizar sus condiciones de vida.

El refinamiento, pues, en el sentido amplio de la palabra consiste en seleccionar las mejores condiciones de vida para los animales y en utilizar los métodos y técnicas que permitan minimizar el sufrimiento, dolor o estrés en el animal utilizado para experimentación. Para refinar se necesitan conocimientos sobre las características físicas, fisiológicas y sociales de los animales, las características de su hábitat, sus técnicas de relación, las técnicas seleccionadas para experimentar con ellos, etc por lo que se hace imprescindible la formación del personal manipulador para garantizar la aplicación de todas las medidas necesarias para promover el bienestar del animal de experimentación.

Estos principios de bienestar no se aplican sólo en la etapa de experimentación sino que tienen que tenerse en cuenta en todas las etapas que se encuentran sometidos los animales de laboratorio: producción, estabulación, mantenimiento, proceso experimental y sacrificio del animal.

La primera consideración para respetar esta R de refinamiento pasa por el compromiso del investigador para evaluar todas las alternativas y seleccionar las técnicas más adecuadas que produzcan menos dolor o malestar y que garanticen, dentro de lo posible, el bienestar de los animales durante la aplicación del protocolo experimental. Además la selección de las técnicas adecuadas debería permitir la obtención de datos más exactos y mayor número de información con menos experimentos de manera que, a efectos prácticos, la aplicación de esta R está íntimamente ligada a la R de reducción ya que generalmente, técnicas más finas implican el uso de un menor número de animales y, a la vez, éstos están sometidos a menos sufrimiento. En este sentido, se apuesta por el empleo de técnicas no invasivas. El grado de invasividad de los procedimientos se clasifica atendiendo a distintos criterios: naturaleza de la técnica, duración y frecuencia del proceso, cambios que se producen en el animal en lo referente a su estado físico, sus necesidades básicas o su relación con el entorno, sistemas biológicos involucrados y/o comprometidos por el empleo de la técnica, nivel de dolor y/o estrés generados en el animal, etc.<sup>78 910</sup>. Para valorar el grado de severidad de un procedimiento se suele aplicar el principio de analogía lo cual supone que los procedimientos que causan dolor o sufrimiento en el ser humano también lo producirán en un animal. La aplicación de este principio es bastante discutible en algunos casos ya que, como ya se ha comentado, la maduración del sistema nervioso así como la expresión de los receptores nociceptivos es diferente en las distintas especies animales empleadas a nivel de laboratorio lo cual dificulta mucho predecir las reacciones de cada especie ante los estímulos dolorosos o estresantes. Es por ello que se han realizado estudios individualizados en las distintas especies de uso habitual en experimentación para clasificar el grado de severidad en distintos niveles (baja, media o alta) que producen ciertos procedimientos experimentales antes, durante o después de su aplicación midiendo parámetros físicos o de comportamiento aunque, por supuesto, esta línea de trabajo continua abierta.

La segunda consideración se refiere a que, junto a la elección de los métodos, se debe reflexionar sobre las especies que van a utilizarse ya que de esta elección depende el número de animales utilizados así como las medidas que deben tomarse para favorecer su bienestar. Debe seleccionarse el método que pueda proporcionar mejores resultados y la especie que sufra el mínimo de dolor, sufrimiento, angustia y daño duradero con el procedimiento seleccionado siempre la especie seleccionada sea permita la extrapolación de los resultados obtenidos a las especies objetivo.

El tercer aspecto para mejorar el bienestar de los animales de experimentación es optimizar sus condiciones de vida en todas las etapas: antes del procedimiento, durante y después de aplicarlo. Las nuevas normativas regulan hasta el detalle todos estos aspectos para garantizar, en la medida de lo posible, el bienestar de los animales.

### **Antes del procedimiento**

Los animales de experimentación nacen ya en los laboratorios. Desde que el animal de experimentación nace se debe procurar que viva en las mejores condiciones posibles. La normativa actual regula las características de la estabulación, los requerimientos de espacio de cada especie, la agrupación de determinadas especies para favorecer la sociabilización y el enriquecimiento ambiental. La figura 1 muestra una fotografía de los racks ventilados que se utilizan para estabular animales en la Universidad de Valencia. Se deben tomar las medidas y precauciones que permitan que cada especie exprese, en lo posible, el comportamiento que presentaría de manera espontánea. El uso de animales con una adecuada socialización, condicionamiento y habituación, además de promover la calidad de vida del animal, redundan en un beneficio para el propio investigador ya que permite realizar los ensayos de manera más cómoda (ya que los animales adaptados se comportan mejor) así como obtener una mejor calidad de los ensayos y de los resultados obtenidos.



*Figura 1 Rack ventilado. SCSIE Universidad de Valencia*

### **Durante el procedimiento**

Además de los aspectos ya comentados respecto a seleccionar la técnica menos invasiva, otro objetivo principal debe ser disminuir la incidencia y severidad de los procedimientos seleccionados en los animales utilizando todas las estrategias y recursos disponibles. La necesidad de valorar los procedimientos de una manera objetiva y precisa ha permitido constatar que las técnicas que se utilizaban tradicionalmente para la evaluación del dolor y del sufrimiento animal presentan muchas deficiencias. Los métodos basados en el principio de similitud permitían extrapolaciones antropomórficas aplicadas sin rigor científico ni sentido crítico. Las investigaciones actuales tratan de validar sistemas de clasificación de dolor y sufrimiento basados en la medición objetiva de parámetros clínicos, índices bioquímicos o fisiológicos de dolor o sufrimiento. La puesta en marcha y validación de métodos fiables de evaluación del dolor permitirá, en un futuro próximo, llevar a cabo una valoración objetiva de los procedimientos que se llevan a cabo con los animales y seleccionar, de este modo, las estrategias más adecuadas para aliviar el dolor y el sufrimiento de cada especie.

En todo procedimiento experimental debemos tener presente el animal debe sufrir el menor grado de dolor posible y también que el dolor es tratable con técnicas de analgesia. Aunque hay investigadores que creen que la administración de anestesia puede afectar a los resultados obtenidos las nuevas corrientes apuntan a que no tratarlo puede afectar más al experimento que la propia anestesia. Por esta razón, la normativa vigente indica que durante el desarrollo del procedimiento se debe aplicar anestesia a los animales con el fin de que el animal no padezca dolor, angustia o sufrimiento intenso. La elección de la técnica de anestesia, el anestésico/s o analgésico/s a utilizar, la vía y modo de administración y la dosis de los mismos, dependerá de factores dependientes del animal utilizado (especie, peso, estado de salud), del experimento (objetivos, duración, grado de severidad) y del manipulador (experiencia y medios de los que dispone). El empleo de técnicas de anestesia no es de elección sino que supone una exigencia legal según las leyes vigentes en la actualidad. La figura 2 ilustra a modo de ejemplo un aparato de anestesia inhalatoria para roedores.



*Figura 2* Aparato de anestesia inhalatoria para roedores. SCSIE Universidad Valencia

Otro aspecto que debería intentar reducirse es la exposición de los animales a los procedimientos que ocasionen un especial sufrimiento o incomodidad en el animal, tales como infecciones experimentales, restricciones hídricas o nutricionales (en cantidad y calidad), deprivación social y/o ambiental o exposición a estímulos adversos (miedo, estrés inducido, etc.). El mismo principio es válido para la frecuencia y las técnicas que se apliquen para procedimientos como la toma de muestras fisiológicas. En este sentido, se prioriza el uso de técnicas de tomas de muestra no invasivas como orina, heces, saliva o pelo. Cuando sea imprescindible utilizar técnicas invasivas para llevar a cabo muestreos seriados, se deben mantener los animales en un entorno lo más cómodo posible y valorar los factores que podrían minimizar el sufrimiento o nivel de estrés. Entre los parámetros a valorar están los volúmenes totales a extraer, el uso de técnicas telemétricas, la implantación de catéteres permanentes siempre con anestésicos y analgésicos apropiados. Otra estrategia útil para algunas especies consiste en entrenar a los animales con anticipación para reducir el miedo asociado a los procedimientos que se les van a aplicar.

### **Después del procedimiento**

El investigador debe adquirir habilidades en el reconocimiento de los signos indicativos del deterioro de la salud del animal y aplicar en ese momento un procedimiento indoloro de eutanasia que minimice el sufrimiento del animal. La eutanasia es un método ético de sacrificio de animales, el cual debe producir un sufrimiento mínimo (dolor, angustia y miedo). Los métodos de eutanasia están en constante cambio y revisión por sus implicaciones negativas en el bienestar animal. La Comisión Europea presenta recomendaciones para la eutanasia de los distintos animales de experimentación. En estas recomendaciones se distribuyen los métodos en tres grupos: 1) permitidos, 2) condicionados o permitidos sólo con animales inconscientes y 3) prohibidos o inaceptables<sup>5,11</sup>.

La última consideración para refinar el uso de animales va dirigida a la formación del personal manipulador. Para poder cumplir con el principio de las tres Rs es necesario tener amplios conocimientos sobre las distintas especies animales, técnicas alternativas de experimentación, características de cada especie, etc. Dado que la mayor parte de los investigadores no poseen todos estos conocimientos se constituyen grupos de expertos para orientar y ayudar a la elaboración de protocolos de actuación lo más éticos posible. No obstante, es imprescindible que las personas que vayan a participar en el estudio con animales posean la capacidad y formación adecuada en el cuidado y manipulación de los mismos, sean capaces de reconocer los indicadores de dolor, estrés y malestar de la especie seleccionada, conozcan adecuadamente los procedimientos experimentales que van a realizar, administren y apliquen cuidados paliativos para

minimizar el sufrimiento y conozcan la legislación vigente al respecto. Por todo ello las autoridades y la propia comunidad científica han considerado imprescindible la creación de un organismo docente competente que garantice la adquisición de unas habilidades y destrezas básicas del personal manipulador en el manejo de los animales de experimentación antes de estar contar con autorización para participar en la realización trabajo experimental con animales. Todo el personal que participe en un proyecto que incluya experimentación con animales de laboratorio debe contar con la acreditación del grado de formación para la actividad que va a desarrollar.

## 8.5 Legislación

Después de siglos de debate y enfrentamientos entre defensores y detractores de la investigación con animales, tanto unos como otros coinciden en la necesidad de regular el uso de animales en experimentación y en la necesidad de que se exija el cumplimiento de las normativas. En este sentido, además de contar con una legislación de la Unión Europea común para todos los países miembro, cada país tiene unas leyes propias, y, en el caso de España, cada Comunidad Autónoma, presentan particularidades propias en sus competencias.

Además de la normativa oficial, algunos aspectos específicos se encuentran en directrices publicadas por sociedades u organismos de carácter científico, algunas veces en colaboración con sociedades protectoras moderadas. Estas recomendaciones no son de obligado cumplimiento pero proporcionan una valiosa información a los investigadores para realizar un mejor uso de los animales y garantizar que éstos reciben los cuidados adecuados. Estas directrices, además, orientan en numerosas ocasiones a los comités éticos de experimentación animal (CEEA) a la hora especificar las exigencias frente a procedimientos concretos que permitan a los investigadores llevar a cabo una práctica más cuidadosa y ética.

Actualmente, los organismos y entidades (públicos y privados) que financian proyectos de investigación también suelen exigir a los investigadores la aportación de garantías del cumplimiento de la legislación (certificados de la formación requerida, informe favorable del organismo competente para el uso de los animales, etc) a la hora de presentar la solicitud. Y muchas revistas científicas se han sumado a esta iniciativa común y exigen a los autores que los procedimientos experimentales cuenten con la aprobación un Comité Ético de Experimentación Animal antes de su publicación. Ambos canales de exigencia son cada vez más habituales.

En general, los aspectos básicos de la legislación vigente se basan en tres pilares fundamentales que todo investigador que desee realizar prácticas con animales debe poseer:

Una formación reconocida que le permita acreditarse ante la autoridad competente.

Unas instalaciones oficialmente registradas donde llevar a cabo el procedimiento experimental

Un procedimiento experimental aprobado por el comité de Ética en experimentación Animal.

A continuación, hacemos un repaso de la legislación (centrándonos en la vigente pero nombrando también la derogada) existente hoy en día a nivel europeo y español.

### 8.5.1 Legislación Europea

La incorporación de España al Consejo de Europa en 1977<sup>12</sup> y a la Unión Europea en 1986, exige la incorporación al cuerpo legislativo común liderado por el Consejo de Europa en todos los campos incluido el referido al uso de animales de experimentación. Las autoridades europeas elaboran Convenios, Acuerdos y Recomendaciones que sirven de plataforma a partir de la cual los estados miembros constituyen su propia legislación en las diferentes áreas de trabajo.

Hay cinco Convenios básicos dedicados al bienestar animal, entre los que se encuentra el Convenio ETS 123 o Convenio Europeo para la protección de animales vertebrados y otros propósitos científicos. Este Convenio se firmó el 18 de marzo de 1986 en Estrasburgo y en España entró en vigor el 1 de enero de 1991. (B.O.E. nº 256 de 25/10/90). Este convenio presenta una normativa general por lo que posteriormente se han concretado y regulado algunos aspectos que no están suficientemente regulados:

\*Resolución sobre la interpretación de ciertas disposiciones y expresiones del Convenio para la protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos, adoptada en Consulta Multilateral el 27 de noviembre de 1992.

\*Resolución sobre la formación y educación de las personas que trabajan con animales de laboratorio, adoptada en Consulta Multilateral el 3 de diciembre de 1993.

\*Resolución sobre instalaciones y cuidados a los animales de laboratorio, adaptadas en Consulta Multilateral el 30 de mayo de 1997.

\*Resolución sobre adquisición y transporte de los animales de laboratorio, adoptada en Consulta Multilateral el 30 de mayo de 1997.

Debido al creciente interés y al aumento de conocimientos acerca de las necesidades de los animales utilizados en experimentación así como la mejora de las técnicas de manipulación de animales surgió la necesidad de modificar diferentes aspectos de la legislación sobre animales de experimentación, sobre todo en lo referente al alojamiento y manejo. Para ello se elaboró y aprobó el Protocolo de Enmienda al Convenio 123 conocido como Convenio 170 que permite que las modificaciones respecto a al alojamiento y manejo de los animales de laboratorio detalladas en los apéndices puedan modificarse por un procedimiento mucho más sencillo y dinámico. Este Convenio se abrió a la firma el 22 de junio de 1998 en Estrasburgo y ha ido entrando en vigor de manera progresiva en los distintos países miembros.

En Octubre de 2010 se publicó la **Directiva 2010/63/UE**,<sup>13</sup> relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Esta Directiva supuso un avance notable para garantizar el bienestar animal. En ella se establecieron normas más detalladas para unificar criterios respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y en otras áreas como educación y formación en ciencias experimentales entre los distintos estados miembros de la Comunidad Europea. Esta directiva favoreció la aplicación aspectos relacionados con la creación, gestión y organización de los Comités de Ética y reguló el empleo de animales modificados genéticamente, animales vertebrados no humanos (entre los que incluyen algunas larvas, fetos de mamíferos en su último tercio de desarrollo y cefalópodos), animales invertebrados y xenotransplantes en la investigación. Esta directiva apuesta clara y decididamente por la implantación de las tres erres: reemplazo, reducción y refinamiento y promovió el uso de métodos alternativos a la investigación animal.

En esta directiva se mencionaban también aspectos relativos a al alojamiento y al cuidado de los animales, y métodos de sacrificio de los mismos y ofrece, además, una clasificación de la severidad de los procedimientos.

## 8.5.2 Legislación Española

La legislación en el ámbito estatal referentes al uso de animales y animales de experimentación incluye hasta la fecha:

La directiva 86/609/CE de la Unión Europea de 1986. (derogada por la entrada en vigor de la **Directiva 2010/63/UE**)

El Convenio ETS 123 del Consejo de Europa de 1986,<sup>14</sup> sobre los animales vertebrados utilizados en experimentación y otros fines científicos, ratificada por España en 1990 y cuya revisión se aprobó en 2006.

El Real Decreto 1201/2005 español sobre protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos (BOE 21 de Octubre de 2005)

La ley de Estado Español 32/2007 de Cuidado de los Animales para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. (B.O.E. 8 de noviembre de 2007

[Real Decreto 53/2013](#), de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia ([B.O.E. 8 de febrero de 2013](#))

[Ley 6/2013](#), de 11 de junio, de **modificación de la Ley 32/2007**, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. (B.O.E. 12 de junio de 2013)

La Directiva 86/609/CE incluyó disposiciones generales para la utilización del animal de experimentación algunas directrices generales sobre las condiciones de alojamiento

El Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos (BOE de 21 de octubre) transpone y desarrolla la Directiva 86/609/CEE y ha estado vigente hasta el 9 de Febrero de 2013. Este Real Decreto reguló muchos aspectos de vacío legal referentes a la optimización del mantenimiento de los animales de experimentación tales como el registro de animales, suministradores y usuarios, las condiciones mínimas de las instalaciones y sobre todo la formación del personal manipulador definiendo cuatro categorías (A, B, C y D) dependiendo de su función en el proceso (cuidador habitual, manipulador, investigador). Estableció la necesidad de la constitución de Comités éticos de bienestar animal en todos los centros de titularidad estatal que evaluara la conveniencia del empleo en los animales de experimentación en los proyectos presentados por los investigadores adscritos al centro así como de la Comisión ética estatal de bienestar animal.

En 2007 se publicó la Ley 32/2007<sup>15</sup> que regula el cuidado de los animales en general, su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. También incluye un cuadro de sanciones a quienes incumplan la normativa. Aunque esta Ley no es específica para animales de experimentación, la Dirección General de Ganadería elabora [periódicamente un informe de ámbito estatal](#) a partir de los datos suministrados por las Autoridades Competentes [respecto al uso de animales para experimentación y otros fines científicos](#).

El [Real Decreto 53/2013](#) supone la traslación de la nueva directiva europea en materia de animales de experimentación ámbito nacional. En él se pormenorizan las condiciones de estabulación, los cuidados que deben recibir los animales y la formación requerida a las personas que van a estar en contacto con ellos en las distintas etapas (criadores, suministradores y usuarios de animales de experimentación) así como la necesidad de la creación de órganos que garanticen el bienestar de los animales en todo momento. Esta normativa se caracteriza por la restricción respecto a las finalidades por la que se pueden utilizar animales de investigación autorizando el uso solo a aquellas que puedan proporcionar claros beneficios, apostando, de esta manera, por el uso, desarrollo y perfeccionamiento de métodos alternativos. Este Real Decreto, de acuerdo con la directiva europea, está inspirado en la filosofía de las tres erres.

Se introducen también modificaciones en las técnicas de control y seguimiento de los proyectos y procedimientos que incluyan el uso de animales vivos para garantizar una mayor transparencia. Los elementos de control consisten en una evaluación previa de los proyectos, una evaluación retrospectiva en algunos casos, y una clasificación de los procedimientos que se van a emplear en función de su grado de severidad.

La Constitución Española contempla un marco autonómico formado por 17 Comunidades Autónomas. Las Comunidades Autónomas tienen competencias sobre distintos aspectos entre los que se encuentran la protección de animales. A continuación se enumeran las leyes aprobadas en cada Comunidad en el tema que nos ocupa.

## **Andalucía**

Ley 11/2003, de 24 de noviembre, de Protección de los Animales. (BOJA nº 237, de 10 de diciembre de 2003).

Decreto 142/2002, de 7 de mayo, por el que se crea y regula el Registro de establecimientos de cría, suministradores y usuarios de animales de experimentación y otros fines científicos. (BOJA nº 55 de 11 de mayo de 2002).

Decreto 199/2005, de 20 de septiembre, por el que se modifica el Decreto 142/2002, de 7 de mayo (BOJA 189).

### **Aragón**

Ley 11/2003, de 19 de marzo, de protección animal, de la Comunidad Autónoma de Aragón. (B.O.A. nº 35, de 26 de marzo).

Orden de 25 de agosto de 1988, del Departamento de Agricultura, Ganadería y Montes, por la que se dictan normas sobre protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos. (BOA de 14 de septiembre de 1988).

Orden de 20 de abril de 2006, del Departamento de Agricultura y Alimentación, por la que se convoca el proceso de homologación para el ejercicio profesional en los centros de experimentación animal y otros fines científicos.

Decreto 239/2008, de 16 de diciembre, del Gobierno de Aragón, por el que se establecen las normas de homologación de los cursos de formación y las de acreditación de las entidades de formación, de los cuidadores y manipuladores de animales, de los adiestradores de los animales de compañía y de los animales potencialmente peligrosos. (BOA 24 de diciembre).

### **Cantabria**

Orden de 2 de febrero de 1989, de la Consejería de Ganadería, Agricultura y Pesca, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. (B.O.C de 20 de febrero de 1989).

### **Cataluña**

Ley 5/1995, de 21 de junio, sobre Protección de los Animales utilizados para experimentación y otras finalidades científicas. (DOGC nº 2073 de 10 de julio de 1.995).

Decreto 214/1997, de 30 de julio, por el que se regula la utilización de animales para experimentación y para otras finalidades científicas. (DOGC nº 2450 de 7 de agosto de 1.997).

Decreto 286/1997, de 31 de octubre, de modificación del Decreto 214/1997, de 30 de julio, por el que se regula la utilización de animales para experimentación y para otras finalidades científicas. (DOGC nº 2518 de 14 de noviembre de 1.997).

Decreto 164/98, de 8 de julio, que modifica el Decreto de 30 de julio de 1997. (DGC de 14 de julio de 1998).

Ley 22/2003, de 4 de julio, de protección de los animales (DOGC 3929, de 16.7.2003, BOE de 8 de agosto). Artículo 24 prohíbe la instalación, en todo el territorio de Cataluña, de granjas, centros de cría o centros de suministro de primates que tengan como objeto su reproducción o comercialización para experimentación animal.

### **Comunidad de Madrid**

Orden de 4 de agosto de 1989 del Consejero de Agricultura y cooperación por la que se dan normas sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. (BOCM de 24 de agosto de 1989).

### **Galicia**

Orden de 15 de septiembre de 2006 por la que se crea el Comité de Bioética de la Consellería del Medio Rural. (DOG de 21 septiembre).

Decreto 296/2008, de 30 de diciembre, de protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, incluida la docencia, y por el que se crea el Registro de los centros de cría, de suministradores y usuarios y la Comisión Gallega de Bienestar de los Animales de Experimentación. (DOG de 16 de enero).

### **Comunidad Foral de Navarra**



Orden Foral de 5 de agosto de 1991, del Consejero de Agricultura, Ganadería y Montes, sobre protección de los animales utilizados en experimentación y fines científicos en la C.F de Navarra (BON del 23 de agosto de 1991).

### **Comunidad Valenciana**

Decreto 13/2007, de 26 de enero, del Consell, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. (DOCV 5439, del 30.01.2007)

### **País Vasco**

Orden de 25 de junio de 1991, del Consejero de Agricultura y Pesca, por la que se dictan normas sobre protección de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos. (B.O.P.V. 136, del 4 de julio).

## **8.6 Los comités éticos**

La aprobación de las leyes que regulan el uso de animales de experimentación conlleva la creación de unos organismos o comisiones competentes que velen por el cumplimiento de la ley en beneficio del bienestar de los animales. Estos organismos están formados por una comisión de experimentación animal y son conocidos como Comités de Ética o Comités Éticos. Su función es valorar la conveniencia de la realización de cada experimento con animales en función de una serie de parámetros sistematizados (cumplimiento de la ley vigente, balance daño/beneficio, grado de severidad de los procedimientos, etc). Para poder ejercer esta delicada tarea de manera apropiada los componentes de estas comisiones deben ser expertos conocedores de los procedimientos de trabajo con los animales, de la legislación y deben ser, asimismo, capaces de evaluar las consecuencias de cada experimento sobre todo en cuanto a bienestar animal se refiere. Suecia fue el primer país en crear estas comisiones seguido por EEUU. En España, desde la aplicación del RD 1201/2005 es necesario que todos los centros usuarios de titularidad estatal posean un comité ético de bienestar animal.

### **8.6.1 Componentes del Comité ético de experimentación animal**

Este comité debe estar integrado como mínimo por tres expertos de reconocido prestigio avalados por su experiencia y que posean los conocimientos necesarios para ejercer la función. Los integrantes mínimos son el especialista en bienestar animal del centro, un investigador del centro ajeno al proyecto que se va a evaluar y una tercera persona que no tenga relación con el centro ni con el proyecto a evaluar para que no exista conflicto de intereses. Cada institución puede incluir más miembros en el comité si lo estima conveniente. Asimismo, los miembros del comité ético pueden solicitar asesoramiento de otros expertos si desconocen algún aspecto importante, si el procedimiento lo requiere o si no hay unanimidad de criterio entre los componentes del comité en la valoración de algún procedimiento.

La normativa interna que gobierna los comités que exige a sus miembros confidencialidad y unanimidad en cuanto a los proyectos evaluados y las decisiones tomadas en cada caso.

### **8.6.2 Funciones del Comité ético de experimentación animal**

Las funciones que deben desempeñar los comités éticos de experimentación animal son múltiples y variadas pero todas ellas giran en torno al objetivo principal de garantizar el bienestar animal. Los componentes del comité deben, en primer lugar, aprobar o denegar la realización de los proyectos presentados por los grupos de investigación adscritos al centro.

Para llevar a cabo esta evaluación los miembros del Comité deben considerar:

- La legalidad del procedimiento descartando los que estén fuera del marco legal (por la especie animal que incluyan o los procedimientos presentados)
- Balance daño-beneficio para valorar la pertinencia de la aprobación del protocolo
- Idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio. El proyecto presentado debe incluir un apartado en el que se indique que se han considerado las posibles técnicas alternativas y las causas por las que no son procedentes en el caso concreto que se evalúa
- Posibilidad de obtener resultados válidos, reproducibles y extrapolables a la población objetivo.
- La correcta realización del análisis estadístico que garantiza que el número de animales propuesto es el menor posible
- La elección de las especies seleccionadas para valorar si son el mejor modelo posible para el proyecto presentado
- La elección de los métodos de analgesia, anestesia y eutanasia seleccionados.
- La formación de los componentes del equipo investigador. La normativa indica que todo el personal que participe en los procedimientos experimentales con animales debe disponer de la certificación oficial acreditativa para realizar las tareas de manejo y manipulación de animales de manera adecuada conveniente.

El Comité ético tiene además autoridad para proponer revisiones y modificaciones de los procedimientos, para suspender los proyectos que no se ajusten a lo aprobado previamente y para establecer programas de inspección periódicos con el fin de detectar deficiencias o irregularidades.

Con el fin de facilitar su tarea evaluadora los Comités éticos elaboran unos protocolos normalizados que los investigadores deben rellenar cuando solicitan la evaluación de cada proyecto. En la Tabla 1 se muestra el Protocolo Normalizado de Procedimiento de la Universidad de Valencia. En este sentido los comités éticos han demostrado ser un elemento útil en la transmisión de las exigencias legales a los investigadores que, en ocasiones, no conocen las normativas con detalle.

*Tabla 1 Protocolo Normalizado de Procedimiento de la Universidad de Valencia*

<p>Código de identificación del procedimiento:  <b><u>MODELO PARA LA COMUNICACIÓN DE PROCEDIMIENTO</u></b>  <b>INVESTIGADOR RESPONSABLE</b>          FECHA RESENTACIÓN.....          FECHA PREVISTA DE INICIO Y FECHA PREVISTA DE FINALIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO.....  <b>1- TITULO DEL PROYECTO</b>  <b>2- OBJETIVOS DEL PROYECTO DE EXPERIMENTACIÓN</b>  <b>3.- IDONEIDAD DE LAS ESPECIES SELECCIONADAS. SU APROVECHAMIENTO.</b>          Indicar especie y raza (o cepa) que se propone utilizar.  <b>4- METODOLOGÍA DEL PROCEDIMIENTO</b></p> <p><u>A. Describir</u>  <u>B. Duración del procedimiento:</u>  <u>C. Ayuno</u>  <u>D. Administración de productos (excepto anestésicos y analgésicos)</u>  <u>E. Toma muestra sanguínea</u>  <u>F. Sufrimiento, dolor y angustia de los animales</u>          F1. Describir en que fases del procedimiento se prevé que el animal puede experimentar sufrimiento, dolor o angustia.          F2. Describir detalladamente el protocolo de supervisión que se utiliza para detectar las situaciones anteriores, indicando:          F3. Medidas correctoras que se han previsto          F4. Criterios de punto final  <u>G Anestesia y analgesia</u>          G1. Anestesia</p>
---

G2. Analgesia

H. Finalización del procedimiento

H1. Técnica eutanásica al finalizar el procedimiento

5.- JUSTIFICACIÓN DEL METODO UTILIZADO frente a otras alternativas posibles.

6.- **ANALISIS PREVISTO DE RESULTADOS**

7.- **PERSONAL DE LA CATEGORÍA C**

8.- **PERSONAL EXPERIMENTADOR**

### 8.6.3 Comisión ética de bienestar animal

Además de los comités éticos propiamente dichos de cada centro existe también otro organismo conocido como **Comisión ética estatal de bienestar animal** que es un órgano adscrito al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Esta Comisión se encarga de asesorar respecto a la legislación vigente que regula el bienestar de los animales utilizados para la experimentación y otros fines científicos, proporciona información sobre el modo de gestionar solicitudes en los centros que están exentos de tener comité ético y sobre las solicitudes de autorización de procedimientos. Además de estas funciones actúa como un órgano de consulta para cualquier cuestión referente al tema en general

Está compuesta por las siguientes personalidades:

- Presidente: Director General de Ganadería del Ministerio de Agricultura, pesca y Alimentación
- Vicepresidente: Director General de Investigación del Ministerio de Educación y ciencia,
- Jefe de Servicio de bienestar Animal de la Dirección General de Ganadería del ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.
- Siete vocales pertenecientes a varios ministerios designados por el Subsecretario del departamento correspondiente que actúan en representación de la Administración General del Estado.
- Un vocal representante de organizaciones no gubernamentales nacionales que vele por la defensa del bienestar animal.
- Un vocal representante de asociaciones profesionales especializadas en animales de experimentación.
- Un vocal representante del Consejo General de Colegios Veterinarios de España.

Esta comisión tiene unas normas de funcionamiento y se reúne al menos una vez cada tres meses.

## 8.7 Conclusiones

Los animales de experimentación son seres vivos que pueden sufrir dolor, estrés o angustia como consecuencia de los procedimientos que se les practican con fines científicos. Nosotros, como seres racionales, debemos implicarnos ética y moralmente e intentar no infligir daño gratuitamente. Los animales de experimentación sólo deberían usarse cuando no haya otra alternativa aceptable (Declaración de Principios). Las leyes al respecto son cada vez más firmes y apuestan firmemente por el “Principio de las tres erres”: Reemplazar, Reducir y Refinar. Este principio se basa en la necesidad de investigar, desarrollar y validar estrategias alternativas al uso de animales en experimentación ya que por un lado, los resultados obtenidos a partir de los animales en ocasiones no son extrapolables a otras especies y por otro lado, en muchas ocasiones existen alternativas más éticas. Pardo Caballo, en su artículo “Ética de la experimentación animal. Directrices legales y éticas contemporáneas” resume muy bien los principios por los que debemos reducir la experimentación animal que se basan en el valor de la naturaleza, el principio de responsabilidad y por último la propia dignidad humana. En los casos en los que no se pueda evitar el uso de animales de experimentación, debemos responsabilizarnos de su bienestar en todo momento utilizando los procedimientos autorizados, cuidándolos debidamente y utilizando técnicas de analgesia, anestesia y eutanasia para minimizar el sufrimiento animal

Otra información de interés

## Legislación referente a los organismos modificados genéticamente

Real Decreto 178/2004, de 30 de enero, por el que se aprueba el Reglamento general para el desarrollo y ejecución de la Ley 9/2003, de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente (BOE 27, 31-01-04).

[Ley 9/2003](#), de 25 de abril, por la que se establece el régimen jurídico de la utilización confinada, liberación voluntaria y comercialización de organismos modificados genéticamente (B.O.E. 26 de abril de 2003). Deroga la Ley 15/1994

Directiva Europea por la que se modifica la Directiva 90/219/CEE relativa a la utilización confinada de microorganismos **OTRA** modificados genéticamente (Directiva 98/81/CEE de 26 de octubre de 1997, D.O.C.E. 5 de diciembre de 1998).

---

<sup>1</sup> Pardo-Caballeros A., “Ética de la experimentación animal. Directrices legales y éticas contemporáneas”. *Cuad. Bioét.* XVI, 2005/3<sup>a</sup>

<sup>2</sup> Russell W.M.S. and Burch R.L., “The Principles of Humane Experimental Technique”, Johns Hopkins University, 1959

<sup>3</sup> Pérez G. Fundamentos del trabajo con animales de laboratorio en proyectos de investigación. Revista del Hospital J.M. Ramos Mejía. Vol XXII, nº3 Edición electrónica, 2007

<sup>4</sup> Mangas-Sanjuan V, González-Álvarez I, González-Álvarez M, Casabó VG, Bermejo M. “[Innovative in vitro method to predict rate and extent of drug delivery to the brain across the blood-brain barrier](#)”. *Mol Pharm.* 2013 Oct 7;10(10):3822-3831

<sup>5</sup> Fernandez-Teruel C, Gonzalez-Alvarez I, Casabó VG, Ruiz-Garcia A, Bermejo M. “[Kinetic modelling of the intestinal transport of sarafloxacin. Studies in situ in rat and in vitro in Caco-2 cells](#)”. *J Drug Target.* 2005 Apr;13(3):199-212.

<sup>6</sup> González-Alvarez I, Fernández-Teruel C, Garrigues TM, Casabo VG, Ruiz-García A, Bermejo M. “[Kinetic modelling of passive transport and active efflux of a fluoroquinolone across Caco-2 cells using a compartmental approach in NONMEM](#)”. *Xenobiotica.* 2005 Dec;35(12):1067-1088.

<sup>7</sup> van de Weerd HA, Baumans V, Koolhaas JM, van Zutphen LF. [Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse.](#) *J Exp Anim Sci.* 1994 Aug;36(4-5):117-127

<sup>8</sup> Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C. “Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission.” *Lab Anim.* 1996 Oct;30(4):293-316.

<sup>9</sup> Townsend P, Morton DB. “Laboratory Animal Care Policies and Regulations” *ILAR J.* 1995;37(2):68-74.

<sup>10</sup> Zimmermann M. “[Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals](#)”. *Pain.* 1983

<sup>11</sup> Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C. “Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission”. *Lab Anim.* 1997 Jan;31(1):1-32.

<sup>12</sup> Consejo de Europa (1986) European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (European treaty series, no 123.)

<sup>13</sup> Unión Europea (2010) **Directiva 2010/63/UE** relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos (DOCE 20-10-2010)

<sup>15</sup> Comisión Europea (2007) Commission recommendation of 18 June 2007 on guidelines for the accommodation and care of animal used for experimental and other scientific purposes (2007/526/EC) OJEU 30.07.2007, L197/1-L197/89

# 9. Correlaciones *in vitro-in vivo*: conceptos generales, metodologías y su aplicación en las guías regulatorias

González-García, I.<sup>a,b</sup>, Mangas-Sanjuán V.<sup>a,b</sup>, Merino-Sanjuán, M.<sup>b,c</sup> and Bermejo M.<sup>a,\*</sup>

*Departamento de Ingeniería, Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Miguel Hernández de Elche.*

*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Valencia.*

*<sup>c</sup>Instituto de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico, Centro Mixto Universidad Politécnica de Valencia-Universidad de Valencia (Spain).*

## 9.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos 5 años, la Agencia Americana del Medicamento (FDA) ha aprobado más de 100 nuevos medicamentos para su comercialización en EEUU<sub>1</sub> y el coste asociado al desarrollo de cada nueva molécula se sitúa por encima de los 1000 millones de dólares<sub>2</sub>, por lo que se ha visto aumentado el interés, por parte de los equipos de investigación, en conseguir una mayor eficiencia en el desarrollo de nuevos medicamentos. La vía de administración más utilizada y económica en el desarrollo de nuevas moléculas es la vía oral, debido a su fácil administración y adherencia al tratamiento. A partir de la década de los 50, se estableció el efecto de la disolución sobre la biodisponibilidad y, por tanto, es posible establecer una relación entre la disolución *in vitro* y los perfiles *in vivo* concentración-tiempo. El desarrollo de este tipo de relaciones *in vitro* e *in vivo*, por tanto, se convierte en una herramienta fundamental en el desarrollo de nuevos medicamentos, debido a un mayor conocimiento de los procesos sobre la disolución del fármaco, lo cual permite una toma de decisiones en el proceso clínico más racional y eficiente. Además, las correlaciones *in vitro-in vivo* (IVIVC) pueden utilizarse como elemento predictor del comportamiento *in vivo*, reduciendo así, cuando sea posible, el uso de voluntarios sanos y evitando dilemas éticos. Ello favorece la reducción de coste y tiempo necesario para que un medicamento alcance el mercado. Por estos motivos, la utilización de las IVIVC ha experimentado un rápido crecimiento en el campo de nuevos sistemas de liberación de fármacos.

Existen numerosos trabajos que explican conceptos y aplicaciones fundamentales de las IVIVC para diferentes formas farmacéuticas<sub>3,4,5,6,7</sub>. Desde las universidades e industria farmacéutica, así como desde los organismos reguladores, las IVIVC han sido utilizadas con diferentes propósitos. De hecho, la FDA publicó en 1997 tres Guías dónde se establecen las condiciones para desarrollar una IVIVC para formulaciones de liberación inmediata<sub>8</sub>, formulaciones de liberación retardada<sub>9</sub> y escalado y cambios post-aprobación: química, fabricación y control, ensayos de disolución *in vitro* y documentación para bioequivalencia *in vivo* para formulaciones de liberación inmediata y retardada<sub>10</sub>. Varios años más tarde, en 2012, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) publicó una Guía titulada: *Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms*, donde se describen las aplicaciones, consideraciones del diseño del estudio clínico y el desarrollo y validación de las IVIVC<sub>11</sub>. Ambas agencias han desarrollado marcos regulatorios que favorecen la utilización de las IVIVC y minimizan la necesidad de estudios de bioequivalencia.

Se pueden encontrar diferentes metodologías matemáticas, las cuales permiten el establecimiento de una IVIVC en función de la calidad de los datos obtenidos y del objetivo deseado. Con el fin de establecer una IVIVC se han utilizado metodologías de una o dos etapas. Wagner, J.G. y

Nelson, E. publicaron en 1963 el primer modelo para estimar la constante de velocidad de absorción a partir de los niveles plasmáticos del fármaco y/o datos de excreción urinaria en un modelo monocompartmental<sup>12</sup>, y en 1967 Loo, J.C. y Riegelman, S. publicaron una solución integral para estimar la constante de velocidad de absorción *in vivo* para un modelo bicompartimental a partir de datos de fármaco en plasma<sup>13</sup>. Además, en los últimos años se han empezado a utilizar métodos de deconvolución modelo-independiente, aunque en menor medida que los métodos desarrollados por Wagner-Nelson y Loo-Riegelman<sup>14</sup>. Sin embargo, se han descrito algunas limitaciones de los métodos en dos etapas frente a los métodos en una etapa, las cuales se explicarán en este capítulo. Dunne, A *et al.* han promovido la implementación y uso de los métodos en una etapa, incorporando los métodos de convolución y ecuaciones diferenciales, ambos también desde una perspectiva poblacional<sup>15,16,17,18,19</sup>.

El principal objetivo de una IVIVC es predecir el comportamiento *in vivo* a partir de datos *in vitro*, como predictor de la biodisponibilidad *in vivo* y para permitir la solicitud de bioexenciones.

## 9.2 DEFINICIONES

Desde el punto de vista matemático, existe una correlación cuando hay una interdependencia entre unos datos cuantitativos o cualitativos o una relación entre una variable medible y una categoría<sup>20</sup>. Desde una perspectiva biofarmacéutica, una buena definición de correlación podría incluir la relación entre características de la liberación *in vitro* y parámetros de biodisponibilidad *in vivo*<sup>3</sup>. La Farmacopea Americana (USP) define una correlación *in vitro-in vivo* como el establecimiento de una relación racional entre una propiedad biológica, o un parámetro derivado de una propiedad biológica y una propiedad físico-química o una característica de la forma farmacéutica<sup>21</sup>. Mientras que la FDA describe las IVIVC como un modelo matemático predictivo de la relación entre una propiedad *in vitro* de un medicamento y una respuesta relevante *in vivo*. Generalmente, la propiedad *in vitro* es velocidad o cantidad de fármaco disuelto o liberado, mientras que la respuesta *in vivo* son concentraciones de fármaco en plasma o cantidad de fármaco absorbido.

## 9.3 APLICACIONES

De acuerdo con lo establecido en las Guías de la FDA y de la EMA<sup>9,11</sup>, las principales aplicaciones de las IVIVC son:

- Cuantificar la liberación *in vivo* del fármaco y los efectos sobre la absorción relacionados con la formulación: el desarrollo y la optimización de una formulación es una parte indispensable del proceso de fabricación y marketing de cualquier medicamento. Los procesos de optimización pueden requerir modificaciones en la fabricación aplicadas a la formulación, y los estudios en voluntarios sanos también pueden necesitar comprobar que la nueva formulación es bioequivalente con la anterior. Sería necesario, por tanto, desarrollar test *in vitro* que garanticen que esos cambios no modifican la biodisponibilidad de las nuevas formulaciones. Además, pueden servir como herramienta en el control de calidad para ciertos procesos de escalado y cambios post-aprobación permitidos en la Guía de la FDA SUPAC-MR<sup>10</sup>. La Guía ofrece las bases para el escalado y cambios post-aprobación sin necesidad de recurrir a los costosos ensayos clínicos de bioequivalencia.
- Establecer las especificaciones de disolución y la relevancia clínica de la disolución *in vitro*: las correlaciones IVIV se utilizan como soporte para establecer especificaciones de la disolución de la molécula. Ellas consisten en establecer un rango de porcentajes de fármaco disuelto para cada tiempo de muestreo. Las especificaciones están diseñadas para representar variaciones aceptables en los porcentajes disueltos, alrededor de una media de un lote referencia, para cada tiempo de muestreo. Estos ensayos de disolución *in vitro* no ofrecen necesariamente información sobre el comportamiento *in vivo* del lote; solamente

comprueban la uniformidad de los lotes producidos en términos de grado de variación con respecto a la media de los lotes referencia<sup>6</sup>.

- **Para solicitar una bioexención:** una vez la IVIVC ha sido establecida, se puede estimar el comportamiento *in vivo* en base a los ensayos de disolución *in vitro*. Posteriormente, procesos de escalado y cambios post-aprobación no requieren de nuevos estudios de bioequivalencia, reduciendo el coste y el tiempo de desarrollo de medicamentos, además de consideraciones éticas. Asimismo, si se establece un IVIVC de una forma de liberación inmediata, modificaciones en el mecanismo de liberación con el objetivo de obtener formulaciones de liberación retardada no requieren de ensayos clínicos. La Guía de la FDA describe extensamente en qué casos una IVIVC puede ser utilizada para la solicitud de bioexenciones<sup>6</sup>. Generalmente, se aceptan fármacos que no presenten estrecho margen terapéutico con dos o más formulaciones y también pueden solicitar aprobación para rangos de dosis nuevos o menores, aunque fármacos de estrecho margen terapéutico también pueden ser aprobados bajo ciertas condiciones. Sin embargo, existen algunas excepciones detalladas en la Guía de la FDA, donde una IVIVC puede no promover la solicitud de bioexención:
  - Aprobación de nuevas formulaciones de una formulación de liberación retardada aprobada cuando la nueva formulación presenta un mecanismo de liberación diferente.
  - Aprobación de un nuevo rango de dosis mayor o menor que las dosis que han demostrado seguridad y eficacia en ensayos clínicos.
  - Aprobación de otro producto de liberación retardada por parte de otro fabricante, incluso bajo el mismo mecanismo de liberación.
  - Aprobación de un cambio en la formulación que incluya un excipiente que no controle la liberación del fármaco y que significativamente pueda afectar a la absorción del mismo.

## 9.4 NIVELES DE IVIVC

En la Guía de la FDA se describen cuatro niveles de correlación<sup>6</sup>, en base a la predicción de las concentraciones plasmáticas frente al tiempo *in vivo* tras una administración de una forma farmacéutica oral<sup>21</sup>.

### 9.4.1 Nivel A de Correlación

Se trata del nivel de correlación más alto y representa una relación punto a punto entre la velocidad de disolución *in vitro* y la velocidad de entrada *in vivo* de un fármaco desde su forma de dosificación<sup>21</sup>. El objetivo de este nivel de correlación es predecir el perfil *in vivo* completo a partir de la curva de disolución *in vitro*. Generalmente, correlaciones lineales son las más habituales y la disolución *in vitro* y la entrada *in vivo* son dos curvas superponibles (relación 1:1) o pueden ser superponibles, gracias a factores de escalado (relación punto a punto). Las correlaciones no lineales son menos frecuentes, pero pueden ser apropiadas de igual manera<sup>3</sup>. Existen en la literatura diferentes métodos para el análisis de datos, aunque como consideración general, todos siguen etapas comunes para el establecimiento de una correlación tipo A<sub>15</sub>: establecer una relación funcional entre las cantidades de entrada y salida, desarrollar un modelo estructural con el fin de relacionar los datos a través de una relación funcional y estimar los parámetros del modelo<sup>22</sup>. Debido a la capacidad predictiva del comportamiento *in vivo* de la forma de dosificación, obtener una correlación tipo A es un excelente elemento en los procesos de control de calidad y pueden ser utilizados como sustitutos del comportamiento *in vivo*. Por tanto, un cambio en el lugar de

fabricación, método de fabricación, proveedor de materia prima, modificaciones menores en la formulación e, incluso, una alteración de la dosis del fármaco con la misma formulación se pueden justificar sin la necesidad de estudios en humanos adicionales.<sup>21</sup>.

## 9.4.2 Nivel B de Correlación

Este tipo de correlación compara un parámetro general del perfil *in vitro* promedio con un parámetro general del perfil *in vivo* promedio.<sup>22</sup>. Aunque una correlación tipo B utiliza todos los datos *in vitro* e *in vivo*, no se considera una correlación punto a punto, ya que sólo un parámetro general *in vitro* es predictivo del comportamiento *in vivo* de un parámetro general. Además, los datos *in vitro* de dicha correlación no pueden utilizarse para justificar comportamientos extremos en los estándares de control de calidad. Por tanto, una correlación tipo B no es predictiva del comportamiento *in vivo* y se trata del nivel más bajo de correlación desde el punto de vista regulatorio.<sup>21</sup>.

## 9.4.3 Nivel C de Correlación

Consiste en una correlación de un único punto entre un parámetro de disolución y un parámetro *in vivo*. Este nivel de correlación no refleja el perfil completo de concentraciones tiempo y, por ello, presenta las mismas limitaciones que las correlaciones tipo B en su capacidad para servir como herramienta predictiva en casos de cambios de producto o lugar de fabricación, así como elemento justificador de comportamientos extremos en los controles de calidad estándares.<sup>21</sup>. Este tipo de correlaciones resulta útil cuando se pretende seleccionar la formulación piloto en las primeras fases de desarrollo clínico, pero no resulta de utilidad para bioexenciones a partir de estudios de bioequivalencia *in vitro*.<sup>2</sup>.

## 9.4.4 Nivel C Múltiple de Correlación

Las correlaciones tipo C múltiple se refieren a la relación entre varios parámetros *in vitro* e *in vivo* a diferentes tiempos de muestreo del perfil de disolución. Debe estar basado en al menos tres puntos diferentes de muestreo de la disolución que cubran las fases iniciales, medias y finales del proceso de disolución. Una correlación tipo C múltiple puede servir como justificante de bioexención, aunque dicha correlación debe estar establecida en todo el perfil de disolución *in vitro* y frente a varios parámetros farmacocinéticos. La relación debe de haberse establecido para cada tiempo del mismo parámetro farmacocinético *in vivo*, de tal manera que se podría evaluar el efecto *in vivo* de cualquier modificación en el proceso de disolución. Generalmente, si una correlación tipo C múltiple es capaz de establecerse, el desarrollo de correlaciones tipo A es igualmente posible.

## 9.5 SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA (BCS)

Los ensayos de disolución son utilizados rutinariamente como control de calidad de las formulaciones desarrolladas y constituyen un componente integral en el proceso de registro de cualquier medicamento. El uso de los ensayos de disolución como índices de control de calidad requiere condiciones sencillas para evitar problemas prácticos, tales como las condiciones analíticas; y para reducir los costes asociados al ensayo experimental. Sin embargo, estos ensayos de disolución pueden aportar información más valiosa del comportamiento *in vivo* de la formulación, gracias al Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, que puede simplificar los



requisitos necesarios e informar de manera más precisa del comportamiento *in vivo* a partir de los datos obtenidos *in vitro*.

EL BCS es un sistema que permite clasificar fármacos en función de su solubilidad y de su permeabilidad intestinal, estableciendo las bases para la justificación de bioexenciones a través de IVIVC<sup>23</sup>. Una bioexención se basa en el permiso para utilizar los ensayos de disolución como predictores de los datos farmacocinéticos, por lo que el ensayo de disolución reemplaza el estudio de bioequivalencia. La permeabilidad y la solubilidad son dos parámetros fundamentales que controlan el proceso de absorción de un fármaco y la BCS clasifica los fármacos en función de estas dos propiedades. La solubilidad se estima disolviendo la dosis más alta en 250 mL de tampón a pH entre 1.0 y 8.0. Fármacos con alta solubilidad son aquellos en los que la dosis más alta se disuelve a cualquier pH. Los fármacos que presentan alta permeabilidad son aquellos cuya fracción oral absorbida supera el 90% o el 85%, asumiendo que el fármaco es estable en el entorno gastrointestinal<sup>9,24</sup>.

El Sistema BCS clasifica los fármacos en cuatro categorías:

- Clase I: alta permeabilidad y alta solubilidad. La disolución del 85% de la dosis del fármaco en menos de 30 minutos garantiza que la biodisponibilidad del fármaco no está limitada por la disolución. En este caso, el vaciado gástrico es el factor limitante del proceso de absorción. Si la disolución es más lenta que el vaciado gástrico, se recomienda establecer el perfil de disolución completo para la formulación.
- Clase II: alta permeabilidad y baja solubilidad. La disolución del fármaco es el factor limitante del proceso de absorción. Por tanto, se recomienda el perfil completo de disolución en diferentes medios de disolución.
- Clase III: baja permeabilidad y alta solubilidad. La permeabilidad es el factor limitante de la absorción del fármaco. La disolución del 85% de la dosis del fármaco debe obtenerse en menos de 15 minutos.
- Clase IV: baja permeabilidad y baja solubilidad. Estos fármacos presentan problemas significativos para la administración oral. Se recomiendan especificaciones de disolución similares que para los Clase II.

El BCS es también muy apropiado para determinar la probabilidad de obtener una IVIVC. Para los fármacos Clase I sería posible establecer una IVIVC si la disolución es más lenta que el vaciado gástrico, pero no si la disolución fuera más rápida. En los Clase II, la disolución *in vivo* es el factor limitante, por lo que es posible establecer una IVIVC. Los medios y las condiciones *in vitro* deben reflejar el comportamiento de la disolución *in vivo*. Para los fármacos Clase III, se puede establecer una IVIVC dependiendo de las velocidades de disolución y de tránsito intestinal. Sin embargo, el grado de correlación dependerá de las características de absorción del fármaco a lo largo del tracto gastrointestinal, como se muestra en la Tabla 2. Para los Clase IA, la solubilidad y la permeabilidad son altas y sitio-independientes, por lo que una IVIVC tipo A podría ser posible. Sin embargo, para los fármacos Clase IB, los cuales presentan una alta permeabilidad sitio-dependiente y con una pequeña ventana de absorción, solo son esperables correlaciones tipo C. Lo mismo ocurre para los Clase II, con los fármacos Clase IIa, es esperable una correlación tipo A, mientras que los Clase IIb, cuya permeabilidad es limitada, no sería posible obtener ninguna IVIVC. En dicha tabla se añade una nueva categoría de fármacos: los Clase V presentan solubilidad y permeabilidad variable y el nivel de correlación dependerá de si el fármaco es una base o un ácido.

**Tabla 1.** Probabilidad de la IVIVC dependiendo de la categoría BCS

Clase	Solubilidad	Permeabilidad	Probabilidad de IVIVC
-------	-------------	---------------	-----------------------

I	Alta	Alta	IVIVC esperado (si la velocidad de disolución es el paso limitante)
II	Baja	Alta	IVIVC esperado
III	Alta	Baja	Pequeña o no IVIVC
IV	Baja	Baja	Pequeña o no IVIVC

**Tabla 2.** Clasificación biofarmacéutica y probabilidad de IVIVC para formulaciones de liberación extendida <sup>3,25,26</sup>

Clase	Solubilidad	Permeabilidad	Probabilidad de IVIVC
IA	Alta y sitio dependiente y sitio independiente	Alta y sitio independiente	IVIVC Nivel A esperado
IB	Alta y sitio independiente	Dependiente de sitio y ventana de absorción estecha	IVIVC Nivel C esperado
Ila	Baja y sitio independiente	Alta y sitio independiente	IVIVC Nivel A esperado
Ilb	Baja y sitio independiente	Dependiente de sitio y ventana de absorción estecha	Pequeña o no IVIVC
Va ácidos	Variable	Variable	Pequeña o no IVIVC
Vb bases	Variable	Variable	IVIVC Nivel A esperado

## 9.6 EVALUACIÓN DE LA PREDICCIÓN DE LAS IVIVC

Una vez se haya establecido la IVIVC, el último paso antes de utilizarla como predictor del comportamiento *in vivo* es evaluar su predicción. Generalmente, ello se determina a través del error de predicción que se calcula con ayuda de las propiedades observadas *in vivo* y el valor estimado de la propiedad *in vivo*. El objetivo de la evaluación de la IVIVC es determinar la magnitud del error de predicción de la biodisponibilidad *in vivo* a partir de los datos de disolución *in vitro*.

### 9.6.1 Validación interna

La validación interna consiste en evaluar los errores de predicción después de comparar los parámetros observados *in vivo* utilizados para desarrollar la IVIVC frente a los parámetros predichos *in vivo* obtenidos a partir de la IVIVC. El % de error de predicción se calcula con la siguiente ecuación:

$$\%EP = \frac{(\text{Parámetro Observado} - \text{Parámetro Predicho})}{\text{Parámetro Observado}} \cdot 100 \quad (1)$$

De acuerdo con las Guías de la FDA y la EMA, el % de error de predicción medio absoluto de todas las formulaciones debe ser inferior al 10% y el % de error de predicción individual de cada formulación no debe superar el 15%.

### 9.6.2 Validación externa

La validación externa se utiliza para evaluar la habilidad de las IVIVC para ser utilizadas como sustitutos del ensayo de bioequivalencia. Se lleva a cabo con un nuevo conjunto de datos que no hayan sido utilizados para desarrollar la IVIVC. El error de predicción (%) se calcula

comparando los parámetros observados del nuevo conjunto de datos con los parámetros predichos a partir de la IVIVC, tal y como se detalla en la Ec. 1. De acuerdo con las Guías de la FDA y la EMA<sup>9,11</sup> los errores de predicción situados por debajo del 10% indican buena capacidad predictiva de la IVIVC, errores de predicción entre el 10-20% señalan una capacidad no conclusiva y necesitan de estudios adicionales y errores de predicción superiores al 20% implican baja o mala capacidad predictiva. Aunque la EMA insiste en la aplicación de la validación externa como evaluación final de la IVIVC, la FDA no exige validación externa si la IVIVC ha superado con éxito la validación interna<sup>9,11</sup>.

## 9.7 RECOMENDACIONES DE LAS AGENCIAS REGULATORIAS SOBRE LAS IVIVC

La Guía titulada “*Extended release oral dosage forms: development, evaluation and application of in vitro/in vivo correlations*” publicada por la FDA en septiembre de 1997 fue la primera guía sobre IVIVC por parte de una agencia regulatoria de impacto mundial. En octubre de 2012, la EMA publicó la Guía titulada “*Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms*”. Ambas incluyen numerosas recomendaciones sobre aspectos fundamentales para desarrollar una IVIVC, desde conceptos generales sobre los niveles de IVIVC aceptados, modelos matemáticos recomendados para establecer una IVIVC y consideraciones sobre la validación de la IVIVC, hasta aspectos sobre el número de individuos o vasos necesarios *in vivo* e *in vitro*, el número y características de las formulaciones y las condiciones de los ensayos de disolución, entre otros. Las recomendaciones más relevantes están resumidas en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Comparación entre las guías de la EMA y FDA. Nd: No descrito

	FDA	EMA
General	Nivel de correlación: A o C múltiple	Nivel de correlación: A
	Se requieren métodos en dos etapas	Sugiere los métodos en dos etapas como una aproximación exploratoria y utilizar los métodos en una etapa para establecer finalmente la correlación
	Se necesitan al menos dos formulaciones	
In vivo	Voluntarios sanos	
	de 6 a 36 sujetos en el estudio <i>in vivo</i> de BE	≥ 12 sujetos en el estudio <i>in vivo</i> de BE
In vitro	En ayunas	
	Preferiblemente aparato tipo I o II	Nd
	pH < 6.8	Nd
	12 formas de dosificación para el ensayo de disolución <i>in vitro</i>	Nd

Aunque la FDA y la EMA recomiendan al menos dos formulaciones con diferentes velocidades de liberación para poder desarrollar una IVIVC, la mayoría de los trabajos publicados utilizan tres formulaciones (lenta, media y rápida). Además, desarrollar una IVIVC utilizando tres o más formulaciones aporta mayor robustez y precisión y por tanto, pueden esperarse mejores resultados en la validación externa.

En las formulaciones de liberación modificada, los excipientes que controlan la liberación de la formulación deben ser idénticos o muy similares, con el fin de poder establecer una IVIVC. Se recomienda que los ensayos de disolución se obtengan en diferentes condiciones experimentales para evaluar cómo la disolución puede afectar a la liberación del producto. Respecto a los aspectos propios de la evaluación, los datos *in vitro* con menor error de predicción son los más bio-indicativos, en base a la IVIVC<sub>3</sub>.

## 9.8 FACTORES QUE AFECTA A LA DISOLUCIÓN DEL FÁRMACO

Tal y como se menciona anteriormente, la absorción del fármaco desde una forma de dosificación oral es un proceso que engloba principalmente tres procesos: liberación del fármaco de la forma farmacéutica, disolución del fármaco en las condiciones fisiológicas y la permeabilidad del mismo a través de la barrera gastrointestinal. El comportamiento *in vivo* es muy dependiente de los dos primeros procesos. Debido al hecho de que la disolución *in vitro* puede servir como indicador del comportamiento *in vivo*, se requieren ensayos de disolución más rigurosos y precisos<sub>24</sub>. Además, entre las aplicaciones de los ensayos de disolución *in vitro* para el desarrollo de medicamentos está evaluar la calidad de los lotes del producto, favorecer el desarrollo de nuevas formulaciones, y garantizar la calidad continuada del producto y su comportamiento tras ciertos cambios, tales como cambios en la formulación, en el proceso de fabricación, en el lugar de fabricación y en el escalado durante el proceso de fabricación<sub>9</sub>. Para comparar los factores que afectan al proceso de disolución *in vitro-in vivo*, se debe analizar la ecuación de Noyes-Whitney:

$$\frac{dQ}{t} = \frac{A \cdot D}{h} \cdot (C_s - C_b) \quad (2)$$

Donde  $dQ/dt$  representa la velocidad de disolución, A es el área de la interfaz entre el fármaco y el solvente, D es el coeficiente de difusión, h es el espesor de la capa entre el solvente y el fármaco,  $C_s$  es la concentración de la sustancia en la superficie y  $C_b$  es la concentración de la sustancia en el solvente. En el caso de que la disolución esté limitada por la difusión,  $C_s$  es igual a la solubilidad de la sustancia. La relación entre estos parámetros, las condiciones fisiológicas y las condiciones *in vitro* se resumen en la tabla 4<sub>27</sub>.

**Tabla 4.** Propiedades fisicoquímicas, variables fisiológicas y factores *in vivo* que influyen a los parámetros de la ecuación de Noyes-Whitney (Eq. 2)

Parámetros	Propiedades fisicoquímicas	Variables fisiológicas	Factores <i>in vitro</i>
A	Tamaño de partículas	Presencia de tensioactivo	Presencia de tensioactivo
h		Motilidad gastrointestinal	Hidrodinámica del medio
D	Volumen y peso molecular	Viscosidad de los fluidos intestinales	Viscosidad del medio
$C_s$	Hidrofilia	pH, tensioactivos	pH, tensioactivos
$C_b$		Volumen intestinal de las secreciones	Volumen del medio

La velocidad de disolución es directamente proporcional a la superficie disponible. El tamaño de partícula y la capacidad humectante del líquido determinan dicha superficie. Para compuestos hidrofóbicos, con baja capacidad humectante, la presencia de tensioactivos en el tracto gastrointestinal puede facilitar su humectabilidad, reduciendo el ángulo de contacto sólido-líquido y, por tanto, la velocidad de disolución aumenta. Este factor fisiológico puede ser reproducido en los ensayos de disolución *in vitro* introduciendo tensioactivos en el medio.

El espesor de la capa adyacente depende de las condiciones hidrodinámicas en el tracto gastrointestinal, las cuales están también influenciadas por la velocidad de flujo, motilidad y factores de mezclado. En este caso, es más complicado obtener un sistema *in vitro* que sea capaz de reproducir las condiciones *in vivo*, aunque el aparato de celda de flujo es una buena aproximación.

Factores como la temperatura, el radio molecular y la viscosidad del medio determinan la difusión del fármaco. La solubilidad del compuesto depende de características físico-químicas, pero puede cambiar por la presencia de tensioactivos y/o cambios en el pH del líquido intestinal. Para fármacos de baja solubilidad, la adición de tensioactivos (por ej. 1% de lauril-sulfato sódico) puede ser adecuada<sup>9, 28, 29</sup>. La solubilidad del fármaco también puede verse incrementada al solubilizar el fármaco en micelas de sales biliares e incrementando la ionización de la molécula, lo cual puede ser simulado *in vitro*. Sin embargo, la adición de enzimas, sales y tensioactivos debe estar adecuadamente justificada<sup>9</sup>.

En general, se prefieren medios acuosos para los ensayos de disolución<sup>9,21</sup>. En las Guías de la USP y FDA, las recomendaciones acerca del pH difieren ligeramente<sup>9,21</sup>. Habitualmente, las agencias aceptan el agua como medio<sup>9,21</sup> o soluciones tamponadas que no excedan un pH de 6.8 como medio inicial para desarrollar una IVIVC<sup>2</sup>. Tal y como recomienda la USP, el agua deuteriada, una solución tamponada (generalmente a pH entre 4 y 8) o soluciones ácidas diluidas (0.001 a 0.1 N) son más deseadas como medios de disolución para sistemas de liberación modificada<sup>21</sup>. Por otro lado, sistemas no acuosos o hidro-alcohólicos han de ser justificados para establecer IVIVC<sup>9,21,28,29</sup> y otras condiciones de ensayo extremas (pH>8) también deben estar justificadas<sup>9</sup>. La concentración disuelta es la fuerza motriz que favorece la disolución del compuesto y está también relacionada con la permeabilidad del compuesto. Por ello, fármacos de alta permeabilidad pueden presentar condiciones de alto gradiente. Por otro lado, el volumen de fluidos en el tracto gastrointestinal se modifica a lo largo del recorrido, así como las condiciones de ayuno o comida pueden modificarlos, lo cual dificulta la reproducción *in vitro* del proceso de disolución *in vivo*. Con el fin de simular el fluido intestinal o gástrico, se requieren de medios de disolución con pH de 6.8 y 1.2, respectivamente<sup>30</sup>.

Las Guías de la FDA y la EMA describen cuatro tipos de aparatos de disolución: cestillo rotante (Aparato 1), método de paletas (Aparato 2), cilindro oscilante (Aparato 3) y celda de flujo (Aparato 4)<sup>21,29</sup>. Las recomendaciones iniciales incluyen el uso de los dos primeros métodos, más sencillos y fáciles de manejar, antes de usar los otros, salvo que no muestren resultados satisfactorios<sup>29</sup>. La principal aplicación del Aparato 3 ha sido determinada para formas farmacéuticas de perlas con sistemas de liberación modificada, mientras que el Aparato 4 ofrece ventajas para sistemas de liberación modificada que incluyan algún ingrediente con una solubilidad muy limitada. El Aparato 5 (paletas sobre disco) y Aparato 6 (cilindro) han demostrado utilidad para evaluar formas farmacéuticas transdérmicas<sup>21</sup>.

La velocidad de agitación puede ser un factor crítico en la disolución *in vitro*, ya que tiende a ser menos discriminativo a altas velocidades. Por ello, si se selecciona el método de cestillo, la agitación habitual es 50-100 rpm, con la paleta 50-75 rpm y 25 si se trata de una suspensión<sup>9,21,31</sup>.

Se deben seleccionar 12 formas farmacéuticas para determinar los perfiles de disolución *in vitro* para poder establecer una IVIVC. Del mismo modo, los tiempos de muestreo deben estar repartidos a lo largo del ensayo para garantizar la caracterización del perfil de disolución completo. El coeficiente de variación de los perfiles de disolución promedios de un único lote debe ser inferior al 10%.

Con el fin de comparar los perfiles de disolución, los métodos matemáticos modelo independiente del factor de diferenciación (f1) y el factor de similitud (f2) son los más recomendados<sup>32,33</sup>. La principal diferencia entre ellos es que el método f1 se centra en las diferencias entre los perfiles, como una medida del error relativo entre las dos curvas, mientras que el método f2 es una

transformación recíproca logarítmica cuadrática de los errores al cuadrado y es una medida de la similitud en los porcentajes de disolución entre dos curvas. Generalmente, valores de  $f1$  hasta 15 (0-15) y valores de  $f2$  superiores a 50 (50-100) garantizar equivalencia de las dos curvas.

$$f1 = \left\{ \frac{[\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|]}{[\sum_{t=1}^n R_t]} \right\} \cdot 100 \quad (3)$$

$$f2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \left( \frac{1}{n} \right) \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \right\} \cdot 100 \quad (4)$$

Donde  $n$  es el número de tiempos de muestreo,  $R_t$  es el valor de la disolución del lote de referencia a tiempo  $t$  y  $T_t$  es el valor de la disolución del lote test a tiempo  $t$ .

Habitualmente, se debe utilizar para establecer una IVIVC una metodología de disolución que sea capaz de discriminar entre dos formulaciones de estudio con diferentes mecanismos de liberación y que refleje mejor el comportamiento *in vivo*. Por tanto, idealmente debe replicar no sólo el medio gastrointestinal, sino también el sistema hidrodinámico. Sin embargo, el movimiento del fármaco a lo largo de tracto gastrointestinal es difícil de simular *in vitro*. Una vez se haya obtenido un sistema discriminativo, las condiciones de disolución deben ser las mismas para todas las formulaciones evaluadas en el estudio para desarrollar la IVIVC. Se puede encontrar una información amplia y detallada sobre los factores que afectan al proceso de disolución en la revisión publicada por Kostewicz et al.

## 9.9 METODOLOGÍAS

Tal y como se ha descrito en la sección anterior, una IVIVC debe predecir los perfiles *in vivo* a partir de los datos *in vitro*. Existen diferentes aproximaciones matemáticas para establecer una IVIVC y pueden clasificarse en dos clases, tal y como se describen en las Guías de la FDA y la EMA.

- Métodos en Dos Etapas
  - Métodos modelo dependiente
    - Wagner-Nelson
    - Loo-Riegelmann
  - Métodos modelo independiente
    - Deconvolución por transformadas de Laplace
    - Deconvolución por ajustado de los perfiles experimentales
    - Deconvolución por Punto-Area.
- Métodos en Una Etapa
  - Métodos de convolución
  - Métodos de ecuaciones diferenciales

### 9.9.1 Métodos en dos etapas

Estos son los métodos más utilizados y requeridos por la FDA para establecer una IVIVC. Se basan en una aproximación en dos etapas. En la primera, se utiliza el método de deconvolución para estimar la absorción *in vivo* o la disolución en el tiempo (por ej. Fracción absorbida frente tiempo). En la segunda etapa, se establece un modelo de unión entre los perfiles de absorción *in*

*vivo* y la liberación o disolución *in vitro*. Posteriormente, se predicen las concentraciones de plasma a partir de los datos de liberación *in vitro* utilizando el modelo de unión.

Estos métodos son únicamente aplicables a sistemas lineales. Se considera un sistema lineal cuando cumple los siguientes requisitos: invarianza en el tiempo y superposición. La principal diferencia entre los métodos modelo independiente y modelo dependiente es que los primeros no asumen un modelo cinético previo sobre la disposición del fármaco, mientras que Wagner-Nelson y Loo-Riegelmann asumen modelos farmacocinéticos monocompartimental o bicompartimental, respectivamente.

### 9.9.1.1 Wagner-Nelson

El método de Wagner-Nelson sólo puede aplicarse a fármacos monocompartimentales. Se basa en el balance de masas. El balance de masas no asume ningún modelo cinético previo, pero obviamente el diagrama dibujado por el método de Wagner-Nelson será diferente dependiendo de la cinética de absorción del compuesto. La ventaja de este método es que los cálculos se pueden realizar a partir de las curvas plasmáticas tras una administración oral sin necesidad de una administración intravenosa, ya que se basa en la premisa de que la constante de velocidad de eliminación se puede obtener a partir de la fase terminal de la curva oral. Sin embargo, en caso de que haya flip-flop, es decir, cuando la constante de velocidad de absorción es el paso limitante en el proceso de eliminación y, por tanto, la fase terminal de la curva represente la constante de velocidad de absorción, será necesaria la administración intravenosa para poder determinar la constante de velocidad de eliminación. Obviamente, se asume que no existen variaciones relevantes entre las cinéticas de disposición en las dos administraciones por cada sujeto.

$$F_{abs} = \frac{A_t}{A_\infty} = \frac{C_t + k_{el} \cdot AUC_0^t}{k_{el} \cdot AUC_0^t} \quad (5)$$

Ecuación 5 La ecuación de Wagner-Nelson representa la fracción absorbida de la dosis biodisponible a tiempo  $t$ .

### 9.9.1.2 Loo-Riegelman

El análisis de datos por Loo-Riegelmann se aplica para fármacos bicompartimentales y es necesario tener en cuenta para el balance de masas la cantidad de fármaco en el compartimento periférico.

$$P_t = k_{12} \cdot e^{-k_{21} \cdot t} \cdot \int_0^t C \cdot e^{k_{21} \cdot t} \cdot \partial t \quad (6)$$

$$P_t = P_{t-1} \cdot e^{-k_{21} \cdot \Delta t} + \frac{k_{12}}{k_{21}} \cdot C_{t-1} \cdot (1 - e^{-k_{21} \cdot \Delta t}) + \frac{k_{12}}{2} \cdot \Delta C \cdot \Delta t \quad (7)$$

La ecuación 6 es la solución exacta de la ecuación de Loo-Riegelman que fue publicada en <sup>37</sup> y ecuación 7 es una solución aproximada que se puede utilizar cuando los intervalos de muestreo son cortos y siempre que los cambios entre las concentraciones entre dos puntos de muestreo sigan una función lineal.

## 9.9.2 Métodos de deconvolución modelo-independiente

Estos métodos de deconvolución no asumen ningún modelo cinético para la disposición del fármaco. La deconvolución se aplica en sistemas lineales, esto es, la integral de convolución es la definición matemática de un sistema lineal.

Para poder entender mejor estos métodos, todos los términos deben ser definidos. Un sistema está caracterizado por una entrada o pulso (que corresponde a la zona de absorción) y una respuesta, considerando respuesta como la variable que se mide debido al impulso.

La función de entrada más importante es el impulso unitario. En términos matemáticos es conocida como la función ( $\delta$ ). Un bolus intravenoso es una buena aproximación o descripción de un impulso unitario. La respuesta se denomina función respuesta al impulso unitario o  $C_\delta \cdot T$

La respuesta al impulso unitario es el resultado de un impulso dividido por su magnitud. En términos prácticos es el perfil concentración-tiempo obtenido por una administración de un bolus intravenoso dividido por la dosis<sup>38,39</sup>.

$$C(t) = \int_0^t f(\tau) \cdot C_\delta \cdot (t - \tau) \cdot d\tau \quad (8)$$

La ecuación 8 muestra la integral de convolución donde C es la concentración de fármaco a tiempo t,  $C_\delta$  es la respuesta al impulso unitario, y f es la velocidad de disolución.

La deconvolución puede ser empleada para estimar una función de entrada dada la correspondiente respuesta del sistema y la respuesta al impulso unitario del sistema. La respuesta al impulso unitario tiene que ser obtenida a través de la administración de una formulación de referencia. Habitualmente consiste en la administración de una formulación intravenosa, pero soluciones orales o de liberación inmediata también pueden utilizarse.

A continuación, se presentan los tres procesos matemáticos para la deconvolución.

### 9.9.2.1 Deconvolución de las transformadas analíticas de Laplace

Las transformadas de Laplace simplifican la resolución de la integral de convolución. Para convolver dos funciones:

1. Se debe determinar la transformada de Laplace de cada función.
2. Se multiplican las funciones transformadas.
3. Se calculan la inversa de las transformadas.

Por ello, la convolución de dos funciones es el producto de la inversa de las transformadas de Laplace en el dominio de Laplace. A continuación se muestra un ejemplo:

Transformada de Laplace de la función entrada  $f(t)$  y la respuesta al impulso unitario  $C_\delta$ :

$$f(t) = F \cdot D \cdot k_a \cdot e^{-k_a \cdot t} \rightarrow l[f(t)] = \frac{F \cdot D \cdot k_a}{(s + k_a)}$$

$$C_\delta(t) = \frac{1}{D} \cdot \frac{D \cdot e^{-k_{el} \cdot t}}{V_d} \rightarrow l[C_\delta(t)] = \frac{1}{V_d \cdot (s + k_{el})}$$

Producto de las transformadas y la función anti-transformada para obtener la expresión de la función respuesta:

$$l[f(t)] \cdot l[C_\delta(t)] = \frac{F \cdot D \cdot k_a}{V_d \cdot (k_a - k_{el})}$$



$$l^{-1} \left[ \frac{F \cdot D \cdot k_a}{V_d \cdot (s + k_a) \cdot (s + k_{el})} \right] = \frac{F \cdot D \cdot k_a}{V_d \cdot (k_a - k_{el})} \cdot (e^{-k_{el} \cdot t} - e^{-k_a \cdot t})$$

### 9.9.2.2 Deconvolución por ajustado de los perfiles

Teniendo en cuenta que la función de entrada es una función de  $p$  parámetros, la deconvolución se transforma en un problema de regresión en el cual los parámetros se estiman por regresión no lineal. Si la función de entrada se considera una función exponencial, su convolución con la respuesta al impulso unitario es la función de Bateman.

### 9.9.2.3 Deconvolución Punto-Area

En esta aproximación, la principal asunción es que en un corto intervalo de tiempo, la función de entrada es constante, por lo que se puede utilizar la ecuación integrada:

$$R_n = \frac{C_n - \sum_{i=2}^n R_{i-1} \cdot AUC_{\delta n-i+1}^{n-1+2}}{AUC_0^1} \quad (9)$$

La ecuación 9 utiliza las concentraciones orales y las áreas bajo la curva (AUC) de la respuesta al impulso unitario. Tras el cálculo de las velocidades de las sucesivas funciones de entrada, si cada velocidad se multiplica por su intervalo de tiempo, se obtienen las concentraciones acumuladas y sus residuales.

Es importante señalar que la fracción biodisponible también se puede obtener mediante los métodos Wagner-Nelson y Loo-Riegelman. Por los métodos de deconvolución, la función *in vivo* obtenida depende de la referencia utilizada durante el proceso de deconvolución.

Si se considera una administración intravenosa, la respuesta al impulso unitario del Sistema corresponde con la disposición del fármaco y, entonces, la función entrada incorpora todos los procesos de la absorción, disolución y primer paso. En el caso de una solución oral, la respuesta al impulso unitario incluye la absorción y el primer paso, por lo que por deconvolución, la función entrada corresponde a la disolución y a la velocidad de liberación. Si la referencia es una forma de liberación inmediata, la respuesta al impulso unitario incorpora la disolución desde la forma farmacéutica, por lo que la función entrada representa la liberación del fármaco.

Con cualquiera de los métodos anteriormente descritos, se puede obtener el perfil de absorción *in vivo*. A continuación es necesario establecer la correlación *in vitro-in vivo*, es decir, la función matemática que relaciona la disolución *in vitro* con los datos de absorción *in vivo*. En una segunda etapa, el objetivo es predecir las concentraciones de plasma a partir de los datos *in vitro*. Las fracciones disueltas predichas *in vivo* tienen que ser deconvueltas con los estimados finales de los parámetros farmacocinéticos obtenidos por los datos de la referencia para calcular los perfiles de concentración plasmática<sup>15</sup>.

## 9.9.3 Métodos de convolución

Los métodos de convolución se basan en modelos en una sola etapa, en el cual directamente se relaciona la liberación *in vivo* con la liberación *in vitro*. La ecuación sobre la cual giran todas estas aproximaciones reside en la integral de convolución<sup>39,40</sup>. Las bases y las ecuaciones de este método han sido descritas con detalle en varias publicaciones<sup>40</sup>. Para estos métodos, una formulación de referencia puede ser apropiada, pero la correlación puede desarrollarse sin estos

datos. La ventaja frente a los métodos en dos etapas es que la relación entre la liberación *in vitro* y las concentraciones de fármaco en plasma se establecen en un solo paso, por lo que el modelado puede centrarse en la capacidad predictiva del comportamiento *in vivo*<sup>39, 41</sup>.

En este contexto, el principal objetivo de una IVIVC es establecer una dependencia funcional que relacione una velocidad entrada *in vivo* (liberación o absorción)  $F_{i2}$  a una velocidad de disolución  $F_{i1}$ . La opción más sencilla es la aproximación lineal:

$$F_{i2}(t) = F_{i1}(t) \quad (10)$$

Tal y como Dunne muestra<sup>42</sup>, la relación entre la disolución *in vivo* e *in vitro* se puede expresar en términos de una relación entre las funciones de distribución o equivalentemente a una relación entre funciones relacionadas, tales como la función Odds (Ec. 11), la función Hazard (Ec. 12) o la función Reversed Hazard (Ec. 13)

$$\frac{F_{i2k}(t)}{1-F_{i2k}(t)} = \alpha_{ik} \cdot \frac{F_{i1}(t)}{1-F_{i1}(t)} \quad (11)$$

$$1 - F_{i2k}(t) = (1 - F_{i1}(t))^{\alpha_{ik}} \quad (12)$$

$$F_{i2k}(t) = (F_{i1}(t))^{\alpha_{ik}} \quad (13)$$

donde  $\alpha_i$  es la constante de proporcionalidad de la unidad  $i_{th}$ .

Siguiendo el desarrollo matemático propuesto por O'Hara<sup>39</sup>, las ecuaciones 11, 12 y 13 se pueden escribir:

$$g(F_{i2k}(t)) = \log(\alpha) + g(F_1(t)) \quad (14)$$

donde  $g(-)$  es la función de unión que presenta un ámbito  $[0, 1]$  a  $[-\infty, +\infty]$ , y es el logit, complementario log-log o log-log dependiendo del cuál de los tres modelos sea considerado. La función de unión garantiza que ambas velocidades (absorción *in vivo* y disolución *in vitro*) residen en el intervalo  $[0, 1]$ .

El escalado del tiempo es frecuente cuando se pretenden justificar diferencias entre los tiempos de los perfiles *in vitro* e *in vivo*. La presencia de un pequeño retraso en el tiempo para los datos *in vivo* puede resultar práctico en muchos casos, ya que comparado con la disolución *in vitro*, donde se inicia instantáneamente, la absorción *in vivo* puede verse retrasada.

$$g(F_{i2k}(t)) = \theta_0 + \theta_1 t + g(F_1(t)) \quad (15)$$

La ecuación 15 asume que los perfiles temporales de la liberación *in vitro* e *in vivo* son similares,  $\theta_0$  y  $\theta_1$  se encargan de describir la relación entre  $F_{i1}$  y  $F_{i2}$  en la escala transformada definida por la función de unión, teniendo en cuenta el escalado temporal y el factor de escala.

Sin embargo, estas ecuaciones no incluyen efectos aleatorios. Tal y como se describe en la literatura<sup>39,42</sup>, los errores asociados a la disolución *in vitro* y el error asociado a los perfiles de absorción *in vivo* son diferentes. Por ello, deben ser modelados de manera independiente,

$$g(F_{i2k}(t)) = \theta_0 + \theta_1 t + g(F_1(t)) + u_i + s_{ik} \quad (16)$$

donde  $u_i$  y  $s_{ik}$  son efectos aleatorios tiempo invariante que describen la variación entre la forma de dosificación *in vitro* y entre las formas de dosificación-sujeto *in vivo*, respectivamente.

## 9.9.4 Modelos basados en ecuaciones diferenciales

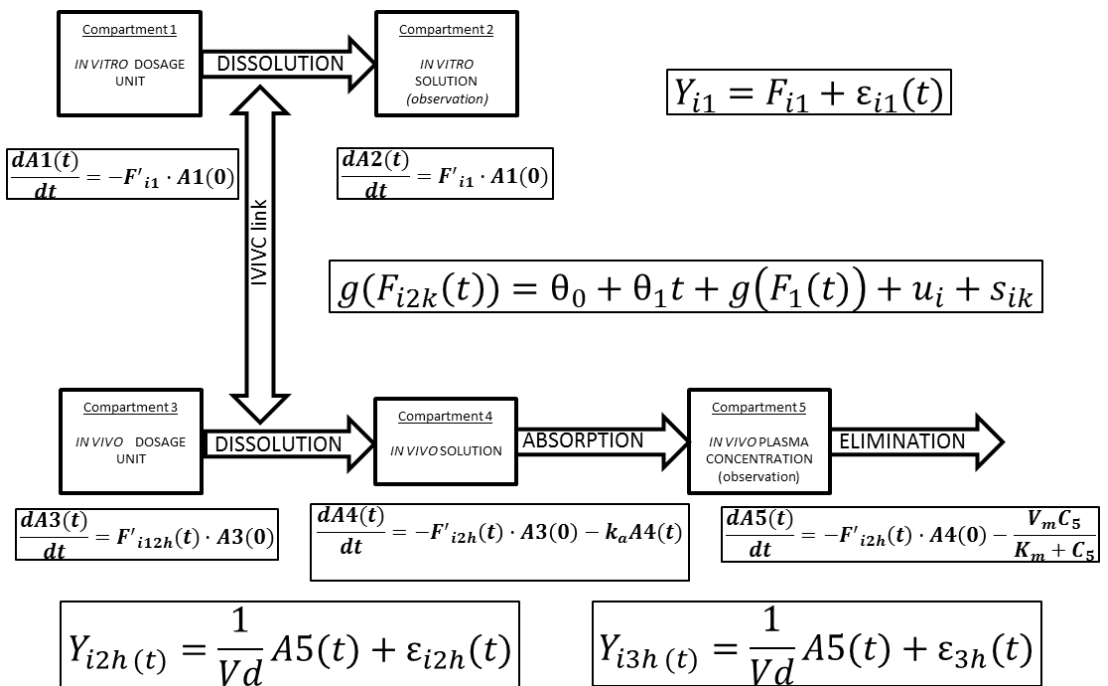
La necesidad de convolución o deconvolución puede ser obviada utilizando soluciones numéricas a modelos basados en ecuaciones diferenciales. Además, las concentraciones en plasma observadas se relacionan directamente con los datos de fracción disuelta *in vitro*. Se ha demostrado que los métodos de convolución y los modelos compartimentales son matemáticamente equivalentes cuando el sistema es lineal<sup>43</sup>. Aun así, existen algunas diferencias, como que los modelos con ecuaciones diferenciales permiten una aproximación compartimental que produce modelos más claros que los métodos de convolución.

Una de las asunciones de los métodos de convolución y deconvolución es que el sistema a modelar es lineal, pero no siempre ocurre de esa manera. Numerosos fármacos se absorben o eliminan por mecanismos que implican procesos saturables (no lineales)<sup>44,45</sup>. Se ha demostrado que los métodos de convolución son válidos<sup>12</sup>, pero cuando los datos presentan procesos no lineales que violan el supuesto de linealidad, no pueden ser empleados.

En el estudio de fármacos que presentan cinéticas no lineales es esencial incorporar métodos que permitan modelar estos fenómenos. Es obvio que los métodos de convolución y deconvolución no satisfacen este requisito, pero una aproximación compartimental, utilizando ecuaciones diferenciales puede ser la solución para este tipo de compuestos. Adicionalmente, la IVIVC puede incorporar efectos aleatorios, fenómenos tiempo-dependientes, factores de escalado, etc., tal y como se pueden requerir por un conjunto de datos<sup>15</sup>.

Gaynor et al<sup>15</sup> describió la aproximación compartimental para un compuesto con cinéticas no lineales (Figura 1). Se utilizaron cinco compartimentos para establecer la IVIVC, donde los dos primeros corresponden a la disolución *in vitro* y los otros tres a los datos *in vivo*, permitiendo una eliminación de Michaelis-Menten.

Figura 1. Figuras basadas en Gaynor, C., et al.



## 9.10. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE UNA IVIVC

La ventaja de obviar la administración intravenosa para establecer una IVIVC es una de las principales ventajas del método de Wagner-Nelson por razones éticas y económicas. Además, los modelos de deconvolución son más sencillos de desarrollar experimentalmente y durante el análisis de datos. Menor número de formulaciones pueden ser requeridas, la utilización de datos promedio y ecuaciones integradas pueden implementarse en la mayoría de los softwares. Estas razones podrían explicar el gran número de IVIVC presentes en la literatura utilizando estos métodos. Una de las más importantes y discutidas limitaciones de Wagner-Nelson y Loo-Riegelmann es la utilización de datos promedio. Una limitación importante de estos métodos es que si los datos experimentales son promediados no es posible calcular la variabilidad asociada a la formulación o entre los individuos y la variabilidad residual. Por este motivo, se produce una pérdida de información. Pero si la IVIVC falla, ¿será debido a la pérdida de información? Cardot et al.<sup>46</sup> describe las diferencias en la pérdida de información cuando se promedian los datos *in vitro* o *in vivo*. Promediar los datos *in vitro* para el análisis es una práctica común en los ensayos para el cálculo de  $f_1$  y  $f_2$ .<sup>47</sup> Quizás, el principal motivo para promediar los datos *in vitro* es que los ensayos de disolución son una técnica reproducible con un entorno controlado (pH, temperatura, composición del medio, etc.) que favorece la obtención de resultados precisos y con poca variabilidad.

Por otro lado, la variabilidad *in vivo* entre-sujetos y la variabilidad residual también deben ser analizadas. En el caso de que haya una gran variabilidad residual puede ser debido a una alta variabilidad residual o a que las diferencias en las formulaciones no pueden ser determinadas por la IVIVC. En el segundo caso, cuando la variabilidad residual es baja, lo cual es habitual, se debe evaluar si las curvas promedio reflejan el comportamiento individual o no.

En numerosos artículos se han utilizado los métodos de deconvolución modelo-dependiente como la metodología para relacionar la absorción *in vivo* con los datos *in vitro*.<sup>48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58</sup> Si nos centramos en los softwares para la implementación de las IVIVC usando Wagner-Nelson y Loo-Riegelmann, la herramienta Excel® es la más utilizada.<sup>48,54</sup> o programas farmacocinéticos como Scientist®<sup>52</sup> y Gastro-Plus®<sup>52, 54</sup> también son empleados. Cabe destacar la contribución en este campo realizada por Langebucher en la implementación en Excel de los métodos de convolución y deconvolución en varios trabajos.<sup>59,60,61,62,63.</sup>

Entre los métodos modelo-independiente, la deconvolución ha venido ganando popularidad en los últimos años, ya que evita la asunción de establecer un modelo farmacocinético previo, permitiendo mayor flexibilidad.<sup>42,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82.</sup> Sin embargo, el uso de datos promedios en algunos artículos es todavía foco de debate y se ha convertido en un área de investigación. Gaynor et al.<sup>18</sup> analizó y comparó para un conjunto de datos iguales el método de deconvolución con datos individuales y datos promedios. Gaynor concluyó que “promediar los datos experimentales antes de realizar la deconvolución provoca predicciones menos precisas que las obtenidas cuando la deconvolución se realiza con los perfiles individuales”. Principalmente, la deconvolución se realiza en plataformas como Phoenix-WinNonlin®<sup>66,69,75,82</sup>, GastroPlus®<sup>68,72,73,78</sup> y NONMEM®<sup>17,65,70,76</sup>, los cuales permiten utilizar datos individuales. Además, en Phoenix-WinNonlin® y GastroPlus® el usuario requiere de menor número de conocimientos para implementar la deconvolución, comparado con NONMEM®. Otros softwares estadísticos y farmacocinéticos que se emplean para realizar la deconvolución en los últimos años son Kinetica®<sup>41</sup>, PCDCON®<sup>42,64,83</sup>, ADAPT II®<sup>80</sup>, Excel®<sup>27</sup> y PDx-IVIVC™<sup>81</sup>.

Aunque la FDA<sup>2</sup> prefiere los métodos en dos etapas para establecer una IVIVC, varios autores han destacado las limitaciones de la deconvolución.<sup>17,39,42,84,85,86</sup>, e incluso la EMA<sup>87</sup> recomienda el método de deconvolución sólo como herramienta exploratoria de los datos, con el fin de poder establecer una IVIVC con un método de una etapa. Las principales limitaciones son:

- Al igual que los métodos modelo-dependientes, frecuentemente los datos observados son promediados a cada punto de muestreo previo a su análisis, lo cual resulta en una pérdida considerable de información.

- Los datos *in vivo* y los datos *in vitro* deben recogerse a los mismos tiempos o únicamente los datos con tiempos comunes pueden ser empleados.
- El proceso de deconvolución es por sí mismo inestable.
- La deconvolución predice la fracción de fármaco disuelto *in vivo* en lugar de las concentraciones plasmáticas, las cuales aportan una información mucho más relevante.
- Asume linealidad del sistema e invarianza en el tiempo
- Dos de los principales asunciones sobre mínimos cuadrados no son cumplidas.

Por el contrario, la convolución no requiere que los datos estén recogidos a los mismos tiempos, predice las concentraciones plasmáticas directamente en un solo paso y utiliza los datos individuales. Sin embargo, al igual que en el método de deconvolución, asume linealidad del sistema e invarianza en el tiempo. Entre los artículos publicados en los últimos años, se utiliza principalmente NONMEM®<sup>17, 39, 88, 89, 90</sup> y sólo en algunos trabajos se incluye SAS®<sup>42</sup>, Sigma-Plot®<sup>41</sup>, Excel®<sup>49</sup> y PC\_IVIVC®<sup>91</sup>.

Los métodos con ecuaciones diferenciales ofrecen una mayor flexibilidad permitiendo cinéticas no lineales e incluso, procesos de varianza en el tiempo. Además, propuestas semi-mecanísticas permiten el uso de datos individuales con el fin de evaluar la variabilidad interindividual y residual del modelo. Un buen trabajo en este sentido se puede encontrar en la publicación de Gaynor et al.<sup>16</sup>, la cual incorpora el análisis de ecuaciones diferenciales desde una perspectiva poblacional y con cinéticas de eliminación no lineales en NONMEM, tal y como también se describe en Soto et al.<sup>85</sup>. Existe también un buen artículo publicado por Buchwald, donde se detallan los beneficios de los métodos con ecuaciones diferenciales y su aplicación en Excel a través de la integración de Euler.<sup>86</sup> La EMA incluye en sus Guías la recomendación de utilizar la convolución y/o ecuaciones diferenciales para obtener IVIVC más robustas y precisas<sup>11</sup>. Este punto es apoyado por Gaynor et al. en este trabajo<sup>17</sup>.

**Tabla5.** Ejemplos de IVIVC en los últimos años, en la que se especifica el fármaco, categoría BCS del fármaco, vía de administración, tipo de formulación –donde IR significa liberación inmediata y MR liberación modificada-, el nivel de correlación, el método y programa utilizado, si utilizan datos individuales o promediados y si realizan algún tipo de validación. Nd: no disponible.<sup>57,68,72,78,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105</sup>

Autor	Año	Clase BCS	Fármaco	Vía	Formulación	Correlación	Método	Programa	Promedio	VI/VE
Egan, TD	1993	Nd	Remifentaniol	IV perf	Nd	Nivel A	Deconvolución	NONMEM	NO	Nd
Eddington, ND	1998	I	Metoprolol	Oral	MR	Nivel A	Nd	Nd	Nd	Nd
Balan, G	2000	II	Glibenclamide	Oral	IR, MR	Nivel A y C	Convolución	Nd	Nd	IV
Sirisuth, N	2000	I	Metoprolol	Oral	MR	Nivel A	Nd	Nd	Nd	IV
Veng-Pedersen, P	2000	II	Carbamazepine	Oral	IR	Nivel A	Convolución	PC_IVIVC	Nd	CROSS
Pitisiu, M	2000	III	Oxybutynin	Oral	OROS	Nivel A	Convolución	NONMEM	NO	IV/EV
Balan, G	2001	III	Metformin	Oral	MR	Nivel A	Convolución	Sigma-Plot	Nd	Nd
Rostami-Hodjegan, A	2002	III	Paracetamol	Oral	IR	Nivel A	Deconvolución	Excel	Nd	Nd
Sirisuth, N	2002	I	Diltiazem	Oral	MR	Nivel A	Convolución	Adapt II	SI	IV
Corrigan, O	2002	II	Ketoprofen	Oral	MR	Nivel A	Deconvolución	PCDCON	SI	Nd
Drover, D	2002	I	Hydromorphone	Oral	IR, MR	Nivel A	Convolución	NONMEM	NO	Nd
Liu, Y	2003	I	Theophylline	Oral	IR, MR	Nivel A	Wagner Nelson	Nd	NO	Nd
Parojcic, J	2004	III	Paracetamol	Oral	MR	Nivel A	Deconvolución	Nd	Nd	Nd
Csajka, C	2004	I	Hydromorphone & Veralipride	Oral	OROS	Nivel A	Convolución	NONMEM	NO	Nd
Sunesen, VH	2005	II	Danazol	Oral	Nd	Nivel A	Deconvolución	PDx-IVIVC	SI	IV
Dutta, S	2005	III	Divalproex sodium	Oral	MR	Nivel A	Wagner Nelson	Nd	SI	IV / EV

Ghosh, A	2008	II	Glipizide	Oral	MR	Nivel A	Wagner Nelson	Nd	SI	IV/EV
Kovacevic, I	2008	II	Carbamazepine	Oral	IR, MR	Nivel A	Deconvolución	GastroPlus	SI	Nd
Okumu, A	2008	II	Montelukast	Oral	MR	Nivel A	Deconvolución	GastroPlus	SI	Nd
Macha, S	2009	II	Nevirapine	Oral	MR	Nivel A	Deconvolución	Winnolin	SI	IV
Soto, E	2009	I	Pramipexole	Oral	MR	Nivel A	Ec. Diferenciales	NONMEM	NO	IV
Aamir, MN	2010	I	Tramadol	Oral	MR	NO IVIVC	Wagner Nelson	Nd	SI	NO
Rossi, RC	2010	II	Fosamprenamivir	Oral	IR	Nivel A	Wagner Nelson	Scientist	SI	IV
Mundin, GE	2012	I	Oxycodone	Oral	MR	Nd	Nd	Nd	Nd	IV
Saibi, Y	2012	II	Ripessidone	Oral	IR	Nivel A	Deconvolución	GastroPlus	SI	IV
Mirza, T	2012	I	Nd	Oral	MR	Nivel A	Wagner Nelson	GastroPlus	SI	IV/EV
Khaled, AA	2013	I	Metoprolol	Oral	ND	Nivel A, B and C	Wagner Nelson	Nd	Nd	IV
Kakhi, M	2013	Nd	Nd	Oral	MR	Nivel A	Deconvolución	Winnolin	NO	
Honorio, T da Sivila	2013	II	Efavirenz	Oral	MR	Nivel A	Wagner Nelson	GastroPlus	SI	IV

<sup>1</sup> FDA, “Impact Innovation Predictability Acces, in Novel New Drug Summary”, 2013, U.S. Department of Health and Human Services: Centre for Drug Evaluation and Research (CDER)

<sup>2</sup> Chilukuri, D.M.S., G.; Young, D, “Pharmaceutical Product Development: In Vitro-In Vivo Correlation”, 2007, *New York: Informa Healthcare USA, Inc.*

<sup>3</sup> Chowdhury, A.K., Islam, S., “In vitro-in vivo correlation as a surrogate for bioequivalence testing: the current state of play”. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2011. 6(3-4): 176-190.

<sup>4</sup> Cook, J.A., “Development strategies for IVIVC in an industrial environment”. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 2012. 33(7): 349-353.

<sup>5</sup> Emami, J., “In vitro - in vivo correlation: from theory to applications”. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences* , 2006. 9(2): 169-189.

<sup>6</sup> Hayes, S., et al., “Interpretation and optimization of the dissolution specifications for a modified release product with an in vivo-in vitro correlation (IVIVC)”. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2004. 93(3): 571-581.

<sup>7</sup> Limberg, J. and H. Potthast, “Regulatory status on the role of in vitro dissolution testing in quality control and biopharmaceutics in Europe”. *Biopharm Drug Dispos*, 2013. 34(5): 247-253

<sup>8</sup> FDA, “Guidance for industry: Dissolution testing for immediate release solid oral dosage forms”, 1997, US Department of Health and Human Services: Centre for Drug Evaluation and Research.

<sup>9</sup> FDA, “Guidance for industry. Extended release oral dosage forms: development, evaluation and application of in vitro/in vivo correlations.”, 1997, US Department of Health and Human Services: Center for Drug Evaluation and Research (CDER).

<sup>10</sup> FDA, “Guidance for Industry. SUPAC-MR: Modified Release Solid Oral Dosage Forms”, 1997, US Department of Health and Human Services: Centre for Drug Evaluation and Research (CDER).

<sup>11</sup> EMA, “Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms”, 2012: London.

<sup>12</sup> Wagner, J.G. and E. Nelson, “Per cent absorbed time plots derived from blood level and/or urinary excretion data”. *Journal of pharmaceutical sciences*, 1963. 52: 610-701.

<sup>13</sup> Loo, J.C. and S. Riegelman, “New method for calculating the intrinsic absorption rate of drugs”. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1968. 57(6): 918-928.

<sup>14</sup> Kakhi, M., P. Marroum, and J. Chittenden, “Analysis of level A in vitro-in vivo correlations for an extended-release formulation with limited bioavailability”. *Biopharmaceutics & drug disposition*, 2013. 34(5): 262-277.

<sup>15</sup> Dunne, A., “Approaches to developing in vitro–in vivo correlation models., in Pharmaceutical Product Development”, D.M. Chilukuri, Sunkara, G., Young, D., Editor 2007, *Informa Healthcare USA: New York*. 47–70

- 
- <sup>16</sup> Gaynor, C., et al., "A population approach to in vitro-in vivo correlation modelling for compounds with nonlinear kinetics". *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 2011. 38(3): 317-332.
- <sup>17</sup> Gaynor, C., A. Dunne, and J. Davis, "A comparison of the prediction accuracy of two IVIVC modelling techniques". *Journal of pharmaceutical sciences*, 2008. 97(8): 3422-3432.
- <sup>18</sup> Gaynor, C., A. Dunne, and J. Davis, "The effects of averaging on accuracy of IVIVC model predictions". *Journal of pharmaceutical sciences*, 2009. 98(10): 3829-3838.
- <sup>19</sup> Rossenu, S., et al., "A nonlinear mixed effects IVIVC model for multi-release drug delivery systems". *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 2008. 35(4): 423-441
- <sup>20</sup> Bolton, S.B., C., "Pharmaceutical Statistics: Practical and Clinical Applications". 2nd ed1991, New York: Marcel Dekker Inc. 211-245.
- <sup>21</sup> USP, "In vitro and In vivo Evaluations of Dosage Forms". 27th. ed2004, Easton, PA.: Mack Publishing Co.
- <sup>22</sup> Lu, Y., S. Kim, and K. Park, "In vitro-in vivo correlation: perspectives on model development". *Int J Pharm*, 2011. 418(1): 142-148.
- <sup>23</sup> Amidon, G.L., et al., "A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability". *Pharmaceutical research*, 1995. 12(3): 413-420.
- <sup>24</sup> Dressman, J.B. and C. Reppas, "In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs". *European journal of pharmaceutical sciences*, 2000. 11 Suppl 2: p. S73-80.
- <sup>25</sup> Sirisuth, N., Eddington, ND, "In vitro-in vivo correlation definitions and regulatory guidance". *Int J Gen Drugs*, 2002. Part 2: 1-11.
- <sup>26</sup> Dressman, J.B., et al., "Dissolution testing as a prognostic tool for oral drug absorption: immediate release dosage forms". *Pharmaceutical research*, 1998. 15(1): 11-22.
- <sup>27</sup> Dressman, J., "Physiological Aspects of the Design of Dissolution Tests, in Capsugel library on Modern Biopharmaceutics" V.5.01., C.S. BMAG, Editor 2001.
- <sup>28</sup> Shah, V.P., et al., "In vitro dissolution profile of water-insoluble drug dosage forms in the presence of surfactants". *Pharmaceutical research*, 1989. 6(7): 612-618.
- <sup>29</sup> Sievert, B.a.S., M., "Dissolution tests for ER products". *Dissolution Technology*, 1998. 5(4): 1-7.
- <sup>30</sup> Bates, T.R., et al., "Gastrointestinal absorption of griseofulvin from corn oil-in-water emulsions: effect of amount of corn oil ingested in man". *Archives of dermatology*, 1977. 113(3): 302-306.
- <sup>31</sup> Shah, V.P., et al., "Influence of higher rates of agitation on release patterns of immediate-release drug products". *Journal of pharmaceutical sciences*, 1992. 81(6): 500-503.
- <sup>32</sup> Moore, J.W.a.F., H.H., "Mathematical comparison of dissolution profiles". *Pharm Tech*, 1996. 20(6): 64-76.
- <sup>33</sup> Shargel, L.a.Y., A.B.C., "Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics". 4th ed1999, Stamford, Connecticut: Appleton and Lange.
- <sup>34</sup> Galia, E., et al., "Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs". *Pharmaceutical research*, 1998. 15(5): 698-705.
- <sup>35</sup> Nicolaidis, E., et al., "Forecasting the in vivo performance of four low solubility drugs from their in vitro dissolution data". *Pharmaceutical research*, 1999. 16(12): 1876-1882.
- <sup>36</sup> Kostewicz, E.S., et al., "In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms". *European journal of pharmaceutical sciences*, 2013.
- <sup>37</sup> Wagner, J.G., "Method for estimating rate constants for absorption, metabolism, and elimination from urinary excretion data". *Journal of pharmaceutical sciences*, 1967. 56(4): 489-494.
- <sup>38</sup> Young, D., "In vitro in vivo correlations", 1997: *Plenum Pub. Corp.*
- <sup>39</sup> O'Hara, T., et al., "In vivo-in vitro correlation (IVIVC) modeling incorporating a convolution step". *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 2001. 28(3): 277-298.
- <sup>40</sup> Gillespie, W.R., "Convolution-based approaches for in vivo-in vitro correlation modeling". *Advances in experimental medicine and biology*, 1997. 423: 53-65.

- 
- <sup>41</sup> Balan, G., et al., "In vitro-in vivo correlation (IVIVC) models for metformin after administration of modified-release (MR) oral dosage forms to healthy human volunteers". *Journal of pharmaceutical sciences*, 2001. 90(8): 1176-1185.
- <sup>42</sup> Dunne, A., T. O'Hara, and J. Devane, "A new approach to modelling the relationship between in vitro and in vivo drug dissolution/absorption". *Statistics in medicine*, 1999. 18(14): 1865-1876; discussion 1877.
- <sup>43</sup> Dunne, A., "Approaches to Developing in vitro-in vivo Correlation Models in Pharmaceutical Product Development in vitro-in vivo Correlation", D.S. Chilukuri, G.; Young, D., Editor 2007, Informa Healthcare USA, Inc: New York. 47-70.
- <sup>44</sup> Gibiansky, L. and E. Gibiansky, "Target-mediated drug disposition model and its approximations for antibody-drug conjugates". *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 2013.
- <sup>45</sup> van Kuilenburg, A.B. and J.G. Maring, "Evaluation of 5-fluorouracil pharmacokinetic models and therapeutic drug monitoring in cancer patients". *Pharmacogenomics*, 2013. 14(7): 799-811.
- <sup>46</sup> Cardot, J.M. and B.M. Davit, "In vitro-in vivo correlations: tricks and traps". *AAPS journal*, 2012. 14(3): 491-499.
- <sup>47</sup> FDA, "Guidance for Industry Nonsterile Semisolid Dosage Forms, in Scale-Up and Postapproval Changes: Chemistry, Manufacturing, and Controls; In Vitro Release Testing and In Vivo Bioequivalence Documentation", 1997, U.S. Department of Health and Human Services: Centre for Drug Evaluation and Research (CDER).
- <sup>48</sup> Bose, A. and W.T. Wui, "Convolution and validation of in vitro-in vivo correlation of water-insoluble sustained-release drug (domperidone) by first-order pharmacokinetic one-compartmental model fitting equation". *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*, 2013. 38(3): 191-200.
- <sup>49</sup> Dutta, S., et al., "Once-a-day extended-release dosage form of divalproex sodium III: development and validation of a Level A in vitro-in vivo correlation (IVIVC)". *Journal of pharmaceutical sciences*, 2005. 94(9): 1949-1956.
- <sup>50</sup> Eroglu, H., et al., "Preparation and in vitro/in vivo evaluation of microparticle formulations containing meloxicam". *AAPS PharmSciTech*, 2012. 13(1): 46-52.
- <sup>51</sup> Ghosh, A., et al., "Extended release dosage form of glipizide: development and validation of a level A in vitro-in vivo correlation". *Biological & pharmaceutical bulletin*, 2008. 31(10): 1946-1951.
- <sup>52</sup> Honorio Tda, S., et al., "In vitro-in vivo correlation of efavirenz tablets using GastroPlus®". *AAPS PharmSciTech*, 2013. 14(3): 1244-1254.
- <sup>53</sup> Khaled, A.A., et al., "Development of in vitro-in vivo correlation for encapsulated metoprolol tartrate". *Acta poloniae pharmaceutica*, 2013. 70(4): 743-747.
- <sup>54</sup> Mirza, T., et al., "Use of in vitro-in vivo correlation to predict the pharmacokinetics of several products containing a BCS class 1 drug in extended release matrices". *Pharmaceutical research*, 2013. 30(1): 179-190.
- <sup>55</sup> Naeem Aamir, M., et al., "Development and in vitro-in vivo relationship of controlled-release microparticles loaded with tramadol hydrochloride". *International journal of pharmaceutics*, 2011. 407(1-2): 38-43.
- <sup>56</sup> Parejija, P.B., et al., "In vivo performance evaluation and establishment of IVIVC for osmotic pump based extended release formulation of milnacipran HCl". *Biopharmaceutics & drug disposition*, 2013. 34(4): 227-235.
- <sup>57</sup> Rossi, R.C., et al., "Development and validation of discriminating method of dissolution for fosamprenavir tablets based on in vivo data". *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2011. 54(3): 439-444.
- <sup>58</sup> Liu, Y., J.B. Schwartz, and R.L. Schnaare, "A multimechanistic drug release approach in a bead dosage form and in vitro predictions". *Pharmaceutical development and technology*, 2003. 8(2): 163-173.
- <sup>59</sup> Langenbucher, F., "Handling of computational in vitro/in vivo correlation problems by Microsoft Excel: I. Principles and some general algorithms". *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 2002. 53(1): 1-7



- 
- <sup>60</sup> Langenbucher, F., "Handling of computational in vitro/in vivo correlation problems by Microsoft Excel: III. Convolution and deconvolution". *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 2003. 56(3): 429-437.
- <sup>61</sup> Langenbucher, F., "Handling of computational in vitro/in vivo correlation problems by Microsoft Excel II. Distribution functions and moments". *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* 2003. 55(1): 77-84.
- <sup>62</sup> Langenbucher, F., "Handling of computational in vitro/in vivo correlation problems by Microsoft Excel: IV. Generalized matrix analysis of linear compartment systems". *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 2005. 59(1): 229-235.
- <sup>63</sup> Langenbucher, F., "Handling of computational in vitro/in vivo correlation problems by Microsoft Excel: V. Predictive absorbability models". *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 2007. 67(1): 293-299.
- <sup>64</sup> Corrigan, O.I., Y. Devlin, and J. Butler, "Influence of dissolution medium buffer composition on ketoprofen release from ER products and in vitro-in vivo correlation". *International journal of pharmaceuticals*, 2003. 254(2): 147-154.
- <sup>65</sup> Egan, T.D., et al., "The pharmacokinetics of the new short-acting opioid remifentanyl (GI87084B) in healthy adult male volunteers". *Anesthesiology*, 1993. 79(5): 881-892.
- <sup>66</sup> Kakhi, M. and J. Chittenden, "Modeling of pharmacokinetic systems using stochastic deconvolution". *Journal of pharmaceutical sciences*, 2013. 102(12): 4433-4443.
- <sup>67</sup> Khaled, A.A., et al., "In vitro to in vivo profiling: an easy idea for biowaiver study". *Acta poloniae pharmaceutica*, 2013. 70(5): 873-875.
- <sup>68</sup> Kovacevic, I., et al., "Justification of biowaiver for carbamazepine, a low soluble high permeable compound, in solid dosage forms based on IVIVC and gastrointestinal simulation". *Molecular pharmaceuticals*, 2009. 6(1): 40-47.
- <sup>69</sup> Macha, S., et al., "In vitro-in vivo correlation for nevirapine extended release tablets". *Biopharmaceutics & drug disposition*, 2009. 30(9): 542-550.
- <sup>70</sup> Modi, N.B., et al., "Application of in vitro-in vivo correlations (IVIVC) in setting formulation release specifications". *Biopharmaceutics & drug disposition*, 2000. 21(8): 321-326.
- <sup>71</sup> Munding, G.E., et al., "Validated in vitro/in vivo correlation of prolonged-release oxycodone/naloxone with differing dissolution rates in relation to gastrointestinal transit times". *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 2012. 8(12): 1495-1503.
- <sup>72</sup> Okumu, A., M. DiMaso, and R. Lobenberg, "Dynamic dissolution testing to establish in vitro/in vivo correlations for montelukast sodium, a poorly soluble drug". *Pharmaceutical research*, 2008. 25(12): 2778-2785.
- <sup>73</sup> Okumu, A., M. DiMaso, and R. Lobenberg, "Computer simulations using GastroPlus to justify a biowaiver for etoricoxib solid oral drug products". *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 2009. 72(1): 91-98.
- <sup>74</sup> Parojcic, J., et al., "Influence of dissolution media composition on drug release and in-vitro/in-vivo correlation for paracetamol matrix tablets prepared with novel carbomer polymers". *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 2004. 56(6): 735-741.
- <sup>75</sup> Patel, A.R., et al., "Pharmacokinetic evaluation and in vitro-in vivo correlation (IVIVC) of novel methylene-substituted 3,3' diindolylmethane (DIM)". *European journal of pharmaceutical sciences*, 2012. 46(1-2): 8-16.
- <sup>76</sup> Rietbrock, S., et al., "Absorption behavior of sulpiride described using Weibull functions". *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*, 1995. 33(5): 299-303.
- <sup>77</sup> Rostami-Hodjegan, A., et al., "A new rapidly absorbed paracetamol tablet containing sodium bicarbonate. II. Dissolution studies and in vitro/in vivo correlation". *Drug development and industrial pharmacy*, 2002. 28(5): 533-543.
- <sup>78</sup> Saibi, Y., H. Sato, and H. Tachiki, "Developing in vitro-in vivo correlation of risperidone immediate release tablet". *AAPS PharmSciTech*, 2012. 13(3): 890-895.
- <sup>79</sup> Sakuma, S., et al., "Correlation between in vitro dissolution profiles from enteric-coated dosage forms and in vivo absorption in rats for high-solubility and high-permeability model drugs". *Journal of pharmaceutical sciences*, 2009. 98(11): 4141-4152.

- 
- <sup>80</sup> Sirisuth, N., L.L. Augsburger, and N.D. Eddington, "Development and validation of a non-linear IVIVC model for a diltiazem extended release formulation". *Biopharmaceutics & drug disposition*, 2002. 23(1): 1-8.
- <sup>81</sup> Sunesen, V.H., et al., "In vivo in vitro correlations for a poorly soluble drug, danazol, using the flow-through dissolution method with biorelevant dissolution media". *European journal of pharmaceutical sciences*, 2005. 24(4): 305-313.
- <sup>82</sup> Yang, Z., et al., "Enhancement of skin permeation of bufalin by limonene via reservoir type transdermal patch: formulation design and biopharmaceutical evaluation". *International journal of pharmaceutics*, 2013. 447(1-2): 231-240.
- <sup>83</sup> Gillespie, W.R., "Documentation for PCDCON computer program", 1992, Austin: University of Texas.
- <sup>84</sup> Costello, C., et al., "A time scaling approach to develop an in vitro-in vivo correlation (IVIVC) model using a convolution-based technique". *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics*, 2011. 38(5): 519-539.
- <sup>85</sup> Soto, E., et al., "Population in vitro-in vivo correlation model for pramipexole slow-release oral formulations". *Pharmaceutical research*, 2010. 27(2): 340-349.
- <sup>86</sup> Buchwald, P., "Direct, differential-equation-based in-vitro-in-vivo correlation (IVIVC) method". *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 2003. 55(4): 495-504.
- <sup>87</sup> EMA, "Guideline on quality of oral modified release products", 2012.
- <sup>88</sup> Csajka, C., D. Drover, and D. Verotta, "The use of a sum of inverse Gaussian functions to describe the absorption profile of drugs exhibiting complex absorption". *Pharmaceutical research*, 2005. 22(8): 1227-1235.
- <sup>89</sup> Drover, D.R., et al., "Input characteristics and bioavailability after administration of immediate and a new extended-release formulation of hydromorphone in healthy volunteers". *Anesthesiology*, 2002. 97(4): 827-836.
- <sup>90</sup> Pitsiu, M., et al., "A semiparametric deconvolution model to establish in vivo-in vitro correlation applied to OROS oxybutynin". *Journal of pharmaceutical sciences*, 2001. 90(6): 702-712.
- <sup>91</sup> Veng-Pedersen, P., et al., "Carbamazepine level-A in vivo-in vitro correlation (IVIVC): a scaled convolution based predictive approach". *Biopharmaceutics & drug disposition*, 2000. 21(1): 1-6.
- <sup>92</sup> Bachhav, Y.G. and V.B. Patravale, "SMEDDS of glyburide: formulation, in vitro evaluation, and stability studies". *AAPS PharmSciTech*, 2009. 10(2): 482-487.
- <sup>93</sup> Brouwers, J., et al., "Determination of intraluminal theophylline concentrations after oral intake of an immediate- and a slow-release dosage form". *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 2005. 57(8): 987-996.
- <sup>94</sup> Cheng, C.L., et al., "Biowaiver extension potential to BCS Class III high solubility-low permeability drugs: bridging evidence for metformin immediate-release tablet". *European journal of pharmaceutical sciences*, 2004. 22(4): 297-304.
- <sup>95</sup> EMA, "Viramune (Nevirapine) assesment report", 2011, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP).
- <sup>96</sup> FDA, "Draft Guidance on Pramipexole Dyhydrochloride", 2008.
- <sup>97</sup> Granero, G.E., C. Ramachandran, and G.L. Amidon, "Rapid in vivo dissolution of ketoprofen: implications on the biopharmaceutics classification system". *Die Pharmazie*, 2006. 61(8): 673-676.
- <sup>98</sup> Jamzad, S. and R. Fassihi, "Development of a controlled release low dose class II drug-Glipizide". *International Journal of Pharmaceutics*, 2006. 312(1-2): 24-32.
- <sup>99</sup> Kalantzi, L., et al., "Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms: acetaminophen (paracetamol)". *Journal of pharmaceutical sciences*, 2006. 95(1): 4-14.
- <sup>100</sup> Kasim, N.A., et al., "Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification". *Molecular pharmaceutics*, 2004. 1(1): 85-96.
- <sup>101</sup> Lassoued, M.A., F. Khemiss, and S. Sfar, "Comparative study of two in vitro methods for assessing drug absorption: Sartorius SM 16750 apparatus versus Everted Gut Sac". *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences*, 2011. 14(1): 117-127.

---

<sup>102</sup>Panikumar, A.V.-R., Y.;Sunhita, G.;Sathesi-Babu, PR.;Subrahmanyam, CVS, “Development of biorelevant and discriminating method for dissolution of efavirenz and its formulations”. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2012. 5: 220-223.

<sup>103</sup> Samaha, D.S., R.; Kyriacos, S, “Modeling and Comparison of Dissolution Profiles of Diltiazem Modified-Release Formulations”. *Dissolution Technology*, 2009: 41-46.

<sup>104</sup> Tsume, Y. and G.L. Amidon, “The biowaiver extension for BCS class III drugs: the effect of dissolution rate on the bioequivalence of BCS class III immediate-release drugs predicted by computer simulation”. *Molecular pharmaceutics*, 2010. 7(4): 1235-1243.

<sup>105</sup> Vaughn, J.M., et al., “Supersaturation produces high bioavailability of amorphous danazol particles formed by evaporative precipitation into aqueous solution and spray freezing into liquid technologies”. *Drug development and industrial pharmacy*, 2006. 32(5): 559-567.

# 10. Sección solubilidad: Solubilidad de principios activos: consideraciones generales y su relación con el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico aplicado a Bioexenciones

Alexis Aceituno Alvarez<sup>a,b</sup>, Felipe Felipe Barrientos García-Huidobro <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Salud Pública de Chile.

<sup>b</sup> Universidad de Valparaiso. Chile

## 10.1 El contexto biofarmacéutico y la importancia de los medicamentos genéricos o multifuentes.

El costo en salud y especialmente, el manejo de enfermedades con medicamentos, se ha ido incrementando exponencialmente en las últimas dos décadas, como consecuencia de la aparición de tratamientos más modernos, el envejecimiento de la población (polifarmacia) y la prevalencia de enfermedades crónicas. En el manejo de diversas patologías, se sabe que la recuperación de la salud de la población es dependiente del uso racional de medicamentos de calidad, y es en este punto en particular donde los países tanto desarrollados como en vías de desarrollo, han puesto el mayor esfuerzo, a través de la reducción en el costo de los medicamentos, sin provocar el menoscabo de su calidad. Esto se ha logrado con la introducción en el mercado de los denominados productos genéricos o productos multifuentes según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS). De acuerdo a la definición universalmente aceptada, un producto genérico es aquel que se fabrica y comercializa una vez vencida la patente de exclusividad del producto innovador y que debe haber demostrado igual eficacia a través de los denominados estudios de bioequivalencia.<sup>1</sup>

Las ciencias biofarmacéutica han contribuido de manera significativa en el desarrollo de productos farmacéuticos genéricos. En este tipo de productos, el menor precio se explica porque los medicamentos genéricos amortizan los gastos en investigación y desarrollo en los cuales debió incurrir el titular del producto original.

Desde la década de los 70 se ha vuelto un tema de la mayor relevancia el asegurar que los medicamentos genéricos posean una calidad y performance *in vivo* que permita demostrar que éstos son igualmente seguros y eficaces que el medicamento original, asegurando así la intercambiabilidad entre especialidades farmacéuticas.<sup>2</sup>

Esta postura de tanta relevancia para la salud de la población, se ha materializado en algunos países con una política de medicamentos que asegure la aplicación de buenas prácticas de manufactura (GMP) en la fabricación y con normativas que exijan la demostración de equivalencia terapéutica (EQT) entre el producto genérico y la especialidad de referencia. La materialización de esta exigencia se lleva a cabo mediante los estudios de “equivalencia *in vivo*” o “bioequivalencia”, concepto aceptado mundialmente por más de 20 años y que ha dado como resultado la producción de productos farmacéuticos genéricos de calidad a un costo menor. El parámetro objetivo que se emplea para

comparar la calidad en términos de eficacia entre un producto innovador y un producto genérico, es la medición experimental de biodisponibilidad.

La Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de Norte América (FDA) ha definido la biodisponibilidad como una medida de "la velocidad y la cantidad de fármaco, o de ingrediente farmacológicamente activo (API) de este, que es liberado desde el producto farmacéutico y se encuentra disponible en el sitio de acción", toda vez que el fármaco se distribuye mediante un equilibrio farmacocinético desde la circulación sistémica hacia el sitio de acción.<sup>3</sup>

El mejor ensayo que permitiría definir si dos medicamentos de igual forma farmacéutica, que poseen la misma dosis de un determinado API, son igualmente eficaces, sería la evaluación del efecto clínico producido con uno u otro producto. Sin embargo, esto resultaría difícil de realizar debido a los tiempos, los costos y las consideraciones éticas en ensayos de larga duración en pacientes y voluntarios.

Los estudios de bioequivalencia pretenden demostrar por medio de parámetros farmacocinéticos que un medicamento genérico o copia, tendrá el mismo efecto terapéutico en términos de seguridad y eficacia que el medicamento innovador, medicamento que cuenta con el respaldo de estudios clínicos y pre clínicos que lo avalan.

La equivalencia terapéutica puede ser demostrada a través de estudios de bioequivalencia (estudios comparativos de biodisponibilidad *in vivo*), estudios realizados en una cantidad pequeña de voluntarios generalmente sanos, en donde lo que se procura es asegurar que ambos medicamentos - genérico e innovador - son absorbidos en igual magnitud como una medida de la eficiencia de la absorción y a la misma velocidad, luego de una administración de una dosis simple del medicamento. El concepto de genérico en las Américas difiere con respecto de los países desarrollados, entendiéndose por tal, al producto que se expenden por su denominación común internacional (DCI) o con nombre de fantasía. Es por ello que la OMS recomienda el empleo del término producto de múltiples fuentes, dejando de lado la controversia en el nombre, de fantasía o no, que se emplee.

Por otra parte, tal como lo establecen algunas agencias de alta vigilancia sanitaria, tales como la FDA en Estados Unidos, la European Medicine Agency (EMA) en Europa y el Instituto de Salud Pública (ISP) en Chile, entre otras agencias, los estudios de bioequivalencia para la demostración de EQT, pueden ser reemplazados por estudios de Bioexención.

## 10.2. Definiciones

La bioexención es la prerrogativa de la autoridad sanitaria de eximir de la obligatoriedad de presentar estudios de bioequivalencia *in vivo* para establecer EQT, con la presentación de pruebas *in vitro*, como los perfiles de disolución comparativos (PDC), la caracterización fisicoquímica del API; su fracción absorbida y su solubilidad en medios de pH controlados.

Para que un producto farmacéutico pueda optar a demostrar su EQT a través de estudios de bioexención (estudios comparativos de cinéticas de disolución *in vitro*), ambos producto - prueba y referencia - deben ser formas farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata (FFSO-LI), con patrones de rápida o muy rápida liberación-disolución y que además cumplan los criterios establecidos por el sistema de clasificación biofarmacéutico (SCB).<sup>4, 5, 6</sup>

El SCB es el marco científico, establecido por Gordon Amidon y colaboradores., en el año 1995, que permite clasificar los fármacos en 4 categorías, basándose en su solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal,<sup>7</sup> del agente terapéuticamente activo (API de su sigla en inglés: *active pharmaceutical ingredient*) de acuerdo a como se muestra en la siguiente figura:

	Alta Solubilidad	Baja Solubilidad
Alta Permeabilidad	<b>Clase 1</b> Alta Solubilidad Alta Permeabilidad	<b>Clase 2</b> Baja Solubilidad Alta Permeabilidad
Baja Permeabilidad	<b>Clase 3</b> Alta Solubilidad Baja Permeabilidad	<b>Clase 4</b> Baja Solubilidad Baja Permeabilidad

*Figura 1. Matriz de clasificación de API de acuerdo al Sistema de clasificación biofarmacéutico*

De acuerdo a este sistema de clasificación, un fármaco se considerará altamente soluble cuando la potencia más alta del medicamento presente en el mercado, es soluble en 250 mL de medio acuoso o menos, que representa el equivalente a 8 onzas de agua, cantidad de líquido con la que se deben consumir los medicamentos a ser evaluados en estudios clínicos, dentro del rango de pH fisiológico, pH 1,0 – 6,8.<sup>8</sup> Así, para poder clasificar la solubilidad de un fármaco de acuerdo al SCB, se puede calcular de manera simple el número de dosis (Do). El número de dosis, es una medida adimensional que establece si un fármaco será clasificado como de alta o baja solubilidad.

Cuando el numero dosis, Do, sea menor o igual a 1 el fármaco se considerará como de alta solubilidad, mientras que cuando el Do sea mayor a 1, el fármaco será clasificado como de baja solubilidad.

$$Do = \frac{Mo/Vo}{Cs}$$

Do = Número de Dosis  
 Mo= Dosis máxima  
 Vo = Vol. Solvente (250 mL)  
 Cs = Solubilidad mínima

*Ecuación 1. Cálculo del número adimensional Do*

El concepto de la solubilidad refleja una propiedad fisicoquímica de la materia prima activa. Cuando se habla de solubilidad en relación con fármacos, esta se define como la máxima cantidad de API, que se logra disolver en un solvente o medio de disolución a una determinada temperatura. O dicho de otra manera, la cantidad máxima de soluto que pasa de fase sólida a solución, para formar una mezcla homogénea a una determinada temperatura.<sup>9</sup>

## **10.3. La solubilidad y los factores que inciden en ella.**

### **10.3.1. Factores relevantes en la formulación de medicamentos**

El paso de soluto sólido a soluto disuelto en el medio disolvente se encuentra condicionado por una serie de factores referidos tanto a la fase sólida, representada por el soluto, como a la fase líquida, representada por el solvente. Los factores del soluto que pueden condicionar la solubilidad son el tamaño y la forma de la partícula, su estado amorfo o cristalino, su polimorfismo, densidad, temperatura de fusión y grado de porosidad entre otras propiedades de la fase sólida. Por otro lado, la solubilidad se encuentra condicionada también por el solvente y su capacidad de humectación, en donde juega un papel fundamental la tensión superficial del disolvente actuando sobre el soluto. Otras propiedades del solvente que juegan un rol sobre la solubilidad son el pH del mismo (especialmente para el caso de fármacos electrolitos débiles) y la constante dieléctrica del mismo, que es una medida de la fuerza del solvente para separar, durante el proceso de disolución, partículas con cargas opuestas.

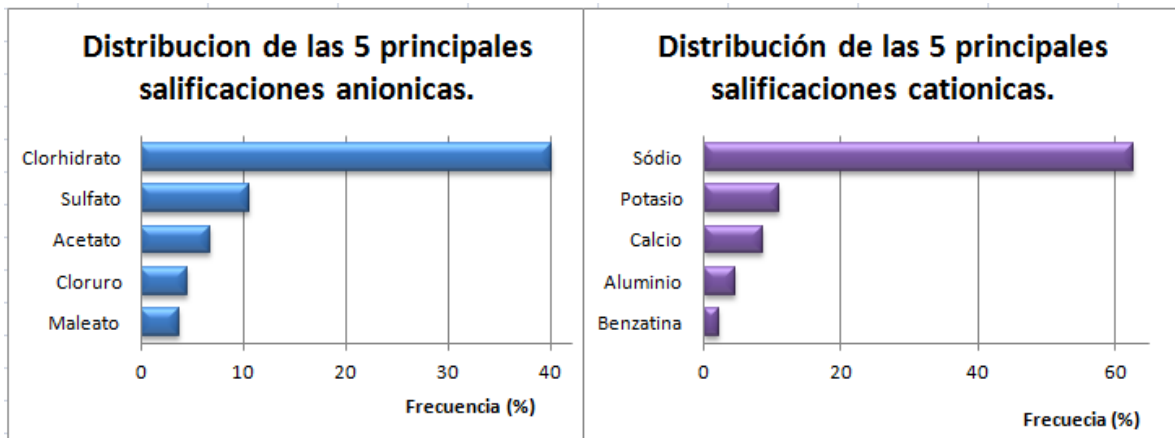
En los estudios de pre-formulación de formas farmacéuticas se debe considerar entre muchos otros factores la propiedad fisicoquímica referida a la solubilidad de los fármacos, ya que dependiendo de ella se determinará si es factible formular productos farmacéuticos como comprimidos, cápsulas blanda, suspensiones u otro tipo de forma farmacéutica.

Por otro lado los estudios de pre-formulación permitirán decidir si se debe formular medicamentos con API en forma de ácidos o bases libres, o si se debe formular con API, solvatados o salificados. Muchos de estos factores deberán ser considerados por el formulador para de una u otra manera formular un producto farmacéutico óptimo.

La salificación de los API es el recurso químico más utilizado y que permite por una parte mejorar las condiciones de estabilidad de los fármacos y por otra, aumentar la solubilidad de los APIs, conduciendo así a una mejor velocidad de disolución de la forma farmacéutica, y permitiendo que el fármaco llegue con mayor rapidez a la circulación sistémica.<sup>10</sup>

Se puede mencionar como ejemplos de medicamentos formulados como sales a los analgésicos diclofenaco sódico o diclofenaco potásico, a los antibióticos cloxacilina sódica, flucloxacilina sódica y a los antidepresivos, clorhidrato de sertralina y clorhidrato de fluoxetina, entre muchos otros ejemplos.

La salificación de los API también es utilizada en algunos casos por los formuladores para poder controlar la velocidad de disolución y la velocidad con la que se entrega el fármaco al organismo. Un ejemplo son los medicamentos constituidos por penicilinas salificadas en la forma de sales de benzatina, que permiten disminuir la solubilidad de la droga en solución y por consiguiente lograr disminuir la velocidad en la entrega del fármaco al organismo.



**Figura 2.** Sales de fármacos más comúnmente empleadas en formas farmacéuticas.<sup>10</sup>

En forma similar se puede decir que los fármacos que se sintetizan en su forma anhidra, poseerán mejor solubilidad que los API sintetizados en su forma hidratada.

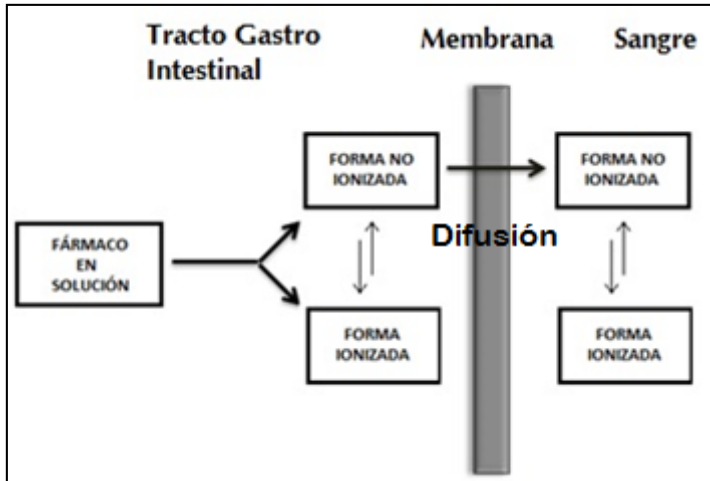
Para los estudios de bioexención, la velocidad de disolución entre el producto innovador y el producto en estudio es la herramienta clave que permite realizar una comparación entre sus cinéticas de disolución mediante el cálculo del factor de similitud,  $f_2$ . Este ensayo permite comprobar que la manufactura de distintos medicamentos que poseen el mismo API, en idéntica dosis molar, fabricados por diferentes laboratorios productores, independiente de si se utilizan los mismos o distintos tipos de excipientes, se comportarán de igual manera en términos de su velocidad de disolución, y a su vez permitirá concluir que ambos productos poseerán la misma biodisponibilidad y por consiguiente producirán el mismo efecto terapéutico. Esto se puede corroborar para un número de fármacos que son bien absorbidos a través del epitelio gastrointestinal y poseen una alta solubilidad en medio tamponados de pH fisiológicamente relevantes.

### 10.3.2. Factores que condicionan la absorción de los medicamentos

A nivel del tracto gastrointestinal, específicamente en la porción final del duodeno y la zona del yeyuno, corresponde al sitio anatómico del organismo destinado a la absorción de los nutrientes presentes en los alimentos, gracias a su extensa área superficial y a las condiciones de pH que posee esta región del tracto digestivo. Estas condiciones son también aprovechadas para la absorción de medicamentos, especialmente aquellos cuya solubilidad es pH dependiente.

La absorción pasiva de los fármacos puede ser descrita como un proceso de difusión controlada desde el lumen intestinal hacia la circulación sistémica. Para que los medicamentos puedan ser absorbidos por el organismo, es necesario que la forma farmacéutica en que está contenido el fármaco, libere el API y que éste se solubilice y disuelva a cierta velocidad, para luego poder difundir a través de la membrana epitelial intestinal y ser distribuidos hacia el lugar en donde ejercerá su acción farmacológica. El proceso se resume en la siguiente figura:



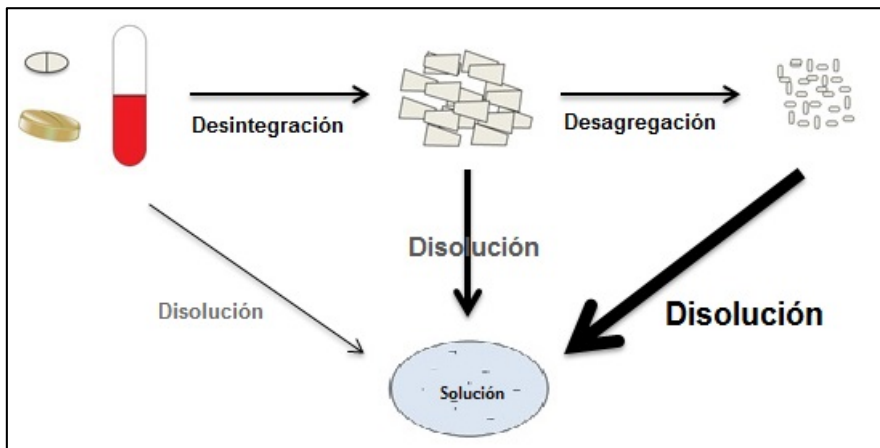


*Figura 3. Diagrama del proceso de absorción para formas farmacéuticas pH dependiente.*

### 10.3.3. Factores farmacotécnicos que inciden en la solubilidad del API.

#### 10.3.3.1 Disminución del tamaño de partícula

De acuerdo a la ecuación de Noyes-Whitney, a medida que las formas farmacéuticas solida orales, se van desintegrando en gránulos y luego desagregando a partículas más finas, el área de exposición de las partículas (soluto) en el solvente se hará cada vez más grande, y por consiguiente facilitará la disolución-solubilidad, lo que permitirá que el fármaco sólido pase a formar una solución y pueda llegar rápidamente a la circulación sistémica.<sup>11</sup>



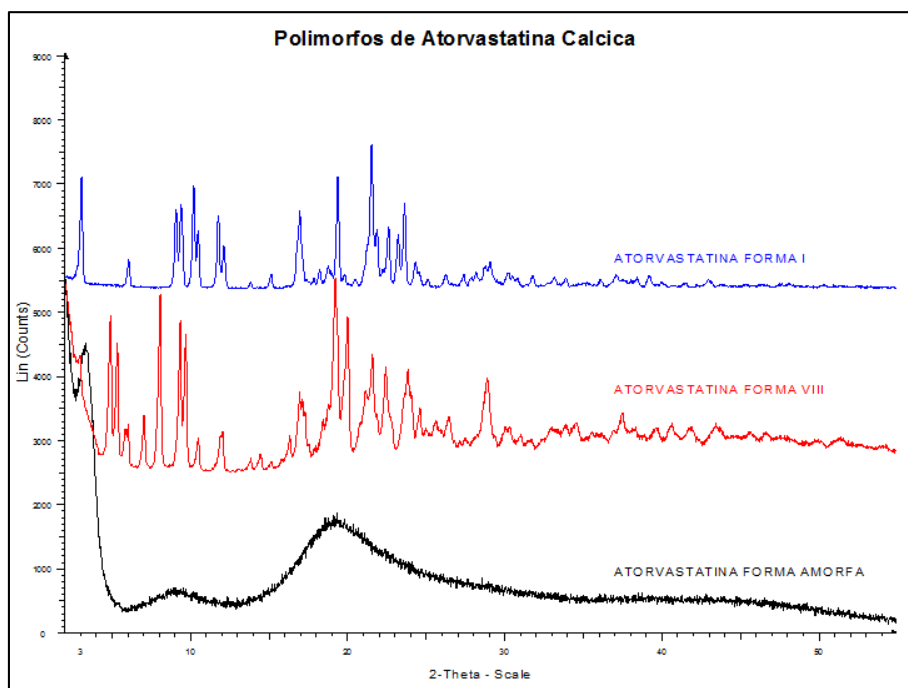
*Figura 4. Diagrama del proceso de liberación y disolución de un fármaco desde una forma farmacéutica sólida.*

Si bien el proceso de micronización permite mejorar la disolución-solubilidad al disminuir el tamaño de partícula, una molienda excesiva puede traer consigo otro tipo de problemas, como es la aglomeración del API, por la generación de cargas electrostáticas debido al aumento de energía libre superficial generada ( $\Delta G$ ).

### 10.3.3.2 Polimorfismo

El estado polimórfico es otro de los factores que condiciona las características fisicoquímicas de los elementos o moléculas. El ejemplo más claro es el polimorfismo que presenta el carbono. Dependiendo de las condiciones ambientales en las cuales se encuentre, el carbono puede existir como grafito o como diamante, siendo sus características fisicoquímicas diametralmente opuestas. Por una parte el diamante es el compuesto conocido de más alta dureza en la tierra, de aspecto transparente, que presenta un elevado punto de fusión y que posee un poder de conductividad térmica elevado y por otro lado, el grafito posee características completamente distintas, siendo un compuesto de textura blanda, aspecto opaco, que presenta un bajo punto de fusión y una baja conductividad térmica.

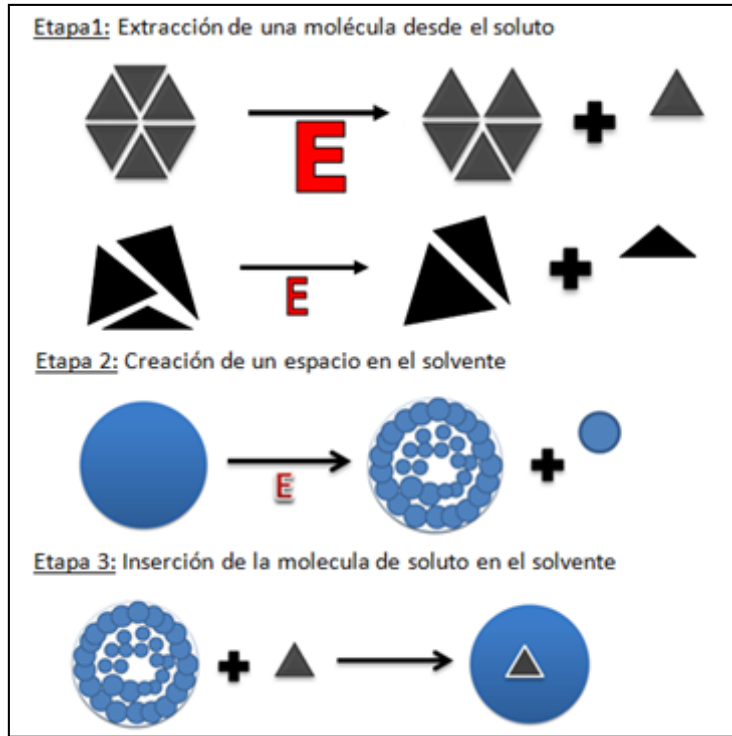
El estado polimórfico de los fármacos tiene incidencia también en las características de la solubilidad de estos, lo que condiciona la biodisponibilidad de los medicamentos formulados con una u otra forma polimórfica del API. El polimorfismo se define como la capacidad de un compuesto en estado sólido de coexistir en 2 o más formas de agrupación interna que presentan idéntica composición química. La técnica más utilizada para poder identificar las diferentes especies polimórficas que podría adoptar el API en su proceso de manufactura o cristalización corresponde a la difracción de rayos X. A diferencia de otras técnicas analíticas como la calorimetría diferencia de barrido (DSC) la difracción de rayos X es una técnica que posee la ventaja de requerir pequeñas cantidades de la materia prima y de no ser un análisis destructivo.



**Figura 5.** Diffractograma de rayos X a diferentes muestras de la droga atorvastatina cálcica. Fuente: Laboratorio de Cristalografía, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, U. de Chile.

Un API que se encuentra en su forma cristalina se caracteriza por poseer una estructura o red con un alto grado de ordenamiento interno, ya que en el proceso de cristalización, las moléculas que se encuentran distribuidas espacialmente, se disponen de forma regular u organizada, mientras que los compuestos en su forma amorfa poseen una estructura u ordenamiento espacial desorganizado.

Generalmente las formas amorfas son formas más solubles que las formas cristalinas. Esto se debe a que la cantidad de energía en el proceso de disolución-solubilidad, que se necesita para llevar una molécula desde una sustancia en estado cristalino sólido al disuelto, es mayor a la energía que se necesita para arrancar una molécula que se encuentra en estado amorfo. Esto se puede apreciar en la Figura 6.



*Figura 6. Etapas y energías requeridas en el proceso de disolución.*

Un caso muy citado en la literatura es el de Norvir cápsulas (Ritonavir) medicamento de laboratorios Abbott, utilizado en el tratamiento contra el Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en donde luego de 2 años del ingreso del fármaco al mercado se detectó en el proceso de producción, una segunda forma cristalina de ritonavir, más estable, pero 50% menos soluble que la forma polimórfica I, lo que se tradujo en una baja biodisponibilidad y el retiro de la forma farmacéutica del mercado, con las consecuencias de un pobre control de los síntomas de la enfermedad.<sup>12</sup>

### 10.3.3.3 pH y temperatura

Sin lugar a duda los factores que mayor incidencia tienen en la solubilidad de los fármacos son el pH del medio y la temperatura del medio de disolución en el cual estos se encuentren.<sup>13</sup> Es por ello que los ensayos de agitación en matraces saturados con activos, para medir solubilidad de equilibrio o termodinámica, son realizados a temperatura controlada de  $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$  que corresponde a la temperatura corporal. Un aumento en la temperatura del ensayo, generará una mayor colisión entre las partículas de soluto y solvente que están en suspensión, aumentando la solubilidad (mayor energía cinética), en tanto una disminución de la temperatura generará el fenómeno contrario.

La mayoría de los medicamentos del arsenal terapéutico corresponden a moléculas de carácter electrolito débil, predominando las bases débiles por sobre los ácidos débiles. Los fármacos de

carácter débil poseen la capacidad de disociarse parcialmente, en su forma ionizada y no ionizada dependiendo del pH del sitio en el cual se encuentren y de su valor de pKa, característica intrínseca de cada fármaco. Así, cuando éstos se encuentran en su estado ionizado, los fármacos serán más solubles que cuando se encuentren en su estado no ionizado.

El pKa se define como la transformación logarítmica de la constante de disociación ácida, que es la medida cuantitativa de la fuerza con la que los protones se encuentran unidos a una molécula en solución.<sup>14</sup>

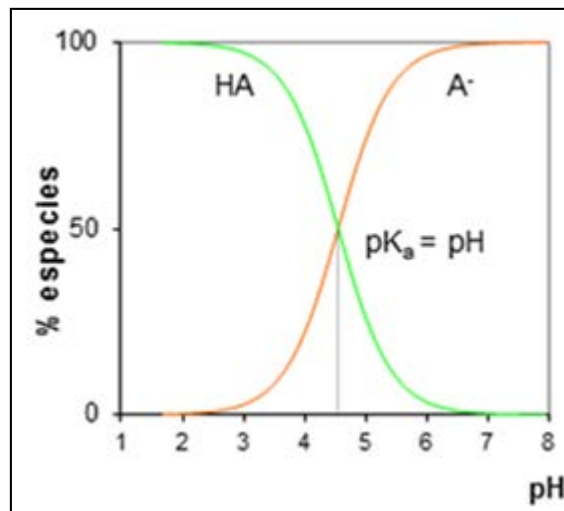
La ecuación de Henderson-Hasselbach es una expresión matemática que permite cuantificar cómo varía la fracción protonada o ionizada y la fracción no ionizada de la molécula en función de su pKa, dependiendo del pH del medio en el cual se encuentre:

$$pK_a = pH + \log \frac{[HA]}{[A^-]}$$

*Ecuación 2. Ec. de Henderson-Hasselbach; relación de la porción ionizada y sin ionizar de un electrolito débil en función del pH y su pKa.*

Aplicando esta ecuación se puede observar que al pH en donde la especie ionizada y no ionizada se encuentren en una proporción de 50%, éste corresponderá al pKa de la molécula.

De acuerdo a esta ecuación, para el caso de los ácidos débiles, cuando el pH sea inferior en 2 unidades al valor de pKa de la molécula, la especie se encontrara 99% en su forma no ionizada, mientras que cuando el pH sea 2 unidades superior al pKa, la especie se encontrara 99% en su fracción ionizada. (Caso contrario ocurre como los compuestos de carácter básico débil).<sup>15</sup>



*Figura 7. Porcentajes de una especie ácida dependiente del pH.*

## 10.4. Métodos para la determinación de la solubilidad

### **10.4.1. Shake Flask o método de agitación hasta saturación en matraces.**

Dentro de las metodologías existentes para la medición de la solubilidad de los fármacos, el método tradicional, y que es además considerado como el gold estándar, con el que deben validarse las nuevas metodologías, corresponde a la medición de la solubilidad termodinámica por el método de agitación de matraces saturados propuesto por Higuchi y Connors.<sup>16</sup>

Este método parte de la premisa de que para poder cuantificar la solubilidad, la fase sólida (sólido) debe alcanzar un estado de equilibrio con la fase líquida (solución). Para lograr esta condición de equilibrio, se debe añadir un exceso de muestra sólida a una solución tamponada, con el objetivo de asegurar que coexista el soluto y el solvente en forma simultánea. En el ámbito de los medicamentos, la mayoría de los fármacos presentan un carácter básico, mientras que otros, como el grupo de los AINES, presentan un carácter ácido. Es importante entonces que la disolución de estos fármacos se realice en un medio tamponado en donde no se permita que exista una variación del pH como consecuencia del carácter ácido-base de la molécula. La medición de solubilidad en un medio no tamponado generará un cambio de pH del medio y consecuentemente la medición de la concentración de soluto en un pH distinto al cual se quiere hacer la medición. Cabe hacer notar que para algunos pocos principios activos, que presentan características distintas a las mencionadas anteriormente, como es el caso de la prednisona, que no posee grupos ionizables, no tiene lógica el ejecutar perfiles de solubilidad dependientes del pH, dado que no corresponden a electrolitos débiles. En tales casos, bastará con demostrar la alta o baja solubilidad en un medio de pH tamponado cercano a 6,8. De la misma forma, especial cuidado deberá tenerse cuando el API posea más de un grupo ionizable, en cuyo caso es factible que los grupos posean cargas contrarias, y a un determinado pH se encuentre la forma zwitteriónica del fármaco. En estos casos, el perfil pH solubilidad presentará una característica zona intermedia de mínima solubilidad (denominado punto isoeléctrico) como sucede con el fármaco pregabalina.

Es importante también señalar que el tiempo de agitación que demore en alcanzar el plateau o estado estacionario de solubilidad va a depender de múltiples factores, en donde además se debe tener en consideración que es necesario inspeccionar que al momento de alcanzar el estado de equilibrio termodinámico, éste se mantenga en el tiempo ya que podrían existir transformaciones polimórficas o degradación del fármaco, que interferirán en la investigación y no permitirán encontrar el valor real de la solubilidad.

Si bien es posible sonicar la muestra para reducir el tiempo de agitación, en términos generales, para los fármacos que presentan baja solubilidad, se estima que el equilibrio de solubilidad se alcanza luego de 24 horas de agitación constante.<sup>17</sup>

Una vez que ha transcurrido el tiempo de agitación necesario, se debe realizar una separación de la fase sólida, respecto de la solución saturada (fase líquida) en donde se cuantifica el fármaco disuelto. Esta separación puede realizarse mediante técnicas sencillas como filtración o centrifugación.

#### **10.4.1.1 Shake Flash y SCB**

Para poder clasificar a los fármacos de acuerdo al SCB, se debe conocer la solubilidad del fármaco dentro de todo el rango de pH fisiológico y por lo tanto, siguiendo la metodología de la agitación de los matraces saturados, se hace necesario realizar ensayos para la medición de la solubilidad termodinámica en diferentes medio de pH tamponados.

De acuerdo a lineamientos nacionales e internacionales <sup>4,5,8</sup> para generar un perfil de solubilidad dentro del rango de pH fisiológico, se deben escoger 5 medios tamponados en los cuales se realizará el ensayo de solubilidad. La elección de estos medios va a estar condicionada de acuerdo al valor de pKa que presente el fármaco en estudio. Así, como condición general se estableció que la solubilidad termodinámica debe ser medida a los pH 1,0; pKa+1; pKa; pKa-1 y pH 6,8, cubriendo así todo el rango de pH fisiológico.

La solubilidad intrínseca o mínima solubilidad dentro del pH de rango fisiológico,<sup>18</sup> se podrá observar fácilmente graficando la solubilidad obtenida en cada uno de los medios tamponados antes mencionado y de acuerdo a la Ecuación 1, poder clasificar al fármaco, como de alta o baja solubilidad conforme al cálculo del número de dosis, Do.

## **10.4.2. Método potenciométrico**

En el año 2001 Avdeef y cols., desarrollaron un método potenciométrico que permite la caracterización de especies químicas con uno o más grupos ionizables en cuanto a sus características de LogP, pKa y Solubilidad intrínseca, utilizando pequeñas cantidades del fármaco y que fue de gran importancia en la caracterización o screening de un número importante de potenciales nuevos medicamentos, gracias a su capacidad de entregar resultados experimentales utilizando pequeñas cantidades de API.

Este equipo semiautomático de adición ácido-base y medición potenciométrica, llamado Gemini Profiler, permite determinar la solubilidad intrínseca por medio de un proceso cinético de solubilidad.

### **10.4.2.1. Identificación y funcionalidad de equipo potenciométrico**

El equipo Gemini Profiler consta de una red de pequeños canales de fibra de vidrio que permiten el transporte de las soluciones titulantes HCl y KOH, con las cuales irá cambiando el pH dentro de la muestra problema, KCl como un medio de disolución y que aporta la fuerza iónica al medio, y gas Argón, un gas inerte, pesado, que a flujo constante y superficial tiene como misión desplazar el CO<sub>2</sub> presente en el aire, que al disolverse en el medio acuoso genera bicarbonato, lo que provocaría cambios de pH, interfiriendo en la medición potenciométrica.

El equipo posee además un armazón en donde incorpora una chaqueta de agua dotada de agitación magnética, que tiene como función mantener constante la temperatura a la que se efectúe el ensayo de solubilidad y ser el receptáculo de los viales de ensayo, dando una agitación vigorosa a las muestras. Como se mencionó con anterioridad, este punto es muy importante ya que permite lograr una agitación hasta alcanzar un estado de equilibrio cinético y mantener una temperatura constante. Se debe tener presente que cambios en la temperatura afectarán el número de colisiones que existan entre el soluto y el solvente lo que finalmente afectará la medición de la solubilidad.

Por último, la parte más importante de este equipo Gemini Profiler lo constituye el electrodo de vidrio, cuya función es la medición de los cambios potenciométricos en la solución de medición, cambios que posteriormente podremos interpretar y obtener los valores de pKa y de solubilidad intrínseca de la muestra problema.

Al ser éste un equipo de titulación potenciométrica, es necesario realizar tanto una caracterización del electrodo, como una calibración en cuanto a las concentraciones de los titulantes, para así obtener resultados exactos, precisos y confiables.

El electrodo de vidrio es caracterizado mediante la obtención de los coeficientes ABC (Avdeef Bucher Coefficients)<sup>19</sup>, que establecen la relación entre la respuesta del electrodo versus el pH, usando 4 parámetros que dan cuenta de la pendiente ( $K_s$ ), el intercepto con el eje X ( $\alpha$ ), y la fuerza de cada uno de los titulantes ( $J_H$  y  $J_{OH}$ ).

Lo valores de aceptación de tales pruebas son expresados numéricamente como GOF (goodness of fit).



**Figura 8.** Fotografía frontal del equipo de titulación semiautomática Gemini Profiler. (baño termoregulado a la derecha).

Los resultados de una titulación potenciométrica son representados normalmente por una curva de volumen de titulante versus pH, la cual se denomina curva de titulación. La forma de esta curva puede sugerir si la especie es un ácido, una base o incluso un anfótero y puede mostrar el pKa de la especie, dado por el punto de inflexión. Sin embargo, en moléculas que poseen 2 o más pKa, no siempre es posible determinar el pKa con una simple observación de la curva. Con el equipo Gemini Profiler se puede hacer uso de una forma gráfica llamada el gráfico de Bjerrum que permite determinar en forma visual todos los pKa que posee una molécula, independiente de la complejidad o superposición de sus pka.<sup>20</sup>

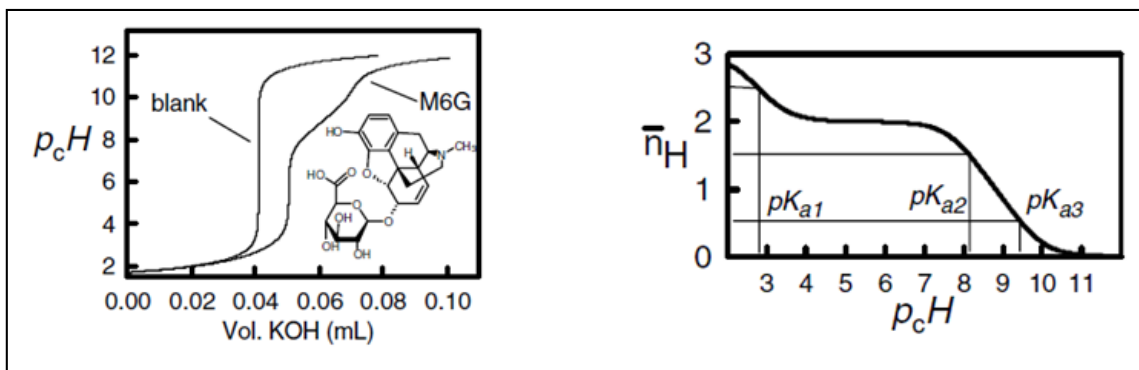


Figura 9. Gráficos que representan el método para la obtención de la representación de Bjerrum.

En la determinación de la solubilidad el potenciómetro requiere previamente de los datos experimentales de pKa, ya que la medición de la solubilidad intrínseca se realiza de acuerdo a un corrimiento del valor de pKa cuando existe un precipitado en la muestra problema; este valor es denominado pKa aparente (pKa<sub>app</sub>).<sup>19</sup>

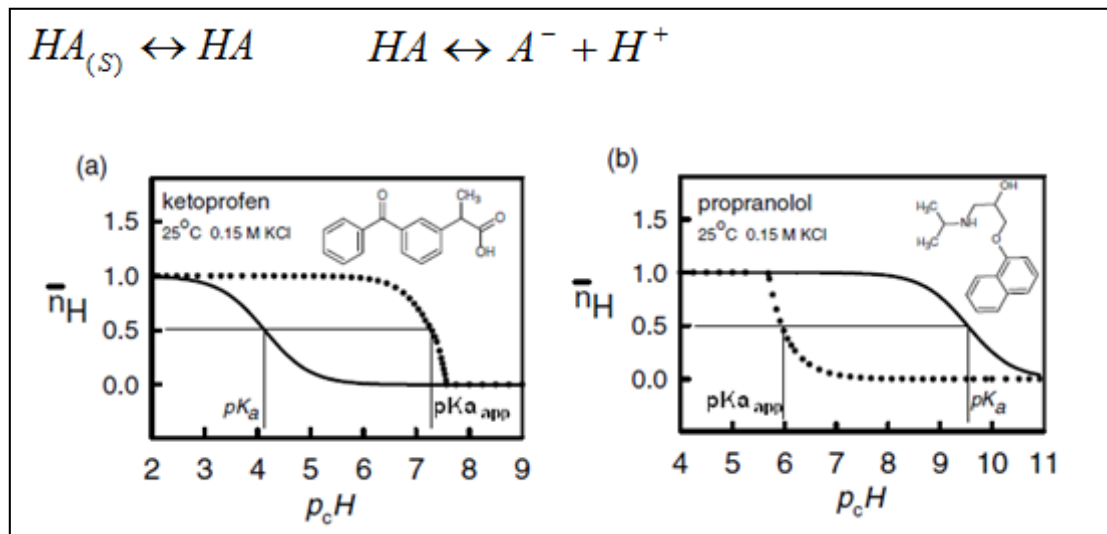


Figura 10. Gráficos que representan el corrimiento de pKa, condicionado por la presencia de un precipitado.

En una primera etapa es necesario realizar un ensayo de pKa experimental, en donde la condición fundamental es que se analice una solución problema homogénea, de manera que no exista una fase sólida que interfiera con la medición.

Luego de obtener el o los valores experimentales de pKa y dependiendo de la lipofilia de la molécula, determinada de acuerdo a su coeficiente de partición (logP), el equipo podrá ser utilizado para realizar la medición de la solubilidad intrínseca y en donde la condición fundamental, será ahora, que exista un precipitado en la solución problema, o dicho de otra manera que haya una solución saturada, asegurando esta condición con un exceso de fase sólida.

Con los valores de pKa y LogP el equipo simulará una curva de titulación y determinará qué cantidad de disolvente es necesaria y cuánto tiempo de agitación se requiere para alcanzar un equilibrio cinético antes de cada medición de pH.

La obtención de la solubilidad intrínseca se basa en la diferencia de pKa y pKa<sub>app</sub> según la siguiente ecuación:

$$\log S_o = \log \frac{C}{2} - [pK_a^{app} - pK_a]$$

Ecuación 3. Fórmula para el cálculo de la solubilidad intrínseca



Como se mencionó con anterioridad, cuando co-existen la fase sólida y la fase líquida en solución, se establecen 2 equilibrios en el medio y el cálculo de la solubilidad queda establecido por la sumatoria de la concentración de todos los compuestos presentes en esa solución.

Especies presentes en una solución saturada.

$$S = [A^-] + [HA]$$

En esta solución saturada, representada por S, la expresión [HA] es considerada una constante, mientras que [A<sup>-</sup>] es variable. Así podemos obtener la ecuación para el cálculo de la solubilidad en función de la solubilidad intrínseca, en términos de una sola variable, pH, para luego graficar solubilidad versus pH.

Cálculo de solubilidad a partir de la solubilidad intrínseca.

$$S = [A^-] + [HA] \quad K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]}$$

$$S = \frac{[HA]K_a}{[H^+]} + [HA] = [HA] \left( \frac{K_a}{[H^+]} + 1 \right)$$

$$S = S_o \left( 10^{-pK_a + pH} + 1 \right)$$

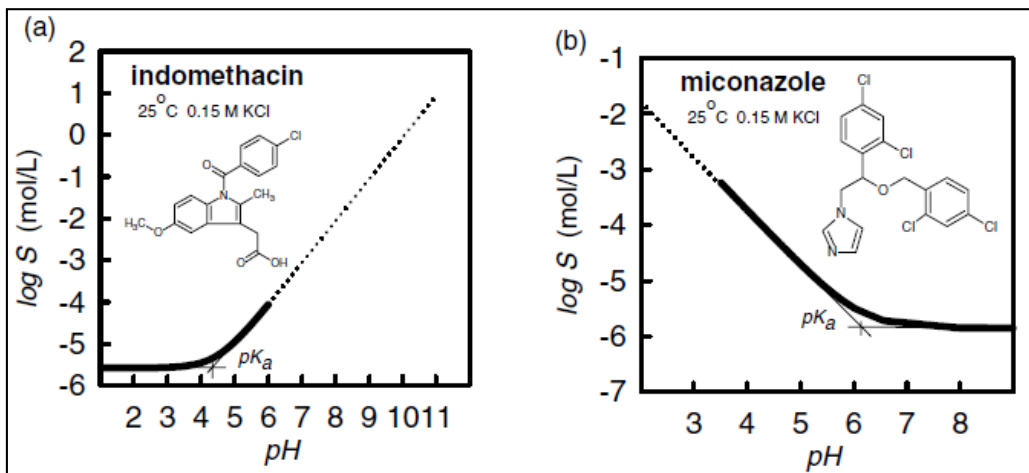


Figura 11. Forma gráfica de determinación de la solubilidad intrínseca en función del pH.

El equipo Gemini Profiler permite por otra parte el uso de co-solventes en el caso de API's que posean una muy baja solubilidad y en donde sea difícil obtener valores de pKa. Los co-solventes principalmente utilizados son la mezcla metanol-agua o dimetil sulfóxido (DMSO) que generan una disminución de la constante dieléctrica del medio, aumentando la solubilidad del compuesto de una forma aparente, bajo el concepto de pKa falso o aparente (p<sub>s</sub>K<sub>a</sub>). Los resultados logrados por el equipo, son luego extrapolados a concentraciones de co-solvente cero para la obtención del pKa acuoso real de la molécula.

La principal ventaja a simple vista, en comparación con el método de los matraces agitados es la cantidad de muestra que se requiere para el análisis, disminuyendo así el uso de reactivos y permitiendo la realización de 3 titulaciones por muestra (por medio de un proceso cinético).

El método potenciométrico para la medición de la solubilidad a través del equipo Gemini Profiler fue correlacionado exitosamente contra el método gold estándar de agitación de los matraces saturados.<sup>21</sup>

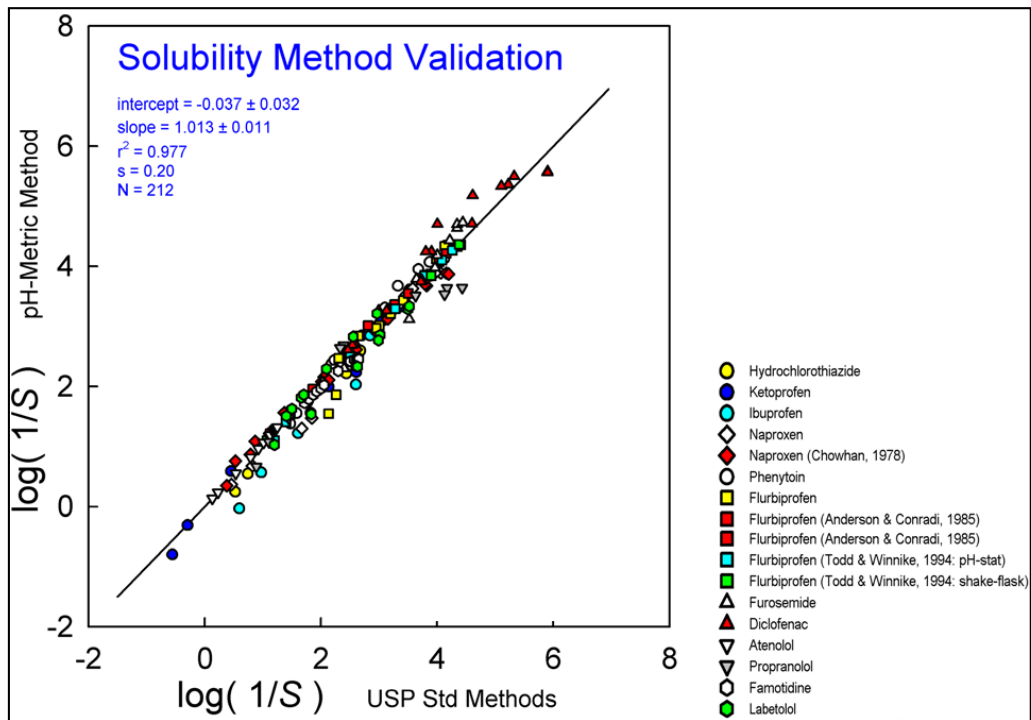


Figura 12. Correlación para varios fármacos entre el método de solubilidad en matraces y método potenciométrico.<sup>22</sup>

## 10.5. Reflexión

Debe destacarse el hecho de que ambas metodologías para la medición de la solubilidad descritas en este capítulo, fueron desarrolladas con un propósito neto de investigación, mientras que el SCB, según los fundamentos establecidos por Gordon Amidon tiene como objetivo principal clasificar a los fármacos en cuanto a sus características de solubilidad acuosa y permeabilidad intestinal, con el fin de subrogar estudios de bioequivalencia in vivo.

En este sentido, y sin dejar de lado las consideraciones discutidas a lo largo de este capítulo, es que se podría esbozar un ensayo más simple para los fármacos que preliminarmente muestren una alta solubilidad, y en donde llegar a obtener una solución a saturación podría significar un problema en conceptos de costos para la industria, dado las cantidades necesarias para saturar y la naturaleza destructiva del ensayo.

Este ensayo de cuantificación, siguiendo la definición de fármacos de alta solubilidad que establece “Que la potencia farmacológica más alta sea soluble en 250 mL de medio dentro de todo el rango

fisiológico” puede ser realizado disolviendo el equivalente al 100% de la potencia farmacológica más alta del API en 250 mL de medio acuoso, o una proporción de éste, agitando la solución/dispersión por el tiempo necesario hasta alcanzar el plateau de solubilidad, para evaluar si efectivamente la totalidad del fármaco es soluble en los 250 mL de medio.

Este ensayo debiera ser planteado de acuerdo a los lineamientos nacionales e internacionales establecidos por la agencias regulatorias de medicamentos en “5 mediciones en los distintos medios pH 1,2; pKa-1; pKa; pKa +1 y pH 6,8, a una temperatura controlada de  $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ”.

## EJERCICIOS PROPUESTOS

1.- Proponga el diseño y ejecución de un estudio de solubilidad para los siguientes fármacos:

- a) Ibuprofeno (pKa = 4,5)
- b) Escitalopram (pKa = 9,5)
- c) Prednisona (pKa = no presenta)

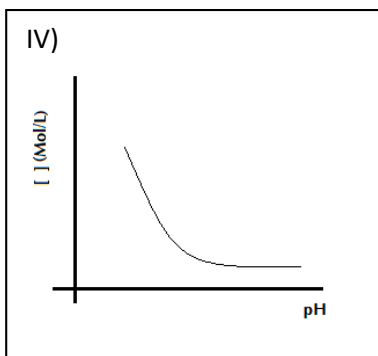
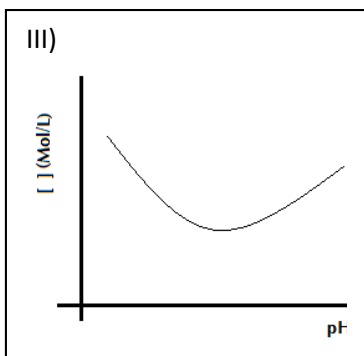
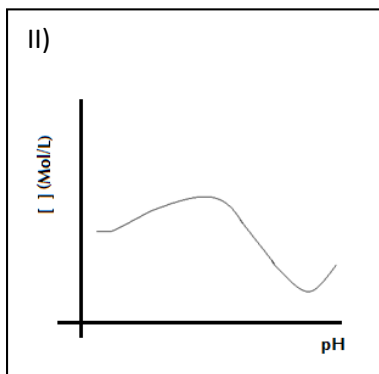
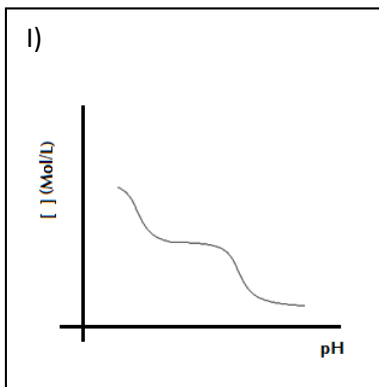
2.- De acuerdo al sistema de clasificación biofarmacéutico y a los valores que a continuación se indican. ¿Qué fármaco presenta una baja solubilidad?

Solubilidad intrínseca griseofulvina = 0,024 mg/mL

Solubilidad intrínseca digoxina = 0,015 mg/mL

3.- Correlacione los gráficos de solubilidad versus pH con las siguientes especies químicas.

- a) Acido
- b) base
- c) Zwitterión



---

<sup>1</sup> Annex 7: Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability. WHO Technical Report Series N° 937. Geneva: WHO; 2006.

<sup>2</sup> Kamal K. Midha and Gordon McKay “Bioequivalencia; its history, practice and future” AAPS journal 2 (4), 2009.

<sup>3</sup> USA, Food and Drug Administration (FDA) “Guidance for Industry, Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations” 2003.

<sup>4</sup> USA, Food and Drug Administration (FDA) “Guidance for industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms based on Biopharmaceutics Classification System”. 2000.

<sup>5</sup> EU, European Medicines Agency (EMA) “Guideline on the investigation of bioequivalence” 2010.

<sup>6</sup> Gobierno de Chile, Ministerio de salud “Norma que define los criterios destinados a establecer equivalencia terapéutica a productos farmacéuticos en Chile” 2005.

<sup>7</sup> Gordon L. Amidon, Hans Lennernas, Vinod P. Shah and Jhon R. Crison “A Theoretical Basis for a Biopharmaceutics Drug Classification: The correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability”. Pharm Res, 12 (3): 413-420, 1995.

<sup>8</sup> Gobierno de Chile, Instituto de Salud Pública, Sub Departamento de Biofarmacia & Bioequivalencia “Guía técnica G-BIOF-02: Bioexención de los estudios de Biodisponibilidad/Bioequivalencia para establecer Equivalencia Terapéutica de Formas Farmacéuticas Sólidas Orales”. 2007.

<sup>9</sup> Abolghasem Jouyban “Handbook of solubility data for pharmaceuticals” 2010.

<sup>10</sup> Lokesh kumar, Aeshna Amin, Arvind K Bansal. Pharm. Technol. 3 (32), 2008

<sup>11</sup> Noyes, A.A. y Whitney W.R., J. Am. Chem. Soc., 19; 930-934, 1897.

<sup>12</sup> John Bauer, Stephen Spanton and cols "Ritonavir:an extraordinary example of conformational polymorphism" Pharmaceut res 18 (6), 2001.

<sup>13</sup> Edit Baka, Jhon E.A. Comer, KrisztinaTakács-Novák “Study of equilibrium solubility measurement by saturation shake-flask method using hydrochlorothiazide as model compound” J Pharm Biomed 46: 335-341, 2007.

<sup>14</sup> Fundamentos de química analítica. Por Skoog D., West D., Holler F.J. and Crouch S. 8va ed. Thomson. 1983.

<sup>15</sup> Study of pH-dependent solubility of organic bases. Revisit of Henderson-Hasselbalch relationship. Por GergelyVolgyi, Edit Baka, Karl J. Box, John E.A. Comer, KrisztinaTakács-Novák. Anal Chim Acta. 40-63, 2010.

<sup>16</sup> Higuchi T, Connors KA. Phase-solubility techniques. Adv. Anal. Chem. Instrum. 4: 117–212, 1965.

---

<sup>17</sup> EPA product properties test guidelines OPPTS 830.7840 water solubility: column elution method; shake flask method.

<sup>18</sup> Palmer, Antonio Llinás, y Cols "Predicting Intrinsic Aqueous Solubility by a Thermodynamic Cycle" *Mol Pharm* 5(2): 266-279, 2008.

<sup>19</sup> Alex Avdeef: *Absorption and Drug Development, solubility, permeability and charge state*, 2003.

<sup>20</sup> Alex Avdeef "Physicochemical profiling (Solubility, Permeability and Charge State)" *Curr Top Med Chem* 1(4): 288-351, 2001.

<sup>21</sup> Avdeef A, Berger CM, Brownell C "pH-metric solubility. 2: correlation between the acid-base titration and the saturation shake-flask solubility-pH methods" *Pharm Res* 17 (1); 9-85, 2000

<sup>22</sup> Capacitación equipo Gemini Profiler, Dana Lipp "Gemini Profiler™ installation and Advanced Training". 2009.

# 11. Sección solubilidad: Métodos *in silico* para la predicción de la solubilidad de fármacos. Aproximaciones al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico

Miguel Ángel Cabrera-Pérez<sup>a</sup>, Hai Pham The<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas / Centro de Bioactivos Químicos /  
Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica  
Cuba.*

<sup>b</sup>*Universidad de Farmacia de Hanoi / Departamento de Farmacología  
Vietnam*

## 11.1 Introducción

La solubilidad de un compuesto se define como la cantidad de sustancia que ha pasado a solución una vez que se ha alcanzado el equilibrio entre la solución y el exceso de sustancia no disuelta, a un valor de temperatura y presión determinado. La solubilidad es una propiedad de interés en muchas áreas de investigación siendo particularmente importante en la industria farmacéutica donde está relacionada con las propiedades farmacocinéticas y toxicológicas<sup>1</sup>. La determinación de la solubilidad de un fármaco ha de ser de forma precisa para evaluar las concentraciones que el fármaco alcanzará en el sitio de acción, establecer el nivel terapéutico y evitar la toxicidad. La importancia de la solubilidad en la absorción intestinal y la biodisponibilidad de un fármaco, ha hecho que sea una de las propiedades que definen el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.

La necesidad de métodos capaces de predecir la solubilidad acuosa, a partir de la estructura química (*in-silico*), en las etapas iniciales del proceso de descubrimiento de fármacos, se ha visto acentuada por el desarrollo acelerado de la química combinatoria y el cribado de alto flujo. Los compuestos obtenidos por estos

métodos tienden a una mayor lipofilia y a una presumible baja solubilidad acuosa en comparación a los obtenidos por estrategias sintéticas convencionales.

Diversas han sido las metodologías utilizadas para la predicción de la solubilidad acuosa, pudiendo dividirse en tres grandes categorías: 1- métodos que usan propiedades físico-químicas experimentales como coeficiente de partición, puntos de fusión, puntos de ebullición, volúmenes molares, etc.; 2- métodos basados en descriptores tales como descriptores físico-químicos, propiedades moleculares, y/o una colección de características estructurales relevantes relacionadas con la actividad y/o propiedad biológica a través de diversas técnicas estadísticas como regresión lineal múltiple y redes neuronales, y 3- métodos basados en contribuciones de grupo. No obstante, la mayoría de estos modelos tienen una limitada aplicación durante el proceso de optimización de nuevos candidatos a fármacos ya que no consideran la dosis del fármaco.

Tomando en consideración que los compuestos con valores similares de solubilidad acuosa pudieran tener diferentes valores de absorción, se ha utilizado un parámetro adimensional denominado *Número de Dosis* ( $D_0$ ) para clasificar la solubilidad de los fármacos. Idealmente, cualquier modelo computacional para predecir el efecto de la solubilidad sobre la absorción debe basarse en el concepto de  $D_0$  para una mejor caracterización de la solubilidad del fármaco. Sin embargo, muy pocos trabajos han estudiado en profundidad este parámetro, lo que hace que la aplicación de modelos computacionales para la predicción de la solubilidad en el marco del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico ha sido limitada.

La importancia de la solubilidad sobre la absorción de fármacos queda reflejada en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico. Es por ello que el objetivo general de este capítulo es brindar una panorámica general sobre el procedimiento de modelación computacional de la solubilidad, sus perspectivas y potencial aplicación dentro del marco del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.

## **11.2 Desarrollo de los modelos computacionales para la predicción de la solubilidad**

La mayoría de los modelos computacionales para la predicción de la solubilidad de fármacos son modelos empíricos de relación cuantitativa/cualitativa estructura-propiedad (QSPR), donde los modelos son entrenados con diversos grupos de datos de solubilidad que son tomados de la literatura, de bases de datos corporativas o generados específicamente para fines de modelación. Por lo tanto, no es una

sorprende que la calidad del modelo computacional para predecir esta propiedad depende de la calidad de los datos de solubilidad medidos experimentalmente y utilizados para obtener el modelo, así como de la validación de los mismos.

La confección de los modelos QSPR de solubilidad contempla la construcción de las bases de datos, el cálculo de los descriptores moleculares, el diseño de las series de entrenamiento y predicción, y como tal, el desarrollo y validación de los modelos. Todo lo anterior se expone en el presente epígrafe bajo un análisis de los modelos descritos en la literatura y a la luz de los principios regulatorios establecidos por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) para la validación de los modelos computacionales<sup>10</sup>.

### **11.2.1 Metodología general para los estudios QSPR.**

El objetivo de cualquier estudio de relación cuantitativa estructura-propiedad (QSPR) es el de desarrollar modelos con una significativa capacidad predictiva. Sin embargo, desde el surgimiento de esta metodología hace unos 50 años se han desarrollado numerosos modelos computacionales donde se le ha prestado muy poca atención al proceso de validación de los mismos<sup>11</sup>.

Diversos esquemas de estudios de relación cuantitativa estructura-propiedad (QSPR) se han descrito en la literatura, sin embargo no es hasta el 2007 cuando la OCDE hace un esfuerzo para articular los principios de la metodología QSPR y desarrollar una guía para la utilización de los modelos QSPR en aplicaciones regulatorias. En este sentido la OCDE establece cinco puntos fundamentales para garantizar la transparencia en el proceso de validación y la fiabilidad de los modelos QSPR. Los puntos establecidos son: 1- una actividad y/o propiedad definida, 2- un algoritmo no ambiguo, 3- un dominio de aplicación definido, 4- mediciones apropiadas de la bondad de ajuste, robustez y predictibilidad, y 5- una interpretación mecanística, siempre que sea posible.

Siendo consecuente con los modelos computacionales para la predicción de la solubilidad, la mayoría de ellos fueron desarrollados antes de lo planteado por la OCDE por lo que de forma general su aplicabilidad ha sido limitada.

Un esquema general para el desarrollo y aplicación de los modelos QSPR se aprecia en la Figura 1. Una descripción del procedimiento la veremos a continuación a través de su aplicación en la predicción de la solubilidad de los fármacos.



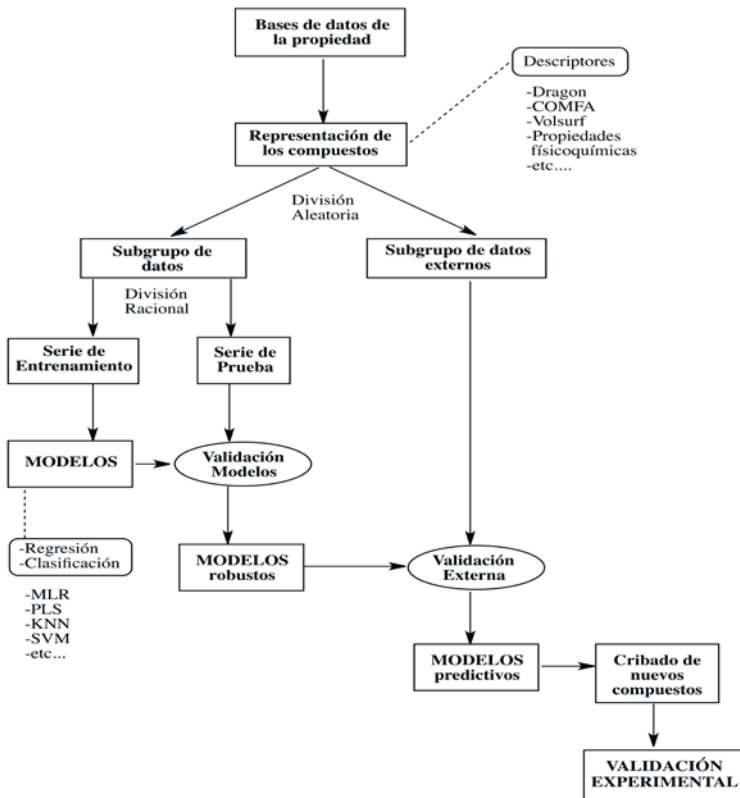


Figura 1. Flujo de trabajo de un estudio QSPR

## 11.2.2 Bases de datos de solubilidad.

Uno de los aspectos de mayor importancia en el desarrollo de cualquier modelo QSPR es la disponibilidad de datos experimentales relevantes y precisos. La selección del conjunto de datos es un proceso extremadamente importante ya que cualquier error en la estructura de los compuestos puede conducir a una pérdida significativa de la capacidad predictiva de los modelos. Comúnmente los datos experimentales colectados provienen de la literatura por lo que se deben seleccionar lo más homogéneamente posible. Muchos autores plantean la necesidad de un proceso de curación de los datos experimentales antes de comenzar el proceso de modelación<sup>12</sup>. Estos conjuntos de datos deben ser lo suficientemente grandes para cubrir un amplio espacio de diversidad estructural que permita alcanzar modelos de mayor capacidad predictiva y aplicabilidad. Las principales

conjuntos de datos descritos en la literatura con valores experimentales de solubilidad, que se han utilizado para el desarrollo de modelos QSPR, se detallan en la Tabla 1.

*Tabla 1. Conjuntos de datos de solubilidad acuosa descritos en la literatura y utilizados para el desarrollo de modelos QSPR.*

Conjuntos de datos	Referencias
Solubilidad acuosa	1, 4, 6, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23

Aunque varios conjuntos de datos de solubilidad acuosa se han descrito en la literatura, muy pocos tienen la calidad y diversidad estructural deseada, lo que reduce la robustez y la capacidad predictiva de los modelos obtenidos<sup>24</sup>. Muchos de estos conjuntos de datos son compilaciones de la literatura y solamente muy pocos de ellos representan los resultados de experimentos controlados<sup>25</sup>.

### 11.2.3 Descriptores moleculares.

Los descriptores moleculares son el resultado final de procedimientos matemáticos que permiten transformar la información química, codificada dentro de la representación simbólica de las moléculas, en números útiles<sup>26</sup>. Los descriptores moleculares nos permiten encontrar correlaciones estructura-propiedad y permite hacer búsquedas sub-estructurales y de similitud. Numerosas metodologías se han desarrollado para generar descriptores moleculares y programas como el Dragón<sup>27</sup>, CDK<sup>28</sup>, Modeslab<sup>29</sup>, Volsurf<sup>30</sup>, etc. son capaces de calcular miles de descriptores moleculares. Muchos de ellos se han utilizado para correlacionar la solubilidad con la estructura química. Entre ellos, los descriptores con información unidimensional (1D), bidimensional (2D) y tridimensional (3D) han demostrado su utilidad para obtener modelos robustos y predictivos. La utilización de un tipo u otro de descriptor depende del objetivo final con el que se hace el modelo. Por ejemplo, aunque los descriptores 1D muchas veces no brindan modelos robustos, precisos y de gran capacidad predictiva, su rápido cálculo y la posibilidad de permitir una interpretación mecanística de la solubilidad de los fármacos hacen interesante su utilización sobre todo para el cribado masivo de grandes bibliotecas de nuevos compuestos. Los descriptores 2D, obtenidos del grafo molecular, pueden ser calculados rápidamente, aunque su naturaleza topológica muchas veces hace difícil su interpretación para obtener una clara relación entre la estructura y las propiedades ADME<sup>31</sup>. Los descriptores 3D contienen información geométrica de la molécula, y aunque capturan una información más importante comparado con los otros descriptores, su principal problema es la selección correcta de la

conformación 3D. Muchos de estos descriptores se han utilizado para predecir la solubilidad de fármacos, aunque ellos difieren en complejidad y velocidad de cálculo.

Una vez calculados los descriptores moleculares a los compuestos de la base de datos y antes de proceder al desarrollo de los modelos QSPR, se realiza una separación aleatoria de los compuestos en la base de datos. Aproximadamente, entre un 20-25% de la base de datos es extraída aleatoriamente y utilizada para validar los modelos finales (validación externa). El resto de los compuestos ( $\approx 80\%$ ) se utilizan para obtener los modelos. Este grupo de moléculas es nuevamente dividido, por métodos estadísticos, en una serie de entrenamiento (80% de los compuestos) que es con la que finalmente se obtienen los modelos y en una serie de prueba (20%) que se utiliza para demostrar la robustez de los modelos creados.

Para el desarrollo de los modelos computacionales se utilizan diversas metodologías estadísticas que detallaremos a continuación.

### **11.2.4 Metodologías estadísticas para la obtención de los modelos computacionales**

La selección de una adecuada metodología estadística es muy importante si queremos alcanzar resultados precisos en la predicción de la solubilidad. Dentro de los muchos factores que conllevan a que sea difícil modelar estas propiedades utilizando aproximaciones QSPR convencionales resaltan como las de mayor importancia, la calidad/cantidad del dato experimental y la complejidad biológica de la propiedad<sup>32</sup>. En este sentido, un amplio rango de técnicas estadísticas diferentes han sido implementadas para desarrollar modelos predictivos de solubilidad.

En el caso de la predicción de la solubilidad los métodos de regresión lineal multivariada (MLR) y mínimos cuadrados parciales (PLS) han sido los métodos lineales más empleados. Los MLR son muy fáciles de usar y aunque las correlaciones obtenidas entre los descriptores y la solubilidad son directas y transparentes muchas veces existe auto-correlación entre los descriptores de los modelos y pocos compuestos por descriptor utilizado, conduciendo a modelos triviales y sobre-ajustados. Los PLS son capaces de reducir estas dificultades, reduciendo sustancialmente el número de descriptores a pocos componentes ortogonales. Aunque los métodos lineales son preferidos por su más fácil interpretación, muchas veces se han utilizado métodos no-lineales como las redes

neuronales artificiales (ANN) y algoritmo genético (GA), para predecir con mayor exactitud la solubilidad acuosa<sup>33</sup>.

La ANN es un método de reconocimiento de patrones donde una red de neuronas artificiales se “entrenan” para reproducir la propiedad experimental, dado un número de descriptores moleculares y para una serie de entrenamiento específica. La red entrenada puede ser utilizada para predecir la propiedad experimental en la serie de prueba (ver Figura 1). Aunque la ANN es una aproximación muy potente generalmente no es posible determinar las causas del resultado alcanzado a partir de un grupo particular de descriptores de entrada, y es difícil decodificar el modelo final para identificar los cambios estructurales que la molécula necesita para mejorar la propiedad evaluada. Además tiene una mayor tendencia a “memorizar” que a “aprender”, lo que es susceptible a modelos sobre-ajustados.

El GA es un algoritmo de búsqueda basado en el mecanismo de la evolución. Se selecciona aleatoriamente una población inicial (compuestos), con una adecuada diversidad y se definen un grupo de parámetros para relacionar los descriptores moleculares con la propiedad biológica. En cada generación se evalúa el ajuste de cada individuo (compuesto) dentro de la población y se seleccionan estocásticamente múltiples individuos y se modifican para formar una nueva población. El ajuste de cada modelo en la población se evalúa sobre la base de la correlación entre la predicción del modelo y los datos de la serie de entrenamiento. El GA generalmente tiene buenos resultados en cuanto a la exactitud de los modelos, pero una pobre precisión, o lo que es lo mismo comúnmente fallan para encontrar una solución óptima<sup>34</sup>. Mientras la ANN puede ayudar en la identificación de modelos, el GA puede ayudar en la selección de la combinación correcta de descriptores moleculares para correlacionar con la propiedad. De forma general los resultados alcanzados en la predicción de la solubilidad acuosa son relativamente mejores utilizando los métodos no-lineales (ANN y GA) que con las aproximaciones lineales (MLR y PLS).

### **11.2.5 Validación de los modelos computacionales**

La capacidad predictiva de cualquier modelo QSPR se puede determinar solamente a través de procesos de validación, los cuáles consisten en la predicción de la actividad o propiedad de los compuestos que no fueron incluidos para el desarrollo del modelo (serie de entrenamiento). Este grupo de compuestos forman la serie de prueba (ver Figura 1). Esta serie normalmente se utiliza para seleccionar los mejores modelos pero no garantiza una adecuada capacidad predictiva del modelo<sup>35</sup>. Para simular un uso más real de los modelos se utiliza el grupo de

validación externa (Ver Figura 1). Este grupo consiste en una serie de compuestos con actividades o propiedades conocidas y que no fueron incluidos ni en la serie de entrenamiento ni en la de prueba. El grupo externo se selecciona aleatoriamente de la base de datos inicial y puede estar entre un 15 y 20% de ésta.

Muchos de los modelos desarrollados para predecir la solubilidad no han sido suficientemente validados, prevaleciendo las validaciones de la serie de entrenamiento (validación interna) y pocos compuestos en la serie de prueba. La mayoría de los modelos descritos implementan la validación cruzada *dejando-uno-fuera* o *dejando-varios-fuera* de la serie de entrenamiento y calculan el coeficiente de correlación de esta validación ( $q^2$ ) como un criterio de robustez y capacidad predictiva del modelo.<sup>36</sup> Sin embargo, adecuados valores de  $q^2$  ( $>0.5$ ) no son una condición suficiente para garantizar su buena predictividad.

Otras de las técnicas más utilizadas para la validación interna es el *bootstrap*. Esta técnica de re-muestreo simula lo que sucedería si las compuestos son tomados de forma aleatoria. El modelo obtenido con los  $n$  compuestos seleccionados aleatoriamente se utiliza para predecir la actividad o propiedad de los compuestos excluidos.<sup>37</sup> Un alto valor de  $q^2$  en la validación por *bootstrap* es una demostración de la robustez del modelo. Con la misma finalidad se utiliza la prueba de aleatorización del valor de la propiedad, donde bajos valores del coeficiente de correlación y de  $q^2$  sugieren una adecuada robustez del modelo.

La mayoría de los modelos publicados para la predicción de la solubilidad presentan altos valores de  $q^2$  pero han sido pobremente validados con datos externos, lo que le resta credibilidad y aplicación práctica.

### **11.3 Ventajas y desventajas de los modelos computacionales**

Varios son los factores que pueden afectar la calidad del dato experimental y por consiguiente los intentos por modelar la solubilidad del fármaco. En este caso se destacan el error experimental en la medición, la carencia de una amplia diversidad estructural, la no consideración de las sales o presencia de iones comunes, el efecto del empaquetamiento del cristal o la pobre relevancia farmacéutica de inadecuados rangos de solubilidad.<sup>38</sup> Por otro lado, son varios los autores que han obtenido modelos con adecuada capacidad de predicción utilizando pequeñas bases de datos de compuestos similares a fármacos.<sup>39</sup> Sin embargo, estas bases de datos son mucho más pequeñas comparadas con la de compuestos orgánicos, lo que limita su

capacidad predictiva. Los modelos de predicción de solubilidad de compuestos no-similares a fármacos serían importantes durante la etapa de identificación de compuestos activos, mientras que los modelos para compuestos similares a fármacos serían usados durante el proceso de optimización de compuestos líderes.

Además un problema relevante es que muchas de las series de entrenamiento utilizadas para el desarrollo de los modelos excluyen con frecuencia los casos que son *outliers* resultando en modelos parcializados<sup>40</sup>. También se han utilizado bases de datos “propias” para desarrollar modelos computacionales y luego no se dispone de esta información para contrastar los resultados<sup>41</sup>. No obstante a lo anteriormente descrito, estos métodos tienen dos ventajas significativas sobre la determinación experimental de esta propiedad. En primer lugar no se requiere del compuesto sintetizado químicamente y en segundo lugar permiten el cribado de miles de compuestos en un corto intervalo de tiempo<sup>42</sup>.

## 11.4 Aplicación a la predicción de la solubilidad dentro del BCS

En 1995, Gordon Amidon y col. publicaron los fundamentos para la clasificación biofarmacéutica de fármacos, sentando las bases de lo que hoy se conoce como el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS). Este sistema es el marco científico para entender la absorción de fármacos en términos de la solubilidad y la permeabilidad. De acuerdo con el BCS, los fármacos se pueden clasificar en cuatro categorías, como se presenta en la Tabla 2.

*Tabla 2. El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.*

Clase	Solubilidad	Permeabilidad	Absorción	Controlador de la Absorción
I	Alta	Alta	Excelente	Vaciado gástrico
II	Baja	Alta	Buena	Disolución
III	Alta	Baja	Limitada	Permeabilidad
IV	Baja	Baja	Baja	No Específico

Una sustancia medicamentosa se considera altamente soluble cuando la dosis de mayor concentración es soluble en 250 ml o menos de medio acuoso a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  en un rango de pH de 1-7,5 según la normativa de US FDA<sup>43</sup>, o de 1,2-6,8 según la guía de la WHO<sup>44</sup>, o de 1-8 como lo recomienda la EMA<sup>45</sup>.

Aunque el mayor impacto del BCS está en la regulación y desarrollo de productos orales de liberación inmediata, siendo un estándar para la exoneración de ensayos de bioequivalencia en humanos para productos del grupo I, una clasificación provisional dentro del BCS para aquellos compuestos líderes sería de gran importancia en las etapas iniciales de desarrollo de medicamentos.

Durante la última década ha existido una considerable investigación sobre los métodos *in silico* para la predicción de la solubilidad acuosa, de forma independiente. Sin embargo, se han realizado varios intentos para establecer una clasificación provisional de esta propiedad dentro del BCS. Una de las clasificaciones más populares se basa en la utilización de valores de solubilidad acuosa descritos en la literatura. Otros trabajos han abordado este tema con diferentes enfoques<sup>46</sup>. En estos estudios, los criterios de solubilidad acuosa se obtuvieron de referencias clásicas como la Farmacopea de los Estados Unidos, el Merck Index y considerando las directrices de la FDA y la OMS. Sin embargo, en la mayoría de los casos los autores no pudieron constar con información completa de los perfiles de solubilidad a diferentes valores de pH, ni con una exactitud sobre el método utilizado para la determinación de la solubilidad. Además las dosis máximas descritas varían en dependencia de las referencias utilizadas.

## **11.5 Clasificación provisional del BCS basado en modelos *in silico* de solubilidad.**

Tomando en consideración los aspectos mencionados anteriormente para el desarrollo de modelos computacionales (QSPR), ejemplificaremos el procedimiento para la predicción *in silico* de la solubilidad, y estableceremos una clasificación provisional para el BCS basado en esta propiedad.

### **11.5.1 Selección de la base de datos.**

Para establecer una clasificación provisional del BCS se requiere tanto datos de solubilidad como de determinación de la permeabilidad intestinal. Sin embargo en este capítulo sólo realizaremos el análisis para la solubilidad. En este sentido se realizó una búsqueda extensiva de la literatura que nos permitió constar con una base de datos de 322 fármacos.

Los datos de solubilidad acuosa de los fármacos (mg/mL) fueron obtenidos de la Farmacopea y del Merck Index. De los valores de solubilidad encontrados a 37 grados, se seleccionó el menor valor, mientras que en los casos donde no se

disponía o no se especificaba un valor de solubilidad, se consideró el límite inferior del rango definido por la Farmacopea.

Para la selección de la máxima dosis (mg) se utilizó: la lista de medicamentos esenciales de la OMS<sup>47</sup> y el Libro Naranja<sup>48</sup>. Para los fármacos que no estaban incluidos en estos documentos y existían en diferentes presentaciones comerciales se utilizó la primera dosis registrada. Las dosis en mg/kg se transformaron asumiendo un valor promedio de 70Kg de peso corporal. Para el cálculo del número de dosis ( $D_0$ ) se utilizó la siguiente ecuación:

$$D_0 = (M_0/V_0) / S \quad (1)$$

donde,  $M_0$  es la mayor dosis registrada (mg),  $S$  es la solubilidad acuosa (mg/mL) y  $V_0$  es el volumen de agua que se asume como 250 mL. Los fármacos con valores de  $D_0 \leq 1$  se clasificaron como de alta solubilidad y con  $D_0 > 1$  como de baja solubilidad.

### 11.5.2 Desarrollo de los modelos computacionales

*Cálculo de descriptores:* La estructura química de los 322 fármacos fue representada con su código SMILES. Un total de 803 descriptores 0-2D, pertenecientes a 29 familias de descriptores implementados en el programa Dragón, y 126 descriptores moleculares del programa VolSurf+<sup>49</sup> fueron calculados.

*Serie de entrenamiento y prueba:* La selección de la serie de entrenamiento y la serie de prueba se realizó por un análisis de conglomerado utilizando el programa Statistica 8.0<sup>50</sup>. Los compuestos dentro de cada serie fueron seleccionados de forma aleatorio en cada conglomerado. Los compuestos seleccionados dentro de la serie de prueba (aproximadamente un 20% de la base de datos) no fueron utilizados para el desarrollo de las funciones discriminantes y sí para la validación de los modelos.

*Desarrollo de los modelos y selección de las variables:* Se utilizaron tres algoritmos de clasificación para establecer relaciones entre la estructura y la solubilidad. Ellos son el Análisis Discriminante Lineal (LDA), el Análisis Discriminante Cuadrático (QDA) y la Regresión Logística Binaria (BLR). Los modelos se desarrollaron utilizando los programas SPSS<sup>51</sup> y Statistica 8.0. Para la identificación de las variables apropiadas para el modelo se siguió el método “stepwise”. En el caso del LDA y QDA, en cada paso se revisaron y evaluaron todas las variables, considerando el grado de significación ( $p$ ) o la razón de Fisher



(F). Luego se aplicó la técnica del “mejor subgrupo” y se consideró el valor de la lambda de Wilks como parámetro de significación. En el caso de la BLR se siguió un proceso de selección condicional.

*Validación de los modelos:* De los tres modelos obtenidos con diferentes grupos de descriptores, se seleccionó el mejor para cada algoritmo de clasificación. Finalmente, se construyó un sistema consenso con las predicciones de los tres modelos seleccionados. El desempeño de los modelos se evaluó a través de la determinación de: la razón de falsos positivos, falsos negativos, verdaderos positivos y verdaderos negativos, el coeficiente de correlación de Matthews y la exactitud de la predicción. Adicionalmente se utilizó la curva ROC (*receiver operating characteristic curve*) para evaluar la exactitud de las funciones discriminantes.

*Aplicación a la predicción del BCS:* Los modelos fueron validados con datos publicados de compuestos clasificados en el BCS. Se empleó una serie externa de 57 compuestos clasificados en el BCS y procedentes de referencias validadas<sup>52</sup>. Con el objetivo de tener predicciones fiables se tomó en consideración el dominio de aplicación definido por el espacio químico de las series de entrenamiento y se utilizó el cálculo del *leverage*.

### 11.5.3 Resultados

*Clasificación de la solubilidad de los fármacos:* Tomando en consideración la comparación directa entre el parámetro adimensional  $D_0$  y la unidad, 188 compuestos de los 322 fueron clasificados como de alta solubilidad. Los compuestos con una solubilidad acuosa menor que 0.1 mg/mL podrían afectar negativamente la absorción oral, por lo que si aplicamos este criterio 218 compuestos tuvieron un valor de solubilidad mínimo ( $S_{\min}$ )  $\geq 0.1$  mg/mL y 171 de ellos tienen un  $D_0 \leq 1$ , lo que corresponde a un 78.44% de verdaderos positivos. Por otro lado de los 104 compuestos con valores de  $S_{\min} < 0.1$  mg/mL, 90 de ellos tenían una baja solubilidad por lo que corresponde a un 86.54% de verdaderos negativos.

Con respecto a la dosis máxima ( $D_{\max}$ ) se seleccionaron valores que corresponden al percentil 10, 25, la mediana, el promedio, el percentil 75 y 90 de la distribución de dosis para la base de datos. Esto se corresponde con valores de 5, 20, 100, 203, 300 y 500mg. Según BCS bajos valores de  $D_{\max}$  debería corresponder a compuestos con alta solubilidad. En los datos de los 25 compuestos con valores de  $D_{\max} < 5$  mg, 23 se clasificaron como de alta solubilidad (92%). Para valores de

$D_{\max} < 20$  mg, la correlación es de un 82% y para  $D_{\max} < 100$  mg ya baja a un 68%. Sin embargo, menos del 54% de los compuestos con  $D_{\max} \geq 203, 300, \text{ o } 500$  mg son clasificados como de baja solubilidad.

Para investigar la correlación y el impacto de la solubilidad y la dosis sobre la clasificación de la solubilidad en el BCS, se utilizó la solubilidad máxima reportada ( $S_{\max}$ ) y la menor dosis ( $D_{\min}$ ) para calcular el valor de  $D_0$ . También se determinó la solubilidad dependiente del pH (mg/mL) utilizando los programas VolSurf+ v.1.0.4, ALOGPS v 2.1 y ACD/Laboratories v3.0.

*Modelos Computacionales para predecir la clasificación en el BCS a partir de la estructura química:* la solubilidad se modeló de forma independiente. La clasificación computacional final del BCS se alcanzó usando un sistema de voto consenso (solubilidad). Los modelos obtenidos para la solubilidad se describen a continuación.

**Tabla 3.** Desempeño de los tres mejores modelos para la clasificación provisional de la solubilidad

Técnica	MCC	Exactitud	Especificidad	Sensibilidad	Precisión
	% (Tr/Ts) <sup>a</sup>				
LDA (S1)	0.66/0.54	83.3/76.9	82.2/79.3	84.0/75.0	86.9/81.8
QDA (S2)	0.63/0.75	81.7/87.7	82.2/82.8	81.3/91.7	86.5/86.8
BLR (S3)	0.60/0.69	80.5/84.6	75.5/82.1	84.1/86.5	83.0/86.5
VoteS	0.68/0.87	84.4/93.9	85.0/ 89.3	84.0/ 97.2	88.7/92.3
Ecuaciones matemáticas					
$CLASS_{D_0}(+/-) = -1.59 - 0.54 \times P\_VSA\_v\_3 + 0.80 \times nArC=N + 0.65 \times C-005 - 0.84 \times CATS2D\_04\_AL + 0.79 \times DLS\_04 + 4.51 \times ID3 + 0.28 \times A - 0.41 \times LgD5$					
$N = 257 \quad \lambda = 0.60 \quad D^2 = 2.74 \quad F = 25.61 \quad p < 0.0001$					
$CLASS_{D_0}(+/-) = -0.36 - 0.90 \times Me - 1.40 \times nCt - 0.79 \times NssNH + 1.22 \times BLTD48 + 0.87 \times DLS\_04 - 0.82 \times CMC-50 - 1.86 \times nArC=N \times N-067 + 0.41 \times N-067 \times NssNH - 0.73 \times Me \times CMC-50 + 0.51 \times nR10^2$					
$N = 257 \quad \lambda = 0.59 \quad D^2 = 2.88 \quad p < 0.0001$					
$Ln(P+/P-) = 2.63 - 0.59 \times nCp + 4.44 \times nArC=N + 0.20 \times H-052 + 1.82 \times N-067 - 1.32 \times NssNH + 1.09 \times BLTD48 + 4.58 \times LDS\_04 - 1.38 \times CMC-50 - 0.38 \times nO$					

<sup>a</sup>Medida de desempeño de la serie de entrenamiento y prueba; <sup>b</sup>Área bajo la curva ROC determinada en la serie de prueba por supuestos no-paramétricos en el 95% del intervalo de confianza asintótico.

Como se puede observar de la Tabla 3 los tres mejores modelos estadísticos para clasificar la solubilidad en el PBC muestran un buen desempeño, teniendo el modelo consenso un comportamiento superior con una precisión general de 88.7% para la serie de entrenamiento y de un 92.3% para la serie de prueba.

Una predicción robusta de la clasificación *in silico* del PCS es muy útil en las etapas iniciales de descubrimiento y desarrollo de fármacos, especialmente para aquellas nuevas entidades moleculares cuyos rangos de dosis terapéutica no están disponibles en las etapas preclínicas. Para ello evaluamos una serie externa de 57 fármacos del listado de medicamentos esenciales de la WHO. Como muchos de estos fármacos no se les describe una clasificación conclusiva, la clasificación *in silico* fue considerada exacta si ésta se corresponde con una de las dos clases. De los 22 fármacos predichos como clase I del PBC, 20 son clase I ó I/III del BCS (91% de exactitud). Mientras que 9 de 11 fármacos predichos como clase II del PBC son clase II o II/IV del BCS (82% de exactitud). De los 13 fármacos predichos como clase III del PBC, 11 son clase III o I/III del BCS (85% de exactitud). Finalmente, 6 fármacos fueron predichos como clase IV del PBC, 3 son clase II/IV y 1 es clase III/IV del BCS (Ver Tabla 6). Estos resultados evidencian que la predicción *in silico* correlacionan bastante bien con la clasificación de WHO del BCS para esta serie de datos.

**Tabla 4.** Validación externa de 57 fármacos del listado de medicamentos esenciales de la WHO

Comp.	WHO BCS	<i>In silico</i> PBC	Comp.	WHO BCS	<i>In silico</i> PBC	Comp.	WHO BCS	<i>In silico</i> PBC
Abacavir	III	III	Cloxacillin	III	III	Mercaptopurina	II/IV	II
Acetazolamida	II/IV	IV	Ciclofosfamida	I	I	Mesalamina	II/IV	IV
Alopurinol	I	I	Dapsona	II	I	Metronidazol	I	I
Amlodipina	I	I	Dietilcarbamazina	I	I	Niclosamida	II/IV	II
Amodiaquina	I/III	II	Diloxanide	II/IV	II	Nicotinamida	I	I
Artemeter	III/IV	IV	Ergocalciferol	III	I/II	Nifurtimox	III	III
Acido Ascórbico	I	I/III	Ergotamina Tartrato	III	IV	Noretisterona	I	I
Azatioprina	II/IV	II	Etambutol	III	III	Oxamniquina	II/IV	III
Benznidazol	III	II	Etosuximida	I/III	I	Penicilamina	III	III
Biperiden	I/III	III	Glibenclamida	II/IV	II	Praziquantel	II	II
Carbidopa	I/III	III	Gliceril trinitrato	I/III	III	Procarbazina	I/III	I
Cefixime	II/IV	IV	Acido Iopanoico	II	II	Proguanil	I	III
Clorambucilo	I/III	I	Isoniazida	I/III	I	Pirazinamida	I/III	I
Clorfenamine	I/III	I	Isosorbide dinitrato	I/III	III	Piridostigmina	III	I
Acido Clavulánico	I/III	III	Levamisol	I/III	I	Quinina	I	I
Clindamicina	I	I	Levonorgestrel	I	I	Retinol palmitato	II/IV	II
Clofazimina	III/IV	II/IV	L-metionina	I	I	Senna	-	IV
Clomipene	I/III	I	Lumefantrina	III/IV	II/IV	Sulfadoxina	I/III	III
Clomipramina	I/III	I	Mefloquina	II/IV	II	Triclabendazol	III/IV	II/IV

## 11.6 Conclusiones y Perspectivas

La predicción de la solubilidad de los fármacos es una de las propiedades farmacocinéticas que han sido siempre un reto para los investigadores que trabajan en el diseño computacional de fármacos. Durante la última década se han desarrollado numerosos modelos cuantitativos y cualitativos alcanzándose adecuados resultados. Sin embargo, actualmente se continúan generando nuevos modelos *in silico* de forma combinada o añadiendo nueva información sobre procesos relacionados.

Varios factores pueden afectar los resultados de los modelos ya sea relacionados con la base de datos experimental, los descriptores moleculares utilizados o la metodología estadística empleada para obtener los modelos. Con relación a las bases de datos el principal problema está relacionado con el tamaño de la misma, con su disponibilidad y con la calidad del dato experimental, lo que hace que muchos modelos tengan una limitada capacidad predictiva. Además aunque se han desarrollado modelos con grandes bases de datos, éstas pertenecen a grandes farmacéuticas, por lo que generalmente el dato primario no está disponible a la comunidad científica, lo que limita la posibilidad de obtener mejores modelos.

En nuestra opinión, el uso de una base de datos cuidadosamente seleccionada, con información sobre los principales eventos o factores vinculados con la solubilidad, que permitan desarrollar diferentes tipos de modelos (modelo consenso) para esta propiedad, puede ser una importante estrategia.

En este sentido quisiéramos resaltar varios aspectos importantes que en nuestra opinión pudieran ser considerados para el desarrollo futuro de modelos computacionales para la predicción de la solubilidad y la clasificación dentro del BCS.

Se debe incrementar la calidad y la cantidad de compuestos en la base de datos, construida a partir de ensayos experimentales confiables. Se debe considerar la variabilidad inter e intra-laboratorio para la propiedad que se modela. La combinación de dos o más modelos para la misma propiedad, basados en principios diferentes, podría brindar una mayor confianza y una ayuda en la toma de decisión. Los resultados de los modelos *in silico* deben ser validados experimentalmente.

En este capítulo hemos realizado un análisis sobre el desarrollo de los modelos computacionales QSPR y su aplicación en la predicción de la solubilidad. Se han discutido cada uno de los pasos para el desarrollo de los modelos computacionales, así como su aplicación a la predicción de esta propiedad. Aunque se han realizado

esfuerzos significativos para acelerar la determinación experimental de esta propiedad, los métodos *in silico* han ganado en popularidad por su capacidad para reducir costes y tiempo, y por la cualidad intrínseca de cribar una gran cantidad de compuestos antes de la síntesis.

## 11.7 Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del proyecto DCI-ALA/ALFA III (2010) 29: Red para el desarrollo de metodologías biofarmacéuticas racionales que incrementen la competencia y el impacto social de las Industrias Farmacéuticas Locales (Red-Biofarma).

---

<sup>1</sup> A. Cheng, K. M. Merz, Jr., *J Med Chem* 2003, 46, 3572.

<sup>2</sup> G. L. Amidon, H. Lennernas, V. P. Shah, J. R. Crison, *Pharm Res* 1995, 12, 413.

<sup>3</sup> J. Huuskonen, M. Salo, J. Taskinen, *J Chem Inf Comput Sci* 1998, 38, 450.

<sup>4</sup> T. J. Hou, K. Xia, W. Zhang, X. J. Xu, *J Chem Inf Comput Sci* 2004, 44, 266.

<sup>5</sup> Y. Ran, S. H. Yalkowsky, *J Chem Inf Comput Sci* 2001, 41, 354.

<sup>6</sup> a)J. Huuskonen, J. Rantanen, D. Livingstone, *Eur J Med Chem* 2000, 35, 1081; b)R. Liu, S. S. So, *J Chem Inf Comput Sci* 2001, 41, 1633; c)D. Butina, J. M. Gola, *J Chem Inf Comput Sci* 2003, 43, 837; d)J. K. Wegner, A. Zell, *J Chem Inf Comput Sci* 2003, 43, 1077; e)J. R. Votano, M. Parham, L. H. Hall, L. B. Kier, L. M. Hall, *Chem Biodivers* 2004, 1, 1829; f)J. S. Delaney, *Drug Discov Today* 2005, 10, 289; g)K. V. Balakin, N. P. Savchuk, I. V. Tetko, *Curr Med Chem* 2006, 13, 223; h)J. Ghasemi, S. Saaidpour, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2007, 55, 669; i)S. R. Johnson, X. Q. Chen, D. Murphy, O. Gudmundsson, *Mol Pharm* 2007, 4, 513; j)J. Wang, G. Krudy, T. Hou, W. Zhang, G. Holland, X. Xu, *J Chem Inf Model* 2007, 47, 1395; k)P. R. Duchowicz, A. Talevi, L. E. Bruno-Blanch, E. A. Castro, *Bioorg Med Chem* 2008, 16, 7944; l)J. Huuskonen, D. J. Livingstone, D. T. Manallack, *SAR QSAR Environ Res* 2008, 19, 191; m)J. Wang, T. Hou, X. Xu, *J Chem Inf Model* 2009, 49, 571; n)B. Louis, V. K. Agrawal, P. V. Khadikar, *Eur J Med Chem* 2010, 45, 4018; o)D. J. Livingstone, M. G. Ford, J. J. Huuskonen, D. W. Salt, *J Comput Aided Mol Des* 2001, 15, 741

<sup>7</sup> a)G. Klopman, S. Wang, D. M. Balthasar, *J Chem Inf Comput Sci* 1992, 32, 474;

b)T. Suzuki, *J Comput Aided Mol Des* 1991, 5, 149.

<sup>8</sup> D. M. Oh, R. L. Curl, G. L. Amidon, *Pharm Res* 1993, 10, 264.

<sup>9</sup> M. S. Ku, *AAPS J* 2008, 10, 208.

<sup>10</sup> a)OECD, in *series on Testing and Assessment*, OECD Environment Health and Safety Publications, 37<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and Working

- 
- Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology, 2004; b)OECD, in *Series on Testing and Assessment. No. 58*, OECD Environment Health and Safety Publications, 2006; c)OECD, in *OECD Series on Testing and Assessment No. 69. ENV/JM/MONO(2007)2*, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2007, p. 154.
- <sup>11</sup> A. Tropsha, A. Golbraikh, *Curr Pharm Des* 2007, 13, 3494.
- <sup>12</sup> D. Fourches, E. Muratov, A. Tropsha, *J Chem Inf Model* 2010, 50, 1189.
- <sup>13</sup> J. Huuskonen, *J Chem Inf Comput Sci* 2000, 40, 773.
- <sup>14</sup> N. R. McElroy, P. C. Jurs, *J Chem Inf Comput Sci* 2001, 41, 1237.
- <sup>15</sup> I. V. Tetko, V. Y. Tanchuk, T. N. Kasheva, A. E. Villa, *J Chem Inf Comput Sci* 2001, 41, 1488
- <sup>16</sup> A. Cheng, D. J. Diller, S. L. Dixon, W. J. Egan, G. Lauri, K. M. Merz, Jr., *J Comput Chem* 2002, 23, 172.
- <sup>17</sup> H. Gao, V. Shanmugasundaram, P. Lee, *Pharm Res* 2002, 19, 497.
- <sup>18</sup> O. Engkvist, P. Wrede, *J Chem Inf Comput Sci* 2002, 42, 1247.
- <sup>19</sup> A. Yan, J. Gasteiger, *J Chem Inf Comput Sci* 2003, 43, 429.
- <sup>20</sup> A. Yan, J. Gasteiger, *QSAR Comb Sci* 2003, 22, 821.
- <sup>21</sup> D. T. Manallack, B. G. Tehan, E. Gancia, B. D. Hudson, M. G. Ford, D. J. Livingstone, D. C. Whitley, W. R. Pitt, *J Chem Inf Comput Sci* 2003, 43, 674.
- <sup>22</sup> K. J. Schaper, B. Kunz, O. A. Raevsky, *QSAR Comb Sci* 2003, 22, 943.
- <sup>23</sup> R. Gozalbes, A. Pineda-Lucena, *Bioorg Med Chem* 2010, 18, 7078.
- <sup>24</sup> a)F. Lombardo, E. Gifford, M. Y. Shalaeva, *Mini Rev Med Chem* 2003, 3, 861;  
b)J. Gola, O. Obrezanova, E. Champness, M. Segall, *QSAR Comb Sci* 2006, 25, 1172
- <sup>25</sup> D. S. Wishart, *Drugs R D* 2007, 8, 349.
- <sup>26</sup> R. Todeschini, V. Consonni, *Handbook of Molecular Descriptors*, Wiley VCH, Weinheim, Germany, 2000.
- <sup>27</sup> R. Todeschini, V. Consonni, A. Mauri, M. Pavan, 2006
- <sup>28</sup> C. Steinbeck, Y. Han, S. Kuhn, O. Horlacher, E. Luttmann, E. L. Willighagen, *J Chem Inf Comput Sci* 2003, 43, 493.
- <sup>29</sup> Y. Gutierrez, E. Estrada, 2004.
- <sup>30</sup> G. Cruciani, P. Crivori, P. A. Carrupt, B. Testa, *J Mol Struct (Teochem)* 2000, 503, 17.
- <sup>31</sup> U. Norinder, C. A. Bergstrom, *ChemMedChem* 2006, 1, 920.
- <sup>32</sup> D. Butina, M. D. Segall, K. Frankcombe, *Drug Discov Today* 2002, 7, S83.
- <sup>33</sup> M. A. Cabrera-Pérez, H. Pham-The, M. Bermejo, I. González-Álvarez, T. Garrigues, *Mini Rev Med Chem* 2012, 12, 534.
- <sup>34</sup> S. P. Niculescu, *J Mol Struct (Teochem)* 2003, 622, 71.
- <sup>35</sup> A. Tropsha, *Mol Inf* 2010, 29, 476.
- <sup>36</sup> A. Golbraikh, A. Tropsha, *J Mol Graph Model* 2002, 20, 269.

- 
- <sup>37</sup> A. Tropsha, P. Gramatica, V. K. Gombar, *QSAR Comb Sci* 2003, 22, 69.
- <sup>38</sup> S. R. Johnson, W. Zheng, *AAPS J* 2006, 8, E27.
- <sup>39</sup> C. A. Bergstrom, C. M. Wassvik, U. Norinder, K. Luthman, P. Artursson, *J Chem Inf Comput Sci* 2004, 44, 1477.
- <sup>40</sup> A. Dokoumetzidis, L. Kalantzi, N. Fotaki, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2007, 3, 491
- <sup>41</sup> A. Di Fenza, G. Alagona, C. Ghio, R. Leonardi, A. Giolitti, A. Madami, *J Comput Aided Mol Des* 2007, 21, 20
- <sup>42</sup> R. Gozalbes, M. Jacewicz, R. Annad, K. Tsaioun, A. Pineda-Lucena, *Bioorg Med Chem* 2011, 19, 2615
- <sup>43</sup> CDER/FDA, Federal Drug and Food Administration: Rockville, MD, USA, Center for Drug Evaluation and Research, 2000.
- <sup>44</sup> WHO, Geneva: World Health Organization, 2006.
- <sup>45</sup> EMA, London, January 2010, pp. 25.
- <sup>46</sup> a)T. Takagi, C. Ramachandran, M. Bermejo, S. Yamashita, L. X. Yu, G. L. Amidon, *Mol Pharm* 2006, 3, 631; b)M. Lindenberg, S. Kopp, J. B. Dressman, *Eur J Pharm Biopharm* 2004, 58, 265; c)M. V. Varma, I. Gardner, S. J. Steyn, P. Nkansah, K. S. Fenner, A. F. El-Kattan, *Mol Pharm* 2012; d)R. Shawahna, N. U. Rahman, *DARU* 2011, 19, 83.
- <sup>47</sup> in (*17th list*), (17th list) ed., March 2011.
- <sup>48</sup> Electronic Orange Book, *Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations*, 32nd ed., Office of Generic Drugs Center for Drug Evaluation and Research, Food and Drug Administration, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/InformationOnDrugs/UCM086233.pdf>, updated August 2012.
- <sup>49</sup> version 1.0.4 ed., available from Molecular Discovery Ltd., London, U.K. (<http://www.moldiscovery.com>).
- <sup>50</sup> StatSoft, 8.0 ed., 2007.
- <sup>51</sup> SPSS (Statistical Software for the Social Sciences), 17.0 ed., For more information about SPSS® software products, please visit the Web site at <http://www.spss.com>, SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2008
- <sup>52</sup> In *WHO Technical Report Series, No. 937*, 40th ed., WHO Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparations, 2006, pp. 391.

## 12. Estudios de permeabilidad en humanos

María Teresa Martínez<sup>a,b</sup>, Sarín Colón Useche<sup>b,c</sup>, Isabel Gonzalez Alvarez<sup>b</sup>, Marta Gonzalez Alvarez<sup>b</sup>, Marival Bermejo Sanz<sup>b</sup>

*a Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. España.*

*b Departamento de Ingeniería. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Miguel Hernández. España.*

*c Departamento de Análisis y Control. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Venezuela*

### 12.1 Introducción

La vía oral es la más ampliamente usada por todas las ventajas que presenta entre las que destaca la comodidad posológica. De hecho, el 90% de los fármacos comercializados están diseñados para administrarse por vía oral. Cuando se administra una forma farmacéutica por esta vía, el fármaco debe absorberse a lo largo del aparato digestivo, llegar a la sangre y ejercer su efecto terapéutico. La capacidad de la mucosa intestinal para permitir que las moléculas de una sustancia pasen por difusión pasiva, por convección y/o por procesos específicos mediados por transportador es conocida como permeabilidad efectiva intestinal ( $P_{\text{eff}}$ )<sub>1</sub>.

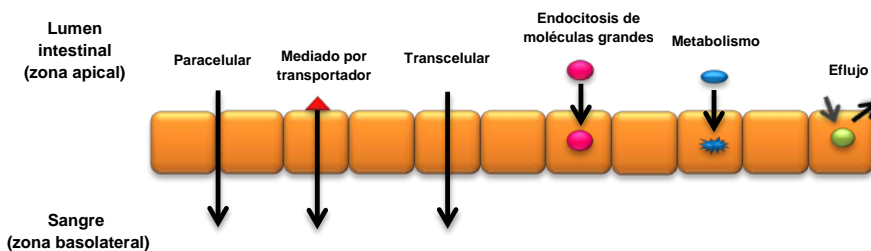
La permeabilidad intestinal de un fármaco es un parámetro que describe la velocidad de transporte a través de la membrana intestinal y que se puede aplicar independientemente del mecanismo de transporte. En el tracto gastrointestinal se pueden presentar múltiples procesos de transporte paralelos: difusión pasiva, transporte mediado por transportadores y secreción intestinal.

La difusión pasiva es el principal mecanismo para la absorción de muchos compuestos lipófilos<sub>3</sub> y consiste en el movimiento de las moléculas de fármaco a favor de gradiente, sin consumo de energía; no requiere transportador y por tanto, es no saturable y de baja especificidad estructural. La difusión pasiva puede ser



paracelular (a través de los espacios intercelulares) o transcelular (a través de las células). El paso limitante de la difusión pasiva es, normalmente, la membrana apical, ya que tiene una composición muy compleja. En general, se asume que los compuestos suficientemente lipófilos son transportados por difusión transcelular pasiva, mientras que los compuestos hidrófilos pequeños (menores de 200 Da) atraviesan la barrera intestinal por vía paracelular si no usan un mecanismo de transporte específico. El pH es un factor que influye enormemente en la permeabilidad pasiva intestinal *in vivo* y por tanto se debe tener en cuenta a la hora de valorar la permeabilidad de los fármacos ya que los cambios de pH son una de las características más notorias del tracto gastrointestinal. Una permeabilidad altamente dependiente del pH explicaría la alta variabilidad farmacocinética inter e intraindividual descrita en algunos estudios.

Los mecanismos de absorción mediados por transportadores requieren de la expresión del transportador en cuestión que reconoce una determinada molécula o familia de moléculas, por lo que son mecanismos selectivos y saturables. De acuerdo a la necesidad de energía para que se lleve a cabo el proceso de absorción, el transporte mediado por transportadores se clasifica en difusión facilitada y transporte activo. La difusión facilitada se realiza a favor de gradiente de concentración y por tanto no requiere energía, mientras que el transporte activo puede hacerse en contra de gradiente y por ello este mecanismo requiere energía. La Figura 1 muestra un esquema de los distintos mecanismos de transporte en el intestino.



**Figura 1.** Mecanismos de transporte en el intestino.

Los fármacos y otros xenobióticos, así como los nutrientes, deben atravesar la membrana intestinal cuando son administrados por vía oral para alcanzar circulación sistémica. Una vez que se ha determinado que un fármaco se puede administrar por vía oral y que se alcanzan concentraciones terapéuticas en el órgano diana, se debe valorar el estado anatómico de la barrera de manera que se garantice la integridad anatómica y fisiológica del tracto gastrointestinal es imprescindible para que el proceso de absorción se realice de forma adecuada. La

verificación de esta integridad se realiza mediante la excreción urinaria de azúcares, que es conocida como “prueba de los azúcares”. En esta prueba, se administra a voluntarios diversos azúcares (sacarosa, lactulosa y manitol) en solución por vía oral, posteriormente se recolectan sus muestras de orina y se procede a cuantificar la cantidad de azúcares excretados. La lactulosa y el manitol son compuestos que se absorben por difusión pasiva y no se metabolizan. La sacarosa es comúnmente aceptada como marcador de daño en la mucosa del tracto digestivo superior (estómago y duodeno)<sup>2</sup>. Con este tipo de prueba se ha demostrado que diversas patologías como enfermedad celíaca, enfermedad de Lesniowski-Crohn, alergia a proteínas de la leche de la vaca, cirrosis, infección por Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), diarrea aguda y crónica, enfermedades intestinales pediátricas, fibrosis quística y perjuicios causados por fármacos analgésicos no esteroideos, pueden provocar cambios en la membrana intestinal y por tanto modifican la absorción por vía oral<sup>s</sup>.

Respecto a la absorción, el parámetro más interesante a evaluar es la fracción absorbida ( $f_{\text{abs}}$ ). Según el ente regulador en materia de medicamentos de Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA) se considera que un fármaco es de alta permeabilidad cuando su fracción absorbida es mayor del 90%; en cambio, en Europa, la Agencia Europea del Medicamento (EMA por sus siglas en inglés) pone este límite en el 85% de la dosis absorbida. El fármaco de referencia para clasificar a los demás fármacos es, en la actualidad, el metoprolol. Si un compuesto muestra una permeabilidad efectiva intestinal mayor que el metoprolol se le considera de alta permeabilidad; en cambio, si tiene una  $P_{\text{eff}}$  menor que el metoprolol se clasifica como de baja permeabilidad. Sin embargo, se está proponiendo una modificación de este criterio: tomando la  $P_{\text{eff}}$  yeyunal del metoprolol a pH 6,5 como el punto de referencia para alta permeabilidad, si un compuesto llega o excede este límite en cualquier punto del intestino, no necesariamente en el yeyuno, se considerará un compuesto de alta permeabilidad con completa absorción ( $f_{\text{abs}} > 90\%$ ). Otro aspecto a considerar es que el metoprolol se absorbe hasta el 100%, mientras que un fármaco es definido como de alta permeabilidad cuando su  $f_{\text{abs}}$  es mayor de 90% u 85% según corresponda. En este sentido se siguen realizando investigaciones a fin de establecer un nuevo compuesto como referencia<sup>s</sup>.

La mejor forma de determinar la  $f_{\text{abs}}$  es haciéndolo a partir de los estudios farmacocinéticos y de balance de masas en humanos. La complejidad y el coste de llevar a cabo estos estudios es muy alto, ya que requieren principios activos radiomarcados para la validación de la alta recuperación de fármacos y sus metabolitos<sup>2</sup>. Por estas razones, se han desarrollado diferentes técnicas *in situ*, *in vivo* e *in vitro* que permiten conocer la  $P_{\text{eff}}$  de los fármacos empleados actualmente y estimar la  $P_{\text{eff}}$  de moléculas candidatas a ser administradas por vía oral. Estas

técnicas alternativas a los estudios farmacocinéticos en humanos y de balance de masas buscan hacer más eficiente el desarrollo de nuevas moléculas, así como caracterizar y clasificar de forma correcta los fármacos usados actualmente. Una de las técnicas que se ha desarrollado para estudiar la permeabilidad efectiva intestinal y el metabolismo es la de perfusión intestinal en humanos, que ha sido validada y ampliamente aplicada para investigar la absorción de los fármacos y el metabolismo intestinal presistémico y actualmente se considera la técnica de referencia para este fin.

Los experimentos de perfusión en el yeyuno y el colon de los humanos, con las técnicas Loc-I-Gut y Loc-I-Col, respectivamente, han proporcionado datos interesantes de permeabilidad para compuestos absorbidos por diversos mecanismos. Este tipo de técnicas está siendo utilizado actualmente para crear una base de datos de permeabilidad en humanos, que se utiliza en el desarrollo del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS, por sus siglas en inglés)<sup>10</sup>. Se ha demostrado que existe una buena correlación entre la permeabilidad yeyunal medida usando la técnica de perfusión de un solo paso sin recirculación y la fracción de dosis absorbida de los fármacos en humanos determinada por estudios farmacocinéticos <sup>11</sup>. A continuación se explican las técnicas para estudiar la permeabilidad intestinal en humanos.

## **12.2 Métodos para estudiar la permeabilidad intestinal en humanos**

Existen distintos métodos descritos para determinar la permeabilidad en humanos. Los experimentos de perfusión en el yeyuno y el colon de los humanos, con las técnicas Loc-I-Gut y Loc-I-Col, respectivamente, han proporcionado datos interesantes de permeabilidad para compuestos absorbidos por diversos mecanismos. Este tipo de técnicas está siendo utilizada actualmente para crear una base de datos de permeabilidad en humanos, que permita conocer la clasificación de los fármacos dentro del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica<sup>10</sup>.

### **12.2.1 Métodos indirectos**

Existen distintos métodos que permiten determinar de manera indirecta la permeabilidad intestinal en humanos. Se puede realizar un estudio de balance de masas farmacocinético en el que se mide la absorción intestinal de un fármaco radiomarcado. Otra opción es determinar la biodisponibilidad oral usando como

referencia una administración intravenosa del mismo fármaco (estudio farmacocinético comparativo). En los últimos años, el uso de técnicas avanzadas de administración como las “cápsulas inteligentes”, que permiten el control de la liberación del fármaco en un segmento específico del intestino, han supuesto un avance importante en la determinación de los lugares de absorción y el efecto de enzimas transportadoras y de secreción. Los métodos más utilizados en este sentido son:

### **12.2.1.1 Estudio de balance de masas farmacocinético**

Es un estudio farmacocinético completo que requiere el marcaje radiactivo del fármaco. Se realiza con voluntarios sanos y, en general, está conformado por tres fases; la primera de preparación de los voluntarios (ayuno de 10 horas previas al estudio), la segunda de administración del fármaco por vía oral y la tercera de evaluación de la absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco. En esta última fase se requiere la recolección de muestras de sangre, orina y heces con la finalidad de cuantificar el fármaco y sus metabolitos en todas las muestras biológicas obtenidas de cada voluntario.

Este tipo de estudio suministra información valiosa sobre la biodisponibilidad del fármaco. La curva de concentración plasmática del fármaco en función del tiempo permite establecer si éste es de alta o baja permeabilidad. Para que se cumpla el balance de masas, la cantidad administrada de fármaco será igual al sumatorio de las cantidades encontradas en plasma, orina y heces<sup>12</sup>.

### **12.2.1.2 Estudio farmacocinético comparativo**

En este estudio se compara la biodisponibilidad de un fármaco administrado por vía oral con los datos de una dosis intravenosa. Provee información farmacocinética útil sobre la distribución y eliminación; e indirectamente, sobre la permeabilidad y la influencia de enzimas y transportadores presistémicos. Consiste en un estudio cruzado en el que se administra el fármaco a voluntarios sanos por vía intravenosa y por vía oral, entre ambas administraciones es necesario un período de lavado. Se pueden estudiar muestras sanguíneas (plasma) o muestras de orina. En este tipo de estudios es imprescindible conocer los metabolitos y disponer de un método de cuantificación adecuado para éstos y para el fármaco en la muestra biológica seleccionada.<sup>13</sup>

### **12.2.1.3 Cápsulas inteligentes**

Son sistemas que permiten estudiar la permeabilidad de los fármacos a través de un dispositivo no invasivo capaz de liberar un fármaco en el lugar deseado del intestino mediante la aplicación de radiofrecuencia. Se trata de una cápsula en cuyo interior se coloca el fármaco (polvo, solución, suspensión, pellets, comprimidos pequeños, etc.); este dispositivo está radiomarcado, de forma que permite determinar su ubicación dentro de una región específica del tracto gastrointestinal mediante escintigrafía gamma. El proceso es el siguiente: la persona se traga la cápsula y, cuando ésta alcanza la ubicación deseada en el tracto gastrointestinal, se aplica una señal magnética externa de radiofrecuencia que provoca la apertura de la cápsula y la liberación de su contenido (la cápsula no se desintegra). Tras la liberación del fármaco se van tomando muestras plasmáticas y se analiza las concentraciones de dicho compuesto. Se pueden hacer varios ensayos, activando la cápsula cada vez en distintas regiones del tracto gastrointestinal. Con los datos obtenidos se hace un análisis farmacocinético comparativo, de forma que se ven las diferencias de absorción entre regiones.

Es un método rápido y efectivo para conocer la velocidad y grado de absorción en regiones específicas del tracto gastrointestinal y que proporciona resultados fiables<sup>14</sup>. A modo de ejemplo comentar un estudio realizado en 8 voluntarios sanos para evaluar la absorción intestinal de una solución de ranitidina rinde datos similares a los obtenidos previamente en estudios de intubación<sup>15</sup> u otro ensayo, realizado por Clear NJ et al., con la cápsula InteliSite<sup>®</sup> pone de manifiesto que el dispositivo se tolera bien por los voluntarios y que se activa correctamente en la mayoría de las ocasiones<sup>16</sup>. Los dispositivos están siendo fabricados por Glaxo Smith Kline con el nombre de cápsulas InteliSite<sup>®</sup> y Companion<sup>®</sup>; y por Phaeton Research Nottingham, denominadas cápsulas Enterion<sup>®</sup>.

### **12.2.2 Métodos directos**

El estudio directo de permeabilidad en humanos se realiza mediante la perfusión de un solo paso sin recirculación de la región del intestino a estudiar. La determinación de la permeabilidad se basa en el cálculo de la absorción intestinal como función de la desaparición de un fármaco en un segmento intestinal perfundido. Por tanto, la permeabilidad intestinal refleja la velocidad de transporte a través de la barrera epitelial del intestino, expresada en centímetros por segundo.

Generalmente el estudio se realiza en el intestino delgado; el yeyuno es la región de absorción por excelencia de casi todos los fármacos en la mayoría de los mamíferos, tiene la superficie más grande y es el sitio de mayor actividad de los transportadores del intestino.

Se han empleado tres métodos de perfusión en el intestino delgado:

### **12.2.2.1 Método de perfusión abierta**

Este método emplea un tubo de triple lumen que incluye un segmento de mezcla en el que los fluidos gastrointestinales se mezclan con la solución de perfusión que entra en el "segmento de mezclado". Se toma una muestra en el extremo distal del segmento de mezclado y ésta es considerada la concentración de entrada en el segmento estudiado. La absorción se calcula a partir de la segunda muestra tomada al final del segmento estudiado, que está normalmente a 20-30 cm del segmento distal de mezcla. Aunque se ha utilizado este método en ocasiones no es de elección debido al inconveniente de que pueden existir diferencias en la composición de la solución entre el segmento de mezclado y el segmento estudiado por incorporación de fluidos desde el espacio proximal al segmento de mezcla.

### **12.2.2.2 Método semiabierto de tubo multi-lumen con un balón de oclusión proximal**

Este método evita la contaminación proximal por oclusión del extremo con un balón en el segmento de estudio, lo que permite hacer una determinación en condiciones de equilibrio en la composición del líquido intraluminal.

Los dos métodos anteriores tienen como inconvenientes la escasa recuperación de volumen no absorbido y que la velocidad de flujo de perfusión es significativamente más alta que la observada fisiológicamente.

### **12.2.2.3 Método de doble balón con tubo multi-lumen**

Con este sistema se crea un segmento de 10 cm entre dos balones, lo que permite la perfusión de un solo paso de una región bien definida del intestino. La principal ventaja de esta técnica es que se minimiza la contaminación con fluidos lumenales en ambos extremos (proximal y distal) del segmento perfundido, debido a la

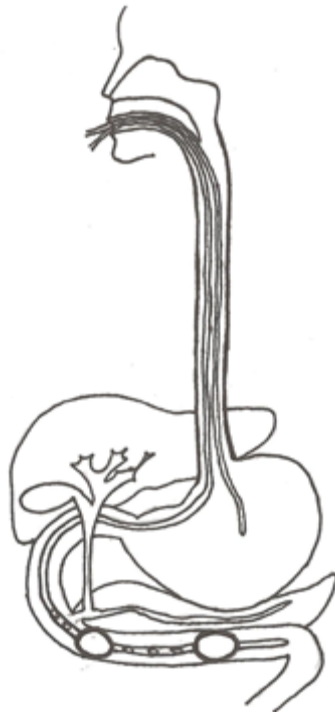
oclusión que provocan los dos balones a ambos lados del segmento que se estudia. Otra ventaja de este método es que se puede recuperar casi por completo el volumen no absorbido ya que la fuga a través de los balones es mínima. El control en la absorción del segmento estudiado con esta técnica facilita el estudio de los mecanismos de transporte y metabolismo de xenobióticos y nutrientes en el intestino humano. Este método permite, además, evaluar el efecto de primer paso intestinal y hepático por determinación simultánea del grado de absorción y biodisponibilidad<sup>10</sup>.

Lennernas ha desarrollado un método de doble balón y tubo multi-lumen, conocido con los nombres de Loc-I-Gut (intestino delgado) y Loc-I-Col (colon) como técnica para la determinación de la permeabilidad en humanos. La técnica ha sido validada y ampliamente aplicada para investigar la absorción de los fármacos y el metabolismo intestinal presistémico; de hecho, actualmente se considera la técnica de referencia para este fin. Para realizar la técnica de perfusión Loc-I-Gut se somete a los voluntarios a un ayuno nocturno de 10 horas. Pasado este tiempo se les aplica un anestésico local (lidocaína) en la garganta para evitar molestias a la hora de la introducción del tubo a través de la boca. Después, se procede a la inserción del tubo Loc-I-Gut; para ello, se usa una guía con revestimiento de teflón para facilitar el paso al intestino delgado. Este tubo multicanal tiene 175 cm de largo, un diámetro externo de 5,3 mm y está hecho de cloruro de polivinilo. Contiene seis canales y está provisto distalmente con dos balones alargados de látex de 40 mm de largo, colocados a 10 cm uno del otro. Cada uno de los balones está conectado a uno de los canales más pequeños. Los dos canales más anchos en el centro del tubo son para la infusión y la aspiración del líquido de perfusión o aire. Los dos canales periféricos restantes se utilizan para la administración de sustancias marcadoras y/o para el drenaje. En el extremo distal del tubo hay unido un peso de 8 cm hecho con pequeñas placas de tungsteno. Este peso facilita el paso del tubo en el yeyuno y su posicionamiento en la parte deseada del intestino delgado.

Una vez introducido el tubo Loc-I-Gut, mediante un fluoroscopio se comprueba la posición del tubo, debiendo estar en la parte proximal del yeyuno. Junto con el tubo Loc-I-Gut, se introduce otro tubo Salem-sump hasta el estómago, con el fin de drenar el jugo gástrico durante el experimento. Una vez que el tubo de perfusión está en el lugar correcto y el balón proximal ha pasado el ligamento de Treitz, los dos balones se inflan con 26-30 ml de aire, de forma que cierran un segmento del yeyuno de 10 cm de largo. La Figura 2 muestra el esquema del sistema. Para eliminar cualquier fluido intestinal que pueda haber antes del segmento que se va a perfundir, se conecta una bomba de vacío al canal proximal de drenaje del tubo. A continuación, se realiza un enjuague con solución salina isotónica a 37°C durante,

al menos, 20 minutos. Después, se procede a la perfusión de la solución del fármaco que se va a estudiar, también a 37°C, usando una bomba que introduce la solución a una velocidad de flujo que, generalmente, está entre 2 y 6 ml/min (los valores fisiológicos en el intestino delgado proximal en humanos son de 0.6 a 4.2 ml/min). El fluido perfundido que sale del segmento yeyunal se recoge cuantitativamente en fracciones de 10 minutos sobre hielo e inmediatamente se congela, generalmente a -20°C, hasta que es analizado. Tras completar el experimento, antes de retirar el sistema Loc-I-Gut, el segmento yeyunal se enjuaga con 120 ml de suero salino isotónico<sup>11,17</sup>.

Además del fármaco que se va a estudiar, la solución a perfundir contiene un marcador no absorbible que suele ser el marcador hidrosoluble polietilenglicol [14C] PEG 4000<sup>18,19</sup>. La recuperación completa de este compuesto en el fluido perfundido que sale del segmento intestinal indica que la mucosa intestinal ha permanecido intacta durante el experimento. Los métodos de perfusión clásicos eran poco fiables porque podía fugarse el fluido por los globos y era muy difícil recoger por completo el fluido que no se había absorbido por lo que el uso de marcadores no absorbibles ha sido un gran avance.



**Figura 2.** Esquema de la técnica Loc-I-Gut.



Para asegurar que la concentración de fármaco que se recoge en el fluido perfundido que sale del segmento intestinal, corresponde con la concentración de fármaco que no se ha absorbido, es necesario hacer pruebas de estabilidad y de adsorción. La adsorción al catéter se evalúa con una prueba de perfusión *in vitro* en un tubo de cristal durante 100 minutos. La prueba de estabilidad se hace con la solución de perfusión a 37°C durante 180 minutos. También se prueba la estabilidad poniendo el fármaco en incubación a 37°C durante 60 minutos en el fluido del yeyuno de humano recogido de tres individuos<sup>20</sup>.

Lennernas et al. publicaron en el año 2007 unos resultados en los que se pone de manifiesto la buena correlación existente entre la permeabilidad medida en yeyuno usando la técnica de perfusión de un solo paso sin recirculación y la fracción de dosis absorbida de los fármacos en humanos determinada por estudios farmacocinéticos<sup>11,21</sup>. El uso de los datos de permeabilidad efectiva yeyunal como sustituto del grado de absorción está científicamente justificado; por tanto, un compuesto con alta permeabilidad en yeyuno (superior a la de la permeabilidad yeyunal del metoprolol) tendrá, sin duda, una fracción de dosis absorbida alta, evitando el riesgo de clasificación errónea según el BCS como un fármaco clase I. Se debe tener mucho más cuidado cuando la  $P_{eff}$  yeyunal no admite una clasificación de alta permeabilidad; un examen completo puede revelar alta permeabilidad, atribuible, por ejemplo, a una permeabilidad dependiente del segmento debido al grado de ionización o de la expresión de algún transportador<sup>9</sup>.

La Tabla 1 recoge los métodos más utilizados para determinar la permeabilidad intestinal en humanos y un breve resumen de sus características más relevantes.

*Tabla 1. Métodos para determinar la permeabilidad en humanos.*

Métodos	Estudio	Características
Indirectos	Balance de masas farmacocinético	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fármaco radiomarcado</li> <li>- Administración oral</li> <li>- Muestras de sangre, orina y heces</li> <li>- Aporta información sobre biodisponibilidad permeabilidad del fármaco</li> </ul>
	Estudio farmacocinético comparativo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Administración oral e intravenosa</li> <li>- Muestras de sangre u orina</li> <li>- Aporta información sobre biodisponibilidad, distribución, eliminación, permeabilidad e influencia de enzimas y transportadores presistémicos</li> </ul>
	Cápsulas inteligentes	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Liberación de un fármaco en un lugar determinado del intestino</li> <li>- Muestras de sangre</li> <li>- Permite estudiar velocidad y grado de absorción de un fármaco en regiones específicas del tracto gastrointestinal</li> </ul>
Directos	Método de perfusión abierta	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tubo de triple lumen con un segmento de mezcla</li> <li>- La incorporación de fluidos de la zona proximal puede provocar diferencias en la composición de la solución del fármaco</li> </ul>
	Método de perfusión semiabierta	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tubo multi-lumen con un balón de oclusión proximal</li> <li>- Evita la incorporación de fluidos desde el espacio proximal</li> </ul>
	Método del doble balón (Loc-I-Gut)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tubo multi-lumen, segmento de 10 cm entre dos balones</li> <li>- Minimiza la contaminación con los fluidos lumbales</li> <li>- Recuperación casi completa de la solución no absorbida</li> <li>- Aporta información sobre mecanismos de transporte y metabolismo en el intestino, efecto de primer paso intestinal y hepático, absorción y biodisponibilidad</li> </ul>

Como se ha mencionado anteriormente, la técnica Loc\_I-Gut es la más utilizada. La principal ventaja de la técnica de perfusión intestinal Loc-I-Gut es que permite

determinar directamente la permeabilidad intestinal *in vivo* en humanos y medir, simultáneamente, los parámetros farmacocinéticos plasmáticos<sup>10,20</sup>. Este método permite una investigación más directa *in vivo* de la absorción intestinal y la secreción intestinal y biliar, sin la influencia de la disolución, motilidad y tránsito gastrointestinal y cambios de pH<sub>2</sub>. Además, se puede estudiar los procesos de primer paso intestinal y/o hepático<sup>17</sup>.

Una ventaja importante de la técnica Loc-I-Gut, es la posibilidad de evaluar el grado del efecto del metabolismo de primer paso intestinal y hepático determinando simultáneamente el grado de absorción y biodisponibilidad. Esto no puede hacerse con la misma precisión usando otras técnicas de perfusión, ya que en estos casos el grado de absorción sólo se puede estimar si se usan compuestos marcados radiactivamente<sup>10</sup>.

De los datos obtenidos en los estudios de permeabilidad en humanos, uno de los hallazgos más importantes es que existe una buena correlación entre la permeabilidad efectiva medida en humanos y el grado de absorción en humanos determinado por estudios farmacocinéticos<sup>10</sup>.

Durante el descubrimiento de fármacos y su desarrollo preclínico es importante la caracterización precisa y rápida de los procesos farmacocinéticos, como son la absorción, distribución, metabolismo y excreción. El uso de cualquier modelo preclínico diseñado para predecir la absorción del fármaco en el intestino humano debe comenzar con una validación de los correspondientes datos *in vivo* de humanos<sup>2</sup>.

Respecto a los inconvenientes, se debe tener en cuenta que mediante la técnica Loc-I-Gut se determina la permeabilidad en un segmento del yeyuno de 10 cm de largo localizado a 40 cm de la unión gastroduodenal. Los resultados obtenidos representan la media de  $P_{\text{eff}}$  de ese segmento de 10 cm de yeyuno proximal. Ésta es la mejor medición disponible en humanos en la actualidad, pero no representa la  $P_{\text{eff}}$  de todo el intestino humano; por lo tanto, la  $f_{\text{abs}}$  no siempre se predice adecuadamente<sup>2</sup>.

Otra de las desventajas de este método es que si existe metabolismo en el lumen y/o en el borde de cepillo, interferirá directamente con la determinación de la permeabilidad, en contraste con el metabolismo intracelular (que se considera como metabolismo de primer paso)<sup>10</sup>.

Por último, uno de los problemas que a menudo se argumentan en las técnicas de perfusión en general, es que pueden perturbar la fisiología, especialmente los patrones de motilidad. En un estudio realizado por Read y colaboradores en 1984,

se observó que la presencia del tubo enlentecía la vida media del vaciado gástrico y el tiempo de tránsito en el intestino delgado. Sin embargo, estos efectos eran mínimos y no ponen en entredicho los datos de absorción de fármacos obtenidos usando estos métodos de perfusión<sup>10</sup>. La Tabla 2 recoge un esquema de las ventajas e inconvenientes de la técnica Loc-I-Gut.

**Tabla 2.** Ventajas e inconvenientes de la técnica Loc-I-Gut

Ventajas	Inconvenientes
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Determinación directa de la <math>P_{eff}</math></li> <li>- Cálculo de parámetros farmacocinéticos plasmáticos</li> <li>Estudio de la absorción y secreción intestinal y biliar sin influencia de disolución, motilidad, tránsito y cambios de pH</li> <li>- Estudio del metabolismo de primer paso intestinal y hepático determinando a la vez la absorción y biodisponibilidad</li> <li>- Buena correlación con resultados de estudios farmacocinéticos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Medida de permeabilidad en un segmento yeyunal, no representativo de la <math>P_{eff}</math> de todo el intestino</li> <li>- Interferencia en el valor de <math>P_{eff}</math> debida al metabolismo en lumen o borde de cepillo</li> <li>- Modificación de la motilidad (despreciable)</li> </ul>

## 12.3 Cálculo de la permeabilidad

Los cálculos de permeabilidad efectiva intestinal y otros parámetros se realizan a partir de los datos de las muestras tomadas en estado estacionario. Se considera que se ha alcanzado esta meseta cuando las concentraciones de fármaco y de [<sup>14</sup>C] PEG 4000 en el fluido perfundido que sale son estables<sup>11</sup>. Cada muestra representa el promedio de las concentraciones de las alícuotas recogidas por cada intervalo de 10 minutos<sup>12</sup>.

Para realizar los cálculos se asume que la cantidad de fármaco que desaparece al realizar la perfusión del segmento intestinal es igual a la cantidad de fármaco que se absorbe. Esta asunción se puede realizar cuando se dan una serie de condicionantes fisiológicos y farmacocinéticos:

- a) El intestino se comporta como un modelo en agitación.
- b) El fármaco no se adsorbe al material del tubo.

- c) No hay degradación química o enzimática del fármaco.
- d) No hay acumulación del fármaco en la pared o tejido intestinal.
- e) Existe una superficie cilíndrica lisa para la absorción.
- f) Se dispone de un perfil de concentraciones lumbales bien definido<sup>6</sup>.

La permeabilidad efectiva intestinal se calcula de acuerdo a la ecuación:

$$P_{\text{eff}} = Q_1 \cdot (C_1 - C_2) / C_2 \cdot 2 \cdot \pi \cdot R \cdot L$$

donde  $Q_1$  es la velocidad de flujo de perfusión que entra en el segmento yeyunal,  $C_1$  y  $C_2$  son las concentraciones de fármaco de entrada y de salida, respectivamente. La superficie del cilindro ( $2\pi RL$ ) del segmento yeyunal se calcula usando la longitud del segmento ( $L=10$  cm) y el radio intestinal<sup>2,12</sup>. El radio del yeyuno humano se ha medido mediante un análisis de rayos X perfundiendo el segmento del yeyuno con bario, obteniendo un radio de 1.75 cm<sup>17</sup>.

El flujo neto de agua (NWF, por sus siglas en inglés) por cm en el fluido perfundido yeyunal se calcula para cada muestra con la ecuación:

$$\text{NWF} = [(1 - \text{PEG}_2 / \text{PEG}_1) \cdot Q_1] / L$$

donde  $\text{PEG}_1$  y  $\text{PEG}_2$  son las concentraciones de [<sup>14</sup>C]PEG 4000, que entran y salen del segmento, respectivamente. Un valor NWF negativo indica absorción neta de agua<sup>17</sup>.

Tras comprobar que el fármaco no se adsorbe al tubo de perfusión y que es estable en la solución de perfusión, se asume que la cantidad de compuesto que desaparece durante la perfusión a través del segmento es la cantidad que se absorbe ( $f_{\text{abs}}$ ) y ésta se calcula con la ecuación:

$$f_{\text{abs}} = 1 - (C_2 \cdot \text{PEG}_1 / C_1 \cdot \text{PEG}_2)$$

La semivida de absorción ( $t_{1/2}$ ) estimada a partir de los valores medidos de permeabilidad en humanos es un parámetro útil para predecir el tiempo para la absorción máxima. Este parámetro se calcula mediante la ecuación:

$$t_{1/2} = V \cdot \ln 2 / P_{\text{eff}} \cdot 2 \cdot \pi \cdot R \cdot L$$

donde  $V$  es el volumen estimado de fluido dentro del segmento intestinal perfundido<sup>10</sup>.

El volumen del segmento intestinal durante cada intervalo de muestreo se calcula con la siguiente ecuación<sup>1</sup>:

$$V = [(PEG_1 - PEG_2)/PEG_2] - \text{volumen del tubo}$$

## 12.4 Buenas Prácticas Clínicas en los estudios de permeabilidad en humanos

El estudio de permeabilidad en humanos, de acuerdo a sus características y objetivos, debe enmarcarse dentro del concepto de Estudio o Ensayo Clínico, que es definido por la Buenas Prácticas Clínicas (BPC) como: “toda investigación efectuada en seres humanos dirigida a determinar o verificar los efectos clínicos, farmacológicos y/o demás efectos farmacodinámicos, y/o identificar cualquier reacción adversa, y/o estudiar la absorción, metabolismo y excreción de uno o varios medicamentos en investigación con el propósito de determinar su seguridad y/o eficacia” <sup>22</sup>. Por esta razón y para garantizar la protección de los derechos, la seguridad y el bienestar de los sujetos, de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki, el diseño y desarrollo de este tipo de estudios debe seguir las normas y recomendaciones establecidas en las BPC, adaptándolas a su naturaleza.

Antes de iniciar un estudio en humanos, es un requisito indispensable contar con un Dictamen Favorable emitido por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC). Para obtener este dictamen es necesario que el investigador lo solicite y presente la solicitud del protocolo del ensayo y sus modificaciones, el documento del consentimiento informado, los procedimientos de captación de sujetos, la hoja de información para el paciente, el Manual del Investigador, la información disponible sobre seguridad, la información referente a la remuneración e indemnizaciones previstas para los sujetos, el currículum vitae del investigador y cualquier otro documento que requiera el CEIC<sup>21</sup>.

A continuación se explica los requerimientos generales en cuanto a personal, documentos e instalaciones requeridos para realizar un estudio de permeabilidad en humanos, según lo establecido en las BPC.

### 12.4.1 Personal

- Investigador: es la persona responsable de la realización del ensayo clínico en un centro de investigación. Si quien realiza el ensayo es un equipo, el investigador será el responsable del equipo y puede denominarse investigador principal<sup>21</sup>.

- Personal médico: los ensayos deben estar bajo la supervisión de un equipo médico responsable del bienestar y seguridad de los pacientes.
- Personal de enfermería: es necesario el apoyo del personal de enfermería durante el desarrollo de los ensayos y se prefiere que este personal cuente con experiencia en servicios de urgencia y/o unidades de cuidados intensivos.
- Otro personal: se refiere a personal de laboratorio cuya función es realizar las determinaciones de fármacos en las muestras usando las herramientas analíticas adecuadas<sup>23</sup>.

## 12.4.2 Documentos

- Protocolo: es un documento que recopila objetivos, diseño, metodología, estadística y organización del ensayo. Suele contener, además, antecedentes y justificación del ensayo<sup>21,22</sup>.
- Procedimientos Normalizados de Trabajo (PNT): documentos que contienen instrucciones escritas y detalladas de todas las actividades y funciones que se desarrollan en el centro. Todo el personal involucrado con el desarrollo y ejecución del ensayo debe estar entrenado en los procedimientos que sean necesarios y dicho entrenamiento debe estar igualmente documentado. Debe existir un PNT que establezca las acciones y los registros en caso de presentarse acontecimientos adversos, acontecimientos adversos graves, reacciones adversas a un medicamento o reacciones adversas inesperadas<sup>21, 22</sup>.
- Manual del investigador: proporciona datos clínicos y no clínicos relevantes para el estudio del medicamento en el ser humano. Proporciona los procedimientos destinados a monitorizar la seguridad y orienta el manejo clínico de los sujetos del estudio durante la realización del ensayo clínico<sup>21</sup>.
- Hoja de información para el paciente y del consentimiento informado para el sujeto del ensayo: estos documentos corresponden al proceso mediante el cual un sujeto confirma voluntariamente su deseo de participar en un estudio en particular, después de haber sido debidamente informado con lenguaje accesible al interlocutor sobre todos los aspectos de éste que sean relevantes y puedan afectar su decisión de participar. Este documento del consentimiento se debe firmar y fechar convenientemente<sup>24</sup>.
- Cuaderno de recogida de datos: corresponde a los documentos impresos, ópticos o electrónicos empleados para la recogida de datos obtenidos según el protocolo para cada sujeto del ensayo.

- “Audit trail”: documentación que permite la reconstrucción del curso de los acontecimientos del ensayo clínico.
- Informe del estudio o ensayo clínico: es una descripción escrita del estudio o ensayo. Debe contener la descripción procedimental, clínica y estadística<sup>21</sup>.

### 12.4.3 Instalaciones

Se debe disponer de espacio suficiente para que se desarrollen adecuadamente las actividades necesarias para el estudio. El diseño del centro debe permitir el acceso fácil de los servicios de emergencia. Si el centro no está dentro de un recinto hospitalario, debe tener fácil acceso para ambulancias y estar situado a una distancia razonable de un centro hospitalario que disponga de servicios de urgencias y unidad de cuidados intensivos.

Debe haber lugares adecuados para el almacén de muestras, estándares, solventes, reactivos, medicamentos y documentos. Las instalaciones también deben contar con un sistema de alarmas o de monitorización para controlar la temperatura. Este sistema debe ser comprobado regularmente y la comprobación, documentada.

Las instalaciones eléctricas deben contar con un sistema que permita el funcionamiento de los equipos de emergencia y otros instrumentos necesarios para la realización de los estudios en caso de una avería eléctrica. Es importante que haya facilidad de comunicación por teléfono, correo electrónico y/o fax. También deben existir sistemas de control de acceso y archivo.

En una unidad destinada a un ensayo de permeabilidad en humanos se requiere las siguientes dependencias diferenciadas y separadas:

- Zona para información/selección de voluntarios.
- Zona de exploración para participantes: a fin de garantizar la confidencialidad y respeto por las personas y realizar de forma adecuada el proceso de selección y reclutamiento de los participantes.
- Sala de hospitalización: para permitir que los participantes puedan permanecer ingresados, así como para la estancia del personal médico, de enfermería u otro personal que se considere necesario. Esta área debe reunir los requisitos necesarios para hacer la estancia de los participantes confortable y segura. Además, debe existir dispositivos para el control de



constantes fisiológicas o de variables farmacodinámicas, y sistemas y aparatos necesarios para el tratamiento de cualquier situación de emergencia.

- Zona de acceso controlado para guardar la medicación: debe existir un área para guardar y manipular los medicamentos que van a ser estudiados. También debe haber un área específica para conservar los medicamentos que se usen en caso de emergencia. Esta área debe mantener condiciones medioambientales que permitan garantizar la estabilidad de los fármacos. Es importante que exista un protocolo de registro de la recepción y consumo y reposición de los medicamentos.
- Laboratorio para el procesamiento y zona de almacenamiento de las muestras.
- Zonas de acceso controlado para guardar los documentos del estudio: área específica, con acceso restringido, destinada a almacenar documentos relacionados con los estudios en marcha y archivos de los ensayos clínicos realizados en la institución. Debe estar protegida contra incendios<sup>2</sup>.

## **12.5 Permeabilidad en humanos y datos obtenidos en modelos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* en animales**

La determinación de la permeabilidad intestinal en humanos podría considerarse un parámetro de vital importancia para el desarrollo de sustancias activas destinadas a la administración oral. Sin embargo, la técnica empleada es compleja, costosa económicamente, presenta problemas éticos dependiendo del principio activo a ensayar y no permite la evaluación de un gran número de moléculas y, por ello, se ha tratado de correlacionar los datos de permeabilidad en humanos con datos obtenidos en modelos más sencillos, a fin de predecir el comportamiento de nuevos fármacos o formas farmacéuticas.

Se ha realizado revisiones que pretenden comparar y correlacionar los datos sobre permeabilidad en humanos con los datos obtenidos en modelos animales. Los datos de permeabilidad en humanos se basan en determinaciones directas *in vivo* en el tracto gastrointestinal humano con un sistema de perfusión de un solo paso sin recirculación<sup>2</sup>. En la bibliografía, la disponibilidad de datos de permeabilidad *in vivo* es limitada. Además, hay escasez de estudios de permeabilidad intestinal en otros mamíferos. Los modelos preclínicos de permeabilidad, como la perfusión *in situ* en rata, el modelo celular *in vitro* Caco-2 y los modelos de cámaras Ussing con segmentos intestinales extirpados, se pueden utilizar para predecir la permeabilidad

*in vivo* en humanos<sup>10</sup>. La técnica Loc-I-Gut ha proporcionado una importante base de datos sobre permeabilidad intestinal de fármacos *in vivo* que puede ser utilizada para comparar con los datos de permeabilidad obtenidos en modelos animales<sup>2</sup>. Las correlaciones de los datos han permitido determinar que se puede predecir de manera muy precisa la permeabilidad de sustancias que se absorben por difusión pasiva con los modelos *in vitro*. En cambio, los compuestos con mecanismos mediados por transportador requieren mayor atención, ya que la predicción puede requerir algún tipo de factor de escala<sup>10</sup>.

El modelo mejor caracterizado y validado es el modelo *in situ* de perfusión intestinal en rata. Existe muy buena correlación entre los datos de permeabilidad obtenidos en el intestino delgado humano y el de rata<sup>2</sup>. Con respecto a la expresión de los transportadores, en el duodeno se ha observado una moderada correlación. Pero, en cuanto a la expresión de las enzimas encargadas del metabolismo, no existe correlación entre humanos y ratas, lo que explica las diferencias que existen en cuanto a metabolismo y biodisponibilidad oral entre las especies. Por todo ello, los modelos de rata pueden ser usados para predecir con precisión la absorción de fármacos en el intestino delgado de seres humanos, pero no pueden usarse para predecir su metabolismo o biodisponibilidad<sup>2</sup>.

Una fuente de variabilidad a considerar entre datos en humanos y ratas es la anestesia, ya que el estado de anestesia contribuye a que la difusión pasiva sea un poco más lenta a través del yeyuno<sup>2</sup>.

En el intestino delgado de la rata se ha observado que el nivel de expresión de la glicoproteína P, depende de la región y sigue un gradiente que aumenta desde el segmento proximal hacia el distal. En los humanos se ha observado la misma tendencia aunque con mayor variabilidad<sup>2</sup>. Se ha realizado estudios en regiones del intestino humano, cuyos resultados permiten afirmar que la permeabilidad depende del segmento intestinal. Pero existen pocos datos experimentales en humanos, por lo que parece que la estrategia más adecuada a seguir es usar el modelo animal (rata) que permita evaluar las diferencias de permeabilidad en cada segmento del intestino y orientar sobre la situación en los humanos<sup>2</sup>. Para aquellos compuestos con transporte pasivo, el orden de importancia de los segmentos proximales del yeyuno, perfundidos en ratas y en los seres humanos, es similar<sup>2</sup>.

El modelo *in vitro* de cultivo celular Caco-2 es otro de los sistemas *in vitro* más usados para estimar la absorción intestinal de un compuesto en humanos. De hecho, se ha postulado que este modelo sería un candidato favorable para reducir la necesidad de experimentos con seres humanos y animales. Sin embargo, la expresión bioquímica y celular de las proteínas y otros componentes celulares, en

comparación con el intestino humano, es difícil de cuantificar o desconocida. Los resultados publicados indican que no se conocen falsos positivos en los estudios de permeabilidad en Caco-2; si un compuesto muestra alta permeabilidad en una monocapa de células Caco-2 en un estudio validado, tendrá alta fracción absorbida. De forma general, existe una correlación entre los datos de permeabilidad en Caco-2 y la absorción de fármacos en humanos. Sin embargo, este modelo funciona dentro de ciertos límites, ya que si los fármacos tienen baja permeabilidad en Caco-2 o se absorben a través de mecanismos mediados por transportador, pueden surgir discrepancias. Para compuestos con transporte que requiere algún tipo de transportador, se ha observado que los valores de permeabilidad en células Caco-2 son menores que los obtenidos en el yeyuno humano *in vivo* a las mismas concentraciones. Esto es debido a que en este modelo hay una expresión variable, y en general menor, de los transportadores que se encuentran en el modelo *in vivo*. En cambio, para los fármacos que se absorben en la mucosa yeyunal de los humanos por difusión pasiva puede predecirse su permeabilidad y clasificarse mediante el modelo *in vitro* de células Caco-2. No obstante, es necesario un mejor conocimiento de las correlaciones *in vitro-in vivo* si se desean utilizar exclusivamente los datos *in vitro* para predecir la absorción *in vivo* y la biodisponibilidad en la fase de desarrollo de fármacos.

El modelo de las cámaras Ussing es una valiosa herramienta predictiva de la absorción *in vivo* de fármacos a través del tracto gastrointestinal humano, y es útil para investigaciones *in vitro* del transporte y metabolismo de fármacos. En el modelo de las cámaras Ussing con segmentos extirpados, se utiliza tejidos animales, principalmente de las ratas, para investigar el transporte intestinal de fármacos, así como las variaciones regionales de transporte. Los estudios realizados con tejidos humanos mediante la misma técnica son limitados. Para fármacos con baja solubilidad, se ha demostrado que el epitelio intestinal de rata en el modelo de las cámaras Ussing es más eficaz en la predicción de la fracción absorbida en humanos que el uso de células Caco-2.

Los valores de permeabilidad en humanos se han comparado con los valores de permeabilidad obtenidos en segmentos de yeyuno de rata empleando las cámaras Ussing para compuestos que se absorben tanto por difusión pasiva como por transportador. Existe una alta correlación entre los dos modelos para los compuestos con transporte pasivo. La permeabilidad estimada en humanos es, en general, unas 4-5 veces mayor que la del tejido de rata. Esta menor permeabilidad *in vitro* es debida, probablemente, a la falta de flujo sanguíneo y/o a un gradiente de concentración menos pronunciado que el de la barrera yeyunal *in vivo*. La menor disponibilidad de cofactores *in vitro*, que son cruciales en el funcionamiento óptimo de las proteínas transportadoras, podría también afectar al modelo.

Existen otros modelos animales que son útiles cuando la rata no resulta un modelo válido por su tamaño o cualquier otra característica. Es el caso, por ejemplo, de las formulaciones orales de liberación prolongada. En estos casos se prefiere utilizar perros o cerdos que son los modelos animales más apropiados para este fin. Los perros presentan ventajas, ya que es fácil administrarles la formulación oral, el acceso a los vasos sanguíneos es sencillo y presentan varios factores fisiológicos similares a los humanos. Sin embargo, también existen claras diferencias que sin duda influirán en la evaluación, sobre todo, de formas de dosificación prolongada. En el caso de formas con una liberación muy lenta se prefiere el cerdo como animal de ensayo para los estudios farmacocinéticos. A pesar de todos los intentos por usar modelos animales, se sigue considerando la administración en humanos como la mejor forma de evaluar este tipo de formulaciones siempre que sea posible. También se ha probado el caballo como modelo animal, pero muchos fármacos presentan en este modelo una baja y muy variable biodisponibilidad que puede ser debida a una baja permeabilidad intestinal<sup>2</sup>.

## 12.6 Aplicaciones de los estudios de permeabilidad en humanos

Los ensayos de perfusión intestinal humana aportan conocimiento sobre el transporte directo *in vivo* a través de la membrana intestinal. La técnica Loc-I-Gut también se ha utilizado ampliamente para investigar la secreción de sustancias endógenas. Otras de las numerosas aplicaciones de esta técnica son estudiar:

- a) El efecto de primer paso de fármacos en el hígado.
- b) El metabolismo del fármaco en el tejido intestinal mediante la medición del metabolito o los metabolitos en el fluido perfundido de salida.
- c) La disolución *in vivo* de fármacos.
- d) Estudios farmacológicos locales.
- e) La absorción de nutrientes.
- f) Los mecanismos biológicos de diferentes enfermedades gastrointestinales.
- g) Las interacciones entre alimentos y medicamentos.
- h) La secreción intestinal de fármacos y compuestos endógenos<sup>3</sup>.

Los datos resultantes de aplicar la técnica Loc-I-Gut también se usan para establecer una base de datos de permeabilidad humana para el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) propuesto por Amidon en 1995 y que permite bioexenciones para formas de dosificación oral de liberación inmediata<sup>12</sup>. Estos datos de permeabilidad *in vivo* en humanos, obtenidos en condiciones fisiológicas adecuadas, proporcionan una base para establecer correlaciones *in vitro-in vivo*. Estas correlaciones se pueden usar para predecir la absorción oral de los fármacos, así como el establecimiento de estándares de bioequivalencia para la aprobación de medicamentos.

Otra de las aplicaciones de esta técnica es la investigación directa de las potenciales interacciones fármaco-fármaco y alimento-fármaco en el transporte intestinal y en el metabolismo de la pared intestinal *in vivo* en humanos, ya que el sustrato y el inhibidor están presentes en el mismo segmento intestinal<sup>17</sup>.

## 12.7 Permeabilidad en humanos: investigaciones y retos futuros

Una de las limitaciones de las técnicas de perfusión intestinal es la dificultad de perfundir ciertas partes del intestino como el íleon y diversas regiones del colon. Por este motivo, no hay valores directos de permeabilidad determinados en estas regiones. De ahí surge la necesidad de desarrollar técnicas que hagan posible el estudio *in vivo* del transporte y metabolismo de los fármacos en dichas regiones del tracto gastrointestinal en humanos. Esto permitiría conocer las causas de las diferencias existentes en el transporte y metabolismo entre las distintas regiones, lo que, a su vez, puede conducir al desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlada por vía oral o la modificación de los existentes, aportándoles ventajosas propiedades. Existe suficiente base científica para asegurar que la permeabilidad intestinal se ve alterada en ciertas enfermedades, lo cual ha sido comprobado mediante la prueba de los azúcares; resultaría interesante conocer los valores de permeabilidad obtenidos por la técnica Loc-I-Gut de fármacos modelo en cada una de esas enfermedades.

También es necesario desarrollar mejores modelos *in silico* que permitan relacionar la permeabilidad con las características fisicoquímicas de los compuestos. De este modo, se podrá predecir la permeabilidad de una estructura química haciendo más sencillo y rentable el desarrollo de nuevas sustancias activas. De hecho, se están haciendo estudios cuyo objetivo es derivar una ecuación de relación estructura-actividad cuantitativa (QSAR, por sus siglas en inglés) que, basada en valores de permeabilidad determinados *in vivo* en humanos y en características fisicoquímicas

de una serie de compuestos, permita predecir la absorción pasiva de fármacos en el intestino humano.

El futuro parece estar encaminado hacia el desarrollo de modelos *in silico* partiendo de los datos obtenidos con los fármacos ya conocidos. En un análisis multivariante se correlacionaron los valores de permeabilidad yeyunal en humanos de 22 compuestos distintos, química y estructuralmente, medidos mediante la técnica Loc-I-Gut. Este análisis incluía valores de lipofilia determinados experimentalmente y también incluía descriptores moleculares calculados. Uno de los modelos obtenidos en este estudio se utilizó para predecir los valores de permeabilidad en una validación externa de 34 compuestos. Los datos se correlacionaron bien con los datos de absorción en humanos para dichos compuestos.

---

<sup>1</sup> Lennernas, H., Ahrenstedt, O. & Ungell, A.L. Intestinal drug absorption during induced net water absorption in man; a mechanistic study using antipyrine, atenolol and enalaprilat. *Br J Clin Pharmacol*, Vol, 37, No. 6, 1994, pp. (589-596).

<sup>2</sup> Lennernas, H. Animal data: the contributions of the Ussing Chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo. *Adv Drug Deliv Rev*, Vol. 59, No.11, 2007, pp. (1103-1120).

<sup>3</sup> Cao, X., et al. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharm Res*, Vol. 28, No. 8, 2006, p.p. (1675-1686).

<sup>4</sup> Bermejo, M. & González, I. How and where are drugs absorbed?, in *Preclinical Development Handbook*, S. Cox Gad, Editor, 2008, John Wiley & Sons, Inc, United States of America.

<sup>5</sup> Winiwarter, S., Bonham, N.M., Ax, F., Hallberg, A., Lennernas, H. & Karlen, A. Correlation of human jejunal permeability (in vivo) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach. *J Med Chem*, Vol. 41. No. 25, 1998, pp. (4939-4949).

<sup>6</sup> Knutson, T., Friðblom, H., Ahlstrom, A., Magnusson, C., Tannergren, C. & Lennernas, H. Increased understanding of intestinal drug permeability determined by the LOC-I-GUT approach using multislice computed tomography. *Mol Pharm*, Vol. 6, No. 1, 2009, pp. (2-10).

<sup>7</sup> Camilleri, M., Madsen, K., Spiller, B., Greenwood-Van Meerveld, B. & Verne, G.H.. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil*, Vol. 24. No. 6, 2012, pp. (503-512).

<sup>8</sup> Kubica, P., Kot-Wasik, A., Wasik, A., Namiesnik, J. & Landowski, P. Modern approach for determination of lactulose, mannitol and sucrose in human urine using HPLC-MS/MS for the studies of intestinal and upper digestive tract permeability. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, Vol. 907, 2012 pp. (34-40).

---

<sup>9</sup> Dahan, A., H. Lennernas & G.L. Amidon. The fraction dose absorbed, in humans, and high jejunal human permeability relationship. *Mol Pharm*, Vol. 9, No. 6, 2012, pp. (1847-1851).

<sup>10</sup> Lennernas, H. Human intestinal permeability. *J Pharm Sci*, Vol. 87, No. 4, 1998 pp. (403-410).

<sup>11</sup> Petri, N., Tannergren, C., Holst, B., Mellon, F.A., Bao, Y., Plumb, G.W., Bacon, J., O'Leary, K.A., Kroon, P.A., Knutson, L., Forsell, P., Eriksson, T., Lennernas, H. & Williamson, G. Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase II enzymes, in human jejunum in vivo. *Drug Metab Dispos*, Vol. 31, No. 6, 2003, pp. (805-813).

<sup>12</sup> Gschwind, H.P., Glaenzel, U., Waldmeier, F., Wirz, B., Sabia, H.D., Picard, F., Weiss, H.M., Choi, L., Swart, P.J., Vasudevan, A. & Azria, M. Metabolism and disposition of the oral absorption enhancer <sup>14</sup>C-radiolabeled 8-(N-2-hydroxy-5-chlorobenzoyl)-amino-caprylic acid (5-CNAC) in healthy postmenopausal women and supplementary investigations in vitro. *Eur J Pharm Sci*, Vol. 47, No. 1, 2012, pp. (44-55).

<sup>13</sup> Marty, M., Fumoleau, P., Adenis, A., Rousseau, Y., Merrouche, Y., Robinet, G., Senac, I. & Puozzo, C. Oral vinorelbine pharmacokinetics and absolute bioavailability study in patients with solid tumors. *Ann Oncol*, Vol. 12, No. 11, 2001, pp. (1643-1649).

<sup>14</sup> Ganta, S, Sharma, P & Garg, S. Permeability Assessment, in *Preclinical Development Handbook*, S. Cox Gad, Editor, 2008, John Wiley & Sons, Inc, United States of America.

<sup>15</sup> Pithavala, Y.K., Heizer, W.D., Parr, A.F., O'Connor-Semmes, R.L. & Brouwer, K.L. Use of the IntelliSite capsule to study ranitidine absorption from various sites within the human intestinal tract. *Pharm Res*, Vol. 15, No. 12, 1998, pp. (1869-1875).

<sup>16</sup> Clear, N.J., Milton, A., Humphrey, M., Henry, B.T., Wulff, M., Nichols, D.J., Anziano, R.J. & Wilding, I. Evaluation of the Intellisite capsule to deliver theophylline and frusemide tablets to the small intestine and colon. *Eur J Pharm Sci*, Vol. 13, No. 4, 2001, pp. (375-384).

<sup>17</sup> Lennernas, H., Knutson, L., Knutson, T., Hussain, A., Lesko, L., Salmonson, T. & Amidon, G.L. The effect of amiloride on the in vivo effective permeability of amoxicillin in human jejunum: experience from a regional perfusion technique. *Eur J Pharm Sci*, Vol. 15, No. 3, 2002, pp. (271-277).

<sup>18</sup> Sladen, G.E. Perfusion studies in relation to intestinal absorption. *Gut*, Vol. 9, No. 6, 1968, pp. (624-8).

<sup>19</sup> Fagerholm, U., Nilsson, D., Knutson, L. & Lennernas, H. Jejunal permeability in humans in vivo and rats in situ: investigation of molecular size selectivity and solvent drag. *Acta Physiol Scand*, Vol. 165, No. 3, 1999, pp. (315-324).

---

<sup>20</sup> Tannergren, C., Knutson, T., Knutson, L. & Lennernas, H. The effect of ketoconazole on the in vivo intestinal permeability of fexofenadine using a regional perfusion technique. *Br J Clin Pharmacol*, Vol. 55, No. 2, 2003, pp. (182-190).

<sup>21</sup> Lennernas, H. Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, Vol. 37, 2007, pp. (1015-1051).

<sup>22</sup> Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. *Normas de Buena Práctica Clínica*. 1997.

<sup>23</sup> Frías, J., Carcas, A. & Guerra, P. Unidades de fase I, in *Tratado de Medicina Farmacéutica*, Moreno, A., Zaragoza, F. & Porras, A., Editores, 2010, Médica Panamericana, Madrid.

<sup>24</sup> Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos-INVIMA. *ABC Buenas Prácticas Clínicas*. 2009. Ministerio de la Protección Social. Bogotá, Colombia.



# 13. Cultivos celulares

Verónica Vivancos<sup>a,b</sup>, Isabel González-Alvarez<sup>a</sup>, Marta González-Alvarez<sup>a</sup>,  
Marival Bermejo<sup>a</sup>

*a Departamento de Ingeniería. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.  
Universidad Miguel Hernández.*

*b Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia.  
Universidad de Valencia.  
España*

## 13.1 Introducción

El cultivo de células consiste en conseguir un sistema *in vitro* en el que las células provenientes de un órgano o un tejido de características determinadas puedan sobrevivir, crecer y mantener todas sus funciones metabólicas de manera reproducible gracias al control de parámetros tales como la composición de los medios de cultivo, las condiciones de temperatura, pH, aireación y humedad.

Los primeros cultivos celulares se realizaron ya en el siglo XIX, como estrategia para estudiar el comportamiento de las células animales sin que éstas se vieran afectadas por las variaciones sistémicas ocurridas dentro del organismo y el estrés de un experimento.

Se puede considerar que el pionero de los cultivos celulares fue Roux, quien en 1885, consiguió aislar y mantener vivas células de embrión de pollo en solución salina, demostrando que podían sobrevivir fuera del organismo. En 1907, el zoólogo americano R G Harrison fue el primero que empleó técnicas *in vitro* muy rudimentarias para el estudio de fenómenos *in vivo*, utilizando médula espinal embrionaria de anfibios. En 1910 Burrows observó que enriqueciendo los medios de cultivo con suero se obtenían mejores resultados en el mantenimiento de cultivos celulares y entre 1920-1940 se establecieron líneas celulares de diversos órganos animales y se desarrollan diversas estrategias para el mantenimiento de las condiciones estériles. Pero será a partir de 1940 cuando se logren mejorar las perspectivas de uso de los cultivos celulares, gracias a la utilización de los primeros

antibióticos, los cuales conferían una mayor duración del cultivo libre de contaminación. Entre 1940 y 1955 el uso de los cultivos celulares se generaliza y se emplean para todo tipo de ensayos tales como replicación de virus sobre células cultivadas, producción de las primeras vacunas virales en cultivos tras la gran epidemia de la Polio de los 40, determinación de las condiciones óptimas para congelar células en nitrógeno líquido y que mantengan su viabilidad post-congelación, y establecimiento la línea inmortal HeLa (1ª de origen humano, 1952).

En los años 60 comenzó el debate sobre el tiempo de vida limitado de las células normales, las cuales se creían inmortales hasta la fecha. Hayflick y Moorhead demostraron que se podían obtener líneas celulares inmortales a partir de células tumorales. También se desarrollaron las técnicas de hibridación en cultivos. La década de los 70 supuso un boom para la ingeniería genética o teoría del ADN recombinante que ha llegado hasta nuestros días. En la actualidad, pueden cultivarse en el laboratorio células procedentes de una amplia gama de tejidos y organismos diferentes. Además, la aplicación de la tecnología del cultivo celular ha hecho posible profundizar en los conocimientos de los mecanismos implicados en todo tipo de procesos intra e intercelulares.

El uso de cultivos celulares se presenta como una herramienta valiosa en investigación ya que ayuda a comprender los fundamentos de la fisiología celular, la toxicología o la virología así como la absorción de fármacos y muchos otros procesos como muerte celular, carcinogénesis, etc. Además, el desarrollo de las técnicas de cultivos celulares ha hecho posible la producción de productos biológicos de gran calidad y en cantidades importantes tales como hormonas, anticuerpos monoclonales, enzimas y vacunas. También se utiliza en ingeniería tisular.

## **13.2 Ventajas e inconvenientes**

El empleo de cultivos celulares ha proporcionado muchos avances en investigación ya que introduce una serie de ventajas. En primer lugar, el uso de metodologías *in vitro* reduce el empleo de animales de experimentación. Este es el punto más relevante ya que el uso de animales de experimentación es un problema ético y la puesta a punto de nuevas estrategias que permitan reducir o evitar el daño a los animales supone un gran avance en este sentido. Los ensayos con cultivos celulares presentan otras ventajas de índole más práctica como la reducción del tiempo de experimentación y obtención de resultados, la fácil manipulación, la existencia de bancos de células de fácil acceso y la posibilidad de trabajar en pequeña, media y

gran escala. Además, las células de líneas inmortales pueden mantenerse congeladas por largos períodos de tiempo con mínima pérdida de viabilidad. Los sistemas *in vitro* permiten controlar un gran número de parámetros que facilitan la homogeneidad y reproducibilidad de los resultados tales como utilizar un único tipo de células en cada cultivo o los parámetros físicoquímicos y fisiológicos del medio como la temperatura, pH, humedad, presión osmótica, niveles de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, densidad celular o presencia de factores de crecimiento. En general, se ha observado buenas correlaciones de los resultados obtenidos *in vitro-in vivo*.

Sin embargo, el empleo de un sistema tan simplificado también supone una serie de limitaciones. En primer, lugar el comportamiento es distinto al del organismo completo al haber perdido la estructura tridimensional y las interacciones heterotípicas ya que las células no están interaccionando con tejidos ni órganos y carecen de sistemas de regulación. Además de ello, los ensayos con cultivos celulares deben realizarse en instalaciones adecuadas que garanticen la esterilidad de las muestras por lo cual se deben seguir unas estrictas normas de asepsia para evitar la contaminación. El mantenimiento de las instalaciones, el personal cualificado y el material requerido hace que el coste de la investigación con cultivos celulares sea elevado. Aunque en la introducción hemos mencionado la puesta a punto de líneas celulares inmortales, muchos estudios requieren el uso de líneas celulares continuas que son inestables. Otra cuestión que ha generado y genera debate en la comunidad científica es la validez del modelo ya que, además de otras cuestiones, existe una gran variabilidad inter-laboratorio.

Se ha realizado una gran cantidad de estudios de validación de modelos *in vitro* en el marco de la obtención de métodos alternativos a la experimentación animal. Nuestro grupo de investigación lideró un proyecto europeo para intentar determinar las causas de la variabilidad e identificar parámetros de referencia que permitieran comparar resultados de distinta procedencia.

### **13.3 Tipos de cultivos**

Los cultivos celulares se obtienen principalmente a partir de suspensiones de células obtenidas por disgregación de tejidos de diferentes órganos en condiciones controladas y adecuadas para su supervivencia y multiplicación, manteniendo para esto todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que se encontrarían *in vivo*.

Los cultivos de células animales se pueden clasificar atendiendo a distintos criterios, entre ellos su capacidad de adherencia, su procedencia o los procesos de modificación que han sufrido.

Respecto a su **capacidad de adherencia** a superficies determinadas podemos distinguir entre cultivos en monocapa o cultivos en suspensión.

La mayoría de los tipos células necesitan una superficie sólida para proliferar. Su multiplicación se inhibe cuando establecen contacto entre sí, permitiendo la formación de una **monocapa** que cubrirá la correspondiente superficie de crecimiento. Las células provenientes de cultivos primarios son las que mejor crecen en esta condición, dada su estabilidad genética y su naturaleza diploide normal.

Las células hematopoyéticas y algunas líneas celulares tumorales o transformadas, por el contrario, crecen en suspensión, lo cual quiere decir que no están ancladas al soporte que las contiene sino que se encuentran dispersas en el medio que las contiene. Su crecimiento se inhibe cuando empiezan a escasear los nutrientes. En todos los tejidos hay una cierta cantidad de células que crecen en suspensión. Mediante las técnicas adecuadas es posible seleccionarlas y cultivarlas de manera independiente.

También se podría incluir en este grupo los cultivos tridimensionales en los que se utilizan estrategias tecnológicas tales como geles de colágeno, de fibrina y de alginato para producir crecimiento en las tres dimensiones de manera que se consiga imitar más fielmente las condiciones *in vivo*.

Atendiendo a la procedencia de las células y a los procesos que sufren y, entendiendo que se consideran cultivos celulares de manera amplia a las técnicas y procesos destinados al mantenimiento de células *in vitro*, distinguimos los siguientes tipos:

El **cultivo de órganos y tejidos** se puede definir como el mantenimiento de fragmentos de tejidos u órganos completos *in vitro*. Este tipo de cultivos mantienen la estructura tridimensional del tejido u órgano pero no permiten la proliferación celular, por lo que se requiere nuevo material animal para cada experimento lo que conlleva una elevada heterogeneidad y una disminución de las ventajas que supone el cultivo celular propiamente dicho.

Los **explantes** primarios son fragmentos de tejidos u órganos que se adhieren a una superficie de cultivo. Con este sistema se consigue que proliferen las células de la periferia del tejido.

Los cultivos de células, tejidos u órganos aislados directamente de un tejido animal reciben el nombre de **cultivos primarios**. Estos mantienen las características de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide (2n), su crecimiento *in vitro* es limitado y hay inhibición por contacto. Los tipos de células que se utilizan más frecuentemente son epiteliales, de tejido conectivo, muscular o nervioso, células sanguíneas y células madre. El estar más cercanas a las células que las originaron, se ve reflejado en una mejor actividad y funcionalidad similar a su ambiente natural. Cuando en el cultivo coexisten dos tipos de células de linajes diferentes que se pueden separar recibe el nombre de **co-cultivo**.

Cuando uno o varios tipos de células de un cultivo primario se re-siembran en una nueva placa (sub-cultivo), el cultivo obtenido se denomina **cultivo secundario**. En este caso la heterogeneidad celular es menor y puede seleccionarse qué células se desarrollarán mediante el cultivo con medios selectivos.

Las **líneas celulares** son las que se obtienen por sub-cultivo y selección de cultivos secundarios. Un grupo de células puede convertirse en inmortal mediante un proceso llamado transformación. Este proceso implica un cambio fenotípico permanente y heredable que puede ser espontáneo ser inducido químicamente o mediante virus tumorales. Algunas líneas celulares de origen humano se hacen inmortales al introducir telomerasa. Cuando una línea celular es sometida a un proceso de transformación y adquiere la habilidad de dividirse indefinidamente se convierte en una **línea celular continua**. Las líneas celulares inmortales también pueden obtenerse desde células tumorales pero en estos casos sus características pueden ser diferentes. Este tipo de cultivo tiene como característica principal no tener inhibición por contacto y de crecer de manera indefinida. En la *tabla 1* se muestran algunas de las líneas celulares más utilizadas.

*Tabla 1. Líneas celulares comunes*

Línea celular	Procedencia
HeLa	Cáncer de cérvix
Caco-2	Cáncer de colon
MDCK	Epitelio de riñón de perro
Hep-G2	Cáncer de hígado
DU145	Cáncer de próstata

Lncap	Cáncer de próstata
MCF-7	Cáncer de mama
MDA-MB-438	Cáncer de mama
PC3	Cáncer de próstata
T47D	Cáncer de mama
THP-1	Leucemia mieloide aguda
U87	Glioma
Saos-2 cells	Cáncer óseo
L6	Mioblastoma de rata
3T3	Fibroblastoma de ratón
CHO	Ovario de hámster chio

Las células procedentes de cultivos primarios o de líneas celulares inmortales pueden criopreservarse en condiciones establecidas lo cual permite el mantenimiento de la línea.

Es posible, además, fusionar dos células y obtener una célula con dos núcleos en el mismo espacio citoplasmático. Son los llamados heterocariontes. Si la entidad heterocarionte es capaz de dividirse produce una célula híbrida que contiene los cromosomas de ambos núcleos en uno solo. Son los **hibridomas**. Se han utilizado desde hace varias décadas para secretar anticuerpos monoclonales contra un antígeno en particular. Además, se puede distinguir entre cultivos **histotípicos** y cultivos organotípicos. En el primer caso se intenta reproducir una estructura tridimensional que simule al tejido original utilizando estrategias tecnológicas tales como inducir el crecimiento celular en el seno de un gel o de agar, sobrecrecimiento de monocapa en frasco o realización de cultivos de alta densidad. En el caso de los cultivos **organotípicos** se utilizan las mismas estrategias pero en este caso se co-cultivan los diferentes tipos de células que forman parte de un órgano.

## 13.4 Fases del crecimiento

La mayoría de los tipos de células pueden aislarse y cultivarse *in vitro* lo cual implica que son capaces de vivir, reproducirse e incluso de manifestar características diferenciales siempre que el entorno y las condiciones sea adecuadas. En su crecimiento *in vitro* los cultivos pasan por una serie de etapas.

- **Fase de adhesión:** Consiste en la fijación de las células al sustrato e inicio del ciclo celular. Esta fase ocurre en las líneas celulares que crecen adheridas

al sustrato. El proceso de anclaje se produce gracias a la secreción de glicoproteínas y proteoglicanos que se fijan al sustrato. Lógicamente el sustrato debe reunir una serie de requisitos para que este proceso se realice correctamente tales como ser hidrofílico, estar cargado, ser no tóxico y biológicamente inerte.

- **Fase de crecimiento exponencial.** Durante esta fase las células crecen de manera exponencial como su nombre indica hasta que alcanzan la siguiente fase.
- **Fase de confluencia.** Cuando el cultivo se ha saturado las células dejan de dividirse ya que han ocupado todo el espacio disponible. En el caso más frecuente de crecimiento en monocapa se detiene por inhibición por contacto. Cuando se ha alcanzado la confluencia es cuando las células se parecen más morfológica y fisiológicamente al órgano o modelo que se pretende imitar. Los procesos de diferenciación y proliferación son excluyentes. Un nivel bajo de densidad celular induce a las células a entrar en división. Para que el ciclo celular pueda llevarse a cabo es necesaria la presencia de factores de crecimiento inductores. Cuando los cultivos llegan a la confluencia se inhibe el crecimiento debido a la activación de proteínas intracelulares como p53 y Rb. El cultivo de células es diferente dependiendo del tipo celular. El parámetro más relacionado con estas diferencias es el grado de diferenciación. Generalmente las líneas celulares indiferenciadas son más fáciles de mantener en cultivo que las diferenciadas. Las líneas tumorales también resultan fáciles para su cultivo *in vitro*.
- **Fase de muerte.** Si el cultivo se prolonga demasiado tiempo, las células entran en una fase de senescencia que termina en muerte celular. Normalmente, las células se pueden subcultivar varias veces hasta que alcanzan la senescencia y mueren. El número de pases que pueden hacerse depende del tipo de células. Algunas células se hacen inmortales generando así una línea celular<sub>3,4,5</sub>.

## 13.5 Acondicionamiento para cultivos celulares

### 13.5.1 Instalaciones

La sala de cultivos es un laboratorio especializado en infraestructura y equipamiento para poder trabajar en condiciones de esterilidad. El laboratorio debe estar aislado de otros laboratorios para facilitar el mantenimiento de la asepsia

requerida y debe estar dotado de una cámara de flujo laminar que permita generar y manipular de forma óptima y segura los cultivos celulares.

Debe tener un área reservada para recibir material y otra zona para el trabajo en condiciones de asepsia. Las superficies de trabajo deben ser desinfectadas antes y después de la actividad.



La *figura 1* esquematiza la importancia de que la asepsia se mantenga en todos los elementos y etapas del manejo y almacenaje de cultivos celulares.

*Figura 1. Trabajo en condiciones de esterilidad en instalaciones de cultivos celulares*

## 13.5.2 Equipamiento

### **Cabina de flujo laminar.**

La cabina es una zona de trabajo libre de contaminantes esencial para la producción y mantenimiento de los cultivos celulares. Una de sus principales características es poseer un filtro estéril (HEPA) para el aire y flujo laminar. Los filtros HEPA retienen un 99% de eficiencia las partículas de hasta 0.3 micras por lo que garantiza un aire libre de partículas y contaminantes. Su superficie se suele limpiar con agentes químicos y durante las fases en las que no está en uso se mantienen estériles mediante lámparas de luz ultravioleta.

Se pueden clasificar en 3 grupos según el nivel de bioseguridad que ofrezcan. La elección del nivel de bioseguridad depende de la peligrosidad del material de experimentación. Existen muchos tipos de cabinas pero en los laboratorios de cultivos se suelen utilizar las de flujo laminar u horizontal.



- Flujo laminar de circulación vertical: Es una cabina de seguridad en la que el aire recircula y es filtrado antes de pasar al medio ambiente por lo que sirve para contener los patógenos con los que se trabaje en ella. Se recomienda para trabajar con microorganismos peligrosos ya que protege al producto, al medio ambiente y al operador.
- Flujo laminar de circulación horizontal: En este tipo de cabina el aire fluye en forma horizontal. Es la más común. El dispositivo protege al producto pero no protege al medio ambiente ni al operador por lo que no es indicado su uso cuando se trabaja con agentes infecciosos.

### **Incubador**

Los cultivos celulares requieren un ambiente óptimo de humedad, temperatura y CO<sub>2</sub> ya que las células son muy sensibles a subidas de temperatura y a variaciones en el nivel de CO<sub>2</sub> que modifican el equilibrio carbonato-bicarbonato del medio de cultivo. Las condiciones ideales son 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y humedad relativa cercana a la saturación.

### **Baño termostataado**

Necesario para atemperar a 37°C cualquier solución que se vaya a estar en contacto con el cultivo celular.

### **Microscopio invertido**

El microscopio se utiliza para realizar un control visual del estado de las células. Permite observar organismos o tejidos en cultivo sin una preparación previa, favoreciendo el seguimiento del estado de crecimiento, comportamiento y demás parámetros involucrados en el desarrollo del cultivo. Además se pueden observar cultivos en estado natural, sin estrés. También es conveniente la adquisición de un microscopio de fluorescencia para observar y caracterizar distintos procesos celulares mediante tinciones específicas.

### **Frigorífico y congelador**

Para la conservación de soluciones y células a baja temperatura se necesitan distintos sistemas de enfriamiento y diferentes temperaturas:

- Frigorífico (4 °C) para el almacenamiento de medios, PBS, tripsina y demás soluciones cuyo uso sea diario.
- Congeladores de -20°C para conservar el suero, los aditivos del medio (glutamina, antibióticos) y soluciones enzimáticas (tripsina, colagenasa).

- Congeladores de  $-80^{\circ}\text{C}$  para el almacenamiento a largo plazo de los aditivos del medio y de sustancias especialmente sensibles (factores de crecimiento, mitógenos, inductores).
- Unidad de almacenamiento en nitrógeno líquido ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), para la criopreservación de las líneas celulares.

Se recomienda que los congeladores y la instalación de criogenia estén en recintos separados a la unidad de cultivo propiamente dicha pues los ventiladores y compresores son una fuente importante de turbulencias y suciedad en el laboratorio.

### **Centrífuga**

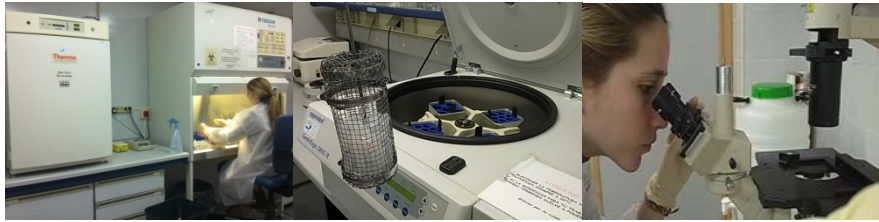
En el laboratorio de cultivo es necesario disponer de una centrífuga refrigerada, con posibilidades de usar en ella desde tubos de pequeño volumen (1 a 2 ml) a botellas de gran capacidad (250 a 500 ml) e incluso placas. La centrífuga se ha de instalar dentro de lo posible alejada de las cabinas de flujo laminar, para evitar las turbulencias de aire que genera.

### **Equipo de filtración y Autoclave**

Todos los productos y el material que entren en contacto con las células debe ser estéril. Para esterilizar el material habitual (pipetas, puntas de pipeta, material de vidrio, pinzas y tubos) se recurre al autoclavado ( $121^{\circ}\text{C}$ , 1 atmósfera, 20 minutos) como método de elección pero cuando no se puede utilizar se utiliza otro método alternativo de acuerdo con las características del material a esterilizar (calor seco, radiaciones). Las disoluciones de trabajo se suelen esterilizar mediante filtración utilizando un filtro esterilizante de tamaño de poro  $0,22\mu\text{M}$  en el momento previo a su uso.

Además de esta equipación básica, los laboratorios de cultivos deben ir dotados de balanzas, equipos de purificación de agua, pHmetros...etc

En la *figura 2* se observa parte del equipamiento necesario para trabajar con cultivos celulares.



*Figura 2. (a) Sala de cultivos celulares con incubador y campana de flujo laminar, (b) Centrífuga, (c) Microscopio invertido*

### 13.5.3 Material

**Pipeteadores y pipetas.** Se trata de dispositivos o instrumentos habituales en los laboratorios de investigación que se utilizan para el trasvase o medición de fluidos. En este caso se utilizan los suministrados por las casas comerciales estériles y envasados de manera unitaria. Suelen llevar un filtro incluido

**Bombas de aspiración,** manuales o eléctricas que permiten la aspiración mecánica del fluido. Importante para mantener la asepsia y al mismo tiempo para la protección del operador. El aire bombeado es filtrado previamente.

**Botellas** de medio, solución tampón, tripsina y demás soluciones para el correcto mantenimiento del cultivo.

**Recipientes para cultivo de células.** Existen en el mercado una gran cantidad de recipientes que permiten cultivar las células a pequeña, mediana o gran escala. Los contenedores más comunes a nivel de laboratorio son los frascos de cultivo o “T-Flask”, que están diseñados y tratados para promover la adherencia y crecimiento de células. Fabricados en poliestireno, son estériles y con áreas de crecimiento de 25cm<sup>2</sup> hasta 175cm<sup>2</sup>. La tapa está diseñada para permitir el intercambio de gases. Existen unos frascos con características especiales como los denominados “roller bottles” y otros que llevan portaobjetos incorporados. Cuando se requiere un cambio de escala hay que tener en cuenta múltiples factores entre los que se encuentra la cantidad óptima de nutrientes, garantizar el intercambio correcto de gases entre otros. En lo que a recipientes se refiere nos encontramos con toda una batería de dispositivos: frascos triples, botellas cilíndricas e incluso biorreactores complejos.

**Cámara de Neubauer,** necesaria para el contaje celular. Es un portaobjetos que contiene un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas

consecutivas de 0.25 mm. Así pues el área sombreada y marcada corresponde a 1 milímetro cuadrado. La zona central del portaobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que genera una cavidad de 0.1 milímetro cúbicos, es decir 0.1 microlitro.

**Placas e insertos**, para realizar los experimentos. Las placas pueden contener distinta cantidad de pocillos (6, 12, 48, 96...) Para la realización de ensayos de permeabilidad se requiere el uso de insertos en cada pocillo. Los insertos contienen una membrana de policarbonato normalmente sobre la que se realizan la siembra de células.

**Material de vidrio.** Se utilizan frascos de vidrio, pero se prefiere el uso de material de plástico para evitar los posibles cortes por rotura.

### 13.5.4 Medio de cultivo

El medio de cultivo es un medio líquido que recubre o rodea las células y que debe garantizar el crecimiento óptimo de las mismas. La principal dificultad para el establecimiento de las líneas celulares es el de obtener medios nutritivos adecuados que sean capaces de reemplazar al medio fisiológico. Estos medios artificiales están compuestos por una serie de nutrientes esenciales para la supervivencia, diferenciación, crecimiento y función de las células. Cada tipo de cultivo requiere un medio de cultivo específico, completado con diferentes sustancias.

Los medios de cultivo están generalmente tamponados para mantener un pH alrededor de 7,4 y tienen, además, indicadores de pH, como el rojo fenol, que cambian de color a medida que se acidifica el medio como resultado del metabolismo celular. Los medios de cultivo se pueden preparar en el laboratorio a partir de sus componentes pero lo más habitual es adquirir los medios comerciales que tienen formas definidas y que incluyen factores de crecimiento y gran número de oligoelementos. Existen una gran cantidad de medios comerciales que abarcan desde los de uso general a algunos específicos para determinados tipos de células. Cualquier medio de cultivo está formado por los siguientes elementos:

- Soluciones salinas equilibradas (BSS)
- Aminoácidos
- Vitaminas
- Glucosa

- Otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular: piruvato, nucleósidos, lípidos, intermediarios del ciclo de Krebs
- Hormonas y factores del crecimiento (casi siempre aportado por el suero)
- Inhibidores del crecimiento de contaminantes. La penicilina y la estreptomina son antibióticos y la anfotericina es un antimicótico, que se adicionan para impedir el crecimiento de bacterias y hongos contaminantes, respectivamente.

Los medios de cultivo suelen estar enriquecidos con suero, el cual presenta actividad promotora del crecimiento celular y en este caso se denominan medios no definidos. La recomendación para establecer un medio definido (sin suero) es empezar con un medio rico y suplementado con elevada concentración de suero (20%) y probar suplementos que permitan reducir la cantidad de suero hasta poderla reducir o suprimir. El suero aporta nutrientes, factores de adhesión, inhibidores de proteasas, hormonas y factores de crecimiento.

La utilización del **suero** presenta diversos problemas:

- El suero varía en cada lote, y cada vez que se produce este cambio hay que realizar una serie de controles costosos.
- Se puede utilizar como máximo un año, a lo largo del cual, se va deteriorando.
- Suele contaminarse con frecuencia por virus y hongos.

Todo esto supone un gran inconveniente para la estandarización de protocolos experimentales. A fin de reemplazar el suero se han desarrollado una serie de sustitutos comerciales como son SerXtend (NEN) y Ventrex (Ventrex Lab Ltd.), Nu-serum (Collaborative Res.)

Después de años de investigación en la composición de los medios la elección de éstos sigue siendo empírica.

### 13.5.5 Parámetros físicos

- **Temperatura:** Tiene gran influencia en la tasa de crecimiento de las células, por lo que es importante un buen control de la misma durante la incubación. También influye en ella el pH del medio. Las células toleran relativamente

bien las bajadas de temperatura pero son sensibles a las temperaturas elevadas.

- **pH:** El pH óptimo de crecimiento para la mayoría de tipos celulares es de 7,4 aunque existen pequeñas variaciones según el tipo celular. Se suele utilizar un sistema tampón, ya sea una solución balanceada que contiene Na, K,  $\text{HCO}_3$ ,  $\text{HPO}_4$ ; el control mediante atmósfera de  $\text{CO}_2$  del incubador; o la solución tampón HEPES.
- **Humedad:** controlada por el incubador, el cual presenta un sistema de circulación de agua en su interior que mantiene el ambiente con la humedad óptima.
- **Osmolaridad:** Suelen crecer bien en el rango de 260 a 320 mOsm/kg. Generalmente se utilizan medios ligeramente hipotónicos para compensar la posible evaporación durante el periodo de incubación, sobre todo en incubadores que carecen de control de humedad. Además, la adición de algunas sustancias como el HEPES puede modificar la osmolaridad del medio
- **Viscosidad:** Viene determinada fundamentalmente por el contenido en suero y apenas influye sobre el crecimiento. La viscosidad es inversamente proporcional al daño celular, por lo que se podría evitar el daño celular en la agitación del cultivo y en la tripsinización aumentando la viscosidad del medio. Se puede incrementar la viscosidad, especialmente en medios libres de suero, añadiendo al medio carboximetil-celulosa o polivinilpirrolidona.
- **Tensión superficial:** Debe ser baja, y en general sólo se ve alterada por la aparición de espumas en los cultivos en suspensión en el cual se burbujea  $\text{CO}_2$ . En estos casos es recomendable emplear un agente antiespumante de silicona pues en éstos casos se produce un aumento de la desnaturalización de proteínas y se incrementa el riesgo de contaminación si la espuma alcanza el cuello del recipiente de cultivo.
- **Fase gaseosa:** la concentración de bicarbonato y la tensión de  $\text{CO}_2$  deben estar en equilibrio para mantener el pH. Normalmente la proporción de  $\text{CO}_2$  oscila entre el 5-10% según la cantidad de  $\text{NaHCO}_3$ . Respecto al oxígeno, es proporcionado por la atmósfera y queda disuelto en el medio de cultivo. Cada tipo de cultivo necesita una concentración diferente de este gas.
- **Luz visible:** Tanto las células como los medios de cultivo deben conservarse con la menor exposición de luz posible, ya que puede favorecer la generación de componentes tóxicos que afecten negativamente a la célula<sup>346</sup>.

## 13.6 Contaminación

La tasa de replicación de las bacterias, hongos y levaduras, es mucho mayor que la de las células eucariotas. Además los medios de cultivo tienen todos los requerimientos nutricionales necesarios para que estos se multipliquen. Los cultivos celulares frecuentemente se contaminan con diferentes especies de microorganismos y micoplasma, lo cual altera el crecimiento celular, los patrones enzimáticos, la composición de la membrana e induce anomalías cromosómicas. En el caso de los estudios de permeabilidad la contaminación puede producir errores en la determinación del parámetro. En todos los casos las alteraciones producidas por las contaminaciones influyen considerablemente en la toma de decisiones de los resultados obtenidos, además de pérdidas económicas y de tiempo.

Una contaminación se puede observar por cambio de pH por ejemplo, o por turbidez, espuma o granulaciones oscuras en el medio. Aunque algunas contaminaciones se aprecian a simple vista, es necesario realizar controles microbiológicos para comprobar la esterilidad de los medios.

## 13.7 Buenas prácticas de trabajo

Las buenas prácticas de laboratorio son procedimientos de organización y trabajo cuyo objetivo es asegurar la calidad e integridad de todos los datos obtenidos durante un estudio determinado y también reforzar la seguridad. Conviene tener en cuenta que un buen procedimiento de trabajo es condición indispensable para la seguridad.

- Todo el personal se lavará las manos después de haber manipulado material infeccioso, así como al abandonar el laboratorio.
- El acceso al laboratorio debe ser controlado.
- Se usarán guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales y otros materiales potencialmente infecciosos o animales infectados. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos.
- Nunca se pipeteará con la boca, empleándose los dispositivos de tipo mecánico.

- Se usarán en todo momento monos, batas o uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio. No se utilizará la ropa de laboratorio fuera de éste. Además la ropa protectora de laboratorio no se guardará en los mismos armarios o taquillas que la ropa de calle.
- Siempre que haya peligro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta, se utilizarán gafas de seguridad, pantallas faciales u otros dispositivos de protección para proteger los ojos y el rostro.
- Se preferirá el uso de material plástico al de cristal a fin de evitar los cortes accidentales.
- En la zona de trabajo está prohibido comer, guardar alimentos, beber, fumar ni usar cosméticos.
- El uso de agujas hipodérmicas y de jeringas debe evitarse. Cuando ello no sea posible, las agujas se recogerán en recipientes adecuados que eviten los pinchazos accidentales.
- Las superficies de trabajo se descontaminarán por lo menos una vez al día y siempre que haya un derrame. Una nota debe especificar el modo de empleo de los desinfectantes, la naturaleza del desinfectante a utilizar y su concentración.
- Todos los desechos biológicos, ya sean líquidos o sólidos, tienen que ser descontaminados antes de su eliminación y se seguirán las normas existentes sobre la gestión de residuos contenidos en las reglamentaciones referentes a residuos sanitarios.
- El material contaminado, que deba ser descontaminado en un lugar exterior al laboratorio, se colocará en un contenedor especial, y se cerrará antes de sacarlo del laboratorio.
- No se usará calzado sin puntera.

Estas son las normas para un laboratorio básico de seguridad biológica. Además de éstas, se podría añadir que el personal que trabaje en los laboratorios de cultivos celulares debe recibir un entrenamiento y una formación adecuada para el correcto manejo de los distintos dispositivos y sobre todo el mantenimiento de las condiciones de asepsia. La OMS clasifica en cuatro categorías según el riesgo que entrañan los microorganismos infectantes que se manipulen. A medida que aumenta el nivel de seguridad, hay que tener mayor precaución 891011121314.



## 13.8 Los cultivos celulares para ensayos de permeabilidad

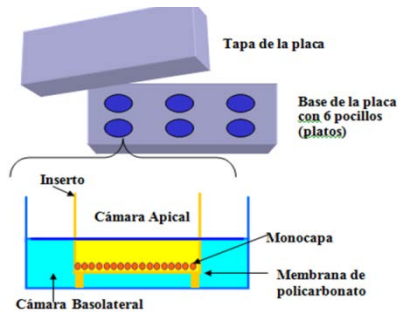
Dado que la vía oral es la forma de administración más cómoda y utilizada por los pacientes es importante realizar ensayos de permeabilidad en fases tempranas del desarrollo de fármacos para acelerar la identificación de moléculas prometedoras.

La permeabilidad junto con la solubilidad son los parámetros que se deben considerar para determinar y predecir la absorción intestinal de los fármacos según el sistema de clasificación biofarmacéutico. La evaluación de la absorción intestinal es un proceso clave para determinar el aprovechamiento de nutrientes y el acceso de fármacos al organismo. La investigación en este campo es muy activa y se ha desarrollado diversos métodos de evaluación los cuales presentan ventajas e inconvenientes que se deberán tener en cuenta a la hora de elegir cual utilizar en un estudio.

Los cultivos celulares presentan diversas ventajas para el estudio del parámetro permeabilidad implicado en la absorción intestinal de fármacos, entre ellas reducción del tiempo y coste, minimización de la experimentación animal, posibilidad de realizar estudios en células humanas, poder estudiar mecanismos de absorción bajo condiciones controladas y rapidez en la determinación de la permeabilidad y metabolismo de los fármacos.

Los cultivos celulares proporcionan una metodología de predicción de la absorción oral de fármacos, utilizando monocapas celulares con un sistema de difusión entre dos compartimentos, que mimetizan el paso del fármaco desde el lumen intestinal al torrente sanguíneo (*figura 3*). El modelo de cultivo celular ideal es aquel que imita las características físicas y bioquímicas de la barrera epitelial intestinal.

El empleo de estos ensayos en la investigación farmacéutica también permite determinar la presencia o no de mecanismos especializados de transporte, los efectos del pH gastrointestinal en la absorción de fármacos y el efecto de los excipientes en la permeabilidad intestinal.



**Figura 3.** Esquema de una placa y un pocillo acondicionado para la realización del ensayo de permeabilidad con cultivos celulares. La monocapa de células crece sobre la membrana de policarbonato, el interior del inserto simula el lumen intestinal y el exterior la zona basolateral, es decir, el torrente sanguíneo.

### 13.8.1 Línea celular Caco-2

La línea celular Caco-2 fue establecida por Fogh y colaboradores en 1977 a partir de carcinoma de colón humano. Es la única línea celular capaz de diferenciarse morfológica y funcionalmente a células con gran similitud a enterocitos, de manera espontánea.<sup>15</sup>.

Esta línea celular ha resultado ser una herramienta útil para el estudio de la absorción oral de fármacos ya que permite trabajar con un elevado rendimiento. Se utiliza tanto en fases de cribado como en estudios de absorción en los cuales adaptando las condiciones experimentales, se realizan experimentos bidireccionales para obtener la permeabilidad de compuestos y determinar su mecanismo de absorción.<sup>16 17 18</sup>.

Las células Caco-2 crecen en monocapa, presentan uniones estrechas (*tight junctions*) entre ellas además de una clara polarización (cara apical y basal). En la cara apical muestran el borde en cepillo <sup>19</sup> mientras que la cara basal es más plana. Otra característica importante que asemeja esta línea celular a la membrana intestinal es la carga enzimática ya que se ha determinado la presencia en las células de muchas de las enzimas del borde en cepillo como hidrolasas (aminopeptidasa-N, fosfatasa alcalina, olopeptidilpeptidasa IV) <sup>20 21</sup>.


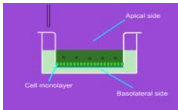

Estudios más recientes indican que este modelo *in vitro* permite clasificar la permeabilidad de los fármacos de forma similar a otros modelos de absorción más complejos, como los tejidos intestinales aislados o los modelos de perfusión *in situ*.<sup>22</sup>.

## 13.8.2 Factores que afectan a la permeabilidad *in vitro*

Los ensayos de permeabilidad se dividen en 3 fases de trabajo: cultivo celular, ensayo de permeabilidad y análisis de los datos, y cada fase está condicionada por factores que pueden incrementar la variabilidad en los resultados obtenidos.

La fase de cultivo celular consiste en el crecimiento de las células en frascos de cultivo o “flasks” y su posterior siembra en monocapas sobre membranas semiporosas. El ensayo de permeabilidad consiste en el transporte del fármaco a través de la monocapa celular. La fase de análisis de datos incluye la medida del fármaco en las muestras y el cálculo de la permeabilidad aparente *in vitro*. La tabla 2 recoge un esquema de las distintas fases y los factores que se deben tener en cuenta en cada una de ellas.

Tabla 2. Fases de los ensayos de permeabilidad intestinal<sup>23</sup>

Fase	Factores	Efectos
Cultivo celular 	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Medio de cultivo, aditivos</li> <li>-Densidad de sembrado celular</li> <li>-Pase celular</li> <li>-Heterogeneidad y diferenciación</li> <li>-Edad de la monocapa y confluencia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Diferenciación de las células</li> <li>-Transportadores desarrollados por la monocapa</li> </ul>
Ensayo de permeabilidad 	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Concentración de fármaco</li> <li>-Temperatura</li> <li>-Tampón de transporte</li> <li>-pH</li> <li>-Integridad de la monocapa (TEER)</li> <li>-Agitación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Ionización del fármaco</li> <li>-Permeabilidad a través de células y filtro</li> </ul>
Análisis de los datos 	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Ecuación de Permeabilidad</li> <li>-Método de análisis del fármaco</li> <li>-Medida de aparición de fármaco en el compartimiento receptor</li> <li>-Medida desaparición del fármaco en el compartimiento dador</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Correlaciones <i>in vivo-in vitro</i></li> <li>-Resultados de <math>P_{app}</math></li> </ul>

Teniendo en cuenta la gran cantidad de parámetros a controlar en cada una de las fases es fácilmente comprensible la variabilidad que se observa en la obtención de medidas de permeabilidad diferentes para un mismo fármaco.

### 13.8.2.1 Factores pre-experimentales

- Pase celular

El proceso de pase afecta a las características biológicas y a las propiedades de la monocapa. Se observa un incremento en la medida de TEER en pases celulares altos (97-98) con respecto a pases más bajos (43-44)<sup>24</sup>. La existencia de cambios en las medidas de Resistencia eléctrica transepitelial en la línea celular Caco-2 fue demostrada por primera vez por Brikse-Anderson y col, los cuales determinaron que el intervalo ideal para la realización de ensayos de permeabilidad en este tipo de línea celular era entre el pase 28 y 65<sup>25</sup>.

El proceso de pase afecta significativamente a las características biológicas y a las propiedades del transporte en monocapas Caco-2. A medida que aumenta el pase celular se produce una reducción de los enzimas en el borde de cepillo y de varias proteínas de transporte<sup>26</sup>.

- Medio de cultivo

Otro parámetro que influye en la integridad de la monocapa, la permeabilidad y expresión de transportadores es la frecuencia con la que se cambia el medio de cultivo y los componentes de este<sup>27</sup>.

La glucosa extracelular a elevada concentración (25-0.5mM) altera el medio isotónico, modificando las propiedades fisiológicas del cultivo celular. Además a mayor concentración de glucosa se fluidifica la membrana, aumentando el incremento de transporte de algunas sustancias.

La glutamina, necesaria para mantener la integridad de la mucosa intestinal, cuando se encuentra en bajas concentraciones produce un descenso del TEER y aumento de la permeabilidad de algunas sustancias.

La frecuencia con la que se renueva el medio afecta a la función diferentes enzimas, como antioxidantes e hidrolasas. Catalasas, glutatión s-transferasa o reductasa<sup>28</sup>.

- Edad de la monocapa

La edad de la monocapa usada en el ensayo de permeabilidad influye en la morfología, propiedades de transporte, integridad, maduración, formación de uniones estrechas y expresión de transportadores en el cultivo celular. Esto junto al pase celular, la densidad de sembrado y la edad de la monocapa influyen en el desarrollo celular. Por lo tanto el TEER y los valores de permeabilidad están influenciados por ello.

El tamaño del filtro es un determinante del tiempo de confluencia y cantidad necesaria de soluto para un experimento.

### 13.8.2.2 Factores experimentales

- pH

A lo largo del intestino delgado se encuentran variaciones del valor de pH que van desde 5 a 8, El valor de pH de cada zona del tracto gastrointestinal afecta al comportamiento del fármaco y modifica su grado de ionización. Esto tiene gran relevancia fisiológica ya que el intestino es el lugar donde se produce la mayor parte de absorción de fármacos administrados por vía oral. Concretamente en plasma y líquido intersticial el pH toma un valor más constante, entre 7.2 y 7.4.

Aquellos fármacos que sean bases débiles, en medio ácido los estarán ionizados y en medio básico no ionizados <sup>29,30</sup>. La velocidad de transporte se verá condicionada por el grado de ionización del fármaco pues las formas no ionizadas son las que difunden de forma mayoritaria<sup>23</sup>.

En los ensayos de permeabilidad se utiliza un tampón de transporte con un pH determinado para el compartimento apical y el basolateral pues se estudió<sup>31</sup> el efecto del pH del tampón tanto en el transporte apical-basolateral como en el basolateral-apical. El cambio del pH en el compartimento apical de 7,4 a 6,5, cuando se estudia el transporte apical-basolateral, produce un aumento en el valor de permeabilidad de los compuestos ácidos; y un descenso de la permeabilidad en los fármacos básicos. Cuando se estudia el transporte en dirección contraria, basolateral-apical y cambiamos el pH en la cámara apical de 7,4 a 6,5 se encuentra un descenso en los valores de permeabilidad de los compuestos ácidos y un incremento de la permeabilidad en los compuestos básicos. Estos cambios de pH no afectan a los compuestos neutros<sup>32,33</sup>.

Los ensayos de permeabilidad pueden realizarse en condiciones isocráticas (el pH en ambos compartimentos será de 7,4) o en gradiente (pH de la cámara apical = 6, y pH de la cámara basolateral = 7,4). Esto va a afectar al grado de ionización de los fármacos y por tanto a su transporte pasivo y activo.

- Utilización de agitador orbital

El transporte pasivo a través de una barrera celular es una combinación de difusión a través de la monocapa y de la capa de difusión acuosa a ambos lados de la membrana<sup>23</sup>.

La agitación durante el experimento de transporte reduce el grosor de la capa acuosa estática. Se ha demostrado un aumento del transporte transcelular y paracelular de algunas sustancias, con consiguiente aumento de permeabilidad.

Las condiciones de transporte, especialmente el pH del tampón de transporte y la agitación durante el ensayo, afectan al flujo del compuesto a través de la monocapa.

- Otros

También hay que tener en cuenta la habilidad y características del personal encargado de realizar los ensayos de transporte, el protocolo utilizado en cada caso y otros factores como el tiempo de toma de muestras ya que pueden incrementar o disminuir el error residual del parámetro a estimar.

### 13.8.2.3 Factores postexperimentales

- Cálculo de  $P_{eff}$

- *Condiciones Sink*

El ensayo debe realizarse en condiciones de mínima concentración, condiciones sumidero o de gradiente máximo ("sink"), de modo que la concentración de fármaco en el compartimento receptor a tiempo  $t$  no rebase nunca el 10% de la concentración inicial en el compartimento dador. De esta forma el proceso puede describirse mediante la siguiente expresión:

$$\frac{dQ}{dt} = P_{eff} \cdot S \cdot C$$

en la que  $dQ/dt$  representa la velocidad de cantidad permeada,  $P_{eff}$  el coeficiente de permeabilidad efectiva,  $S$  el área de difusión y  $C$ , la concentración inicial del fármaco en estudio.

- *Condiciones no Sink*

En este caso no se cumple que la concentración de fármaco en el compartimento receptor a tiempo  $t$  no rebase nunca el 10% de la concentración inicial en el compartimento dador. Esto ocurre con compuestos que tienen una alta permeabilidad.

$$\frac{M_R}{M_{D(0)}} = \left( \frac{V_R}{(V_R + V_D)} \right) \cdot (1 - e^{-\alpha \cdot \beta \cdot t}) \quad (1)$$

$$\alpha = A \cdot P_{app} / V_D \quad (2)$$

$$\beta = (V_D + V_R) / V_R \quad (3)$$

Se debe corregir el valor de la concentración en el compartimento dador para cada tiempo para evitar que los valores calculados de la Peff estén infravalorados, donde  $M_R$  es la cantidad de fármaco en la cámara receptora,  $M_{D(0)}$  es la cantidad en la cámara dadora a tiempo igual a 0,  $V_R$  y  $V_D$  son los volúmenes de ambas cámara (receptora y dadora),  $A$  es el área de difusión y  $P_{app}$  es el coeficiente de permeabilidad aparente.

- Estimación de los componentes de transporte

Los enfoques clásicos están basados en la valoración de la velocidad inicial para obtener el coeficiente de permeabilidad aparente para una barrera simple. Este enfoque incluye la suposición de condiciones sink y la ausencia de problemas en el balance de masas. En algunos casos, este enfoque conduce a inexactitudes en la valoración del parámetro. Por otra parte, el uso de modelos moleculares de transporte requiere de programas más sofisticados para determinar los componentes del transporte que son los parámetros cinéticos que intervienen en la ecuación matemática que explica la evaluación de la concentración de fármaco en el organismo. De esta manera se identifica la afinidad del sustrato por el portador ( $K_m$ ) la velocidad máxima ( $V_m$ ) a la que se realiza el modelo cinético y de los parámetros de difusión a niveles moleculares.

Los métodos para determinar los parámetros que rigen la cinética del fármaco en el organismo son dos:

- *Concentraciones o cantidades frente al tiempo*

En este método se usan los datos obtenidos del experimento, es decir, las concentraciones (o cantidades) en la cámara receptora y se describe el sistema en forma de ecuaciones diferenciales y se realiza la integración numérica.

– *Permeabilidad frente a la Concentración*

Este es el método clásico en el cual se representa permeabilidad efectiva a cada concentración inicial y se separa el componente difusional del componente mediado por transportadores.

### **13.8.3 Aplicaciones de los ensayos de permeabilidad *in vitro***

#### **13.8.3.1 Determinación de la permeabilidad intestinal y mecanismos de transporte**

Los valores de la Permeabilidad se calculan por regresión lineal de las cantidades acumuladas de fármaco en el compartimiento receptor frente al tiempo, de acuerdo con esta expresión:

$$P_{eff} = \frac{b}{S \cdot C} \quad (4)$$

Donde  $P_{eff}$  es el coeficiente de permeabilidad efectiva,  $b$  es la pendiente de la regresión,  $S$  el área de difusión y  $C$ , la concentración del fármaco en estudio.

Para poner en evidencia la existencia o no de transportadores implicados en el mecanismo de absorción de un compuesto, hay que diseñar un estudio donde se ensayen diferentes concentraciones de dicho compuesto. En primer lugar se analiza estadísticamente la hipótesis de igualdad de los valores de las permeabilidades en sentido apical-basolateral y opuesto obtenidos a las distintas concentraciones del compuesto.

Una vez establecida la existencia de diferencias significativas se realiza un ajuste a una cinética combinada de Michaelis-Menten y de primer orden, según los modelos que se ilustran en las figuras siguientes, asumiendo un transporte pasivo y un transporte activo debido, por ejemplo, a la presencia de un transportador de secreción (efflux) para comparar los valores obtenidos en los parámetros de bondad de ajuste con los obtenidos con el diseño de una cinética más compleja. En primer lugar se consideran las diferentes posibilidades de localización del transportador en la cara apical o basolateral de la célula. Un segundo factor a considerar a la hora de



establecer la cinética de absorción es la localización del lugar de unión al portador. Si se asume una distribución inmediata del compuesto en el compartimento dador con el interior de las células la presencia del lugar de unión al portador se convierte en un factor de relevancia.

El transporte del epitelio intestinal puede ocurrir mediante diferentes rutas, que se pueden clasificar en cuatro grupos:

- **Difusión pasiva:** o por gradiente de concentración generado entre los dos lados de la membrana celular <sup>34</sup>. Recibe el nombre de ruta transcelular aquella en la que el compuesto atraviesa la membrana y el citoplasma. En el transporte paracelular están implicados los poros de membrana y las uniones estrechas<sup>15</sup>.
- **Difusión facilitada:** es considerada un mecanismo de transporte pasivo pues aunque influya un transportador, éste no necesita energía para funcionar, y el transporte ocurre por la diferencia de gradiente de concentración.
- **Transporte activo mediado por transportador:** este ocurre tanto en dirección apical-basolateral (lumen a torrente sanguíneo) como en dirección basal-apical (torrente sanguíneo a lumen). Este tipo de transporte facilita el paso de sustancias hidrofílicas y compuestos de bajo peso molecular (menos de 600 Daltons) a través de la membrana intestinal. Algunos nutrientes como azúcares, aminoácidos, péptidos pequeños y purinas utilizan este tipo de transporte.
  - Transporte activo de absorción: Las proteínas que intervienen transportan el fármaco a través de la membrana en sentido lumen sangre. Las proteínas de la familia MRP (proteínas de resistencia a fármacos) actúan de este modo, excepto MRP2.
  - Transporte de secreción o *efflux*: Las proteínas que intervienen impiden el paso del fármaco a través de la membrana, devolviendo al lumen intestinal las moléculas de fármaco que atraviesan la membrana del enterocito. Como resultado, la absorción es menor de la esperada. Las principales proteínas de membrana implicadas en este tipo de transporte son la Glicoproteína P y MRP2. La glicoproteína P limita la entrada en la célula de un amplio rango de sustancias, entre ellas, compuestos catiónicos y lipofílicos como son los fármacos antineoplásicos, fármacos anti VIH, antibióticos y hormonas

- **Endocitosis:** también llamado transporte mediado por vesículas, las moléculas o partículas son envueltas por la célula. En la membrana celular se crean unas invaginaciones que rodean las partículas y forman una vesícula gracias a la cual la sustancia en cuestión atraviesa la membrana hacia el interior de la célula. Este tipo de transporte conlleva gasto de energía. La difusión es dependiente del tamaño de poro y del peso molecular del compuesto. Fagocitosis es una variante de la endocitosis en la cual se envuelve toda la célula y pinocitosis cuando lo que se fagocita es una sustancia líquida. La transcitosis ocurre cuando el material que va a ser transportado es reconocido por un transportador de membrana, un ejemplo de este es la insulina y otras proteínas. La endocitosis es el mecanismo de absorción que menos influye en el paso de sustancias a nivel de epitelio intestinal, pero es muy importante en la incorporación de sustancias proteicas.

### **13.8.3.2 Estudios de mecanismos de inhibición**

El descubrimiento y mejora de mecanismos de inhibición de fármacos es un campo de investigación frecuente en farmacología ya que muchos medicamentos son inhibidores enzimáticos. Las características principales que determinan la actividad de un inhibidor son: especificidad (su incapacidad de unirse a otras proteínas), y su potencia (su constante de disociación, la cual indica la concentración necesaria para inhibir a una enzima). El empleo de inhibidores específicos de determinadas proteínas de transporte ha permitido dilucidar el mecanismo de absorción de muchas moléculas y optimizar de esta manera su posología, dosis así como determinar la vía de administración más adecuada.

### **13.8.3.3 Transfección para simular ventanas de absorción**

Se conoce como transfección al proceso de introducir en una célula en cultivo convertida en permeable, un vector en el cual están insertadas moléculas de ADN extrañas (heterólogas). Un ejemplo común en el campo de los cultivos celulares es insertar el gen que codifica determinadas proteínas como la glicoproteína P a las células para que la sobreexpresen y así aumentar el transporte de secreción llevado a cabo por estas.

### **13.8.3.4 Estudio de degradación en lumen intestinal**

Es conveniente comprobar tras realizar un experimento con cultivos celulares que no ha habido degradación del fármaco por el intestino. Una manera efectiva de llevar a cabo este estudio es mediante un sencillo balance de masas. Para esto hay que sumar las cantidades de fármaco de todos los compartimentos por los que ha pasado el fármaco y si esta cantidad es igual a la inicial, el fármaco no ha sido degradado por el lumen intestinal.

#### **13.8.4 Correlaciones *in vitro-in vivo***

Las monocapas celulares Caco-2 son un modelo *in vitro* ampliamente reconocido para la predicción de la permeabilidad cuando los compuestos se absorben mediante difusión pasiva. Los compuestos que se absorben completamente presentan unos coeficientes altos de permeabilidad ( $P_{app} > 1 \times 10^{-6} \text{cm/s}$ ) y los compuestos que presentan una absorción incompleta tienen coeficientes de permeabilidad más bajos ( $P_{app} > 1 \times 10^{-7} \text{cm/s}$ ) en monocapas Caco-2<sup>1</sup>.

Las Caco-2 pueden ser utilizadas para predecir el transporte de compuestos por diferentes vías a través del epitelio intestinal tras la comparación del transporte de fármacos en monocapas Caco-2 con el transporte intestinal *in vivo*<sup>35</sup>. La mejor correlación se obtiene con los compuestos que tienen un transporte pasivo transcelular. La ruta paracelular es menos permeable en las monocapas celulares que *in vivo*, pero los datos obtenidos hasta ahora indican que la selectividad de esta vía es comparable con la situación *in vivo*<sup>36</sup>.

### **13.9 Otras aplicaciones y usos**

Los cultivos de células animales tienen aplicación, como técnicas únicas o complementarias de otras, en un gran número de líneas de investigación. De hecho, han sido fundamentales para numerosos avances científicos alcanzados en distintas ramas de las ciencias biomédicas entre las que destacan la virología, la genética, la investigación contra el cáncer, la inmunología, la biotecnología, las aplicaciones médicas y de diagnóstico así como otro tipo de aplicaciones industriales.

Así por ejemplo, las técnicas de cultivo celular permiten el estudio de las propias células, su actividad intracelular (metabolismo, el control del ciclo celular, síntesis de proteínas, muerte celular...), su interacción con el medio (estudios de infección, citotoxicidad, mutagénesis, carcinogénesis) y entre ellas ( adhesión, morfogénesis, modelos organotípicos, interacciones entre distintas células en cocultivo) además

de la modulación de la expresión génica, farmacología, toxicología, la clonación y el estudio de numerosos aspectos relacionados con el cáncer y su diagnóstico. A continuación detallaremos algunos de los usos más comunes de los cultivos celulares.

### **13.9.1 Ensayos de proliferación/citotoxicidad**

La toxicología celular puede considerarse como el conjunto de investigaciones cualitativas y cuantitativas, sobre los efectos nocivos o respuestas biológicas no deseadas, que experimenta un cultivo celular expuesto a un determinado compuesto químico, a fin de poder extrapolar los resultados a nivel del organismo. Los ensayos de toxicidad en cultivos se basan en la capacidad que tienen las células vivas y metabólicamente activas en reducir sales de tetrazolio (amarillo) a formazán que es un compuesto insoluble que precipita en forma de cristales de color azul oscuro. Esta reacción es catalizada por la succinato deshidrogenasa mitocondrial activa en las células vivas y, por tanto, la cantidad de producto formado que será proporcional al número de células viables del cultivo puede ser fácilmente cuantificada espectrofotométricamente.

Este tipo de pruebas pueden ser utilizadas como alternativa al uso de animales de experimentación. Aunque las pruebas *in vivo* no podrán ser sustituidas por completo se minimiza en la medida de lo posible la utilización de animales en los bioensayos.

En diversas ocasiones ha sido posible demostrar el riesgo de un determinado producto químico para el hombre, pero sólo de una manera asociativa causa-efecto, sin poder entender sus motivos con el empleo de pruebas con animales. La utilización de pruebas *in vitro* permiten una comprensión más profunda de las causas.

### **13.9.2 Biología del desarrollo**

Otra área de gran interés se centra en la biología del desarrollo, mediante la búsqueda de modelos experimentales que permitan explicar cómo el gran número de células presentes en organismo maduro derivan de una sola célula a partir de la fertilización. Por ello las líneas celulares que conservan la capacidad de diferenciarse *in vitro* son objeto de un intenso estudio.

### **13.9.3 Animales transgénicos**

Cierto tipo de investigaciones no pueden realizarse sin el cultivo de células, por ejemplo, el trabajo con animales transgénicos, que conduce a que organismos maduros expresen genes nuevos, se basa totalmente en las técnicas de cultivo celular para la inserción de genes extraños en las células receptoras.

### **13.9.4 Infecciones virales**

Una de las áreas en las cuales se han observado grandes avances con la utilización de cultivos de células es el diagnóstico de infecciones virales. Dicho diagnóstico es posible al buscar señales de cambios degenerativos conocidos colectivamente como efecto citopático en cultivos en monocapa de diferentes líneas celulares. El observador puede emitir un diagnóstico preliminar basándose en la línea celular implicada, en el tiempo de incubación y en la magnitud del efecto citopático, aunque son necesarias pruebas adicionales para la identificación definitiva del virus.

### **13.9.5 Diagnóstico temprano**

En cuanto a las enfermedades inflamatorias asociadas con la respuesta inmune, un número considerable de pacientes presentan síntomas inflamatorios no característicos, y constituyen un reto diagnóstico y terapéutico. Estos casos no característicos, por lo tanto puede representar una etapa temprana, o mostrar una presentación atípica, de un trastorno del tejido conectivo mixto o una infección. La determinación del fenotipo inmune de los linfocitos en sangre por citometría de flujo es un procedimiento rutinario de diagnóstico para la evaluación de las enfermedades linfoproliferativas e inmunodeficiencia VIH del paciente. Es por esto que el método empleado por citometría de flujo es adecuado para laboratorios de diagnóstico clínico, y que promete ser una valiosa fuente de información clínica para pacientes con síntomas inflamatorios inusuales.

## **13.10 Conservación**

Las células no pueden mantenerse en cultivo indefinidamente por múltiples razones. Las razones de índole práctica incluyen el tiempo que se requiere en el

cuidado y mantenimiento de los cultivos, los problemas de espacio que se generan en los incubadores si se pretenden mantener muchas líneas celulares simultáneamente y el mayor riesgo de contaminación además del considerable gasto económico que supone. Además, muchas células no permiten el cultivo prolongado y las que lo permiten son susceptibles de sufrir cambios irreversibles en su biología. Además, los cultivos prolongados incrementan el riesgo de contaminación microbiológica o de otro tipo.

Por esta razón, la forma de mantener las células asegurando que se mantengan en su estado inicial es criopreservarlas, es decir, proceder a su ultracongelación en condiciones que permitan su posterior recuperación. En general, se consigue mediante una congelación lenta y una descongelación rápida, con un tratamiento previo pues el proceso de conservación entraña ciertos inconvenientes.

### **13.10.1 Congelación**

Para realizar la congelación, el cultivo debe estar en fase exponencial de crecimiento y libre de contaminantes.

La congelación de las células en suspensión se puede realizar directamente, pero las células que crecen en monocapa deben ser previamente “levantadas” con tripsina/EDTA. A continuación, hay que bloquear la acción de la tripsina con suero y lavar las células. Una vez lavadas y contadas, la viabilidad de las células a congelar debe ser superior al 90%. Acto seguido, las células se centrifugan y resuspenden en un crioprotector adecuado, generalmente suero de ternero y dimetilsulfóxido DMSO (1/10). El DMSO es un crioprotector que incrementa la permeabilidad de las membranas, disminuyendo su fragilidad. El inconveniente de su uso es que resulta tóxico para las células por lo que su manipulación debe ser lo más rápida posible <sup>37</sup>. Cada criotubo, convenientemente etiquetado, no debe contener una concentración superior a  $2-4 \times 10^6$  células/mL, ni se debe llenar del todo. Los criotubos se depositan en contenedores tipo Nalgene Cryo® Mr. Frosty en un baño de isopropanol de bajo punto de congelación. Tras un día en el congelador convencional, se pasa dos días más a otro de  $-80^{\circ}\text{C}$  y por último se almacena en nitrógeno líquido gaseoso.

### **13.10.2 Descongelación**

La descongelación deber ser rápida; el criotubo se calienta en un baño a 37 °C hasta su descongelación. A continuación, las células se han de pipetear despacio sobre el medio de cultivo atemperado. Es necesario eliminar los restos de DMSO, porque puede resultar tóxico para ciertas células.

### **13.10.3 Organización y mantenimiento de un banco de células congeladas**

Las células de cultivo se deben almacenar cuando lleven pocos pases de cultivo, lo que asegura que mantengan su estado inicial.

En caso de necesitar cantidades importantes de una línea o trabajar con ella de forma continua durante un tiempo, es recomendable generar un pequeño *stock* de alícuotas de trabajo a partir de una alícuota del *stock* original, congelando nuevas alícuotas en los primeros pases de cultivo, que se irán descongelando y reponiendo a lo largo del trabajo por el mismo procedimiento antes indicado, de forma que se asegure que las células utilizadas son lo más parecidas posible a las originales.

## **13.11 Bancos de almacenaje de líneas celulares**

El objetivo de un banco celular es asegurar a la comunidad médica y científica la calidad de las líneas celulares procedentes de células que van a ser utilizadas en investigación y terapia. Para ello contará con un amplio repertorio de líneas celulares de todo tipo y proveerá a equipos médicos y científicos con líneas celulares perfectamente caracterizadas, bajo los estándares apropiados de calidad y seguridad, tanto para la investigación clínica como para las aplicaciones clínicas.

Como ya se ha indicado, la obtención de líneas celulares de distinto origen constituye una fuente importante de células con fines de investigación. Aparte de su directa generación, las líneas celulares se pueden obtener de colecciones; entre las más completas se encuentran: *American Type Culture Collection* (ATCC), *National Cell Culture Center* del NIH o *European Collection of Cell Cultures* (ECACC). También se pueden obtener mediante la cesión de otro laboratorio, siendo ésta una práctica habitual entre investigadores.

---

<sup>1</sup> Castaño, ME. Cultivos celulares, in Principios de virología, 2012, pp. (29-46), Biogénesis.

---

<sup>2</sup> Audus, K.L. et al. The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharmaceutical Research*, Vol. 7, No. 5, 1990, pp. (435-451).

<sup>3</sup> Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 2002, Garland Science, Isbn 0815332181, New York.

<sup>4</sup> Universidad de Barcelona, España. Introducción al cultivo celular. Disponible en: <http://www.ub.edu/biocel/wbc/tecnicas/cap1.htm>. [Consultado: 13-07-2014].

<sup>5</sup> Resino, S. La instrumentación del laboratorio de cultivo celular. *Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas*. Disponible en: <http://epidemiologiamolecular.com/laboratorio-cultivo-celular/>. [Consultado: 18-07-2014].

<sup>6</sup> Sigma Aldrich. Técnicas fundamentales en el cultivo celular. Un manual de laboratorio. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com>. [Consultado: 18-07-2014]

<sup>7</sup> Rivera-Tapia, J.A. y cols. Contaminación por micoplasmas en cultivos celulares. *An. Med*, Vol. 51, No. 3, 2006, pp. (109-112).

<sup>8</sup> Diario Oficial de las Comunidades Europeas. (D.O.C.E.), DIRECTIVA 88/320/CEE de 9-6-1988 Relativa a la inspección y verificación de las buenas prácticas de laboratorio. 16-06-1988.

<sup>9</sup> Diario Oficial de las Comunidades Europeas. (D.O.C.E.), DIRECTIVA 90/18/CEE de 18-12-1989 Se adapta al progreso técnico el Anexo de la Directiva del Consejo 88/320/CEE sobre la inspección y verificación de las buenas prácticas de laboratorio (BPL). 13-01-1990.

<sup>10</sup> Diario Oficial de las Comunidades Europeas. (D.O.C.E.), DIRECTIVA 90/679/CEE de 26-11-1990 Sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo. 31-12-1990.

<sup>11</sup> REAL DECRETO 822/1993 DE 28-5. Donde se establecen los principios de buenas prácticas de laboratorio. B.O.E. No. 128 de 29-5-1993.

<sup>12</sup> REAL DECRETO 2043/1994 DE 14-10. Sobre inspección y verificación de buenas prácticas de laboratorio. B.O.E. No. 281 de 24-11-1994.

<sup>13</sup> Organización Mundial de la Salud. *Manual de Bioseguridad en el Laboratorio*. O.M.S. Ginebra, 2005.

<sup>14</sup> Sabeter, J. & Vilumana, A.. *Buenas Prácticas de Laboratorio*, 1988, Madrid, Diaz de Santos.

<sup>15</sup> Artursson, P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A mode for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *Journal Pharmaceutical Science*, Vol. 79, No. 6, 1990, pp. (476-482).



- 
- <sup>16</sup> Delie, F. & Rubas, W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, Vol. 14, 1997, pp. (221-286).
- <sup>17</sup> Artursson, P. Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, Vol. 8, 1991, pp. (305-330).
- <sup>18</sup> Hillgren, K., Kato, A. & Borchardt, R.T. *In vitro* systems for studying intestinal drug absorption. *Med Res Rev*, Vol. 15, 1995, pp. (83-109).
- <sup>19</sup> Hidalgo, I.J., Raub, T.J. & Borchardt, R.T. Characterization of the lumen colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, Vol. 96, No. 3, 1989, pp. (736-749).
- <sup>20</sup> Matsumoto, H., Erickson, R.H., Gum, J.R., Yoshioka, M., Gum, E. & Kim, Y.S. Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2. *Gastroenterology*, Vol. 98, 1990, pp. (1190-1207).
- <sup>21</sup> Vachon, P.H. & Karlsson, J. Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology*, Vol. 103, No. 2, 1992, pp. (414-423).
- <sup>22</sup> Artursson, P. & Karlsson, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 175, No. 3, 1991, pp. (880-885).
- <sup>23</sup> Volpe, D.A. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays. *J Pharm Sci*, Vol. 97, No. 2, 2008, pp. (712-725).
- <sup>24</sup> Lu, S., Gough, A.W., Bobrowski, W.F. & Stewart, B.H. Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. *J Pharm Sci*, Vol. 85, 1996, pp. (270-273).
- <sup>25</sup> Briske-Anderson, M.J., Finley, J.W. & Newman, S.M. The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. *Proc Soc Expt Biol Med*, Vol. 214, 1997, pp. (248-257).
- <sup>26</sup> Yu, H., Cook, T.J. & Sinko, P.J. Evidence of diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharm Res*, Vol. 14, No. 6, 1997, pp. (757-762).
- <sup>27</sup> Neuhoff, S., Artursson, P., Zamora, I. & Ungell, A.L. Impact of Extracellular Protein Binding on Passive and Active Drug Transport Across Caco-2 Cells. *Pharm Res*, Vol. 23, 2006, pp. (350-359).
- <sup>28</sup> Bestwick, C.S. & Milne, L. Alteration of culture regime modifies antioxidant defenses independent of intracellular reactive oxygen levels and resistance to severe oxidative stress within confluent Caco-2 "intestinal cells". *Dig Dis Sci*, Vol. 46, 2001, pp. (417-423).

---

<sup>29</sup> Nagara, N., Tavelin, S., Artursson, P. Contribution of the Paracellular Route to the pH-Dependent Epithelial Permeability to Cationic Drugs. *J Pharm Sci*, Vol. 93, 2004, pp. (2972-2984).

<sup>30</sup> Varma, M.V.S. & Panchagnula. pH-Dependent Functional Activity of P-Glycoprotein in Limiting Intestinal Absorption of Protic Drugs: Kinetic Analysis of Quinidine Efflux *in situ*. *J Pharm Sci*, Vol. 94, 2005, pp. (2632-2643).

<sup>31</sup> Johnson, N., Lee, K.J., Castelo, J., Click, K., Christopher, R., Gordon, P., Hollenbeck, T., Moylan, D., Ereso, V., Holme, K., Grass, G., Sinko, P.J. & Lee, Y.H. Impact of experimental conditions on *in vitro* permeability: (2) effect of pH, buffer and CO<sub>2</sub> incubation in Caco-2 cell. *AAPS Pharm Sci*, Vol. 3, 2001.

<sup>32</sup> Neuhoff, S., Ungell, A.L., Zamora, I. & Artursson, P. pH-Dependent bidirectional transport of weakly basic drugs across Caco-2 monolayers: implications for drug-drug interactions. *Pharm Res*, Vol. 20, No. 8, 2003, pp. (1141-1148).

<sup>33</sup> Neuhoff, S., Ungell, A.L., Zamora, I. & Artursson, P. pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 monolayers. *Eur J Pharm*, Vol. 25, 2005, pp. (211-220).

<sup>34</sup> Mayerson, M. Principles of drug absorption, in *Modern Pharmaceutics*, G. Banker & C. Rothers, 1995 pp. (21-74), Marcel Dekker, New York.

<sup>35</sup> González, I., Fernández, C., Casabó, V.G., Garrigues, T.M., Polli, J.E., Ruiz, A. & Bermejo, M. *In situ* Kinetic Modelling of Intestinal Efflux in Rats: Functional Characterization of Segmental Differences and Correlation with *in vitro* Results. *Biopharm Drug Dispos*, Vol. 28, 2007, pp. (229-239).

<sup>36</sup> Navarro, C., González, I., Casabó, V.G., Merino, V. & Bermejo, M. Correlación entre modelos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* en estudios de absorción. *Med Uis*, Vol. 21, 2008, pp. (17-31).

<sup>37</sup> Kruse, P. & Patterson, M. *Tissue culture methods and applications*, 1973, Academia Press, New York.

# 14. Sección permeabilidad: Métodos *in vitro* de estimación de la permeabilidad intestinal: membranas PAMPA

Gladys Granero  
*Universidad Nacional de Córdoba*  
*Argentina*

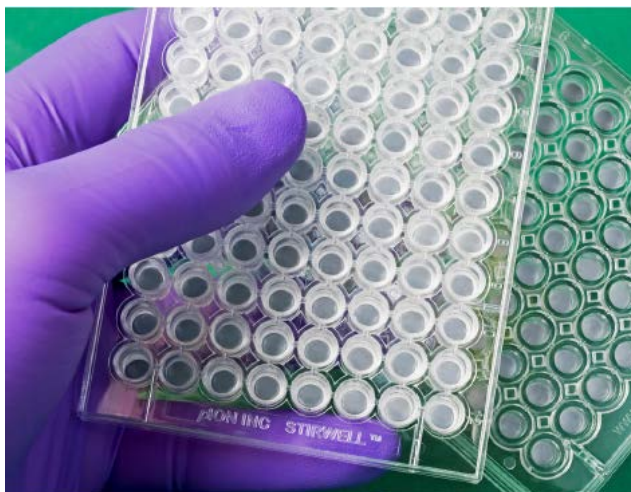
## 14.1. Introducción

El principal objetivo de los ensayos de permeabilidad con membranas artificiales (“parallel artificial membrane permeation assay”, PAMPA) es la clasificación de permeabilidad de los fármacos según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB), que se absorben en forma pasiva, y fundamentalmente, aquellos que lo hacen por un transporte transcelular.

PAMPA, es un modelo de permeabilidad no celular que proporciona un estimado de la permeabilidad transcelular pasiva de un fármaco, ya que carece de sistemas proteicos transportadores de fármacos y poros.

El método PAMPA fue propuesto inicialmente por Kansy y colaboradores, en 1998. El sistema PAMPA se basa en la utilización de microplacas de titulación de 96 posillos, completamente llenos con una solución buffer (pH 7,4/6,5), las cuales se cubren con una placa con microfiltros porosos hidrofóbicos impregnados con una solución al 10% p/v de lecitina de huevo en n-dodecano, que imita al epitelio intestinal.

En este método se forma una especie de “sándwich” con las microplacas de 96 posillos y el plato de filtro, de manera que cada posillo se divide en dos cámaras, la cámara donora abajo y la aceptora arriba, separadas por un filtro poroso impregnado con la solución lipídica en un disolvente orgánico, de acuerdo al esquema que se muestra en la siguiente figura:



*Figura 1. Microplacas de 96 posillos.*

## 14.2. Diferentes sistemas PAMPA<sub>3</sub>

En la actualidad, se han desarrollado diferentes variantes del ensayo PAMPA propuesto por Kansy y colaboradores<sub>2</sub>, los cuales utilizan diferentes componentes para formar la membrana lipídica artificial sobre el soporte poroso.

El siguiente cuadro resumen las diferentes composiciones lipídicas más comúnmente utilizadas para impregnar el filtro poroso de las microplacas de titulación y que han dado lugar a las diferentes versiones PAMPA:

*Tabla 1. Modelos PAMPA comúnmente utilizados*

DENOMINACION SISTEMA PAMPA	MEZCLA LIPIDICA (p/v % disuelto en el solvente)	SOLVENTE
Egg-PAMPA	Lecitina de huevo	n-dedecano
HDM-PAMPA	n-hexadecane	hexano
DOPC-PAMPA	2% dioleoilfosfatidilcolina	n-dodecano
Double-Sink <sup>TM</sup> o DS PAMPA	20% mezcla de fosfolípidos (con exceso de lípidos negativos)	n-dodecano

BM-PAMPA	0,8% fofatidilcolina, 0,8% fosfatidiletanolamina, 0,2% fosfatidilserina, 0,2% fosfatidilinositos, 1% colesterol	1,7- octadieno
----------	---	-------------------

## 14.2.1 Sistemas PAMPA comerciales

Se puede encontrar comercialmente diferentes modelos PAMPA automatizados como los siguientes:

### 14.2.1.1 BD Gentest™ Pre-coated PAMPA Plate System

El estudio de permeabilidad se realiza utilizando un aparato comercial integrado a un lector de placas y un brazo de robot.

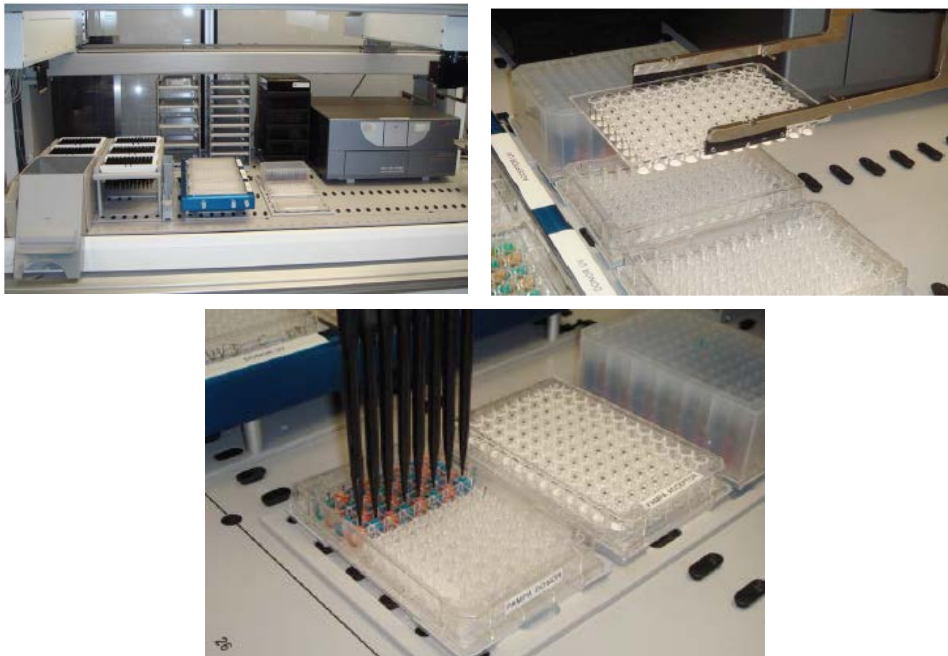


Figura 2. BD Gentest™ Pre-coated PAMPA Plate System

Las placas con microfiltros de 96 posillos están pre-cubiertos con lípidos, listos para usar, de acuerdo a la siguiente representación esquemática:

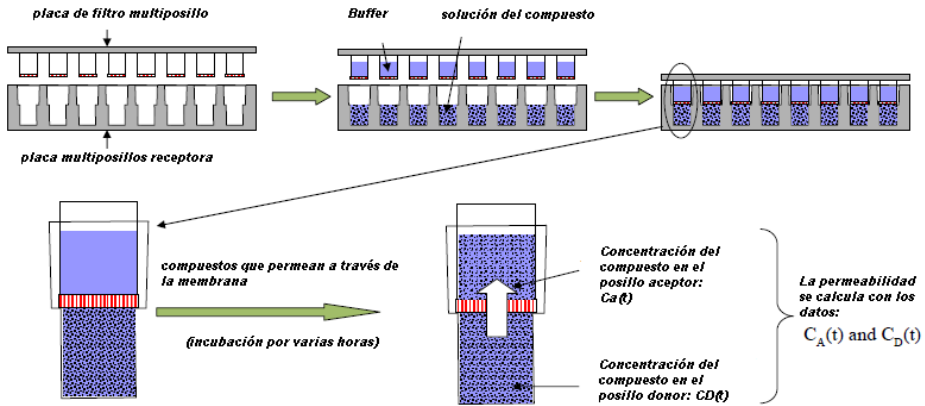


Figura3. Representación esquemática del sistema PAMPA

De acuerdo a los fabricantes de este sistema PAMPA, el filtro de la placa está impregnado con una solución lipídica que forma capas delgadas de lípidos dentro de los poros del filtro (Figura 3). Este efecto se lograría utilizando solventes volátiles que se evaporan luego del recubrimiento del filtro. De esta manera, se obtendrían caminos de permeación más cortos, lo cual representa mejor a las membranas biológicas.

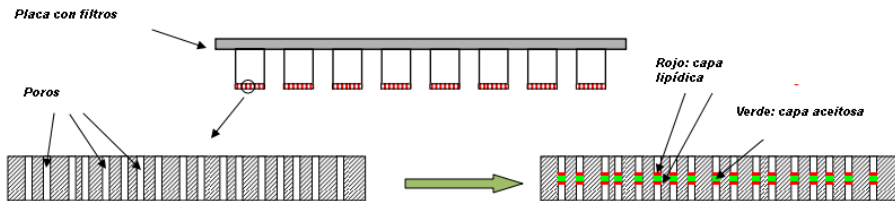


Figura 4. Representación esquemática de la membrana artificial

#### 14.2.1.2 Pion Instruments.

pION Inc. ha introducido un ensayo PAMPA llamado “Double-Sink PAMPA.

El ensayo PAMPA para medir permeabilidad se basa en la difusión del fármaco de interés a través de la membrana artificial obtenida con una mezcla optimizada de fosfolípidos, la cual divide dos placas de microtitulación de 96 posillos formando un “sándwich”, en un compartimiento donador y receptor para determinar la permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) del fármaco.



Figura 5. Set complete PAMPA Explorer™

En la solución buffer del compartimiento receptor, se agrega una sustancia química que solubiliza el fármaco para simular la condición de sumidero.

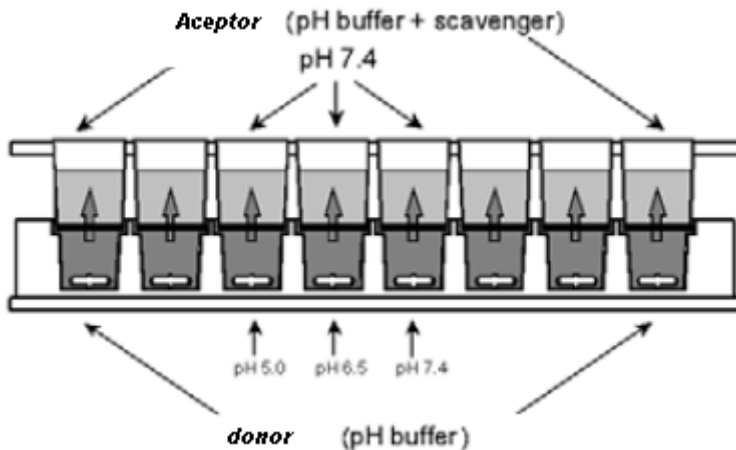


Figura 6. Representación esquemática del sistema PAMPA

Este ensamble se coloca sobre un aparato llamado “pION Gut-Box™” (pION Inc, MA), un aparato de agitación mecánica, para agitar los discos agitadores que se colocan en los compartimientos donores de la microplaca de titulación. Estos discos magnéticos giran en respuesta a una rotación precisa de un campo magnético alto dentro del “Gut-Box”. El panel de control del “Gut-Box” está calibrado para producir un determinado espesor de capa de agua estática (UWL) sobre la membrana artificial.



*Figura 7. Aparato de agitación Gut-Box™*

## **14.3. Factores críticos de los sistemas PAMPA**

### **14.3.1 Composición lipídica de la membrana.**

La membrana celular del entericito está compuesta principalmente por lípidos. La mitad de los lípidos son fosfolípidos, principalmente fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS).

Los fosfolípidos tienen una cabeza fosfato polar y también una cadena alquílica lipofílica (por ejemplo, ácidos grasos).



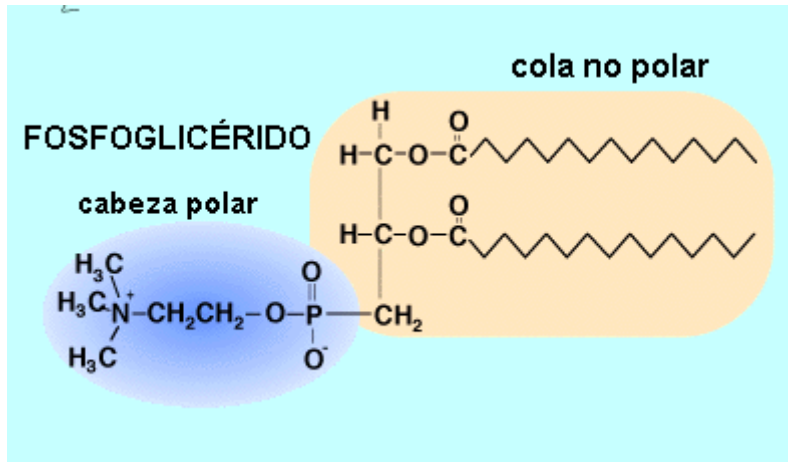


Figura 8. Estructura de un fosfolípido

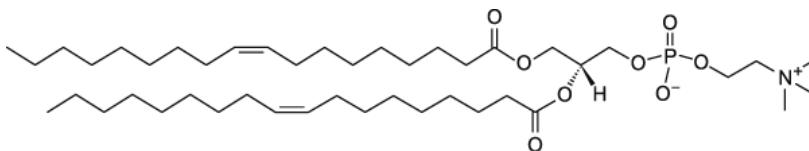
Los ácidos grasos varían en la longitud de la cadena alquílica y el grado de insaturación. Las cadenas alquílicas de fosfolípidos más comunes de la membrana plasmática del enterocito son las cadenas alquílicas: 16:0, 18:0, 18:1 y 18:2.

El tipo de lípidos que forman la membrana artificial en los sistemas PAMPA regula la fluidez/rigidez la misma y su capacidad de formar pares iónicos con los fármacos.

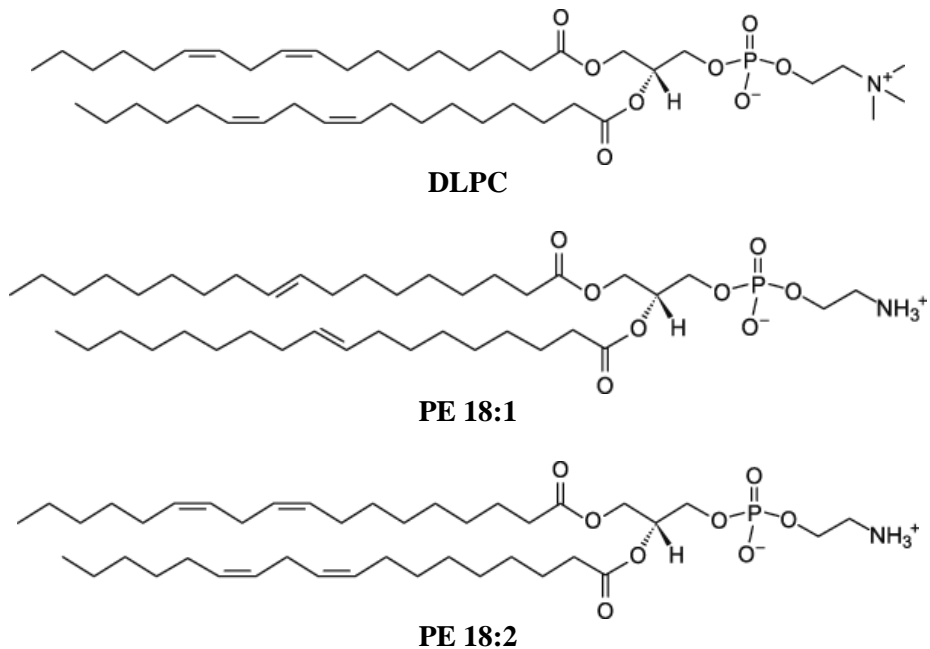
Por ejemplo, Seo y colaboradores estudiaron la influencia de la composición fosfolípida en el transporte por difusión pasiva de fármacos modelos usando un sistema PAMPA.

Se usaron los siguientes fosfolípidos en una concentración del 5% p/v en n-dodecano.:

- 1,2 dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (PC 18:1) [DOPC]
- 1,2-dilinoil-snglicero-3-fosfocolina (PC 18:2) [DLPC]
- 1,2-dioleoil-snglicero-3-fosfoetanolamina (PE 18:1)
- 1,2-dilinoil-snglicero-3-fosfoetanolamina (PE 18:2)



**DOPC**



*Figura 9. Estructuras de diferentes fosfolípidos*

Las fosfatidilcolinas y fosfatidiletanolaminas son fosfolípidos neutros ya que tienen una carga neta de cero. Las fosfatidilserinas están cargadas en forma negativa y los fosfatidilinositol poseen carga neta positiva.

Aunque la estructura de la membrana artificial que se forma sobre el filtro es desconocida, los resultados encontrados por Seo y colaboradores sugieren que la composición lipídica de la membrana modula la permeabilidad a través de la misma de aquellos fármacos con apreciable permeabilidad por medio de la influencia de la fluidez de la membrana y la formación de pares iónicos.

### **14.3.2 Capa de agua estática sobre la superficie de la membrana (UWL).**

La mayoría de los sistemas experimentales *in vitro* para determinar permeabilidad intestinal se caracterizan por tener una pobre hidrodinámica.

En los estudios de permeabilidad, la resistencia total del fármaco a la barrera de permeación (por ejemplo, células, lípidos, etc.) comprende no solo la resistencia de la barrera de permeación propiamente dicha, sino también, aquella de la capa de agua estática (UWL), que es una región de líquido adyacente a la superficie de la membrana que está pobremente agitada, y en donde la concentración del compuesto permeante está gobernada solo por difusión.

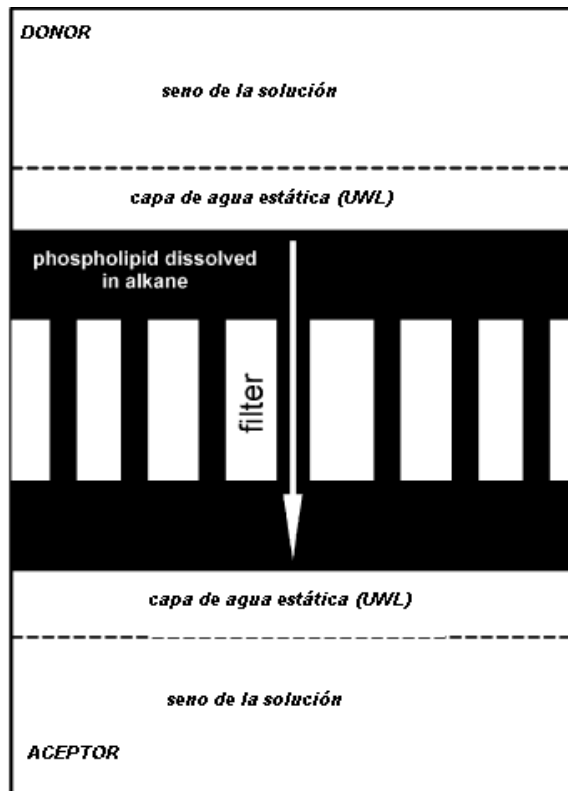


Figura 10. Representación esquemática de la estructura lamelar de una celda de permeación

En una celda de permeación, ambos lados de la membrana están en contacto con una estática capa de agua (UWL). El espesor de UWL depende de la velocidad de agitación en el seno de la solución, haciéndose más delgada cuando aumenta la agitación de la misma.

La capa de agua estática (UWL) contribuye a la resistencia al movimiento de las especies permeantes.

El transporte pasivo a través de una membrana es una combinación de la difusión a través de la misma y la difusión a través de la capa de agua estática (UWL) a cada lado de la membrana.

Cuando el soluto se introduce en el seno de la fase acuosa, la agitación produce una mezcla convectiva de la misma, posicionando el fármaco próximo a la UWL. En este punto, el pasaje a través de la UWL está gobernado por la ley de difusión.

En modelos hidrodinámicos simples, el espesor de la UWL se puede disminuir con la agitación, pero no eliminar. En consecuencia, el valor de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) del fármaco obtenido a partir de los experimentos con los sistemas PAMPA, representa la suma de la contribución de la permeabilidad intrínseca del fármaco a través de la membrana ( $P_m$ ) y la debida a la resistencia que ofrece la UWL ( $P_{UWL}$ ) al paso del fármaco, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P_{app} = P_m + P_{UWL} \quad (1)$$

En el seno de la solución, la concentración del soluto está uniformemente distribuida, como resultado de una mezcla convectiva del mismo. Sin embargo, en la UWL, la concentración de las moléculas no es uniforme, ya que ellas se mueven desde una región de alta concentración a una de menor por difusión pasiva.

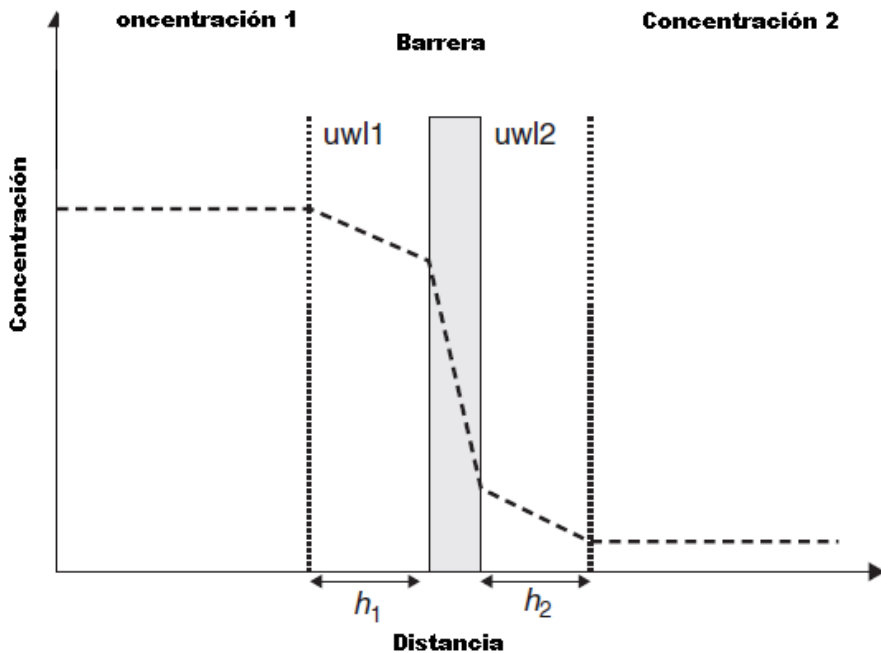


Figura 11. Gradiente de concentración del fármaco a ambos lados de la membrana artificial en una celda de difusión

Para moléculas hidrofílicas, las cuales permean poco las membranas lipídicas, esta membrana constituye la barrera limitante en la velocidad del proceso de transporte del fármaco.

Por otro lado, para moléculas lipofílicas, es la UWL la que constituye la barrera limitante de la velocidad del fármaco durante su absorción, y como consecuencia, dos fármacos con diferentes permeabilidades de membrana intrínseca ( $P_m$ ) podrían tener la misma permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ).

*In vivo*, debido a que se produce una mezcla eficiente cerca de la superficie del epitelio gastrointestinal (GI), la UWL es relativamente pequeña (30-100  $\mu\text{m}$ ) y por lo tanto tiene poca contribución a la permeabilidad del fármaco. Sin embargo, *in vitro*, la UWL puede ser marcadamente gruesa, por ejemplo, 1000  $\mu\text{m}$  en células Caco-2.

En los sistemas PAMPA sin agitación de los compartimientos de la celda de difusión, el valor de UWL se encuentra en el rango de 1900 y 3800  $\mu\text{m}$ .

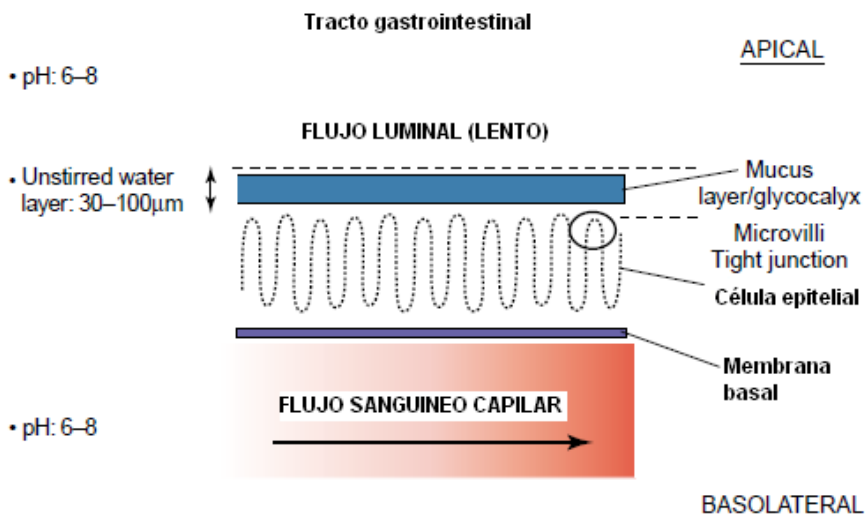


Figura 12. Representación esquemática de la barrera epitelial in vivo que deben atravesar los fármacos para alcanzar la superficie basolateral del enterocito

Para reflejar el comportamiento del fármaco en el epitelio intestinal *in vivo*, en el modelo *in vitro* PAMPA es necesario minimizar el espesor de la UWL a ambos lados de la membrana lipofílica.

Se ha propuesto que una manera de disminuir el espesor de la UWL en los sistemas PAMPA es a través del agregado de un agitador magnético en los compartimientos donador y/o aceptor o realizar el estudio utilizando un agitador orbital.

Avdeef y colaboradores<sup>8</sup> encontraron que agregando un disco agitador en el compartimiento donador de las microplacas de 96 posillos se observa un aumento en la permeabilidad de fármacos modelos a través de UWL con el aumento en la velocidad de agitación.

En este estudio se utilizó un instrumento pION INC. (Woburn, MA, USA). La membrana artificial se obtuvo con una solución al 20% p/v de una mezcla de lecitina en dodecano.

### 14. 3.3 pH,

Muchos fármacos poco solubles en agua son ácidos o básicos débiles, y por lo tanto, tienen componentes estructurales que pueden estar protonados o desprotonados, respectivamente.

En el tracto gastrointestinal (TGI), el pH local varía desde el intestino delgado superior hasta el colon distal, lo cual afecta significativamente los parámetros de absorción del fármaco dependiendo de si la molécula es predominantemente ácida o básica.

Por ejemplo, en un entorno predominantemente ácido, un ácido débil permanecerá no ionizado y por lo tanto será absorbido por una ruta transcelular.

Sin embargo, los estudios de permeabilidad convencionales se suelen hacer a un pH fijo (por ejemplo, 7,4) y por lo tanto fallan para imitar el pH dinámico del TGI. En estas condiciones experimentales, el pH del buffer puede influir significativamente en la capacidad de solubilidad de estos compuestos, y por lo tanto, en los valores de permeabilidad aparente que se obtienen.

De acuerdo a la hipótesis pH-partición, solo los fármacos neutros pueden atravesar en forma pasiva las membranas celulares. En consecuencia, la especie neutra de un fármaco dissociable es la forma del mismo favorecida para su absorción.

Para fármacos ionizables, la permeabilidad de membrana ( $P_m$ ) del mismo depende del pH en el seno de la solución. El valor máximo de  $P_m$  posible se obtiene en el valor de pH donde el fármaco se encuentra en su forma no cargada. Este valor de  $P_m$  límite se denomina  $P_o$  (permeabilidad intrínseca), es decir, la permeabilidad de las especies neutras del fármaco.

La relación entre  $P_m$  y  $P_o$  se puede escribir en términos de la fracción de las especies no cargadas del fármaco, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P_m = f_u P_o \quad (2)$$

Por ejemplo, si se considera un fármaco monoprotónico que es un ácido débil ( $\log K_1 = pK_a$ ), se obtiene la siguiente relación pH-permeabilidad:

$$\frac{1}{P_{app}} = \frac{1}{P_{UWL}} + \frac{(10^{-pK_a+pH} + 1)}{P_o} \quad (3)$$

Para un ácido diprotónico:

$$\frac{1}{P_{app}} = \frac{1}{P_{UWL}} + \frac{(10^{-pKa1-pKa2+2pH} + 10^{-pKa2+pH} + 1)}{P_o} \quad (4)$$

Para un ácido triprótico:

$$\frac{1}{P_{app}} = \frac{1}{P_{UWL}} + \frac{(10^{-pKa1-pKa2-pKa3+3pH} + 10^{-pKa2-pKa3+2pH} + 10^{-pKa3+pH} + 1)}{P_o} \quad (5)$$

Para un fármaco que es una base débil, la relación pH-permeabilidad es la siguiente:

$$\frac{1}{P_{app}} = \frac{1}{P_{UWL}} + \frac{(10^{pKa-pH} + 1)}{P_o} \quad (6)$$

Para un fármaco que es un anfolito:

$$\frac{1}{P_{app}} = \frac{1}{P_{UWL}} + \frac{(10^{pK2-pH} + 10^{-pK1+pH} + 1)}{P_o} \quad (7)$$

Estas ecuaciones consideran las siguientes asunciones:

La permeación de la membrana de las especies cargadas es despreciable.

La permeación de la membrana de las especies neutras es por difusión pasiva y constante en el rango de pH empleado.

La permeación a través de la UWL es por difusión pasiva y constante en el rango de pH empleado.

Los efectos de otros factores sobre la permeabilidad aparente del fármaco es despreciable.

Para simular más cercanamente el pH del TGI en los estudios PAMPA se puede realizar los estudios de permeación utilizando un gradiente de pH.

Alternativamente, se puede preferir hacer los ensayos de permeabilidad en un entorno que asegure que la permeabilidad del fármaco no se ve afectada por el estado de ionización. Por lo tanto, si la constante de ionización del fármaco se conoce, se puede determinar fácilmente el pH al cual las especies neutras del mismo están favorecidas. Sin embargo, el ajuste del pH de esta manera genera un



entorno experimental más artificial, y en consecuencia, disminuye la biorelevancia del estudio.

Sugano y colaboradores<sup>10</sup> estudiaron el efecto del pH (5,5, 6,5 y 7,4) sobre la permeación de 33 fármacos estructuralmente diversos en un ensayo *in vitro* utilizando un sistema BM PAMPA.

La dependencia con el pH estuvo de acuerdo con lo que predice la teoría pH-partición. La mejor predicción de la absorción oral (fracción de dosis absorbida) se obtuvo en condiciones de pH 5,5 ( $r = 0,866$ ,  $n = 25$ ) y/o pH = 6,5 ( $r = 0,865$ ,  $n = 28$ ) más que a pH = 7,4 ( $r = 0,767$ ,  $n = 24$ ).

La contribución de UWL al valor de permeabilidad del fármaco también varía considerablemente de unas condiciones experimentales a otras. En particular, el efecto que se observa debido a que UWL varía dependiendo del pH del seno de la solución en la que se encuentra el fármaco.

Ruell y colaboradores<sup>11</sup> obtuvieron los perfiles pH-permeabilidad de 12 fármacos ionizables (5 ácidos, 1 anfótero y 6 bases) en un rango de pH de 3-10 utilizando el instrumento PAMPA Evolution de Pion inc. (Woburn, MA, USA). En este sistema la membrana artificial se forma con una solución al 2% p/v de DOPC en dodecano.

Considerando un ácido débil, por ejemplo ibuprofeno, en la ausencia de UWL, la permeabilidad de la membrana ( $P_m$ ) del fármaco en función del pH debería tener la siguiente forma:

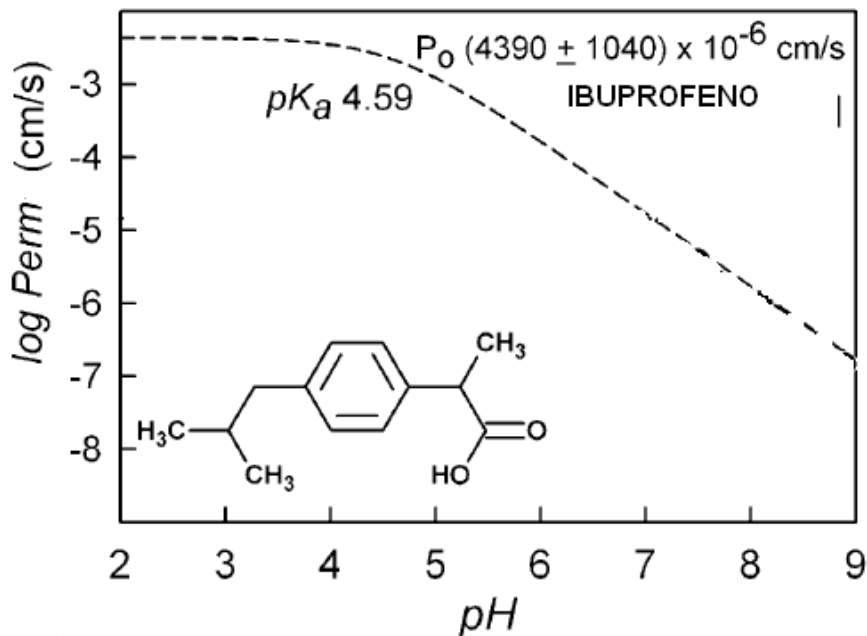


Figura 13. Perfil pH-permeabilidad del ibuprofeno

La  $P_m$  medida debería corresponder al valor de la permeabilidad intrínseca del fármaco ( $P_0$ ) para un  $\text{pH} \ll pK_a$ .

Para un  $\text{pH} \gg pK_a$ , la concentración de la especie neutra del fármaco disminuye por un orden de magnitud para cada aumento en la unidad de pH. En consecuencia, en soluciones alcalinas, la  $P_m$  observada para ácidos débiles disminuye por un orden de magnitud por cada aumento de unidad de pH.

En la presencia de UWL, la  $P_0$  disminuye en el rango de pH donde predominan las especies neutras del fármaco. La diferencia entre el valor de  $P_0$  en la presencia y en la ausencia de UWL es igual a la diferencia entre el  $pK_a$  verdadero del fármaco y el  $pK_a$  aparente medido, denominado por Avdeef y colaboradores  $pK_a$  de flujo ( $pK_a^{\text{flujo}}$ ),  $\log P_0 - \log P_u = [pK_a^{\text{flujo}} - pK_a]$ , por lo tanto, el espesor de la UWL es proporcional a  $pK_a^{\text{flujo}} - pK_a$ .

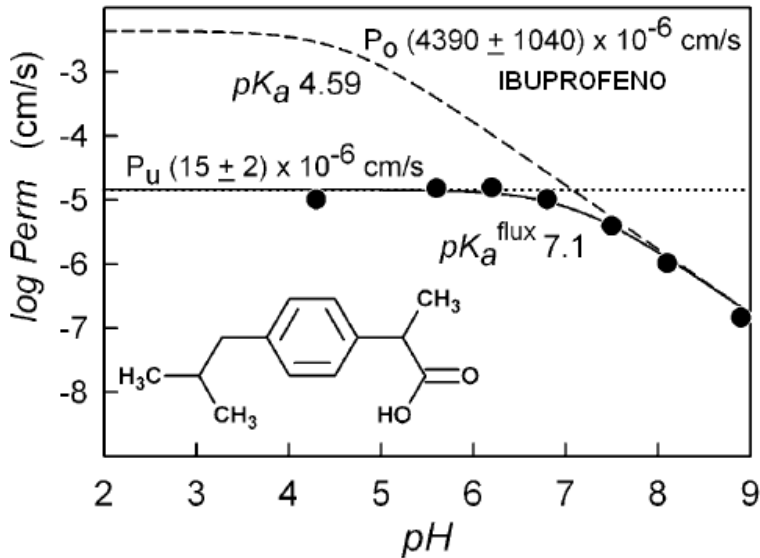


Figura 14. Perfil pH-permeabilidad del ibuprofeno en la presencia de UWL

Para ácidos, el  $\text{pK}_a$  aparente se desvía a valores mayores, y para bases, la desviación se produce en la dirección opuesta.

### 14.3.4 Condición de sumidero (“sink condition”)<sub>12</sub>

El fármaco luego de su absorción a través del epitelio intestinal, es rápidamente removido por la sangre del sistema portal. De esta manera, se mantiene un gradiente de concentración, el cual funciona como una fuerza para su transporte. Este arreglo se llama condición de sumidero “sink condition”.

Similarmente, en los modelos *in vitro* se debe establecer la condición de sumidero, la cual se debe sostener a lo largo del curso de un experimento. Esto implica que el fármaco, el cual ha permeado hacia el compartimiento aceptor, no debe regresar por difusión hacia el compartimiento donador. Prácticamente, se requiere que la concentración del fármaco en el compartimiento receptor no exceda el 10% de la concentración del mismo en el lado donador.

Es necesario establecer condiciones de sumidero en los experimentos *in vitro* para determinar permeabilidad, en orden de generar resultados experimentales confiables. Sin embargo, asegurar las condiciones de sumidero puede ser un

problema en el caso de fármacos poco solubles, ya que estos compuestos tienden a acumularse en el compartimiento aceptor, conduciendo a su saturación. Más aún, aquellos que son muy lipofílicos, serán más propensos a regresar por difusión al compartimiento donador.

En la ausencia de condiciones de sumidero, los valores de  $P_{app}$  obtenidos fallarán en representar los valores de permeabilidad obtenidos *in vivo*.

Para crear condiciones de sumidero, se suele agregar en el compartimiento receptor un compuesto solubilizante de los fármacos que son muy lipofílicos y por consiguiente poco solubles en agua.

En el modelo “Double Sink (DS) se agrega un surfactante en el buffer aceptor (pH 7,4) para crear las condiciones de sumidero

## 14.4. Análisis de los datos

El cálculo del valor de la permeabilidad aparente del fármaco ( $P_{app}$ ) se basa en la siguiente ecuación derivada de la primera ley de Fick:

$$P_{app} = dm / dt * (V_d / A * M_d) \quad (8)$$

donde  $d_m$  es la cantidad acumulada del fármaco en el compartimiento aceptor por el tiempo  $d_t$ ,  $A$  es el área del inserto utilizado,  $V_d$  es el volumen donador y  $M_d$  es la cantidad del fármaco en el lado donador.  $d_m/d_t$  es el cambio en cantidad del fármaco en el compartimiento receptor en el tiempo.

El cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente del fármaco ( $P_{app}$ ) con la ecuación 8 puede llevar a un resultado erróneo en el caso de fármacos que son poco solubles en agua, si se ignora la influencia de la retención del mismo en la membrana artificial, por lo cual, se ha propuesto un método de cálculo refinado que tiene en cuenta su ocurrencia.

La siguiente ecuación tiene en cuenta el balance de masa del fármaco y corrige por la retención del mismo dentro de la membrana artificial:

$$P_{app} = dm / dt * [V_d / A * (M_d - M_m)] \quad (9)$$

donde  $M_m$  es la cantidad del fármaco retenido por la membrana. La retención se puede calcular a partir de la cantidad al inicio y la cantidad del fármaco en los compartimientos donador y receptor al final del experimento [ $M_m = M_{do} - (M_{dt} + \sum M_r)$ ].

Otra fuente de error en el cálculo del coeficiente  $P_{app}$  puede provenir de la dificultad de mantener la condición de sumidero a lo largo del experimento. Huang y colaboradores han derivado una ecuación modificada para calcular el valor de  $P_{app}$  cuando no se cumple con la condición de sumidero:

$$P_{app} = V_r * (dC_r / dt) / [A / (C_d * C_r)] \quad (11)$$

donde  $V_r$  es el volumen en el lado receptor, y  $C_r$  y  $C_d$  son las concentraciones en los lados receptor y donador, respectivamente.

En esta ecuación se tiene en cuenta las concentraciones del fármaco en los compartimientos donador y receptor, además del volumen del compartimiento receptor.

Cuando el fármaco es muy poco soluble, la concentración del mismo en el lado donador no se conoce, y por consiguiente los coeficientes de  $P_{app}$  calculados serán erróneos. En este caso, se sugiere utilizar valores de flujo como una alternativa, ya que su cálculo es independiente de la concentración inicial del fármaco:

$$P_{app} = -2,303 \frac{V_d V_r}{V_d + V_r} \frac{1}{A * t} \log \left( 1 - \frac{\text{flujo}\%}{100} \right) \quad (12)$$

El software de PAMPA Evolution version 2.2 utiliza la siguiente ecuación para calcular la  $P_{app}$  del fármaco, que tiene en cuenta condiciones de iso-pH y la retención del fármaco en la membrana, en esta ecuación describe condiciones de no sumidero:

$$P_{app} = -\frac{2,303 V_d}{A(t - \tau_{lag})} \left( \frac{1}{1 + r_v} \right) \cdot \log_{10} \left[ -1 + \left( \frac{1 + r_v^{-1}}{1 - R} \right) \cdot \frac{C_a(t)}{C_d(0)} \right] \quad (13)$$

siendo,  $r_v = V_d/V_a$  la razón de volumen entre los compartimientos acuosos,  $V_d$  es el volumen del compartimiento donador,  $V_a$  es el volumen del compartimiento receptor,  $A$  = área del filtro,  $t$  = tiempo de permeación,  $\tau_{lag}$  = tiempo necesario para

saturar la membrana,  $R$  = fracción molar de la pérdida del soluto hacia la membrana,  $C_d$  y  $C_a$  = concentración en los compartimentos donador y aceptor, respectivamente.

El modelo PAMPA-DS asume que el transporte reverso del fármaco desde el compartimiento aceptor hacia el donador es cero. En consecuencia, la ecuación para el cálculo de la  $P_{app}$  se simplifica a la siguiente expresión:

$$P_{app} = -\frac{2,303V_d}{A(t - \tau_{lag})} \cdot \log_{10} \left[ \left( \frac{1}{1-R} \right) \cdot \frac{C_d(t)}{C(0)} \right] \quad (14)$$

Cuando se obtienen diferentes cantidad transferidas del fármaco al compartimiento receptor en diferentes intervalos pequeños de tiempo ( $d_t$ ), el coeficiente de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) se obtiene de la porción lineal del gráfico: cantidad de fármaco acumulado en el lado receptor versus el tiempo, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{A \cdot C_o} \quad (15)$$

donde  $dQ/dt$  es la velocidad aparente en el estado de equilibrio del fármaco en el lado receptor,  $C_o$  la concentración inicial del fármaco en el lado donador, y  $A$  el área de la superficie de la membrana.

---

<sup>1</sup> Buckley, S.T., Fischer, S.M., Fricker, G., Brandl, M. In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: challenges and perspectives. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012, 45, 235-250

<sup>2</sup> Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K. "Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes". *Journal of Medicinal Chemistry* 1998, 41(7), 1007-1010

<sup>3</sup> Avdeef A. The rise of PAMPA. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 2005, 1 (2), 1-18

<sup>4</sup> pION. "Double-Sink™ PAMPA assay for permeability studies". Application note. 1-3

<sup>5</sup> Seo, P.R., Teksin, Z.S., Kao, J.P.Y., Polli, J.E. „Lipid composition effect on permeability across PAMPA“. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006, 29, 259-268

- 
- <sup>6</sup> Sugano K. "Aqueous boundary layers related to oral absorption of a drug: from dissolution of a drug to carrier mediated transport and intestinal wall metabolism". *Molecular Pharmaceutics* 2010, 7 (5), 1362-1373
- <sup>7</sup> Velicky, M., Tam, K.Y., Dryfe, R.A.W. "In situ artificial permeation assay under hydrodynamic control: correlation between drug in vitro permeability and fraction absorbed in humans". *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2011, Vol. 44, 299-309
- <sup>8</sup> Avdeef, A., Nielsen, P.E., Tsinman, O. "PAMPA – a drug absorption in vitro model 11. Matching the in vivo unstirred water layer thickness by individual-well stirring in microtitre plates". *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2004, 22, 365-374
- <sup>9</sup> Wohnsland, F., Faller, B. "High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes". *Journal of Medicinal Chemistry* 2001, 44, 923-930
- <sup>10</sup> Sugano, K., Hamada, H., Machida, M., Ushio, H., Saitoh, K., Terada, K. "Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay". *International Journal of Pharmaceutics* 2001, 228, 181-188
- <sup>11</sup> Ruell, J.A., Tsinman, K.L., Avdeef, A. "PAMPA – a drug absorption in vitro model 5. Unstirred water layer in iso-pH mapping assays and  $pK_a^{\text{flux}}$  – optimized design (pOD-PAMPA)". *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2003, 20, 393-402
- <sup>12</sup> Buckley, S.T., Fischer, S.M., Fricker, G., Brandl, M. "In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: challenges and perspectives". *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012, 45(3), 235-250

# 15. Absorción transdérmica: Modelos *in vitro*

Teresa Antón<sup>a,b</sup>, Isabel Gonzalez-Alvarez<sup>a</sup>, Marta Gonzalez-Alvarez<sup>a</sup>, Marival Bermejo<sup>a</sup>,  
Virginia Merino Sanjuán<sup>b,c</sup>,

<sup>a</sup>*Departamento de Ingeniería. Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia.  
Universidad Miguel Hernandez.*

<sup>b</sup>*Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad  
de Valencia.*

<sup>c</sup>*Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico. Unidad Mixta Universidad  
Politécnica de Valencia-Universidad de Valencia  
España*

## 15.1 Introducción

La aplicación de medicamentos sobre la piel tiene como finalidad la obtención de efectos terapéuticos que pueden ser locales (en la superficie de la piel o en alguna de las capas que la componen) o sistémicos. En el primer caso se busca que el fármaco no se absorba sino que se quede en la superficie o acceda a la profundidad deseada para ejercer su acción terapéutica, mientras que en el segundo, al contrario que el anterior, se busca que los fármacos sean capaces de atravesar todas las capas de la piel y accedan a los capilares sanguíneos que irrigan la zona de aplicación para alcanzar niveles eficaces en circulación sanguínea.

La administración transdérmica es pues una alternativa terapéutica para fármacos para los que se presenta algún inconveniente, cuando son administrados por otras vías, como puede ser la oral o la parenteral. Entre las ventajas podemos destacar las siguientes:

- ✓ Evita el efecto de primer paso (hepático e intestinal) y la degradación en el tracto gastrointestinal por efecto del pH o del metabolismo intestinal
- ✓ Puede proporcionar niveles terapéuticos constantes
- ✓ Es cómoda para el paciente

Pero, como toda vía de administración, presenta una serie de inconvenientes:

- ✓ Está limitada a sustancias farmacológicamente potentes ya que las concentraciones plasmáticas que se consiguen no suelen ser muy altas
- ✓ No se pueden aplicar fármacos que provoquen irritación local,
- ✓ Existe la posibilidad de que se produzcan procesos metabólicos debido a la existencia de sistemas enzimáticos en la piel (metabolismo cutáneo)
- ✓ Está condicionada por las características físico-químicas del fármaco (especialmente tamaño molecular y lipofilia), así como de la piel y los excipientes.

## 15.2 Estructura de la piel y sus anexos

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano. Presenta una superficie total aproximada de 1,7 m<sup>2</sup> y su peso alcanza unos 4 kg, constituyendo cerca del 10% del peso.



Debido a su composición se encarga de mantener la homeostasis de los fluidos corporales evitando la excesiva evaporación de agua, regula la temperatura corporal y protege al individuo de agentes externos como microorganismos, luz ultravioleta, traumas mecánicos, etc, en definitiva, protege a nuestro organismo del exterior y actúa como barrera.

La superficie de la piel se encuentra recubierta por una emulsión epicutánea (manto hidrolipídico) la cual se forma a partir de las secreciones sebáceas y sudoríparas y engloba células descamadas y bacterias. Esta capa presenta un pH ácido, de alrededor de 5-5.2 aunque presenta variaciones en ciertas zonas del cuerpo. Este pH ligeramente ácido facilita a la función protectora de la piel ya que no es un pH adecuado para la proliferación de microorganismos.

La piel, propiamente dicha, se compone de tres capas diferenciadas, que se esquematizan en la figura 1:

- ✓ epidermis
- ✓ dermis
- ✓ hipodermis

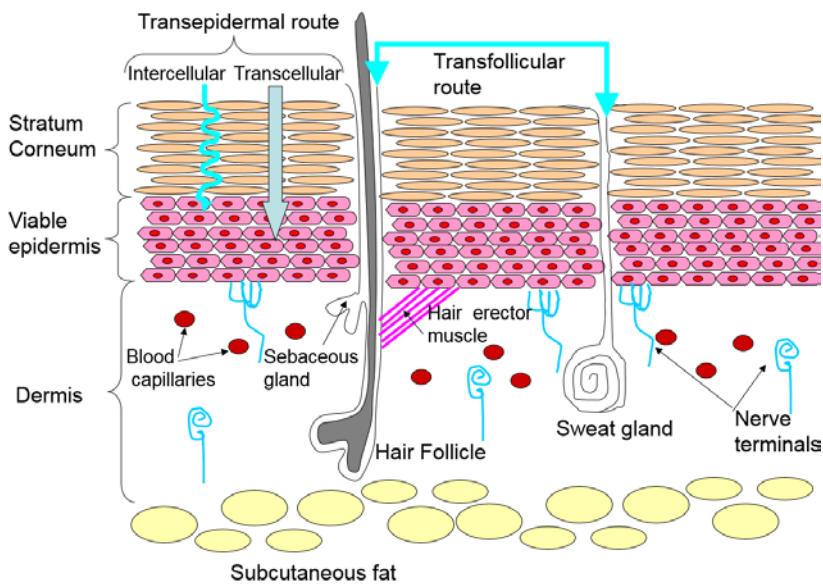


Figura 1. Esquema de la estructura de la piel (Tomado del capítulo 4 del libro "How and where are the drug absorbed?" con permiso de los autores)<sup>1</sup>.)

La capa más externa es la **epidermis**, la cual se compone del estrato córneo en su parte más superficial y por debajo de ésta, la epidermis viva.

El **estrato córneo** es la subcapa que está en contacto con el exterior. Puede tener un espesor de 10-20  $\mu\text{m}$  y engloba células metabólicamente inactivas llamadas corneocitos que están inmersas en una matriz lipídica. El citoplasma de estas células es principalmente de naturaleza proteica (queratina) y la matriz intercelular está compuesta principalmente de colesterol, ceramidas y ácidos grasos, entre otros. Estos lípidos se disponen formando bicapas lipídicas (lamelas) de manera que se generan compartimentos acuosos entre ellas. Esta composición determina que el estrato córneo sea de carácter fundamentalmente lipófilo, por lo que es el principal impedimento a la penetración de fármacos hidrófilos.

La **epidermis viva** es una capa epitelial estratificada y avascular que presenta un espesor de hasta 100-150  $\mu\text{m}$ . Está integrada por cuatro tipos celulares: queratinocitos, melanocitos, células de Merkel de las terminaciones nerviosas y células fagocíticas de Langerhans. Los queratinocitos sufren modificaciones tanto en su metabolismo como en su composición, enriqueciéndose de queratina a medida que se van diferenciando y progresando hacia el estrato córneo. Nacen en la capa basal interna o germinativa que separa la dermis de la epidermis. Estas células están en

continuo proceso de renovación y a medida que evolucionan hacia el exterior dan origen a los diferentes estratos: espinoso, granuloso y estrato córneo.

La **dermis** se sitúa inmediatamente por debajo de la epidermis y está compuesta por una matriz densa de tejido conectivo, formado por fibras de colágeno y elastina. En este nivel ya hay vasos sanguíneos por lo que los fármacos que lleguen a la misma podrían pasar a la circulación sistémica.

Tanto la epidermis viva como la dermis son estratos celulares mucho más hidrófilos que el estrato córneo.

La **hipodermis** es la capa más profunda de la piel y representa la zona de separación entre la dermis y los tejidos subyacentes. En ésta se hallan grandes masas de adipocitos que acumulan lípidos en sus vesículas y constituyen la reserva energética más importante del organismo humano. A nivel de absorción de fármacos esta capa no es relevante.

Además de las capas epiteliales, la piel contiene **estructuras o glándulas anejas** que se anclan en la dermis o hipodermis y desembocan en la epidermis. Estas estructuras son:

- ✓ Los folículos pilosebáceos: compuestos por folículos pilosos y glándulas sebáceas. Estas últimas segregan sebo hacia la parte superior del canal piloso.
- ✓ Las glándulas sudoríparas: vierten su secreción (sudor) de naturaleza fundamentalmente acuosa al exterior ayudando a la función de termorregulación del organismo.

### 15.3 Vías de penetración cutánea

Cuando un fármaco se aplica sobre la superficie de la piel en primer lugar debe disolverse en ella y posteriormente atravesar las diferentes capas que la constituyen para acceder a la circulación sistémica o bien puede permanecer en la piel (bien sea en capas más superficiales o en las más internas). La entrada del fármaco se puede producir a través de dos vías:

**Transepidérmica:** Supone el paso a través de la epidermis. Como las células de la piel representan más del 99% de la superficie, esta vía es la mayoritaria. A su vez se puede diferenciar:

*Vía intercelular:* consiste en la difusión de sustancias a través de los espacios intercelulares del estrato córneo siguiendo un camino tortuoso. Es la vía principal.

*Vía transcelular:* se trata de la penetración de sustancias que atraviesan varias veces las capas lipídicas y los corneocitos mediante continuos procesos de reparto (paso de un medio a otro) y difusión (dentro de un mismo medio).

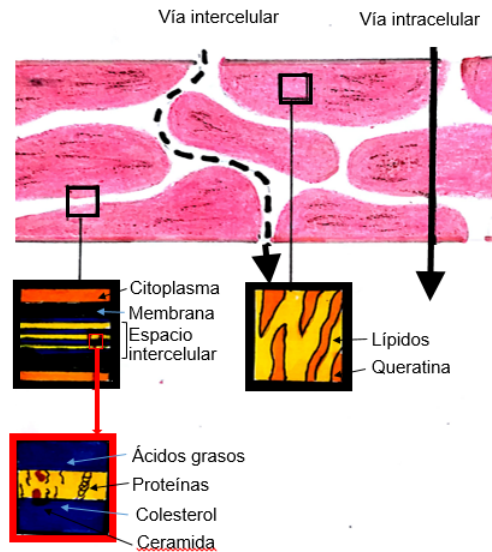


Figura 2. Vías de penetración intercelular y transcelular a través de la epidermis.

**Transapendicular:** se realiza por las glándulas sudoríparas y los folículos pilosebáceos. Es la ruta minoritaria ya que estas estructuras representan menos del 1% del total de la superficie de la piel.

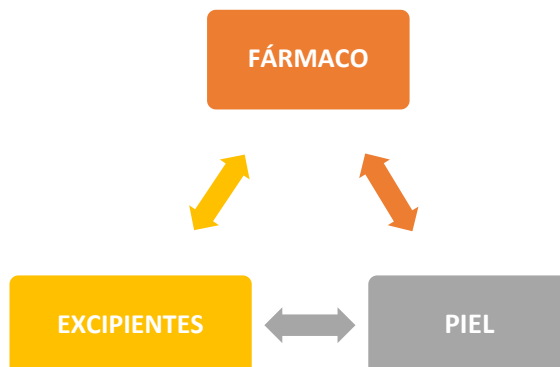
## 15.4 Factores implicados en la absorción transdérmica

### 15.4.1 Factores implicados en la absorción transdérmica

El que un fármaco atraviese en mayor o menor medida la barrera de la piel depende de muchos factores (relativos a la interacción entre la piel, el principio activo y los excipientes) que deben ser considerados a la hora de formular un medicamento.

**Factores biológicos:** hacen referencia a la propia naturaleza de la piel. Así, se encuentran diferencias en la permeabilidad según la edad, la raza, el estado de la piel, el grado de hidratación, etc y aportan una gran variabilidad interindividual.

**Factores físico-químicos:** se consideran tanto las características del fármaco (concentración, coeficiente de difusión, coeficiente de reparto...) como la naturaleza del vehículo utilizado para su aplicación (excipientes), como se detalla en el epígrafe siguiente.



## Principios activos

La absorción percutánea tiene lugar primordialmente por difusión pasiva. El modelo más sencillo para explicar el proceso de la absorción percutánea se basa en la aplicación de la *primera ley de Fick*, que establece que la velocidad de transferencia de la sustancia que difunde a través de una superficie de área igual a la unidad, es proporcional al incremento de concentración (*ecuación 1*).

$$\frac{dM}{dt} = \frac{D \cdot P \cdot C}{L} \quad (1)$$

Donde  $dM/dt$  es la velocidad de penetración por unidad de superficie; **D** representa el coeficiente de difusión del fármaco; **P**, es el coeficiente de reparto del fármaco entre la piel y el vehículo; **C**, la concentración del principio activo en el vehículo, y **L** es la longitud del camino difusional. Así pues, todas aquellas propiedades que condicionen el coeficiente de difusión, bien en la formulación o a través de las distintas capas de la piel, como son viscosidad de la formulación y el peso y volumen molecular del soluto pueden afectar a la velocidad de absorción. No obstante, es sin duda mucho más relevante la lipofilia de la molécula, puesto que determina que el acceso a las distintas capas sea más o menos favorable. En este sentido, un coeficiente de reparto elevado no siempre es indicativo de una mayor facilidad de difusión a través de la piel, ya que las sustancias muy lipófilas pueden acumularse en el estrato córneo, con lo cual se ve dificultada su penetración a estratos más profundos.

## Excipientes

Dado que las características fisicoquímicas de la molécula activa limitan en gran medida su paso a través de la piel, se puede considerar que el número de fármacos que por sí solos son capaces de atravesar el estrato córneo en cantidad suficiente para producir una respuesta terapéutica es reducido. Aunque el principal papel del excipiente es servir de soporte al principio activo que se desea aplicar sobre la piel, en las formulaciones dermatológicas los excipientes tienen una función más activa y pueden influir en la penetración del principio activo hacia lugares más o menos profundos situados por debajo de la zona de aplicación y contribuir de este modo en la eficacia del preparado.

El efecto del excipiente puede ser debido a una interacción fármaco-vehículo; por una acción directa sobre la estructura o propiedades de la piel; o por una acción indirecta, al variar por ejemplo la temperatura del tejido, su grado de hidratación, etc.

Algunos excipientes conocidos como promotores químicos ayudan a aumentar el paso del principio activo a través de la piel. Estos promotores deben reunir en la medida de lo posible unos requisitos: ser farmacológicamente y químicamente inertes, tener efectos reversibles sobre la piel, ser compatibles con el fármaco concreto, poseer buenos caracteres organolépticos y no deben producir irritación.

## 15.5 Técnica *in vitro* para la evaluación del grado de penetración a través de la piel

Existen distintos métodos experimentales que permiten estudiar la absorción percutánea de todo tipo de moléculas, ya sean farmacológicamente activas o bien se desee evaluar su potencial toxicidad. Inicialmente se puede establecer una división en dos grandes grupos: estudios *in vivo* e *in vitro*. Sin duda, a priori, resultan más interesantes los estudios *in vivo*, ya sean en animales de experimentación o en voluntarios, puesto que se aproximan más a situaciones reales, al mantener la viabilidad completa de la piel, lo que representa que sus funciones propias, como

capacidad de metabolismo, distribución y excreción a través de la propia piel y del organismo se mantienen. No obstante, hay que señalar en este contexto que los estudios de experimentación animal que se han venido realizando en los últimos tiempos para probar la falta de toxicidad de productos cosméticos por ejemplo, deben ser sustituidos según las reglamentaciones por otro tipo de estudios *in vitro*, que no supongan el uso de animales de ninguna especie.

Los distintos métodos *in vitro* disponibles para el estudio de la penetración ofrecen la posibilidad de profundizar en los diferentes aspectos y factores que influyen en la absorción percutánea de fármacos, ya que permiten fijar y controlar las condiciones en el experimento de modo que, la elección de un determinado diseño experimental depende de la finalidad buscada en cada caso. Entre los muchos aspectos que se pueden estudiar destacan:

- ✓ el esclarecimiento de los procesos limitantes de la absorción,
- ✓ el análisis de las propiedades intrínsecas de la membrana como barrera,
- ✓ la identificación de la vía de difusión predominante,
- ✓ la detección de los efectos producidos por los componentes del vehículo,
- ✓ el estudio de la capacidad de difusión del fármaco,
- ✓ la detección de la variabilidad existente entre membranas de distinto origen,
- ✓ la acción de compuestos promotores de la penetración cutánea.

Cuando se dispone de un principio activo susceptible de administrarse por vía transdérmica se deben realizar ensayos *in vitro* para determinar su permeabilidad a través de la piel. En primer término resulta fundamental analizar la penetración de la molécula por sí misma, es decir, desde una solución empleando un vehículo que no interfiera en las propiedades barrera de la piel. No obstante, dado que en la vía transdérmica los excipientes tienen una función activa es necesario realizar el diseño racional de varias formulaciones y evaluar la absorción del activo desde todas ellas para seleccionar la más adecuada dependiendo del efecto buscado en cada caso.

Los ensayos de permeabilidad *in vitro* presentan varias limitaciones, entre las más destacables sobreestiman la absorción transdérmica respecto a lo que sucede en el organismo vivo. En cualquier caso, son muy útiles para realizar un screening preliminar. Si el diseño del estudio es adecuado y se fijan todas aquellas variables que afectan a la penetración a excepción de la analizada es posible sacar conclusiones adecuadas, respecto, por ejemplo, a qué formulación implica un mayor grado de penetración a través de la piel de la molécula objeto de estudio, a pesar de no poder determinar cuál será el valor exacto del grado de penetración en situaciones reales de utilización en humanos.

A continuación se comentan los **aspectos más destacables** de los estudios de evaluación de la permeabilidad cutánea *in vitro*.

### 15.5.1 Piel o membranas alternativas.

La piel empleada para los estudios de absorción transdérmica suele ser de origen humano o animal. Siempre que sea posible es recomendable utilizar piel humana (abdomen o pecho), que procede de cirugía estética y siempre bajo el consentimiento informado del donante.

Debido al problema de la baja disponibilidad y de la variabilidad que existe entre individuos (raza, sexo, edad, etc), muchas veces se recurre a modelos animales. En general, las características histológicas y la composición son diferentes a la humana. Los modelos de rata, ratón, cobaya y conejo pueden utilizarse, pero sobreestiman, en mayor medida que la piel de origen humano, la permeabilidad *in vivo* en humanos. Por otro lado, se ha observado que la piel de cerdo, a pesar de estas diferencias, presenta una gran similitud en términos de características de permeabilidad con la piel humana. Puede emplearse piel procedente de diferentes localizaciones (espalda, abdomen, etc) pero lo más común es emplear oreja de cerdo. En este sentido, hay que destacar que este

animal no se sacrifica exprofeso para realizar este tipo de estudios, sino que pueden ser animales destinados al consumo alimentario siempre y cuando el tejido se obtenga antes del escaldado del animal.

En los ensayos puede emplearse piel completa, es decir, aquella que incluye estrato córneo, epidermis y dermis. El grosor de este tipo de preparación es muy variable, suele presentar valores superiores a 1000  $\mu\text{m}$ . Por este motivo, en muchas ocasiones se recurre a laminarla con un dermatomo, con objeto de que el espesor esté controlado (generalmente alrededor de 500-600  $\mu\text{m}$ ). Los ensayos pueden llevarse a cabo inmediatamente tras la obtención de la piel o bien ésta puede almacenarse entre  $-80^{\circ}$  y  $-20^{\circ}$   $^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización, en un periodo de unos meses.

En ocasiones se emplea únicamente la fracción constituida por la epidermis viva y el estrato córneo, para ello se somete el tejido a calor ( $60^{\circ}$   $^{\circ}\text{C}$  durante 45 segundos) y de este modo se consigue la separación dermo-epidérmica.

En último término, también puede seleccionarse únicamente el estrato córneo, dado es el estrato que representa la principal barrera de entrada para muchos fármacos. Para ello debe someterse la piel a tratamiento enzimático (proteasas) para proceder a su separación.

La principal limitación que presentan es que el tejido no conserva enzimas activos, por lo que sólo pueden proporcionar datos de permeabilidad pasiva y no pueden aportar información sobre otro tipo de transporte o sobre fenómenos de metabolismo cutáneo.

Además de la piel humana y animal, existen otras alternativas para llevar a cabo el estudio de la absorción como por ejemplo las PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) skin constituidas por 70% aceite de silicona y 30% miristato de isopropilo. El uso de estas membranas se fundamenta en que el paso de los compuestos a través de las membranas biológicas está limitado fundamentalmente en su reparto en las bicapas lipídicas, lo cual, si bien no es del todo cierto resulta bastante útil a efectos prácticos. La ventaja de estas membranas estriba en que permiten realizar el cribado de una gran cantidad de compuestos y que los resultados son muy reproducibles dada la homogeneidad de las mismas.

En un reciente estudio, se ha avanzado en este aspecto y se ha desarrollado un modelo de PAMPA que se acerca más a la composición natural de la piel. Mediante correlaciones entre datos de permeabilidad en piel humana obtenidas con células de Franz y datos de permeabilidad obtenidas con el modelo PAMPA, se ha observado que la composición cuali y cuantitativa más representativa de la piel completa es una mezcla de ceramidas (del tipo C8-C18), ácidos grasos libres y colesterol (en proporción aproximadamente de 1:1:1); y el aceite de silicona en sustitución de n-dodecano que aporta hidratación a la membrana pero sin permitir la formación de canales acuosos. Una vez establecida la composición, se establecieron diversas correlaciones entre los datos observados con este nuevo modelo y los datos procedentes de estudios con distintos tipos de preparaciones cutáneas. Finalmente, se determinó que este modelo es más representativo de la piel completa que de los otros tipos de piel (estrato córneo aislado y epidermis aislada).

La principal limitación que presentan es que no contienen transportadores ni enzimas por lo que sólo pueden proporcionar datos de permeabilidad pasiva y no pueden aportar información sobre otro tipo de transporte o sobre fenómenos de metabolismo cutáneo.

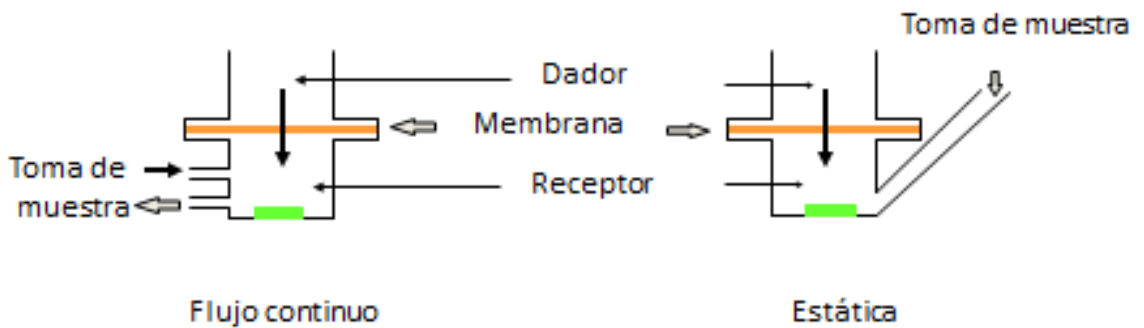
También es posible emplear líneas celulares de queratinocitos humanos cultivados en multicapa. Estas desarrollan las capas basal, granulosa, espinosa y estrato córneo, mantienen desmosomas y la estructura lipídica en bicapas correspondiente al estrato córneo; así pues son representativas de la epidermis. Igualmente están disponibles queratinocitos humanos cultivados en multicapa sobre una matriz de colágeno con fibroblastos viables, como representativo de piel completa. Son sustratos con actividad metabólica que pueden emplearse en estudios toxicológicos, de irritación y de absorción.

## 15.5.2 Realización del ensayo de absorción transdérmica

La mayor parte de los experimentos in vitro recurren al empleo de células de difusión, elaboradas con vidrio neutro para evitar que interfiera con la sustancia a ensayar. Existen diferentes modalidades y diseños, pero la variante más utilizada son las células de flujo vertical (tipo célula de Franz). Estas células constan de dos compartimentos adyacentes (figura 3): en la parte superior se encuentra el compartimento dador, en el que se dispone la formulación a ensayar, y en la parte inferior el receptor que contiene una solución en la que se irá disolviendo la fracción absorbida del fármaco. Entre ambos compartimentos se dispone la piel en posición horizontal. El área útil de difusión de las células y la capacidad del compartimento receptor son variables, en función del diseño del sistema. En cada caso se debe calcular cuales son exactamente los valores de área útil de difusión y volumen del compartimento receptor, así como garantizar que el sistema tenga un sellado adecuado con objeto de evitar pérdidas laterales de líquido.

El diseño del compartimento receptor puede variar, así pueden tener una única tubuladura a través de la que se toman muestras a tiempos prefijados (células estáticas); o bien pueden tener dos, de modo que el contenido del compartimento receptor está en continua renovación tratando de simular el drenaje vascular, lo que resulta muy útil en el caso de sustancias penetrantes poco solubles en el fluido receptor, o por el contrario sustancias que alcancen elevadas concentraciones en el mismo, ya que en ambos casos la velocidad de difusión puede estar limitada por la pérdida de las condiciones de sumidero.

Es importante que en el compartimento receptor no se formen capas estáticas que limiten el proceso de difusión pasiva, así como evitar que haya burbujas de aire adyacentes a la piel que la paralizarían. Por ello se debe de rellenar este compartimento con precaución y, en caso de células estáticas se debe de introducir en él un imán, así se consigue la homogeneización instantánea de la solución receptora.



*Figura 3. Esquema de las células de difusión de flujo vertical (tipo Franz)*

Dado que el proceso de difusión está condicionado por la temperatura, los estudios de absorción transdérmica deben llevarse a cabo a garantizando que la temperatura de la piel sea de  $32 \pm 1$  °C. Una vez ensamblado el sistema, y antes de proceder a la realización del ensayo, se debe comprobar la integridad de la piel. Existen distintas metodologías para su comprobación, como determinación de la pérdida de agua transepidérmica (TEWL, del inglés: Transepidermal Water Loss), medida del paso de agua tritiada a través de la piel, o la medida de la resistencia transepidérmica. Esta última medida es sencilla de realizar pero depende de la concentración de iones en el medio así como del grado de hidratación de la piel, por ello debe de llevarse a cabo en condiciones perfectamente estandarizadas, con objeto de que su medida tenga realmente valor. Para ello puede procederse, por ejemplo, del siguiente modo: se introduce en el compartimento dador 1 mL suero fisiológico y se rellena el compartimento receptor con el mismo, se mantienen las células a la temperatura indicada, con agitación a 200 rpm, durante 30 minutos. Tras este

tiempo se procede a la medida de la resistencia eléctrica. En caso de piel completa de 600  $\mu\text{m}$  de espesor valores inferiores a 3  $\text{k}\Omega$  son indicativos de falta de integridad de la membrana.

Tras esta determinación puede procederse a la realización del ensayo. Para ello se sustituye el compartimento dador y el receptor por los medios adecuados. La elección adecuada del fluido receptor es crucial y se debe tener en cuenta que no debe comprometer la integridad de la piel y que la sustancia a estudiar debe ser estable y soluble en él. Siempre que sea posible se recomienda emplear un tampón, como fosfato, de pH 7.4, a no ser que el compuesto a ensayar sea muy poco soluble en él.

En el compartimento dador puede disponerse una disolución o bien una formulación sólida o semisólida. En cualquier caso, con objeto de que los cálculos sean exactos la cantidad que se introduzca ha de ser conocida. Se recomienda emplear una relación cantidad de formulación/superficie de piel similar a la que se vaya a emplear en condiciones reales de utilización de la formulación, si bien en algunos casos resulta difícil dadas las bajas concentraciones de activo empleadas. El compartimento dador puede quedar al aire o puede protegerse adecuadamente, en cualquier caso, debe simular las condiciones de aplicación que posteriormente se deseen del producto.

En estos momentos se inicia el estudio de absorción transdérmica. A los tiempos que se consideren adecuados se toman muestras (del volumen necesario) del compartimento receptor, a través de la tubuladura lateral. Tras cada toma de muestra se repone con el mismo volumen de la solución empleada para rellenar el compartimento dador, cuidando que no quede ninguna burbuja de aire en contacto con la piel. Las muestras obtenidas se centrifugan o se filtran para evitar interferencias de componentes liberados por la piel y se conservan del modo adecuado hasta su valoración.

Si se va a emplear la ecuación derivada de la primera ley de Fick para calcular el flujo transdérmico se debe de muestrear a intervalos adecuados para disponer al menos de 5 puntos en el estado estacionario de difusión. El tiempo de realización de los ensayos no debe ser superior a 24 horas ya que a partir de este tiempo la integridad de la piel puede verse alterada.

Al finalizar el ensayo se procede a desmontar el sistema y a recoger todas las muestras necesarias con objeto de realizar un balance de masas: se retira la formulación restante, se realiza un lavado de la superficie de la piel, se recoge la piel y el contenido del compartimento receptor. Cada una de estas muestras se somete a un proceso de extracción adecuado y por último se valoran con objeto de determinar la cantidad de activo en cada una de ellas.

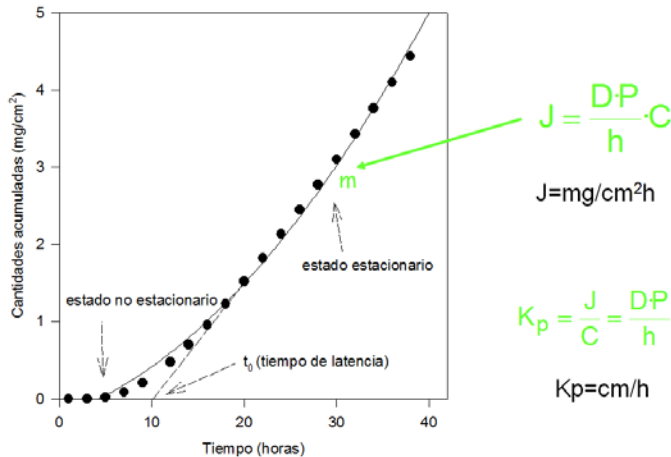
## **15.6 Cálculo de los parámetros representativos de la difusión**

El tratamiento matemático más sencillo, aplicable cuando se alcanza el estado estacionario de difusión y el ensayo cumple las condiciones sumidero, consiste en aplicar la ecuación derivada de la primera ley de Fick de la difusión. Para que estos cálculos sean aplicables la concentración en el compartimento dador debe mantenerse constante durante todo el ensayo (la concentración en compartimento receptor debe ser inferior al 10% a la del compartimento dador y la concentración del fármaco en el compartimento receptor ha de ser inferior al 20 % de la solubilidad en este medio). Si no se cumplen estas condiciones se requiere otros cálculos, como los recogidos en <sup>34</sup>

Los cálculos correspondientes a este tipo de experimentos se describir en el capítulo 26 de este libro.



# Cinética de difusión



**Figura 4.** Esquema de la representación gráfica de los datos obtenidos

La pendiente de la recta de la regresión lineal del tramo correspondiente al estado estacionario de difusión de las cantidades de fármaco acumuladas ( $Q$ , (masa/superficie)) en el compartimento receptor frente al tiempo ( $t$ ) permite el cálculo del flujo transdérmico del compuesto en el estado estacionario de la difusión (cantidad de fármaco que difunde por unidad de área y tiempo, ( $J_{ss}$ )). El cociente entre el flujo en estado estacionario y la concentración en el compartimento dador (que se asume invariable durante la realización del ensayo) corresponde al coeficiente de permeabilidad,  $K_p$  (longitud/tiempo).

El punto de corte de la recta de regresión en el eje de las  $x$  (tiempo) corresponde al periodo de latencia para alcanzar el estado estacionario de difusión ( $t_0$ ).

El balance de masas realizado permite la comprobación de la adecuación del ensayo para la realización de los cálculos mencionados.

<sup>1</sup> Marival Bermejo and Isabel Gonzalez-Alvarez, "How and where are drugs absorbed?" En *Preclinical Development Handbook: ADME and Biopharmaceutical Properties*. ISBN-13: 978-0-470-24847-8 - John Wiley & Sons, 2008

<sup>2</sup> Sinkó B<sup>1</sup>, Garrigues TM, Balogh GT, Nagy ZK, Tsinman O, Avdeef A, Takács-Novák K. Skin-PAMPA: a new method for fast prediction of skin penetration. *Eur J Pharm Sci*. 2012 11;45(5):698-707

<sup>3</sup> Mangas-Sanjuan V, González-Álvarez I, González-Álvarez M, Casabó VG, Bermejo M. "Modified nonsink equation for permeability estimation in cell monolayers: comparison with standard methods". *Mol Pharm*. 2014 May 5;11(5):1403-1414

<sup>4</sup> Tavelin, S., Grasjo, J., Taipalensuu, J., Ocklind, G., Artursson, P "Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport". *Methods Mol Biol*, 2002, 188: 233-272

# **16. Sección permeabilidad: Métodos *in situ* de estimación de la permeabilidad (1). Sistemas de perfusión de un solo paso**

Gladys E. Granero, Maria Julia Mora  
*Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad  
Nacional de Córdoba. Argentina*

## **16.1. Introducción**

La mayoría de los fármacos se administran por vía oral. De hecho la gran mayoría de las formas de administración farmacéuticas se diseñan para ser administrados por dicha vía. Sin embargo, no todos los compuestos tienen propiedades compatibles para el desarrollo de una forma de administración oral.

Frecuentemente, una pobre biodisponibilidad resulta en la terminación del desarrollo de nuevas drogas. Por lo tanto, la biodisponibilidad optimizada de las drogas es una de los objetivos muy importante para la industria farmacéutica.

## **16.2. Biodisponibilidad oral**

La biodisponibilidad representa la velocidad y la extensión de la dosis oral de un fármaco que alcanza la circulación sistémica, la cual está controlada por la solubilidad y la velocidad de disolución del fármaco en el fluido intestinal y por la permeabilidad a través de la membrana intestinal, el metabolismo presistémico y, algunas veces, la eficiencia de los sistemas que transportan las drogas.

La biodisponibilidad (F) es la variable farmacocinética más útil para caracterizar la fracción de una dosis que alcanza la circulación sistémica en una forma no cambiada (activa), y se relaciona a sus datos farmacológicos y de seguridad para los productos farmacéuticos orales. En un contexto regulatorio, se entiende a la biodisponibilidad como la extensión y la velocidad a la cual la sustancia activa o su porción activa se libera desde una forma farmacéutica y está disponible en la circulación general.

La biodisponibilidad depende principalmente de tres procesos generales en serie pero complejos; la fracción de dosis absorbida ( $f_a$ ), la extracción del fármaco de primer paso en la pared intestinal ( $E_G$ ) y la extracción de primer paso del fármaco en el hígado ( $E_H$ ).

$$F = f_a \cdot (1 - E_G) \cdot (1 - E_H) \quad (1)$$

### 16.2.1 Factores que afectan la biodisponibilidad oral de un fármaco

Diferentes Factores pueden afectar la fracción de dosis absorbida (es decir  $f_a$ ) y el metabolismo de primer paso en la pared intestinal (es decir  $E_G$ ) de los fármacos. En general, estos se pueden dividir en tres categorías amplias:

- A. Factores farmacéuticos, tales como la elección de los excipientes y los métodos de fabricación.
- B. Factores fisicoquímicos de las moléculas del fármaco por sí mismos, tales como la solubilidad y la forma cristalina.
- C. Factores fisiológicos, genéticos, bioquímicos y fisiopatológicos en el intestino.

### 16.3. Fracción de dosis absorbida ( $f_a$ )<sub>3</sub>

La  $f_a$  es la fracción de la dosis transportada (absorbida) a través de la membrana apical del enterocito hacia el espacio celular de la célula.

De acuerdo a esto, la velocidad (masa/tiempo) y la extensión de la absorción ( $f_a = \text{masa}/\text{Dosis}$ ) desde el lumen intestinal *in vivo* están influenciadas por: dosis/velocidad de disolución, degradación química o metabólica en el lumen intestinal, unión compleja luminal, tránsito intestinal y permeabilidad efectiva ( $P_{\text{eff}}$ ) a través de la mucosa intestinal.

La fracción de dosis absorbida ( $f_a = M_{(t)}/\text{Dosis}$ ), es decir la fracción del fármaco que se pierde desde el lumen intestinal, asegurando que no hay reacción luminal, en algún tiempo  $t$  es:

$$f_a = \frac{M(t)}{Dosis} = \int_0^t \int_A P_{eff} \cdot C_{lumen} \cdot dAdt \quad (2)$$

donde,  $A$  es el área de superficie intestinal disponible,  $P_{eff}$  es el valor promedio de la permeabilidad intestinal efectiva a lo largo de la región intestinal donde ocurre la absorción,  $C_{lumen}$  es la concentración del fármaco libre de referencia en el lumen intestinal.

Desde esta ecuación se desprende que, la  $P_{eff}$  y la concentración del fármaco libre y disuelto son las variables claves que controlan la velocidad global y la extensión de la absorción, y esta ecuación se aplica sin tener en cuenta el mecanismo de transporte.

## 16.4. Permeabilidad intestinal efectiva ( $P_{eff}$ ).

La permeabilidad es uno de los parámetros biofarmacéuticos claves que determinan la velocidad y la extensión de la absorción intestinal del fármaco.

La permeabilidad intestinal efectiva ( $P_{eff}$ ) del fármaco se deriva de la ley de Fick, la cual define la relación entre el flujo neto ( $J_{pared}$  o masa por unidad de área por unidad de tiempo) a través de la pared de la membrana y la caída de la concentración del fármaco ( $\Delta C$ ) a través de la superficie de la membrana.

$$J_{pared} = P_{eff} \Delta C \quad (3)$$

Cuando un fármaco en solución pasa a través del intestino, la concentración del mismo en el lumen intestinal disminuye debido a la absorción. En consecuencia, la velocidad de transporte del mismo a través del segmento intestinal completo (masa absorbida) se puede definir por la ley de Fick, donde el flujo neto se expresa como la masa por unidad de área por unidad de tiempo:

$$J_{pared} = \frac{dM}{dt} \frac{1}{A} \quad (4)$$

$$\frac{dM}{dt} = AP_{eff} (C_{lumen}^{ref} - C_{sangre}^{ref}) \quad (5)$$

Esta ecuación se puede simplificar si se asume que no hay acumulación del fármaco en el lado sanguíneo, es decir  $C_{\text{sangre}}^{\text{ref}} \ll C_{\text{lumen}}^{\text{ref}}$ , o que la sangre portal se considera estar bajo condiciones de sumidero.

Lennernäs y colaboradores reportaron que las concentraciones del fármaco en el plasma son generalmente de diferentes órdenes de magnitud inferiores a las encontradas en el lumen intestinal del fármaco en humanos, por lo tanto, esto demuestra la validez de esta asunción.

Consecuentemente, la velocidad de absorción del fármaco depende: del área expuesta, el coeficiente de permeabilidad, y la concentración en la superficie de la membrana de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{dM}{dt} = A \cdot P_{\text{eff}} \cdot C_{\text{lumen}}^{\text{ref}} \quad (6)$$

Más generalmente, la siguiente relación se usa para definir la velocidad global de absorción a lo largo del tracto gastrointestinal (TGI) entero:

$$\text{Velocidad} : \frac{dM}{dt} = \int \int_A P_{\text{eff}} C_{\text{lumen}}^{\text{ref}} dA \quad (7)$$

Donde, la doble integral esta sobre la superficie absorbente entera y la masa absorbida a cualquier tiempo, es decir la extensión de absorción está dada por la siguiente ecuación:

$$\text{Extensión} : M(t) = \int_t \int \int_A P_{\text{eff}} C_{\text{lumen}}^{\text{ref}} dA dt \quad (8)$$

donde, la permeabilidad y la concentración del fármaco dependen de la posición y del tiempo del mismo en el lumen intestinal.

## 16.5. Perfusión intestinal de un solo paso,

### 16.5.1 Fundamentos de la perfusión intestinal de un solo paso (PISP)

El modelo de perfusión intestinal de un solo paso (PISP) fue propuesto originalmente por Higuchi. El mismo fue diseñado para estimar las propiedades de absorción de un fármaco considerando un flujo de fluido continuo en el intestino.

El método de PISP consiste en aislar un segmento del intestino de un animal de experimentación, el más utilizado hasta el momento es la rata. El segmento del intestino de interés es canalizado por sus extremos proximal y distal con cánulas plásticas. La solución del fármaco es perfundida continuamente (con una bomba de infusión) a través de la longitud establecida del segmento intestinal, ingresando por la cánula proximal del mismo y es recolectada a través de la cánula distal, a velocidades de flujo de entre 0,1 y 0,3 ml/min. Las muestras del perfundido recogidas son analizadas por un método analítico para determinar la concentración del fármaco que no fue absorbido (Figura 1).

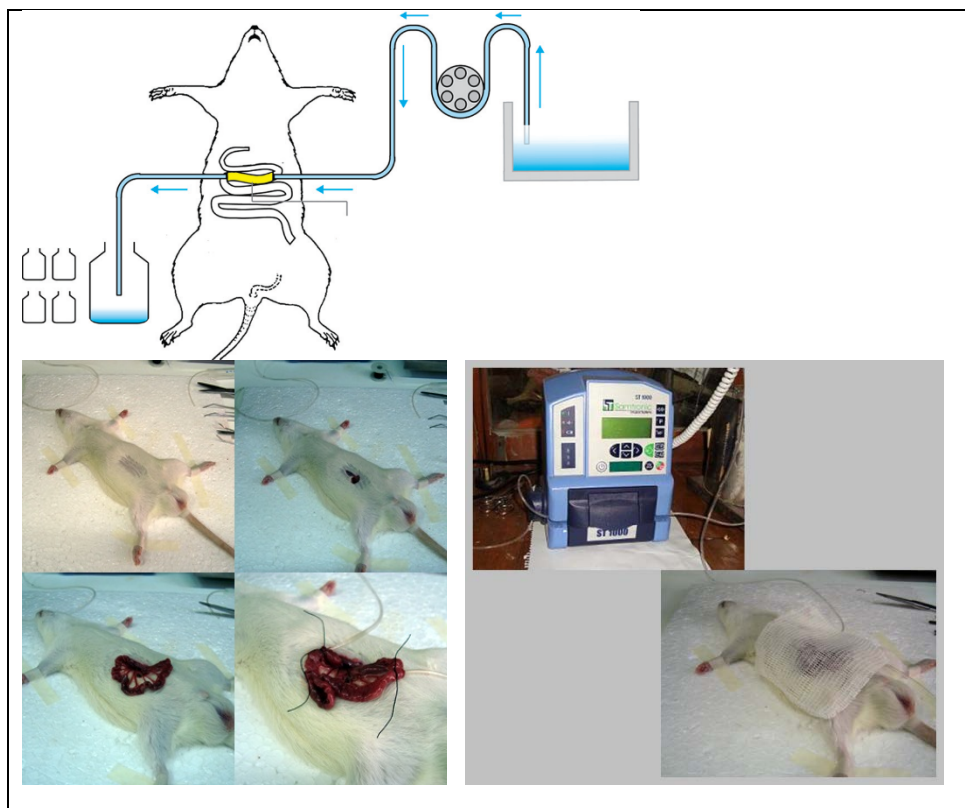


Figura 1. Metodología del SPIP

En algunos experimentos, para prevenir el recicle entero hepático, el conducto biliar se puede cerrar antes de la perfusión.

La estimación de la permeabilidad intestinal efectiva ( $P_{eff}$ ) se determina calculando la diferencia de concentración entre los fluidos de ingreso y de salida una vez que el estado de equilibrio se alcanza (es decir, cuando las concentraciones de salida del compuesto son estables en el tiempo).

## 16.6. Modelos utilizados para determinar la concentración luminal del fármaco.<sup>67</sup>

Un modelo físico para el flujo de fluido simultáneo a la absorción en el tracto intestinal, bajo condiciones de estado de equilibrio, se presenta en la siguiente figura:

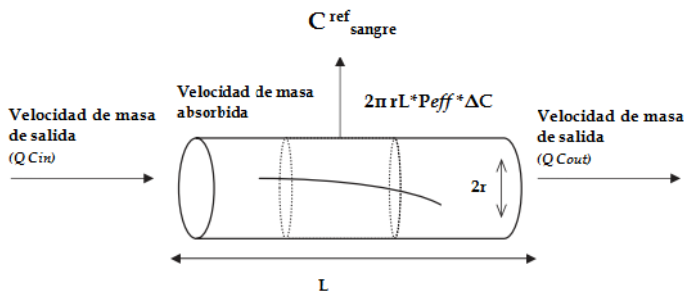


Figura 2. Representación esquemática de un segmento intestinal.

En el estado de equilibrio, el siguiente balance de masa se puede aplicar a través de un segmento perfundido, es decir considerándolo como un tubo cilíndrico:

$$QC_{in} - QC_{sal} = AP_{eff} C_{lumen}^{ref} \quad (9)$$

donde,  $QC_{in} - QC_{sal}$  es la diferencia entre el producto de la velocidad de flujo volumétrico ( $Q$ ) por la concentración del fármaco de ingreso ( $C_{in}$ ) menos el producto de la velocidad de flujo volumétrico ( $Q$ ) por la concentración de salida ( $C_{sal}$ ), respectivamente.

Assumiendo que la masa se pierde desde el tubo solo por absorción hacia la sangre, la masa absorbida por unidad de tiempo, es la diferencia entre las velocidades del flujo de masa a la entrada y a la salida del tubo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P_{eff} = \frac{Q}{A} \frac{(C_{in} - C_{sal})}{C_{lumen}^{ref}} \quad (10)$$

El término ( $C_{lumen}^{ref}$ ), es decir el perfil de concentración del fármaco en el segmento intestinal, depende de la dinámica del flujo en el intestino y se han propuesto diferentes modelos matemáticos para definir este término.

### 16.6.1 Modelo del tanque bien mezclado

El modelo más simple es el modelo del tanque bien mezclado o el modelo bien agitado, el cual considera se alcanza dentro del intestino la mezcla completa (es decir axial y radial) del fluido que es perfundido en el mismo y, por lo tanto, hay una concentración uniforme dentro del intestino. El modelo asume que se produce una dilución instantánea de la corriente de ingreso en el segmento intestinal.

El término  $C_{lumen}^{ref}$  se considera aproximadamente ser igual a  $C_{sal}$  y por consiguiente la  $P_{eff}$  calculada como sigue:

$$P_{eff} = \frac{Q}{A} \left( \frac{C_{in} - C_{out}}{C_{out}} \right) \quad (11)$$

### 16.6.2 Modelo del tubo paralelo

El modelo de la mezcla radial completa o modelo del tubo paralelo considera que se produce una disminución constante del flujo del fluido en el cilindro. Ello también se refiere a un sistema abierto, donde la solución de perfusión, que contiene el fármaco, fluye hacia abajo del segmento cilíndrico y, en el estado de equilibrio, se establece un gradiente de concentración constante a lo largo de la longitud del segmento.

El perfil de concentración se considera ser constante radialmente pero no axialmente. Por lo tanto, el perfil de concentración del fármaco disminuirá de una manera exponencial, asumiendo una absorción de primer orden.



El término  $C_{\text{lumen}}^{\text{ref}}$  se puede aproximar a la concentración media logarítmica en el intestino de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$C = \frac{(C_{\text{sal}} - C_{\text{in}})}{\ln\left(\frac{C_{\text{sal}}}{C_{\text{in}}}\right)} \quad (12)$$

y sustituyendo en la ecuación anterior se obtiene la siguiente expresión:

$$P_{\text{eff}} = -\frac{Q}{A} \ln\left(\frac{C_{\text{sal}}}{C_{\text{in}}}\right) \quad (13)$$

La fracción del fármaco remanente en el intestino (no absorbido), en el estado de equilibrio, se define como la razón de las concentraciones de ingreso y de salida, y se puede calcular acomodando la ecuación anterior como sigue:

$$\frac{C_{\text{sal}}}{C_{\text{in}}} = e^{\left\{\frac{-A}{Q} P_{\text{eff}}\right\}} \quad (14)$$

Este modelo asume que en el estado de equilibrio hay una transferencia total del fármaco desde el lumen intestinal hacia la vena portal, es decir, la pérdida de masa refleja la aparición de la masa en la sangre.

Por lo tanto, la fracción del fármaco absorbida se puede definir como:

$$f_a = 1 - \left(\frac{C_{\text{sal}}}{C_{\text{in}}}\right) \quad (15)$$

$$f_a = 1 - e^{\left\{\frac{C_{\text{sal}}}{C_{\text{in}}}\right\}} \quad (16)$$

$$f_a = 1 - e^{\left\{\frac{-A}{Q} P_{\text{eff}}\right\}} \quad (17)$$

De acuerdo a la ecuación 17, la fracción de droga absorbida se puede predecir por los valores de  $P_{eff}$ , asumiendo que el área y la velocidad de flujo a través del intestino se conocen.

### **16.6.3 Ventajas y limitaciones de la técnica de perfusión intestinal de un solo paso.**

#### **16.6.3.1 Ventajas**

Las ventajas de las técnicas *in situ* son:

Se dispone de un suplemento sanguíneo intacto.

Se pueden tomar múltiples muestras, lo cual permite hacer estudios cinéticos.

Un punto fundamental considerando el método de perfusión intestinal *in situ* es que el modelo de la rata ha demostrado correlacionar con datos humanos *in vivo*. Amidon demostró que se puede predecir la absorción de sustratos transportados en forma pasiva y activa. Sin embargo, las concentraciones lumbales intestinales que se usan en los experimentos de ratas deben reflejar adecuadamente el escalado y las concentraciones de relevancia clínica para asegurar determinaciones de permeabilidad adecuadas.

#### **16.6.3.2 Limitaciones**

Hay limitaciones de los modelos de perfusión *in situ* como:

La derivación de estos modelos asumen que todo el fármaco pasa hacia la vena portal.

La asunción que la desaparición del fármaco refleja la absorción del mismo puede ser o no válida en algunas circunstancias. Si el fármaco en estudio es metabolizada por los enterocitos, su desaparición desde el lumen intestinal no reflejará la aparición del fármaco en la sangre.

Los modelos de perfusión intestinal que se basan en la cinética de desaparición del fármaco desde el segmento intestinal asumen que el transporte del mismo hacia los enterocitos, es decir a través de la membrana apical, es la etapa limitante de la velocidad. Esto es la mayoría de las veces verdad, como en el caso de compuestos que se absorben en forma pasiva, aunque las excepciones de esto podrían incluir fármacos que se transportan en forma activa a través de la membrana basolateral.

Por ejemplo, considerando el transporte rápido de di y tri-péptidos por el transportador oligopéptido, es común que la membrana basolateral sea la etapa más lenta en el transporte global desde el lumen intestinal hacia la sangre portal. Similarmente, si el fármaco es transportado vía los vasos linfáticos intestinales, por ejemplo en el caso de fármacos lipofílicos, la asociación con las lipoproteínas producidas intracelularmente sería la etapa crítica limitante en la velocidad para el pasaje del fármaco hacia la circulación sistémica.

Las técnicas *in situ* sufren la desventaja que el animal está anestesiado por la duración del experimento. La cirugía y la anestesia cambian diferentes factores fisiológicos que pueden alterar las características de absorción del fármaco.

Anderson y col. encontraron que el espesor de la capa de agua estática que se encuentra sobre la mucosa intestinal (ABL) en las ratas laparotomizadas es mayor que en las ratas concientes y no laparotomizadas. También Yuasa y col reportaron que el efecto combinado de la laparotomía y la anestesia parecen incrementar la resistencia ABL, posiblemente como un resultado de una movilidad y mezclado intestinal reducidos, generando una mayor barrera a la absorción de los fármacos lipofílicos.

El uretano y el fenobarbital son los anestésicos más ampliamente utilizados en estudios de absorción intestinal. Mientras que el uretano puede ofrecer la ventaja en términos de una anestesia más larga y prolongada, el fenobarbital parece tener menos impacto en el proceso de absorción. Aunque Ueada y col. encontraron que la biodisponibilidad de la oxacilina aumento debido a un efecto inducido por el fenobarbital versus ratas concientes y esto se debió principalmente a la disminución en la extracción del metabolismo hepático del fármaco.

La mezcla ketamina/midazolam parece disminuir el transporte activo de la glucosa y aumentar el flujo sanguíneo intestinal, lo cual no favorece los estudios de absorción intestinal.

La mezcla ketamina/xilazina significativamente reduce la actividad hepática de CYP3A y el flujo sanguíneo venoso portal.

#### **16.6.4 Estandarización y validación de la técnica de perfusión intestinal de un solo paso**<sup>9,10,11,12,13</sup>

Para evitar errores potenciales en los estimados de  $P_{eff}$ , se deben considerar cuidadosamente condiciones tales como:

La estabilidad del fármaco en el perfundido intestinal.

La adsorción del fármaco en todos los elementos que componen el sistema de perfusión.

El pH y la osmolaridad de las soluciones de perfusión. La osmolaridad de la solución de perfusión se ajusta a aquellas encontradas en condiciones fisiológicas. Las soluciones de perfusión hiperosmolares tienden a disminuir los valores de  $P_{eff}$ , efecto que se atribuye a un efecto de dragado reverso del solvente.

El pH también se ajusta a los valores encontrados en condiciones fisiológicas. El pH de la solución de perfusión puede afectar a los valores de  $P_{eff}$ , especialmente en el caso de fármacos que son ácidos o bases débiles.

El uso de una concentración del fármaco clínicamente relevante. La viabilidad funcional del tejido intestinal es crucial cuando se usan modelos *in situ* para el transporte a través de la membrana intestinal. La concentración del fármaco en la solución de perfusión debe ser clínicamente relevante, en especial para aquellos fármacos que son transportados a través de la mucosa intestinal por un mecanismo saturable y por lo tanto, no poseen características de absorción lineal.

Para facilitar la estandarización de los resultados de permeabilidad inter-laboratorio, se perfunde el fármaco en estudio concomitantemente con dos estándares de baja y alta permeabilidad. Un estándar interno de baja permeabilidad para determinar la integridad de la membrana y un estándar de alta permeabilidad para verificar la reproducibilidad del método. Además, también se agrega un marcador de permeabilidad cero para corregir las concentraciones de las soluciones de perfusión recolectadas a la salida del segmento intestinal por los cambios de volúmenes de agua dentro del segmento.

Los criterios de estandarización más comúnmente utilizados son los que están en la siguiente tabla:

Tabla 1. Condiciones para estandarizar la técnica de perfusión intestinal de paso simple.

CONDICIÓN	CRITERIO
Osmolaridad de la solución de perfusión	~290 mOsm/kg (Buffer fosfato 70 mM)
Estándares internos	Marcador de baja permeabilidad (manitol, atenolol) y alta permeabilidad

	(metoprolol, ketoprofeno)
Concentraciones clínicamente relevantes y pH	6,5
Estabilidad del fármaco en las condiciones experimentales	Mínima degradación y adsorción en el sistema experimental

#### 16.6.4.1 Elección de la velocidad de flujo

La elección de la velocidad de flujo de la solución de perfusión en los experimentos *in situ* de perfusión intestinal de un solo paso es una consideración importante a tener en cuenta, ya que puede afectar: la hidrodinámica, el espesor de ABL, el radio intestinal, el área de la superficie del intestino, y el tiempo para alcanzar las condiciones de estado de equilibrio, todo lo cual puede impactar en las estimaciones de los valores de  $P_{eff}$ .

El radio intestinal tiene implicancias para la estimación del coeficiente de permeabilidad. El más ampliamente utilizado se estimada ser 0.18 cm para ratas. Hay un pequeño cambio en la presión intraluminal con un aumento de la velocidad de flujo de 0,25 a 0,5 ml/min, sin que se produzca un cambio aparente en la distensión del lumen intestinal.

#### 16.6.4.2 Corrección de la concentración del fármaco en las muestras de perfundido recolectadas

Una consideración adicional cuando se usan técnicas *in situ* es el volumen de la solución del fármaco en el lumen intestinal, ya que la absorción y secreción de agua durante la perfusión puede introducir errores in la concentración del mismo dentro del lumen del segmento intestinal, y por lo tanto en, la absorción calculada.

Se han publicado varios métodos para corregir el del flujo del agua, incluyendo la coperfusión de un marcador no absorbible como el rojo de fenol, la inulina o el  $^{14}C$  PEG 4000.

$$C_{sal}^{corregida} = \frac{[Concentración\ Marcador_{in}]}{Concentración\ Marcador_{sal}} \quad (18)$$

$$C_{sal}^{corregida} = C_{sal} \frac{Q_{sal}}{Q_{in}} \quad (19)$$

En la técnica SPIP, la determinación de la absorción y secreción de agua se refiere al flujo neto de agua (NWF), y es importante para el cálculo de la permeabilidad. Por lo general, un marcador no absorbible como el rojo de fenol o un compuesto radiactivo  $^{14}\text{C}$  polyetilenglicoles se utilizan para el cálculo del NWF.

También se puede aplicar un método gravimétrico para corregir la concentración de las muestras de perfusión recolectadas desde el extremo distal del segmento intestinal.

Este método consiste en la determinación del peso del perfundido intestinal recogido en un determinado periodo de tiempo y su conversión a un parámetro volumérico. Luego se corrige el volumen de la solución del fármaco que ingresa y que sale del segmento intestinal para calcular el coeficiente de permeabilidad efectivo ( $P_{\text{eff}}$ ).

Como aproximación para el cálculo del NWF este método asume que la densidad de las soluciones del perfundido intestinal que ingresan y que salen del intestino es 1,0 g/ml. Sin embargo, la contribución de la erosión de la célula y el mucus pueden alterar significativamente la densidad del perfundido, y la asunción de un valor de densidad 1 g/ml puede introducir errores en los cálculos. Tales errores subsecuentemente pueden introducir variabilidad en la estimación de  $P_{\text{eff}}$ .

Este problema se espera que sea mayor en el caso de fármacos poco permeables, las cuales tienen por sí una permeabilidad variable.

$$C_{sal}^{corregido} = C_{sal} \frac{Q_{sal}}{Q_{in}} \quad (20)$$

Densidad 1 g/ml

$$Q_{sal} = \frac{\text{peso neto}}{t_{\text{min}}} \quad (21)$$

Densidad  $\neq$  1 g/ml

$$Q_{sal} = \frac{\frac{\text{peso}}{\delta_{\text{perfundido}}}}{\text{tiempo}} \quad (22)$$

### 16.6.5 Correlación entre los valores de $P_{eff}$ determinados *in situ* con la absorción intestinal en humanos

Para demostrar la idoneidad de un método de permeabilidad destinado a la aplicación del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB), debe establecerse una relación de importancia-orden entre los valores de los ensayos de permeabilidad y el grado de los datos de absorción del fármaco en sujetos humanos usando un número suficiente de fármacos modelos.

La FDA<sup>14</sup> sugiere un listado de veinte fármacos modelos para establecer la correlación entre los valores de  $P_{eff}$  obtenidos de los experimentos *in situ* en animales con los valores de fracción absorbida de los fármacos en humanos, mientras que recomienda seis fármacos modelos cuando los mismos se realizan en humanos.

Esta relación debe permitir la diferencia precisa entre las sustancias medicamentosas con atributos de permeabilidad intestinal baja y alta.

Para demostrar la idoneidad de un método, los fármacos modelos deben representar un rango de absorción que incluya baja (por ejemplo, <50%), moderada (por ejemplo, 50-89%) y alta ( $\geq 90\%$ ) y deben evaluarse a concentraciones clínicamente relevantes (Figura 3).

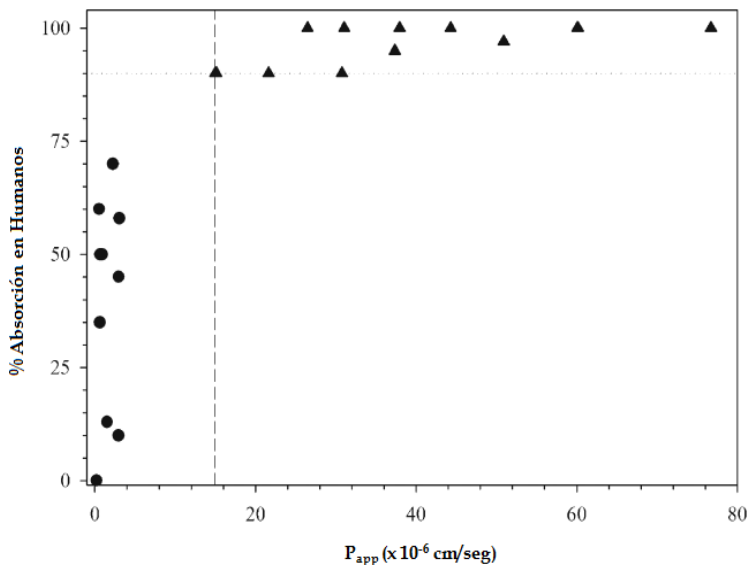


Figura 3. Demostración de la adecuabilidad del método.

Los patrocinadores pueden seleccionar los compuestos de la lista de los fármacos y/o sustancias químicas proporcionada en la Tabla 2 propuesta por la FDA o pueden decidir seleccionar otros medicamentos para los cuales hay información disponible en el mecanismo de absorción y cálculos confiables del grado de absorción de medicamentos en humanos.

Tabla 2. Listado de fármacos estándares propuestos por la FDA.

FÁRMACO	CLASE DE PERMEABILIDAD
Antipirina	Alto (Candidato Potencial PI)
Cafeína	Alto
Carbamazepina	Alto
Fluvastatina	Alto
Ketoprofeno	Alto
Metoprolol	Alto (Candidato Potencial PI)
Naproxeno	Alto
Propranolol	Alto
Teofilina	Alto
Verapamilo	Alto (Candidato Potencial SS)
Amoxicilina	Bajo
Atenolol	Bajo
Furosemida	Bajo
Hidroclorotiazida	Bajo
Manitol	Bajo (Candidato Potencial SS)
Metildopa	Bajo
Polietilenglicol (400)	Bajo
Polietilenglicol (1000)	Bajo
Polietilenglicol (4000)	Bajo (marcador de permeabilidad cero)
Ranitidina	Bajo



## 16.7. Conclusión

Frecuentemente se utiliza la técnica de perfusión intestinal de un solo paso *in situ* en roedores (ratas o conejos) para estudiar la permeabilidad y cinética de absorción de los fármacos. La mayor ventaja de un sistema *in situ* es la presencia de un suplemento sanguíneo y nervioso intacto en los animales de experimentación. Esta metodología muy exacta para predecir la permeabilidad de fármacos transportados en forma pasiva, sin embargo, se debe usar un factor de escalado para predecir la permeabilidad de fármacos que son transportados en forma activa a través de un transportador.

Los experimentos *in situ* para estudiar la absorción intestinal de un fármaco consisten en la perfusión de la solución del fármaco preparada en un buffer fisiológico a través de un segmento intestinal canalizado. La absorción se establece en base a la desaparición del fármaco desde el lumen del intestino. La hidrodinámica del flujo del buffer a través del segmento intestinal puede influenciar las características de absorción de los fármacos debido al efecto de la capa de agua estática (ABL) sobre la superficie de la mucosa intestinal. En esta técnica la diferencia en la concentración del flujo de ingreso y de salida se usa para calcular la permeabilidad. La presencia de un suplemento sanguíneo intacto, nervioso, y capacidad de clearance en el sitio de absorción conduce a un sistema experimental excelente que refleja las condiciones *in vivo*. También, el ingreso de compuestos se puede controlar con respecto a la concentración, pH, velocidad de flujo, región intestinal, etc.

A pesar de sus ventajas, el uso del método de perfusión intestinal de paso simple está severamente limitado ya que este método se fundamenta en la desaparición del fármaco desde el sitio luminal del intestino como un indicador de su absorción, pero la velocidad de disminución de la concentración en el perfundido no representa siempre la velocidad de absorción del fármaco hacia la circulación sistémica (especialmente para fármacos que sufren metabolismo presistémico o luminal).

Este método también está limitado por su costo, ya que requiere un gran número de animales para conseguir datos de absorción significativamente estadísticos. Además, la manipulación quirúrgica del intestino combinada con la anestesia puede causar un cambio significativo en el flujo sanguíneo del intestino y tener un efecto importante en la velocidad de absorción del fármaco.

---

<sup>1</sup> Veber, D.F., Jonson, S.R., Cheng, H.Y., Ward, K.W., “Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates”. *Journal of Medicinal Chemistry* 2002, 45(12), 2615-2623

<sup>2</sup> Griffin, B. ; O’Driscoll, C. (2008). *Drug absorption studies. In situ, in vitro and in silico models*. Springer, Los Angeles, USA, parte 1, capítulo 2 : Models of the small intestine, pp. 35-65

<sup>3</sup> Dahan, A., Lennernäs, H., Amidon, G.L. “The fraction dose absorbed, in humans, and high jejunal human permeability relationship”. *Molecular Pharmaceutics* 2012, 9(6), 1847-1851

<sup>4</sup> Lennernäs, H. (1998). “Human jejunal permeability”. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 87, N<sup>o</sup>4, 403-410

<sup>5</sup> Ni, P.F. ; Ho, N.F. ; Higuchi, W.I. “Theoretical model studies of intestinal drug absorption 5. Non-steady-steady-state fluid flow and absorption”. *International Journal of Pharmaceutics* 1980, 5, 33-48

<sup>6</sup> Cao, X. ; Gibbs, S.T. ; Fang, L. ; Miller, H.A. ; Landowski, C.P. ; Shin, H-C. ; Lennernäs, H. ; Zhong, Y. ; Amidon, G.L. ; Yu, L.X. ; Sun, D. “Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model”. *Pharmaceutical Research* 2006, 23 (8), 1675-1686

<sup>7</sup> Zhiqiang Luo, Y.L., Baosheng, Z., Mingmin, T., Honghuan, D., Lei Z., Beiran, L., Li, W. “Ex vivo and in situ approaches used to study intestinal absorption”. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2013, 68, 208-216

<sup>8</sup> Volpe, D.A. Application of method suitability for drug permeability classification. *AAPS Journal* 2010, 12 (4), 670-678

<sup>9</sup> Anderson, B.W. ; Levine, A.S. ; Levitt, D.G. ; Kneip, J.M., Levitt, M.D. “Physiological measurement of luminal stirring in perfused rat jejunum”. *American Journal of Physics* 1998, 254, G843-G848

<sup>10</sup> Yuasa, H. ; Matsuda, K. ; Watanabe, J. “Influence of anesthetic regimens on intestinal-absorption in rats”. *Pharmaceutical Research* 1993, 10, 884-888

<sup>11</sup> Ueda, S., Yamaoka, K., Nakagawa, T.. “Effect of phenobarbital anaesthesia on intestinal absorption and hepatic first-pass metabolism of oxacillin in rats, evaluated by portal-systemic concentration difference”. *Journal of Pharmacy and pharmacology* 1999, 51, 585-589

<sup>12</sup> Sutton, S.C. ; Rinaldi, M.T.S. (2001). “Comparison of the gravimetric, phenol red, and 14C-PEG-3350 methods to determine water absorption in the rat single-pass intestinal perfusion model”. *AAPS PharmSci*, 3 (3), 1-5

<sup>13</sup> Issa, C. ; Gupta, P. ; Bansal, A.K. “Implications of density correction in gravimetric method for water flux determination using rat single-pass

---

intestinal perfusion technique: A technical note." *AAPS PharmSciTech* 2003, 4 (2), Article 16, 1-6

<sup>14</sup> CDER/FDA, Guidance for industry: "Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalences studies for immediate release dosage forms based on a biopharmaceutical classification system": Center for Drug Evaluation and Research : 2000

# 17. Perfusión *in situ* sin recirculación

Isabel Lozoya-Agullo<sup>a,b</sup>, Marta Gonzalez-Alvarez<sup>a</sup>, Isabel Gonzalez-Alvarez<sup>a</sup> y Marival Bermejo<sup>a</sup>

*a Departamento de Ingeniería, Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad Miguel Hernández de Elche.*

*b Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Valencia.*

## 17.1 Introducción

La técnica de perfusión *in situ* sin recirculación permite calcular la constante de absorción de fármacos a través del tracto gastrointestinal del animal anestesiado o tramos del mismo. Esta técnica fue descrita por Doluisio y colaboradores<sup>1</sup>, y supuso una mejora, respecto a las técnicas *in situ* existentes para calcular la constante de absorción de los fármacos a través del tracto gastrointestinal en ratas.

En el año 1969 existían diversas técnicas para estudiar la absorción gastrointestinal: Brodie y colaboradores empleaban una técnica *in situ* en ratas para determinar el equilibrio entre las concentraciones de fármaco en sangre y en el lumen intestinal, mediante inyección simultánea del fármaco en el torrente sanguíneo y la perfusión de disoluciones de fármaco a través del intestino<sup>2</sup>.

Otros autores como Schanker o Kakemi<sup>2</sup>, estudiaron la dinámica del proceso de absorción midiendo la desaparición a partir de disoluciones de perfusión gástrica o intestinal mediante experimentos de un solo paso o experimentos de circulación.

Perfusión de un solo paso: la disolución de fármaco se perfunde a través de un tramo intestinal y se determina la concentración entrante y saliente. La diferencia entre ambas concentraciones se asume como concentración absorbida en ese tramo intestinal. Se supone que la absorción sigue una cinética de primer orden.

Experimentos de circulación en los que se determina la disminución de concentración de fármaco en la disolución circulante. Este método tiene el inconveniente que el volumen de perfusión debe de ser mucho mayor que el volumen de la luz intestinal.

Otros investigadores intentaron estudiar la absorción gastrointestinal con técnicas *in vitro* usando segmentos aislados de intestino. Pero estos segmentos carecen de suministro sanguíneo, lo cual es un inconveniente importante.

A pesar de que se aprendió mucho sobre el proceso de absorción de fármacos mediante experimentos que utilizaban las técnicas mencionadas anteriormente, ninguna técnica o combinación de ellas permitía al investigador hacer algo más que comparar el valor de permeabilidad entre los compuestos respecto a las tasas de absorción orales. Además, en la mayoría de preparaciones *in situ* las constantes aparentes de velocidad de absorción eran relativamente lentas; mientras que en humanos y animales intactos la absorción de fármacos calculada con datos plasmáticos era muy rápida.

## 17.2 Ventajas e inconvenientes

La principal ventaja del método de Doluisio es que permite calcular constantes de velocidad de absorción comparables con las obtenidas a partir de datos de concentración plasmática tras la administración oral de un fármaco. Además, la técnica experimental es sencilla, el material necesario es barato y se dispone de él fácilmente, un solo animal produce datos experimentales suficientes para el análisis de la cinética de absorción, la variación de los resultados cinéticos entre animales es mínima y el tiempo requerido para llevar a cabo el experimento no es mucho (de 45 a 60 minutos, cirugía y toma de muestras).

Con este método se mantienen las características propias de la realidad fisiológica en el animal completo, como puede ser la capa de mucus y la presencia de los movimientos peristálticos o de las secreciones intestinales. Pero como todos los modelos animales, conlleva problemas éticos, logísticos y económicos. Las condiciones hidrodinámicas son distintas de los ensayos *in vivo*, por lo que las estimaciones de los valores de permeabilidad para los compuestos de baja lipofilia son menos precisos.

Otra limitación es que la permeabilidad intestinal se calcula a partir de las concentraciones remanentes en el lumen intestinal, por ello es necesario comprobar que la desaparición se produce únicamente por absorción y no por degradación o metabolismo.

En el tracto gastrointestinal, tiene lugar un proceso de reabsorción de agua paralelo al de absorción del fármaco. En algunos casos supone la reducción de más del 10% del volumen al finalizar el ensayo de absorción, sigue una cinética de orden cero y es necesario tenerlo en cuenta para el cálculo adecuado de la permeabilidad intestinal. Como parámetro representativo del proceso de absorción se calcula la constante aparente de velocidad de absorción,  $k_a$ , que lleva implícita la superficie intestinal. Para poder comparar los resultados obtenidos "*in situ*" en intestino delgado con los obtenidos "*in vitro*" en líneas celulares deben transformarse los valores de  $k_a$  en permeabilidades.

## 17.3 Acondicionamiento

### 17.3.1 Instalaciones

Una instalación para animales de laboratorio (bioterio, animalario o estabulario) debe facilitar la investigación mediante la disminución de variables experimentales imprevistas, mientras provee todos los requerimientos fisiológico, sociales y de comportamiento del animal.

Las funciones de estos centros van, desde la producción de reactivos biológicos de alta calidad, hasta el mantenimiento de especies o cepas no producidas en sus instalaciones. En ellos se debe evitar la intromisión de animales y personas incontroladas y llevar una permanente vigilancia de las poblaciones, garantizando la constitución genética y el perfecto estado sanitario. Sirven de suministrador a los investigadores y/o mantienen los animales en fase experimental, asesorando a otros centros productores o a los usuarios. En ellos se puede realizar la centralización de otros elementos relacionados con el animal (material y equipamiento) y el desarrollo de investigación relacionada con el animal de experimentación, además de la formación y/o especialización de profesionales. Muchos de estos centros actúan como empresas o forman parte de los servicios técnicos de apoyo a la investigación o centros de instrumentación científica de universidades, hospitales, centros de investigación o laboratorios.

## 17.4 Equipamiento y material

Además de rata Wistar, Sprague-Dawgle de peso comprendido entre 250-295 g se necesita el siguiente material:

- Baño a  $37 \pm 0,5$  °C
- Solución de anestesia: Pentobarbital sódico en suero fisiológico.
- Suero fisiológico.
- Disolución del fármaco en “solución B”. Ajustar el pH a 7,00 antes de enrasar.
- Solución B: NaCl.....9 g
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1/15M.....3.9 mL
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1/15M 6.1 mL
- Ajustar pH a 7,00 con NaOH o HCl
- $\text{H}_2\text{O}$  bidestilada.....c.s.p. 1L
- Tubos de vidrio neutro de 25 mL de capacidad
- Tubos para la recogida de muestras
- Pipetas de diferentes volúmenes
- 2 cánulas de vidrio acodadas de unos 3 mm de diámetro interno y 4 mm de diámetro externo
- 2 tubos de polietileno de unos 3 cm de longitud y 4 mm de diámetro interno
- 2 llaves de 3 pasos
- 2 jeringuillas de vidrio con luer-lock de 10 mL de capacidad
- Algodón hidrófilo
- Hilo de seda
- Pinzas de diente ratón
- Pinzas de punta fina
- Tijera quirúrgica
- 2 pinzas de sujeción unidas a soportes verticales

## 17.5 Personal

El personal investigador que diseñe y/o realice la técnica quirúrgica deberá entrar acreditado según la legislación vigente en el país donde se realice el ensayo

## 17.6 Buenas prácticas de trabajo

Siempre que se usen animales en investigación se debe tener en cuenta que su bienestar es muy importante. Además, existen razones éticas, científicas, jurídicas y económicas para asegurar que los animales serán cuidados adecuadamente:

Si el animal sufre estrés y/o dolor podrían verse afectados los resultados del experimento. (razón científica)

A través de normas bioéticas han sido adoptados los principios de las 3 R's:

Reemplazar: sustituir los animales de laboratorio por equivalentes que no empleen animales, es decir, usar métodos alternativos siempre que sea posible. (razón ética)

Reducir el número de animales empleados en la investigación. Usar un número menor de animales resulta más barato y el trabajo se reduce al mínimo. (razón económica)

Refinar: usar procedimientos que minimicen el sufrimiento o la ansiedad de los animales empleados en la experimentación. (razón ética)

Legislación europea: Directiva 86/609/CEE del Consejo de Europa, de 24 de noviembre de 1986, que se complementa con la Resolución 86/C 331/02 (razón jurídica)

Los experimentos deben tener como objetivo el bien del hombre o de la naturaleza.

Evitar todo sufrimiento y ansiedad y paliar el que obligadamente se deba producir.  
Los experimentadores deben estar adecuadamente capacitados.  
No deben existir alternativas al empleo de los animales.  
Obligación de métodos indoloros de eutanasia.  
Debe fomentarse la búsqueda de técnicas alternativas.

Las Buenas Prácticas de Laboratorio son un conjunto de Normativas sometidas a revisiones constantes que tienden a afinar progresivamente en los principios éticos: minimizar el sufrimiento de los animales, disminuir el número empleado y emplear sistemas alternativos igualmente fiables.

CIOMS es una organización científica establecida por la Unesco y la OMS en 1949 que estableció, entre otros, los siguientes principios éticos universales:

El avance del conocimiento, la protección de la salud y/o el bienestar de los hombres y los animales requiere de la experimentación con animales vivos.  
Siempre que sea apropiado usar métodos alternativos (3 R's).  
Realizar experimentación en animales después de estudiar su importancia para la salud humana y animal y para el avance del conocimiento biológico.  
Seleccionar animales de especie y calidad apropiadas.  
Evitar o minimizar las molestias, la angustia y el dolor.  
Los animales que puedan sufrir dolor crónico o severo, angustia, molestia o invalidez, que no puedan ser aliviados, deben ser sacrificados sin dolor.  
Los animales deben tener las mejores condiciones de vida posibles.

## 17.7 Tipos de animales

Los conceptos básicos sobre absorción gastrointestinal de fármacos están basados, en gran medida, en experimentos realizados en ratas<sup>1</sup>. Las razas más empleadas en estudios de absorción son la Wistar y la Sprague-Dawley<sup>78</sup>

### **Wistar**

El investigador Donaldson adquirió cuatro parejas de ratas albinas para el Instituto Wistar de Filadelfia, en EEUU, las cuales dieron origen a la bien conocida estirpe que lleva el nombre de dicha institución.

Actualmente es una de las cepas de ratas más populares utilizadas para la investigación de laboratorio. Se caracteriza por su cabeza ancha, orejas largas, y con una longitud de la cola que es siempre inferior a la longitud de su cuerpo. Es una rata con buena tasa de crecimiento, dócil y fácil de manipular.

### **Sprague Dawley**

El profesor Robert W. Dawley, de Wisconsin, fue quien crió y tipificó la cepa que lleva su apellido al que antepuso el de su esposa Sprague. Esta cepa de rata fue la primera producida por la compañía de animales Sprague Dawley en Madison.

Es una rata albina que procede de una serie de cruces iniciados con un macho de cabeza pigmentada y seis hembras albinas de origen desconocido. La rata Sprague Dawley se utiliza ampliamente en investigación médica, su principal ventaja es su tranquilidad y facilidad de manejo.

## 17.8 Técnica experimental

### Acondicionamiento del animal

El animal se mantiene en ayuno durante un periodo de unas 20 horas, con objeto de que la cantidad de detritus y heces formes sea mínima en lumen intestinal. Durante ese periodo de ayuno al animal se le permite libre acceso al agua para evitar su deshidratación.

### Anestesia del animal

Se procede a pesar al animal y a continuación se calcula el volumen de solución de anestesia que debe administrarse. La dosis necesaria de pentobarbital sódico es 30 mg/kg. Ésta se administra por inyección intraperitoneal. A continuación se espera entre 5 y 10 min, hasta comprobación de pérdida de reflejo parpebral.

### Técnica quirúrgica

A partir de este momento el animal debe mantenerse a una temperatura ambiental de 25°C para evitar que se enfríe ya que, de lo contrario, se podría modificar la perfusión sanguínea y falsear los resultados del ensayo de absorción.

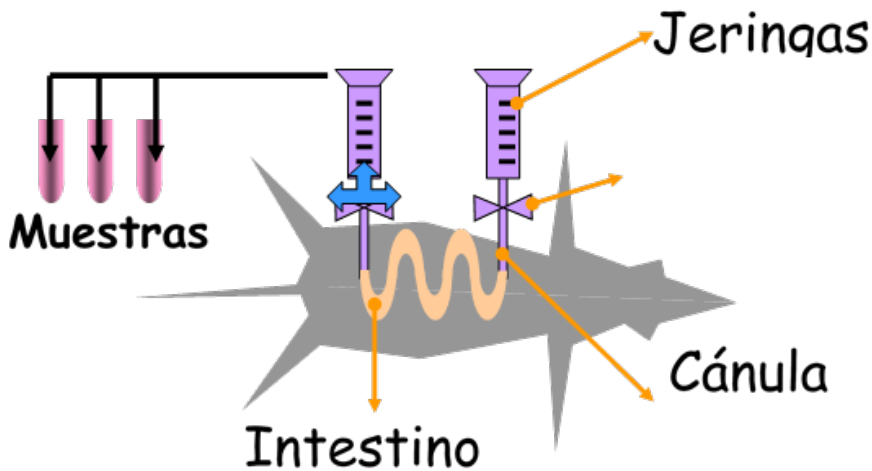


Figura 1. Esquema de la técnica experimental

Se coloca al animal en posición de decúbito supino sobre un tablero quirúrgico y se sujeta las extremidades mediante cinta adhesiva. Con ayuda de unas pinzas de diente de ratón, se hace una incisión longitudinal en la línea alba de la capa muscular abdominal del animal. Para descubrir el paquete abdominal se corta a lo largo de esta línea desde 1 cm por encima del poro genital hasta 1 cm por debajo del apéndice xifoides, evitando lesionar los músculos abdominales y tratando de producir la mínima hemorragia posible.

Se localiza el estómago, a partir del cual empieza el duodeno que es el primer tramo del intestino delgado. En la zona proximal del duodeno, se practica un pequeño corte en bisel. A continuación se introduce una cánula acodada. Esta cánula se sujeta con hilo de seda a la pared intestinal.

Se localiza el conducto biliar y se practica una ligadura con hilo de seda para impedir el paso de la bilis al lumen intestinal.

La cánula se une a una llave de tres pasos mediante un tubo de polietileno. Ésta última se conecta a una jeringa de 10mL de capacidad, que se sujeta mediante una pinza a un soporte vertical. Debe procurarse que la posición de la cánula respete la disposición natural del intestino en la medida de lo posible. La llave de tres pasos permite la correcta realización de los ensayos.



A continuación para aislar el intestino delgado, se localiza el ciego, tramo donde acaba el intestino delgado y empieza el intestino grueso. Se practica, como en el caso anterior, un corte en bisel. Aunque el animal ha sido sometido a 20h de ayuno, siempre quedan restos de quimo en el lumen intestinal, por lo que es necesario proceder al lavado de la zona, haciendo pasar solución A (unos 25 mL aproximadamente, atemperado a 37°C). Debe evitarse el lavado enérgico ya que se podría lesionar la mucosa intestinal. Finalmente se hacen pasar unos 25 mL de la solución B para restaurar el pH intestinal.

Se coloca en esta segunda incisión una cánula de forma similar a la primera. Una vez ligada la cánula con hilo de seda se introduce varias veces aire en el intestino para provocar la salida de los restos de la solución de lavado. Así se evita, en lo posible, la dilución de la solución de perfusión. La cánula se une a una llave de tres pasos y ésta, a su vez, a una jeringa de 10 mL que se sujeta por una pinza a un soporte vertical.

Dado que la cavidad abdominal permanece al descubierto, para evitar la desecación del intestino, se introduce en ella un pequeño volumen de líquido de solución B, atemperado a 37°C, y se cubre la incisión con una torunda de algodón empapado en la misma. Conviene controlar que no se enfríe la cavidad abdominal durante el ensayo, ya que podría disminuir el riego mesentérico. Esto se consigue reponiendo la torunda varias veces.

### **Perfusión y toma de muestra**

Se introduce 10 mL de la solución de perfusión en la jeringa proximal con la llave de tres pasos en posición jeringa-intestino, mientras la llave distal conecta el intestino con el exterior. Así el aire que ocupa el interior del intestino es desplazado por la solución a medida que esta se introduce. Se pone en marcha el cronómetro y se colocan ambas llaves en posición jeringa-exterior con lo que el intestino se convierte en un compartimento estanco ocupado por la solución de perfusión.

A los tiempos de toma de muestra, cada 5 minutos hasta un total de 6 muestras, se toma aire en la jeringa contraria a la de muestreo y seguidamente se colocan las dos llaves en posición jeringa-intestino. Se bombea el aire de la jeringa contraria a la de muestreo mientras en la jeringa que se toma la muestra, se succiona la solución de perfusión. Una vez que se ha extraído todo el volumen posible de la solución se toman 0.25 mL con ayuda de una micropipeta. A continuación se devuelve la solución remanente al interior del intestino; para ello, se coloca la llave en la que se ha cogido la muestra en posición jeringa-intestino y la otra llave en posición intestino-exterior para facilitar la salida de aire. Tras introducir la solución, ambas llaves se colocan en posición jeringa-exterior, convirtiendo de nuevo el intestino en un compartimento estanco.

Las muestras se toman alternativamente por cada una de las jeringas. La primera muestra se toma en la jeringa distal y la última en la jeringa proximal. Las muestras se recogen en tubos adecuados, se centrifugan a 5000 rpm durante 5 minutos para separar la muestra de restos de mucosa. A continuación se conservan de forma adecuada hasta la valoración cuantitativa.

Una vez tomadas todas las muestras, se extrae todo el líquido remanente del intestino. Para ello, se desconecta la cánula de la jeringa distal y se coloca en un tubo de vidrio de 25 mL. La otra cánula se mantiene conectada a la jeringa proximal, con la cual se toma aire y se ejerce presión para forzar la salida del líquido remanente a través de la cánula. Seguidamente, con ayuda de unas tijeras se corta el mesenterio y se separa lentamente el asa intestinal del resto del animal. Una vez aislado el intestino mediante una torunda de algodón húmedo, se presiona ligeramente, de principio a fin y se vacía completamente su contenido en el tubo.

El volumen de líquido recogido se centrifuga durante 5 minutos a 5000 rpm para separar los restos de mucosa que se han podido arrastrar en el vaciado. Tras retirarlos se mide el volumen de líquido recuperado. El volumen remanente al final del ensayo ( $V_f$ ) corresponde a la suma de este volumen más el volumen de las muestras extraídas para la valoración. Para los cálculos posteriores se

emplea como volumen inicial (volumen a tiempo cero,  $V_0$ ) 10,7 mL. Por último se comprueba al final del ensayo el pH de la solución recogida.

## 17.9 Aplicaciones de los ensayos *in situ*

### 17.9.1 Determinación de la permeabilidad intestinal y mecanismos de transporte,

Gracias a esta metodología podemos conocer parámetros fundamentales en el desarrollo de cualquier fármaco como la constante aparente de velocidad de absorción, la permeabilidad y los mecanismos implicados en el transporte de la molécula.

La constante aparente de velocidad de absorción ( $K_{ap}$ ) se obtiene mediante ajuste por regresión no lineal a la siguiente ecuación:

$$C = C_0 \cdot e^{-K_{ap} \cdot t} \quad (1)$$

donde C es la concentración de fármaco a tiempo t y  $C_0$  corresponde a la concentración inicial de fármaco disponible para la absorción ( $t=0$ ).

Para obtener un valor representativo de la constante de velocidad de absorción, el ensayo se realiza en un mínimo de seis animales para cada concentración ensayada. Con esto se obtiene un valor medio que es característico de las condiciones del ensayo.

Es posible determinar los valores de permeabilidad intestinal efectiva ( $P_{eff}$ ) por transformación de la constante aparente de velocidad de absorción según la ecuación:

$$P_{eff} = \frac{K_{ap} \cdot R}{2} \quad (2)$$

Donde R es el radio del segmento intestinal donde se ha perfundido la disolución a ensayar.

Para poner en evidencia la existencia o no de transportadores implicados en el mecanismo de absorción de un compuesto, hay que diseñar un estudio en el que se determine la permeabilidad a diferentes concentraciones de compuesto. La comparación estadística de las constantes aparentes de velocidad de absorción obtenidas con las distintas concentraciones ensayadas permite poner de manifiesto la presencia o no de un transporte activo y saturable, pues la presencia de diferencias estadísticamente significativas nos indica que existen transportadores implicados en la absorción.

### 17.9.2 Estudios de mecanismos de inhibición.

Se puede evaluar la capacidad que tienen ciertos inhibidores de provocar una menor absorción, y por tanto disminuir la permeabilidad del fármaco, a través de fenómenos inhibitorios.

Para ello se debe adicionar una cantidad adecuada de inhibidor a una concentración de compuesto que no provoque la saturación de los transportadores. Una vez finalizado el ensayo se comparan estadísticamente los resultados obtenidos entre el fármaco en solución libre y el fármaco adicionado de inhibidor.

### 17.9.3 Detección de ventanas de absorción.

Una vez obtenida la evidencia experimental de la presencia de un proceso no lineal, es decir, presencia de transportadores, se podrían realizar ensayos de absorción en los diferentes tramos fisiológicos del intestino delgado de la rata.

El objetivo de estos ensayos es caracterizar la zona de absorción con niveles mayores de expresión del transportador, lo que se conoce como determinar la presencia de ventanas de absorción.

Para ello se efectuarían ensayos en duodeno, considerando como tal la zona comprendida entre el píloro y el ligamento de Treitz (longitud aproximada 10 cm), en yeyuno tomando 45 cm desde el ligamento de Treitz y en íleon, caracterizado como los 45 cm previos a la válvula íleo-cecal. Por último se realizan también ensayos en colon que se aísla desde el ciego a la zona rectal (aproximadamente 10 cm).

## 17.9.4 Correlaciones<sup>11,12</sup>

Esta técnica experimental también permite establecer correlaciones a partir de datos previamente publicados.

Para poder establecer correlaciones se debe aislar el componente pasivo del proceso de absorción, siempre y cuando sea posible ya que hay compuestos en los que no se consigue aislar.

- Correlaciones *in situ-in vitro*:
- Calcular la permeabilidad en rata usando la permeabilidad *in vitro*.
- Correlaciones fracción absorbida-*in situ*:
- Estimar la fracción absorbida en humanos basándose en la permeabilidad intestinal en rata.
- Correlaciones biodisponibilidad- $K_a$  *in situ*:
- Permite calcular la biodisponibilidad *in vivo* usando las constantes de absorción calculadas *in situ*.
- Correlaciones *in situ*-lipofilia:
- Permite calcular la absorción (permeabilidad) a partir de la lipofilia de los compuestos.

## 17.10 Factores que afectan a la técnica experimental

### 17.10.1 Factores pre-experimentales

Entre los factores pre-experimentales en rata que conducen a la obtención de medidas de permeabilidad diferentes para un mismo fármaco están la raza y el sexo. Otro aspecto a tener en cuenta es el estado nutricional del animal, ya que en ciertos compuestos se puede modificar la absorción y la permeabilidad debido a la desnutrición<sup>13</sup>.

Además, existen otros factores que pueden alterar al animal y afectar a los resultados. Éstos pueden ser biológicos y no biológicos<sup>4</sup>.

Factores biológicos: aire, agua, alimento, contaminación ambiental, personal trabajador, presencia de insectos y parásitos en el estabulario.

Factores no biológicos: diseño del estabulario, clima, temperatura, humedad, luz, ruido, jaulas.

## 17.10.2 Factores experimentales

Con las técnicas *in situ*, el aporte neural, endocrino, sanguíneo y linfático de la zona en estudio permanece intacto. Estos modelos son, por tanto, sensibles a influencias farmacológicas y fisiológicas, por lo que se observa una gran variabilidad en comparación con los sistemas *in vitro*.

Esta técnica *in situ* sin recirculación, basada en el método de Doluisio, puede llevarse a cabo en intestino completo o en tramos intestinales, creando un compartimento estanco de absorción, donde se observa cómo va desapareciendo el fármaco del lumen intestinal. Dependiendo de la zona elegida para realizar el experimento, puede haber diferencias en los datos de permeabilidad obtenidos para un mismo compuesto.

Las muestras se toman cada 5 minutos alternando las jeringas del compartimento estanco, durante 30 minutos. Por lo que cualquier error en el montaje experimental o en la toma de muestras, también puede afectar a los valores de permeabilidad.

## 17.10.3 Factores post-experimentales

Existe un proceso de reabsorción de agua simultáneo al proceso de absorción de la sustancia ensayada de modo que la solución remanente en lumen se concentra<sup>14</sup>. Este proceso puede falsear por exceso el valor de la concentración remanente en lumen, sobre todo en las últimas muestras (25 y 30 min).

Con el fin de estimar las concentraciones reales de compuesto se calculó el volumen remanente a cada tiempo de toma de muestra. Dado que el volumen varía según una cinética de orden cero, la ecuación diferencial representativa del proceso es<sup>15</sup>:

$$\frac{dV}{dt} = -k_0 \quad (3)$$

Su forma integrada es:

$$V = V_0 - k_0 \cdot t \quad (4)$$

en la que V es el volumen remanente en el intestino a cada tiempo,  $V_0$  es el volumen remanente a tiempo inicial y  $k_0$  representa la constante de velocidad de reabsorción de agua (ml/min).

Mediante regresión lineal por mínimos cuadrados de los volúmenes obtenidos, se obtienen los parámetros  $V_0$  como ordenada en el origen y  $k_0$  como pendiente. Estos parámetros permiten determinar los volúmenes teóricos para cada tiempo de toma de muestra ( $V_t$ ), y con ellos se corrigen los valores experimentales de las concentraciones de soluto en las muestras, utilizando la ecuación:

$$C = E \cdot \frac{V_t}{V_0} \quad (5)$$

en la que C corresponde a la concentración de soluto corregida y E es la concentración obtenida experimentalmente.

## 17.11 Cálculo de la permeabilidad intestinal

Las muestras obtenidas tras aplicar la técnica *in situ* sin recirculación se someten a un procedimiento analítico, normalmente cromatografía líquida de alta resolución, para poder determinar la concentración de compuesto estudiado que existe en cada muestra.

Una vez conocidas las concentraciones se calcula la constante aparente de velocidad de absorción ( $K_{ap}$ ) mediante ajuste por regresión no lineal a la siguiente ecuación:

$$C = C_0 \cdot e^{-K_{ap} \cdot t} \quad (6)$$

donde C es la concentración de fármaco a tiempo t y  $C_0$  corresponde a la concentración inicial de fármaco disponible para la absorción ( $t=0$ ).

Conociendo  $K_{ap}$  es posible determinar los valores de permeabilidad intestinal efectiva ( $P_{eff}$ ) por transformación de la constante aparente de velocidad de absorción según la ecuación:

$$P_{eff} = \frac{K_{ap} \cdot R}{2} \quad (7)$$

Donde R es el radio del segmento intestinal donde se ha perfundido la disolución a ensayar.

---

<sup>1</sup> Doluisio JT, Billups HF, Dittert LW, Sugita ET, Swintosky JV. Drug absorption. I: An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J Pharm Sci* 1969, 1196-2000

<sup>2</sup> Schanker L., Tocco D., Brodie B. and Hogben C. Absorption of drugs from the rat small intestine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1958, 123:81-88.

<sup>3</sup> Bermejo M., Ruiz-García A. Oral permeability predictions, from In Silico to In Vivo models

<sup>4</sup> Giráldez Dávila A., Zúñiga, JM. La ciencia del animal de laboratorio y el procedimiento experimental. *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. Madrid:McGraw-Hill, 2001, 3-22

<sup>5</sup> Pardo A, Ética de la experimentación animal. Directrices legales y éticas contemporáneas, Cuaderno Bioética XVI, 2005/3<sup>a</sup>

<sup>6</sup> Russel W, Burch R, "The principles of humane animal experimental techniques", 1959

<sup>7</sup> Varma VSM, Panchagnula R. Prediction of in vivo intestinal absorption enhancement on P-Glycoprotein inhibition, from rat in situ permeability. *J Pharm Sci* 2005, 1694-1704

<sup>8</sup> Kim JS, Mitchell S, Kijek P, Tsume Y, Hilfinger J, Amidon GL. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: utility for BCS Class I biowaiver requests. *Mol Pharm* 2006; 3 (6): 686-694.

<sup>9</sup> Moll-Navarro MJ, Merino M, Casabó VG, Náchter A, Polache A. Interaction of taurine on baclofen intestinal absorption: a nonlinear mathematical treatment using differential equations to describe kinetic inhibition models. *J Pharm Sci* 1996; 85: 1248-54

<sup>10</sup> González-Alvarez I, Fernández-Teruel C, Casabó-Alós VG, Garrigues TM, Polli JE, Ruiz-García A, Bermejo M. [In situ kinetic modelling of intestinal efflux in rats: functional characterization of segmental differences and correlation with in vitro results](#). *Biopharm Drug Dispos.* 2007, 229-239.

<sup>11</sup> Gonzalez-Alvarez I, Gonzalez-Alvarez M, Oltra-Noguera D, Merino V, Tökési N, Ovádi J, Bermejo M. [Unique pharmacology of KAR-2, a potential anti-cancer agent: absorption modelling and selective mitotic spindle targeting](#). *Eur J Pharm Sci.* 2009 Jan 31;36(1):11-19.

<sup>12</sup> Rodríguez-Berna G, Cabañas MJ, Mangas-Sanjuán V, Gonzalez-Alvarez M, Gonzalez-Alvarez I, Abasolo I, Schwartz S Jr, Bermejo M, Corma A. [Semisynthesis, cytotoxic activity, and oral availability of new lipophilic 9-substituted camptothecin derivatives](#). *ACS Med Chem Lett.* 2013 May 28;4(7):651-655

<sup>13</sup> Catalán-Latorre A, Náchter A, Merino V, Jiménez-Torres NV, Merino M. In Situ Study of the Effect of Naringin, Talinolol and Protein-Energy Undernutrition on Intestinal

---

Absorption of Saquinavir in Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2011; 109: 245–252

<sup>14</sup> Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 2001; **11**: 1156-66.

<sup>15</sup> Martin-Villodre A, Pla-Delfina JM, Moreno J *et al.* Studies on the reliability of a bihyperbolic functional absorption model. I. Ring-substituted anilines. *J Pharmacokinet Biopharm* 1986; 14: 615-633.

# **18. Sección Permeabilidad: Estudios de balance de masas y estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia. Método de canulación de la vena yugular en rata.**

Matilde Merino Sanjuán<sup>a,b</sup>, Ana Catalán Latorre<sup>a,b</sup>, Virginia Merino Sanjuán<sup>a,b</sup>

*a Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.*

*b Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico. Unidad Mixta Universidad Politécnica de Valencia-Universidad de Valencia, España*

## **18.1 Introducción**

Actualmente los medicamentos utilizados en clínica son seguros y eficaces gracias, en parte, a que en el complejo proceso que transcurre desde el descubrimiento de las moléculas candidatas a fármacos hasta el desarrollo de medicamentos se realizan numerosos ensayos que permiten obtener el conocimiento necesario para seleccionar tanto la formulación farmacéutica como la vía de administración más idóneas. Para alcanzar este objetivo, desde todos los estamentos, tanto públicos (Universidades, Industria, Hospitales y Agencias reguladoras) como privados que, de una u otra manera, se implican en el proceso de investigación y desarrollo de medicamentos se invierte un gran esfuerzo destinado a evaluar los resultados que generan diferentes estudios encaminados a conocer el modo y los mecanismos por los que, tras la administración de un medicamento al organismo, el fármaco alcanza la circulación sistémica y se desencadena la respuesta, terapéutica y tóxica, del organismo al fármaco y a sus metabolitos. Entre estos estudios tiene especial protagonismo la evaluación farmacocinética de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) de los fármacos así como los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia, éstos últimos diseñados, en general, para comparar dos o más formulaciones del mismo fármaco.

La caracterización de los procesos ADME de los medicamentos se realiza utilizando modelos experimentales *in silico*, *in vitro*, *in situ* y/o *in vivo*, cuya selección se fundamenta, según la fase concreta del proceso de desarrollo de medicamentos, en los objetivos del estudio.

En este capítulo se realiza un análisis de los estudios de balance de masa y de los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia. Se describe el objetivo, el diseño y el análisis de resultados de ambos estudios así como la importancia de los resultados obtenidos en la fase de registro de nuevos medicamentos. Por último se realiza una descripción detallada de un modelo experimental *in vivo* basado en la canulación permanente de la vena yugular de rata con el objetivo de obtener muestras de sangre de los animales en tiempos preestablecidos sin necesidad de recurrir a la anestesia del animal en cada toma de muestra. De este modo es posible disponer de las muestras experimentales necesarias para construir las curvas de concentración plasmática-tiempo del fármaco y sus metabolitos después de la administración del fármaco en régimen de dosis única o en régimen de dosis múltiple. Además cuando se dispone a los animales en jaulas metabólicas es posible recoger la orina y construir las curvas de excreción urinaria del fármaco y sus metabolitos que, junto con las anteriores, constituyen los datos experimentales que permiten caracterizar el perfil farmacocinético de medicamentos y/o abordar los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia en modelos de experimentación animal.

## **18.2 Estudios de balance de masa**

### **18.2.1 Objetivo**

El objetivo principal de los estudios de balance de masas es caracterizar el perfil farmacocinético de los medicamentos. En la actualidad, entre los métodos disponibles para alcanzar este objetivo, los estudios de balance de masas son los que proveen información más exhaustiva en relación con las vías metabólicas, las vías de excreción, las características de distribución y la exposición del organismo al fármaco y a sus metabolitos.

Tradicionalmente, el estándar de práctica de estos estudios se ha caracterizado por la administración de los fármacos marcados radiactivamente ya que de este modo se facilita la cuantificación analítica en los fluidos biológicos, tanto del fármaco como de sus metabolitos. Entre los isótopos radiactivos más utilizados para marcar a los



fármacos objeto de estudio se encuentran el  $^{14}\text{C}$  (Carbono 14),  $^3\text{T}$  (tritio) y  $^{35}\text{S}$  (Sulfuro 35). Sin embargo, la toxicidad inherente al uso de estas sustancias hace necesario que se propongan métodos alternativos que permitan la administración de fármacos no marcados.

Los estudios de balance de masas pueden realizarse tanto en animales de experimentación como en humanos. Prácticamente para la totalidad de moléculas candidatas a fármacos se requiere disponer de estos ensayos realizados en humanos antes de iniciar los ensayos clínicos en fase III. No obstante, existen algunas situaciones particulares en las que resulta innecesario disponer de estos estudios en humanos. Por ejemplo, cuando el fármaco se metaboliza en muy baja proporción, es un derivado mimético de una sustancia endógena, se utiliza únicamente en pacientes terminales o está indicado para el tratamiento de enfermedades para las que no se dispone de alternativa terapéutica.

## **18.2.2 Diseño de los estudios**

Existen varios aspectos a tener en cuenta en el diseño de los estudios de balance de masas, entre ellos el diseño experimental, la selección y preparación de la dosis, la selección de los tiempos de obtención de muestras experimentales y la cuantificación analítica del fármaco y sus metabolitos en los fluidos biológicos.

### **18.2.2.1 Diseño experimental**

Los estudios de balance de masa pueden realizarse tras la administración del fármaco en dosis única o en régimen de dosis múltiple. En humanos, por razones de seguridad, en la mayoría de los casos se realizan tras la administración del fármaco en dosis única, ya que en general el fármaco administrado está marcado con un isótopo radiactivo. Además, por la misma razón, el número de sujetos incluidos en el estudio es siempre limitado, en general inferior a 6 no siendo nunca superior a 8.

Los sujetos que participan en el estudio pueden ser voluntarios sanos o grupos de población de pacientes. Su selección está condicionada por las características del fármaco. En general, cuando los fármacos se administran a una dosis segura y se detectan fácilmente en las muestras biológicas participan en el estudio voluntarios sanos. Sin embargo, cuando se trata de evaluar fármacos que son tóxicos a las dosis administradas, por ejemplo fármacos utilizados para el tratamiento del SIDA o del cáncer, se incluyen en el estudio los pacientes de la población específica.

La elección de la vía de administración del fármaco se realiza de acuerdo con las características del fármaco y puede ser cualquiera de las vías de administración de fármacos habituales: intravenosa, intramuscular, oral, tópica (percutánea), o, en más raras situaciones, por inhalación.

### **18.2.2.2 Selección y preparación de la dosis**

La selección de la dosis de fármaco debe realizarse de acuerdo con el perfil de eficacia y seguridad de la molécula y con la sensibilidad de las técnicas analíticas disponibles. De forma óptima, el estudio debe diseñarse para maximizar los aspectos cuantitativos del fármaco y minimizar el riesgo asociado a su administración.

Para la selección de las dosis administradas a humanos se utilizan los datos obtenidos en estudios preclínicos realizados en animales, generalmente ratas, a partir de los cuales se realiza el escalado de dosis correspondiente. En cualquier caso, la dosis seleccionada está estrechamente relacionada con la información de la molécula disponible en el momento de la realización del estudio. Así, cuando el estudio de balance de masas se realiza en una fase temprana del desarrollo de fármacos, y únicamente se dispone de información procedente de los ensayos clínicos de seguridad fase I las dosis seleccionadas son en general muy pequeñas. Sin embargo, cuando el estudio de balance de masas se realiza en una fase más tardía del proceso de desarrollo del fármaco, en la que ya se dispone de mayor información sobre la toxicidad de la molécula, la dosis seleccionada puede ser mayor.

En los estudios de balance de masas la selección de la dosis es una decisión muy importante, tanto si se utiliza el fármaco marcado radiactivamente como si se utiliza el fármaco no radiactivo. Se trata de un paso decisivo y no está exento de riesgos. Si la dosis administrada es demasiado elevada el estudio plantea el inconveniente de que para garantizar la descripción completa del perfil farmacocinético es necesario mantener la recogida de muestras de plasma, orina y heces durante periodos de tiempo prolongados, pero además puede comprometer la seguridad de los individuos que participan en el estudio. En caso contrario, si la dosis administrada es muy pequeña, la falta de sensibilidad de la técnica analítica puede limitar la detección y cuantificación del fármaco y/o de todos sus metabolitos. Éste último aspecto puede llegar incluso a ser motivo para invalidar el estudio.

Cuando se utilizan los fármacos marcados radiactivamente la preparación de la dosis se realiza habitualmente en el entorno donde se desarrolla el ensayo. En general el fármaco está disponible en estado sólido, en forma de polvo, y se reconstituye en el

momento de su administración. En algunas ocasiones se dispone del fármaco en solución para su dilución y posterior administración. En este último caso, es conveniente reservar una alícuota de la disolución administrada para confirmar la dosis administrada así como realizar el contaje de radiactividad en caso de que se hubiera administrado el fármaco marcado. Una vez realizada la administración, los recipientes utilizados para administrar la solución o la suspensión de fármaco deben lavarse de forma repetida para asegurar que los individuos reciben la dosis completa.

### **18.2.2.3 Obtención de muestras experimentales**

Las matrices biológicas habitualmente recogidas para realizar estos estudios son sangre, orina y heces. En ocasiones limitadas también se recogen muestras de saliva o se determina el dióxido de carbono en el aire expirado. Asimismo, según la indicación del fármaco, también puede ser importante obtener muestras de bilis o de fluido cerebroespinal.

Los tiempos para la obtención de las muestras biológicas se seleccionan utilizando como guía los resultados de los estudios farmacocinéticos del fármaco padre obtenidos en los primeros ensayos en fase I. La primera toma de muestra corresponde siempre al momento previo a la administración de la dosis y el tiempo de recogida de muestras se debe prolongar hasta que el fármaco y sus metabolitos no se detecten en las muestras biológicas. Por consiguiente, el periodo de toma de muestras está relacionado con el aclaramiento del fármaco, de tal forma que en algunas ocasiones es suficiente con muy pocas horas y en otras puede alargarse durante días o incluso semanas.

Cuando se administra el fármaco marcado radiactivamente es habitual realizar el contaje de la radiactividad total en sangre. En general las muestras de sangre se procesan para obtener el plasma y se cuantifica tanto el fármaco como sus metabolitos utilizando los métodos analíticos disponibles. Además se determinan las características relacionadas con la unión del fármaco a las proteínas plasmáticas.

Las muestras de orina se recogen en intervalos de tiempo predeterminados. Con frecuencia los intervalos de recogida de orina son las 12 horas previas a la administración del fármaco, y entre 0-12 y 12-24 horas después de la administración. Antes de realizar la determinación analítica del fármaco y metabolito en las muestras de orina debe medirse el volumen, el pH y la densidad de la orina recogida en cada intervalo.

Por último las muestras de heces se recogen a diario, se pesan y se almacenan para realizar la posterior extracción, identificación y cuantificación del fármaco y del metabolito.

#### **18.2.2.4 Valoración analítica en las muestras biológicas**

Cuando se administra el fármaco marcado radiactivamente se procede a la utilización de contadores de escintilización. De esta forma se cuantifica la radiactividad que emiten las muestras biológicas obtenidas en los tiempos de muestreo. En caso de que se administre el fármaco sin marcar con un isótopo radiactivo la determinación analítica de los fármacos y metabolitos en las muestras biológicas se realiza utilizando los métodos analíticos disponibles para cada molécula, ahora bien la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC y UPLC) y la espectrofotometría de masas son, en la actualidad, los métodos analíticos estándar.

#### **18.2.3 Análisis de datos**

Los datos obtenidos en los estudios de balance de masas deben procesarse para obtener la información relevante de los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos y sus metabolitos. A continuación se describe el análisis de datos que se realiza con mayor frecuencia.

**Reactividad total recuperada.** La suma de la radiactividad medida en las muestras biológicas recogidas debe estar próxima al 100% de la dosis administrada; se consideran aceptables valores superiores al 90% y en caso de que el fármaco se haya administrado por inhalación se aceptan niveles inferiores. Una recuperación de la radiactividad total inferior al 90% de la dosis administrada puede atribuirse a varios factores; entre los principales, un periodo de toma de muestras demasiado corto, la ausencia de matrices biológicas muestreadas o muestras biológicas recogidas de forma no adecuada. En los casos en que la recuperación de radiactividad en orina y heces es muy baja puede atribuirse a que el fármaco o metabolitos se acumula en tejidos profundos, por ejemplo médula, o que fármaco y metabolitos tienen una semivida biológica muy prolongada por tratarse de moléculas muy lipófilas. Es importante analizar con cautela los datos que revelan las muestras de heces ya que la manipulación previa de estas muestras es un factor decisivo en el resultado, por ejemplo cuando se trata de fármacos lipófilos si la homogeneización de las mismas no es completa se obtienen resultados erróneos, variables y contradictorios.

**Porcentaje de la dosis eliminado por cada vía de eliminación.** La representación gráfica del porcentaje de dosis excretada en orina y en heces en función del tiempo permite obtener una aproximación válida sobre la vía de eliminación del fármaco y metabolitos. Además permite conocer si la eliminación de la dosis administrada se ha completado durante el tiempo en el que se ha realizado el ensayo.

**Fracción de dosis excretada por cada vía de eliminación.** El cociente entre la cantidad o radiactividad excretada por una vía de eliminación (orina, heces, etc.) y la cantidad o radiactividad total excretada proporciona una estimación de la fracción de dosis excretada por cada vía. Si tras la administración del fármaco por vía intravenosa éste se excreta por heces indica que el fármaco sufre excreción biliar. Sin embargo, si tras la administración por vía oral se excreta de forma inalterada por heces puede atribuirse a que parte de la dosis administrada no se ha absorbido y/o a que el fármaco se excreta por vía biliar. La fracción de dosis excretada por las vías de excreción no fecales se relaciona con la fracción de dosis absorbida. En cualquier caso para conocer el origen de los factores que influyen en la biodisponibilidad oral del fármaco es conveniente disponer de datos experimentales tras la administración del fármaco por vía intravenosa y por vía oral. Así, cuando un fármaco presenta una biodisponibilidad oral baja debido a una falta de absorción en el tracto gastrointestinal la fracción de dosis de fármaco que se recupera en heces será elevada. Sin embargo, si la baja biodisponibilidad es debida a un elevado efecto de primer paso intestinal y/o hepático serán muy bajas las cantidades o concentraciones de fármaco en plasma.

**Curvas de concentración plasmática tiempo del fármaco.** Las curvas de concentración plasmática del fármaco frente al tiempo permiten conocer la cantidad de fármaco que ha alcanzado la circulación sistémica de forma inalterada. La comparación de la exposición sistémica (área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo, AUC) de radiactividad total con la del fármaco padre proporciona información sobre la magnitud de metabolismo del fármaco. Una diferencia elevada en los valores del AUC o un elevado cociente entre radiactividad total y la radiactividad del fármaco padre indica un metabolismo del fármaco padre en elevada proporción.

**Unión a proteínas plasmáticas.** Es importante conocer si en el ámbito de dosis utilizadas existe linealidad en la unión a proteínas plasmáticas. Estos estudios pueden realizarse utilizando los métodos *in vitro* utilizados habitualmente para su caracterización.

**Identificación de metabolitos en plasma, orina y heces.** La razón principal para identificar el perfil metabólico del fármaco es conocer la potencial actividad

terapéutica y tóxica de los metabolitos así como averiguar si éstos son capaces de alterar la actividad del fármaco padre por fenómenos de inhibición y/o desplazamiento. En general los metabolitos son inactivos; sin embargo, cuando se administra un profármaco, la producción del metabolito implica la formación de la molécula activa y por consiguiente el desarrollo posterior de la actividad. En otros casos el metabolito puede potenciar o inhibir el efecto terapéutico del fármaco, competir por la unión del fármaco a las proteínas plasmáticas o a las proteínas tisulares. Además, cuando se identifican metabolitos tóxicos se requiere iniciar nuevos estudios de seguridad para el fármaco. En este caso puede ser aconsejable caracterizar el perfil de toxicidad de los metabolitos en estudios preclínicos en líneas celulares, particularmente si los metabolitos en humanos no son similares a los obtenidos en las especies animales seleccionadas para los estudios de seguridad no clínicos.

**Relación entre la concentración de fármaco en sangre y en plasma.** Permite conocer la distribución del fármaco y metabolito entre los elementos formes de la sangre y el plasma. Esta relación es la unidad cuando el fármaco se distribuye en la misma proporción entre el plasma y los elementos formes de la sangre. Valores superiores a la unidad indican que el fármaco y metabolitos se distribuyen preferentemente en los componentes celulares de la sangre (un valor aproximado de 1,6 implica que aproximadamente 1/3 del total de fármaco está en plasma).

## **18.3 Estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia**

### **18.3.1 Objetivo**

La Food and Drug Administration (FDA) define la biodisponibilidad como la velocidad y cantidad a la cual un fármaco o componente activo, absorbido a partir de la forma de dosificación que lo contiene, se hace disponible en el lugar de acción. Para los productos farmacéuticos destinados a no ser absorbidos y que no deben acceder a la circulación sanguínea, se puede evaluar la biodisponibilidad por medio de mediciones indicadas para reflejar la velocidad y la medida en que el ingrediente activo o la fracción activa se hace disponible en el sitio de acción. Pero para aquellos fármacos que deben absorberse, la evaluación objetiva del acceso del fármaco al lugar de acción resulta muy compleja y en algunos casos imposible. Por ello la American Pharmacist Association (APhA) propuso una segunda definición para biodisponibilidad: velocidad y cantidad a la cual un fármaco o componente activo,

absorbido a partir de la forma de dosificación que lo contiene alcanza la circulación sistémica.

Los estudios de biodisponibilidad pueden llevarse a cabo en diversas situaciones:

- empleando el principio activo en disolución, con objeto de caracterizarla como un parámetro biofarmacéutico del mismo
- incorporando el fármaco en el medicamento, como un parámetro de medida de calidad de la forma de dosificación
- en términos comparativos, con objeto de determinar si se observan diferencias que se puedan atribuir a cambios en las características fisicoquímicas del principio activo (tamaño de partícula, diferencia de especie química...), modificaciones en el proceso de fabricación, cambios (cuali y cuantitativos) en los excipientes de la formulación, justificar especificaciones de ensayos de disolución, evaluar linealidad cinética en un ámbito de dosis determinado, estudiar la interacción de fármacos con alimentos y establecer la bioequivalencia (similitud de biodisponibilidad) entre alternativas farmacéuticas y equivalentes farmacéuticos con objeto de garantizar la seguridad y eficacia de los tratamientos en caso de realizar sustituciones terapéuticas.

La determinación de la biodisponibilidad se lleva a cabo por medio del estudio del tránsito del fármaco en el organismo (niveles plasmáticos o en otro fluido muestreable como orina). Generalmente estos estudios se llevan a cabo comparando los resultados obtenidos con el tratamiento a evaluar (vía de administración o formulación) y un tratamiento de referencia. De acuerdo con la definición de biodisponibilidad se deben considerar dos vertientes: biodisponibilidad en magnitud y biodisponibilidad en velocidad.

La primera, biodisponibilidad en magnitud, habitualmente referenciada como F, se refiere a la fracción de dosis que accede a la circulación sistémica. Ésta puede calcularse, a partir de las curvas de niveles plasmáticos que se obtienen tras la administración de una dosis única del fármaco, D, por medio de la expresión:

$$F = \frac{Cl_p \cdot AUC_0^\infty}{D} \quad \text{Ec. 1}$$

donde  $Cl_p$  es el aclaramiento plasmático y AUC el área bajo la curva de concentración plasmática de fármaco frente al tiempo.

Para determinar la biodisponibilidad absoluta en magnitud debe administrarse el fármaco por dos vías: intravenosa (iv, referencia) y extravasal (ev, problema). La biodisponibilidad puede calcularse como:

$$F = \frac{F_{ev}}{F_{iv}} = \frac{\frac{Cl_{p,ev} \cdot AUC_{0,ev}^{\infty}}{D_{ev}}}{\frac{Cl_{p,iv} \cdot AUC_{0,iv}^{\infty}}{D_{iv}}} \quad \text{Ec 2}$$

Si se asume que el  $Cl_p$  es lineal en el ámbito de concentraciones administradas la ecuación anterior puede simplificarse:

$$F = \frac{AUC_{0,ev}^{\infty} \cdot D_{iv}}{AUC_{0,iv}^{\infty} \cdot D_{ev}} \quad \text{Ec 3}$$

En caso de administrar la misma dosis en ambos casos:

$$F = \frac{AUC_{0,ev}^{\infty}}{AUC_{0,iv}^{\infty}} \quad \text{Ec 4}$$

Dado que no siempre es posible administrar el fármaco por vía intravenosa se puede emplear como referencia otra administración extravasal. En estas circunstancias se calcula la biodisponibilidad relativa de acuerdo con la expresión siguiente:

$$F = \frac{F_{problema}}{F_{referencia}} = \frac{\frac{Cl_{p,problema} \cdot AUC_{0,problema}^{\infty}}{D_{problema}}}{\frac{Cl_{p,referencia} \cdot AUC_{0,referencia}^{\infty}}{D_{referencia}}} \quad \text{Ec 5}$$

expresión en la que se pueden hacer las mismas consideraciones que en la ecuación 2.

Si el principio activo presenta una cinética de eliminación saturable el aclaramiento plasmático no se mantiene constante para todas las concentraciones plasmáticas alcanzadas y tampoco se mantiene constante tras las distintas administraciones, por lo que no son válidas las simplificaciones indicadas. En estos casos se puede estimar el aclaramiento intrínseco,  $Cl_{int}$ , en función de las concentraciones plasmáticas ( $c_t$ ) y de los parámetros  $V_m$  y  $K_m$  de la ecuación de Michaelis-Menten:



$$Cl_{int} = \frac{V_m}{K_m + C_t} \quad \text{Ec 6}$$

En este caso, puede determinarse la biodisponibilidad por aplicación del método propuesto por Marti y Levi:

$$F = \frac{1}{D} \cdot \sum_{i=1}^{\infty} Cl_i \cdot AUC_i \quad \text{Ec 7}$$

expresión en la que D es la dosis administrada,  $Cl_i$  es el aclaramiento intrínseco estimado en un tiempo i y  $AUC_i$  el área bajo la curva desde cero a tiempo i.

La biodisponibilidad puede determinarse también cuando el fármaco se administra en un régimen de dosificación múltiple. En este caso las muestras experimentales deben obtenerse cuando se alcanza el estado estacionario y los cálculos se realizan con el AUC del intervalo de dosificación,  $AUC_{\tau}$ , para cuya determinación se requiere menor número de muestras; además los niveles plasmáticos son más elevados y por tanto la determinación analítica es más fiable y el uso del medicamento se aproxima más al uso clínico del fármaco. Pero plantea inconvenientes relacionados con el aumento de la duración del estudio y mayor exposición al fármaco.

En caso de no linealidad cinética, si se emplea un régimen de dosificación múltiple, para el cálculo de la biodisponibilidad puede emplearse la ecuación propuesta por Chiou y colaboradores.:

$$F = \frac{V_m \overline{C_{ss}}}{\tau (V_m + \overline{C_{ss}})} \quad \text{Ec 8}$$

donde  $\overline{C_{ss}}$  es la concentración plasmática promedio en estado de equilibrio estacionario.

Como medida de la biodisponibilidad en velocidad se emplean parámetros puntuales como  $C_{m\acute{a}x}$  (concentración plasmática máxima alcanzada) y  $t_{m\acute{a}x}$  (tiempo al que se alcanza  $C_{m\acute{a}x}$ ). Puesto que  $C_{m\acute{a}x}$  puede modificarse por cambios en la velocidad o en la magnitud de la absorción, se recomienda además el cálculo de  $C_{m\acute{a}x}/AUC_0^{\infty}$  como parámetro indicativo de la velocidad de absorción. Hay que tener en cuenta que tanto  $t_{m\acute{a}x}$  como  $C_{m\acute{a}x}$  están influenciados por el diseño experimental de toma de muestras.

Dos medicamentos son bioequivalentes si, siendo equivalentes farmacéuticos (medicamentos que contienen idénticas cantidades del mismo fármaco, es decir, misma sal, éster... en la misma forma de dosificación, no necesariamente los mismos excipientes) o alternativas farmacéuticas (medicamentos que contienen la misma parte de la molécula activa, pero no necesariamente en la misma forma química (sal, éster...) ni en la misma forma de dosificación, ni en la misma cantidad al ser administrados a la misma dosis molar de principio activo, presentan biodisponibilidad en velocidad y magnitud similares, de modo que pueda suponerse que su eficacia y seguridad serán idénticas<sup>3</sup>.

### **18.3.2 Factores que influyen en la biodisponibilidad**

El acceso de un fármaco a la circulación sistémica depende de sus propiedades físico-químicas y características farmacocinéticas, la forma de dosificación que lo contiene y el sistema biológico al que se dirige. Para que se produzca la absorción de una molécula es necesario que ésta en primer término se libere desde la forma farmacéutica que la contiene, se disuelva en una determinada zona anatómica y difunda hasta acceder al lugar en el que se deba producir su absorción. Si el fármaco se administra disuelto al determinar su biodisponibilidad ésta caracteriza el comportamiento biofarmacéutico del mismo, para la vía de administración seleccionada.

Polimorfismo, coeficiente de reparto, pKa, tamaño de partícula y solubilidad pueden tener una influencia directa en la velocidad de disolución. Para los fármacos que presentan baja solubilidad y/o una velocidad de disolución lenta éstas pueden ser factor limitativo de la absorción y por tanto influir en la biodisponibilidad. Por otra parte, la forma farmacéutica que se seleccione (suspensión, comprimidos, cápsulas...), así como los componentes de la formulación y los procesos tecnológicos empleados en su elaboración pueden influir en la solubilidad, la velocidad de disolución y en algunos casos en la absorción de la molécula activa. Si se determina la biodisponibilidad del fármaco desde una forma de dosificación ésta puede considerarse un parámetro de medida de calidad de la formulación.

Son factores fisiológicos importantes en la biodisponibilidad la edad, el sexo, el peso y el índice de masa corporal, la temperatura, flujo sanguíneo, momento de la administración, velocidad de vaciado gástrico, motilidad intestinal, embarazo y polimorfismo genético. La mayor parte de estos parámetros afectan al proceso de absorción o al aclaramiento plasmático y por ello repercuten en la biodisponibilidad.

### 18.3.3 Diseño y análisis de datos

Se puede utilizar varios métodos *in vivo* e *in vitro* para medir la biodisponibilidad, éstos incluyen, en orden de preferencia decreciente, estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos y estudios *in vitro*.

De acuerdo con las definiciones de biodisponibilidad y bioequivalencia, la medida de parámetros farmacocinéticos en una matriz biológica accesible como la sangre, el plasma y/o el suero son indicativos de la liberación de la sustancia farmacológica que contiene el medicamento en la circulación sistémica. Sólo se recomiendan estudios farmacodinámicos en aquellos casos en los que no es posible un enfoque farmacocinético. Para productos farmacéuticos altamente solubles, altamente permeables, de disolución rápida, administrados por vía oral, es apropiada la caracterización de bioequivalencia utilizando un enfoque *in vitro* (estudios de disolución) en base al sistema de clasificación biofarmacéutica. A continuación se comentarán los estudios farmacocinéticos.

#### 18.3.3.1 Estudios farmacocinéticos

**Diseño del estudio.** Para seleccionar el diseño óptimo de un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia, es necesario considerar en primer lugar el número de formulaciones a comparar, las características del fármaco y sus propiedades farmacocinéticas, el objetivo del estudio, la variabilidad inter e intraindividual y el número de periodos permitidos.

Cuando se desea comparar dos formulaciones, generalmente se realiza un **estudio cruzado**. En este tipo de estudio cada individuo recibe las dos formulaciones a evaluar, de modo que se supone que la eliminación, el volumen de distribución y la absorción, según lo determinado por variables fisiológicas (p.ej., vaciado gástrico, movilidad, pH) tienen menos variabilidad entre ocasiones en comparación con la variabilidad que resulta de la formulación. Por lo tanto, se puede determinar diferencias entre los dos productos debido a factores de formulación.

El **diseño paralelo**, en líneas generales, no es una buena alternativa en los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia, ya que con el mismo número de individuos que un ensayo cruzado tiene menor capacidad discriminativa ya que la varianza residual incluye la variabilidad inter e intraindividual, en contraposición con los estudios cruzados 2x2 en los que únicamente integra la variabilidad intraindividual. No obstante, en algunas situaciones, especialmente cuando el fármaco tiene una

semivida muy prolongada, o se trata de una sustancia potencialmente tóxica el diseño paralelo puede resultar una buena alternativa.

El número total de sujetos en el estudio debe basarse en un cálculo de tamaño muestral de forma que la potencia estadística del estudio sea como mínimo del 80%. En cualquier caso, en un ensayo de diseño cruzado 2x2 el número de individuos a incluir no puede ser inferior a 12.

En los ensayos de demostración de bioequivalencia se acepta un diseño en dos etapas. De acuerdo con este diseño, si con el número inicial de individuos incluidos en el estudio no se puede demostrar bioequivalencia, porque la potencia del estudio es insuficiente, es posible continuar el estudio aumentando el número de individuos. En estos estudios, el análisis de los datos de la primera etapa se considera un intermedio y el nivel de significación global del estudio ( $\alpha$ ) debe de ser de 0,05.

**Población de estudio.** Los estudios deben realizarse en individuos sanos, representativos de la población en general, teniendo en cuenta los factores de edad, sexo y raza. Si el fármaco está destinado para uso en ambos sexos debe incluir proporciones similares de varones y mujeres en el estudio. Generalmente incluyen voluntarios entre los 18 y 55 años, con peso dentro de los ámbitos normales. No obstante, si el fármaco está destinado a utilizarse principalmente en personas de edad avanzada se deberá incluir la mayor cantidad posible de sujetos de edad igual o superior a 60 años. En algunos casos, cuando el fármaco presenta una toxicidad elevada, los estudios deben realizarse en pacientes para los cuales está destinado el fármaco. En cualquier caso es necesaria una caracterización genética de los participantes, siempre que se considere que ésta puede ser relevante desde el punto de vista farmacocinético.

Los criterios de exclusión deben especificarse claramente en el protocolo del estudio y la decisión de exclusión debe ser anterior a proceder al análisis de las muestras biológicas. El análisis de resultados debe realizarse con la información obtenida del total de individuos participantes. Sin embargo, en un diseño cruzado, si algún individuo no completa los dos tratamientos, o en un diseño paralelo si no se completa íntegramente un tratamiento, la información obtenida de dicho individuo debe excluirse.

Los ensayos de bioequivalencia son ensayos clínicos de fase I y por tanto están sometidos a la legislación correspondiente. Estos estudios requieren del consentimiento informado de los voluntarios y se rigen por la normativa adoptada por la Asamblea de la Asociación Médica Mundial en Helsinki en 1964 y modificada posteriormente en Tokyo 1975, Venecia 1983 y Hong Kong en 1989.

**Estudios de dosis única/dosis múltiples.** Por lo general se recomienda realizar los estudios farmacocinéticos en dosis única para productos farmacéuticos de liberación tanto inmediata como modificada a fin de demostrar la bioequivalencia, porque normalmente son más sensibles en evaluar la liberación de la sustancia farmacológica del medicamento en la circulación sistémica. Si hace falta un diseño de estudio de dosis múltiples, se deberá realizar la administración posológica y el muestreo apropiados para asegurar que se ha alcanzado el estado estacionario.

Cuando un medicamento se presenta en diferentes dosis y se debe demostrar bioequivalencia, en algunos casos pueden realizarse los estudios farmacocinéticos con una única dosis y ampliar la bioequivalencia a las demás. Para que ello sea posible se debe considerar la linealidad farmacocinética, la solubilidad del fármaco y la proporcionalidad entre el componente activo y los demás componentes de la formulación.

Si las distintas formulaciones han sido elaboradas por el mismo fabricante y en el mismo lugar, el comportamiento farmacocinético es lineal en el ámbito terapéutico, la composición cualitativa de las formulaciones es idéntica y la relación principio activo/excipientes es la misma y los ensayos de disolución *in vitro* permiten confirmar la exención de ensayos de bioequivalencia para otras dosis y el fármaco es de solubilidad elevada, puede realizarse el ensayo de bioequivalencia sólo con una de las dosis del rango a ensayar. Si el fármaco es de baja solubilidad la dosis que se debe seleccionar es la más elevada. En estos casos, si se demuestra bioequivalencia y se cumplen todos los requisitos mencionados, se puede eximir de realizar los ensayos de bioequivalencia siempre que los cambios en formulación sean mínimos: el contenido en principio activo represente menos del 5% del contenido total y las cantidades de los excipientes sean las mismas para todas las dosis.

En caso de que la farmacocinética sea no lineal pueden darse dos situaciones. Si los valores de  $C_{m\acute{a}x}$  y  $AUC_0^{\infty}$  se incrementan más que proporcionalmente a la dosis administrada se evaluará la bioequivalencia en función de la dosis más alta. Si los valores de  $C_{m\acute{a}x}$  y  $AUC_0^{\infty}$  se incrementan menos que proporcionalmente a la dosis administrada se evaluará la bioequivalencia en función de la dosis más baja, si esto es debido a la saturación del proceso de absorción, o con la dosis más baja y con la más alta, si es debido a baja solubilidad.

**Valoración de las muestras.** Puede emplearse para la valoración de las muestras el método bioanalítico que sea adecuado para permitir la valoración de analito de forma exacta, precisa, selectiva, reproducible y con sensibilidad. El límite de cuantificación

debe ser inferior a  $1/20$  de  $C_{\text{máx}}$  o un valor inferior, con objeto de detectar el efecto “carry-over” (el efecto del fármaco aplicado en el periodo I perdura al iniciar el periodo II).

En caso de que el principio activo tenga un carbono quiral, deberá utilizarse un método bioanalítico enantioselectivo si los enantiómeros presentan diferente comportamiento farmacocinético y/o diferente actividad farmacodinámica o cuando la relación entre la concentración plasmática de los enantiómeros no permanece constante y se modifica como consecuencia de un cambio en la velocidad de absorción. De lo contrario es posible emplear un método aquiral.

**Medidas farmacocinéticas.** Las guías de bioequivalencia establecen la evaluación de parámetros farmacocinéticos indicativos de exposición temprana, máxima y total del perfil de concentración-tiempo del plasma, el suero o la sangre.

Para los productos farmacéuticos de liberación inmediata de administración oral, por lo general se puede demostrar la bioequivalencia mediante mediciones de exposición máxima y exposición total.

Como medida de exposición temprana las guías recomiendan el uso de una AUC parcial. Se deberá truncar el área parcial en la mediana de los valores de  $t_{\text{máx}}$  de la población para la formulación de referencia. Se deberá recoger por lo menos dos muestras cuantificables antes del tiempo máximo esperado para que el cálculo del área parcial se considere adecuado.

La exposición máxima puede evaluarse con la concentración máxima del fármaco ( $C_{\text{máx}}$ ), obtenida directamente de los datos sin interpolación.

Para los estudios de dosis única, la medición de la exposición total corresponde a:

-el área bajo de la curva de concentración-tiempo en plasma/suero/sangre desde el tiempo cero hasta el tiempo  $t$  ( $AUC_0^t$ ), donde  $t$  es el último tiempo experimental para el que se ha podido cuantificar la concentración para la formulación individual.

-el área bajo de la curva de concentración-tiempo en plasma/suero/sangre desde el tiempo cero hasta tiempo infinito  $AUC_0^\infty$  donde  $AUC_0^\infty = AUC_0^t + C_t/Z$ ,  $C_t$  es la última concentración experimental del fármaco y  $Z$  es la constante de velocidad de eliminación, o la constante de velocidad de la fase terminal de la curva de concentración plasmática-tiempo, calculada según un método apropiado. También deberá referirse la semivida del fármaco.

Para estudios en estado estacionario, la exposición total deberá ser el área bajo la curva de concentración-tiempo en plasma, suero o sangre en un intervalo de dosificación ( $\tau$ ) cuando se ha alcanzado el estado estacionario.

En caso de que se generen metabolitos, en principio la determinación de bioequivalencia se basa en las medidas de  $C_{\text{máx}}$  del producto inalterado (fármaco padre), ya que éstas son más sensibles a cambios en la absorción que las del metabolito. Esta recomendación también es válida para profármacos, excepto si la farmacocinética es no lineal, en cuyo caso debe analizarse las concentraciones del metabolito activo.

En caso de que los métodos bioanalíticos que se utilicen no permitan la valoración adecuada del fármaco ni siquiera en un régimen de dosis múltiples, está justificada la evaluación de la bioequivalencia en función del metabolito. Para ello debe demostrarse que la formación del metabolito no está saturada. En estos casos, la evaluación de la bioequivalencia en magnitud puede hacerse a través de la medida del  $AUC_0^{\infty}$  del metabolito y en velocidad en base a los valores de  $C_{\text{máx}}$  del compuesto inalterado, por los motivos expuestos.

Para todos estos parámetros ( $AUC_0^{\infty}$ ,  $C_{\text{máx}}$ , etc.) el intervalo de confianza del 90% de la media geométrica del cociente entre el valor obtenido con la formulación problema y el obtenido con la formulación de referencia debe de quedar incluido en el intervalo de aceptación: 80,00-125,00%. Si se trata de productos de estrecho índice terapéutico el intervalo de aceptación debe reducirse. En caso de productos de elevada variabilidad el intervalo de aceptación de  $C_{\text{máx}}$  puede ampliarse.

En general no se requiere comparación entre los valores de  $t_{\text{máx}}$ , excepto en medicamentos de liberación inmediata en los que puede tener relevancia clínica o en los que puede tener una repercusión en el inicio de acción o de aparición de efectos adversos. En estas situaciones no debe haber una diferencia aparente entre la mediana de  $t_{\text{máx}}$  y su variabilidad entre la formulación problema y la de referencia.

## **18.4 Modelos animales in vivo**

Los estudios de balance de masas y los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia pueden realizarse en animales de experimentación utilizando distintos modelos in vivo que, en general, se realizan en animales sanos de diferentes especies animales. Sin embargo, los resultados que se obtienen no siempre son fácilmente extrapolables a la especie humana en las condiciones de uso y por ello en

muchas situaciones es conveniente que estos estudios también se realicen en modelos de enfermedad desarrollados en animales de experimentación. En Europa, a los estudios en animales de experimentación se les exige el cumplimiento de la normativa vigente recogida en la directiva 2010/63/UE del 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos en la que se recogen las normas de correcto uso y manipulación de animales de laboratorio. Además los estudios deben ser aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la institución donde se desarrollan. En otras partes del mundo también se siguen unas normas internacionales armonizadas.

Para llevar a cabo estos estudios pueden utilizarse diversas especies animales. La rata es quizá la especie animal más utilizada ya que el proceso absorción gastrointestinal en esta especie animal presenta similitudes con la especie humana, probablemente se debe a que es un omnívoro, como el hombre. El hámster, cobaya y conejo también son útiles, pero los dos últimos más alejados del hombre, en cuanto a absorción gastrointestinal, probablemente debido a su condición de herbívoros. El perro, por ser carnívoro, es en principio poco adecuado, pero su utilidad estriba en su tamaño y docilidad además de que el uso de esta especie animal permite el estudio de formas farmacéuticas sólidas preparadas para humanos, lo que resulta imposible en otras especies de menor tamaño.

Para llevar a cabo este tipo de estudios el modelo animal utilizado con más frecuencia es la rata albina macho, de raza Wistar y de peso comprendido entre 270-330 g. En este modelo animal se puede administrar diferentes dosis. Con objeto de obtener con facilidad las muestras de sangre se puede canular de forma permanente de la vena yugular, este proceso consiste en la implantación de un catéter de silicona en la vena yugular derecha de la rata de forma permanente. Esta técnica permite que la administración intravenosa y la toma de muestras de sangre se realicen sin necesidad de anestésicar al animal o limitar su movilidad, evitando así un estrés adicional para el animal de experimentación.

La implantación del catéter en la vena yugular de la rata se realiza en condiciones de anestesia y analgesia adecuadas. La anestesia y analgesia de los animales se induce con un anestésico general y un antiinflamatorio. Puede emplearse como anestésico, entre otras alternativas, el pentobarbital sódico administrado por vía intraperitoneal a razón de 30 mg por kilogramo de peso del animal. Una vez se ha inducido la anestesia, se administra por vía subcutánea en la zona ventral superior 0,5 mg por kilo del analgésico y antiinflamatorio butorfanol tartrato.



Una vez recuperado el animal de la intervención quirúrgica en la que se implanta la cánula en la vena yugular, y tras comprobar su recuperación, se puede iniciar el estudio farmacocinético que se haya diseñado previamente.

Las ventajas de disponer de un catéter implantado de forma permanente en la vena yugular para obtener muestras de sangre son básicamente las siguientes, se facilita la administración y la toma de muestras de sangre, se evita alteración del comportamiento, conservando movilidad y autonomía, se evita alteración del flujo sanguíneo (no requiere anestesia al administrar/toma de muestras), la toma de muestras se puede mantener durante tiempo prolongado (24-48h) y la preparación no precisa un periodo de ayuno. En el desarrollo del proceso es importante inducir la anestesia utilizando los protocolos autorizados así como disponer de material quirúrgico que asegure la realización de incisiones precisas para evitar desgarros y facilitar el aislamiento de las venas.

Durante el proceso de implantación del catéter y en el desarrollo del ensayo es conveniente mantener precauciones para que el ensayo se realice con éxito. Entre éstas es importante destacar que se debe asegurar la utilización de material estéril y heparinizado, los animales deben mantener una situación de anestesia profunda durante todo el proceso, la cánula implantada debe quedar bien fijada, durante la intervención quirúrgica se deben evitar hemorragias y la formación de coágulos y sobre todo se debe mantener volemia reponiendo las muestras de sangre extraídas con el volumen adecuado de suero fisiológico heparinizado.

La limitación más importante de este método es que la dosis máxima que se puede administrar, que está condicionada por el volumen máximo de administración y la sensibilidad de la técnica analítica utilizada para la cuantificación del fármaco en las muestras de sangre.

En la tabla 1 se detallan los volúmenes de administración recomendados (y máximos posibles), expresados en mL/kg, según la vía de administración.

*Tabla 1: Vía de administración y volúmenes (mL/kg) recomendable y (máximo). SC: subcutánea; IP: intraperitoneal; IM: intramuscular; IV: intravenosa.*

Especie Animal	Vía de administración y volúmenes (mL/kg) recomendable y (máximo)					
	Oral	SC	IP	IM	IV (bolus)	IV (lenta)
Rata	10 (40)	5 (10)	10 (20)	0,1 (0,2)	5	(20)

Asimismo durante el periodo de muestreo se debe limitar la extracción de las muestras sanguíneas para garantizar que el animal mantiene una adecuada volemia y que el valor hematocrito del animal de experimentación no se altera. El volumen sanguíneo total de la rata oscila entre 58-90 mL/kg, su volumen plasmático entre 36-45 mL/Kg<sup>7</sup>. A continuación se detallan las recomendaciones para la obtención de muestras sangre en rata:

- Muestreo en un único día, sin reemplazar la volemia, se puede extraer el volumen equivalente al 15% del volumen sanguíneo total. No pueden extraerse más muestras hasta transcurridas 4 semanas.
- Muestreo en un único día, con reemplazo de volemia, se puede extraer el volumen equivalente al 40% del VST en el periodo de 24 h. No puede tomarse más muestras hasta transcurridas 4 semanas.
- Muestreo durante una semana: se puede extraer hasta el volumen equivalente al 7,5% del volumen sanguíneo total.
- Muestreo en dos semanas: se puede extraer hasta el volumen equivalente al 10% del volumen sanguíneo total.

Cuando se utiliza la rata como modelo animal los estudios de biodisponibilidad y de bioequivalencia adoptan en general el diseño paralelo, ya que es posible adaptar con mayor facilidad la estrategia de toma de muestras a los requerimientos anteriores. A ello se debe añadir la consideración de que la viabilidad de la cánula implantada para la obtención de las muestras de sangre no puede garantizarse durante un periodo de tiempo superior a los 3-5 días. Esta situación representa una limitación experimental muy importante en un diseño cruzado para determinar la biodisponibilidad y/o bioequivalencia de fármacos de semivida biológica prolongada, ya que no siempre es posible garantizar la funcionalidad de la cánula dejando transcurrir el periodo de lavado entre las dos administraciones.

---

<sup>1</sup> Food and Drug administration. “Estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia para productos farmacéuticos administrados oralmente. Consideraciones generales. Guía para la industria”. In <http://www.fda.gov/default.htm>, Oct 2013.

<sup>2</sup> Chiou W. L., Chung Y. L. and Lam G. “Plasma area method in relative bioavailability evaluation of drugs with changing biological half-lives”. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 70, No 1, 1981, pp(109–112). DOI: 10.1002/jps.2600700129

<sup>3</sup> European Medicines Agency. “Guideline on the investigation of bioequivalence”. In <http://www.ema.europa.eu/>, Oct 2013.

---

<sup>4</sup> Bonate, P., L. “Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation”. 2011 (2<sup>a</sup> Ed.) Springer, ISBN: 1441994858, USA.

<sup>5</sup> BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. “Removal of blood from laboratory mammals and birds, First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement”. *Laboratory Animals*, Vol. 27, No. 1, 1993, pp. (1-22).

<sup>6</sup> Diehl, K. H., Hull R, Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina ,Y., Smith, D., Vidal. J. M., van de Vorstenbosch, C.; European Federation of Pharmaceutical Industries Association and European Centre for the Validation of Alternative Methods. “A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes”. *Journal of Applied Toxicology*, Vol. 21, 2001, pp. (15-23), DOI: 10.1002/jat.727

<sup>7</sup> McGuill, M., W., Rowan, A., N. “Biological Effects of Blood Loss: Implications for Sampling Volumes and Techniques, In: Perspectives on Animal Use; Special Article: A Medical Ethics Primer; Principles and Guidelines”. *Institute for laboratory animal research* , Vol. 31, No. 4, 1989, pp. (5-18), DOI: 10.1093.

# 19. Sección permeabilidad: Métodos *in silico* para la predicción de la permeabilidad de fármacos. Aproximaciones al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico

Miguel Ángel Cabrera-Pérez<sup>a</sup>, Hai Pham The<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas / Centro de Bioactivos Químicos /  
Unidad de Modelación y Experimentación Biofarmacéutica  
Cuba.

<sup>b</sup>Universidad de Farmacia de Hanoi / Departamento de Farmacología  
Vietnam

## 19.1 Introducción

La permeabilidad intestinal es una medida de la absorción intestinal y el transporte de fármacos. Comúnmente se describe como un coeficiente de permeabilidad aparente (Papp ó Pm), el cual es determinado por diferentes modelos experimentales y sus unidades son en cm/s. Diversos métodos *in-vitro*, *in-situ* e *in-vivo* se han utilizado para la estimación de la permeabilidad. Dentro de los métodos *in-vitro* se destacan los basados en células (Caco-2, MDCK, HT29-MTX, 2/4/A1, etc.), siendo la línea celular de adenocarcinoma de colon humano Caco-2 la más usada para simular la monocapa del epitelio intestinal. Los valores de permeabilidad en Caco-2 correlacionan adecuadamente con los obtenidos en el intestino delgado, por lo que es una herramienta válida para la estimación de la absorción oral en humanos. Otros de los métodos *in-vitro* utilizados para la determinación de la permeabilidad son basados en membranas artificiales (PAMPA), y en tejidos (cámara Ussing, y sacos intestinales). Dentro de los métodos *in-situ* resaltan la perfusión intestinal en ratas, y en los *in-vivo* los estudios en animales de laboratorio y de perfusión intestinal en humanos.

La importancia de la permeabilidad sobre la absorción de fármacos queda reflejada en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico<sup>10</sup>. Diversos modelos *in-silico*, basados en el cálculo de descriptores moleculares, han sido desarrollados para predecir la permeabilidad a partir de la estructura química para facilitar la optimización de compuestos líderes en el proceso de descubrimiento de fármacos<sup>11</sup>. Es por ello que el objetivo general de este capítulo es brindar una panorámica general sobre el procedimiento de modelación computacional de la permeabilidad intestinal, sus perspectivas y potencial aplicación dentro del marco del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.

## **19.2 Desarrollo de los modelos computacionales para la predicción de la permeabilidad**

La mayoría de los modelos computacionales para la predicción de la permeabilidad intestinal de fármacos, al igual que para predecir la solubilidad acuosa, son modelos empíricos de relación cuantitativa/cualitativa estructura-propiedad (QSPR), donde los modelos son entrenados con datos de permeabilidad tomados de la literatura, de bases de datos de empresas farmacéuticas u obtenidos específicamente en laboratorios para fines de modelación. Por lo tanto, es normal que la calidad del modelo computacional para predecir esta propiedad depende de la calidad de los datos de permeabilidad determinados experimentalmente y utilizados para obtener el modelo, así como de la validación de los mismos.

De forma similar a los modelos computacionales para predecir la solubilidad (ver capítulo 9), la confección de los modelos QSPR de permeabilidad intestinal siguen los mismos pasos: a) construcción de las bases de datos, b) cálculo de los descriptores moleculares, c) diseño de las series de entrenamiento y predicción, y d) desarrollo y validación de los modelos. Todo lo anterior se describe en el siguiente epígrafe bajo un análisis de los modelos descritos en la literatura y a la luz de los principios regulatorios establecidos por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) para la validación de los modelos computacionales<sup>12</sup>.

### **19.2.1 Metodología general para los estudios QSPR.**

Como se describió en el capítulo de solubilidad y de forma similar, existen diversos esquemas de estudios de relación cuantitativa estructura-propiedad (QSPR) que se han descrito en la literatura para predecir la permeabilidad. Sin embargo, la mayoría

de ellos fueron desarrollados antes de lo planteado por la OCDE por lo que de forma general su aplicabilidad ha sido limitada.

Un esquema general para el desarrollo y aplicación de los modelos QSPR se aprecia en la Figura 1. Una descripción del procedimiento la veremos a continuación a través de su aplicación en la predicción de la permeabilidad de los fármacos.

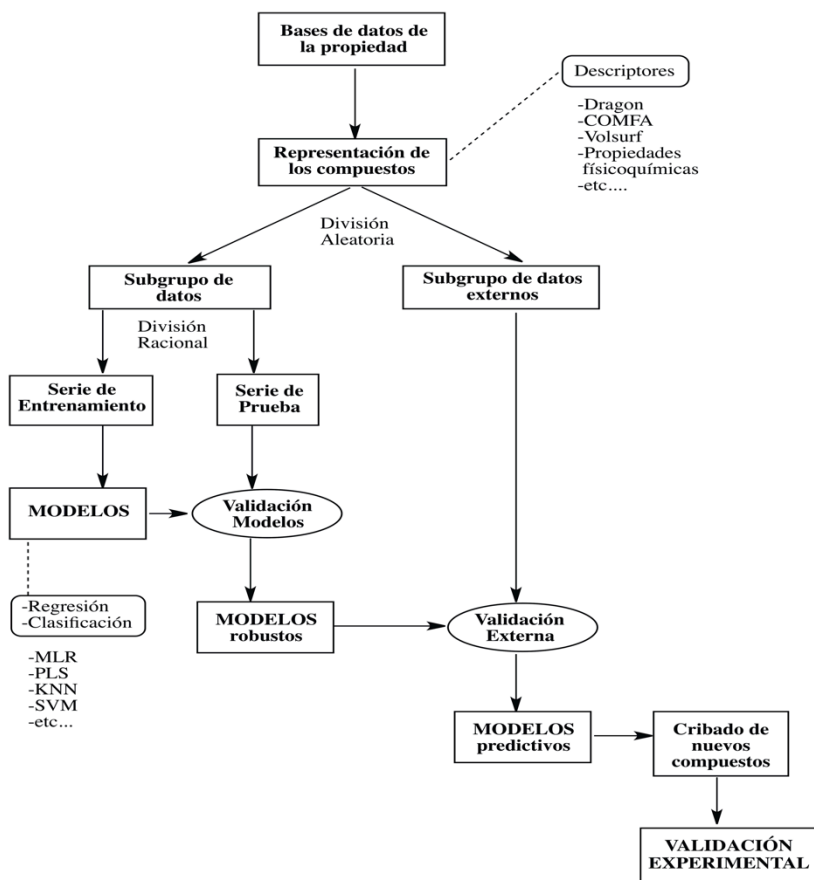


Figura 1. Flujo de trabajo de un estudio QSPR

## 19.2.2 Bases de datos de solubilidad.

Para el desarrollo de cualquier modelo QSPR, la disponibilidad de datos experimentales de calidad es muy importante para obtener modelos relevantes y

precisos. La selección del conjunto de datos experimentales debe seguir un protocolo riguroso para evitar errores en las estructuras de los compuestos que puedan conducir a una pérdida significativa de la capacidad predictiva de los modelos. De forma general los datos experimentales colectados provienen de la literatura por lo que se deben seleccionar lo más homogéneamente posible. Muchos autores plantean la necesidad de un proceso de curación de los datos experimentales antes de comenzar el proceso de modelación<sup>13</sup>. Las bases de datos deben ser lo suficientemente grandes para cubrir un amplio espacio de diversidad estructural que permita alcanzar modelos más predictivos y con mayor aplicabilidad. Las principales conjuntos de datos descritos en la literatura con valores experimentales de permeabilidad, que se han utilizado para el desarrollo de modelos QSPR, se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Conjuntos de datos de permeabilidad intestinal descritos en la literatura y utilizados para el desarrollo de modelos QSPR.

Conjuntos de datos	Propiedad ADME	Referencias
Permeabilidad intestinal	Papp Caco-2	4, 14, 15, 16, 17, 18,19, 20, 21, 22, 23, 24, 25
Permeabilidad intestinal	Papp MDCK	21, 26
Permeabilidad intestinal	Papp PAMPA	27, 28

Papp: Permeabilidad aparente; Caco-2: células de adenocarcinoma de colon humano; MDCK: células de riñón de perro; PAMPA: permeación en membranas artificiales.

Aunque varios conjuntos de datos de permeabilidad intestinal se han descrito en la literatura, muy pocos tienen la calidad y diversidad estructural deseada, lo que reduce la robustez y la capacidad predictiva de los modelos obtenidos<sup>29</sup>. Muchos de estos conjuntos de datos son compilaciones de la literatura y solamente muy pocos de ellos representan los resultados de experimentos controlados<sup>30</sup>.

### 19.2.3 Descriptores moleculares.

Los descriptores moleculares son el resultado final de procedimientos matemáticos que permiten transformar la información química, codificada dentro de la representación simbólica de las moléculas, en números útiles<sup>31</sup>. Los descriptores moleculares nos permiten encontrar correlaciones estructura-propiedad y permite hacer búsquedas sub-estructurales y de similaridad. Numerosa metodologías se han desarrollado para generar descriptores moleculares y programas como el Dragón<sup>32</sup>, CDK<sup>33</sup>, Modeslab<sup>34</sup>, Volsurf<sup>35</sup>, etc. son capaces de calcular miles de descriptores moleculares. Muchos de ellos se han utilizado para correlacionar la permeabilidad

intestinal con la estructura química. La utilización de un tipo u otro de descriptor depende del objetivo final con el que se hace el modelo. Por ejemplo, aunque los descriptores 1D muchas veces no brindan modelos robustos, precisos y de gran capacidad predictiva, su rápido cálculo y la posibilidad de permitir una interpretación mecanística de la permeabilidad intestinal de los fármacos hacen relevante su utilización sobre todo para el cribado masivo de grandes bibliotecas de nuevos compuestos. Los descriptores 2D pueden ser calculados rápidamente, aunque su naturaleza topológica muchas veces hace difícil su interpretación para obtener una clara relación entre la estructura y las propiedades ADME<sup>36</sup>. Los descriptores 3D contienen información geométrica de la molécula, y aunque capturan una información más importante comparado con los otros descriptores, su principal problema es la selección correcta de la conformación 3D. Muchos de estos descriptores se han utilizado para predecir la permeabilidad intestinal de fármacos, aunque ellos difieren en complejidad y velocidad de cálculo.

Una vez calculados los descriptores moleculares a los compuestos de la base de datos y antes de proceder al desarrollo de los modelos QSPR, se realiza una separación aleatoria de los compuestos en la base de datos. Aproximadamente, entre un 20-25% de la base de datos es extraída aleatoriamente y utilizada para validar los modelos finales (validación externa). El resto de los compuestos ( $\approx 80\%$ ) se utilizan para obtener los modelos. Este grupo de moléculas es nuevamente dividido, por métodos estadísticos, en una serie de entrenamiento (80% de los compuestos) que es con la que finalmente se obtienen los modelos y en una serie de prueba (20%) que se utiliza para demostrar la robustez de los modelos creados.

Para el desarrollo de los modelos computacionales se utilizan diversas metodologías estadísticas que detallaremos a continuación.

#### **19.2.4 Metodologías estadísticas para la obtención de los modelos computacionales**

Una adecuada metodología estadística es muy importante si queremos alcanzar resultados precisos en la predicción de la permeabilidad intestinal. Varios factores propician que sea difícil modelar esta propiedad utilizando aproximaciones QSPR convencionales. Entre ellos resaltan la calidad/cantidad del dato experimental y la complejidad biológica de la propiedad<sup>37</sup>. En este sentido, un amplio rango de técnicas estadísticas diferentes han sido implementadas para desarrollar modelos predictivos de la permeabilidad intestinal.



Para la predicción de la permeabilidad intestinal se han utilizado diferentes bases de datos y metodologías estadísticas<sup>38</sup>. Aunque se han obtenido muy buenos modelos de regresión, en nuestra opinión los modelos de clasificación son la mejor opción ya que a diferencia de la solubilidad, la permeabilidad es una propiedad experimental altamente variable. Dentro de los métodos de regresión desarrollados resaltan los descritos con anterioridad en el capítulo de solubilidad: MLR, PLS, ANN y GA (ver capítulo 11).

Dentro de los métodos de clasificación utilizados para la predicción de la permeabilidad intestinal, fundamentalmente en células Caco-2, se destacan el Análisis Discriminante Lineal (LDA) y las Máquinas de Soporte Vectorial (SVM). Para el LDA, la propiedad se asigna como dos o más clases en vez del valor numérico. El LDA calcula una función discriminante que divide el espacio de descriptores moleculares para proporcionar la mejor separación entre las diferentes clases. Aunque los resultados alcanzados con este método proporcionan adecuados valores de discriminación entre las clases, no ha sido ampliamente utilizado para la predicción de la permeabilidad intestinal. Esto pudiera estar provocado por la flexibilidad del LDA en situaciones donde hay muchas variables altamente correlacionadas y su extrema rigidez cuando la frontera de las clases es complejas o no lineales. En ambos se aprecian problemas de ajuste.

Como los valores de permeabilidad son comúnmente no lineales y multidimensionales, los métodos convencionales de análisis como LDA no son suficientes para brindar predicciones exactas y precisas. Para solventar este problema se han utilizado métodos automatizados de aprendizaje supervisado como el SVM. Este método trata de encontrar una frontera o hiperplano que separe las clases de compuestos. Este hiperplano se posiciona utilizando ejemplos de la serie de entrenamiento, los cuales son conocidos como vectores de apoyo, y este subgrupo evita el sobreajuste. La distancia a la frontera puede ser utilizada para asignar un nivel de confianza a la predicción de forma tal que mientras mayor es la distancia, mayor es la confianza en la predicción. La principal ventaja de esta aproximación es que produce una única solución en comparación a las redes neuronales y su principal desventaja es que es un método de caja negra por lo que resulta difícil interpretar los resultados.

### **19.2.5 Validación de los modelos computacionales**

El potencial predictivo de cualquier modelo QSPR se puede determinar solamente a través de procesos de validación, los cuáles consisten en la predicción de la actividad o propiedad de los compuestos que no fueron incluidos para el desarrollo del modelo

(serie de entrenamiento). Este grupo de compuestos forman la serie de prueba (ver Figura 1) y se utiliza para seleccionar los mejores modelos pero no garantiza una adecuada capacidad predictiva del modelo<sup>39</sup>. Para simular un uso más real de los modelos se utiliza el grupo de validación externa (Ver Figura 1), el cual se selecciona aleatoriamente de la base de datos inicial y puede estar entre un 15 y 20% de ésta.

Muchos de los modelos desarrollados para predecir la permeabilidad no han sido suficientemente validados, prevaleciendo las validaciones de la serie de entrenamiento (validación interna) y pocos compuestos en la serie de prueba. La mayoría de los modelos descritos implementan la validación cruzada *dejando-uno-fuera* o *dejando-varios-fuera* de la serie de entrenamiento y calculan el coeficiente de correlación de esta validación ( $q^2$ ) como un criterio de robustez y capacidad predictiva del modelo<sup>40</sup>. Sin embargo, adecuados valores de  $q^2$  ( $>0.5$ ) no son una condición suficiente para garantizar su buena predictividad.

Otras de las técnicas más utilizadas para la validación interna es el *bootstrap*. Esta técnica de re-muestreo simula lo que sucedería si las compuestos son tomados de forma aleatoria. El modelo obtenido con los  $n$  compuestos seleccionados aleatoriamente se utiliza para predecir la actividad o propiedad de los compuestos excluidos<sup>41</sup>. Un alto valor de  $q^2$  en la validación por *bootstrap* es una demostración de la robustez del modelo. Con la misma finalidad se utiliza la prueba de aleatorización del valor de la propiedad, donde bajos valores del coeficiente de correlación y de  $q^2$  sugieren una adecuada robustez del modelo.

La mayoría de los modelos publicados para la predicción de la permeabilidad presentan altos valores de  $q^2$  pero han sido pobremente validados con datos externos, lo que le resta credibilidad y aplicación práctica.

### **19.3 Ventajas y desventajas de los modelos computacionales**

Diversos son los factores que pueden afectar la calidad del dato experimental y por consiguiente los intentos por modelar la permeabilidad intestinal del fármaco.

Aunque varios modelos han sido propuestos para predecir la permeabilidad intestinal, la mayoría de ellos han estado basados en bases de datos pequeñas, el valor experimental ha estado altamente influenciado por las diferencias inter-laboratorios y los modelos no han sido lo suficientemente validados con datos externos para demostrar su capacidad predictiva<sup>42</sup>. Además un problema relevante es

que muchas de las series de entrenamiento utilizadas para el desarrollo de los modelos excluyen con frecuencia los casos que son *outliers* resultando en modelos parcializados<sup>43</sup>. También se han utilizado bases de datos “propias” para desarrollar modelos computacionales y luego no se dispone de esta información para contrastar los resultados. No obstante, pese ha los problemas anteriormente planteados en la predicción de la permeabilidad, estos métodos tienen dos ventajas significativas sobre la determinación experimental de esta propiedad. En primer lugar no se requiere del compuesto sintetizado químicamente y en segundo lugar permiten el cribado de miles de compuestos en un corto intervalo de tiempo<sup>44</sup>.

## 19.4 Aplicación a la predicción de la permeabilidad intestinal dentro del BCS.

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS), desarrollado en 1995 por Gordon Amidon y col., es el marco científico para entender la absorción de fármacos en términos de la solubilidad y la permeabilidad. De acuerdo con el BCS, los fármacos se pueden clasificar en cuatro categorías, como se presenta en la Tabla 2.

*Tabla 2. El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.*

Clase	Solubilidad	Permeabilidad	Absorción	Controlador de la Absorción
I	Alta	Alta	Excelente	Vaciado gástrico
II	Baja	Alta	Buena	Disolución
III	Alta	Baja	Limitada	Permeabilidad
IV	Baja	Baja	Baja	No Específico

El valor límite para la clasificación de la permeabilidad se basa indirectamente en el grado de absorción (fracción de la dosis absorbida o biodisponibilidad no-sistémica) de una sustancia medicamentosa en humanos y directamente, en las mediciones de la tasa de transferencias de masa a través de la membrana intestinal humana. A falta de evidencias que sugieran una inestabilidad en el tracto gastrointestinal, se considera un ingrediente farmacéutico activo (IFA) como altamente permeable cuando el grado de absorción en humanos es igual o superior al 90% de la dosis administrada, tomando como base la determinación del balance de masas o comparando con la dosis intravenosa de referencia<sup>45</sup>. Sin embargo, trabajos publicados recientemente han demostrado la posibilidad de disminuir el valor de absorción en humanos a 85% para IFAs altamente permeables<sup>46</sup>.

Aunque el mayor impacto del BCS está en la regulación y desarrollo de productos orales de liberación inmediata, siendo un estándar para la exoneración de ensayos de bioequivalencia en humanos para productos del grupo I, una clasificación provisional dentro del BCS para aquellos compuestos líderes sería de gran importancia en las etapas iniciales de desarrollo de medicamentos.

Durante la última década ha existido una considerable investigación sobre los métodos *in silico* para la predicción de la permeabilidad intestinal, de forma independiente. Sin embargo, se han realizado varios intentos para establecer una clasificación provisional de esta propiedad dentro del BCS. Una de las clasificaciones más populares se basa en la estimación de la permeabilidad a través de la determinación computacional del coeficiente de partición octanol/agua (clogP)<sup>47</sup>. Otros trabajos han abordado este tema con diferentes enfoques<sup>48</sup>. En el caso de la permeabilidad, la clasificación se basa en diferentes estimaciones que siguen siendo un tanto inciertas. Según la FDA y la OMS la permeabilidad de una sustancia puede ser determinada por i)- estudios farmacocinéticos en humanos (biodisponibilidad absoluta o balance de masa) y por ii)- métodos de permeabilidad intestinal (estudios de perfusión intestinal *in vivo* en humanos, perfusión intestinal *in vivo* o *in situ* en modelos de animales, permeación *in vitro* en tejido humano o animal y permeación *in vitro* a través de monocapas de células epiteliales). Dentro de estos ensayos *in vitro* se destaca la determinación de la permeabilidad en células Caco-2, siendo un método apropiado para estimar la absorción oral de moléculas similares a fármacos en las etapas iniciales de desarrollo preclínico. Este tipo de línea celular es recomendado tanto por la FDA como la EMA como un modelo adecuado para estimar la permeabilidad intestinal.

Muchos han sido los modelos *in silico* desarrollados para predecir la permeabilidad intestinal en células Caco-2 (ver Tabla1), sin embargo prácticamente no se han aplicado para la estimación de una clasificación provisional del BCS.

## **19.5 Clasificación provisional del BCS basado en modelos *in silico* de permeabilidad.**

Tomando en consideración los aspectos mencionados anteriormente para el desarrollo de modelos computacionales (QSPR), ejemplificaremos el procedimiento para la predicción *in silico* de la permeabilidad intestinal, y estableceremos una clasificación provisional para el BCS basado en esta propiedad.

## 19.5.1 Selección de la base de datos.

Para establecer una clasificación provisional del BCS se requiere tanto datos de solubilidad como de determinación de la permeabilidad intestinal. Sin embargo en este capítulo sólo realizaremos el análisis para la permeabilidad intestinal. En este sentido se realizó una búsqueda extensiva de la literatura que nos permitió constar con una base de datos de 322 fármacos.

Para la clasificación de la permeabilidad, de acuerdo al BCS, se utilizaron los datos experimentales en células Caco-2. Para su selección, se homogenizaron las condiciones experimentales para la determinación de la permeabilidad como son: número de pases (28-65), confluencia (>85%), el ensayo de transporte después de 18-21 días de la siembra a un rango de pH entre 6.5-7.4 y a 37 °C. Se adoptó el método propuesto por Kim y col.<sup>49</sup>, tomando el valor promedio de permeabilidad del Metoprolol ( $P_{app} = 20 \times 10^{-6}$  cm/s) como valor límite de alta permeabilidad. Además este compuesto es considerado por la FDA como un compuesto estándar para la alta permeabilidad ya que su absorción en humanos es superior a 95%. Los valores medios de permeabilidad fueron seleccionados para cada fármaco y se excluyeron aquellos que estaban fuera del rango  $\pm 2D$  (desviación estándar). Finalmente el valor *cut off* seleccionado del Metoprolol, para definir la frontera entre alta y baja permeabilidad, fue de  $16 \times 10^{-6}$  cm/s.

## 19.5.2 Desarrollo de los modelos computacionales

*Cálculo de descriptores:* La estructura química de los 322 fármacos fue representada con su código SMILES. Un total de 803 descriptores 0-2D, pertenecientes a 29 familias de descriptores implementados en el programa Dragón, y 126 descriptores moleculares del programa VolSurf<sup>50</sup> fueron calculados.

*Serie de entrenamiento y prueba:* La selección de la serie de entrenamiento y la serie de prueba se realizó por un análisis de conglomerado utilizando el programa Statistica 8.0<sup>51</sup>. Los compuestos dentro de cada serie fueron seleccionados de forma aleatorio en cada conglomerado. Los compuestos seleccionados dentro de la serie de prueba (aproximadamente un 20% de la base de datos) no fueron utilizados para el desarrollo de las funciones discriminantes y sí para la validación de los modelos.

*Desarrollo de los modelos y selección de las variables:* Se utilizaron tres algoritmos de clasificación para establecer relaciones entre la estructura y la permeabilidad intestinal. Ellos son el Análisis Discriminante Lineal (LDA), el Análisis Discriminante Cuadrático (QDA) y la Regresión Logística Binaria (BLR). Los

modelos se desarrollaron utilizando los programas SPSS<sub>s2</sub> y Statistica 8.0. Para la identificación de las variables apropiadas para el modelo se siguió el método “stepwise”. En el caso del LDA y QDA, en cada paso se revisaron y evaluaron todas las variables, considerando el grado de significación (p) o la razón de Fisher (F). Luego se aplicó la técnica del “mejor subgrupo” y se consideró el valor de la lambda de Wilks como parámetro de significación. En el caso de la BLR se siguió un proceso de selección condicional.

*Validación de los modelos:* De los tres modelos obtenidos con diferentes grupos de descriptores, se seleccionó el mejor para cada algoritmo de clasificación. Finalmente, se construyó un sistema consenso con las predicciones de los tres modelos seleccionados. El desempeño de los modelos se evaluó a través de la determinación de: la razón de falsos positivos, falsos negativos, verdaderos positivos y verdaderos negativos, el coeficiente de correlación de Matthews y la exactitud de la predicción. Adicionalmente se utilizó la curva ROC (*receiver operating characteristic curve*) para evaluar la exactitud de las funciones discriminantes.

*Aplicación a la predicción del BCS:* Los modelos fueron validados con datos publicados de compuestos clasificados en el BCS. Se empleó una serie externa de 57 compuestos clasificados en el BCS y procedentes de referencias validadas<sub>s3</sub>. Con el objetivo de tener predicciones fiables se tomó en consideración el dominio de aplicación definido por el espacio químico de las series de entrenamiento y se utilizó el cálculo del *leverage*.

### 19.5.3 Resultados

*Clasificación de la permeabilidad in-vitro de los fármacos:* Los valores medios de permeabilidad para la base de datos estuvieron en un rango de  $0.049 \times 10^{-6}$  cm/s (Rafinosa) a  $378.33 \times 10^{-6}$  cm/s (Etilil Estradiol). Los valores medios y la mediana de la data fueron  $25.1 \times 10^{-6}$  cm/s y  $17.3 \times 10^{-6}$  cm/s, respectivamente. El Metoprolol (compuesto estándar/referencia) fue la frontera de clasificación de los compuestos con alta permeabilidad. Sin embargo, el valor de fracción absorbido en humanos para el Metoprolol es mayor del 95%, lo que es más conservador que los criterios de permeabilidad establecidos por las directrices de la FDA ( $F_a \geq 90\%$ ) y la WHO ( $F_a \geq 85\%$ ). Para la selección final del valor de permeabilidad a utilizar para la clasificación se siguió el método propuesto por Kim y col., donde el límite inferior del 90% del intervalo de confianza para el valor medio de permeabilidad del compuestos de referencia (Metoprolol) debe ser mayor que 0.8, lo que es un criterio aceptable para compuestos con alta permeabilidad. Siguiendo este criterio, 167 compuestos fueron clasificados como de alta permeabilidad, 51 compuestos caen en

el rango [0.8-1.25] del intervalo de confianza del Metoprolol y 26 compuestos tienen una permeabilidad menor que el Metoprolol.

*Modelos Computacionales para predecir la clasificación en el BCS a partir de la estructura química:* la permeabilidad se modeló de forma independiente. La clasificación computacional final del BCS se alcanzó usando un sistema de voto consenso. Los modelos obtenidos para la permeabilidad se describen a continuación.

**Tabla 3.** Desempeño de los tres mejores modelos para la clasificación provisional de la permeabilidad

Técnica	MCC	Exactitud	Especificidad	Sensibilidad	Precisión
	% (Tr/Ts) <sup>a</sup>				
LDA (P1)	0.63/0.69	81.6/84.9	81.9/85.7	81.4/84.2	82.0/88.9
QDA (P2)	0.65/0.76	82.4/87.9	81.1/89.3	83.7/86.8	81.8/91.7
BLR (P3)	0.64/0.73	82.0/86.4	79.5/89.3	84.5/84.2	80.7/91.4
VoteP	0.70/0.77	85.2/87.9	85.0/ 96.4	85.3/ 81.6	85.3/96.9
Ecuaciones matemáticas					
$CLASS_{Papp}(+/-) = -5.91 + 0.01 \times P\_VSA\_s\_6 - 1.62 \times nRNR2 - 0.74 \times C-016 + 2.64 \times CATS2D\_08\_AP + 4.23 \times LLS\_01 + 0.01 \times WN2 + 3.79 \times CACO2$					
$N = 256 \quad \lambda = 0.57 \quad D^2 = 2.81 \quad F = 22.24 \quad p < 0.0001$					
$CLASS_{Papp}(+/-) = 0.32 - 1.02 \times GATS2m + 0.95 \times GATS2s - 0.55 \times nRNR2 - 0.52 \times B03[O-O] - 1.95 \times SAdon + 0.82 \times LLS\_01 + 3.46 \times nC=N-N<\times B04[O-CI] + 0.37 \times nRNR2 \times SAdon + 0.32 \times CATS2D\_03\_DD \times SAdon - 0.46 \times B08[C-O]^2$					
$N = 256 \quad \lambda = 0.55 \quad D^2 = 3.18 \quad p < 0.0001$					
$Ln(P+/P-) = 5.49 - 2.05 \times nRNR2 + 3.74 \times CATS2D\_07\_DP + 1.88 \times CACO2 - 5.04 \times GATS2m - 22.48 \times nFuranes - 0.02 \times SAdon - 1.05 \times nRCOOH$					

<sup>a</sup>Medida de desempeño de la serie de entrenamiento y prueba; <sup>b</sup>Área bajo la curva ROC determinada en la serie de prueba por supuestos no-paramétricos en el 95% del intervalo de confianza asintótico.

Como se puede observar de la Tabla 3 los tres mejores modelos estadísticos para clasificar la permeabilidad en el PBC muestran un buen desempeño, teniendo el modelo consenso un comportamiento superior con una precisión general de 85.3% para la serie de entrenamiento y de un 96.9% para la serie de prueba.

Una predicción robusta de la clasificación *in silico* del PCS es muy útil en las etapas iniciales de descubrimiento y desarrollo de fármacos, especialmente para aquellas nuevas entidades moleculares cuyos rangos de dosis terapéutica no están disponibles en las etapas preclínicas. Para ello evaluamos, de forma similar a como se hizo para la solubilidad, una serie externa de 57 fármacos del listado de medicamentos esenciales de la WHO. Como muchos de estos fármacos no se les describe una clasificación conclusiva, la clasificación *in silico* fue considerada exacta si ésta se corresponde con una de las dos clases. De los 22 fármacos predichos como clase I

del PBC, 20 son clase I ó I/III del BCS (91% de exactitud). Mientras que 9 de 11 fármacos predichos como clase II del PBC son clase II o II/IV del BCS (82% de exactitud). De los 13 fármacos predichos como clase III del PBC, 11 son clase III o I/III del BCS (85% de exactitud). Finalmente, 6 fármacos fueron predichos como clase IV del PBC, 3 son clase II/IV y 1 es clase III/IV del BCS (Ver Tabla 6). Estos resultados evidencian que la predicción *in silico* correlacionan bastante bien con la clasificación de WHO del BCS para esta serie de datos.

Tabla 4. Validación externa de 57 fármacos del listado de medicamentos esenciales de la WHO

Comp.	WHO BCS	In silico PBC	Comp.	WHO BCS	In silico PBC	Comp.	WHO BCS	In silico PBC
Abacavir	III	III	Cloxacillin	III	III	Mercaptopurina	II/IV	II
Acetazolamida	II/IV	IV	Ciclofosfamida	I	I	Mesalamina	II/IV	IV
Alopurinol	I	I	Dapsona	II	I	Metronidazol	I	I
Amlodipina	I	I	Dietilcarbamazina	I	I	Niclosamida	II/IV	II
Amodiaquina	I/III	II	Diloxanide	II/IV	II	Nicotinamida	I	I
Artemeter	III/I V	IV	Ergocalciferol	III	I/II	Nifurtimox	III	III
Acido Ascórbico	I	I/III	Ergotamina Tartrato	III	IV	Noretisterona	I	I
Azatioprina	II/IV	II	Etambutol	III	III	Oxamniquina	II/IV	III
Benznidazol	III	II	Etosuximida	I/III	I	Penicilamina	III	III
Biperiden	I/III	III	Glibenclamida	II/IV	II	Praziquantel	II	II
Carbidopa	I/III	III	Gliceril trinitrato	I/III	III	Procarbazina	I/III	I
Cefixime	II/IV	IV	Acido Iopanoico	II	II	Proguanil	I	III
Clorambucilo	I/III	I	Isoniazida	I/III	I	Pirazinamida	I/III	I
Clorfenamine	I/III	I	Isosorbide dinitrato	I/III	III	Piridostigmina	III	I
Acido Clavulánico	I/III	III	Levamisol	I/III	I	Quinina	I	I
Clindamicina	I	I	Levonorgestrel	I	I	Retinol palmitato	II/IV	II
Clofazimina	III/I V	II/I V	L-metionina	I	I	Senna	-	IV
Clomipene	I/III	I	Lumefantrina	III/I V	II/I V	Sulfadoxina	I/III	III
Clomipramina	I/III	I	Mefloquina	II/IV	II	Triclabendazol	III/I V	II/I V

## 19.6 Conclusiones y Perspectivas

La predicción de la permeabilidad intestinal de los fármacos es una de las propiedades farmacocinéticas que han sido siempre un reto para los investigadores



que trabajan en el diseño computacional de fármacos. Durante la última década se han desarrollado numerosos modelos cuantitativos y cualitativos alcanzándose adecuados resultados. Sin embargo, actualmente se continúan generando nuevos modelos *in silico* de forma combinada o añadiendo nueva información sobre procesos relacionados.

Varios factores pueden afectar los resultados de los modelos ya sea relacionados con la base de datos experimental, los descriptores moleculares utilizados o la metodología estadística empleada para obtener los modelos. Con relación a las bases de datos el principal problema está relacionado con el tamaño de la misma, con su disponibilidad y con la calidad del dato experimental, lo que hace que muchos modelos tengan una limitada capacidad predictiva. Además aunque se han desarrollado modelos con grandes bases de datos, éstas pertenecen a grandes farmacéuticas, por lo que generalmente el dato primario no está disponible a la comunidad científica, lo que limita la posibilidad de obtener mejores modelos.

En nuestra opinión, el uso de una base de datos cuidadosamente seleccionada, con información sobre los principales eventos o factores vinculados con la solubilidad, que permitan desarrollar diferentes tipos de modelos (modelo consenso) para esta propiedad, puede ser una importante estrategia.

En este sentido quisiéramos resaltar varios aspectos importantes que en nuestra opinión pudieran ser considerados para el desarrollo futuro de modelos computacionales para la predicción de la solubilidad y la clasificación dentro del BCS.

Se debe incrementar la calidad y la cantidad de compuestos en la base de datos, construida a partir de ensayos experimentales confiables. Se debe considerar la variabilidad inter e intra-laboratorio para la propiedad que se modela y el proceso de transporte activo principalmente para la predicción de la permeabilidad.

La combinación de dos o más modelos para la misma propiedad, basados en principios diferentes, podría brindar una mayor confianza y una ayuda en la toma de decisión. Los resultados de los modelos *in silico* deben ser validados experimentalmente.

En este capítulo hemos realizado un análisis sobre el desarrollo de los modelos computacionales QSPR y su aplicación en la predicción de la permeabilidad intestinal. Se han discutido cada uno de los pasos para el desarrollo de los modelos computacionales, así como su aplicación a la predicción de esta propiedad. Aunque se han realizado esfuerzos significativos para acelerar la determinación experimental

de esta propiedad, los métodos *in silico* han ganado en popularidad por su capacidad para reducir costes y tiempo, y por la cualidad intrínseca de cribar una gran cantidad de compuestos antes de la síntesis.

## 19.7 Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo financiero del proyecto DCI-ALA/ALFA III (2010) 29: Red para el desarrollo de metodologías biofarmacéuticas racionales que incrementen la competencia y el impacto social de las Industrias Farmacéuticas Locales (Red-Biofarma).

---

<sup>1</sup> H. Bohets, P. Annaert, G. Mannens, L. Van Beijsterveldt, K. Anciaux, P. Verboven, W. Meuldermans, K. Lavrijsen, *Curr Top Med Chem* 2001, 1, 367

<sup>2</sup> B. Sarmento, A. F., S. B. da Silva, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2012.

<sup>3</sup> I. J. Hidalgo, T. J. Raub, R. T. Borchardt, *Gastroenterology* 1989, 96, 736.

<sup>4</sup> S. Yee, *Pharm Res* 1997, 14, 763.

<sup>5</sup> M. Kansy, F. Senner, K. Gubernator, *J Med Chem* 1998, 41, 1007.

<sup>6</sup> A. L. Ungell, S. Nylander, S. BERGSTRAND, A. SJOBERG, H. Lennernas, *J Pharm Sci* 1998, 87, 360.

<sup>7</sup> L. Barthe, J. Woodley, G. Houin, *Fundam Clin Pharmacol* 1999, 13, 154.

<sup>8</sup> B. H. Stewart, O. H. Chan, R. H. Lu, E. L. Reyner, H. L. Schmid, H. W. Hamilton, B. A. Steinbaugh, M. D. Taylor, *Pharm Res* 1995, 12, 693.

<sup>9</sup> A. Dahan, H. Lennernas, G.L. Amidon, *Mol Pharm*, 2012, 9, 1847.

<sup>10</sup> M. S. Ku, *AAPS J* 2008, 10, 208.

<sup>11</sup> M. A. Cabrera-Pérez, H. Pham-The, M. Bermejo, I. González-Álvarez, T. Garrigues, *Mini Rev Med Chem* 2012, 12, 534.

<sup>12</sup> a)OECD, in *series on Testing and Assessment*, OECD Environment Health and Safety Publications, 37<sup>th</sup> Joint Meeting of the Chemicals Committee and Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology, 2004; b)OECD, in *Series on Testing and Assessment. No. 58*, OECD Environment Health and Safety Publications, 2006; c)OECD, in *OECD Series on Testing and Assessment No. 69. ENV/JM/MONO(2007)2*, Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, France, 2007, p. 154.

<sup>13</sup> D. Fourches, E. Muratov, A. Tropsha, *J Chem Inf Model* 2010, 50, 1189.

<sup>14</sup> P. Artursson, J. Karlsson, *Biochem Biophys Res Commun* 1991, 175, 880.

<sup>15</sup> M. Yazdanian, S. L. Glynn, J. L. Wright, A. Hawi, *Pharm Res* 1998, 15, 1490.

<sup>16</sup> G. Camenisch, J. Alsenz, H. van de Waterbeemd, G. Folkers, *Eur J Pharm Sci* 1998, 6, 313.

- 
- <sup>17</sup> P. Stenberg, U. Norinder, K. Luthman, P. Artursson, *J Med Chem* 2001, *44*, 1927.
- <sup>18</sup> S. Fujiwara, F. Yamashita, M. Hashida, *Int J Pharm* 2002, *237*, 95.
- <sup>19</sup> T. J. Hou, W. Zhang, K. Xia, X. B. Qiao, X. J. Xu, *J Chem Inf Comput Sci* 2004.
- <sup>20</sup> Y. Marrero Ponce, M. A. Cabrera, V. Romero, M. Bermejo, D. Siverio, F. Torrens, *Internet Electron J Mol Des* 2005, *4*, 124.
- <sup>21</sup> H. H. Refsgaard, B. F. Jensen, P. B. Brockhoff, S. B. Padkjaer, M. Guldbbrandt, M. S. Christensen, *J Med Chem* 2005, *48*, 805.
- <sup>22</sup> J. A. Castillo-Garit, Y. Marrero-Ponce, F. Torrens, R. Garcia-Domenech, *J Pharm Sci* 2008, *97*, 1946.
- <sup>23</sup> P. Paixao, L. F. Gouveia, J. A. Morais, *Eur J Pharm Sci* 2010, *41*, 107.
- <sup>24</sup> H. Pham The, I. Gonzalez-Álvarez, M. Bermejo, V. Mangas Sanjuan, I. Centelles, T. M. Garriges, M. A. Cabrera-Pérez, *Mol Inf* 2011, *30*, 376.
- <sup>25</sup> a)H. Pham-The, I. González-Álvarez, M. Bermejo, T. Garrigues, H. Le-Thi-Thu, M. A. Cabrera-Pérez, *Mol Inf* 2013, *32*, 459; b)H. Pham-The, T. Garrigues, M. Bermejo, I. Gonzalez-Alvarez, M. C. Monteagudo, M. A. Cabrera-Perez, *Mol Pharm* 2013, *10*, 2445.
- <sup>26</sup> G. Cruciani, M. Pastor, W. Guba, *Eur J Pharm Sci* 2000, *11 Suppl 2*, S29.
- <sup>27</sup> K. Nakao, M. Fujikawa, R. Shimizu, M. Akamatsu, *J Comput Aided Mol Des* 2009, *23*, 309.
- <sup>28</sup> M. Akamatsu, M. Fujikawa, K. Nakao, R. Shimizu, *Chem Biodivers* 2009, *6*, 1845.
- <sup>29</sup> a)F. Lombardo, E. Gifford, M. Y. Shalaeva, *Mini Rev Med Chem* 2003, *3*, 861; b)J. Gola, O. Obrezanova, E. Champness, M. Segall, *QSAR Comb Sci* 2006, *25*, 1172
- <sup>30</sup> D. S. Wishart, *Drugs R D* 2007, *8*, 349.
- <sup>31</sup> R. Todeschini, V. Consonni, *Handbook of Molecular Descriptors*, Wiley VCH, Weinheim, Germany, 2000.
- <sup>32</sup> R. Todeschini, V. Consonni, A. Mauri, M. Pavan, 2006
- <sup>33</sup> C. Steinbeck, Y. Han, S. Kuhn, O. Horlacher, E. Luttmann, E. L. Willighagen, *J Chem Inf Comput Sci* 2003, *43*, 493.
- <sup>34</sup> Y. Gutierrez, E. Estrada, 2004.
- <sup>35</sup> G. Cruciani, P. Crivori, P. A. Carrupt, B. Testa, *J Mol Struct (Theochem)* 2000, *503*, 17.
- <sup>36</sup> U. Norinder, C. A. Bergstrom, *ChemMedChem* 2006, *1*, 920.
- <sup>37</sup> D. Butina, M. D. Segall, K. Frankcombe, *Drug Discov Today* 2002, *7*, S83.
- <sup>38</sup> M. A. Cabrera-Pérez, H. Pham-The, M. Bermejo, I. González-Álvarez, T. Garrigues, *Mini Rev Med Chem* 2012, *12*, 534.
- <sup>39</sup> A. Tropsha, *Mol Inf* 2010, *29*, 476.
- <sup>40</sup> A. Golbraikh, A. Tropsha, *J Mol Graph Model* 2002, *20*, 269.
- <sup>41</sup> A. Tropsha, P. Gramatica, V. K. Gombar, *QSAR Comb Sci* 2003, *22*, 69.
- <sup>42</sup> T. Hou, J. Wang, W. Zhang, W. Wang, X. Xu, *Curr Med Chem* 2006, *13*, 2653.
- <sup>43</sup> A. Dokoumetzidis, L. Kalantzi, N. Fotaki, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2007, *3*, 491.

- 
- <sup>44</sup> R. Gozalbes, M. Jacewicz, R. Annad, K. Tsaioun, A. Pineda-Lucena, *Bioorg Med Chem* 2011, *19*, 2615.
- <sup>45</sup> CDER/FDA, Federal Drug and Food Administration: Rockville, MD, USA, Center for Drug Evaluation and Research, 2000.
- <sup>46</sup> EMA, London, January 2010, pp. 25.
- <sup>47</sup> N. A. Kasim, M. Whitehouse, C. Ramachandran, M. Bermejo Sanz, H. Lennernas, A. S. Hussain, H. E. Junginger, S. A. Stavchansky, K. K. Midha, V. P. Shah, G. Amidon, *Mol Pharm* 2004, *1*, 85.
- <sup>48</sup> a)T. Takagi, C. Ramachandran, M. Bermejo, S. Yamashita, L. X. Yu, G. L. Amidon, *Mol Pharm* 2006, *3*, 631; b)M. Lindenberg, S. Kopp, J. B. Dressman, *Eur J Pharm Biopharm* 2004, *58*, 265; c)M. V. Varma, I. Gardner, S. J. Steyn, P. Nkansah, K. S. Fenner, A. F. El-Kattan, *Mol Pharm* 2012; d)R. Shawahna, N. U. Rahman, *DARU* 2011, *19*, 83.
- <sup>49</sup> J. S. Kim, S. Mitchell, P. Kijek, Y. Tsume, J. Hilfinger, G. L. Amidon, *Mol Pharm* 2006, *3*, 686.
- <sup>50</sup> version 1.0.4 ed., available from Molecular Discovery Ltd., London, U.K. (<http://www.moldiscovery.com>).
- <sup>51</sup> StatSoft, 8.0 ed., 2007.
- <sup>52</sup> SPSS (Statistical Software for the Social Sciences), 17.0 ed., For more information about SPSS® software products, please visit the Web site at <http://www.spss.com>, SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2008
- <sup>53</sup> In *WHO Technical Report Series, No. 937*, 40th ed., WHO Expert Committee on Specification for Pharmaceutical Preparations, 2006, pp. 391.

## 20. Sección velocidad de disolución: Metodologías de obtención de perfiles de disolución. Aparatos, parámetros del ensayo. Cinética y comparación

Virginia Sánchez Montoya<sup>a</sup>, Patricia Carreño González<sup>a</sup>

*a Escuela de Química y Farmacia, Facultad de Farmacia  
Universidad de Valparaíso, Valparaíso  
Chile*

### 20.1 Disolución

La absorción de un fármaco administrado en una forma farmacéutica sólida por vía oral depende de su liberación desde ésta, su disolución o solubilización bajo condiciones fisiológicas y su permeabilidad a través del tracto gastrointestinal, lo anterior hace que la disolución *in vitro* sea una prueba relevante para la predicción de la eficiencia *in vivo* del fármaco y para la identificación de problemas potenciales de biodisponibilidad *in vivo*.

Las diferencias observadas *in vivo* entre la velocidad y la cantidad absorbida de un fármaco, en dos productos sólidos orales farmacéuticamente equivalentes, se puede deber a diferencias en la disolución del fármaco *in vivo*. Sin embargo, cuando la disolución *in vivo* de una forma farmacéutica oral sólida de liberación inmediata es rápida en relación con el vaciamiento gástrico y además el fármaco tiene alta permeabilidad, es poco probable que la velocidad y la magnitud de la absorción del fármaco dependan de la disolución y/o el tiempo de tránsito gastrointestinal del principio activo. Bajo tales circunstancias, es posible que no sea necesario demostrar la biodisponibilidad o bioequivalencia *in vivo* para los productos farmacéuticos que contienen principios activos altamente solubles y altamente permeables, correspondientes a la Clase 1 del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, (SCB), siempre que los excipientes usados en la forma farmacéutica no afecten significativamente la absorción de los ingredientes activos. Los fundamentos del SCB se pueden usar para justificar bioexenciones de formas farmacéuticas sólidas

de liberación inmediata que contienen fármacos activos altamente solubles, altamente permeables y que exhiben una disolución *in vitro* rápida usando los métodos de prueba recomendados para determinar solubilidad, permeabilidad y disolución *in vitro*.

Las pruebas de disolución *in vitro* para formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata, tales como comprimidos y cápsulas, se usan para:

- Evaluar calidad entre lotes de producción,
- Guiar el desarrollo de formulaciones
- Asegurar la continuidad de la calidad y eficiencia después de cambios en la formulación, el proceso de manufactura, el sitio de fabricación o aumento en escala del proceso de fabricación

El proceso de disolución global de un fármaco liberado desde una forma farmacéutica sólida se representa mediante el perfil de disolución, que corresponde a la representación gráfica de la cantidad acumulativa de fármaco disuelto en función del tiempo.

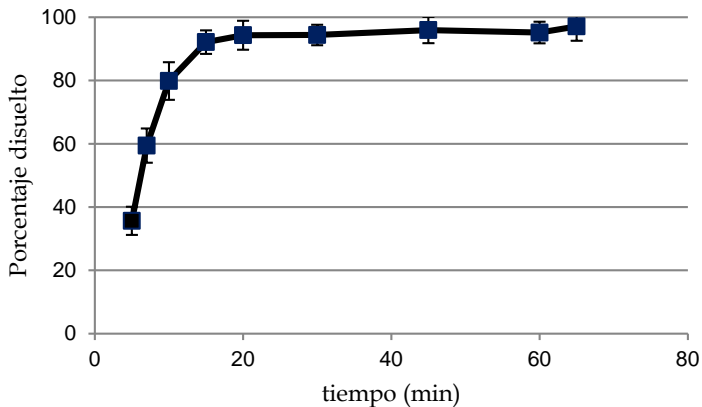


Figura 1. Perfil de disolución

## 20.2 Comparación de perfiles de disolución

La comparación de perfiles de disolución es utilizada para evaluar la calidad y eficiencia continua después de cambios de formulación, proceso de manufactura,

sitio de fabricación o aumento en escala, para eximir de los requisitos de bioequivalencia a las concentraciones menores de una forma de dosificación y para apoyar exenciones de bioequivalencia.

La comparación de perfiles de disolución se usa con el fin de evaluar si dos productos tienen un proceso de disolución similar. Los perfiles cinéticos de disolución se pueden considerar similares en razón de la similitud global de los perfiles y en cada punto temporal de disolución de la muestra. Existe un amplio número de modelos matemáticos y estadísticos que permiten comparar perfiles cinéticos de disolución y determinar la similitud que existe entre dos formulaciones. Un enfoque sencillo e independiente del modelo cinético utiliza un factor de similitud (ecuación 1), que es una transformación logarítmica recíproca de la raíz cuadrada de la suma del error de las diferencias al cuadrado y constituye una medición de la similitud en la disolución porcentual (%) entre ambas curvas.

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\} \quad (1)$$

Donde:

log = logaritmo base 10

n = número de tiempos de muestreo

R<sub>t</sub> = cantidad disuelta (%) promedio de la referencia a cada tiempo de muestreo t

T<sub>t</sub> = cantidad disuelta (%) promedio del producto de prueba a cada tiempo de muestreo t

El factor de similitud entrega un resultado que va desde 0 a 100. Es 100 cuando los perfiles de disolución del producto de prueba y de referencia son idénticos y 0 cuando los perfiles son diferentes. Este método es el más conveniente para la comparación de los perfiles de disolución cuando hay de tres a cuatro o más puntos temporales de disolución disponibles.

El factor de similitud es el método más popular, ya que ha sido adoptado por el Center of Drug Evaluation and Research (FDA) y por el Human Medicines Evaluation Unit of Medicinal Products (EMA) como un criterio para asegurar la similitud entre 2 perfiles de disolución in vitro y es incluido en numerosas guías para la industria.

### 20.3 Uso del factor de similitud

Se debe evaluar 12 unidades posológicas de los productos farmacéuticos a comparar en la determinación de cada perfil de disolución, tanto del producto de referencia como del producto en evaluación. Los dos perfiles se consideran similares o equivalentes cuando el valor de  $f_2$  es  $\geq 50$ .

Para que los resultados obtenidos al comparar los perfiles de disolución usando el  $f_2$  sean validos o útiles se deben tener las siguientes consideraciones:

Para usar datos promedio de disolución, el coeficiente de variación no deberá ser más del 20% en los primeros puntos y no más del 10% en los demás puntos.

Se deberá recolectar las muestras en un número suficiente de intervalos para caracterizar el perfil de disolución del producto medicamentoso (p.ej., 10, 15, 20 y 30 minutos).

Los tiempos de disolución de los dos perfiles de disolución que se comparan deben ser los mismos.

Se requiere un mínimo de 3 puntos (excluido 0) para el cálculo de  $f_2$ .

Se debe incluir un punto después que se ha disuelto el 85% del fármaco.

## **20.4 Aparatos y procedimientos**

Los estudios de disolución se deben realizar en el Aparato de disolución USPI a 100 rpm o en el Aparato II de disolución a 75 rpm usando 900 mL de los siguientes medios de disolución:

Solución de pH 1,2: 0,1 N de HCl o Fluido Gástrico Simulado USP sin enzimas;

Solución tampón de pH 4,5: buffer acetato y

Solución tampón de pH 6,8: Fluido Intestinal Simulado USP sin enzimas. Para cápsulas y comprimidos recubiertos de gelatina, se puede usar Fluidos Gástrico o Intestinal Simulado USP (con enzimas).

## **20.5 Validacion de los estudios de disolución**

Se entiende por validación al proceso mediante el cual se demuestra la aplicabilidad de un método analítico y consiste en el establecimiento de una evidencia



documentada que demuestre con alto grado de probabilidad que el método es confiable para producir el resultado previsto dentro de los intervalos definidos.

Para que los resultados experimentales de los estudios de disolución sean confiables, los métodos utilizados deberán ser apropiadamente validados:

### **Prueba de aptitud del sistema**

Calibración mecánica: Antes de realizar las mediciones, se recomienda verificar los siguientes parámetros críticos del procedimiento de disolución: horizontalidad, centrado y vaivén de los ejes, vaivén del canastillo, fluctuaciones de temperatura, velocidad de rotación de los ejes y altura del canastillo o paleta.

Calibración química: se recomienda emplear los 2 calibradores estándares de la USP, Comprimidos de Prednisona y Comprimidos de Ácido Salicílico, y verificar las especificaciones señaladas para los aparatos de disolución 1 o 2, según corresponda.

### **Medio de disolución**

Los medios de disolución se deben desairear, ya que los gases disueltos pueden causar la formación de burbujas que pueden alterar los resultados de la disolución. Un método para eliminar los gases es calentar el medio de disolución, mezclando suavemente, hasta aproximadamente 41°C e inmediatamente filtrar al vacío utilizando un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm o menor mezclando vigorosamente y continuar mezclando al vacío durante aproximadamente 5 minutos (USP 33).

### **Validación de la metodología analítica**

Las técnicas más usadas para el análisis de las muestras extraídas en los estudios de disolución son la espectrofotometría ultravioleta y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Una ventaja de la técnica HPLC es que permite detectar más fácilmente la interferencia de algunos excipientes y además optimizar la sensibilidad del análisis.

Los parámetros recomendados para la validación del método analítico utilizado son: linealidad, exactitud, precisión y robustez <sup>1,567</sup>. Además se recomienda documentar la especificidad del método, la influencia del sistema de filtración de las muestras extraídas desde los vasos de disolución, la estabilidad del analito en las soluciones y la precisión intermedia y los límites de cuantificación y detección del analito.

El ambiente de disolución puede ser afectado por factores externos que afectarían la prueba de disolución. Estos factores incluyen:

## **Vibración**

El aparato de disolución debe ser ubicado donde no sea afectado por cualquier forma de vibración. Idealmente no debería haber ningún otro equipo en el mesón que no esté involucrado en el test de disolución.

## **Aire acondicionado**

Un aumento del flujo de aire causado por las unidades de calentamiento/enfriamiento de aire pueden causar altas velocidades de evaporación y también fluctuaciones en la temperatura en el vaso de disolución. Para evitar esto se deberían usar una tapa en cada vaso. Además, se debería optimizar el desplazamiento del flujo de aire alrededor del equipo para evitar efectos adversos en los vasos.

## **Instalaciones de limpieza**

Los lavaderos deberían estar instalados cerca, con acceso a agua de alta pureza para ayudar a la limpieza adecuada de los vasos y la preparación del medio. Los vasos dedicados se deberían mantener en el lugar y ser seriados junto con los ejes. Los equipos de preparación se deberían mantener en un área separada del ambiente de disolución por posibles efectos de vibración.

## **20.6 Modelos cinéticos**

Existen varios modelos matemáticos que describen la cinética de disolución de formas farmacéuticas de liberación inmediata y de liberación modificada.

La ecuación fundamental para estudiar la velocidad de disolución de un sólido en el seno de un líquido fue desarrollada por Noyes y Whitney en 1897, a partir de las leyes de Fick que rigen los procesos de difusión y, posteriormente, modificada por Brunner y cols<sup>89</sup>

$$\frac{dC}{dt} = k \cdot S \cdot (C_s - C) \quad (2)$$

en la que:

$dC/dt$  = variación de la concentración de fármaco en solución por unidad de tiempo (velocidad de disolución)

$k$  = constante de velocidad

$S$  = superficie del sólido

$C$  = concentración de fármaco en solución a un tiempo  $t$

$C_s$  = concentración a saturación del fármaco en el disolvente

*In vivo*, luego de la administración de un fármaco, éste se va absorbiendo a medida que se disuelve en el tracto gastrointestinal, se presenta la situación en que  $C_s \gg C$ , por lo que  $C$  tiene un valor despreciable respecto de  $C_s$ . Además,  $k$  y  $C_s$  son constantes para una determinada especie cristalina de un fármaco, por lo cual la ecuación (2) se puede escribir

$$\frac{dc}{dt} = k \cdot S \quad (3)$$

### Cinética de orden cero

Si la ecuación (3) se expresa como cantidad disuelta en función del tiempo, la disolución de un principio activo desde una forma farmacéutica que no se desintegra, cuya área superficial no cambia y libera lentamente al fármaco bajo condiciones sink, puede ser representada por la siguiente ecuación

$$Q_t = K_0 t \quad (4)$$

donde  $Q_t$  es la cantidad de fármaco disuelta a tiempo  $t$  y  $K_0$  es la constante de velocidad de disolución de orden cero. Conforme a esta expresión, la velocidad con que el sólido se disuelve en el solvente es constante en el tiempo e independiente de la concentración del soluto y el gráfico de la cantidad que se va disolviendo a diferentes tiempos ( $Q_t$ ) en función del tiempo, es una recta cuya pendiente o inclinación es la constante de velocidad del proceso, como se indica en la figura 2.

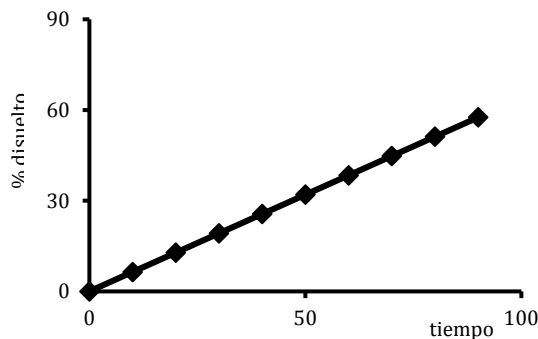


Figura 2. Disolución de orden cero

Esta relación se puede usar para describir la disolución de un fármaco desde varios tipos de formas farmacéuticas de liberación modificada, como algunos sistemas transdérmicos, osmóticos, y matriciales, entre otras.

### Cinética de orden uno

En este caso la superficie es directamente proporcional a la cantidad remanente de fármaco en la forma farmacéutica, es decir,  $S = K (Q_{\infty} - Q)$  y la ecuación (3) se puede escribir

$$\frac{d(Q_{\infty}-Q)}{dt} = -K(Q_{\infty} - Q) \quad (5)$$

e integrando entre los tiempos 0 y t, se obtiene

$$(Q_{\infty} - Q) = Q_{\infty} e^{-Kt} \quad (6)$$

o al aplicar logaritmo

$$\log(Q_{\infty}- Q) = \log Q_{\infty} - \frac{K}{2,303} t \quad (7)$$

De acuerdo a la ecuación (7), la representación gráfica de la cantidad remanente de fármaco en escala logarítmica en la ordenada versus el tiempo en la abcisa, es una recta de cuya pendiente se obtiene la constante de velocidad de disolución de orden uno.

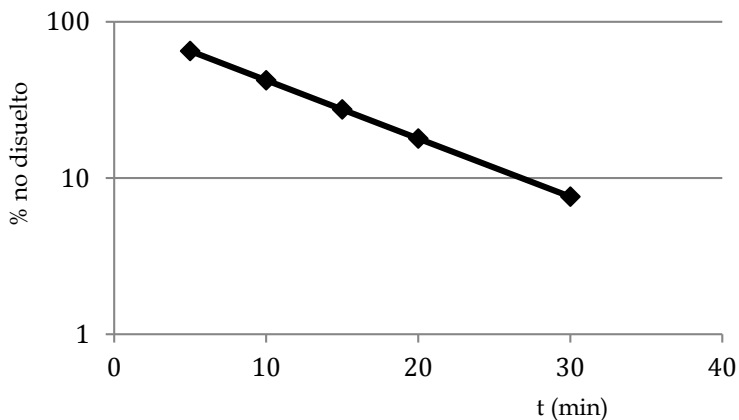


Figura 3. Disolución de orden uno

### Cinética de raíz del tiempo

Este tipo de cinética se ajusta a fármacos formulados en sistemas de liberación modificada o en formas farmacéuticas semisólidas. En ambos tipos de productos, la determinación de la cantidad de principio activo disuelto en función del tiempo se realiza aplicando la ecuación de Higuchi:

$$Q = \sqrt{tDC_s(2C - C_s)} \quad (8)$$

donde Q es la cantidad de fármaco liberado por unidad de área, D es el coeficiente de difusión del fármaco en la matriz; C es la concentración inicial de fármaco y C<sub>s</sub> es la solubilidad del fármaco en la matriz.

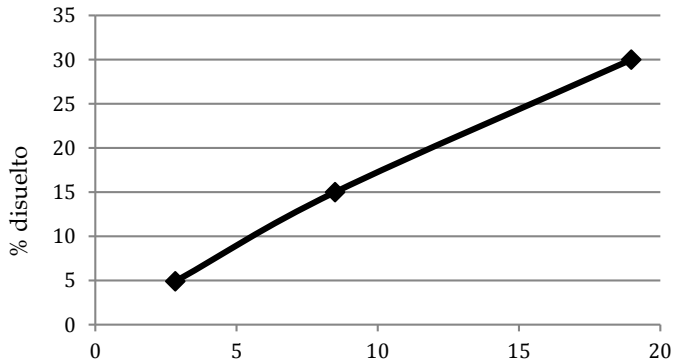


Figura 4. Disolución con cinética raíz del tiempo

### Cinética de raíz cúbica

La cinética de raíz cúbica se aplica a fármacos con partículas de forma esférica o cuya forma geométrica inicial se mantiene constante, produciéndose una disminución de superficie asociada a la disolución. En este caso, la variación de la superficie del sólido es una función relacionada con la raíz cúbica del cuadrado del volumen de las partículas:

$$Q = Q_{\infty} - \left[ Q_{\infty}^{\frac{1}{3}} - K_d t \right]^3 \quad (9)$$

donde Q es la cantidad de fármaco disuelta a tiempo t, Q<sub>∞</sub> es la cantidad máxima de fármaco susceptible de disolverse y K<sub>d</sub> es la constante de velocidad del proceso de disolución.<sup>10</sup>

<sup>1</sup> FDA. Guidance for industry: Dissolution Testing of Immediate Release solid Oral Dosage Forms. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Rockville, MD. 1997

- 
- <sup>2</sup> Moore, J. W. Flanner, H. H. "Mathematical comparison of dissolution profiles". *Pharm. Tech.* 1996, 20, 64 – 74
- <sup>3</sup> Shah, V. P. Tsong, Y. Sathe, P. Liu, J - P. "In vitro dissolution profile comparison – statistics and analysis of the similarity factor  $f_2$ ". *Pharm. Res.* 1998, 15, 889 – 896
- <sup>4</sup> Global Harmonization Task Force, Study Group 3. Quality Management Systems – Process Validation Guidance. 2004
- <sup>5</sup> "Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology" *International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements.* Q2(R1) 2005
- <sup>6</sup> WHO. World Health Organization Expert Committee on Specifications for pharmaceutical preparations. Fortieth Report, Geneve. 2006
- <sup>7</sup> The United States Pharmacopeial Convention. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional. USP 33/NF 28. Compendios de Normas Oficiales. Rockville. 2007
- <sup>8</sup> Dokoumetzidis, A., Macheras, P. "A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system". *Int. J. Pharmaceut.* 2006, 321, 1-11
- <sup>9</sup> Costa, P., Sousa Lobo, J.M. "Modeling and comparison of dissolution profiles". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2001, 13: 123 –133
- <sup>10</sup> Doménech, B. J., Martínez, L. J., Plá, D. JM. *Biofarmacia y Farmacocinética. Vol II: Biofarmacia.* Editorial Síntesis S. A., Madrid, 1998, 57-76.

# **PARTE APLICADA**

# 21. Sección parte aplicada: Validación de métodos analíticos

Marcela Longhi

*Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.*

A continuación se presenta la validación de un método HPLC para cuantificar Ibuprofeno en un estudio de solubilidad, como ejemplo del procedimiento que se debe seguir cuando se desea validar un método analítico.

El objetivo de la validación de una metodología analítica es demostrar y documentar en forma experimental que las características de desempeño del método cumplen los requisitos previstos, obteniendo resultados confiables y reproducibles.

Por naturaleza se sabe que en un determinado proceso puede intervenir de manera directa o indirecta la mano del hombre y que por lo tanto generará una variable imposible de eliminar, pero que sí es posible de controlar. En este contexto, la estadística es la herramienta que permite controlar esta variable ayudando a identificar posibles errores y tomar medidas para minimizarlos, en otras palabras, la estadística es la herramienta que permite dar una solidez científica a la validación.

La USP 30 clasifica en 4 categorías las características de desempeño a evaluar. Considerando la variabilidad de los objetivos, es lógico que diferentes procedimientos requieran diferentes esquemas de validación.

En la categoría 1 se encuentran los procedimientos analíticos para la cuantificación de los ingredientes activos en fármacos a granel o en productos terminados. Esta categoría establece que se deben evaluar las características de exactitud, precisión, especificidad, linealidad e intervalo, las que serán complementadas con la evaluación de robustez y estabilidad, a los diferentes pH.



Con el fin de economizar en tiempo y reactivos, además de ocupar la estadística como una herramienta que facilite el estudio, se realizó un análisis de las pendientes, mediante un test ANOVA, seguido de un post test de TUCKEY, que indicarán si las pendientes son significativamente iguales, lo cual ahorraría el tener que validar a cada uno de los 5 pH.

## 21.1. Especificidad (selectividad)

Se define como la capacidad de identificar y/o medir separadamente de manera inequívoca el o los analitos de interés en presencia de posibles interferentes, tales como impurezas, productos de la matriz y/o productos de degradación.

La selectividad es uno de los primeros parámetros a evaluarse, ya que se debe conocer en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito de interés.

Se evaluaron las posibles interferencias de la fase móvil, soluciones tampón y posibles productos de degradación, sometiendo las muestras a condiciones de estrés (calor, luz, hidrólisis ácida, hidrólisis básica y oxidación).

Junto con la selectividad del método debe evaluarse la idoneidad del sistema, entendiéndose esta como un conjunto de ensayos que permite comprobar que el sistema es adecuado. Si bien el test de idoneidad debe entenderse como parte integral del procedimiento, es en una primera etapa la que permite evaluar la selectividad del método en cuanto a sus parámetros cromatográficos.

- *Factor de capacidad ( $k'$ ):* se define como el volumen de fase móvil necesario para eluir un compuesto después del volumen inicial contenido en la columna. Son recomendables valores de  $k'$  superiores a 2.
- *Número de platos teóricos ( $N$ ):* corresponde a cortes o rodajas imaginarias de la columna cromatográfica, donde se consigue un equilibrio transitorio antes de que la fase móvil avance hacia la próxima rodaja. La eficacia de la columna y por consiguiente su poder separativo y de proporcionar bandas de elución estrechas se mide en función de los platos teóricos. Son recomendables valores de  $N$  superiores a 2000.
- *Factor de asimetría o de cola:* una señal perfectamente simétrica proporcionará una minimización en las imprecisiones de detección del inicio y final del pico

por lo que permitirá una mejor y más precisa cuantificación. Son recomendables valores entre 0,8 y 1,5.

- *Resolución R*: Corresponde a la medida de separación entre 2 picos y es fundamental a la hora de controlar si existe algún interferente con la detección del pico de interés. Son recomendables valores de R mayores a 2.

## 21.2 Linealidad

La linealidad es la capacidad del método para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango establecido.

Para considerar el método lineal, se evaluaron 5 niveles de concentración, en donde el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) debe ser mayor a 0,98, el intercepto con el eje Y no debe ser distinto de 0 (en un intervalo de confianza de un 95%) y el coeficiente de variación del factor de respuesta no debe ser mayor a un 2%.

Así se obtuvieron 5 ecuaciones de la recta, para los 5 pH.

## 21.3 Estabilidad de las soluciones

Es fundamental en todo estudio demostrar la estabilidad de las soluciones desde su preparación hasta la finalización de su análisis, especialmente cuando se ocupan equipos automatizados en donde la muestra puede permanecer en el muestreador por un largo periodo de tiempo.

Para determinar la estabilidad se prepararon soluciones de concentración conocida las cuales fueron analizadas antes y después de ser almacenadas bajo condiciones de:

- temperatura: 37°C por 24 horas.
- refrigeración (2 - 8°C) por 48 horas.
- temperatura ambiente por 24 horas.

Se realizaron 3 lecturas de cada muestra y se comparó el resultado obtenido con la solución analizada a tiempo cero. El rango de recuperación deberá estar entre 98-102%.

## 21.4 Precisión

La precisión expresa el grado de concordancia entre una serie de medidas a partir de una misma muestra homogénea. La variabilidad que existe entre una medición y otra es debida a factores inherentes al método, como por ejemplo analista, equipo instrumental, reactivos, etc.

La precisión engloba diferentes estudios:

- a) *Repetibilidad*: estudia la variabilidad de los resultados, sobre una misma muestra en las mismas condiciones operativas (mismo analista, aparatos, reactivos en un periodo corto de tiempo) en un mismo laboratorio.

Esta se evaluó por triplicado a 3 niveles de concentración conocida dentro del rango de linealidad, con pesadas independientes y en donde el coeficiente de variación no debe ser mayor a un 2%.

- b) *Precisión intermedia*: estudia la variabilidad de los resultados, sobre una misma muestra, pero en condiciones operativas diferentes (puede ser distintos analistas, aparatos, días) en un mismo laboratorio.

Esta se evaluó variando tanto el día de cada ensayo como el aparato utilizado. Se evaluó por triplicado a los mismos 3 niveles de concentración conocida, con pesadas independientes, en donde además de evaluar que el coeficiente de variación no deba ser mayor a un 2%, se deberá cumplir con el test de comparación de medias, en donde primero se debe determinar si las varianzas son iguales o distintas, mediante un test de Fisher, para luego comparar las medias, mediante un test t de student.

## 21.5 Exactitud

La exactitud expresa la proximidad de los resultados con el valor que es considerado como verdadero.

La exactitud puede evaluarse contra patrones de referencia certificados o bien analizando una muestra problema o placebo a la que se le ha añadido una cantidad conocida de este patrón.

Esta se evaluó por triplicado a 3 niveles de concentración conocida dentro del rango de linealidad y en donde el porcentaje de recuperación aceptado esté entre el 95 – 105%.

## 21.6 Robustez

Se define como la capacidad del método para no verse afectado frente a pequeños pero deliberados cambios susceptibles de producirse durante su utilización, dando una idea de su fiabilidad durante su uso normal.

Los factores a evaluar pueden ser cuantitativos como el pH de la fase móvil, el porcentaje orgánico en la fase móvil, la temperatura del horno, etc. Pero también pueden ser cambios cualitativos como cambios en el fabricante de la columna o antigüedad de ésta.

Los márgenes de variación fueron determinados según la incertidumbre de cada factor multiplicada por un coeficiente de seguridad. ( $K= 5$ ).

Las condiciones cromatográficas del método analítico fueron las descritas en la Tabla 1:

*Tabla 1. Condiciones cromatográfico del método de cuantificación*

Tipo de columna	Inertsil ODS-3 de 4,6 mm de diámetro x 25 cms. de largo, rellena con material L1
Fase Móvil	Acetonitrilo : Acido cloro acético, ajustado a pH 3.0 (60:40)
Velocidad de flujo	2,0 mL/min
Volumen de inyección	100 $\mu$ l
Temperatura del horno	37°C
Longitud de onda	264 nm

La robustez fue estudiada con un diseño factorial de 8 experimentos, para evaluar la influencia de 3 factores.

En donde el signo “-“o “+” indica la desviación respecto de su valor nominal.

Los factores a evaluar y sus márgenes de variación fueron los siguientes:

- Cambios porcentuales en la composición de la fase móvil. ( $\pm 2,5\%$ )

- Cambios de flujo ( $\pm 0,003$  ml/min).
- Variación de la longitud de onda de medición ( $\pm 2$  nm).

<b>Factores</b>	<b>Numero de ensayos</b>							
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>
<b>A</b>	-	+	-	+	-	+	-	+
<b>B</b>	-	-	+	+	-	-	+	+
<b>C</b>	-	-	-	-	+	+	+	+

Para la evaluación de los resultados se determinó la influencia de cada factor y su intervalo de confianza siguiendo la siguiente fórmula:

Influencia del factor A:  $A = \frac{1}{4} (-R_1 + R_2 - R_3 + R_4 - R_5 + R_6 - R_7 + R_8)$

Influencia del factor B:  $B = \frac{1}{4} (-R_1 - R_2 + R_3 + R_4 - R_5 - R_6 + R_7 + R_8)$

Influencia del factor C:  $C = \frac{1}{4} (-R_1 - R_2 - R_3 - R_4 + R_5 + R_6 + R_7 + R_8)$

Intervalo de confianza:  $A (B \text{ o } C) \pm t * S / \sqrt{n}$

Donde:

t = coeficiente de student para probabilidad de  $1 - (\alpha/2)$  y el número de grados de libertad de la cantidad de experimentos.

S = desviación estándar de los resultados de todos los experimentos.

n = número de experimentos.

Si el intervalo de confianza del factor, contiene al cero, se considera que los resultados obtenidos no fueron influenciados por la variación en cuestión.

## 21.7 Resultados

### 21.7.1 Especificidad

Como la solubilidad de un principio activo es una característica intrínseca de la molécula, la determinación se realizó desde la materia prima, y por consiguiente no consideró los posibles interferentes de los excipientes que pudiesen existir en el caso de cuantificar por ejemplo una cinética de disolución en un producto farmacéutico terminado.

Los cromatogramas demuestran que si bien el ibuprofeno presenta degradación y por tanto se genera la presencia de otro compuesto (4-ibap), el método no presenta interferentes con el pico del analito, ya que las resoluciones calculadas entre éstos fueron siempre mayor a 1,5. En la Tabla 2 se muestra que el sistema es adecuado, en cuanto a sus parámetros cromatográficos.

*Tabla 2. Parámetros cromatográficos*

	T.R. (IBP)	T.R. (4-ibap)	k'	R	N	Tailing
Medio ácido	5,853	8,270	2,58	8,2	8385	1,213
Medio básico	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
Fotólisis	5,83	-	2,56	N.A.	8171	1,222
Oxidación	5,862	8,217	2,58	8,297	8899	1,157
Temperatura	5,832	-	2,56	N.A.	8161	1,224

Cuando se intentó analizar la posible degradación por hidrólisis alcalina, se observó un precipitado en la solución. Esto puede explicarse debido a que a valores por sobre en el caso de los ácidos, se alcanza el producto de solubilidad (KPS) de la sal y la fracción de ibuprofeno libre, precipita como sal.

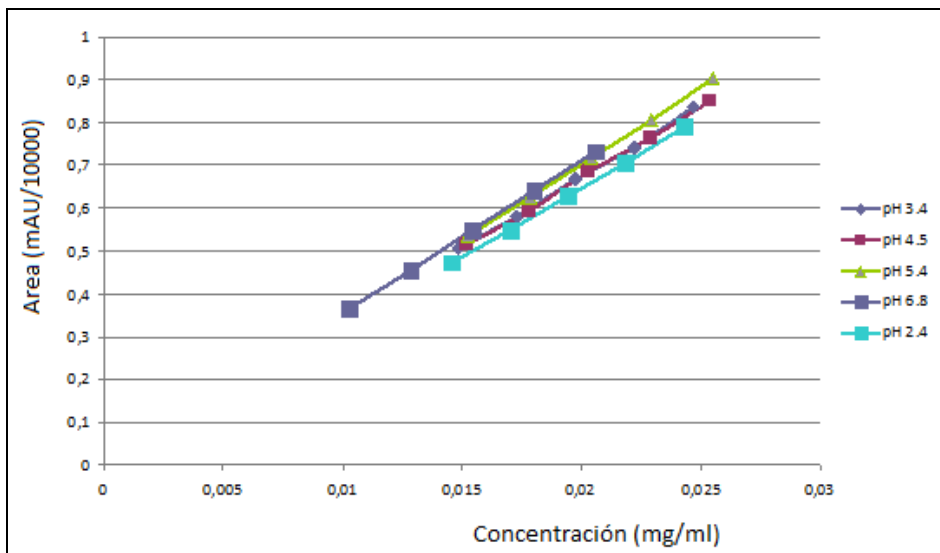
## 21.7.2 Linealidad

En la Tabla 3 se muestra el cumplimiento de los criterios de aceptación establecidos respecto de la linealidad del método, demostrándose así que el método cumple con este parámetro en cada uno de los pH dentro del rango de concentración propuesto (entre 60 y 100%).

*Tabla 3. Parámetros estadísticos para el cálculo de linealidad, para soluciones estándares de ibuprofeno en 5 niveles de concentración*

Parámetros	pH 2,4	pH 3,4	pH 4,5	pH 5,4	pH 6,8
Pendiente	32,46	33,09	33,048	35,80	35,82
Intercepto	-0,002	0,012	0,010	-0,0136	-0,0045
Coefficiente de determinación ( $r^2$ )	0,999	0,999	0,999	1,0	1,0
CV del F.R.	0,53	0,82	0,79	0,5	0,5

Como se muestra en la Figura 1, las pendientes a los distintos pH fueron muy similares, por lo que se procedió a analizar las pendientes con un test ANOVA y post test de TUCKEY (anexo 2).



*Figura 1. Gráfico de la respuesta lineal a los 5 pH*

Se obtuvieron 2 grupos de pendientes que no mostraron diferencias significativas con un intervalo de confianza de un 95%. Así las pendientes de las linealidades determinadas a los pH 2,4; 3,4 y 4,5, que llamaremos grupo A y las pendientes de las linealidades de los pH 5,4 y 6,8, que llamaremos grupo B, mostraron ser significativamente iguales. Esto nos llevó a la conclusión de que en lugar de realizar la validación de la metodología analítica a todos los pH, ésta se puede realizar solo a un pH en cada grupo, ya que si el método es válido para uno también se esperaría que lo fuera para los demás pH dentro del grupo. De tal forma que en adelante la validación se realizará solo a los pH 3,4, perteneciente al grupo A y pH 5,4 perteneciente al grupo B.

La diferencia en la sensibilidad de las pendientes, varía significativamente entre los grupos A y B. Esto puede explicarse a la diferencia que existe entre la fracción no ionizada y ionizada en cada grupo, siendo esta última la que a pH mayores al pKa de la molécula se encuentra en una mayor proporción y que al ser éste el grupo cromóforo, aumenta la sensibilidad del método.

### 21.7.3 Estabilidad

La estabilidad se determina como el porcentaje de recuperación de las soluciones después de ser almacenadas en las condiciones de temperatura señaladas en la tabla 4.

La concentración a tiempo cero se considerara como 100 % y el criterio de aceptación es de 98 – 102%.<sup>7</sup>

*Tabla 4. Porcentaje de recuperación para el ensayo de estabilidad de ibuprofeno*

	% de recuperación			
	Tiempo cero	24 h T ambiente	24 h 37°C	48 h refrigerado
pH 2,4	100	101,7	101,0	102,0
pH 3,4	100	100,9	98,0	101,8
pH 4,5	100	99,3	101,0	99,8
pH 5,4	100	100,2	98,9	100,4
pH 6,8	100	100,4	99,3	100,5

Los resultados muestran que se cumple el criterio de aceptación en cada uno de los pH, si bien las soluciones pueden sufrir degradación, como se vio en la



selectividad, los resultados indican que las soluciones de ibuprofeno son estables durante el tiempo en que son manipuladas y analizadas.

### 21.7.4 Precisión

La precisión se evaluó en 3 niveles de concentración conocida, dentro del rango de linealidad (60, 80 y 100%), cada una de estas soluciones de ibuprofeno fue preparada con pesadas independientes y fue analizada en triplicado.

La repetibilidad se expresa matemáticamente por el coeficiente de variación, el cual no fue mayor a un 2%, mientras que la precisión intermedia debe además cumplir con el test de comparación de medias, como lo muestran las Tablas 8–17 en el anexo 1.

Uno de los factores que puede influir en la repetibilidad instrumental, es la concentración de trabajo ocupada, ya que a concentraciones muy bajas, la desviación estándar de las respuestas puede ser elevada. La repetibilidad del método también puede verse afectada en el modo en cómo se preparan las muestras, ya que a mayor manipulación, va a existir una mayor probabilidad de que la variabilidad aumente.

Se debe tener en cuenta que la precisión estudia la variabilidad o dispersión que existe entre los diferentes resultados, sin tener en cuenta su proximidad con el valor real.

### 21.7.5 Exactitud

La exactitud expresa la cercanía entre los resultados obtenidos y el valor considerado como verdadero, lo cual podría estar influenciado por errores sistemáticos como por ejemplo la preparación de la muestra, la extracción del analito o la calidad de los reactivos, los resultados se muestran en la Tabla 5.

Una de las maneras de evaluar la exactitud es mediante la comparación con un patrón de referencia certificado.

*Tabla 5. Porcentaje de recuperación en los 3 niveles de concentración para cada pH*

Nivel de concentración	% recuperación		Criterios de aceptación	
	pH 3,4	pH 5,4	Recuperación	C.V. $\leq 2$

			95-105%	
60%	97,5	102,7	Cumple	Cumple
80%	101,6	102,3	Cumple	Cumple
100%	100,3	99,4	Cumple	Cumple

## 21.7.6 Robustez

La evaluación de la robustez fue realizada con un diseño factorial de 8 experimentos, los resultados de tal estudio se muestran a continuación:

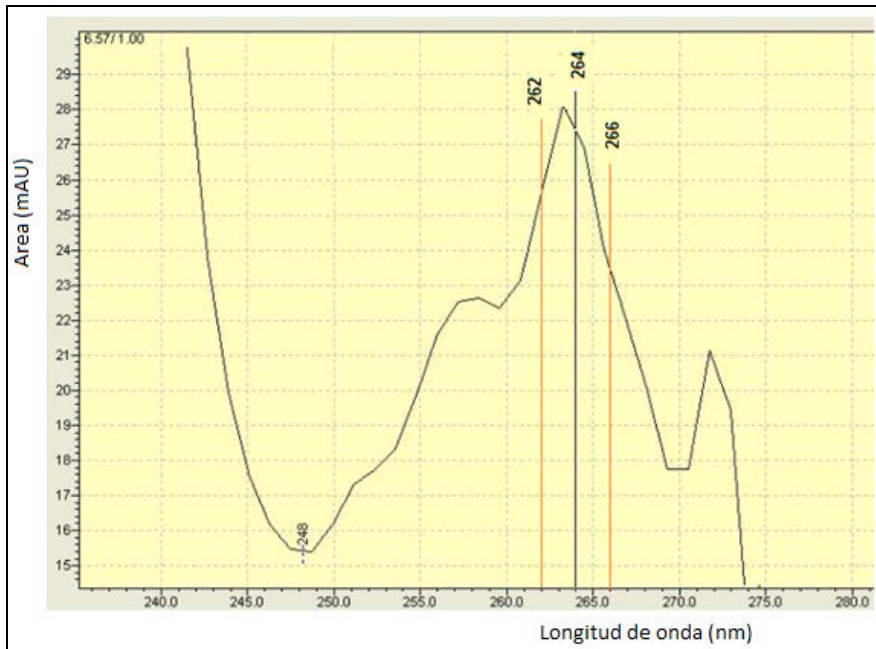
*Tabla 6. Influencia de los factores A, B y C sobre las áreas a pH 3,4*

	Factor	Intervalo de Confianza	
Influencia factor A	7465,583	4676,364	10254,803
Influencia factor B	521,250	-2267,970	3310,470
Influencia factor C	2157,750	-631,470	4946,970
D.S. total (S)	4163,995		

*Tabla 7. Influencia de los factores A, B y C sobre las áreas a pH 5,4*

	Factor	Intervalo de Confianza	
Influencia factor A	7999,667	5127,623	10871,710
Influencia factor B	291,833	-2580,210	3163,877
Influencia factor C	-498,667	-3370,710	2373,377
D.S. total (S)	4287,642		

De los resultados obtenidos se puede observar que las pequeñas variaciones realizadas al flujo (B) y a la composición de la fase móvil, (A) no alteraron significativamente los resultados, ya que sus intervalos de confianza contuvieron al cero, sin embargo un cambio en la longitud de onda (C) si fue significativo. Esto puede explicarse debido a que a la longitud de onda empleada, 264 nm. se encuentra en una pendiente pronunciada en el espectro de absorción UV, como lo muestra la Figura 2, por lo que la absorbancia varía significativamente. A pesar de esto, el método no se invalida, sino que establece la necesidad de verificar la exactitud de la longitud de onda del detector previo a la cuantificación, para establecer las condiciones óptimas de desempeño del método.

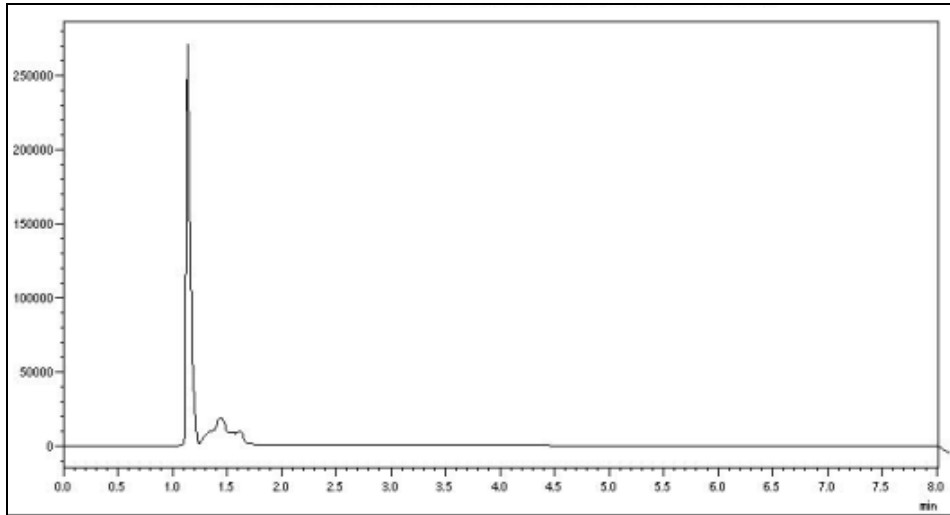


*Figura 2. Barrido del espectro de absorción UV del compuesto Ibuprofeno*

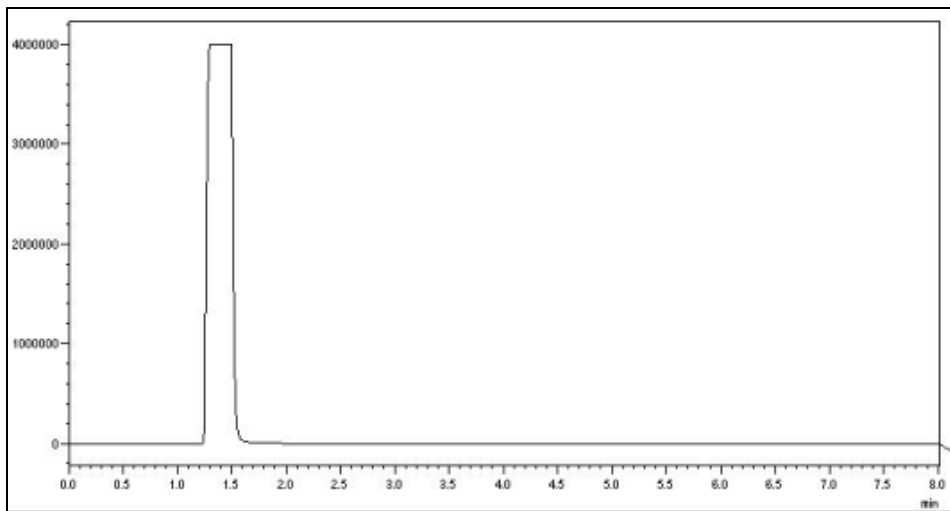
En el caso de un análisis cualitativo, resulta evidente que se deba analizar la influencia de cada factor sobre la concentración del analito. Sin embargo si existe la presencia de más de un analito también interesará analizar la influencia de cada factor sobre otros parámetros como por ejemplo la resolución.

La robustez es un parámetro de validación que debe ser incluido en una fase inicial en el desarrollo del método analítico ya que este parámetro dota de flexibilidad al método. Si bien un método poco robusto puede ser validado, es preferible dar cierta flexibilidad al método.

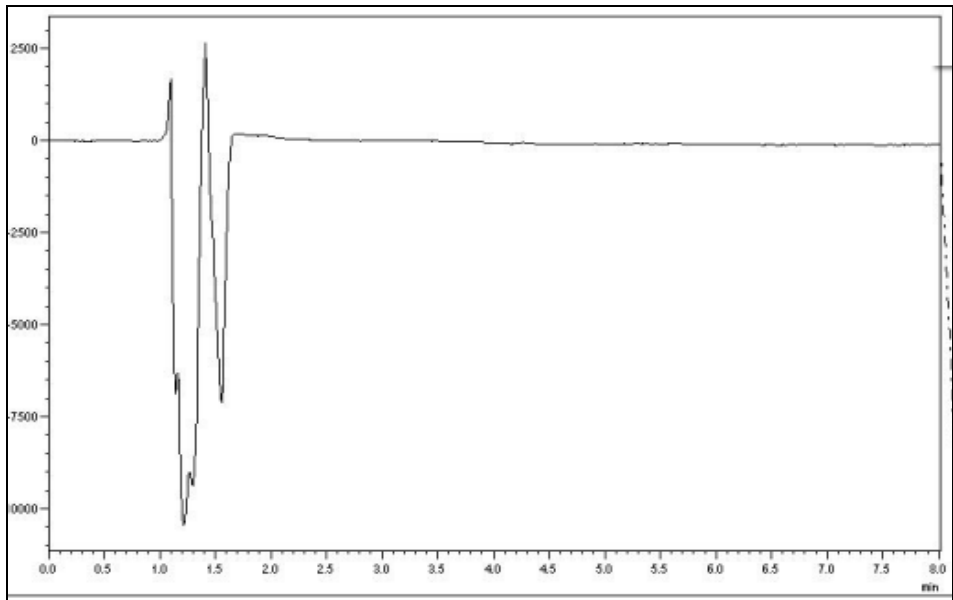
## Anexo 1.



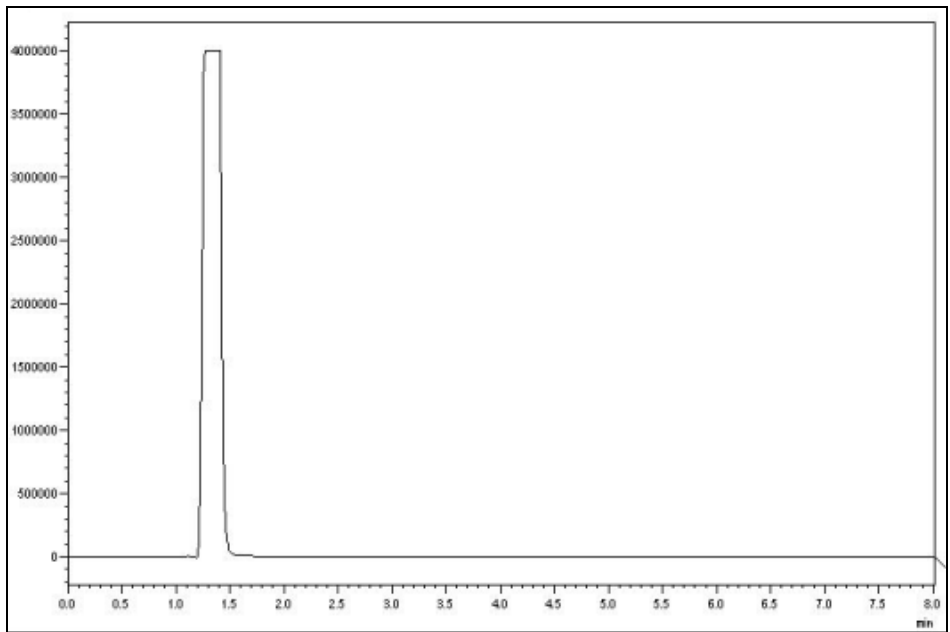
*Figura 3. Cromatografía para la inyección del medio tampón pH 2,4*



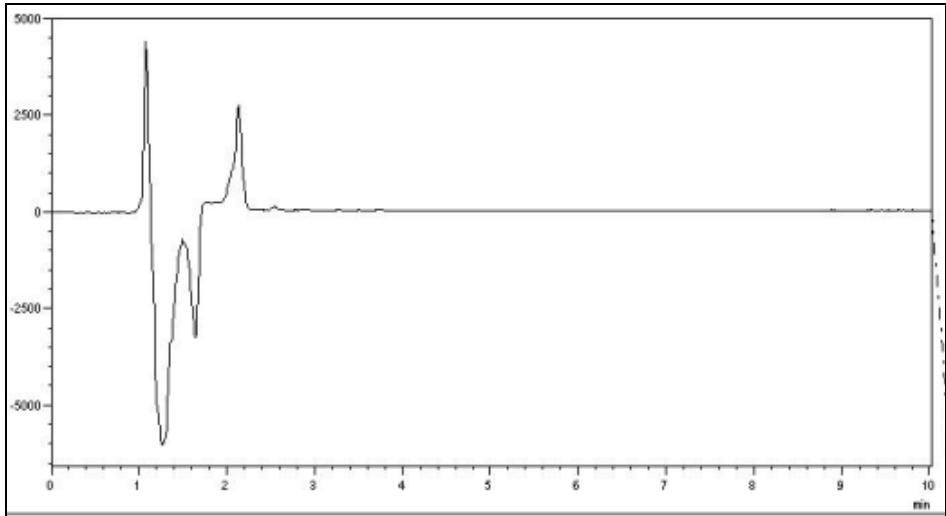
*Figura 4. Cromatografía para la inyección del medio tampón pH 3,4*



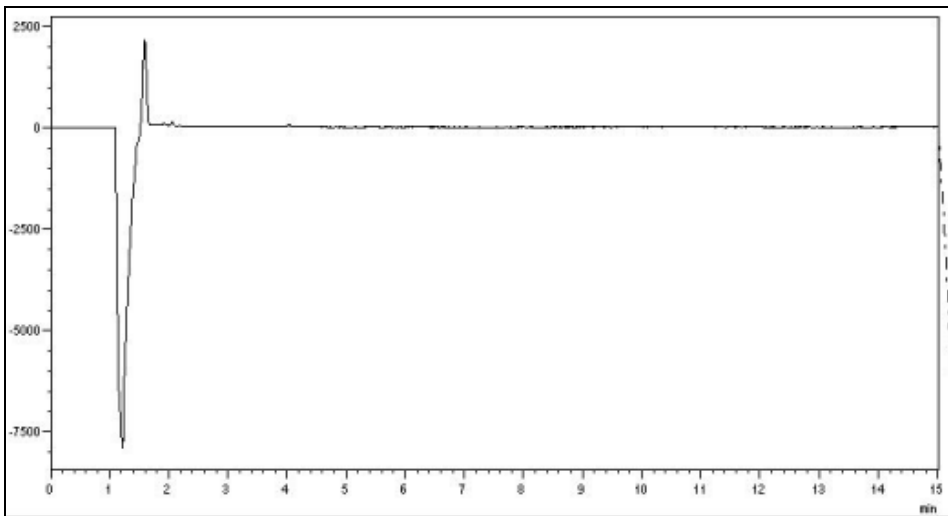
*Figura 5. Cromatografía para la inyección del medio tampón pH 4,5*



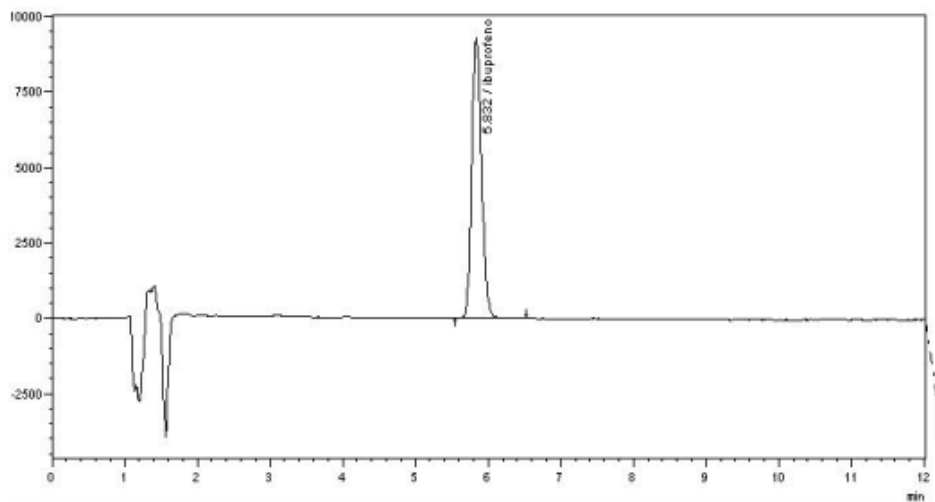
*Figura 6. Cromatografía para la inyección del medio tampón pH 5,4*



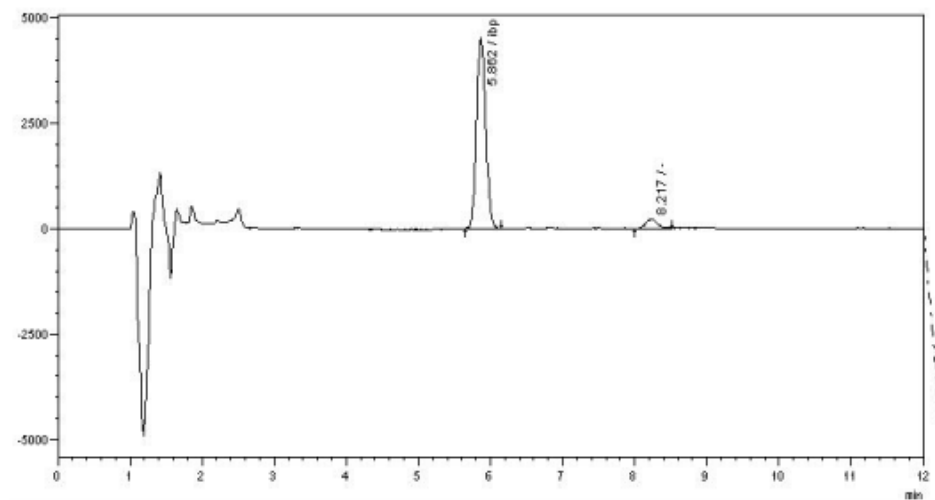
*Figura 7. Cromatografía para la inyección del medio tampón pH 6,8*



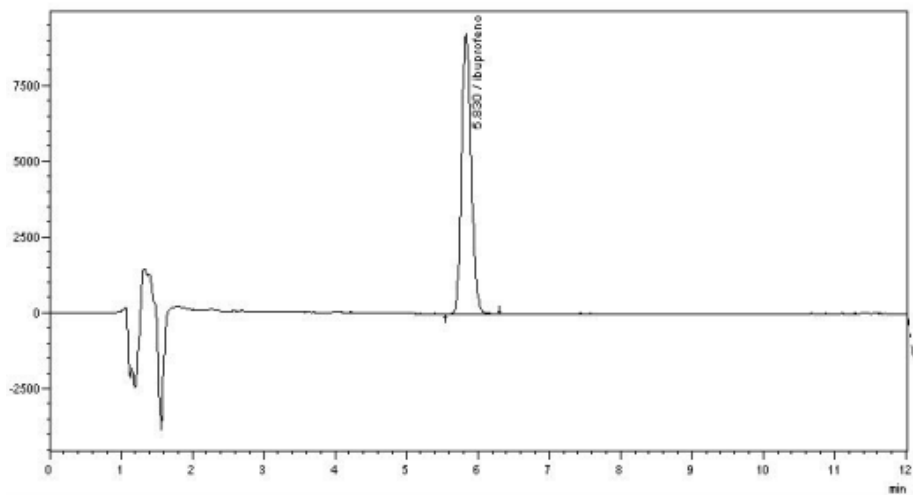
*Figura 8. Cromatografía para la inyección de la fase móvil*



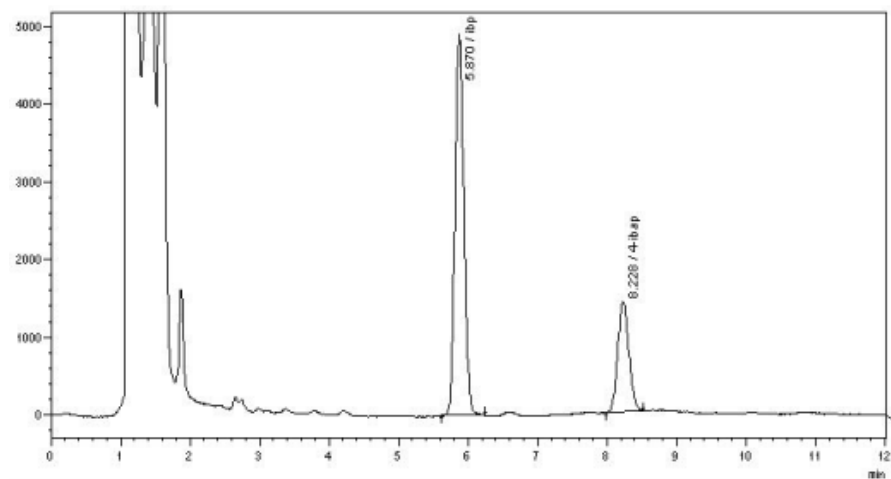
**Figura 9.** Cromatografía resultante de la exposición de una solución de ibuprofeno a degradación por temperatura (70°C por 24 hrs).



**Figura 10.** Cromatografía resultante de la exposición de una solución de ibuprofeno a degradación por oxidación (peróxido de hidrogeno al 10 %).

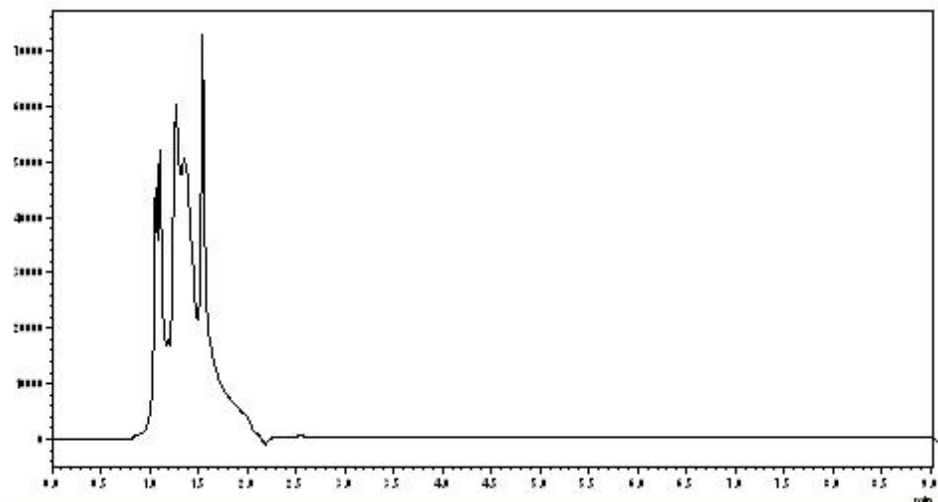


**Figura 11.** Cromatografía resultante de la exposición de una solución de ibuprofeno a degradación por fotólisis (exposición bajo lámpara UV de alta intensidad por 24 hrs).



**Figura 12.** Cromatografía resultante de la exposición de una solución de ibuprofeno a degradación por hidrólisis acida (solución de HCL 1M por 24 hrs).





**Figura 13.** Cromatografía resultante de la exposición de una solución de ibuprofeno a degradación por hidrólisis básica (solución de NaOH 1M por 24 hrs).

**Tabla 8.** Repetibilidad en buffer pH 3,4 en 3 niveles de concentración, día 1

Concentración (mg/mL)	áreas (mAU)			C.V. (%)
	lectura 1	lectura 2	lectura 3	
0.01476	48931	48760	48813	0.2
0.01936	66154	66405	66274	0.2
0.0255	85755	85966	85852	0.1

**Tabla 9.** Repetibilidad en buffer 3,4 en 3 niveles de concentración, día 2

Concentración (mg/mL)	áreas (mAU)			C.V. (%)
	lectura 1	lectura 2	lectura 3	
0.01476	47873	47693	47463	0.4
0.01936	66368	66323	66449	0.1
0.02350	79328	79326	78976	0.3

**Tabla 10.** Repetibilidad en buffer pH 5,4 en 3 niveles de concentración, día 1

Concentración (mg/mL)	áreas (mAU)			C.V. (%)
	lectura 1	lectura 2	lectura 3	
0.01518	52467	52618	53389	0.9
0.02096	72229	72139	72121	0.1
0.02470	82485	82493	82509	0

**Tabla 11.** Repetibilidad en buffer pH 5,4 en 3 niveles de concentración, día 2

Concentración (mg/mL)	áreas (mAU)			C.V. (%)
	lectura 1	lectura 2	lectura 3	
0.01512	52828	52990	53028	0.2
0.01936	67700	68065	67710	0.3
0.02450	80333	80719	80370	0.3

**Tabla 12.** Comparación de medias muestra 1, pH 3,4

Comparación de Medias, Muestra 1, nivel 60%			
		<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>
Media		33.09	32.83
Varianza		0.00	0.02
Nº Determinaciones		3	3
Comparación de Varianza			
F crítico (tabla)		9.28	Varianzas Iguales
F calculado		5.6955	
Varianza Comun		0.0118	
Grados de libertad		4	
<b>Varianzas Iguales</b>			
Estadístico t experimental		0.4320	Considerar para Analisis
Valor crítico de t (2 colas)		2.7764	
Calificación t		<b>Cumple</b>	

*Tabla 13. Comparación de medias muestra 2, pH 3,4*

<b>Comparación de Medias, Muestra 2, nivel 80%</b>			
		<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>
Media		34.23	34.29
Varianza		0.00	0.00
Nº Determinaciones		3	3
<b>Comparación de Varianza</b>			
F critico (tabla)		9.28	<b>Varianzas Iguales</b>
F calculado		3.8657	
Varianza Comun		0.0026	
Grados de libertad		4	
<b>Varianzas Iguales</b>			
Estadístico t experimental		0.0914	<b>Considerar para Analisis</b>
Valor critico de t (2 colas)		2.7764	
Calificacion t		<b>Cumple</b>	

*Tabla 14. Comparación de medias muestra 3, pH 3,4*

<b>Comparación de Medias, Muestra 3, nivel 100%</b>			
		<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>
Media		33.67	33.71
Varianza		0.00	0.01
Nº Determinaciones		3	3
<b>Comparación de Varianza</b>			
F critico (tabla)		9.28	<b>Varianzas Iguales</b>
F calculado		4.3352	
Varianza Comun		0.0046	
Grados de libertad		4	
<b>Varianzas Iguales</b>			
Estadístico t experimental		0.0634	<b>Considerar para Analisis</b>
Valor critico de t (2 colas)		2.7764	
Calificacion t		<b>Cumple</b>	

*Tabla 15. Comparación de medias muestra 1, pH 5,4*

<b>Comparación de Medias, Muestra 1, nivel 60%</b>			
		<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>
Media		34.80	35.02
Varianza		0.11	0.00
Nº Determinaciones		3	3
<b>Comparación de Varianza</b>			
F critico (tabla)		9.28	<b>Varianzas Distintas</b>
F calculado		21.5068	
Varianza Comun		0.0555	
Grados de libertad		4	
<b>Varianzas Distintas</b>			
Estadístico t experimental		0.3711	<b>Considerar para Analisis</b>
Valor t' Cochran (2 colas)		4.30265	
Calificación t'			<b>Cumple</b>

*Tabla 16. Comparación de medias muestra 2, pH 5,4*

<b>Comparación de Medias, Muestra 2, nivel 80%</b>			
		<i>Día 1</i>	<i>Día 2</i>
Media		34.43	34.60
Varianza		0.00	0.01
Nº Determinaciones		3	3
<b>Comparación de Varianza</b>			
F critico (tabla)		9.28	<b>Varianzas Distintas</b>
F calculado		14.7645	
Varianza Comun		0.0060	
Grados de libertad		4	
<b>Varianzas Distintas</b>			
Estadístico t experimental		0.3034	<b>Considerar para Analisis</b>
Valor t' Cochran (2 colas)		4.30265	
Calificación t'			<b>Cumple</b>

**Tabla 17.** Comparación de medias muestra 3, pH 5,4

<b>Comparación de Medias, Muestra 3, nivel 100%</b>			
		<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>
Media		34.40	34.31
Varianza		0.00	0.00
Nº Determinaciones		3	3
<b>Comparación de Varianza</b>			
F critico (tabla)		9.28	<b>Varianzas Iguales</b>
F calculado		1.4616	
Varianza Comun		0.0039	
Grados de libertad		4	
<b>Varianzas Iguales</b>			
Estadístico t experimental		0.4320	<b>Considerar para Analisis</b>
Valor critico de t (2 colas)		2.7764	
Calificacion t			<b>Cumple</b>

## Anexo 2.

```

/STATISTICS DESCRIPTIVES
/MISSING ANALYSIS
/POSTHOC=TUKEY ALPHA(0.05) .
    
```

## Oneway

**Notes**

Output Created		27-Jan-2011 10:24:15
Comments		
Input	Active Dataset	DataSet0
	Filter	<none>
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	15
MissingValueHandling	Definition of Missing	User-defined missing values are treated as missing.
	Cases Used	Statistics for each analysis are based on cases with no missing data for any variable in the analysis.
Syntax	<pre> ONEWAY VAR00001 BY VAR00002 /STATISTICS DESCRIPTIVES /MISSING ANALYSIS /POSTHOC=TUKEY ALPHA(0.05).</pre>	
Resources	Processor Time	00:00:00.015
	Elapsed Time	00:00:00.015

[DataSet0]

### Descriptives

VAR00001

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	32.1500	.23065	.13317	31.8770	33.0230	32.21	32.67
2	3	33.0867	.02517	.01453	33.0242	33.1492	33.06	33.11
3	3	33.0133	.14978	.08647	32.6713	33.4154	32.92	33.21
4	3	35.7967	.39311	.22696	34.8201	36.7732	35.35	36.09
5	3	35.8200	.24062	.13892	35.2223	36.4177	35.57	36.05
Total	15	34.0393	1.52669	.39419	33.1939	34.8848	32.21	36.09

### ANOVA

VAR00001

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	32.054	4	8.013	138.785	.000
Within Groups	.577	10	.058		
Total	32.631	14			

### Post Hoc Tests

## Multiple Comparisons

VAR00001

Tukey HSD

(I) VAR000 C2	(J) VAR000 C2	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1	2	-.63667	.19620	.054	-1.2824	.0090
	3	-.59333	.19620	.076	-1.2390	.0524
	4	-3.31667	.19620	.000	-3.9924	-2.7010
	5	-3.37000	.19620	.000	-4.0157	-2.7243
2	1	.63667	.19620	.054	-.0090	1.2824
	3	.04333	.19620	.999	-.6024	.6890
	4	-2.71000	.19620	.000	-3.3557	-2.0643
	5	-2.73333	.19620	.000	-3.3790	-2.0876
3	1	.59333	.19620	.076	-.0524	1.2390
	2	-.04333	.19620	.999	-.6890	.6024
	4	-2.75333	.19620	.000	-3.3990	-2.1076
	5	-2.77667	.19620	.000	-3.4224	-2.1310
4	1	3.31667	.19620	.000	2.7010	3.9924
	2	2.71000	.19620	.000	2.0643	3.3557
	3	2.75333	.19620	.000	2.1076	3.3990
	5	-.02333	.19620	1.000	-.6690	.6224
5	1	3.37000	.19620	.000	2.7243	4.0157
	2	2.73333	.19620	.000	2.0876	3.3790
	3	2.77667	.19620	.000	2.1310	3.4224
	4	.02333	.19620	1.000	-.6224	.6690

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

## Homogeneous Subsets



## VAR00001

Tukey HSD

VAR00002	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	32.4500	
3	3	33.0433	
2	3	33.0867	
4	3		35.7967
5	3		35.8200
Sig.		.051	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

## 22. Sección aplicación práctica: Cálculo de fracción absorbida

Virginia Merino Sanjuán<sup>a,b</sup>, Matilde Merino Sanjuán<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> *Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.*

<sup>b</sup> *Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico. Unidad Mixta Universidad Politécnica de Valencia-Universidad de Valencia España*

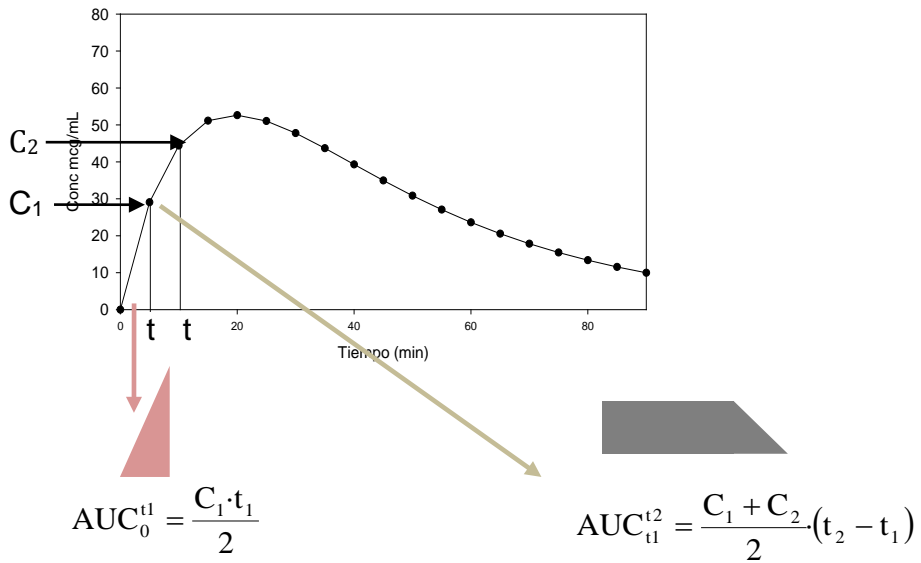
### 22.1 Estimación del área bajo la curva concentración plasmática-tiempo

El área comprendida bajo la curva de niveles plasmáticos frente al tiempo,  $AUC_{0-t}$ , es un parámetro representativo de la cantidad de fármaco que alcanza la circulación sistémica, en forma inalterada, tras la administración de una dosis.

Su cálculo puede realizarse por integración numérica (método trapezoidal) o a partir de la expresión matemática derivada de resolver la integral de la ecuación que describe la evolución temporal de las concentraciones plasmáticas del fármaco tras su administración al organismo.

#### 22.1.1 Cálculo del AUC mediante el método de los trapecios (integración numérica).

El método se basa en calcular el área entre dos puntos experimentales consecutivos de la curva de concentración plasmática (C) –tiempo (t) (Figura 1).



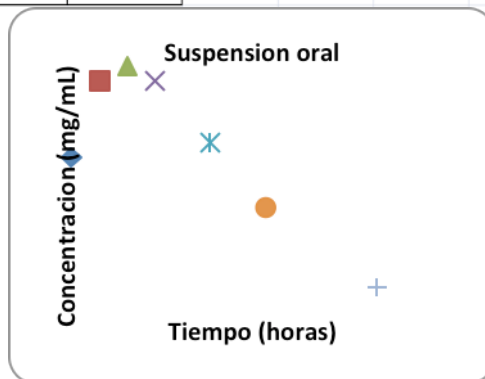
**Figura 1.** Representación gráfica de los valores de concentración plasmática frente a los tiempos de toma de muestra tras administración de un fármaco por vía extravasal.

### Paso 1.

Introducción de los datos experimentales de concentración plasmática-tiempo en la hoja de cálculo.

Se introducen en la columna A los tiempos de toma de muestras y en la columna B las concentraciones experimentales obtenidas en las muestras.

1	CÁLCULO AUC ADMINISTRACIÓN SUSPENSION ORAL		D=500 mg	Antibiótico
2				
3	tiempo	Concentración		
4	horas	mcg/mL		
5		0	0	
6	1	5		
7	2	7		
8	3	7.4		
9	4	7		
10	6	5.4		
11	8	3.7		
12	12	1.6		



### Paso 2.

Cálculo del AUC de los trapecios.

El área bajo la curva del intervalo correspondiente a dos tomas de muestras consecutivas se asimila a un trapecio, cuya área equivale a la semisuma de las bases por la altura, de acuerdo con la expresión siguiente:

$$\text{Area} = \Delta t \cdot \frac{C_1 + C_2}{2}$$

Siendo  $\Delta t = t_2 - t_1$

1. Cálculo del área del primer trapecio:

Cuando el fármaco se administra por vía extravasal el primer trapecio es un triángulo y el área se calcula a partir de la ecuación siguiente:

$$AUC_0^{t1} = \frac{C1 \cdot t1}{2}$$

	A	B	C	D	E	F
1	CÁLCULO AUC ADMINISTRACIÓN SUSPENSION ORAL D=500 mg					Antibiótico
2						
3	tiempo	Concentraci	LN Conc.	AUC parcial	AUC 0-t	
4	horas	mcg/mL		mcg*h/mL	mcg*h/mL	
5		0	0			
6	1	5		=B6*A6/2		
7	2	7				
8	3	7.4				
9	4	7				
10	6	5.4				
11	8	3.7				
12	12	1.6				

2. Cálculo del área de los trapecios siguientes hasta el último punto experimental

	A	B	C	D	E	F
1	CÁLCULO AUC ADMINISTRACIÓN SUSPENSION ORAL D=500 mg					Antibiótico
2						
3	tiempo	Concentraci	LN Conc.	AUC parcial	AUC 0-t	
4	horas	mcg/mL		mcg*h/mL	mcg*h/mL	
5		0	0			
6	1	5		2.5		
7	2	7		=(B7+B6)*0.5*(A7-A6)		
8	3	7.4				
9	4	7				
10	6	5.4				
11	8	3.7				
12	12	1.6				
13						
14						

**Paso 3.**

Cálculo del AUC 0-t.

El área total bajo la curva desde tiempo cero hasta el último tiempo (t) en el que se dispone de valor experimental de concentración plasmática,  $AUC_{0-t}$ , equivale a la suma de las áreas de todos los trapecios considerados en este periodo de tiempo:

$$AUC_0^t = \sum_0^t \Delta t \cdot \frac{C_1 + C_2}{2}$$

	A	B	C	D	E	F
1	CÁLCULO AUC ADMINISTRACIÓN SUSPENSION ORAL D=500 mg					Antibiótico
2						
3	tiempo	Concentraci	LN Conc.	AUC parcial	AUC 0-t	
4	horas	mcg/mL		mcg*h/mL	mcg*h/mL	
5		0	0			
6	1	5		2.5	2.5	
7	2	7		6	=E6+D7	
8	3	7.4		7.2		
9	4	7		7.2		
10	6	5.4		12.4		
11	8	3.7		9.1		
12	12	1.6		10.6		
13						

	A	B	C	D	E	F
1	CÁLCULO AUC ADMINISTRACIÓN SUSPENSION ORAL D=500 mg					Antibiótico
2						
3	tiempo	Concentraci	LN Conc.	AUC parcial	AUC 0-t	
4	horas	mcg/mL		mcg*h/mL	mcg*h/mL	
5		0	0			
6	1	5		2.5	2.5	
7	2	7		6	8.5	
8	3	7.4		7.2	15.7	
9	4	7		7.2	22.9	
10	6	5.4		12.4	35.3	
11	8	3.7		9.1	44.4	
12	12	1.6		10.6	55	

**Paso 4.**

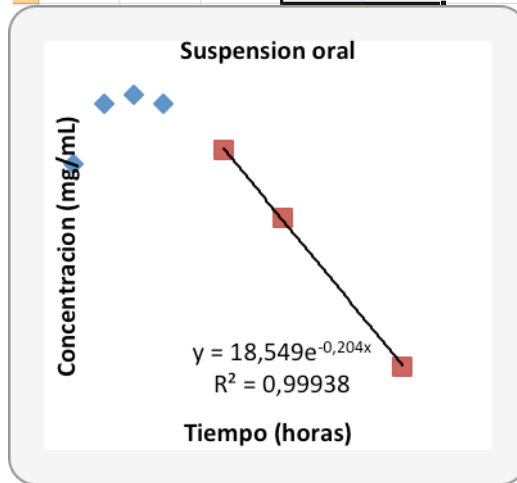
**Cálculo del  $AUC_{t-\infty}$**

El valor de  $AUC_{t-\infty}$  se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$AUC_t^\infty = \frac{C_t}{k}$$

En la que  $C_t$  representa el último valor experimental de concentración plasmática y  $k$  la pendiente de la recta de regresión de los pares de valores experimentales de los logaritmos neperianos de concentración plasmática y tiempo que definen una recta en escala semilogarítmica.

	A	B	C	D	E	F
2						
3	tiempo	Concentraci	LN Conc.	AUC parcial	AUC 0-t	
4	horas	mcg/mL		mcg*h/mL	mcg*h/mL	
5	0	0				
6	1	5	1.60943791	2.5	2.5	
7	2	7	1.94591015	6	8.5	
8	3	7.4	2.00148	7.2	15.7	
9	4	7	1.94591015	7.2	22.9	
10	6	5.4	1.68639895	12.4	35.3	
11	8	3.7	1.30833282	9.1	44.4	
12	12	1.6	0.47000363	10.6	55	
13						
14						
15						
16						
17			Regresion	DADERO)	2.9204079	
18			LN (3puntos	0.00508462	0.04585561	
19				0.99937739	0.02196805	
20				1605.14042	1	
21				0.77463321	0.0004826	



$$AUC_t^\infty = \frac{C_t}{k} = \frac{1.6}{0.204} = 7.85$$

### Paso 5.

Cálculo del  $AUC_{0-\infty}$

El cálculo del área total bajo la curva,  $AUC_{0-\infty}$ , se obtiene de acuerdo con la siguiente expresión.

$$AUC_{0-\infty} = AUC_0^t + AUC_t^\infty$$

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
2												
3	tiempo	Concentraci	LN Conc.	AUC parcial	AUC 0-t							
4	horas	mcg/mL		mcg*h/mL	mcg*h/mL							
5	0	0										
6	1	5	1.60943791	2.5	2.5							
7	2	7	1.94591015	6	8.5							
8	3	7.4	2.00148	7.2	15.7							
9	4	7	1.94591015	7.2	22.9							
10	6	5.4	1.68639895	12.4	35.3				AUC 0-t=	55		
11	8	3.7	1.30833282	9.1	44.4				AUC t-∞=	7.8542607		
12	12	1.6	0.47000363	10.6	55				AUC 0-∞=	62.8542607		
13												
14												
15												
16												
17			Regresion	DADERO)	2.9204079		k	0.20371109		Regresion	-0.18774575	2.7607545
18			LN (3puntos)	0.00508462	0.04585561					LN (4puntos)	0.01235099	0.09957683
19				0.99937739	0.02196805						0.99141876	0.07306941
20				1605.14042	1						231.066518	2
21				0.77463321	0.0004826						1.23869632	0.01067828
22												
23												

$$AUC_{0-\infty} = AUC_0^t + AUC_t^\infty = 55 + 7.85 = 62.85 \text{ mg} \cdot \text{h} / \text{mL}$$

## 22.2 Estimación de la fracción de dosis absorbida. Método de Wagner-Nelson

Este método es válido para cualquier vía y forma de administración, independientemente del orden que siga el proceso de la absorción e independientemente de que ésta sea o no completa. Es un método cuantitativo que se emplea para el cálculo de la fracción de dosis absorbida de fármacos monocompartimentales.

Para utilizar este método se dispone de los pares de valores experimentales de concentración plasmática del fármaco ( $C_p$ ) obtenidos para cada tiempo de toma de muestra ( $t$ ) tras la administración del fármaco por la vía y forma farmacéutica seleccionadas.



**Fundamento:**

En cualquier instante, la cantidad de medicamento absorbido ( $Q_a$ ) es igual a la cantidad de medicamento existente en el organismo ( $Q$ ) más la cantidad eliminada ( $Q_e$ ):

$$Q_a = Q + Q_e$$

En el modelo monocompartimental, la concentración plasmática es la misma que existe en el resto de compartimentos acuosos del organismo. Por consiguiente, las cantidades  $Q_a$ ,  $Q$  y  $Q_e$ , se pueden expresar como concentraciones si se dividen por el volumen de distribución del fármaco ( $V_d$ ). Así el balance anterior expresado en concentración adopta la siguiente expresión:

$$A_t = C + E$$

en la que  $A_t$  equivale a la concentración absorbida acumulada (es decir, la que habría en plasma si no existieran procesos de eliminación simultáneos).

**Paso 1.**

Introducción de los datos experimentales de concentración plasmática-tiempo en la hoja de cálculo.

**Paso 2.**

Cálculo del  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{t-\infty}$  y  $AUC_{0-\infty}$

**Paso 3.**

Cálculo de la concentración eliminada para cada tiempo  $t$  ( $E$ ).

La concentración eliminada se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$E = k_{el} \cdot AUC_0^t$$

$k_{el}$  se obtiene a partir de la fracción final exponencial de la curva de concentración plasmática tiempo y  $AUC_{0-t}$  representa el área bajo la curva de concentración plasmática tiempo entre 0 y  $t$ .

ESTIMACION.LINEAL							
	A	B	C	D	E	F	G
4							
5							
6	tiempo	Concentraci	LN Conc.	AUC parcial	AUC 0-t	kel	E=kel*AUC 0
7	horas	mcg/mL		mcg*h/mL	mcg*h/mL	1/horas	mcg/mL
8	0	0					
9	1	5	1.609437912	2.5	2.5	0.20371109	=F9*E9
10	2	7	1.945910149	6.0	8.5	0.20371109	
11	3	7.4	2.00148	7.2	15.7	0.20371109	
12	4	7	1.945910149	7.2	22.9	0.20371109	
13	6	5.4	1.686398954	12.4	35.3	0.20371109	
14	8	3.7	1.30833282	9.1	44.4	0.20371109	
15	12	1.6	0.470003629	10.6	55.0	0.20371109	
16							

ESTIMACION.LINEAL							
	A	B	C	D	E	F	G
1	<b>Cálculo de la fracción absorbida:</b>						
2	<b>Método de Wagner-Nelson</b>						
3	<b>Administración suspensión oral 500 mg Antibiotico</b>						
4							
5							
6	tiempo	Concentraci	LN Conc.	AUC parcial	AUC 0-t	kel	E=kel*AUC 0
7	horas	mcg/mL		mcg*h/mL	mcg*h/mL	1/horas	mcg/mL
8	0	0					
9	1.00	5.00	1.61	2.50	2.50	0.20	0.51
10	2.00	7.00	1.95	6.00	8.50	0.20	1.73
11	3.00	7.40	2.00	7.20	15.70	0.20	3.20
12	4.00	7.00	1.95	7.20	22.90	0.20	4.66
13	6.00	5.40	1.69	12.40	35.30	0.20	7.19
14	8.00	3.70	1.31	9.10	44.40	0.20	9.04
15	12.00	1.60	0.47	10.60	55.00	0.20	11.20
16							

#### Paso 4.

Cálculo de la concentración absorbida acumulada  $A_t$ .

Este valor se calcula como suma de la concentración plasmática (C), y la concentración eliminada (E).

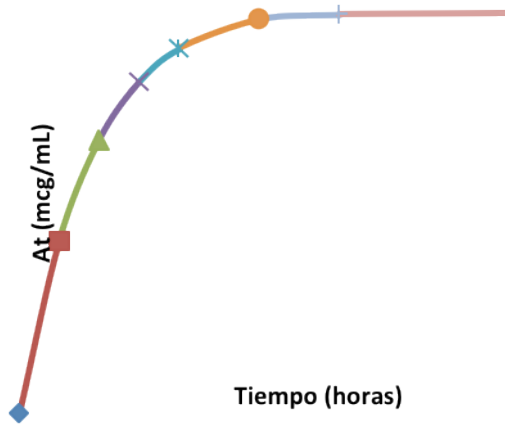
ESTIMACION.LINEAL								=G9+B9	
	A	B	C	D	E	F	G	H	
1	<b>Cálculo de la fracción absorbida:</b>								
2	<b>Método de Wagner-Nelson</b>								
3	<b>Administración suspensión oral 500 mg Antibiótico</b>								
4									
5									
6	tiempo	Concentració	LN Conc.	AUC parcial	AUC 0-t	kel	E=kel*AUC 0	At=C+E	
7	horas	mcg/mL		mcg*h/mL	mcg*h/mL	1/horas	mcg/mL	mcg/mL	
8	0	0						0	
9	1.00	5.00	1.61	2.50	2.50	0.20	0.51	=G9+B9	
10	2.00	7.00	1.95	6.00	8.50	0.20	1.73		
11	3.00	7.40	2.00	7.20	15.70	0.20	3.20		
12	4.00	7.00	1.95	7.20	22.90	0.20	4.66		
13	6.00	5.40	1.69	12.40	35.30	0.20	7.19		
14	8.00	3.70	1.31	9.10	44.40	0.20	9.04		
15	12.00	1.60	0.47	10.60	55.00	0.20	11.20		
16									
17									

Tras absorberse la cantidad de fármaco máxima susceptible de hacerlo los valores de  $A_t$  se mantienen constantes y equivale a  $A_\infty$ , que es la cantidad máxima de fármaco absorbida y equivalente matemáticamente a:

$$A_\infty = k_{el} \cdot \int_0^\infty C \cdot dt$$

I11								=G9+B9	
	A	B	C	D	E	F	G	H	
1	<b>Cálculo de la fracción absorbida:</b>								
2	<b>Método de Wagner-Nelson</b>								
3	<b>Administración suspensión oral 500 mg Antibiótico</b>								
4									
5									
6	tiempo	Concentració	LN Conc.	AUC parcial	AUC 0-t	kel	E=kel*AUC 0	At=C+E	
7	horas	mcg/mL		mcg*h/mL	mcg*h/mL	1/horas	mcg/mL	mcg/mL	
8	0	0						0	
9	1.00	5.00	1.61	2.50	2.50	0.20	0.51	5.51	
10	2.00	7.00	1.95	6.00	8.50	0.20	1.73	8.73	
11	3.00	7.40	2.00	7.20	15.70	0.20	3.20	10.60	
12	4.00	7.00	1.95	7.20	22.90	0.20	4.66	11.66	
13	6.00	5.40	1.69	12.40	35.30	0.20	7.19	12.59	
14	8.00	3.70	1.31	9.10	44.40	0.20	9.04	12.74	
15	12.00	1.60	0.47	10.60	55.00	0.20	11.20	12.80	
16									
17									

Al representar gráficamente los valores de la concentración absorbida para cada tiempo de toma de muestra se obtiene una curva ascendente que se hace asintótica cuando cesa la absorción (Figura 2).



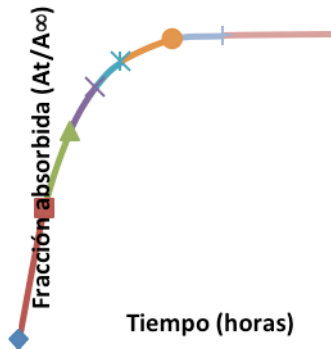
*Figura 2. Representación gráfica de las concentraciones absorbidas acumuladas ( $A_t$ ) para cada tiempo de toma de muestra ( $t$ ).*

### **Paso 5.**

Cálculo de la fracción de dosis absorbida

El cociente entre la concentración absorbida a un tiempo  $t$  y la concentración máxima absorbida ( $A_t/A_\infty$ ) representa la fracción absorbida, de la cantidad total que se absorberá, que puede ser igual o inferior a la dosis administrada.

ESTIMACION LINEAL								
A	B	C	D	E	F	G	H	I
1 Cálculo de la fracción absorbida:								
2 Método de Wagner-Nelson								
3 Administración suspensión oral 500 mg Antibiótico								
4								
5								
6 tiempo	Concentraci	LN Conc.	AUC parcial	AUC 0-t	kel	E=kel*AUC 0	At=C+E	Fa
7 horas	mcg/mL		mcg*h/mL	mcg*h/mL	1/horas	mcg/mL	mcg/mL	Fraccion absor
8	0	0					0	0
9	1.00	5.00	1.61	2.50	2.50	0.20	0.51	=H9/H\$15
10	2.00	7.00	1.95	6.00	8.50	0.20	1.73	0.68
11	3.00	7.40	2.00	7.20	15.70	0.20	3.20	0.83
12	4.00	7.00	1.95	7.20	22.90	0.20	4.66	0.91
13	6.00	5.40	1.69	12.40	35.30	0.20	7.19	0.98
14	8.00	3.70	1.31	9.10	44.40	0.20	9.04	1.00
15	12.00	1.60	0.47	10.60	55.00	0.20	11.20	1.00
16								



La fracción máxima absorbida será la unidad (o 100 cuando se expresa en forma de porcentaje). En la figura se muestra la representación gráfica de la fracción absorbida en función del tiempo de toma de muestra.

En caso de que la absorción sea completa el valor de la concentración absorbida acumulada para tiempo infinito ( $A_{\infty}$ ) multiplicado por el volumen de distribución del fármaco ( $V_d$ ) equivale a la dosis administrada. Sin embargo, cuando la absorción no es completa este producto ( $A_{\infty} \cdot V_d$ ) equivale una fracción de la dosis administrada ( $f \cdot D$ ), en la que  $f$  es la biodisponibilidad o fracción de la dosis administrada que llega de forma inalterada a la circulación sistémica.

## 22.3 Estimación de la fracción de dosis absorbida. Método de Loo-Riegelman

La estimación de la fracción de dosis absorbida adaptado a fármacos bicompartimentales es más complejo y se realiza a partir del método de Loo-Riegelman. Para la práctica del método es necesario conocer el valor de las microconstantes ( $k_{12}$ ,  $k_{21}$  y  $k_{el}$ ) determinadas previamente por vía intravenosa rápida o, menos frecuentemente, por perfusión a velocidad constante.

Los sujetos sometidos al ensayo se distribuyen en dos grupos (A y B). A los componentes del primer grupo (A) se les administra una dosis única, previamente decidida, del fármaco por vía intravenosa y se procede a la toma de muestras, a tiempos preestablecidos, para el trazado de las correspondientes curvas de concentración plasmática ( $C_p$ ) tiempo ( $t$ ). Paralelamente, se administra a los componentes del segundo grupo (B) el preparado de administración extravasal cuya fracción de dosis,  $F_a$ , se desea determinar, a la misma o parecida dosis, procediendo asimismo a la toma de las muestras de sangre, a tiempos preestablecidos, necesarias para la construcción de las curvas de nivel plasmático correspondientes.

Con los datos experimentales obtenidos tras la administración del fármaco por vía intravenosa se calculan las microconstantes ( $k_{el}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ) individuales y promedias.

### **Fundamento:**

En cualquier instante, la cantidad de medicamento absorbido ( $Q_a$ ) equivale a la suma de las existentes en el compartimento central ( $Q_c$ ), en el compartimento periférico ( $Q_p$ ) y las eliminadas ( $Q_e$ ) a los mismos tiempos:

$$Q_a = Q_c + Q_p + Q_e$$

El balance anterior expresado en concentración adopta la siguiente expresión:

$$A_t = C_t + P_t + E_t$$

El valor  $C_t$  se obtiene directamente de la curva extravasal para los diferentes tiempos que se consideran. En tiempo infinito,  $C_t$  se reduce a cero. El valor  $E_t$  se calcula por medida del área parcial comprendida bajo la curva de nivel plasmático extravasal entre tiempo cero y el tiempo  $t$  que se considera, mediante la expresión, análoga a la propuesta por Wagner-Nelson. El valor  $P_t$  es el que mayores dificultades de cálculo presenta, ya que no es posible tomar muestras del compartimiento periférico y por ello su determinación directa es inviable.

**Paso 1.**

Introducción de los datos experimentales de concentración plasmática-tiempo en la hoja de cálculo.

**Paso 2.**

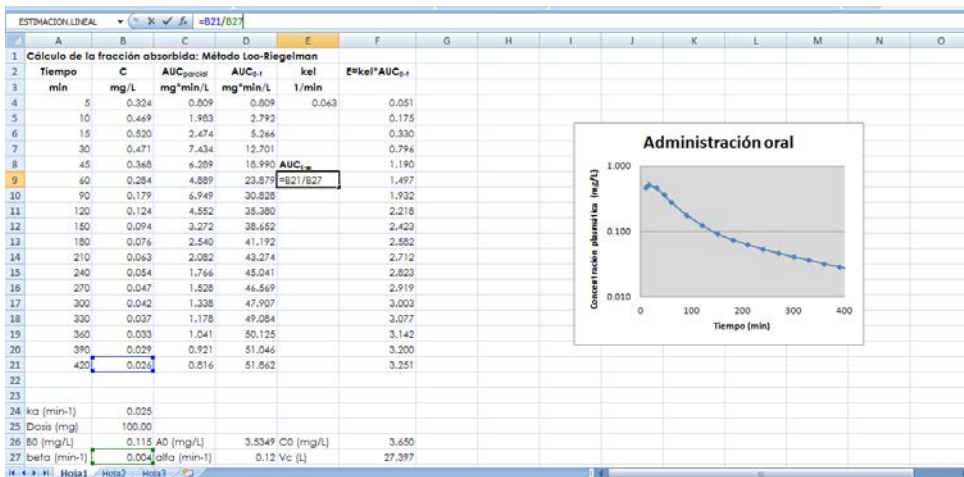
Cálculo del  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{t-\infty}$  y  $AUC_{0-\infty}$

**Paso 3.**

Cálculo de la concentración eliminada para cada tiempo  $t$  (E).

La concentración eliminada se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$E = k_{el} \cdot AUC_0^t$$



**PASO 4.** Cálculo de la concentración de fármaco en compartimiento periférico (P)

$$\frac{dP}{dt} = k_{12} \cdot C - k_{21} \cdot P$$

La integral de esta diferencial no ofrece una solución inmediata para el cálculo de la concentración de fármaco en el compartimento periférico, P. Para resolver esta indefinición se propone considerar una concentración plasmática inmediatamente anterior a C (sea C'),- así como una concentración en compartimento periférico inmediatamente anterior a P (sea, por ejemplo, P'). Se tendrá entonces:

$$C = C' + \Delta C$$

$$P = P' + \Delta P$$

Para tiempos muy cortos, los intervalos  $\Delta C$  y  $\Delta P$  podrían asimilarse a las diferenciales correspondientes, de manera que:

$$C = C' + dC$$

$$P = P' + dP$$

y, sustituyendo en la ecuación diferencial anterior, se obtiene:

$$\frac{dP}{dt} = k_{12} \cdot (C' + dC) - k_{21} \cdot (P' + dP)$$

y al integrar la ecuación anterior se obtiene la expresión matemática:

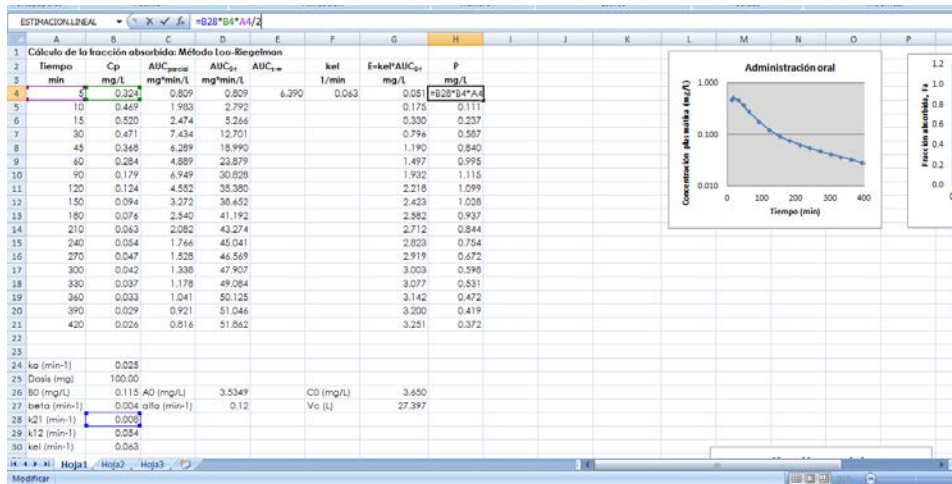
$$P = \frac{k_{12}}{k_{21}} \cdot C' \cdot \left(1 - e^{-k_{21}(t-t')}\right) + \frac{k_{21}(C - C')(t - t')}{2} + P' \cdot e^{-k_{21}(t-t')}$$

en la cual,  $k_{12}$  y  $k_{21}$  son las microconstantes de distribución y de retorno (determinadas, junto con  $k_{el}$ , por administración intravenosa),  $t$  es la unidad de tiempo en que se ha tomado la muestra de sangre,  $t'$  la unidad de tiempo correspondiente a la toma inmediatamente anterior,  $C$  es la concentración plasmática hallada en el instante  $t$  que se considera,  $C'$  la hallada en la unidad de tiempo  $t'$  inmediatamente anterior, y  $P'$  la concentración de fármaco existente en compartimento periférico en la unidad de tiempo inmediatamente anterior al que se considera, es decir,  $t'$ .

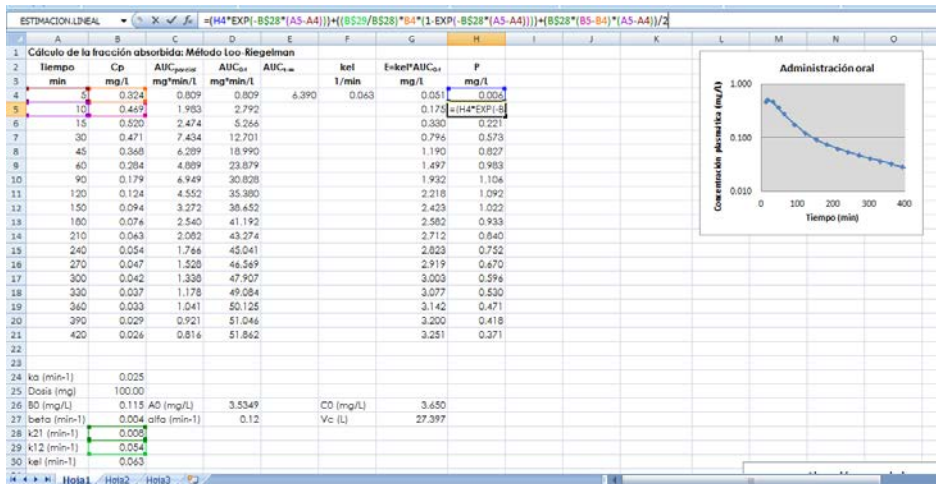


Puesto que se parte de tiempo cero, en el cual tanto  $C'$  como  $P'$  valen cero, para la primera unidad de tiempo (es decir, la correspondiente a la primera toma), todos los términos que multiplican a  $C'$  y a  $P'$  en la ecuación anterior se anulan, de manera que el valor  $P$  viene dado, en esta primera determinación, por la expresión simplificada:

$$P = \frac{k_{21} \cdot C \cdot t}{2}$$



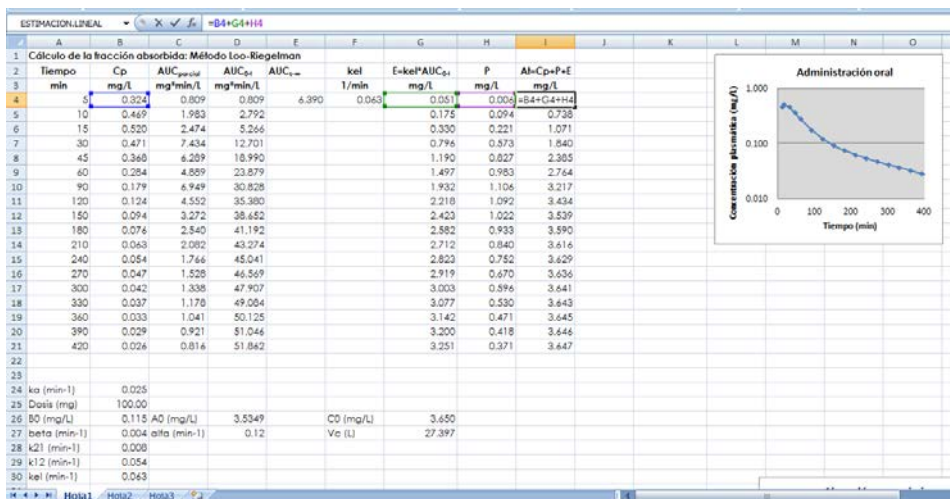
Para la segunda y siguientes muestras, el valor  $P'$  es, pues, el valor  $P$  obtenido de acuerdo con la ecuación indicada anteriormente.



#### Paso 4.

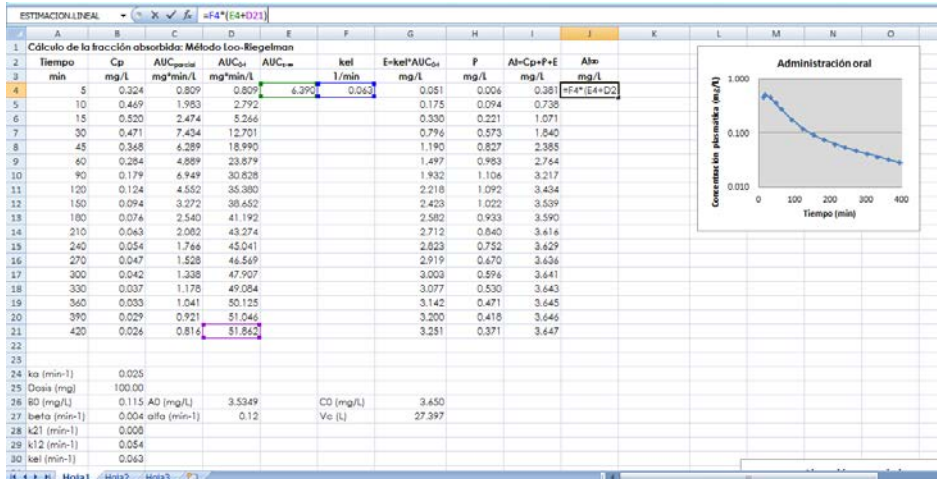
Cálculo de la concentración absorbida acumulada  $A_t$ .

Este valor se calcula como suma de la concentración plasmática (C), la concentración en compartimento periférico (P) y la concentración eliminada (E).

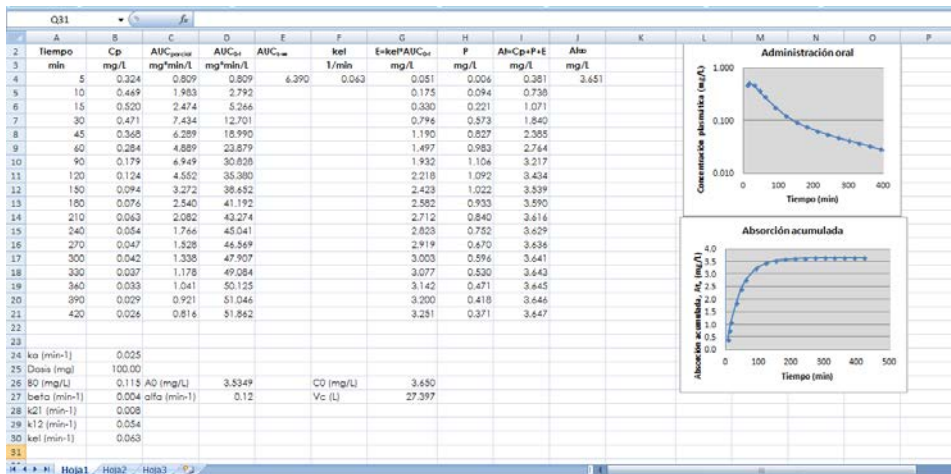


Tras absorberse la cantidad de fármaco máxima susceptible de hacerlo los valores de  $A_t$  se mantienen constantes y equivale a  $A_{\infty}$ , que es la cantidad máxima de fármaco absorbida y equivalente matemáticamente a:

$$A_{\infty} = k_{el} \cdot \int_0^{\infty} C \cdot dt$$

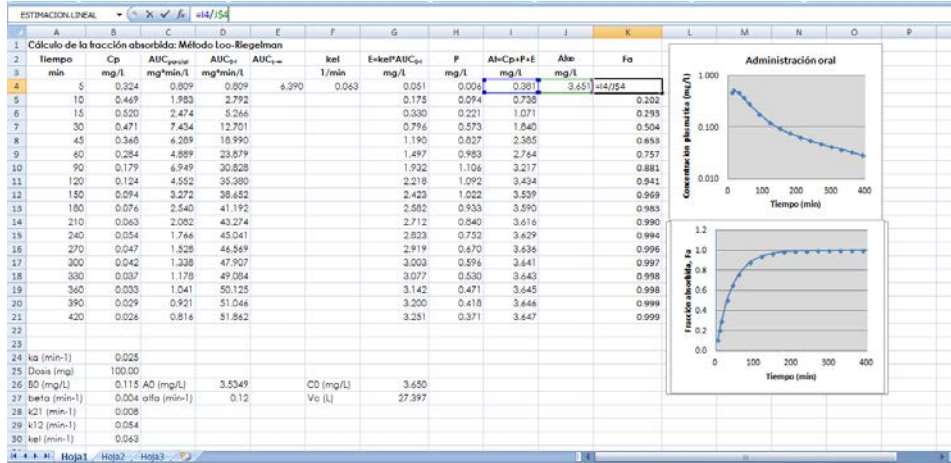


Al representar gráficamente los valores de la concentración absorbida para cada tiempo de toma de muestra se obtiene una curva ascendente que se hace asintótica cuando cesa la absorción.



**Paso 5.**  
Cálculo de la fracción de dosis absorbida.

El cociente entre la concentración absorbida a un tiempo  $t$  y la concentración máxima absorbida ( $A_t/A_\infty$ ) representa la fracción absorbida, de la cantidad total que se absorberá, que puede ser igual o inferior a la dosis administrada.



La fracción máxima absorbida será la unidad (o 100 cuando se expresa en forma de porcentaje).

En caso de que la absorción sea completa el valor de la concentración absorbida acumulada para tiempo infinito ( $A_\infty$ ) multiplicado por el volumen de distribución del fármaco ( $V_c$ ) equivale a la dosis administrada. Sin embargo, cuando la absorción no es completa este producto ( $A_\infty \cdot V_c$ ) equivale una fracción de la dosis administrada ( $f \cdot D$ ), en la que  $f$  es la biodisponibilidad o fracción de la dosis administrada que llega de forma inalterada a la circulación sistémica.

## 23. Sección parte aplicada: Cálculos en bioequivalencia

Virginia Merino Sanjuán<sup>a,b</sup>, Matilde Merino Sanjuán<sup>a,b</sup>, Victor Mangas Sanjuán<sup>c</sup>,  
Isabel González Álvarez<sup>c</sup>, Marival Bermejo Sanz<sup>c</sup>

*a Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia.  
Universidad de Valencia.*

*b Centro de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico. Unidad Mixta  
Universidad Politécnica de Valencia-Universidad de Valencia.*

*c Departamento de Ingeniería. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.  
Universidad Miguel Hernández.  
España.*

### 23.1 Fundamento

Los parámetros  $C_{max}$  y AUC son los utilizados habitualmente en los estudios de bioequivalencia puesto que estos parámetros reflejan la velocidad y magnitud de la absorción respectivamente.

Las guías de la EMA y la FDA recomiendan el uso de sus transformaciones logarítmicas para la evaluación de estos parámetros, ya que los datos logotransformados tienen desde el punto de vista estadístico las siguientes ventajas:

1. La distribución de los parámetros AUC y  $C_{max}$  es logarítmico-normal. Por otro lado su varianza tiende a incrementarse con el valor de su media. La transformación logarítmica resuelve este problema ya que la variable logotransformada presenta una distribución más simétrica y la varianza es independiente del valor de la media.
2. La transformación logarítmica permite hacer una aproximación que evita hacer inferencias sobre el cociente de los parámetros (AUC o  $C_{max}$ ) en la escala original. Aunque el parámetro de interés clínico al hacer la comparación es el cociente o relación entre la formulación problema y la de referencia, la división resulta poco adecuada para aplicar métodos

estadísticos paramétricos. Se debe tener en cuenta que cuando se conoce la desviación estándar de dos medias y se desea calcular su diferencia con su desviación estándar asociada, es sencillo a partir de los valores originales realizar la transmisión de error y calcular la desviación estándar de la diferencia. Sin embargo calcular la desviación estándar asociada al cociente de dos variables es mucho más complejo. Al realizar la transformación logarítmica la inferencia se realiza sobre la diferencia de los logaritmos ( $\ln T - \ln R$ ) con lo que es más sencilla la aplicación de un método paramétrico.

3. La transformación logarítmica permite obtener resultados interpretables desde el punto de vista clínico. Las inferencias sobre la diferencia de dos medias en escala logarítmica puede transformarse en inferencias sobre el cociente de las dos variables en la escala original (Nota: recuerde que  $\ln T - \ln R = \ln(T/R)$ ).

### Paso 1. Descripción del ensayo

Calcular los valores de área total bajo la curva de concentración plasmática tiempo ( $AUC_{0-\infty}$ ) y de concentración plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) a partir de los datos de concentración plasmática tiempo obtenidos tras la administración a los voluntarios sanos de los preparados problema y referencia. El cálculo de ambos parámetros se realiza utilizando el método no compartimental.

Insertar en las celdas los parámetros y los datos correspondientes al diseño experimental, es decir,

- Identificación del sujeto,
- Secuencia,
- Periodo,
- Formulación (problema o referencia),
- $C_{m\acute{a}x}$  y
- $AUC_{0-\infty}$

	A	B	C	D	E	F	G
1	Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulacion	Cmax	AUC	
2							
3							

## Paso 2. Inserción de los datos experimentales

Se introducen los datos identificando a los sujetos (variable continua), y la secuencia, período y formulación. Estas tres últimas variables discretas ordinales.

En caso de que se realice un estudio de bioequivalencia de diseño cruzado con dos períodos, dos secuencias y dos formulaciones las variables toman los valores “0 y 1” como se esquematiza en la tabla siguiente:

*Tabla 1. Diseño de un estudio de bioequivalencia*

		Periodo	
Grupo voluntarios	Secuencia	0	1
$n_1$	0	Problema o Test (0)	Referencia (1)
$n_2$	1	Referencia (1)	Problema o Test (0)

Siendo  $n_1$  y  $n_2$  el número de voluntarios de los grupos 1 y 2 respectivamente. Se requiere que transcurra un tiempo equivalente a 10 semividas biológicas entre la administración de los dos preparados a un mismo individuo.

Se calcula el logaritmo (neperiano o decimal) del parámetro de interés ( $AUC_{0-\infty}$  o  $C_{m\acute{a}x}$ ) para cada sujeto y cada una de las formulaciones.

H2											
=LN(F2)											
1	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
	Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulacion	Cmax	AUC	InCmax	In AUC			
2	3	0	0	0	2.44	215.9	0.892	5.375			
3	4	0	0	0	2.95	261.9	1.082	5.568			
4	6	0	0	0	2.97	308.8	1.089	5.733			
5	7	0	0	0	2.54	240.6	0.932	5.483			
6	8	0	0	0	2.81	202.4	1.033	5.310			
7	10	0	0	0	3.12	310.3	1.138	5.738			
8	1	1	1	0	3.05	245.7	1.115	5.504			
9	2	1	1	0	2.95	343.7	1.082	5.840			
10	5	1	1	0	2.26	186.6	0.815	5.229			
11	9	1	1	0	2.68	223.8	0.986	5.411			
12	11	1	1	0	2.18	184.9	0.779	5.220			
13	12	1	1	0	3.22	244.9	1.169	5.501			
14	1	1	0	1	3.14	259.6	1.144	5.559			
15	2	1	0	1	3.37	385.9	1.215	5.956			
16	5	1	0	1	2.57	212.9	0.944	5.361			
17	9	1	0	1	3.44	261.4	1.235	5.566			
18	11	1	0	1	2.72	236.9	1.001	5.468			
19	12	1	0	1	3.18	232.5	1.157	5.449			
20	3	0	1	1	3.35	235.6	1.209	5.462			
21	4	0	1	1	3.31	250.4	1.197	5.523			
22	6	0	1	1	3.26	343.9	1.182	5.840			
23	7	0	1	1	2.85	210.2	1.047	5.348			
24	8	0	1	1	2.83	173.3	1.040	5.155			
25	10	0	1	1	3.43	312.2	1.233	5.744			
26											
27											

Se calcula para cada sujeto la diferencia entre LnT (formulación Test o problema) y el LnR (formulación de referencia).



ESTIMACION.LINEAL					ESTIMACION.LINEAL				
A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
1	Sujeto	InCmaxTest	InCmaxRef	InCmaxTest-InCmaxRef	1	Sujeto	InCmaxTest	InCmaxRef	InCmaxTest-InCmaxRef
2	1	1.115	1.144	=B2-C2	2	1	1.115	1.144	-0.029
3	2	1.082	1.215		3	2	1.082	1.215	-0.133
4	3	0.892	1.209		4	3	0.892	1.209	-0.317
5	4	1.082	1.197		5	4	1.082	1.197	-0.115
6	5	0.815	0.944		6	5	0.815	0.944	-0.129
7	6	1.089	1.182		7	6	1.089	1.182	-0.093
8	7	0.932	1.047		8	7	0.932	1.047	-0.115
9	8	1.033	1.040		9	8	1.033	1.040	-0.007
10	9	0.986	1.235		10	9	0.986	1.235	-0.250
11	10	1.138	1.233		11	10	1.138	1.233	-0.095
12	11	0.779	1.001		12	11	0.779	1.001	-0.221
13	12	1.169	1.157		13	12	1.169	1.157	0.013
14					14				
15					15				
16	Sujeto	In AUCTest	In AUCRef	InAUCTest-InAUCRef	16	Sujeto	In AUCTest	In AUCRef	InAUCTest-InAUCRef
17	1	5.504	5.559		17	1	5.504	5.559	-0.055
18	2	5.840	5.956		18	2	5.840	5.956	-0.116
19	3	5.375	5.462		19	3	5.375	5.462	-0.087
20	4	5.568	5.523		20	4	5.568	5.523	0.045
21	5	5.229	5.361		21	5	5.229	5.361	-0.132
22	6	5.733	5.840		22	6	5.733	5.840	-0.108
23	7	5.483	5.348		23	7	5.483	5.348	0.135
24	8	5.310	5.155		24	8	5.310	5.155	0.155
25	9	5.411	5.566		25	9	5.411	5.566	-0.155
26	10	5.738	5.744		26	10	5.738	5.744	-0.006
27	11	5.220	5.468		27	11	5.220	5.468	-0.248
28	12	5.501	5.449		28	12	5.501	5.449	0.052
29					29				

Se calcula el valor medio de todas las diferencias (LnT-LnR).

ESTIMACION.LINEAL									
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	Sujeto	InCmaxTest	InCmaxRef	InCmaxTest-InCmaxRef					
2	1	1.115	1.144	-0.029		LnT-LnR	=PROMEDIO(D2:D13)		
3	2	1.082	1.215	-0.133					
4	3	0.892	1.209	-0.317					
5	4	1.082	1.197	-0.115					
6	5	0.815	0.944	-0.129					
7	6	1.089	1.182	-0.093					
8	7	0.932	1.047	-0.115					
9	8	1.033	1.040	-0.007					
10	9	0.986	1.235	-0.250					
11	10	1.138	1.233	-0.095					
12	11	0.779	1.001	-0.221					
13	12	1.169	1.157	0.013					
14									
15									
16	Sujeto	In AUCTest	In AUCRef	InAUCTest-InAUCRef		LnT-LnR	-0.04331		
17	1	5.504	5.559	-0.055					
18	2	5.840	5.956	-0.116					
19	3	5.375	5.462	-0.087					
20	4	5.568	5.523	0.045					
21	5	5.229	5.361	-0.132					
22	6	5.733	5.840	-0.108					
23	7	5.483	5.348	0.135					
24	8	5.310	5.155	0.155					
25	9	5.411	5.566	-0.155					
26	10	5.738	5.744	-0.006					
27	11	5.220	5.468	-0.248					
28	12	5.501	5.449	0.052					
29									

Se calcula el error estándar asociado a esa diferencia a partir del valor de la varianza residual del análisis de la varianza (ANOVA),  $V_r$  (a veces denominado MSE).

### Paso 3. Obtención de la varianza residual a partir del análisis ANOVA

El ANOVA de un factor para un estudio de bioequivalencia realizado de acuerdo con un diseño cruzado (2x2) permite obtener la varianza residual según se indica en la tabla que se expone a continuación.

*Tabla 2. Varianza residual de un estudio de bioequivalencia con un diseño cruzado*

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
<b>Interindividual</b>	SSI	n-1	$V_i = SSI / (n-1)$	$V_i / V_r$
Secuencia	SSS	s-1	$V_s = SSS / (s-1)$	$V_s / V_c$
Sujeto/secuencia	SSC	n-s	$V_c = SSC / (n-s)$	$V_c / V_r$
<b>Intraindividual</b>				
Formulaciones	SSF	f-1	$V_f = SSF / (f-1)$	$V_f / V_r$
Periodos	SSP	p-1	$V_p = SSP / (p-1)$	$V_p / V_r$



Los cálculos del ANOVA se inician con la obtención del término de corrección (CT) y la suma de cuadrados para cada una de las fuentes de variabilidad (SSF, SSI, SSP, SSS, SSC y SSR).

### 1. Cálculo del término de corrección (CT)

Se calcula a partir de la ecuación siguiente:

$$CT = \frac{(\sum Y_T)^2}{N_T}$$

$Y_T$ : Suma de todas las observaciones.

$N_T$ : Número total de observaciones, es decir  $2n$ .

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
2	3	0	0	0	215.9	5.375			5.375	5.462	
3	4	0	0	0	261.9	5.568			5.568	5.523	
4	6	0	0	0	308.8	5.733			5.733	5.840	
5	7	0	0	0	240.6	5.483			5.483	5.348	
6	8	0	0	0	202.4	5.310			5.310	5.155	
7	10	0	0	0	310.3	5.738			5.738	5.744	
8	3	0	1	1	235.6	5.462			5.504	5.559	
9	4	0	1	1	250.4	5.523			5.840	5.956	
10	6	0	1	1	343.9	5.840			5.229	5.361	
11	7	0	1	1	210.2	5.348			5.411	5.566	
12	8	0	1	1	173.3	5.155			5.220	5.468	
13	10	0	1	1	312.2	5.744			5.501	5.449	
14	1	1	0	1	259.6	5.559					
15	2	1	0	1	385.9	5.956					
16	5	1	0	1	212.9	5.361					
17	9	1	0	1	261.4	5.566					
18	11	1	0	1	236.9	5.468					
19	12	1	0	1	232.5	5.449					
20	1	1	1	0	245.7	5.504					
21	2	1	1	0	343.7	5.840					
22	5	1	1	0	186.6	5.229					
23	9	1	1	0	223.8	5.411					
24	11	1	1	0	184.9	5.220					
25	12	1	1	0	244.9	5.501					
26	n	12									
27											
28	Cálculos ANOVA										
29	sumaX2	730.751854									
30	CT	729.756457									
31	Sstotal=	0.99539694 SST									
32	Sstot/g1	0.04327813									
33	Vartot	0.04327813									

### 2. Cálculo de la suma de cuadrados formulaciones (SSF)

$$SSF = \frac{(\sum Y_{Ref})^2 + (\sum Y_{Test})^2}{n} - CT$$

$\sum Y_{Ref}$ : Suma de las observaciones (lnAUC o lnCmax) para la formulación de referencia.

$\sum Y_{Test}$ : Suma de las observaciones (lnAUC o lnCmax) para la formulación problema

CT: Factor de corrección

**a) Cálculo  $(\sum Y_{Ref})^2$**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulacion	AUC	ln AUC			lnAUCref	lnAUCTest	
2	3	0	0	0	215.9	5.375			5.375	5.462	
3	4	0	0	0	261.9	5.568			5.568	5.523	
4	6	0	0	0	308.8	5.733			5.733	5.840	
5	7	0	0	0	240.6	5.483			5.483	5.348	
6	8	0	0	0	202.4	5.310			5.310	5.155	
7	10	0	0	0	310.3	5.738			5.738	5.744	
8	3	0	1	1	235.6	5.462			5.504	5.559	
9	4	0	1	1	250.4	5.523			5.840	5.956	
10	6	0	1	1	343.9	5.840			5.229	5.361	
11	7	0	1	1	210.2	5.348			5.411	5.566	
12	8	0	1	1	173.3	5.155			5.220	5.468	
13	10	0	1	1	312.2	5.744			5.501	5.449	
14	1	1	0	1	259.6	5.559					
15	2	1	0	1	385.9	5.956					
16	5	1	0	1	212.9	5.361					
17	9	1	0	1	261.4	5.566					
18	11	1	0	1	236.9	5.468					
19	12	1	0	1	232.5	5.449					
20	1	1	1	0	245.7	5.504					
21	2	1	1	0	343.7	5.840					
22	5	1	1	0	186.6	5.229					
23	9	1	1	0	223.8	5.411					
24	11	1	1	0	184.9	5.220					
25	12	1	1	0	244.9	5.501					
26											
27											

**b) Cálculo  $(\sum Y_{Test})^2$**

ESTIMACION.LINEAL							=SUMA(F20:F25, F2:F7)^2				
	A	B	C	SUMA(número1, [número2], [número3], ...)			G	H	I	J	K
1	Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulacion AUC	In AUC			InAUCRef	InAUCTest		
2	3	0	0	0	215.9	5.375			5.375	5.462	
3	4	0	0	0	261.9	5.568			5.568	5.523	
4	6	0	0	0	308.8	5.733			5.733	5.840	
5	7	0	0	0	240.6	5.483			5.483	5.348	
6	8	0	0	0	202.4	5.310			5.310	5.155	
7	10	0	0	0	310.3	5.738			5.738	5.744	
8	3	0	1	1	235.6	5.462			5.504	5.559	
9	4	0	1	1	250.4	5.523			5.840	5.956	
10	6	0	1	1	343.9	5.840			5.229	5.361	
11	7	0	1	1	210.2	5.348			5.411	5.566	
12	8	0	1	1	173.3	5.155			5.220	5.468	
13	10	0	1	1	312.2	5.744			5.501	5.449	
14	1	1	0	1	259.6	5.559					
15	2	1	0	1	385.9	5.956					
16	5	1	0	1	212.9	5.361					
17	9	1	0	1	261.4	5.566					
18	11	1	0	1	236.9	5.468					
19	12	1	0	1	232.5	5.449					
20	1	1	1	0	245.7	5.504					
21	2	1	1	0	343.7	5.840					
22	5	1	1	0	186.6	5.229					
23	9	1	1	0	223.8	5.411					
24	11	1	1	0	184.9	5.220					
25	12	1	1	0	244.9	5.501					
26											
27											

c) Cálculo SSF

ESTIMACION.LINEAL							=(B37*B38)/B26				
	A	B	C	D	E	F	G				
1	Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulacion AUC	In AUC						
2	3	0	0	0	215.9	5.375					
3	4	0	0	0	261.9	5.568					
4	6	0	0	0	308.8	5.733					
5	7	0	0	0	240.6	5.483					
6	8	0	0	0	202.4	5.310					
7	10	0	0	0	310.3	5.738					
8	3	0	1	1	235.6	5.462					
9	4	0	1	1	250.4	5.523					
10	6	0	1	1	343.9	5.840					
11	7	0	1	1	210.2	5.348					
12	8	0	1	1	173.3	5.155					
13	10	0	1	1	312.2	5.744					
14	1	1	0	1	259.6	5.559					
15	2	1	0	1	385.9	5.956					
16	5	1	0	1	212.9	5.361					
17	9	1	0	1	261.4	5.566					
18	11	1	0	1	236.9	5.468					
19	12	1	0	1	232.5	5.449					
20	1	1	1	0	245.7	5.504					
21	2	1	1	0	343.7	5.840					
22	5	1	1	0	186.6	5.229					
23	9	1	1	0	223.8	5.411					
24	11	1	1	0	184.9	5.220					
25	12	1	1	0	244.9	5.501					
26	n										
27											
28	<b>Cálculos ANOVA</b>										
29	sumaX2	730.75195									
30	CT	723.75646									
31	Sintonal	0.9953959 SSF									
32	SintonIgl	0.0432781									
33	Varlot	0.0432781									
34											
35											
36	<b>Formulaciones</b>										
37	sumaFRef	4412.930									
38	sumaFTest	4344.215									
39	sumaFIn	723.75711									
40	sumaFIn-C	0.012557 SSF									
41											
42	<b>Periodos</b>										
43											

ESTIMACION.LINEAL							=B39-B30				
	A	B	C	D	E	F	G				
1	Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulacion AUC	In AUC						
2	3	0	0	0	215.9	5.375					
3	4	0	0	0	261.9	5.568					
4	6	0	0	0	308.8	5.733					
5	7	0	0	0	240.6	5.483					
6	8	0	0	0	202.4	5.310					
7	10	0	0	0	310.3	5.738					
8	3	0	1	1	235.6	5.462					
9	4	0	1	1	250.4	5.523					
10	6	0	1	1	343.9	5.840					
11	7	0	1	1	210.2	5.348					
12	8	0	1	1	173.3	5.155					
13	10	0	1	1	312.2	5.744					
14	1	1	0	1	259.6	5.559					
15	2	1	0	1	385.9	5.956					
16	5	1	0	1	212.9	5.361					
17	9	1	0	1	261.4	5.566					
18	11	1	0	1	236.9	5.468					
19	12	1	0	1	232.5	5.449					
20	1	1	1	0	245.7	5.504					
21	2	1	1	0	343.7	5.840					
22	5	1	1	0	186.6	5.229					
23	9	1	1	0	223.8	5.411					
24	11	1	1	0	184.9	5.220					
25	12	1	1	0	244.9	5.501					
26	n										
27											
28	<b>Cálculos ANOVA</b>										
29	sumaX2	730.75195									
30	CT	723.75646									
31	Sintonal	0.9953959 SSF									
32	SintonIgl	0.0432781									
33	Varlot	0.0432781									
34											
35											
36	<b>Formulaciones</b>										
37	sumaFRef	4412.930									
38	sumaFTest	4344.215									
39	sumaFIn	723.75711									
40	sumaFIn-C	LB39-B20									
41											
42	<b>Periodos</b>										
43											

### 3. Cálculo de la suma de cuadrados períodos (SSP)

$$SSP = \frac{(\sum P_1)^2 + (\sum P_2)^2}{n} - CT$$

$\sum P_1$ : Suma de las observaciones (lnAUC o lnCmax) en el periodo 1.

$\sum P_2$ : Suma de las observaciones (lnAUC o lnCmax) en el periodo 2.

CT: Factor de corrección

#### a) Cálculo $(\sum P_1)^2$

ESTIMACION.LINEAL												
=SUMA(F2:F7,F14:F19)^2												
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulaci	AUC	ln AUC			lnAUCRef	lnAUCTest		
2	3	0	0	0	215.9	5.375			5.375	5.462		
3	4	0	0	0	261.9	5.568			5.568	5.523		
4	6	0	0	0	308.8	5.733			5.733	5.840		
5	7	0	0	0	240.6	5.483			5.483	5.348		
6	8	0	0	0	202.4	5.310			5.310	5.155		
7	10	0	0	0	310.3	5.738			5.738	5.744		
8	3	0	1	1	235.6	5.462			5.504	5.559		
9	4	0	1	1	250.4	5.523			5.840	5.956		
10	6	0	1	1	343.9	5.840			5.229	5.361		
11	7	0	1	1	210.2	5.348			5.411	5.566		
12	8	0	1	1	173.3	5.155			5.220	5.468		
13	10	0	1	1	312.2	5.744			5.501	5.449		
14	1	1	0	1	259.6	5.559						
15	2	1	0	1	385.9	5.956						
16	5	1	0	1	212.9	5.361						
17	9	1	0	1	261.4	5.566						
18	11	1	0	1	236.9	5.468						
19	12	1	0	1	232.5	5.449						
20	1	1	1	0	245.7	5.504						
21	2	1	1	0	343.7	5.840						
22	5	1	1	0	186.6	5.229						
23	9	1	1	0	223.8	5.411						
24	11	1	1	0	184.9	5.220						
25	12	1	1	0	244.9	5.501						
26	n		12									
27												
28	<b>Cálculos ANOVA</b>											
29	suma^2	730.75185										
30	CT	729.75646										
31	Sstotal=	0.9953969 SST										
32	Sstotgl	0.0432781										
33	Vartot	0.0432781										
34												
35												
36	<b>Formulaciones</b>				<b>Periodos</b>							
37	sumaFRef	4412.998		sumaP(0)	=SUMA(F2:							
38	sumaFTest	4344.215		sumaP2(1)	4326.9531							
39	sumaF/n	729.76771		SumaP/n	729.78233							
40	sumaF/n-C	0.0112853	SSF	SumaP/n-C	0.026 SSP							
41												
42												

#### b) Cálculo $(\sum P_2)^2$

ESTIMACION.LINEAL													X ✓ f_x		=(SUMA(F8:F13,F20:F25))^2	
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L				
1	Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulaci	AUC	In AUC			InAUCRef	InAUCTest						
2	3	0	0	0	215.9	5.375			5.375	5.462						
3	4	0	0	0	261.9	5.568			5.568	5.523						
4	6	0	0	0	308.8	5.733			5.733	5.840						
5	7	0	0	0	240.6	5.483			5.483	5.348						
6	8	0	0	0	202.4	5.310			5.310	5.155						
7	10	0	0	0	310.3	5.738			5.738	5.744						
8	3	0	1	1	235.6	5.462			5.504	5.559						
9	4	0	1	1	250.4	5.523			5.840	5.956						
10	6	0	1	1	343.9	5.840			5.229	5.361						
11	7	0	1	1	210.2	5.348			5.411	5.566						
12	8	0	1	1	173.3	5.155			5.220	5.468						
13	10	0	1	1	312.2	5.744			5.501	5.449						
14	1	1	0	1	259.6	5.559										
15	2	1	0	1	385.9	5.956										
16	5	1	0	1	212.9	5.361										
17	9	1	0	1	261.4	5.566										
18	11	1	0	1	236.9	5.468										
19	12	1	0	1	232.5	5.449										
20	1	1	1	0	245.7	5.504										
21	2	1	1	0	343.7	5.840										
22	5	1	1	0	186.6	5.229										
23	9	1	1	0	223.8	5.411										
24	11	1	1	0	184.9	5.220										
25	12	1	1	0	244.9	5.501										
26	n		12													
27																
28	<b>Cálculos ANOVA</b>															
29	sumaN2	730.75185														
30	CT	729.75646														
31	Sstotal=	0.9353969	<b>SST</b>													
32	Sstot/rl	0.0432781														
33	Vartot	0.0432781														
34																
35																
36	<b>Formulaciones</b>			<b>Periodos</b>												
37	sumaFRef	4412.398		sumaP{0}	4430.835											
38	sumaFTest	4344.215		sumaP2{1}	=SUMA(F8:F13,F20:F25)											
39	sumaFIn	729.76771		SumaPIn	729.78233											
40	sumaFIn-C	0.0112553	<b>SSF</b>	SumaPIn-C	0.026	<b>SSP</b>										
41																
42																

c) Cálculo SSP



ESTIMACION.LINEAL										=E39-B30					
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L			
1	Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulacion	AUC	In AUC			InAUCRef	InAUCTest					
2	3	0	0	0	215.9	5.375			5.375	5.462					
3	4	0	0	0	261.9	5.568			5.568	5.523					
4	6	0	0	0	308.8	5.733			5.733	5.840					
5	7	0	0	0	240.6	5.483			5.483	5.348					
6	8	0	0	0	202.4	5.310			5.310	5.155					
7	10	0	0	0	310.3	5.738			5.738	5.744					
8	3	0	1	1	235.6	5.462			5.504	5.559					
9	4	0	1	1	250.4	5.523			5.840	5.956					
10	6	0	1	1	343.9	5.840			5.229	5.361					
11	7	0	1	1	210.2	5.348			5.411	5.566					
12	8	0	1	1	173.3	5.155			5.220	5.468					
13	10	0	1	1	312.2	5.744			5.501	5.449					
14	1	1	0	1	259.6	5.559									
15	2	1	0	1	385.9	5.956									
16	5	1	0	1	212.9	5.361									
17	9	1	0	1	261.4	5.566									
18	11	1	0	1	236.9	5.468									
19	12	1	0	1	232.5	5.449									
20	1	1	1	0	245.7	5.504									
21	2	1	1	0	343.7	5.840									
22	5	1	1	0	186.6	5.229									
23	9	1	1	0	223.8	5.411									
24	11	1	1	0	184.9	5.220									
25	12	1	1	0	244.9	5.501									
26	n		12												
27															
28	<b>Cálculos ANOVA</b>														
29	sumaX2	730.75185													
30	CT	729.75646													
31	Sstotal	0.9953969	SST												
32	Sstotgl	0.0432781													
33	Varlot	0.0432781													
34															
35															
36	<b>Formulaciones</b>			<b>Periodos</b>											
37	sumaFRef	4412.998		sumaP(0)	4430.835										
38	sumaFTest	4344.215		sumaP(1)	4326.5531										
39	sumaFIn	729.76771		SumaPIn	729.78233										
40	sumaFIn-C	0.0112553	SSF	SumaPIn-C	=E39-B30	SSP									
41															
42															

#### 4. Cálculo de la suma de cuadrados interindividual (SSI)

$$SSI = \frac{\sum (\sum S_i)^2}{p} - CT$$

$\sum S_i$ : Suma de las observaciones (lnAUC o lnCmax) para el individuo i.

CT: Factor de corrección

##### a) Cálculo $(\sum S_i)^2$

ESTIMACION.LINEAL    X ✓ fx    =SUMA(I2:J2)^2

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulador	AUC	In AUC			InAUCRef	InAUCTest		
2	3	0	0	0	215.9	5.375			5.375	5.462	=SUMA(I2:J2)^2	
3	4	0	0	0	261.9	5.568			5.568	5.523	123.011	
4	6	0	0	0	308.8	5.733			5.733	5.840	133.935	
5	7	0	0	0	240.6	5.483			5.483	5.348	117.315	
6	8	0	0	0	202.4	5.310			5.310	5.155	109.522	
7	10	0	0	0	310.3	5.738			5.738	5.744	131.818	
8	3	0	1	1	235.6	5.462			5.504	5.559	122.396	
9	4	0	1	1	250.4	5.523			5.840	5.956	139.130	
10	6	0	1	1	343.9	5.840			5.229	5.361	112.144	
11	7	0	1	1	210.2	5.348			5.411	5.566	120.490	
12	8	0	1	1	173.3	5.155			5.220	5.468	114.222	
13	10	0	1	1	312.2	5.744			5.501	5.449	119.897	
14	1	1	0	1	259.6	5.559						
15	2	1	0	1	385.9	5.956						
16	5	1	0	1	212.9	5.361						
17	9	1	0	1	261.4	5.566						
18	11	1	0	1	236.9	5.468						
19	12	1	0	1	232.5	5.449						
20	1	1	1	0	245.7	5.504						
21	2	1	1	0	343.7	5.840						
22	5	1	1	0	186.6	5.229						
23	9	1	1	0	223.8	5.411						
24	11	1	1	0	184.9	5.220						
25	12	1	1	0	244.9	5.501						
26	n		12									
27												
28	Cálculos ANOVA											
29	sumaX2	730.75185										
30	CT	729.75646										

Ej. Bioequivalencia    Hoja2    ANOVA    ANOVA InAUC

**b) Cálculo  $\Sigma(\Sigma S_i)^2/p$**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulador	AUC	In AUC			InAUCRef	InAUCTest		12F x 1C
2	3	0	0	0	215.9	5.375			5.375	5.462	117.440	
3	4	0	0	0	261.9	5.568			5.568	5.523	123.011	
4	6	0	0	0	308.8	5.733			5.733	5.840	133.935	
5	7	0	0	0	240.6	5.483			5.483	5.348	117.315	
6	8	0	0	0	202.4	5.310			5.310	5.155	109.522	
7	10	0	0	0	310.3	5.738			5.738	5.744	131.818	
8	3	0	1	1	235.6	5.462			5.504	5.559	122.396	
9	4	0	1	1	250.4	5.523			5.840	5.956	139.130	
10	6	0	1	1	343.9	5.840			5.229	5.361	112.144	
11	7	0	1	1	210.2	5.348			5.411	5.566	120.490	
12	8	0	1	1	173.3	5.155			5.220	5.468	114.222	
13	10	0	1	1	312.2	5.744			5.501	5.449	119.897	
14	1	1	0	1	259.6	5.559					=SUMA(K2:K13)/2	
15	2	1	0	1	385.9	5.956						
16	5	1	0	1	212.9	5.361						
17	9	1	0	1	261.4	5.566						
18	11	1	0	1	236.9	5.468						
19	12	1	0	1	232.5	5.449						
20	1	1	1	0	245.7	5.504						
21	2	1	1	0	343.7	5.840						
22	5	1	1	0	186.6	5.229						
23	9	1	1	0	223.8	5.411						
24	11	1	1	0	184.9	5.220						
25	12	1	1	0	244.9	5.501						
26	n		12									
27												
28	Cálculos ANOVA											
29	sumaX2	730.75185										
30	CT	729.75646										

Ej. Bioequivalencia    Hoja2    ANOVA    ANOVA InAUC

### c) Cálculo SSI

The screenshot shows an Excel spreadsheet with two main data tables side-by-side. The left table is for 'ANOVA InAUC' and the right is for 'ANOVA InAUCTest'. Both tables have columns for 'Signo', 'Secuencia', 'Periodo', 'Formulacion AUC', 'InAUC', and 'InAUCTest'. Below the data tables, there are summary statistics for 'Cálculos ANOVA' (ANOVA) and 'Formulaciones', 'Periodos', and 'Individuos'.

### 5. Cálculo de la suma de cuadrados de la secuencia (SSS)

$$SSS = \frac{(\sum G_1)^2 + (\sum G_2)^2}{n} - CT$$

$\sum G_1$ : Suma de las observaciones (lnAUC o lnCmax) en la secuencia 1.

$\sum G_2$ : Suma de las observaciones (lnAUC o lnCmax) en la secuencia 2.

CT: Factor de corrección

#### a) Cálculo $(\sum G_1)^2$ y $(\sum G_2)^2$

This screenshot is similar to the one above but highlights the calculation of the sum of squares of the sequence (SSS). The formula bar at the top shows the calculation:  $=SUMA(F14:F25)^2$ . The spreadsheet includes columns for 'Signo', 'Secuencia', 'Periodo', 'Formulacion AUC', 'InAUC', and 'InAUCTest'. Below the data tables, there are summary statistics for 'Cálculos ANOVA' and 'Formulaciones', 'Periodos', and 'Individuos'.

## b) Cálculo SSS

The image shows a detailed Excel spreadsheet for ANOVA calculations. It is divided into two main sections: 'ESTIMACION LINEAL' for experiment K36-K37 (left) and K3B-B30 (right). Each section contains a data table with columns for Subject (Sujeto), Sequence (Secuencia), Period (Periodo), Formulation (Formulacion), and Individual (Indiv). Below the data tables, there are sections for 'Cálculos ANOVA' (ANOVA Calculations) and 'Formulaciones' (Formulations). The ANOVA sections include calculations for Total (Total), Between (Entre), Within (Dentro), and Error (Error) sums of squares, along with F-values and p-values. The 'Formulaciones' section lists various formulations and their corresponding individual values.

## 6. Cálculo de la suma de cuadrados de la interacción individuos/secuencia (SSC)

$$SSC = \frac{\sum(Y_T^2)}{2} + \frac{(\sum G_1)^2 + (\sum G_2)^2}{n}$$

$(Y_T^2)$ : Suma de todas las observaciones al cuadrado

### a) Cálculo de $Y_T^2$

ESTIMACION.LINEAL													
=K14													
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	
1	Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulac	AUC	In AUC			InAUCRef	InAUCTest			
2	3	0	0	0	215.9	5.375			5.375	5.462		117.440	
3	4	0	0	0	261.9	5.568			5.568	5.523		123.011	
4	6	0	0	0	308.8	5.733			5.733	5.840		133.935	
5	7	0	0	0	240.6	5.483			5.483	5.348		117.315	
6	8	0	0	0	202.4	5.310			5.310	5.155		109.522	
7	10	0	0	0	310.3	5.738			5.738	5.744		131.818	
8	3	0	1	1	235.6	5.462			5.504	5.559		122.396	
9	4	0	1	1	250.4	5.523			5.840	5.956		139.130	
10	6	0	1	1	343.9	5.840			5.229	5.361		112.144	
11	7	0	1	1	210.2	5.348			5.411	5.566		120.490	
12	8	0	1	1	173.3	5.155			5.220	5.468		114.222	
13	10	0	1	1	312.2	5.744			5.501	5.449		119.897	
14	1	1	0	1	259.6	5.559						730.653	
15	2	1	0	1	385.9	5.956							
16	5	1	0	1	212.9	5.361							
17	9	1	0	1	261.4	5.566							
18	11	1	0	1	236.9	5.468							
19	12	1	0	1	232.5	5.449							
20	1	1	1	0	245.7	5.504							
21	2	1	1	0	343.7	5.840							
22	5	1	1	0	186.6	5.229							
23	9	1	1	0	223.8	5.411							
24	11	1	1	0	184.9	5.220							
25	12	1	1	0	244.9	5.501							
26	n		12										
27													
28	<b>Cálculos ANOVA</b>												
29	sumsX2	730.7519											
30	CT	729.7565											
31	Sstotal=	0.995397	<b>SST</b>										
32	Sstot/gl	0.043278											
33	Vartot	0.043278											
34													
35													
36	<b>Formulaciones</b>		<b>Periodos</b>		<b>Individuos</b>							4392.862	
37	sumaFRef	4412.998	sumaP1(0)	4430.835	sumalnd1							4364.239	
38	sumaFTes	4344.215	sumaP2(1)	4326.553	sumalnd2							729.758	
39	sumaFfn	729.7677	SumaPfn	729.7823	sumalnd3							0.002	
40	sumaFfn-C	0.011255	<b>SSF</b>	SumaPfn-C	0.026	<b>SSP</b>						<b>SSS</b>	
41													
42									=K14				
43									0.9026	-0.902563154		0.901	0.9026
44									<b>SSI</b>			<b>SSC</b>	<b>SSS-SSC</b>
45													
46													

b) Cálculo de SSC

ESTIMACION.LINEAL											
=H42-K39											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulac	AUC	In AUC			InAUCRef	InAUCTest	
2	3	0	0	0	215.9	5.375			5.375	5.462	117.440
3	4	0	0	0	261.9	5.568			5.568	5.523	123.011
4	6	0	0	0	308.8	5.733			5.733	5.840	133.935
5	7	0	0	0	240.6	5.483			5.483	5.348	117.315
6	8	0	0	0	202.4	5.310			5.310	5.155	109.522
7	10	0	0	0	310.3	5.738			5.738	5.744	131.818
8	3	0	1	1	235.6	5.462			5.504	5.559	122.396
9	4	0	1	1	250.4	5.523			5.840	5.956	139.130
10	6	0	1	1	343.9	5.840			5.229	5.361	112.144
11	7	0	1	1	210.2	5.348			5.411	5.566	120.490
12	8	0	1	1	173.3	5.155			5.220	5.468	114.222
13	10	0	1	1	312.2	5.744			5.501	5.449	119.897
14	1	1	0	1	259.6	5.559					730.659
15	2	1	0	1	385.9	5.956					
16	5	1	0	1	212.9	5.361					
17	9	1	0	1	261.4	5.566					
18	11	1	0	1	236.9	5.468					
19	12	1	0	1	232.5	5.449					
20	1	1	1	0	245.7	5.504					
21	2	1	1	0	343.7	5.840					
22	5	1	1	0	186.6	5.229					
23	9	1	1	0	223.8	5.411					
24	11	1	1	0	184.9	5.220					
25	12	1	1	0	244.9	5.501					
26	n		12								
27											
28	<b>Cálculos ANOVA</b>										
29	sumaX2	730.7519									
30	CT	729.7565									
31	Sstotal=	0.995397	<b>SST</b>								
32	Sstot/ql	0.043278									
33	Vartot	0.043278									
34											
35											
36	<b>Formulaciones</b>		<b>Periodos</b>		<b>Individuos</b>						4392.862
37	sumaFRef	4412.998	sumaP1(0)	4430.835	sumaInd1						4364.239
38	sumaFTes	4344.215	sumaP2(1)	4326.553	sumaInd2						723.758
39	sumaF/n	729.7677	SumaP/n	729.7823	sumaInd3						0.002
40	sumaF/n-C	0.011255	<b>SSF</b>	SumaP/n-C	0.026	<b>SSP</b>					<b>SSS</b>
41									730.6590		
42									0.9026	-0.902563154	=H42-K39
43									<b>SSI</b>		<b>SSC</b>
44											
45											
46											

## 7. Cálculo de la suma de cuadrados residual

$$SSR = SST - SSF - SSI - SSP$$

ESTIMACION.LINEAL													=B31-B40-H42-E40		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M		
1	Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulac	AUC	In AUC			InAUCRef	InAUCTest					
2	3	0	0	0	215.9	5.375			5.375	5.462	117.440				
3	4	0	0	0	261.9	5.568			5.568	5.523	123.011				
4	6	0	0	0	308.8	5.733			5.733	5.840	133.935				
5	7	0	0	0	240.6	5.483			5.483	5.348	117.315				
6	8	0	0	0	202.4	5.310			5.310	5.155	109.522				
7	10	0	0	0	310.3	5.738			5.738	5.744	131.818				
8	3	0	1	1	235.6	5.462			5.504	5.559	122.396				
9	4	0	1	1	250.4	5.523			5.840	5.956	139.130				
10	6	0	1	1	343.9	5.840			5.229	5.361	112.144				
11	7	0	1	1	210.2	5.348			5.411	5.566	120.490				
12	8	0	1	1	173.3	5.155			5.220	5.468	114.222				
13	10	0	1	1	312.2	5.744			5.501	5.449	119.897				
14	1	1	0	1	259.6	5.559					730.659				
15	2	1	0	1	385.9	5.956									
16	5	1	0	1	212.9	5.361									
17	9	1	0	1	261.4	5.566									
18	11	1	0	1	236.9	5.468									
19	12	1	0	1	232.5	5.449									
20	1	1	1	0	245.7	5.504									
21	2	1	1	0	343.7	5.840									
22	5	1	1	0	186.6	5.229									
23	9	1	1	0	223.8	5.411									
24	11	1	1	0	184.9	5.220									
25	12	1	1	0	244.9	5.501									
26	n		12												
27															
28	<b>Cálculos ANOVA</b>														
29	sumaX2	730.7519													
30	CT	729.7665													
31	Sstotal=	0.995397 <b>SST</b>													
32	Sstotfjl	0.043278													
33	Vartot	0.043278													
34															
35															
36	<b>Formulaciones</b>		<b>Periodos</b>		<b>Individuos</b>							4392.862			
37	sumaFRef	4412.990	sumaP1(0)	4430.895	sumaind1							4364.239			
38	sumaFTest	4344.215	sumaP2(1)	4326.553	sumaind2							729.758			
39	sumaFIn	729.7677	SumaPIn	729.7823	sumaind3							0.002			
40	sumaFIn-CT	0.011255 <b>SSF</b>	SumaPInu	0.026 <b>SSP</b>	Sumaind4							<b>SSS</b>			
41					sumaintotf2	730.6590									
42					sumaintot-CT	0.9026		0.082051196				0.901	0.9026		
43					<b>SSI</b>						<b>SSC</b>	<b>SSS-SSC</b>			
44															
45	<b>SSR</b>	=B31-B40-I													
46															

A continuación se trasladan los valores al cuadro resumen del análisis de varianza y se calcula la varianza residual, Vr

	Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
49	<b>Interindividual</b>	SSI	n-1	V=SSI/(n-1)	Vj/Vi
50	Secuencia	SSS	s-1	Vs=SSS/(s-1)	Vs/Vc
51	Sujeto/Secuencia	SSC	n*s	Vc=SSC/(n*s)	Vc/Vr
52	<b>Intraindividual</b>				
53	Formulaciones	SSF	f-1	Vf=SSF/(f-1)	Vf/Vr
54	Periodos	SSP	p-1	Vp=SSP/(p-1)	Vp/Vr
55	Residual	SSR	g	Vr=SSR/g	
56	Total	SST	N-1		
57	SSR= SST-SSs-SSP-SSi				
58					
59					
60					
61	n	12			
62	f	2			
63	s	2			
64	p	2			
65					
66					

	Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
50	<b>Interindividual</b>	0.9026	11	0.0821	14.7390
51	Secuencia	0.0019	1	0.0019	0.0216
52	Sujeto/Secuencia	0.0006	10	0.0001	16.1669
53	<b>Intraindividual</b>				
54	Formulaciones	0.0119	1	0.0119	2.0204
55	Periodos	0.0259	1	0.0259	0.4644
56	Residual	0.0597	10	0.0596	
57	Total	0.9954	23		
58	SSR= SST-SSs-SSP-SSi				

#### Paso 4. Obtención del intervalo de confianza 90%

El intervalo de confianza 90% del cociente de medias (IC90%) con los datos logotransformados se calcula a partir de la expresión siguiente:

$$IC90\% = e^{(\ln AUC_{Test} - \ln AUC_{Ref}) \pm t_{(\alpha, v)} \cdot \sqrt{\frac{2V_r}{n}}} \quad IC90\% = e^{(\ln AUC_{Test} - \ln AUC_{Ref}) \pm t_{(\alpha, v)} \cdot SD}$$

t: valor de t de Student para un nivel de significación  $\alpha$  de 0.05; n: número de individuos que participan en el estudio y v: grados de libertad de la varianza residual ( $V_r$ ) (n-2); SD: Desviación estándar del cociente de medias; Vr: Varianza residual del ANOVA.

$\ln AUC_{Test}$  y  $\ln AUC_{Ref}$  son los valores de la media aritmética de los logaritmos neperianos de  $AUC_{Test}$  y  $AUC_{Ref}$ ; es decir el logaritmo neperiano de la media geométrica de  $AUC_{Test}$  y  $AUC_{Ref}$ .

Los límites inferior y superior (LI, LS) del IC90% se calculan del siguiente modo:

$$LI = e^{(\ln AUC_{Test} - \ln AUC_{Ref}) - t_{(\alpha, v)} \cdot SD}$$

$$LS = e^{(\ln AUC_{Test} - \ln AUC_{Ref}) + t_{(\alpha, v)} \cdot SD}$$

### 1. Cálculo del valor medio del $\ln AUC_{Test}$ y del $\ln AUC_{Ref}$ y de la diferencia de medias

	B	C	D	E	F	G	H
14							
15							
16	$\ln AUC_{Test}$	$\ln AUC_{Ref}$	$\ln AUC_{Test} - \ln AUC_{Ref}$		$\ln T - \ln R$		
17	5.504	5.559	-0.055		Cociente Test/Ref		
18	5.840	5.956	-0.116		SD		
19	5.375	5.462	-0.087		two tailed t(0.05,10)		
20	5.568	5.523	0.045		IC90%		
21	5.229	5.361	-0.132				
22	5.733	5.840	-0.108		antiLn		
23	5.483	5.348	0.135		Límites	1.25	0.8
24	5.310	5.155	0.155				
25	5.411	5.566	-0.155				
26	5.738	5.744	-0.006				
27	5.220	5.468	-0.248				
28	5.501	5.449	0.052				
29	=PROMEDIO()	5.536					



	B	C	D	E	F	G	H
14							
15							
16	In AUCTest	In AUCRef	InAUCTest-InAUCRef		LnT-LnR		
17	5.504	5.559	-0.055		Cociente Test/Ref		
18	5.840	5.956	-0.116		SD		
19	5.375	5.462	-0.087		two tailed t(0.05,10)		
20	5.568	5.523	0.045		IC90%		
21	5.229	5.361	-0.132				
22	5.733	5.840	-0.108		antiLn		
23	5.483	5.348	0.135		Limites	1.25	0.8
24	5.310	5.155	0.155				
25	5.411	5.566	-0.155				
26	5.738	5.744	-0.006				
27	5.220	5.468	-0.248				
28	5.501	5.449	0.052				
29	5.493	=PROMEDIO					

	B	C	D	E	F	G	H
14							
15							
16	In AUCTest	In AUCRef	InAUCTest-InAUCRef		LnT-LnR	=B29-C29	
17	5.504	5.559	-0.055		Cociente Test/Ref		
18	5.840	5.956	-0.116		SD		
19	5.375	5.462	-0.087		two tailed t(0.05,10)		
20	5.568	5.523	0.045		IC90%		
21	5.229	5.361	-0.132				
22	5.733	5.840	-0.108		antiLn		
23	5.483	5.348	0.135		Limites	1.25	0.8
24	5.310	5.155	0.155				
25	5.411	5.566	-0.155				
26	5.738	5.744	-0.006				
27	5.220	5.468	-0.248				
28	5.501	5.449	0.052				
29	5.493	5.536					

## 2. Cálculo del cociente de medias de AUC

	B	C	D	E	F	G	H
14							
15							
16	In AUCTest	In AUCRef	InAUCTest-InAUCRef		LnT-LnR	-0.043	
17	5.504	5.559	-0.055		Cociente Test/Ref	=EXP(G16)	
18	5.840	5.956	-0.116		SD		
19	5.375	5.462	-0.087		two tailed t(0.05,10)		
20	5.568	5.523	0.045		IC90%		
21	5.229	5.361	-0.132				
22	5.733	5.840	-0.108		antiLn		
23	5.483	5.348	0.135		Limites	1.25	0.8
24	5.310	5.155	0.155				
25	5.411	5.566	-0.155				
26	5.738	5.744	-0.006				
27	5.220	5.468	-0.248				
28	5.501	5.449	0.052				
29	5.493	5.536					

3. Cálculo de la desviación estándar del cociente de medias (SD) a partir de la varianza residual obtenida en el ANOVA

$$SD = \sqrt{\frac{2V_r}{n}}$$

	B	C	D	E	F	G	H
14							
15							
16	In AUCTest	In AUCRef	InAUCTest-InAUCRef		LnT-LnR	-0.043	
17	5.504	5.559	-0.055		Cociente Test/Ref	0.958	
18	5.840	5.956	-0.116		SD	0.030	
19	5.375	5.462	-0.087		two tailed t(0.05,10)		
20	5.568	5.523	0.045		IC90%		
21	5.229	5.361	-0.132				
22	5.733	5.840	-0.108		antiLn		
23	5.483	5.348	0.135		Limites	1.25	0.8
24	5.310	5.155	0.155				
25	5.411	5.566	-0.155				
26	5.738	5.744	-0.006				
27	5.220	5.468	-0.248				
28	5.501	5.449	0.052				
29	5.493	5.536					

4. Obtención del valor de t para un riesgo de azar de 0.05 y 10 grados de libertad

	B	C	D	E	F	G	H
14							
15							
16	In AUCTest	In AUCRef	InAUCTest-InAUCRef		LnT-LnR	-0.043	
17	5.504	5.559	-0.055		Cociente Test/Ref	0.958	
18	5.840	5.956	-0.116		SD	0.030	
19	5.375	5.462	-0.087		two tailed t(0.05,10)	=DISTR.T.INV(0.1	
20	5.568	5.523	0.045		IC90%		
21	5.229	5.361	-0.132				
22	5.733	5.840	-0.108		antiLn		
23	5.483	5.348	0.135		Limites	1.25	0.8
24	5.310	5.155	0.155				
25	5.411	5.566	-0.155				
26	5.738	5.744	-0.006				
27	5.220	5.468	-0.248				
28	5.501	5.449	0.052				
29	5.493	5.536					

## 5. Obtención de los límites inferior y superior IC90%

	B	C	D	E	F	G	H
14							
15							
16	In AUCTest	In AUCRef	InAUCTest-InAUCRef		LnT-LnR	-0.043	
17	5.504	5.559	-0.055		Cociente Test/Ref	0.958	
18	5.840	5.956	-0.116		SD	0.030	
19	5.375	5.462	-0.087		two tailed t(0.05,10)	1.812	
20	5.568	5.523	0.045		IC90%	0.012 =G16-(G18*G19	
21	5.229	5.361	-0.132				
22	5.733	5.840	-0.108		antiLn		
23	5.483	5.348	0.135		Limites	1.25	0.8
24	5.310	5.155	0.155				
25	5.411	5.566	-0.155				
26	5.738	5.744	-0.006				
27	5.220	5.468	-0.248				
28	5.501	5.449	0.052				
29	5.493	5.536					

	B	C	D	E	F	G	H
14							
15							
16	In AUCTest	In AUCRef	InAUCTest-InAUCRef		LnT-LnR	-0.043	
17	5.504	5.559	-0.055		Cociente Test/Ref	0.958	
18	5.840	5.956	-0.116		SD	0.030	
19	5.375	5.462	-0.087		two tailed t(0.05,10)	1.812	
20	5.568	5.523	0.045		IC90%	=G16+(G18*G19)	
21	5.229	5.361	-0.132				
22	5.733	5.840	-0.108		antiLn		
23	5.483	5.348	0.135		Limites	1.25	0.8
24	5.310	5.155	0.155				
25	5.411	5.566	-0.155				
26	5.738	5.744	-0.006				
27	5.220	5.468	-0.248				
28	5.501	5.449	0.052				
29	5.493	5.536					

## 6. Cálculo del antilogaritmo de los límites del IC90%

	B	C	D	E	F	G	H
14							
15							
16	In AUCTest	In AUCRef	InAUCTest-InAUCRef		LnT-LnR	-0.043	
17	5.504	5.559	-0.055		Cociente Test/Ref	0.958	
18	5.840	5.956	-0.116		SD	0.030	
19	5.375	5.462	-0.087		two tailed t(0.05,10)	1.812	
20	5.568	5.523	0.045		IC90%	0.012	-0.099
21	5.229	5.361	-0.132				
22	5.733	5.840	-0.108		antiLn	=EXP(G20)	0.906
23	5.483	5.348	0.135		Limites	1.25	0.8
24	5.310	5.155	0.155				
25	5.411	5.566	-0.155				
26	5.738	5.744	-0.006				
27	5.220	5.468	-0.248				
28	5.501	5.449	0.052				
29	5.493	5.536					



## 24. Sección parte aplicada: Cálculos de números adimensionales

Sarín Colón Useche<sup>a,b</sup>, Isabel Gonzalez Alvarez<sup>a</sup>, Marival Bermejo Sanz<sup>a</sup>

*a Departamento de Ingeniería. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.  
Universidad Miguel Hernández. España.*

*b Departamento de Análisis y Control. Facultad de Farmacia y Bioanálisis.  
Universidad de Los Andes. Venezuela*

En este cuadernillo se presenta el procedimiento para calcular las magnitudes adimensionales a partir de las características del fármaco y de los parámetros fisiológicos intestinales humanos.

Las ecuaciones utilizadas son las siguientes ya descritas en el capítulo 2:

$$Dn = Tres/Tdis$$

$$Tdis = \rho \cdot r^2 / 3 \cdot D \cdot Cs$$

$$Do = (Dosis/250)/Cs$$

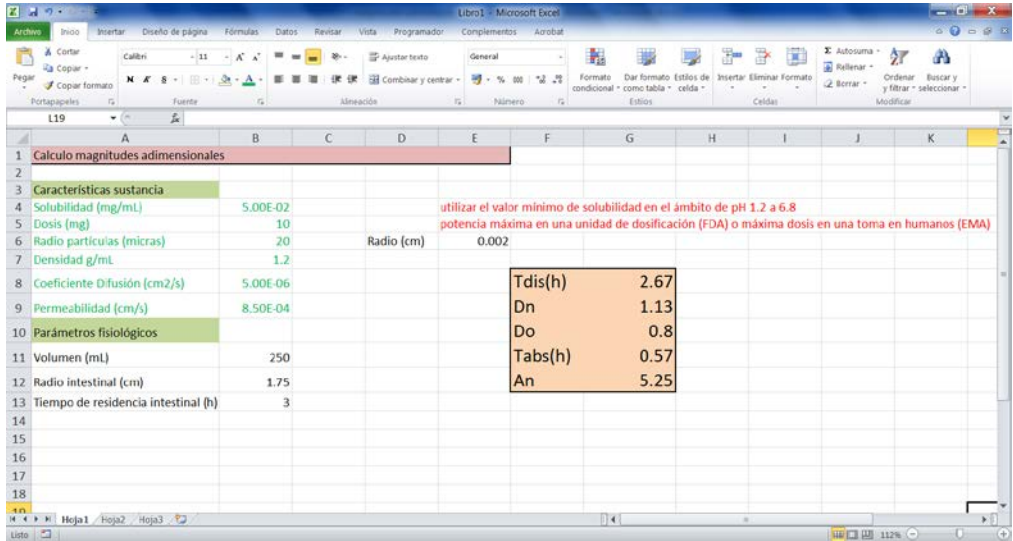
$$An = Tres/Tabs$$

$$Tabs = Rintest/Pef$$

En la hoja Excel se indica en la columna B en color verde los datos que deben incluirse de la sustancia activa y sus unidades.

Si se utilizan las unidades indicadas, los tiempos de disolución y de absorción (Tdis y Tabs) se obtienen en horas.

Para el cálculo del número de dosis se puede utilizar la máxima potencia en la unidad de dosificación como indica la guía de la FDA o la máxima dosis administrada en cada toma en humanos según la guía de la EMA.



Se calculan también en la hoja Excel las fracciones absorbidas con las siguientes ecuaciones

$$Fa = 1 - e^{-2 \cdot An}$$

Que permite calcular la fracción absorbida en ausencia de cualquier limitación debido a la solubilidad o a la velocidad de disolución

$$Fa = \frac{2 \cdot An}{Do}$$

Que sería válida para sustancias cuya disolución no se completa durante el tránsito intestinal (es decir  $Dn < 1$ )

Adicionalmente se calculan la dosis máxima absorbible (MAD) y la dosis absorbible limitada por solubilidad (SLAD)

$$MAD = Cs \cdot Ka \cdot Vi \cdot Tsi$$

$$SLAD = Cs \cdot 500 \cdot An$$

Dividiendo estas cantidades por la dosis se puede estimar la fracción oral absorbible.

Fracción absorbida1	$1 - \exp(-2 * A_n)$	0.99997
Fracción absorbida2	$2 * A_n / D_o$	0.26
Solubility limited absorbable dose	$500 * C_s * A_n$	131.14
Maximum absorbable dose MAD	$C_s * K_a * V_i * T_{si}$	131.14
Ka (h-1)	$2 * P_{eff} * 3600 / R$	3.50



## 25. Sección parte aplicada: Cálculos de la permeabilidad intestinal *in vitro*<sub>12</sub>

Victor Mangas Sanjuán<sup>a</sup>, Isabel González Álvarez<sup>a</sup>, Marta González Álvarez<sup>a</sup>  
 Marival Bermejo Sanz<sup>a</sup>  
*a Departamento de Ingeniería. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.  
 Universidad Miguel Hernández.  
 España.*

### Paso 1.

Descripción del ensayo

	A	B	C	D	E	F
1	Non Sink conditions					
2	Assumptions	Non sink conditions				
3		Donor Conc. Change				
4		Keep Mass balance				
5	Area cm2	1.131	Donor Vol mL	0.4	f	0.500
6	Receiver Vol mL	1.2	Sample Vol mL	0.6		
7			Init Conc. µM	50	init amount nM	20
8						
9	time min	0	Conc exp. µM	Conc. Theor Donor µM	Amount in receiver nMol	Amount in sample nMol
10		0	0	50	0	0
11	10	600	2.97	41.087	3.565	1.783

Insertar en las celdas preparadas el efecto los datos sobre nuestro sistema experimental, es decir,

- área en cm<sup>2</sup> de los insertos utilizados
- volúmenes en mL de la cámara dadora y receptora
- volumen de muestra que se toma en mL
- concentración inicial de la solución de fármaco por ejemplo micromolar
- la cantidad inicial de fármaco se obtiene multiplicando el Donor V\* Init Conc

- f corresponde al factor de dilución que se calcula como  

$$\frac{(\text{Receiver Vol}-\text{Sample Vol})}{\text{Receiver Vol}}$$

## Paso 2.

Inserción de los datos experimentales

Se introducen los tiempo de toma de muestras en minutos pero se transforman a segundos para obtener las permeabilidades den las unidades habituales.

Se tabulan las concentraciones experimentales obtenidas en las muestras.

Para calcular las cantidades en compartimento receptor se multiplican las concentraciones experimentales "Cexp" por el volumen de la cámara receptora "Receiver Vol"

time min	Conc exp. $\mu\text{M}$	Conc. Theor Donor $\mu\text{M}$	Amount in receiver nMol	Amount in sample nMol	AccumAmount in sample nMol
0	0	50	0	0	0
10	2.97	41.087	1.783	1.783	1.783
20	3.83	34.054	2.298	4.081	4.081
30	3.83	28.318	2.296	6.377	6.377
40	3.48	23.618	2.088	8.465	8.465
50	3.03	19.748	1.818	10.283	10.283
60	2.60	16.493	1.560	11.843	11.843

Hay que considerar por otra parte que con cada muestra se ha eliminado una cantidad de fármaco del compartimento receptor. Esta cantidad se calcula en la columna F multiplicando la concentración en receptor "C exp" por el volumen de la muestra "Sample Vol"

1	Non Sink conditions						
2	Assumptions Non sink conditions						
3	Donor Conc. Change						
4	Keep Mass balance						
5	Area cm2	1.131	Donor Vol mL	0.4	f	0.500	
6	Receiver Vol mL	1.2	Sample Vol mL	0.6			
7			Init Conc. $\mu\text{M}$	50	init amount nMol	20	
9	time min	0	Conc exp. $\mu\text{M}$	Conc. Theor Donor $\mu\text{M}$	Amount in receiver nMol	Amount in sample nMol	AccumAmount in sample nMol
10		0	0	50	0	0	0
11	10	600	2.97	41.087	3.565	=C11*Vs	1.783
12	20	1200	3.83	34.054	4.596	2.298	4.081
13	30	1800	3.83	28.318	4.592	2.296	6.377
14	40	2400	3.48	23.618	4.176	2.088	8.465
15	50	3000	3.03	19.748	3.636	1.818	10.283
16	60	3600	2.60	16.493	3.120	1.560	11.843
17				(Mo-Mreceiver)/Vd	Creceiver*Vr	Creceiver*Vs	Accum-ColumnF

En la columna G se acumulan las cantidades totales que se han extraído del sistema por el muestreo.

Amount in receiver nMol	Amount in sample nMol	AccumAmount in sample nMol
0	0	0
3.565	1.783	1.783
4.596	2.298	=F12+G11
4.592	2.296	6.377
4.176	2.088	8.465
3.636	1.818	10.283
3.120	1.560	11.843
Creceiver*Vr	Creceiver*Vs	Accum-ColumnF

Por último se suman las cantidades en receptor con las cantidades acumuladas en las muestras para obtener las cantidades totales acumuladas en receptor.

Amount in receiver nMol	Amount in sample nMol	AccumAmount in sample nMol	AccumAmount in receiver nMol
0	0	0	0
3.565	1.783	1.783	3.565
4.596	2.298	4.081	=E12+G11
4.592	2.296	6.377	8.673
4.176	2.088	8.465	10.553
3.636	1.818	10.283	12.101
3.120	1.560	11.843	13.403
Creceiver*Vr	Creceiver*Vs	Accum-ColumnF	Mreceiver+Msamples

Amount in receiver nMol	Amount in sample nMol	AccumAmount in sample nMol	AccumAmount in receiver nMol
0	0	0	0
3.565	1.783	1.783	=E11
4.596	2.298	4.081	6.379
4.592	2.296	6.377	8.673
4.176	2.088	8.465	10.553
3.636	1.818	10.283	12.101
3.120	1.560	11.843	13.403
Creceiver*Vr	Creceiver*Vs	Accum-ColumF	Mreceiver+Msamples

A partir de las cantidades acumuladas en receptor se pueden corregir las concentraciones remanentes en el compartimento dador

Donor Vol mL	0.4	f	0.500		
Sample Vol mL	0.6				
Init Conc. $\mu\text{M}$	50	init amount nM	20		
Conc exp. $\mu\text{M}$	Conc. Theor Donor $\mu\text{M}$	Amount in receiver nMol	Amount in sample nMol	AccumAmount in sample nMol	AccumAmount in receiver nMol
0	50	0	0	0	0
2.97	$=(M0-H11)/Vd$	3.565	1.783	1.783	3.565
3.83	34.054	4.596	2.298	4.081	6.379
3.83	28.318	4.592	2.296	6.377	8.673
3.48	23.618	4.176	2.088	8.465	10.553
3.03	19.748	3.636	1.818	10.283	12.101
2.60	16.493	3.120	1.560	11.843	13.403
	$(Mo-Mreceiver)/Vd$	Creceiver*Vr	Creceiver*Vs	Accum-ColumF	Mreceiver+Msamples

Esta corrección es necesaria ya que la autentica fuerza motriz para la difusión es la diferencia de concentraciones entre cámara dador y receptora y no es exacto suponer que la concentración en dador no cambia o que la concentración en receptor es despreciable frente a la que hay en dador (condiciones sink donde  $Creceiver < 0.1 * C \text{ donor}$ ).

Una vez corregida la concentración en dador se puede comparar con la de receptor para contrastar si se mantienen las condiciones sink (o sumidero).

balance			
Donor Vol mL	0.4	f	0.500
Sample Vol mL	0.6		
Init Conc. µM	50	init amount nM	20

Conc exp. µM	Conc. Theor Donor µM	Amount in receiver nMol	Amount in sample nMol	AccumAmount in sample nMol	AccumAmount in receiver nMol	Crel	sink?	fraction transported
0	50	0	0	0	0			0.000
2.97	41.087	3.565	1.783	1.783	3.565	=C11/D11	ok	0.069
3.83	34.054	4.596	2.298	4.081	6.379	0.112	Nosink	0.135
3.83	28.318	4.592	2.296	6.377	8.673	0.135	Nosink	0.200
3.48	23.618	4.176	2.088	8.465	10.553	0.147	Nosink	0.264
3.03	19.748	3.636	1.818	10.283	12.101	0.153	Nosink	0.328
2.60	16.493	3.120	1.560	11.843	13.403	0.158	Nosink	0.391
	(Mo-Mreceiver)/Vd	Creceiver*Vr	Creceiver*Vs	Accum-ColumnF	Mreceiver+Msamples	Creceiver/Cdonor		

Si  $C_{exp}(\text{receiver})/C_{\text{donor}} < 0.11$  se acepta que hay condiciones sink. En caso contrario aparece la alerta NOsink.

Para crear esa alerta se hace con una función lógica cuya sintaxis se muestra a continuación

Crel	sink?	fraction transported
0.072	ok	0.069
=SI( I12 >0.11;"Nosink";"ok")		
0.135	Nosink	0.200
0.147	Nosink	0.264
0.153	Nosink	0.328
0.158	Nosink	0.391
Creceiver/Cdonor		

El último paso consiste en calcular las fracciones transportadas en cada intervalo de tiempo, que corresponden a la diferencia [cantidad en receptor en el instante t+1]-[cantidad en receptor en el instante t] dividido por el área de transporte A y por la concentración promedio en dador entre esos dos tiempos.

Conc. Theor Donor $\mu\text{M}$	Amount in receiver nMol	Amount in sample nMol	AccumAmount in sample nMol	AccumAmount in receiver nMol	Crel
50	0	0	0	0	
41.087	3.565	1.783	1.783	3.565	0.072
34.054	4.596	2.298	4.081	6.379	0.112
28.318	4.592	2.296	6.377	8.673	0.135
23.618	4.176	2.088	8.465	10.553	0.147
19.748	3.636	1.818	10.283	12.101	0.153
16.493	3.120	1.560	11.843	13.403	0.158
$(M_0 - M_{\text{receiver}})/V_d$	$C_{\text{receiver}} * V_r$	$C_{\text{receiver}} * V_s$	Accum-ColumnF	$M_{\text{receiver}} + M_{\text{samples}}$	$C_{\text{receiver}}/C_{\text{donor}}$

Ahora mediante regresión lineal de las fracciones transportadas frente al tiempo se obtiene una pendiente que representa directamente la permeabilidad en cm/s

SUMA

Area cm2	1.131	Donor Vol mL	0.4	f	0.500
Receiver Vol mL	1.2	Sample Vol mL	0.6		
		Init Conc. $\mu\text{M}$	50	init amount nM	20

time min	0	Conc exp. $\mu\text{M}$	Conc. Theor Donor $\mu\text{M}$	Amount in receiver nMol	Amount in sample nMol	AccumAmount in sample nMol	AccumAmount in receiver nMol	Crel	sink?	fraction transport
	0	0	50	0	0	0	0			0.000
10	600	2.97	41.087	3.565	1.783	1.783	3.565	0.072	ok	0.069
20	1200	3.83	34.054	4.596	2.298	4.081	6.379	0.112	Nosink	0.135
30	1800	3.83	28.318	4.592	2.296	6.377	8.673	0.135	Nosink	0.200
40	2400	3.48	23.618	4.176	2.088	8.465	10.553	0.147	Nosink	0.264
50	3000	3.03	19.748	3.636	1.818	10.283	12.101	0.153	Nosink	0.328
60	3600	2.60	16.493	3.120	1.560	11.843	13.403	0.158	Nosink	0.391
			$(M_0 - M_{\text{receiver}})/V_d$	$C_{\text{receiver}} * V_r$	$C_{\text{receiver}} * V_s$	Accum-ColumnF	$M_{\text{receiver}} + M_{\text{samples}}$	$C_{\text{receiver}}/C_{\text{donor}}$		

	SINK	SINK
Slope	0.0032	Corrected by $C_{\text{donor}}$
Intercept	2.29	0.003
r	0.990	1.000
Peff cm/s	5.75E-05	$0:K16;B10;B16$

En la aproximación clásica para el cálculo de permeabilidades se hace la regresión de cantidades acumuladas en receptor frente la tiempo y la pendiente se corrige por el área de transporte y por la concentración inicial para calcular la Peff como se ve en la siguiente figura

1	Non Sink conditions							
2	Assumptions	Non sink conditions						
3		Donor Conc. Change						
4		Keep Mass balance						
5	Area cm2	1.131	Donor Vol mL	0.4	f	0.500		
6	Receiver Vol mL	1.2	Sample Vol mL	0.6				
7			Init Conc. µM	50	init amount nM	20		
8								
9	time min	0	Conc exp. µM	Conc. Theor Donor µM	Amount in receiver nMol	Amount in sample nMol	AccumAmount in sample nMol	AccumAmount in receiver nMol
10		0	0	50	0	0	0	0
11	10	600	2.97	41.087	3.565	1.783	1.783	3.565
12	20	1200	3.83	34.054	4.596	2.298	4.081	6.379
13	30	1800	3.83	28.318	4.592	2.296	6.377	8.673
14	40	2400	3.48	23.618	4.176	2.088	8.465	10.553
15	50	3000	3.03	19.748	3.636	1.818	10.283	12.101
16	60	3600	2.60	16.493	3.120	1.560	11.843	13.403
17				(Mo-Mreceiver)/Vd	Creceiver*Vr	Creceiver*Vs	Accum-ColumF	Mreceiver+Msamples
18								
19								
20		SINK	SINK					
21	Slope	6;B11:B16)	Corrected by Cdonor					
22	intercept	2.29	0.003					
23	r	0.990	1.000					
24	Peff cm/s	5.75E-05	1.08E-04					

Sin embargo ello supone asumir que la Concentración en dador permanece constante, lo que habitualmente no se cumple, en el ejemplo presente disminuye de 50 micromolar a 16 micromolar. Por ello la permeabilidad calculada bajo el supuesto de dador infinito (cuya C no varía) y condiciones sink obtiene un permeabilidad infraestimada. La corrección realizada para tener en cuenta el cambio de concentración en dador y por tanto el cambio de la fuerza motriz de la difusión permite obtener una permeabilidad más aproximada al valor real.

No obstante en este método de cálculo se ignora la violación de la condiciones sink. Para tener en cuenta este factor hay que utilizar la ecuación integrada completa que describe la evolución de las concentraciones en compartimento receptor cuya implementación se sale del ámbito de este curso.

$$C_{R(t)} = \left( \frac{M_{tot}}{V_D + V_R} \right) + \left( C_{R0} - \frac{M_{tot}}{V_D + V_R} \right) \cdot e^{-P_{eff} \cdot A \cdot \left( \frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_R} \right) \cdot t}$$

---

<sup>1</sup> Tavelin, S., Grasjo, J., Taipalensuu, J., Ocklind, G., Artursson, P. "Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport". *Methods Mol Biol*, 2002, 188: 233-272

<sup>2</sup> Mangas-Sanjuán V., Gonzalez-Alvarez M., González-Alvarez I., Bermejo Sanz, M. "Caco-2 cells for studying intestinal absorption mechanisms: comparison and correlations with rat model" in *Caco-2 cells and their users* Ed. Megan A. Schulz-ISBN:978-1-61209-917-0 2011 [www.novapublishers.com](http://www.novapublishers.com). 2012



## 26. Sección parte aplicada: Cálculos de permeabilidad en células de Franz

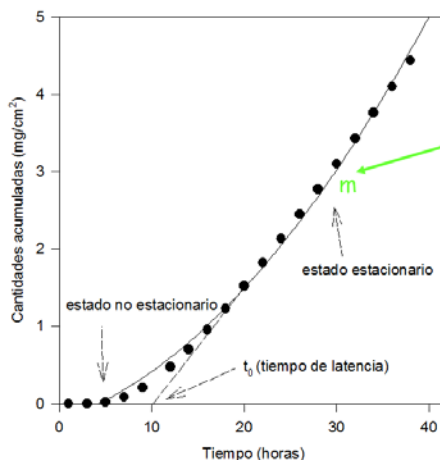
Victor Mangas Sanjuán<sup>a</sup>, Isabel González Álvarez<sup>a</sup>, Marta González Álvarez<sup>a</sup>  
Marival Bermejo Sanz<sup>a</sup>, Virginia Merino<sup>b</sup>

*a Departamento de Ingeniería. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.  
Universidad Miguel Hernández.*

*b Departamento de Ingeniería. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.  
Universidad de Valencia.*

Una vez valoradas las muestras debe procederse al cálculo del flujo transdérmico y del coeficiente de permeabilidad. Para ello en primer lugar se deben calcular las cantidades de fármaco acumuladas en el compartimento receptor y representarlas frente al tiempo, con objeto de analizar si se ha alcanzado el estado estacionario de difusión y calcular los parámetros que definen el proceso.

### Cinética de difusión



$$J = \frac{D \cdot P}{h} \cdot C$$

$$J = mg/cm^2h$$

$$K_p = \frac{J}{C} = \frac{D \cdot P}{h}$$

$$K_p = cm/h$$

A continuación se expone un ejemplo, de un ensayo de difusión llevado a cabo empleando células de Franz sin circulación continua. El ensayo se ha llevado a cabo durante 7 h. Cada hora se ha tomado una muestra de 200  $\mu\text{L}$ . En cada tiempo de muestreo se ha repuesto el volumen tomado. La solución inicial tiene una concentración de 2 mg/mL del fármaco evaluado. El volumen del compartimento receptor es de 6 mL y la superficie de piel expuesta al fármaco es de 0.784  $\text{cm}^2$ . El tratamiento de los datos se llevará a cabo en una hoja Excel.

El primer paso es interpolar las áreas obtenidas en la valoración de cada una de las muestras en una recta de calibración. De este modo tendremos la concentración en cada una de las muestras. A continuación se debe calcular la cantidad de fármaco acumulado en el compartimento receptor.

Para calcular la cantidad acumulada de fármaco a cada tiempo de muestreo se ha de tener en cuenta tanto la muestra valorada en ese instante, como la cantidad retirada en las muestras anteriores.

Así en la primera muestra:

$$Q_{t1} = C_{t1} \cdot V_r$$

Expresión en la que  $Q_{t1}$  es la cantidad acumulada en el compartimento receptor al primer tiempo de toma de muestra,  $C_{t1}$  es la concentración analizada en la primera muestra y  $V_r$  es el volumen del compartimento receptor. En nuestro ejemplo  $V_r$  son 6 mL.

En la segunda y sucesivas muestras:

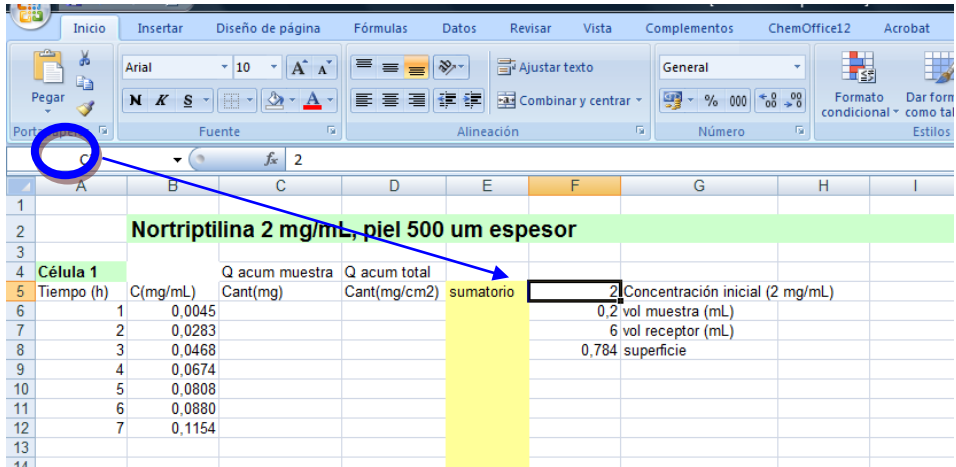
$$Q_{tn} = C_{tn} \cdot V_r + \sum_{t1}^{tn-1} C_t V_m$$

Expresión en la que  $V_m$  es el volumen de las muestras tomadas. En nuestro caso 0.2 mL.

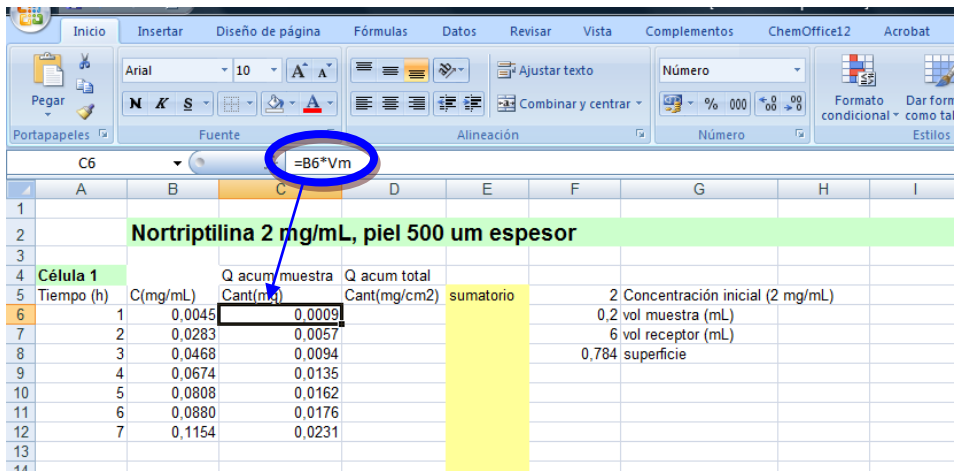
Una vez obtenida esta cantidad a cada tiempo la dividiremos por la superficie de piel  $S$  para normalizar la información.

Para facilitar los cálculos los valores de  $V_r$ ,  $V_m$ ,  $S$  y concentración de fármaco en el compartimento dador los fijaremos en 4 celdas de la hoja Excel. En este ejemplo están en las celdas F5 a F8.

Para fijar las posiciones nos situamos sobre la celda deseada y en el cuadro superior izquierdo introducimos la identificación:



Lo primero que calcularemos, en la columna C serán las cantidades retiradas en cada muestra, para ello multiplicaremos los datos de la columna B por Vm. En el primer dato:  $C6=B6*Vm$ . Los demás se pueden obtener arrastrando:



En la columna E dispondremos el sumatorio de las cantidades extraídas en todas las muestras anteriores a ese tiempo. Para el primer tiempo nada. Para el segundo tiempo  $E7=C6$ .

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1									
2		<b>Nortriptilina 2 mg/mL, piel 500 um espesor</b>							
3									
4	<b>Célula 1</b>		Q acum muestra	Q acum total					
5	Tiempo (h)	C(mg/mL)	Cant(mg)	Cant(mg/cm <sup>2</sup> )	sumatorio		2	Concentración inicial (2 mg/mL)	
6	1	0,0045	0,0009				0,2	vol muestra (mL)	
7	2	0,0283	0,0057		=C6		6	vol receptor (mL)	
8	3	0,0468	0,0094				0,784	superficie	
9	4	0,0674	0,0135						
10	5	0,0808	0,0162						
11	6	0,0880	0,0176						
12	7	0,1154	0,0231						
13									
14									

Para el tercer tiempo, E8=E7+C7. Los demás se pueden obtener arrastrando E8.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1									
2		<b>Nortriptilina 2 mg/mL, piel 500 um espesor</b>							
3									
4	<b>Célula 1</b>		Q acum muestra	Q acum total					
5	Tiempo (h)	C(mg/mL)	Cant(mg)	Cant(mg/cm <sup>2</sup> )	sumatorio		2	Concentración inicial (2 mg/mL)	
6	1	0,0045	0,0009				0,2	vol muestra (mL)	
7	2	0,0283	0,0057				6	vol receptor (mL)	
8	3	0,0468	0,0094		=C7+E7		0,784	superficie	
9	4	0,0674	0,0135						
10	5	0,0808	0,0162						
11	6	0,0880	0,0176						
12	7	0,1154	0,0231						
13									
14									

Finalmente en la columna D calcularemos la cantidad acumulada hasta este tiempo por unidad de superficie. Para el primer tiempo:  $D6=B6 \cdot V_r/S$

	A	B	C	D	E	F	G
4	Célula 1		Q acum muestra	Q acum total			
5	Tiempo (h)	C(mg/mL)	Cant(mg)	Cant(mg/cm2)	sumatorio	2	Concentración in
6	1	0,0045	0,0009	0,034		0,2	vol muestra (mL)
7	2	0,0283	0,0057		0,0009	6	vol receptor (mL)
8	3	0,0468	0,0094		0,0066	0,784	superficie (cm2)
9	4	0,0674	0,0135		0,0159		
10	5	0,0808	0,0162		0,0294		
11	6	0,0880	0,0176		0,0455		
12	7	0,1154	0,0231		0,0631		
13							
14							

Para el segundo tiempo  $D7=(B7*Vr+E7)/S$ . Para los demás puesto que el cálculo es igual se obtienen arrastrando

	A	B	C	D	E	F	G
4	Célula 1		Q acum muestra	Q acum total			
5	Tiempo (h)	C(mg/mL)	Cant(mg)	Cant(mg/cm2)	sumatorio	2	Concentración in
6	1	0,0045	0,0009	0,034		0,2	vol muestra (mL)
7	2	0,0283	0,0057	0,217	0,0009	6	vol receptor (mL)
8	3	0,0468	0,0094		0,0066	0,784	superficie (cm2)
9	4	0,0674	0,0135		0,0159		
10	5	0,0808	0,0162		0,0294		
11	6	0,0880	0,0176		0,0455		
12	7	0,1154	0,0231		0,0631		
13							
14							

Una vez calculados todos los valores comprobaremos que la concentración en el compartimento receptor al final del ensayo no supera el 10% de la concentración inicial. Nosotros lo hemos hecho en la celda  $G12=D12/Vr*S$

Inicio Insertar Diseño de página Fórmulas Datos Revisar Vista Complementos ChemOffice12 Acrobat

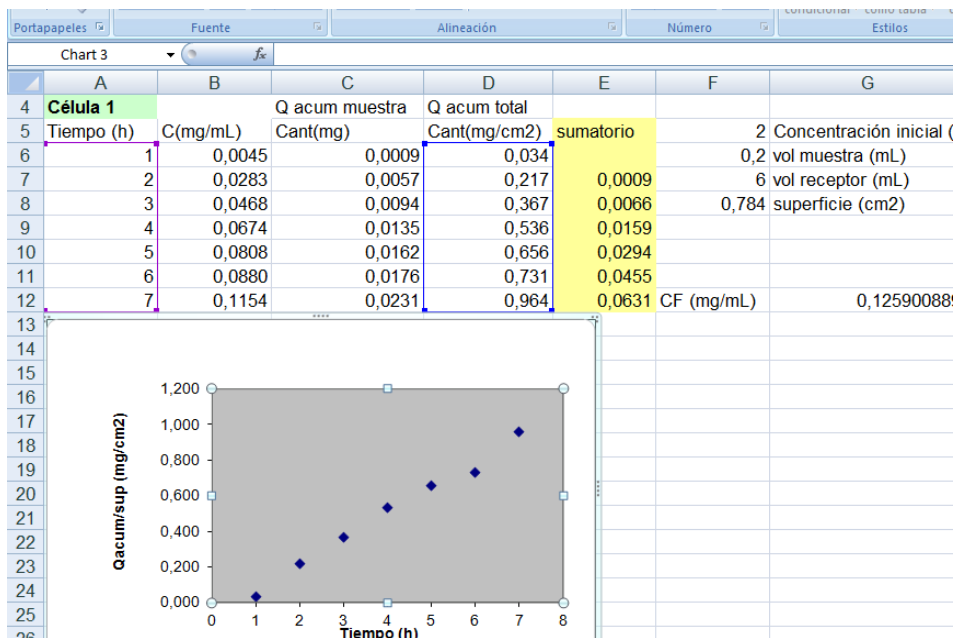
Pegar Fuente Alineación Número Estilos

Portapapeles Fuente Alineación Número Estilos

G12  $f_x = D12/Vr * S$

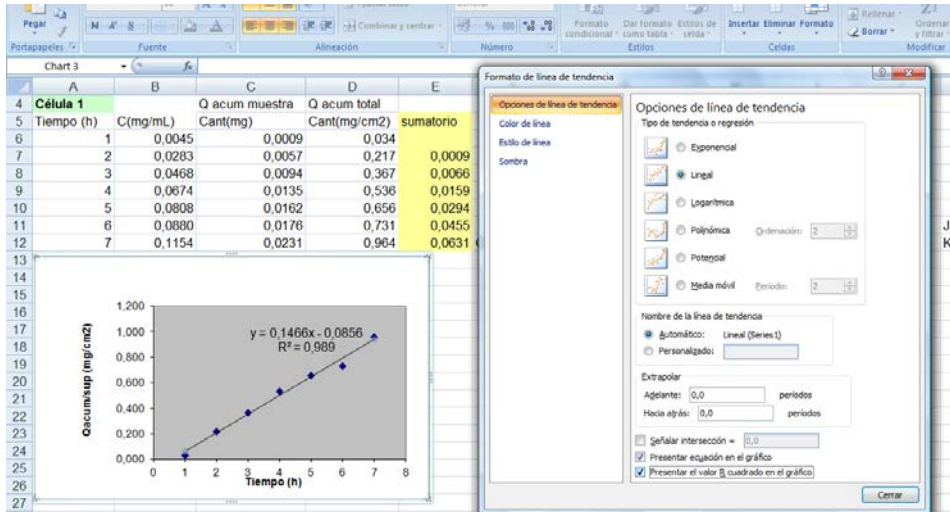
	A	B	C	D	E	F	G
4	Célula 1		Q acum muestra	Q acum total			
5	Tiempo (h)	C(mg/mL)	Cant(mg)	Cant(mg/cm <sup>2</sup> )	sumatorio	2	Concentración in
6	1	0,0045	0,0009	0,034		0,2	vol muestra (mL)
7	2	0,0283	0,0057	0,217	0,0009	6	vol receptor (mL)
8	3	0,0468	0,0094	0,367	0,0066	0,784	superficie (cm <sup>2</sup> )
9	4	0,0674	0,0135	0,536	0,0159		
10	5	0,0808	0,0162	0,656	0,0294		
11	6	0,0880	0,0176	0,731	0,0455		
12	7	0,1154	0,0231	0,964	0,0631	CF (mg/mL)	0,1259
13							
14							

Una vez obtenidos todos los valores insertaremos una gráfica (dispersión) en la que en el eje x representamos tiempos (columna A) y en el eje y representamos Q acumulada total/S (columna D)

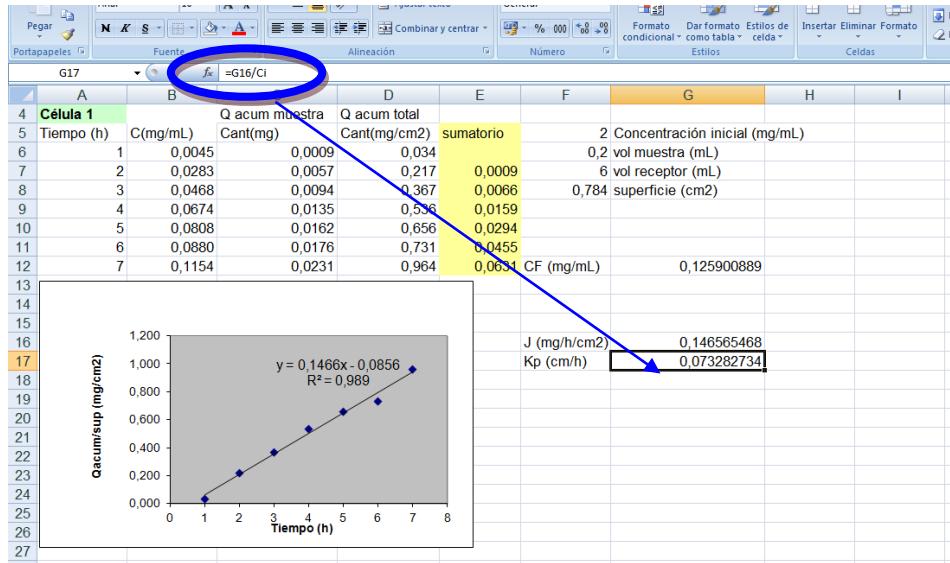


Podemos observar que todos los puntos se alinean y por tanto todos ellos pueden ser utilizados para calcular el flujo transdérmico del fármaco, que corresponde a la

pendiente de la regresión de Qacum/S versus t. Lo podemos hacer agregando una línea de tendencia, lineal, seleccionando representar la ecuación en el gráfico.



El valor de la pendiente: 0,1466 corresponde al flujo, J en mg/h·cm<sup>2</sup>. Por último, si dividimos por la concentración del compartimento dador, que asumimos constante durante todo el ensayo (Ci) obtendremos el coeficiente de permeabilidad Kp (cm/h).



## 27. Cálculo de permeabilidad en rata: perfusión de un solo paso

Gladys Granero<sup>a</sup>, María Julia Mora<sup>a</sup>

*a Universidad Nacional de Córdoba.  
Argentina.*

A continuación se presenta como ejemplo del cálculo de la permeabilidad usando el modelo de perfusión de un solo paso en rata, los resultados obtenidos con una solución de propranolol.

- Concentración del propranolol en la solución de perfusión: 0,984 mg/ml
- Longitud del segmento intestinal (L): 9,7 cm
- Radio del segmento intestinal R: 0,18 cm
- Flujo de perfusión (Q<sub>in</sub>): 0,2 ml/min (0,0033 ml/seg)

Para calcular la permeabilidad intestinal del compuesto que estamos estudiando se utiliza el modelo del tubo paralelo, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$P_{eff} = -Ln \frac{(C_{salcorr} / C_{in})}{2\pi RL} \quad (1)$$

Para corregir la concentración de la alícuota del perfundido recolectada a cada intervalo de tiempo, por el cambio del flujo de agua dentro del lumen del segmento intestinal, durante el experimento, se debe multiplicar la concentración medida del compuesto en la alícuota del perfundido que hemos tomado en cada intervalo de tiempo, por el flujo de la solución perfundida y corregida por la variación de agua dentro del segmento de intestino a través del cual perfundimos la solución con el compuesto en estudio, de acuerdo a la siguiente ecuación:



$$Q_{corr} = \frac{Q_{sal}}{Q_{in}} = \frac{\text{peso}_{alícuota} / \delta}{0,2} \quad (2)$$

Consideramos que la densidad de la alícuota del perfundida ( $\delta$ ) es 1 g/ml.

Tiempo (minutos) (1)	Peso de la alícuota del perfundido (gramos) (2)	Concentración de la alícuota del perfundido, $C_{sal}$ (mg/ml) (3)	$Q_{corr}$ (Eq. 2) Columna 2/0,2 (4)	$C_{salcorr}$ Columna 3 * columna 4
22	0,4992	0,5739	0,5832	0,6211
29,5	0,4958	0,5665	0,5757	0,6131
37	0,4986	0,5109	0,5193	0,5530
44,5	0,5045	0,5199	0,5284	0,5627
52	0,5046	0,4606	0,4681	0,4986
59,5	0,5029	0,5027	0,5109	0,5441
67	0,5010	0,4607	0,4682	0,4986
74,5	0,5021	0,4581	0,4656	0,4958

Para obtener la permeabilidad intestinal efectiva ( $P_{eff}$ ) del compuesto que estamos estudiando utilizamos la ecuación 1, entonces:

$C_{salcorr}$ (1)	R (cm) (2)	L (cm) (3)	$Q_{in}$ (ml/seg) (4)	$P_{eff}$ (cm/seg) = $-\ln((\text{columna 1}/\text{columna 4})/2 * 3,14 * \text{columna 2} * \text{columna 3})$ (5)
0,6211	0,18	9,7	0,003	0,0042
0,6131				0,0043
0,5530				0,0052
0,5627				0,0051
0,4986				0,0062
0,5441				0,0054
0,4986				0,0061
0,4958				0,0062

Para obtener el valor de  $P_{eff}$  sacamos el valor promedio de la columna 5 y calculamos la desviación estándar de este valor, entonces:

$P_{eff}$  promedio  $\pm$  Desviación estándar del propranolol es = 0,0053  $\pm$  0,0008 cm/seg

## 28. Sección parte aplicada: Cálculo de permeabilidad en rata: perfusión sin recirculación

Victor Mangas Sanjuán<sup>a</sup>, Isabel González Alvarez<sup>a</sup>, Marta González Alvarez<sup>a</sup>  
Marival Bermejo Sanz<sup>a</sup>

*a Departamento de Ingeniería. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.  
Universidad Miguel Hernández.  
España.*

### Paso 1.

Volúmenes de muestra y muestreo. Datos

	A	B	C	D
1				
2	Dolus			
3	vol muestra	0,2		
4	vol inicial	10,9	depende del investigador	
5	vol final	7,5	lo que medimos al final del experimento	
6	vf+muestra	8,7	volumen final +( volumen muestras*nº muestras)	
7				
8	Datos			
9	Tiempo	Concentraciones experimentales		
10	5	34,9		
11	10	27,4		
12	15	21,0		
13	20	14,8		
14	25	13,5		
15	30	10,9		
16				

Tiempo (min) Conc experimentales (mg/ml)

### Paso 2.

Proceso de reabsorción de agua



### Paso 3.

Calcular concentraciones reales a cada tiempo

Mediante regresión lineal por mínimos cuadrados de los volúmenes obtenidos, se obtienen los parámetros  $V_0$  como ordenada en el origen y  $k_0$  como pendiente. Estos parámetros permiten determinar los volúmenes teóricos para cada tiempo de toma de muestra ( $V_t$ ), y con ellos se corrigen los valores experimentales de las concentraciones de soluto en las muestras, utilizando la ecuación:

$$C_{REAL} = C_{EXP} \cdot (V_{MUESTRA} / V_{INICIAL})$$

$$B18 = B10 \cdot (E10 / B\$4)$$

en la que  $C_{REAL}$  corresponde a la concentración de soluto corregida y  $C_{EXP}$  es la concentración obtenida experimentalmente.

	A	B	C	D
16				
17	Tiempo (min)	Conc correg (mg/ml)		
18	5	33,74		
19	10	25,52		
20	15	18,91		
21	20	12,84		
22	25	11,26		
23	30	8,72		
24				

Esta técnica considera que la desaparición del compuesto del lumen se debe únicamente a absorción y sigue una cinética aparente de primer orden según la siguiente ecuación:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{ap} \cdot C$$

donde  $C$  corresponde a la concentración remanente de fármaco en el intestino y  $k_{ap}$  la constante de velocidad de absorción aparente de primer orden. Su forma integrada es:

$$C = C_0 \cdot e^{-k_{ap} \cdot t}$$

donde C es la concentración de fármaco a tiempo t y C<sub>0</sub> corresponde a la concentración inicial de fármaco disponible para la absorción (t = 0).

#### Paso 4.

##### Regresión Lineal

En la hoja de cálculo hemos detallado en la columna A y B los tiempos y las concentraciones plasmáticas reales.

$$\ln C = \ln C_0 - k_a * t$$

calcular por regresión lineal k<sub>a</sub> y C<sub>0</sub>

	A	B	C	D	E	F
16						
17	Tiempo (min)	Conc correg (mg/ml)			Neperianos de C	
18	5	33,74		5	3,52	
19	10	25,52		10	3,24	
20	15	18,91		15	2,94	
21	20	12,84		20	2,55	
22	25	11,26		25	2,42	
23	30	8,72		30	2,17	
24						
25	Ordenada	44,91				
26	Ka (min)	5,75E-02				
27	ka (h)	3,45E+00				
28						

#### Paso 5.

Cálculo de las concentraciones teóricas

$$C_{TEORICA} = C_0 * e^{-k_a * T}$$

$$G18 = B25 * EXP(-B26 * A18)$$

Para obtenerlos es necesario proporcionar unos *valores o estimas iniciales* a los parámetros de dichas ecuaciones. Esos valores iniciales se encuentran en las celdas B25 a B26.



El fundamento de la regresión consiste en calcular el valor de los parámetros que hace mínima la suma de cuadrados.

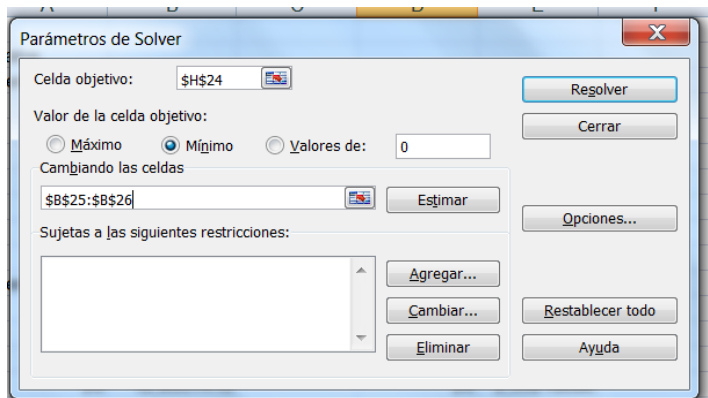
En el caso de ecuaciones no lineales se debe recurrir a procedimientos iterativos. En excel la herramienta que realiza dichos procedimientos se llama “Solver”.

### **Paso 7.**

Solver (*Esta herramienta esta detallada en el capítulo 30*)

En el menú “herramientas” (“Tools”) se selecciona la opción Solver. Ello conduce a un menú en el que se le debe indicar

- a) cuál es la celda cuyo valor queremos hacer “mínimo”. Se debe seleccionar la celda que contenga la suma de cuadrados: H24.
- b) qué celdas queremos cambiar para que la suma de cuadrados sea mínima. En este caso las celdas a cambiar son las que contienen el valor de los parámetros a estimar, es decir B25 a B26



## 29. Sección parte aplicada: Cálculos de velocidad de disolución

Andrés Figueroa Campos<sup>a,b</sup>, Sarín Colón Useche<sup>c,d</sup>, Isabel Gonzalez Alvarez<sup>c</sup>,  
Marival Bermejo Sanz<sup>c</sup>

*a Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia.  
Universidad de Valencia. España.*

*b Subdepartamento de Biofarmacia y Bioequivalencia. Agencia Nacional de  
Medicamentos. Instituto de Salud Pública de Chile. Chile.*

*c Departamento de Ingeniería. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.  
Universidad Miguel Hernández. España.*

*d Departamento de Análisis y Control. Facultad de Farmacia y Bioanálisis.  
Universidad de Los Andes. Venezuela*

### 29.1 Introducción

El ensayo de disolución permite estudiar *in vitro* la velocidad con la cual un principio activo es cedido a un medio de disolución desde una forma farmacéutica. Es una prueba de rutina en control de calidad y además puede usarse con otros propósitos como el desarrollo de formulaciones y para demostrar bioequivalencia. En estos dos últimos casos, se requiere conocer no solo si el fármaco disuelve en el medio, sino que además se desea obtener información del comportamiento de velocidad de disolución de la formulación. Para ello es necesario que se realice el estudio de disolución con tomas de muestras múltiples a lo largo del ensayo, que permita construir curvas de cantidades disueltas de fármaco (expresadas generalmente como porcentaje) en función del tiempo, que son conocidas como perfiles de disolución<sup>12</sup>.

En este cuadernillo se presenta el procedimiento a seguir para calcular la cantidad de fármaco disuelto de formulaciones ensayadas en los aparatos de disolución I (Cestillo), II (Paleta) y IV (Celda de flujo) descritos en las diferentes Farmacopeas<sup>3</sup>, haciendo uso de Microsoft Excel. Al seguir los pasos descritos a continuación se puede obtener en primer lugar el % de fármaco disuelto en función del tiempo, luego el resultado promedio de las unidades ensayadas y su coeficiente



de variación y por último, se detalla el procedimiento a seguir para comparar dos perfiles de disolución a través del Factor de Similitud ( $f_2$ ) y la Distancia Estadística Multivariada.

En los aparatos I y II se coloca la formulación a estudiar en un vaso que contiene el medio de disolución (generalmente 900 mL) y se extraen distintas muestras a los tiempos preestablecidos. Después de cada toma de muestra, el volumen de medio extraído puede o no reponerse, es por ello que en el texto a continuación se explica de forma separada los cálculos del ensayo de velocidad de disolución realizado en los aparatos I y II **con** y **sin** reposición del medio.

En el aparato IV la formulación a estudiar se coloca en una celda que permite el paso de medio de disolución, a una velocidad constante. Las muestras se obtienen por recolección del medio que ha pasado a través de la celda, en los intervalos de tiempo preestablecidos. En este caso, el perfil de disolución puede hacerse acumulando la cantidad de fármaco disuelto en las distintas tomas de muestras (**acumulado**). Otra opción en los ensayos con este aparato consiste en representar directamente las concentraciones obtenidas en cada intervalo de tiempo en función del tiempo (**sin acumular**).

## 29.2 Aparato I y II con reposición de medio

A cada tiempo preestablecido de muestreo se extrae una alícuota de 5 mL y a continuación se repone el mismo volumen con el medio de disolución empleado. De esta forma se mantiene constante el volumen inicial del medio de disolución del ensayo; paralelamente la concentración de fármaco disuelto disminuye a lo largo del ensayo por la dilución del medio.

La toma de muestra supone la extracción de fármaco disuelto que debe ser considerado hasta el final del ensayo, con este fin se genera una columna de cantidad de fármaco acumulado (Q acum).

### **Paso 1.**

Preparar hoja Excel con los datos del ensayo.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1										
2										
3										
4	Dosis (mg)	40								
5	Fd	3	Factor de dilución							
6	Vm (mL)	5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t							
7	Vol. Medio (mL)	900	Volumen del medio de disolución							
8										
9										
10	Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto	
11	1	0	0							
12		5	0,0049							
13		10	0,0079							
14		15	0,0109							
15		20	0,0137							
16		30	0,0153							
17		45	0,0153							
18		60	0,0153							
19										
20										

La dosis es la cantidad total de fármaco en cada vaso de disolución y el factor de dilución es el número que permite calcular la concentración real de cada muestra cuando se realiza algún tipo de dilución que se pueda requerir, por ejemplo en el caso de precipitación de la muestra o por el método de cuantificación ya validado.

En la columna B se incluyen los tiempos de muestreo, en la columna C las concentraciones obtenidas que corresponden a cada tiempo.

## Paso 2.

Cálculo de la concentración corregida (Conc correg).

Multiplicar la concentración (C12) del tiempo 5 minutos con el Fd (B5).

Esta función debe ser la misma en todas los tiempos de muestreo (5, 10, 15,...), para ello se debe arrastrar la función desde la celda D12 hasta la celda D18; previamente se debe fijar la celda B5 para que la multiplicación se realice siempre con la celda B5 (Fd). Para fijar la celda se debe anteponer el símbolo \$ a la columna y a la fila (\$B\$5).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1										
2										
3										
4	Dosis (mg)	40								
5	Fd	3	Factor de dilución							
6	Vm (mL)	5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t							
7	Vol. Medio (mL)	900	Volumen del medio de disolución							
8										
9										
10	Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto	
11		0	0	0	0					
12		5	0,0049	=C12*\$B\$5						
13		10	0,0079							
14		15	0,0109							
15		20	0,0137							
16		30	0,0140							
17		45	0,0143							
18		60	0,0148							
19										
20										

La concentración corregida es la concentración real de fármaco que se encuentra en cada tiempo de muestreo.

### Paso 3.

Cálculo de cantidad de fármaco en la alícuota (Qt).

Multiplicar la concentración corregida (D12) del tiempo 5 minutos con el volumen de muestra extraída (B6). Al igual que en el paso anterior la función se debe arrastrar a todos los tiempo de muestreo, fijando la celda B6.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1										
2										
3										
4	Dosis (mg)	40								
5	Fd	3	Factor de dilución							
6	Vm (mL)	5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t							
7	Vol. Medio (mL)	900	Volumen del medio de disolución							
8										
9										
10	Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto	
11		0	0	0	0					
12		5	0,0049	0,0146	=D12*\$B\$6					
13		10	0,0079	0,0238						
14		15	0,0109	0,0327						
15		20	0,0137	0,0410						
16		30	0,0140	0,0420						
17		45	0,0143	0,0429						
18		60	0,0148	0,0444						
19										
20										

La Qt es la cantidad de fármaco disuelta en la alícuota al tiempo t.

#### Paso 4.

Cálculo de cantidad acumulada de fármaco (Q acum).

la cantidad acumulada de fármaco disuelto es igual a cero (F12) en el primer tiempo de muestreo (5 min), debido a que a este tiempo no se ha retirado ninguna fracción de muestra del vaso de disolución.

en el segundo tiempo de muestreo (10 min) la Q acum (F13) es igual a la Qt en el primer tiempo de muestreo (E12).

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1											
2											
3											
4	Dosis (mg)		40								
5	Fd		3	Factor de dilución							
6	Vm (mL)		5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t							
7	Vol. Medio (mL)		900	Volumen del medio de disolución							
8											
9											
Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto			
1	0	0	0	0	0	0					
	5	0,0049	0,0146	0,0729	0						
	10	0,0079	0,0238	0,1191	=E12						
	15	0,0109	0,0327	0,1634							
	20	0,0137	0,0410	0,2049							
	30	0,0140	0,0420	0,2100							
	45	0,0143	0,0429	0,2145							
	60	0,0148	0,0444	0,2220							

en el tercer tiempo de muestreo (15 min) la Q acum (F14) es la sumatoria de la Qt (E13) y Q acum (F13) del tiempo anterior (10 min). Para los siguientes tiempos de muestreo se debe arrastrar esta última función.

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1											
2											
3											
4	Dosis (mg)		40								
5	Fd		3	Factor de dilución							
6	Vm (mL)		5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t							
7	Vol. Medio (mL)		900	Volumen del medio de disolución							
8											
9											
Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto			
1	0	0	0	0	0	0					
	5	0,0049	0,0146	0,0729	0						
	10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729						
	15	0,0109	0,0327	0,1634	=F13+E13						
	20	0,0137	0,0410	0,2049							
	30	0,0140	0,0420	0,2100							
	45	0,0143	0,0429	0,2145							
	60	0,0148	0,0444	0,2220							

La Q acum es la suma de las cantidades de fármaco disueltas que han sido extraídas desde el tiempo 0 hasta el tiempo t de muestreo.

### Paso 5.

Cálculo de cantidad de fármaco en el medio (Q medio).

Multiplicar la concentración corregida (D12) del tiempo 5 minutos con el volumen del medio (B7). La función se debe arrastrar a los siguientes tiempos de muestreo, fijando la celda B7.

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1											
2											
3											
4	Dosis (mg)		40								
5	Fd		3	Factor de dilución							
6	Vm (mL)		5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t							
7	Vol. Medio (mL)		900	Volumen del medio de disolución							
8											
9											
10	Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto		
11	1	0	0	0	0	0	0	0			
12		5	0,0049	0,0146	0,0729	0	=D12*\$B\$7				
13		10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729					
14		15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919					
15		20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553					
16		30	0,0140	0,0420	0,2100	0,5602					
17		45	0,0143	0,0429	0,2145	0,7702					
18		60	0,0148	0,0444	0,2220	0,9847					
19											
20											

La Q medio es la cantidad de fármaco disuelta en el medio de disolución en cada tiempo de muestreo.

### Paso 6.

Cálculo de cantidad de fármaco total (Q total).

Sumar la Q acum (F12) y la Q medio (G12) en el primer tiempo de muestreo y luego arrastrar la función a las siguientes celdas.

SI									
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1									
2									
3									
4	Dosis (mg)	40							
5	Fd	3	Factor de dilución						
6	Vm (mL)	5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t						
7	Vol. Medio (mL)	900	Volumen del medio de disolución						
8									
9									
Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	5	0,0049	0,0146	0,0729	0,0729	13,1149	=G12+F12		
1	10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	21,4343			
1	15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	29,4119			
1	20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553	36,8766			
1	30	0,0140	0,0420	0,2100	0,5602	37,8000			
1	45	0,0143	0,0429	0,2145	0,7702	38,6100			
1	60	0,0148	0,0444	0,2220	0,9847	39,9600			
19									
20									

Con la extracción de muestra a cada tiempo se retira del medio una cantidad de fármaco que esta disuelta, por tanto la Q total es la sumatoria de Q medio y Q acum de las alícuotas en cada tiempo de muestreo.

### Paso 7.

Cálculo de porcentaje disuelto de fármaco (% disuelto).

Es la multiplicación a cada tiempo de muestreo de Q total (H12) por cien dividido entre la dosis (B4), esta última celda debe ser fijada y luego se arrastra la función a los siguientes tiempos.

SI									
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1									
2									
3									
4	Dosis (mg)	40							
5	Fd	3	Factor de dilución						
6	Vm (mL)	5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t						
7	Vol. Medio (mL)	900	Volumen del medio de disolución						
8									
9									
Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	
1	5	0,0049	0,0146	0,0729	0,0729	13,1149	13,1149	=H12*100/\$B\$4	
1	10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	21,4343	21,5072		
1	15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	29,4119	29,6038		
1	20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553	36,8766	37,2319		
1	30	0,0140	0,0420	0,2100	0,5602	37,8000	38,3602		
1	45	0,0143	0,0429	0,2145	0,7702	38,6100	39,3802		
1	60	0,0148	0,0444	0,2220	0,9847	39,9600	40,9447		
19									
20									

El % disuelto es la relación porcentual entre la cantidad disuelta de fármaco a cada tiempo de muestreo y la dosis ensayada.

F34										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1										
2										
3										
4	Dosis (mg)	40								
5	Fd	3	Factor de dilución							
6	Vm (mL)	5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t							
7	Vol. Medio (mL)	900	Volumen del medio de disolución							
8										
9										
10	Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto	
11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
12		5	0,0049	0,0146	0,0729	0	13,1149	13,1149	32,7873	
13		10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	21,4343	21,5072	53,7680	
14		15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	29,4119	29,6038	74,0095	
15		20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553	36,8766	37,2319	93,0797	
16		30	0,0140	0,0420	0,2100	0,5602	37,8000	38,3602	95,9005	
17		45	0,0143	0,0429	0,2145	0,7702	38,6100	39,3802	98,4505	
18		60	0,0148	0,0444	0,2220	0,9847	39,9600	40,9447	102,3618	
19										
20										

Al completar todas las celdas del vaso 1, se debe realizar el mismo procedimiento para tantos vasos como unidades sean ensayadas, en una misma hoja de datos.

### 29.3 Aparato I y II sin reposición de medio

A cada tiempo preestablecido de muestreo se extrae una alícuota de 5 mL y el volumen extraído no se repone. Por lo tanto, el volumen total del medio va disminuyendo con el transcurso del ensayo.

Al igual que el procedimiento con reposición, se extrae fármaco disuelto en cada toma de muestra que se debe considerar hasta el final del ensayo. Para ello se genera una columna de cantidad de fármaco acumulado (Q acum).

#### Paso 1.

Preparar hoja Excel con los datos del ensayo.

H25											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1											
2											
3											
4	Dosis (mg)	40									
5	Fd	3	Factor de dilución								
6	Vm (mL)	5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t								
7											
8											
9	Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Vol medio (mL)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto	
10		0	0								
11		5	0,0049								
12		10	0,0079								
13		15	0,0109								
14		20	0,0137								
15		30	0,0153								
16		45	0,0153								
17		60	0,0153								
18											
19											

Desarrollar el **Paso 2**, **Paso 3** y **Paso 4** del procedimiento descrito cuando el ensayo es realizado con reposición.

### Paso 5.

Cálculo del volumen del medio (Vol medio)

En el segundo tiempo de muestreo (G12), restar al volumen del medio (G11), el volumen de la muestra (B6). La función se debe arrastrar a los siguientes tiempos de muestreo, fijando la celda B6.

DESVEST.S											
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1											
2											
3											
4	Dosis (mg)	40									
5	Fd	3	Factor de dilución								
6	Vm (mL)	5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t								
7											
8											
9	Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Vol medio (mL)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto	
10		0	0	0	0	0	900				
11		5	0,0049	0,0146	0,0729	0	900				
12		10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	=G11-\$B\$6				
13		15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919					
14		20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553					
15		30	0,0153	0,0460	0,2302	0,5602					
16		45	0,0153	0,0460	0,2302	0,7904					
17		60	0,0153	0,0458	0,2292	1,0206					
18											
19											

El volumen del medio no se mantiene constante durante el ensayo; va disminuyendo con cada toma de muestra.

### Paso 6.

Cálculo de cantidad de fármaco en el medio (Q medio).

Multiplicar la concentración corregida (D11) del tiempo 5 minutos con el volumen del medio (G11). La función se debe arrastrar a los siguientes tiempos de muestreo.



SI										
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1										
2										
3										
4	Dosis (mg)	40								
5	Fd	3	Factor de dilución							
6	Vm (mL)	5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t							
7										
8										
Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Vol medio (mL)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto	
1	0	0	0	0	0	900	0	0		
11	5	0,0049	0,0146	0,0729	0	900	=D11*G11			
12	10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	895,0				
13	15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	890,0				
14	20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553	885,0				
15	30	0,0153	0,0460	0,2302	0,5602	880,0				
16	45	0,0153	0,0460	0,2302	0,7904	875,0				
17	60	0,0153	0,0458	0,2292	1,0206	870,0				
18										
19										

La Q medio es la cantidad de fármaco disuelta en el medio de disolución en cada tiempo de muestreo.

### Paso 7.

Cálculo de cantidad de fármaco total (Q total).

Sumar la Q acum (F11) y la Q medio (H11) en el primer tiempo de muestreo y luego arrastrar la función a las siguientes celdas.

DESVEST.S										
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1										
2										
3										
4	Dosis (mg)	40								
5	Fd	3	Factor de dilución							
6	Vm (mL)	5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t							
7										
8										
Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Vol medio (mL)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto	
1	0	0	0	0	0	900	0	0		
11	5	0,0049	0,0146	0,0729	0	900	13,1149	=H11+F11		
12	10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	895,0	21,3153			
13	15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	890,0	29,0851			
14	20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553	885,0	36,2620			
15	30	0,0153	0,0460	0,2302	0,5602	880,0	40,5144			
16	45	0,0153	0,0460	0,2302	0,7904	875,0	40,2842			
17	60	0,0153	0,0458	0,2292	1,0206	870,0	39,8887			
18										
19										

Con la extracción de muestra a cada tiempo se retira del medio una cantidad de fármaco que esta disuelta, por tanto la Q total es la sumatoria de Q medio y Q acum de las alícuotas en cada tiempo de muestreo.

### Paso 8.

Cálculo de porcentaje disuelto de fármaco (% disuelto)

Es la multiplicación a cada tiempo de muestreo de Q total (I11) por cien dividido entre la dosis (B4), esta última celda debe ser fijada y luego se arrastra la función a los siguientes tiempos.

Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Vol medio (mL)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto
1	0	0	0	0	0	900	0	0	0
	5	0,0049	0,0146	0,0729	0	900	13,1149	13,1149	=I11*100/\$B\$4
	10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	895,0	21,3153	21,3881	
	15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	890,0	29,0851	29,2770	
	20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553	885,0	36,2620	36,6173	
	30	0,0153	0,0460	0,2302	0,5602	880,0	40,5144	41,0746	
	45	0,0153	0,0460	0,2302	0,7904	875,0	40,2842	41,0746	
60	0,0153	0,0458	0,2292	1,0206	870,0	39,8887	40,9093		

El % disuelto es la relación porcentual entre la cantidad disuelta de fármaco a cada tiempo de muestreo y la dosis ensayada.

Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Vol medio (mL)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto
1	0	0	0	0	0	900	0	0	0
	5	0,0049	0,0146	0,0729	0	900	13,1149	13,1149	32,7873
	10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	895,0	21,3153	21,3881	53,4703
	15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	890,0	29,0851	29,2770	73,1925
	20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553	885,0	36,2620	36,6173	91,5432
	30	0,0153	0,0460	0,2302	0,5602	880,0	40,5144	41,0746	102,6864
	45	0,0153	0,0460	0,2302	0,7904	875,0	40,2842	41,0746	102,6864
60	0,0153	0,0458	0,2292	1,0206	870,0	39,8887	40,9093	102,2733	

Al completar todas las celdas del vaso 1, se debe realizar el mismo procedimiento para tantos vasos como unidades sean ensayadas, en una misma hoja de datos.

## 29.4 Aparato IV (acumulado)

A cada tiempo preestablecido de muestreo se obtiene una muestra (cuyo volumen es dependiente del flujo y tiempo del intervalo de muestreo). La concentración de fármaco disuelto disminuye a lo largo del ensayo.

La muestra obtenida contiene el fármaco disuelto, que debe ser considerado hasta el final del ensayo, con este fin se genera una columna de cantidad de fármaco acumulado (Q acum).

**Paso 1.**

Preparar hoja Excel con los datos del ensayo.

A36							
A	B	C	D	E	F	G	H
1							
2							
3							
4	Dosis (mg)	32					
5	Fd	2					
6	Flujo (mL/min)=	8					
7							
8							
Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	% disuelto	
10	0	0					
11	5	0,0020					
12	10	0,0031					
13	15	0,0051					
14	20	0,0075					
15	30	0,0078					
16	45	0,0137					
17	60	0,0205					
18	90	0,0145					
19	120	0,0100					
20	150	0,0066					
21	180	0,0041					
22	210	0,0029					
23	240	0,0022					
24							
25							

La dosis es la cantidad total de fármaco en cada celda de disolución y el factor de dilución es el número que permite calcular la concentración real de cada muestra cuando se realiza algún tipo de dilución que se pueda requerir, por ejemplo en el caso de precipitación de la muestra o por el método de cuantificación ya validado.

En la columna B se incluyen los tiempos de muestreo, en la columna C las concentraciones obtenidas en cada toma de muestra.

**Paso 2.**

Cálculo de la concentración corregida (Conc correg).

Multiplicar la concentración (C11) del tiempo 5 minutos con el Fd (B5).

Esta función debe ser la misma en todas los tiempos de muestreo (5, 10, 15...), para ello se debe arrastrar la función desde la celda D11 hasta la celda D23; previamente se debe fijar la celda B5 para que la multiplicación se realice siempre con la celda B5 (Fd). Para fijar la celda se debe anteponer el símbolo \$ a la columna y a la fila (\$B\$5).

255								
	A	B	C	D	E	F	G	H
1								
2								
3								
4	Dosis (mg)	32						
5	Fd	2						
6	Flujo (mL/min)=	8						
7								
8								
	Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	% disuelto	
10		0		0				
11		5	0,0020	=C11*\$B\$5				
12		10	0,0031					
13		15	0,0051					
14		20	0,0075					
15		30	0,0078					
16	1	45	0,0137					
17		60	0,0205					
18		90	0,0145					
19		120	0,0100					
20		150	0,0066					
21		180	0,0041					
22		210	0,0029					
23		240	0,0022					
24								
25								

La concentración corregida es la concentración real de fármaco que se encuentra en cada tiempo de muestreo.

### Paso 3.

Cálculo de cantidad de fármaco en la muestra (Qt).

Multiplicar la concentración corregida (D11) del tiempo 5 minutos con el flujo del ensayo y con la diferencia entre los tiempos de toma de muestras ( $t_2-t_1$ ). Al igual que en el paso anterior la función se debe arrastrar a todos los tiempo de muestreo, fijando la celda B5.

255							
A	B	C	D	E	F	G	H
1							
2							
3							
4	Dosis (mg)	32					
5	Fd	2					
6	Flujo (mL/min)=	8					
7							
8							
Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	% disuelto	
10	0	0	0	0			
11	5	0,0020	0,0040	=D11*\$B\$6*(B11-B10)			
12	10	0,0031	0,0062				
13	15	0,0051	0,0102				
14	20	0,0075	0,0150				
15	30	0,0078	0,0156				
16	45	0,0137	0,0274				
17	60	0,0205	0,0410				
18	90	0,0145	0,0290				
19	120	0,0100	0,0200				
20	150	0,0066	0,0132				
21	180	0,0041	0,0082				
22	210	0,0029	0,0058				
23	240	0,0022	0,0044				
24							
25							

La Qt es la cantidad de fármaco disuelta en la muestra al tiempo t.

**Paso 4.**

Cálculo de cantidad acumulada de fármaco (Q acum).

Es la sumatoria de Qt (E11) y la Qacum (F10) del tiempo anterior. Los siguientes tiempos de muestreo se debe arrastrar esta última función.

		A	B	C	D	E	F	G	H
1									
2									
3									
4	Dosis (mg)		32						
5	Fd		2						
6	Flujo (mL/min)=		8						
7									
8									
9	Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	% disuelto		
10	1	0	0	0	0	0			
11		5	0,0020	0,0040	0,1600	=E11+F10			
12		10	0,0031	0,0062	0,2480				
13		15	0,0051	0,0102	0,4080				
14		20	0,0075	0,0150	0,6000				
15		30	0,0078	0,0156	1,2480				
16		45	0,0137	0,0274	3,2880				
17		60	0,0205	0,0410	4,9200				
18		90	0,0145	0,0290	6,9600				
19		120	0,0100	0,0200	4,8000				
20		150	0,0066	0,0132	3,1680				
21		180	0,0041	0,0082	1,9680				
22		210	0,0029	0,0058	1,3920				
23		240	0,0022	0,0044	1,0560				
24									
25									

La Q acum es la suma de las cantidades de fármaco disueltas que han sido obtenidas desde el tiempo 0 hasta el tiempo t de muestreo.

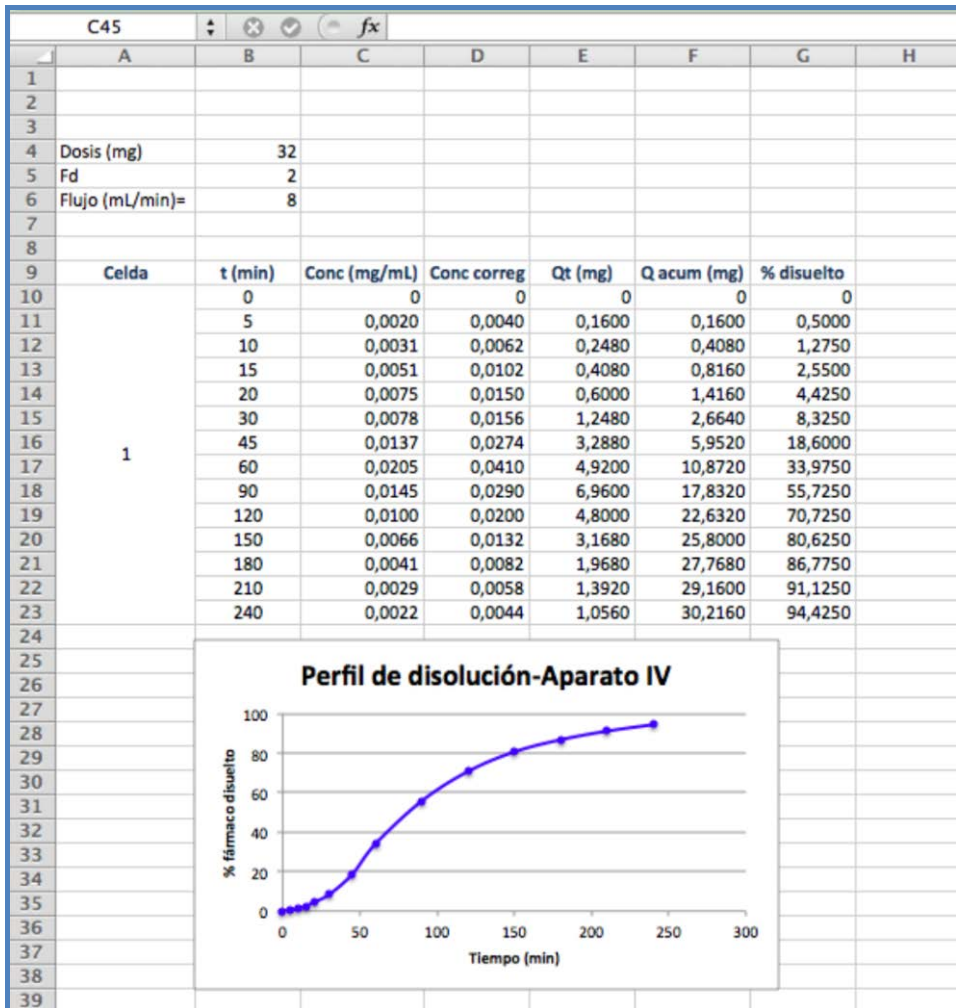
**Paso 5.**

Cálculo de porcentaje disuelto de fármaco (% disuelto)

Es la multiplicación a cada tiempo de muestreo de Q acum (F11) por cien dividido entre la dosis (B4), esta última celda debe ser fijada y luego se arrastra la función a los siguientes tiempos.

255							
A	B	C	D	E	F	G	H
1							
2							
3							
4	Dosis (mg)	32					
5	Fd	2					
6	Flujo (mL/min)=	8					
7							
8							
Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	% disuelto	
10	0	0	0	0	0	0	
11	5	0,0020	0,0040	0,1600	0,1600	=F11*100/\$B\$4	
12	10	0,0031	0,0062	0,2480	0,4080		
13	15	0,0051	0,0102	0,4080	0,8160		
14	20	0,0075	0,0150	0,6000	1,4160		
15	30	0,0078	0,0156	1,2480	2,6640		
16	45	0,0137	0,0274	3,2880	5,9520		
17	60	0,0205	0,0410	4,9200	10,8720		
18	90	0,0145	0,0290	6,9600	17,8320		
19	120	0,0100	0,0200	4,8000	22,6320		
20	150	0,0066	0,0132	3,1680	25,8000		
21	180	0,0041	0,0082	1,9680	27,7680		
22	210	0,0029	0,0058	1,3920	29,1600		
23	240	0,0022	0,0044	1,0560	30,2160		
24							
25							

El % disuelto es la relación porcentual entre la cantidad disuelta de fármaco a cada tiempo de muestreo y la dosis ensayada.



Al completar la celda 1, se debe realizar el mismo procedimiento para tantas celdas como unidades sean ensayadas, en una misma hoja de datos.

## 29.5 Cálculo de resultados promedio y Factor de Similitud ( $f_2$ )

### 29.5.1 Resultados promedio



Para ambos procedimientos (con reposición y sin reposición) se debe calcular los porcentajes de fármaco disuelto promedio a cada tiempo con su respectiva desviación estándar (DE) y coeficiente de variación (CV%).

**Paso 1.**

Cálculo del porcentaje de fármaco disuelto promedio (% disuelto).

Para calcular el % disuelto promedio del tiempo 5 minutos se debe utilizar la función PROMEDIO y seleccionar todas las celdas de % disuelto de este tiempo (I12; I20; I28; I36; I44; I52) y luego se arrastra la función a los siguientes tiempos.

PROMEDIO										=PROMEDIO(I12;I20;I28;I36;I44;I52)									
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O					
1																			
2																			
3																			
4	Dosis (mg)	40																	
5	Fd	3	Factor de dilución																
6	Vm (mL)	5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t																
7	Vol. Medio (mL)	900	Volumen del medio de disolución																
8																			
9																			
10	Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto	Tabla de resultados promedio									
11	1	0	0	0	0	0	0	0	0	t (min)	% disuelto	DE	CV (%)						
12		5	0,0049	0,0146	0,0729	0	13,1149	13,1149	32,7873	5	=PROMEDIO(I12;I20;I28;I36;I44;I52)								
13		10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	21,4343	21,5072	53,7680	10									
14		15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	29,4119	29,6038	74,0095	15									
15		20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553	36,8766	37,2319	93,0797	20									
16		30	0,0140	0,0420	0,2100	0,5602	37,8000	38,3602	95,9005	30									
17	45	0,0143	0,0429	0,2145	0,7702	38,6100	39,3802	98,4505	45										
18	60	0,0148	0,0444	0,2220	0,9847	39,9600	40,9447	102,3618	60										
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0										
20	2	5	0,0040	0,0120	0,0599	0	10,7737	10,7737	26,9343										
21		10	0,0073	0,0218	0,1092	0,0599	19,6554	19,7153	49,2881										
22		15	0,0100	0,0300	0,1500	0,1691	27,0078	27,1768	67,9421										
23		20	0,0139	0,0418	0,2089	0,3191	37,5952	37,9143	94,7859										
24		30	0,0139	0,0418	0,2089	0,5280	37,5952	38,1232	95,3080										
25		45	0,0143	0,0429	0,2147	0,7368	38,6540	39,3908	98,4770										
26	60	0,0148	0,0444	0,2219	0,9516	39,9480	40,8996	102,2489											
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0										
28	3	5	0,0045	0,0135	0,0674	0	12,1265	12,1265	30,3164										
29		10	0,0078	0,0234	0,1170	0,0674	21,0671	21,1344	52,8361										
30		15	0,0109	0,0326	0,1628	0,1844	29,3017	29,4862	73,7154										
31		20	0,0138	0,0414	0,2072	0,3472	37,3012	37,6483	94,1209										
32		30	0,0146	0,0437	0,2183	0,5544	39,3010	39,8554	99,6386										
33		45	0,0148	0,0444	0,2220	0,7728	39,9600	40,7328	101,8319										
34	60	0,0148	0,0444	0,2220	0,9948	39,9600	40,9548	102,3869											

**Paso 2.**

Cálculo de la desviación estándar (DE).

Para calcular la DE del tiempo 5 minutos se debe utilizar la función DESVEST y seleccionar todas las celdas de % disuelto de este tiempo (I12; I20; I28; I36; I44; I52) y luego se arrastra la función a los siguientes tiempos.

DESVEST.S														
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1														
2														
3														
4	Dosis (mg)	40												
5	Fd	3	Factor de dilución											
6	Vm (mL)	5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t											
7	Vol. Medio (mL)	900	Volumen del medio de disolución											
8														
9														
10	Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto	Tabla de resultados promedio				
11		0	0	0	0	0	0	0	0	t (min)	% disuelto	DE	CV (%)	
12		5	0,0049	0,0146	0,0729	0	13,1149	13,1149	32,7873	5	31,85	=DESVEST.S(12;20;128;136;144;152)	0	0
13		10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	21,4343	21,5072	53,7680	10	54,04			
14		15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	29,4119	29,6038	74,0095	15	75,14			
15		20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553	36,8766	37,2319	93,0797	20	93,38			
16		30	0,0140	0,0420	0,2100	0,5602	37,8000	38,3602	95,9005	30	95,99			
17		45	0,0143	0,0429	0,2145	0,7702	38,6100	39,3802	98,4505	45	98,70			
18		60	0,0148	0,0444	0,2220	0,9847	39,9600	40,9447	102,3618	60	102,03			
19		0	0	0	0	0	0	0	0					
20		5	0,0040	0,0120	0,0599	0	10,7737	10,7737	26,9343					
21		10	0,0073	0,0218	0,1092	0,0599	19,6554	19,7153	49,2881					
22		15	0,0100	0,0300	0,1500	0,1691	27,0078	27,1768	67,9421					
23		20	0,0139	0,0418	0,2089	0,3191	37,5952	37,9143	94,7859					
24		30	0,0139	0,0418	0,2089	0,5280	37,5952	38,1232	95,3080					
25		45	0,0143	0,0429	0,2147	0,7368	38,6540	39,3908	98,4770					
26		60	0,0148	0,0444	0,2219	0,9516	39,9480	40,8996	102,2489					
27		0	0	0	0	0	0	0	0					
28		5	0,0045	0,0135	0,0674	0	12,1265	12,1265	30,3164					
29		10	0,0078	0,0234	0,1170	0,0674	21,0671	21,1344	52,8361					
30		15	0,0109	0,0326	0,1628	0,1844	29,3017	29,4862	73,7154					
31		20	0,0138	0,0414	0,2072	0,3472	37,3012	37,6483	94,1209					
32		30	0,0146	0,0437	0,2183	0,5544	39,3010	39,8554	99,6386					
33		45	0,0148	0,0444	0,2220	0,7728	39,9600	40,7328	101,8319					
34		60	0,0148	0,0444	0,2220	0,9948	39,9600	40,9548	102,3869					

### Paso 3.

Cálculo del coeficiente de variación (CV%).

Para calcular el CV% del tiempo 5 minutos se debe multiplicar la DE (M12) por cien y dividir entre el % disuelto promedio (L12), luego se arrastra la función a los siguientes tiempos.

DESVEST.S														
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1														
2														
3														
4	Dosis (mg)	40												
5	Fd	3	Factor de dilución											
6	Vm (mL)	5,0	Volumen de muestra extraída en tiempo t											
7	Vol. Medio (mL)	900	Volumen del medio de disolución											
8														
9														
10	Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto	Tabla de resultados promedio				
11		0	0	0	0	0	0	0	0	t (min)	% disuelto	DE	CV (%)	
12		5	0,0049	0,0146	0,0729	0	13,1149	13,1149	32,7873	5	31,85	=M12*100/L12	2,91	0
13		10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	21,4343	21,5072	53,7680	10	54,04		3,74	
14		15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	29,4119	29,6038	74,0095	15	75,14		6,36	
15		20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553	36,8766	37,2319	93,0797	20	93,38		0,93	
16		30	0,0140	0,0420	0,2100	0,5602	37,8000	38,3602	95,9005	30	95,99		2,05	
17		45	0,0143	0,0429	0,2145	0,7702	38,6100	39,3802	98,4505	45	98,70		1,72	
18		60	0,0148	0,0444	0,2220	0,9847	39,9600	40,9447	102,3618	60	102,03		0,78	
19		0	0	0	0	0	0	0	0					
20		5	0,0040	0,0120	0,0599	0	10,7737	10,7737	26,9343					
21		10	0,0073	0,0218	0,1092	0,0599	19,6554	19,7153	49,2881					
22		15	0,0100	0,0300	0,1500	0,1691	27,0078	27,1768	67,9421					
23		20	0,0139	0,0418	0,2089	0,3191	37,5952	37,9143	94,7859					
24		30	0,0139	0,0418	0,2089	0,5280	37,5952	38,1232	95,3080					
25		45	0,0143	0,0429	0,2147	0,7368	38,6540	39,3908	98,4770					
26		60	0,0148	0,0444	0,2219	0,9516	39,9480	40,8996	102,2489					
27		0	0	0	0	0	0	0	0					
28		5	0,0045	0,0135	0,0674	0	12,1265	12,1265	30,3164					
29		10	0,0078	0,0234	0,1170	0,0674	21,0671	21,1344	52,8361					
30		15	0,0109	0,0326	0,1628	0,1844	29,3017	29,4862	73,7154					
31		20	0,0138	0,0414	0,2072	0,3472	37,3012	37,6483	94,1209					
32		30	0,0146	0,0437	0,2183	0,5544	39,3010	39,8554	99,6386					
33		45	0,0148	0,0444	0,2220	0,7728	39,9600	40,7328	101,8319					
34		60	0,0148	0,0444	0,2220	0,9948	39,9600	40,9548	102,3869					

## 29.4.2 Factor de Similitud ( $f_2$ )

Al realizar el cálculo de los resultados promedios y obtener el CV %, se debe verificar que el primer tiempo de muestreo debe tener un CV %  $\leq 20$  % y los puntos temporales un CV %  $\leq 10$  % para poder realizar el cálculo de  $f_2$ .

Cuando los CV excedan los valores señalados anteriormente, no puede realizarse la comparación de perfiles a través del factor de similitud. Se puede recurrir a otros estadísticos como por ejemplo la distancia estadística multivariada (MSD, por sus singlas en inglés), cuyo cálculo se explica más adelante.

El  $f_2$  debe incluir un mínimo de cuatro puntos excluyendo el cero y sólo se debe incluir los tiempos de muestreo hasta que cualquiera de las formulaciones (referencia y/o test) sea  $\geq$  el 85% de fármaco disuelto, según la normativa actual de la European Medicines Agency (EMA), ya que la normativa de la Food and Drug Administration (FDA) incluye los tiempos de muestreo hasta que la formulación de referencia sea  $\geq$  el 85% de fármaco disuelto.

### Paso 1.

Preparar hoja Excel con los datos de porcentaje de fármaco disuelto promedio (% disuelto) del producto de referencia y test.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1											
2	t (min)	Referencia	Test	(R-T) <sup>2</sup>	SUMA*1/n	E+1	F <sup>(-0,5)</sup>	G*100	LOG	$f_2$	
3	5	18,70	31,85								
4	10	36,54	54,04								
5	15	52,52	75,14								
6	20	67,76	93,38								
7	30	92,19	95,9949								
8	45	99,13	98,6986								
9	60	101,18	102,0254								
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

En este ejemplo, según la normativa de la EMA, la formulación test alcanza un porcentaje  $\geq$  al 85% de fármaco disuelto a los 20 minutos. Por lo que se incluyen los primeros cuatro puntos de muestreo de ambas formulaciones para el cálculo.

### Paso 2.

Cálculo de  $(R-T)^2$ .

Para calcular el  $(R-T)^2$  se restan las celdas B3 y C3 y se elevan a la potencia 2 y luego se arrastra la función hasta la celda D6.

LOG10										
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1										
2	t (min)	Referencia	Test	(R-T)^2	SUMA*1/n	E+1	F^(-0,5)	G*100	LOG	f <sub>2</sub>
3	5	18,70	31,85	=(B3-C3)^2						
4	10	36,54	54,04							
5	15	52,52	75,14							
6	20	67,76	93,38							
7	30	92,19	95,9949							
8	45	99,13	98,6986							
9	60	101,18	102,0254							
10										
11										
12										
13	$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$									
14										
15										
16										
17										
18										
19										

### Paso 3.

Sumatoria de (R-T)<sup>2</sup>.

Utilizar la función SUMA en la celda D10 y seleccionar los (R-T)<sup>2</sup>: D3; D4; D5; D6.

LOG10										
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1										
2	t (min)	Referencia	Test	(R-T)^2	SUMA*1/n	E+1	F^(-0,5)	G*100	LOG	f <sub>2</sub>
3	5	18,70	31,85	172,93						
4	10	36,54	54,04	306,32						
5	15	52,52	75,14	511,84						
6	20	67,76	93,38	656,51						
7	30	92,19	95,9949							
8	45	99,13	98,6986							
9	60	101,18	102,0254							
10			SUMA	=SUMA(D3:D6)						
11										
12										
13	$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$									
14										
15										
16										
17										
18										
19										

### Paso 3.

Cálculo SUMA\*1/n.

Se debe multiplicar la celda D10 por el inverso del número de puntos (1/n), en este ejemplo con un “n” igual a 4.

LOG10										
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1										
2	t (min)	Referencia	Test	(R-T) <sup>2</sup>	SUMA*1/n	E+1	F <sup>(-0,5)</sup>	G*100	LOG	f <sub>2</sub>
3	5	18,70	31,85	172,93	=D10*(1/4)					
4	10	36,54	54,04	306,32						
5	15	52,52	75,14	511,84						
6	20	67,76	93,38	656,51						
7	30	92,19	95,9949							
8	45	99,13	98,6986							
9	60	101,18	102,0254							
10			SUMA	1647,61						
11										
12										
13	$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$									
14										
15										
16										
17										
18										
19										

#### Paso 4.

Cálculo E + 1.

A la celda E3 se suma la unidad.

LOG10										
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1										
2	t (min)	Referencia	Test	(R-T) <sup>2</sup>	SUMA*1/n	E+1	F <sup>(-0,5)</sup>	G*100	LOG	f <sub>2</sub>
3	5	18,70	31,85	172,93	411,90	=E3+1				
4	10	36,54	54,04	306,32						
5	15	52,52	75,14	511,84						
6	20	67,76	93,38	656,51						
7	30	92,19	95,9949							
8	45	99,13	98,6986							
9	60	101,18	102,0254							
10			SUMA	1647,61						
11										
12										
13	$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$									
14										
15										
16										
17										
18										
19										

#### Paso 5.

Cálculo de F<sup>(-0.5)</sup>.

La celda F3 se eleva a la potencia (-0.5).

LOG10										
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
2	t (min)	Referencia	Test	(R-T) <sup>2</sup>	SUMA*1/n	E+1	F <sup>(-0,5)</sup>	G*100	LOG	f <sub>2</sub>
3	5	18,70	31,85	172,93	411,90	412,90	=F3 <sup>(-0,5)</sup>			
4	10	36,54	54,04	306,32						
5	15	52,52	75,14	511,84						
6	20	67,76	93,38	656,51						
7	30	92,19	95,9949							
8	45	99,13	98,6986							
9	60	101,18	102,0254							
10		SUMA	1647,61							

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

### Paso 6.

Cálculo de G\*100.

Se multiplica la celda G3 por cien.

LOG10										
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
2	t (min)	Referencia	Test	(R-T) <sup>2</sup>	SUMA*1/n	E+1	F <sup>(-0,5)</sup>	G*100	LOG	f <sub>2</sub>
3	5	18,70	31,85	172,93	411,90	412,90	0,05	=G3*100		
4	10	36,54	54,04	306,32						
5	15	52,52	75,14	511,84						
6	20	67,76	93,38	656,51						
7	30	92,19	95,9949							
8	45	99,13	98,6986							
9	60	101,18	102,0254							
10		SUMA	1647,61							

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

### Paso 7.

Cálculo de LOG.

Se utiliza la función LOG10 para calcular el logaritmo de la celda H3.

LOG10										
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1										
2	t (min)	Referencia	Test	(R-T) <sup>2</sup>	SUMA*1/n	E+1	F <sup>(-0,5)</sup>	G*100	LOG	f <sub>2</sub>
3	5	18,70	31,85	172,93	411,90	412,90	0,05	4,92	=LOG10(H3)	
4	10	36,54	54,04	306,32						
5	15	52,52	75,14	511,84						
6	20	67,76	93,38	656,51						
7	30	92,19	95,9949							
8	45	99,13	98,6986							
9	60	101,18	102,0254							
10			SUMA	1647,61						
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

### Paso 8.

Cálculo del factor de similitud ( $f_2$ ).

La celda I3 es multiplicada por 50, el valor obtenido corresponde a  $f_2$ .

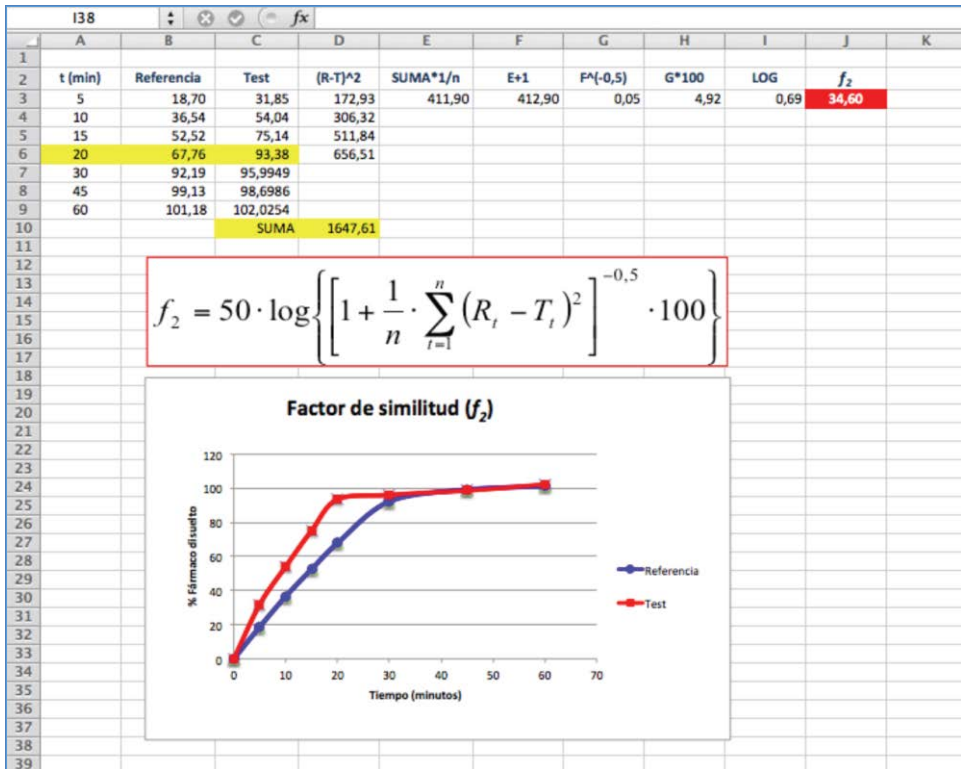
LOG10										
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1										
2	t (min)	Referencia	Test	(R-T) <sup>2</sup>	SUMA*1/n	E+1	F <sup>(-0,5)</sup>	G*100	LOG	f <sub>2</sub>
3	5	18,70	31,85	172,93	411,90	412,90	0,05	4,92	0,69	=50*I3
4	10	36,54	54,04	306,32						
5	15	52,52	75,14	511,84						
6	20	67,76	93,38	656,51						
7	30	92,19	95,9949							
8	45	99,13	98,6986							
9	60	101,18	102,0254							
10			SUMA	1647,61						
11										
12										
13										
14										
15										
16										
17										
18										
19										

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

### Paso 8.

Grafica del factor de similitud ( $f_2$ ).

Se grafican todos los puntos del ensayo (tiempo 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 minutos) incluyendo el tiempo cero.



El valor obtenido en este ejemplo no satisface la condición de similitud entre perfiles de disolución.

Los valores de  $f_2$  mayores de 50 (entre 50 y 100) aseguran similitud o equivalencia de las curvas de los dos productos. Se acepta una diferencia máxima entre los perfiles de las formulaciones de hasta un 10%, que corresponde al valor de  $f_2$  de 50. Un valor de  $f_2$  de 100 quiere decir que la diferencia entre los perfiles de las formulaciones estudiadas es de 0%.

## 29.6 Aparato IV (sin acumular)

A cada tiempo preestablecido de muestreo se obtiene una muestra (cuyo volumen es dependiente del flujo y tiempo del intervalo de muestreo correspondiente).

### Paso 1.

Preparar hoja Excel con los datos del ensayo.



I36							
	A	B	C	D	E	F	G
1							
2							
3							
4	Dosis (mg)	32					
5	Fd	2					
6	Flujo (mL/min)=	8					
7							
8							
9	Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	% disuelto	
10	1	0	0				
11		5	0,0020				
12		10	0,0031				
13		15	0,0051				
14		20	0,0075				
15		30	0,0078				
16		45	0,0137				
17		60	0,0205				
18		90	0,0145				
19		120	0,0100				
20		150	0,0066				
21		180	0,0041				
22		210	0,0029				
23		240	0,0022				
24							
25							

Desarrollar el **Paso 2** y **Paso 3** del procedimiento descrito cuando el ensayo es realizado con acumulación de la cantidad de fármaco disuelto: acumulado (ítem 3).

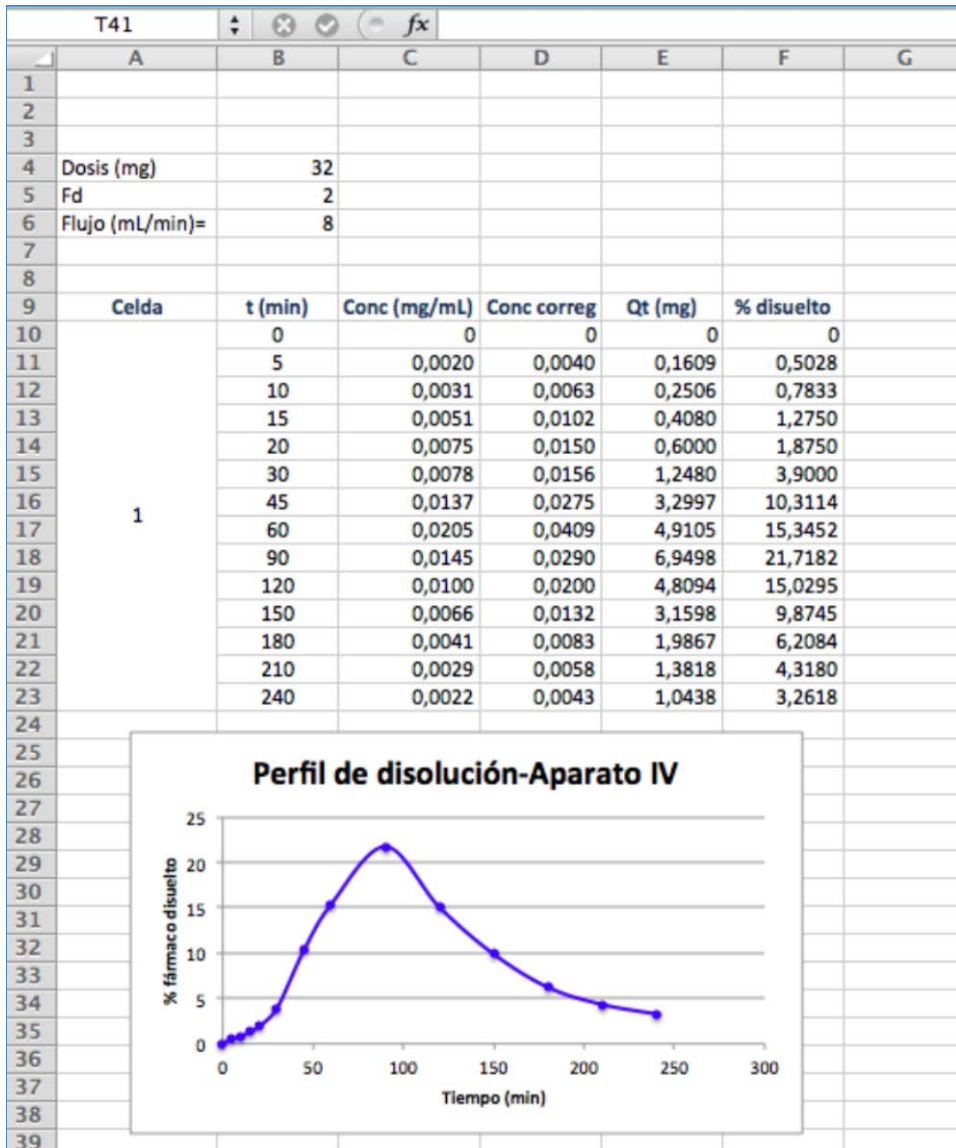
**Paso 4.**

Cálculo de porcentaje disuelto de fármaco (% disuelto)

Es la multiplicación a cada tiempo de muestreo de Q acum (E11) por cien dividido entre la dosis (B4), esta última celda debe ser fijada y luego se arrastra la función a los siguientes tiempos.

255							
A	B	C	D	E	F	G	
1							
2							
3							
4	Dosis (mg)	32					
5	Fd	2					
6	Flujo (mL/min)=	8					
7							
8							
Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	% disuelto		
10	0	0	0	0	0		
11	5	0,0020	0,0040	0,1609	=E11*100/\$B\$4		
12	10	0,0031	0,0063	0,2506			
13	15	0,0051	0,0102	0,4080			
14	20	0,0075	0,0150	0,6000			
15	30	0,0078	0,0156	1,2480			
16	45	0,0137	0,0275	3,2997			
17	60	0,0205	0,0409	4,9105			
18	90	0,0145	0,0290	6,9498			
19	120	0,0100	0,0200	4,8094			
20	150	0,0066	0,0132	3,1598			
21	180	0,0041	0,0083	1,9867			
22	210	0,0029	0,0058	1,3818			
23	240	0,0022	0,0043	1,0438			
24							
25							

El % disuelto es la relación porcentual entre la cantidad disuelta de fármaco a cada tiempo de muestreo y la dosis ensayada.



Al completar la celda 1, se debe realizar el mismo procedimiento para tantas celdas como unidades sean ensayadas, en una misma hoja de datos.

La comparación de este tipo de perfiles se realiza a través de la distancia estadística multivariada<sup>4</sup>. La aplicación DDSolver, que es un complemento para Microsoft





Time (min)	Ref.1 F (%)	Ref.2 F (%)	Ref.3 F (%)
5	24.06	26.91	27.23
10	45.26	51.84	48.15
15	61.22	62.24	60.08
20	66.04	67.25	69.25
30	80.25	85.97	81.14
45	85.09	89.22	89.72
60	91.72	93.39	93.75

#### Paso 4.

Seleccionar los porcentajes de fármaco disuelto de todas las celdas de los tiempos seleccionados en el paso anterior (B5:M17) del producto de referencia.

Time (min)	Ref.1 F (%)	Ref.2 F (%)	Ref.3 F (%)
10	45.26	51.84	48.15
15	61.22	62.24	60.08
20	66.04	67.25	69.25
30	80.25	85.97	81.14
45	85.09	89.22	89.72
60	91.72	93.39	93.75

#### Paso 5.

Repetir el Paso 3 y Paso 4 para el producto test.

**Dissolution Profile Comparison - Multivariate Confidence Region**

Input data format

Time (min)	Ref.1 F(%)	Ref.2 F(%)	Ref.3 F(%)
5	24.06	26.81	27.33
10	45.26	51.84	48.15
15	61.22	62.24	60.09
20	66.04	67.25	69.35
30	80.25	85.97	81.14
45	85.09	89.22	89.72
60	91.72	93.39	93.75

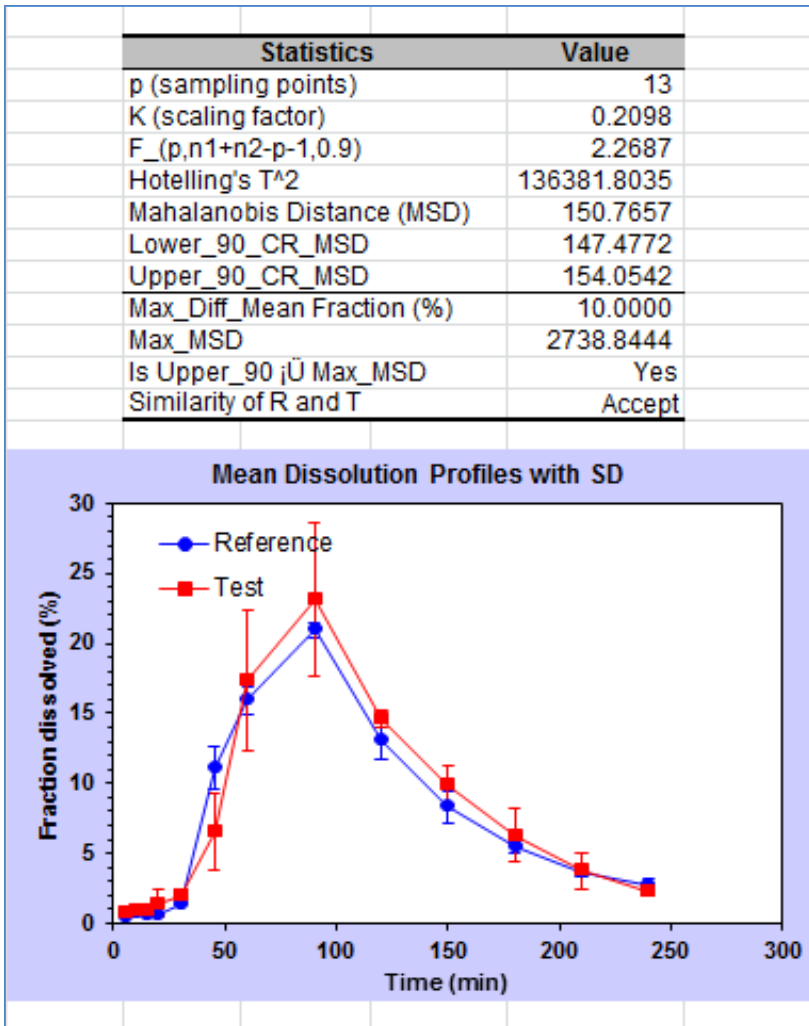
Input - Reference formulation  
Time: Hoja1!\$A\$5:\$A\$17  
F (%): Hoja1!\$B\$5:\$M\$17

Input - Test formulation  
Time: foja1!\$A\$23:\$A\$35  
F (%): foja1!\$B\$23:\$M\$35

Setting  
Time Unit: min

**Paso 6.**

Seleccionar el botón RUN para comenzar el análisis y se obtendrá la siguiente tabla y gráfica.



Se considera que las formulaciones son similares cuando el límite superior del intervalo de confianza es igual o menor a la distancia máxima de Mahalanobis.

En este ejemplo el límite superior del intervalo de confianza al 90 % es 154.0542, siendo éste menor a la distancia máxima de Mahalanobis la cual es 2738.8444.

La tabla nos indica que “Si” cumple dicho parámetro y “Acepta” la similitud entre el producto de referencia y test.



---

<sup>1</sup> Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency (EMA). Guideline on the Investigation of Bioequivalence, London, 2010.

<sup>2</sup> US FDA, US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research. Guideline for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, 2000.

<sup>3</sup> European Pharmacopoeia. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe, 2007.

<sup>4</sup> Adams, E., Coomans, D., Smeyers-Verbeke, J. & Massart, D.L., “Non-linear mixed effects models for the evaluation of dissolution profiles”. *Int. J. Pharm.*, Vol. 240, 2002, 37-53.

<sup>5</sup> Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C. & Shaofei, X., “DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles”. *AAPS Journal*, Vol. 12, No 3, 2010, 263-271.

## 30. Sección parte aplicada: Ajuste no lineal por mínimos cuadrados en Excel. Uso de herramienta Solver

Victor Mangas Sanjuán<sup>a</sup>, Isabel González Alvarez<sup>a</sup>, Marta González Alvarez<sup>a</sup>  
Marival Bermejo Sanz<sup>a</sup>  
*a Departamento de Ingeniería. Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.  
Universidad Miguel Hernández.  
España.*

Los objetivos de este apartado son la introducción en los fundamentos de la regresión no lineal y el aprendizaje de la herramienta “Solver”.

El modelo farmacocinético que mejor represente los datos experimentales será aquel en el que la suma de cuadrados sea mínima. Para ello, deberemos comparar distintos modelos farmacocinéticos con el fin de obtener unas concentraciones teóricas y ver con cuál se obtiene una suma de cuadrados más pequeña. Para realizar esta práctica, deberá utilizar Excel.

1. En la columna A introducimos los tiempos.
2. En la columna B añadimos las concentraciones experimentales obtenidas del ensayo.
3. En este ejemplo, compararemos las estimaciones de “Solver” para un modelo monocompartimental (MC) y un modelo bicompartimental (BC). En la columna C calculamos las concentraciones teóricas según la ecuación del modelo cinético monocompartimental y en la columna E calcularemos las correspondientes al modelo bicompartimental. Para obtener las concentraciones teóricas, deberemos proporcionar unos valores o estimas iniciales a los parámetros correspondientes a cada modelo cinético. Esos valores se encuentran en las celdas B16 a B19 para el modelo monocompartimental y B22 a B26 para el modelo bicompartimental.
4. En las columnas D y F se calculan los valores residuales al cuadrado de cada modelo. Es decir el cuadrado de la diferencia entre el valor

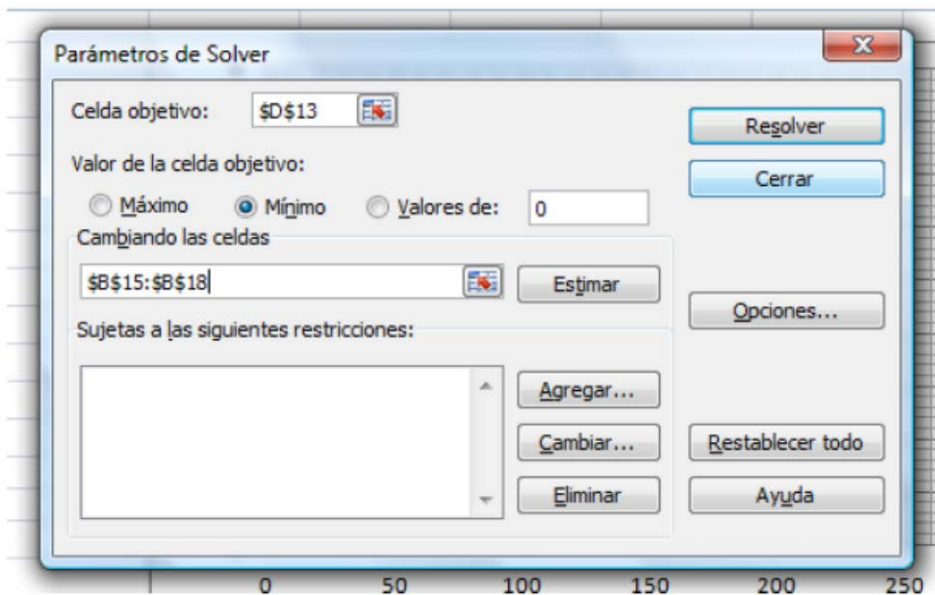
experimental y el valor predicho para cada uno de los modelos. La suma de esas diferencias cuadradas se denomina Suma de Cuadrados (SC o SSR).

	A	B	C	D	E	F
1	TIEMPO	CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES	MONOCOMPARTIMENTAL	RESIDUALES MC	BICOMPARTIMENTAL	RESIDUALES BC
2	5	4.99	4.9483	0.0017	4.6363	0.132
3	10	7.01	7.1233	0.0128	7.0622	8.631
4	15	7.81	7.8419	0.0010	8.1840	46.457
5	30	8.45	7.5736	0.7681	8.1970	475.372
6	60	5.64	5.9649	0.1056	5.6555	2953.322
7	90	3.99	4.6614	0.4507	3.9904	7397.658
8	120	2.93	3.6425	0.5076	3.0747	13671.532
9	180	2.31	2.2241	0.0074	2.2168	31606.853
10	240	1.86	1.3581	0.2519	1.8119	56733.565
11	300	1.59	0.8293	0.5787	1.5423	89077.019
12	360	1.24	0.5064	0.5382	1.3283	128645.406
13			SSR	46.67	SSR	330615.95
14			R2	-0.87	R2	-0.86
15						
16	A	10.4554				
17	Ka	0.1719				
18	E	9.7693				
19	Kel	0.0082				
20						
21						
22	M	12.3808				
23	alfa	0.0238				
24	N	3.1614				
25	beta	0.0024				
26	Ka	0.0989				
27						
28						
29						
30						

El fundamento de la regresión consiste en calcular el valor de los parámetros que hace mínima la suma de cuadrados. Para obtener el mínimo de una función se debe obtener el valor de su derivada con respecto a cada uno de los parámetros. En el caso de la regresión lineal al derivar la suma de cuadrados respecto a la ordenada y la pendiente se obtiene un sistema de dos ecuaciones que posee una solución algebraica sencilla. En el caso de ecuaciones no lineales se debe recurrir a procedimientos iterativos. En excel la herramienta que realiza dichos procedimientos se llama “Solver”.

5. Instalación de la herramienta Solver: una vez abierto Excel, clicamos sobre “Complementos”. En el menú que se abre, clicamos sobre la pestaña “Ir” en Complementos de Excel. Por último, activamos la opción “Solver”. La herramienta aparecerá en la pestaña “Datos” del menú principal de Excel.
6. Activamos la función “Solver” para la minimización de la suma de cuadrados. Ello conduce a un menú en el que se le debe indicar

- a) Celda objetivo: cuál es la celda cuyo valor queremos hacer “mínimo”. Se debe seleccionar la celda que contenga la suma de cuadrados, que en este ejemplo corresponde a la celda D13.
- b) Parámetros del modelo: qué celdas queremos cambiar para que la suma de cuadrados sea mínima. En este caso las celdas a cambiar son las que contienen el valor de los parámetros a estimar. Es decir B15 a B19 en el modelo bicompartimental.

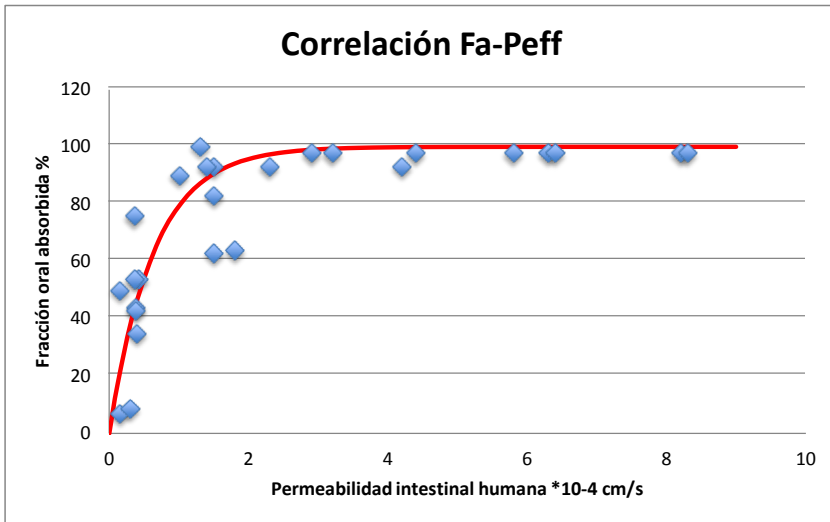


# **ANEXOS**

# ANEXO A

X	Y	Tres horas	3,00 Radio intest. Cm	1,37	peff	gráfica
Human Jejunal Permeability (10 <sup>-4</sup> cm/s)	Fraction Dose Absorbed %	fa teórica	residuales			
0,15	7	21,1	197,8		0,12	0,0
0,3	8,5	37,7	852,0		0,36	17,2
0,4	35	46,8	138,7		0,72	43,3
0,38	44	45,1	1,2		1,08	67,9
0,15	50	21,1	837,4		1,44	81,8
0,42	54	48,4	31,0		1,8	89,7
0,38	43	45,1	4,3		1,8	94,1
0,36	54	43,3	114,2		2,16	96,7
1,8	64	94,1	908,8		2,52	98,1
0,36	76	43,3	1068,4		2,88	98,9
1	90	79,3	113,7		3,24	99,4
1,5	63	90,6	762,1		3,6	99,7
1,5	83	90,6	57,9		3,96	99,8
1,5	93	90,6	5,7		4,32	99,9
1,4	93	89,0	16,0		4,68	99,9
1,3	100	87,1	165,8		5,04	100,0
2,3	93	97,3	18,8		5,4	100,0
2,9	98	99,0	0,9		5,76	100,0
3,2	98	99,4	1,8		6,12	100,0
4,2	93	99,9	47,2		6,48	100,0
4,4	98	99,9	3,6		6,84	100,0
5,8	98	100,0	4,0		7,2	100,0
6,3	98	100,0	4,0		7,56	100,0
6,4	98	100,0	4,0		7,92	100,0
8,2	98	100,0	4,0		8,28	100,0
8,3	98	100,0	4,0		8,64	100,0
					9	100,0
					0,36	

5367,255617



# ANEXO B

## CÁLCULO AUC ADMINISTRACIÓN IV

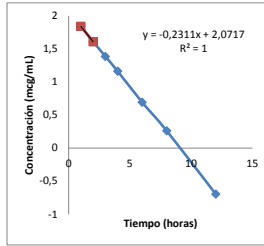
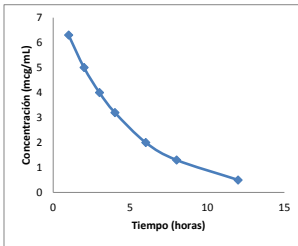
D=250 mg Antibiótico

tiempo horas	Concentración mcg/mL	LN Conc.	AUC parcial mcg <sup>2</sup> /h/mL	AUC 0-t mcg <sup>2</sup> /h/mL
0	7,938			
1	6,3	1,84054963	7,119	7,119
2	5	1,60943791	5,65	12,8
3	4	1,38629436	4,5	17,3
4	3,2	1,16315081	3,6	20,9
6	2	0,69314718	5,2	26,1
8	1,3	0,26236426	3,3	29,4
12	0,5	-0,69314718	3,6	33,0

AUC 0-t=	33,0
AUC t-∞=	2,2
AUC 0-∞=	35,1

Vd=D/CO 31,492862

Regresion LN (2puntos)	-0,23111172	2,07166135	k	0,23111172	Regresion LN (3puntos)	-0,22712764	2,06634924
	0	0	CO	7,938		0,00230021	0,00496903
#INUMI	1	0				0,99989745	0,00325299
0,02670631	0	0				9749,98761	1
						0,10317393	1,0582E-05



7,93830678

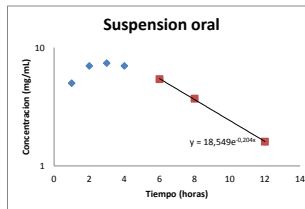
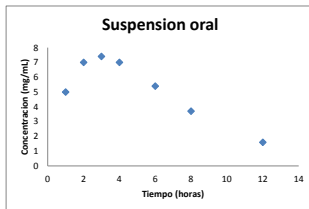
## CÁLCULO AUC ADMINISTRACIÓN SUSPENSION ORAL

D=500 mg Antibiótico

tiempo horas	Concentración mcg/mL	LN Conc.	AUC parcial mcg <sup>2</sup> /h/mL	AUC 0-t mcg <sup>2</sup> /h/mL
0	0			
1	5	1,60943791	2,5	2,5
2	7	1,94591015	6	8,5
3	7,4	2,00148	7,2	15,7
4	7	1,94591015	7,2	22,9
6	5,4	1,68639895	12,4	35,3
8	3,7	1,30833282	9,1	44,4
12	1,6	-0,47000363	10,6	55

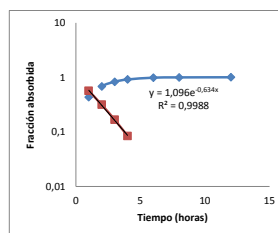
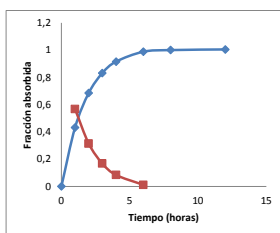
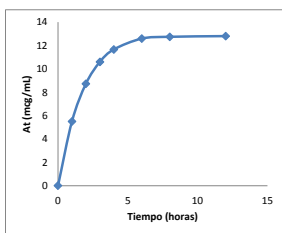
AUC 0-t=	55
AUC t-∞=	7,8542607
AUC 0-∞=	62,8542607

Regresion LN (3puntos)	-0,20371109	2,9204079	k	0,20371109	Regresion LN (4puntos)	-0,18774575	2,7607545
	0,00508462	0,04585561				0,01235099	0,09967683
	0,99937739	0,02196805				0,99141876	0,07306941
	1605,14042	1				231,066518	2
	0,77463321	0,0004826				1,23369632	0,01067828



**Cálculo de la fracción absorbida:  
Método de Wagner-Nelson  
Administración suspensión oral 500 mg Antibiótico**

tiempo horas	Concentración mcg/mL	LN Conc.	AUC parcial mcg <sup>2</sup> /h/mL	AUC 0-t mcg <sup>2</sup> /h/mL	kel 1/horas	E=kel*AUC 0-t	AUC 0-t+C+E mcg/mL	Fa Fracción absorbida	1-Fa
0	0	0					0	0	
1	5	1,60943791	2,5	2,5	0,20371109	0,50927772	5,50927772	0,43243938	0,56756062
2	7	1,94591015	6,0	8,5	0,20371109	1,73154426	8,73154426	0,68536454	0,31463546
3	7,4	2,00148	7,2	15,7	0,20371109	3,19826409	10,5982641	0,83188886	0,16811114
4	7	1,94591015	7,2	22,9	0,20371109	4,66498393	11,6649839	0,91561883	0,08438117
6	5,4	1,68639895	12,4	35,3	0,20371109	7,19100144	12,5910014	0,98830467	0,01169533
8	3,7	1,30833282	9,1	44,4	0,20371109	9,04477234	12,7447723	1,0003746	
12	1,6	0,47000363	10,6	55,0	0,20371109	11,2041099	12,8041099	1,00503217	



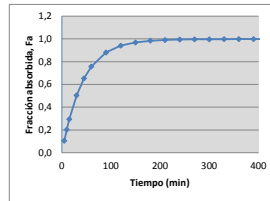
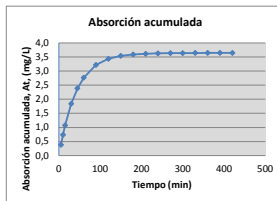
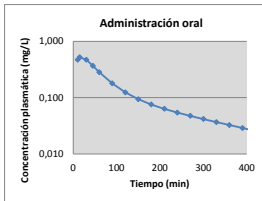


# ANEXO C

Cálculo de la fracción absorbida: Método Loo-Riegelman

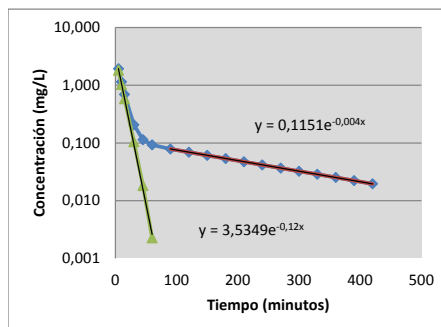
Tiempo min	Cp mg/L	AUC <sub>0-∞</sub> mg·min/L	AUC <sub>0-t</sub> mg·min/L	kel 1/min	E=kel·AUC <sub>0-t</sub> mg/L	P mg/L	At=Cp+P+E mg/L	A∞ mg/L	Fa
5	0,324	0,809	0,809	6,390	0,063	0,051	0,006	0,381	0,104
10	0,469	1,983	2,792			0,175	0,094	0,738	0,202
15	0,520	2,474	5,266			0,330	0,221	1,071	0,293
30	0,471	7,434	12,701			0,796	0,573	1,840	0,504
45	0,368	6,289	18,990			1,190	0,827	2,385	0,653
60	0,284	4,889	23,879			1,497	0,983	2,764	0,757
90	0,179	6,949	30,828			1,932	1,106	3,217	0,881
120	0,124	4,552	35,380			2,218	1,092	3,434	0,941
150	0,094	3,272	38,652			2,423	1,022	3,539	0,969
180	0,076	2,540	41,192			2,582	0,933	3,590	0,983
210	0,063	2,082	43,274			2,712	0,840	3,616	0,990
240	0,054	1,766	45,041			2,823	0,752	3,629	0,994
270	0,047	1,528	46,569			2,919	0,670	3,636	0,996
300	0,042	1,338	47,907			3,003	0,596	3,641	0,997
330	0,037	1,178	49,084			3,077	0,530	3,643	0,998
360	0,033	1,041	50,125			3,142	0,471	3,645	0,998
390	0,029	0,921	51,046			3,200	0,418	3,646	0,999
420	0,026	0,816	51,862			3,251	0,371	3,647	0,999

ka (min-1)	0,025				
Dosis (mg)	100,00				
B0 (mg/L)	0,115 A0 (mg/L)	3,5349	C0 (mg/L)	3,650	
beta (min-1)	0,004 alfa (min-1)	0,12	Vc (L)	27,397	
k21 (min-1)	0,008				
k12 (min-1)	0,054				
kel (min-1)	0,063				



Time (min)	Cp IV (mg/L)	ln Cp	Cp (extrapolad)	Cp-Cp extapolada
5	1,935	0,6599306	0,11282087	1,822
10	1,142	0,13261899	0,11058686	1,031
15	0,692	-0,36819747	0,1083971	0,584
30	0,207	-1,57339893	0,10208454	0,105
45	0,114	-2,16821046	0,0961396	0,018
60	0,093	-2,37722874	0,09054087	0,002
90	0,079	-2,5406514	0,08030255	-0,001
120	0,069	-2,6686142		
150	0,061	-2,7952252		
180	0,054	-2,92178566		
210	0,047	-3,04834422		
240	0,042	-3,17490271		
270	0,037	-3,3014612		
300	0,032	-3,42801969		
330	0,029	-3,55457818		
360	0,025	-3,68113667		
390	0,022	-3,80769516		
420	0,020	-3,93425364		

B0 (mg/L)	0,115	A0 (mg/L)	3,5349	C0 (mg/mL)	3,650
beta (min-1)	0,004	alfa (min-1)	0,12		
k21 (min-1)	0,00765797				
k12 (min-1)	0,054				
kel (min-1)	0,06267978				



# ANEXO D

Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulacion	Cmax	AUC	InCmax	In AUC	
	1	1	1	0	3,05	245,7	1,115	5,504
	2	1	1	0	2,95	343,7	1,082	5,840
	3	0	0	0	2,44	215,9	0,892	5,375
	4	0	0	0	2,95	261,9	1,082	5,568
	5	1	1	0	2,26	186,6	0,815	5,229
	6	0	0	0	2,97	308,8	1,089	5,733
	7	0	0	0	2,54	240,6	0,932	5,483
	8	0	0	0	2,81	202,4	1,033	5,310
	9	1	1	0	2,68	223,8	0,986	5,411
	10	0	0	0	3,12	310,3	1,138	5,738
	11	1	1	0	2,18	184,9	0,779	5,220
	12	1	1	0	3,22	244,9	1,169	5,501
								242,876943
								5,49255491

Sujeto	InCmaxTest	InCmaxRef	InCmaxTest-InCmaxRef
1	1,115	1,144	-0,029
2	1,082	1,215	-0,133
3	0,892	1,209	-0,317
4	1,082	1,197	-0,115
5	0,815	0,944	-0,129
6	1,089	1,182	-0,093
7	0,932	1,047	-0,115
8	1,033	1,040	-0,007
9	0,986	1,235	-0,250
10	1,138	1,233	-0,095
11	0,779	1,001	-0,221
12	1,169	1,157	0,013

LnT-LnR	
Cociente Test/Ref	
SD	
two tailed t(0.05,10)	
IC90%	
antiLn	
Limites	1,25 0,8

Sujeto	In AUCTest	In AUCRef	InAUCTest-InAUCRef
1	5,504	5,559	-0,055
2	5,840	5,956	-0,116
3	5,375	5,462	-0,087
4	5,568	5,523	0,045
5	5,229	5,361	-0,132
6	5,733	5,840	-0,108
7	5,483	5,348	0,135
8	5,310	5,155	0,155
9	5,411	5,566	-0,155
10	5,738	5,744	-0,006
11	5,220	5,468	-0,248
12	5,501	5,449	0,052
	5,493	5,536	

LnT-LnR	-0,043	
Cociente Test/Ref	0,958	
SD	0,030	
two tailed t(0.05,10)	1,812	
IC90%	0,012	-0,099
antiLn	1,012	0,906
Limites	1,25	0,8

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
<b>Interindividual</b>	SSI	n-1	$V_i=SSI/(n-1)$	$V_i/V_r$
Secuencia	SSS	s-1	$V_s=SSS/(s-1)$	$V_s/V_c$
Sujeto/secuencia	SSC	n-s	$V_c=SSC/(n-s)$	$V_c/V_r$
<b>Intraindividual</b>				
Formulaciones	SSF	f-1	$V_f=SSF/(f-1)$	$V_f/V_r$
Periodos	SSP	p-1	$V_p=SSP/(p-1)$	$V_p/V_r$
Residual	SSR	a	$V_r=SSR/a$	
Total	SST	N-1		

**SSR= SST-SSF-SSP-SSI**

Sujeto	Secuencia	Periodo	Formulacion	AUC	In AUC
3	0	0	0	215,9	5,375
4	0	0	0	261,9	5,568
6	0	0	0	308,8	5,733
7	0	0	0	240,6	5,483
8	0	0	0	202,4	5,310
10	0	0	0	310,3	5,738
3	0	1	1	235,6	5,462
4	0	1	1	250,4	5,523
6	0	1	1	343,9	5,840
7	0	1	1	210,2	5,348
8	0	1	1	173,3	5,155
10	0	1	1	312,2	5,744
1	1	0	1	259,6	5,559
2	1	0	1	385,9	5,956
5	1	0	1	212,9	5,361
9	1	0	1	261,4	5,566
11	1	0	1	236,9	5,468
12	1	0	1	232,5	5,449
1	1	1	0	245,7	5,504
2	1	1	0	343,7	5,840
5	1	1	0	186,6	5,229
9	1	1	0	223,8	5,411
11	1	1	0	184,9	5,220
12	1	1	0	244,9	5,501

InAUCRef	InAUCTest	
5,375	5,462	117,440
5,568	5,523	123,011
5,733	5,840	133,935
5,483	5,348	117,315
5,310	5,155	109,522
5,738	5,744	131,818
5,504	5,559	122,896
5,840	5,956	139,130
5,229	5,361	112,144
5,411	5,566	120,490
5,220	5,468	114,222
5,501	5,449	119,897
		730,659

**Cálculos ANOVA**

sumaX2	730,7518541
CT	729,7564572
Sstotal=	0,995396042 <b>SS</b>
Sstot/gj	0,043278128
Vartot	0,043278128

Formulaciones	Periodos	Individuos						
sumaRef	4412,998	sumaP1(0)	4430,835	sumaInd1	4392,862			
sumaFTest	4344,215	sumaP2(1)	4326,55313	sumaInd2	4364,239			
sumaF/n	729,7077125	SumaP/n	729,782328	sumaInd3	729,758			
sumaF/n-CT	0,011255306 <b>SSF</b>	SumaP/n-CT	0,026 <b>SSP</b>	SumaInd4	0,002			n 12
				sumaIntot/2	730,6590			f 2
				sumaIntot-CT	0,9026	0,082051196		s 2
							0,901	0,9026
								SSS+SSC
								p 2

**SSR** 0,0557

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
<b>Interindividual</b>	SSI	n-1	$V_i=SSI/(n-1)$	$V_i/V_r$
Secuencia	SSS	s-1	$V_s=SSS/(s-1)$	$V_s/V_c$
Sujeto/secuencia	SSC	n-s	$V_c=SSC/(n-s)$	$V_c/V_r$
<b>Intraindividual</b>				
Formulaciones	SSF	f-1	$V_f=SSF/(f-1)$	$V_f/V_r$
Periodos	SSP	p-1	$V_p=SSP/(p-1)$	$V_p/V_r$
Residual	SSR	a	$V_r=SSR/a$	
Total	SST	N-1		

**SSR= SST-SSF-SSP-SSI**

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F
<b>Interindividual</b>	0,9026	11	0,0821	14,7290
Secuencia	0,0019	1	0,0019	0,0216
Sujeto/secuencia	0,9006	10	0,0901	16,1669
<b>Intraindividual</b>				
Formulaciones	0,0113	1	0,0113	2,0204
Periodos	0,0259	1	0,0026	0,4644
Residual	0,0557	10	<b>0,0056</b>	
Total	0,9954	23		

**SSR= SST-SSF-SSP-SSI**

n 12  
f 2  
s 2  
p 2

**SD** 0,03047057

# ANEXO E

## Calculo magnitudes adimensionales

Características sustancia	
Solubilidad (mg/mL)	5,00E-02
Dosis (mg)	500
Radio partículas (micras)	10
Densidad g/mL	1,2
Coefficiente Difusión (cm <sup>2</sup> /s)	5,00E-06
Permeabilidad (cm/s)	8,50E-04
Parámetros fisiológicos	
Volumen (mL)	250
Radio intestinal (cm)	1,75
Tiempo de residencia intestinal (h)	3

utilizar el valor mínimo de solubilidad en el ámbito de pH 1.2 a 6.8  
potencia máxima en una unidad de dosificación (FDA) o máxima dosis en una toma en humanos (EMA)

Radio (cm) 0,001

Tdis(h)	0,67
Dn	4,50
Do	40,0
Tabsh(h)	0,57
An	5,25

$$Dn = \frac{Tres}{Tdis}$$

$$Tdis = \frac{\rho \cdot r^2}{3 \cdot D \cdot Cs}$$

$$Do = \frac{Dosis / 250}{Cs}$$

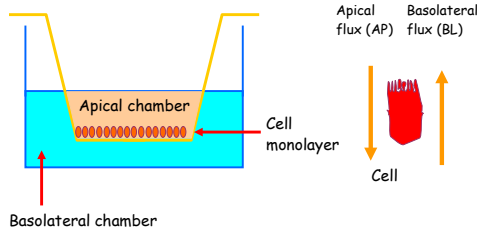
$$An = \frac{Tres}{Tabsh}$$

$$Tabsh = \frac{R_{intest}}{P_{ef}}$$

Fracción absorbida1	1-exp(-2*An)	0,99997
Fracción absorbida2	2*An/Do	0,26
Solubility limited absorbable dose	500*Cs*An	131,14
Maximum absorbable dose MAD	Cs*Ka*Vi*Tsi	131,14
Ka (h <sup>-1</sup> )	2*Peff*3600/R	3,50

# ANEXO F

		$\frac{dQ}{A \cdot dt} = P \cdot (C_{dador} - C_{aceptor})$ sink si $C_{aceptor} < 0.1 C_{dador}$ $\frac{dQ}{A \cdot dt} = P \cdot C_{dador}$ $\frac{Q}{A} = P \cdot C_{dador} \cdot t$				DADOR		ACEPTOR		
Area cm2 A	1,131	Donor Vol mL Vd	0,4							
Receiver Vol mL Vr	1,2	Sample Vol mL Vs	0,6							
		Init Conc. µM Ci	50	Init amount nM M0	20					
time min	time sec	Conc exp. µM	Conc. Theor Donor µM	Amount in receiver nMol	Amount in sample nMol	AccumAmount in sample nMol	AccumAmount in receiver nMol	Crel	sink?	fraction transported
0	0	0	50	0	0	0	0	0		0,000
10	600	2,971	41,087	3,565	1,783	1,783	3,565	0,072		0,069
20	1200	3,83	34,054	4,596	2,298	4,081	6,379	0,112		0,135
30	1800	3,827	28,318	4,592	2,296	6,377	8,673	0,135		0,200
40	2400	3,48	23,618	4,176	2,088	8,465	10,553	0,147		0,264
50	3000	3,03	19,748	3,636	1,818	10,283	12,101	0,153		0,328
60	3600	2,6	16,493	3,120	1,560	11,843	13,403	0,158		0,391
			(M0-Mrceiver)/Vd	Creceiver*Vr	Creceiver*Vs	Accum-ColumF	Mreceiver+Msamples	Creceiver/Cdonor		
		SINK	SINK							
Slope	0,0032	Corrected by Cdonor								dQ/dt=P*C M/C*A
intercept	2,29	0,006								
P	0,990									
Peff cm/s	5,75E-05	1,08E-04								

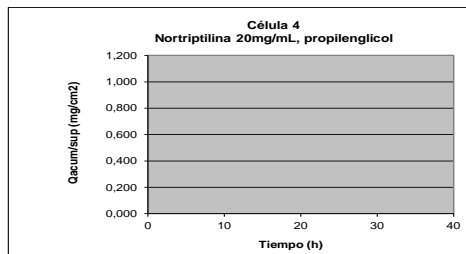
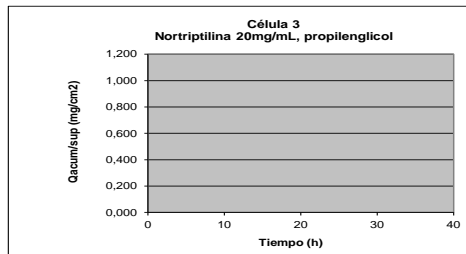
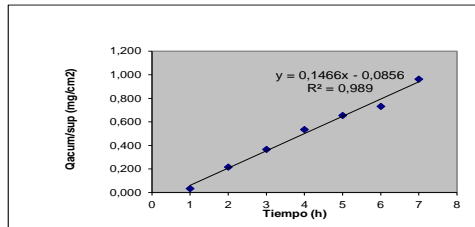




# ANEXO G

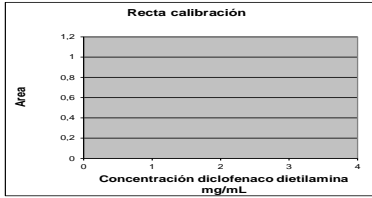
## Nortriptilina 2 mg/mL, piel 500 um espesor

Célula 1		Q acum muestra	Q acum total	sumatorio	2 Concentración inicial (mg/mL)	
Tiempo (h)	C (mg/mL)	Cant(mg)	Cant(mg/cm2)		0,2 vol muestra (mL)	6 vol receptor (mL)
1	0,0045	0,0009	0,034	0,0009	0,784 superficie (cm2)	
2	0,0283	0,0057	0,217	0,0066		
3	0,0468	0,0094	0,367	0,0159		
4	0,0674	0,0135	0,536	0,0294		
5	0,0808	0,0162	0,656	0,0455		
6	0,0880	0,0176	0,731	0,0631	CF (mg/mL)	0,125900889
7	0,1154	0,0231	0,964			
					J (mg/h/cm2)	0,146565468
					Kp (cm/h)	0,073282734



Flujo medio de flujo medio cv(%)  
 #iDIV/0! #iDIV/0! #iDIV/0!

Conc mg/mL	area 1	area 2	area 3	media	sd
0,5					
0,05					
0,001					



TIEMPO	Area 1 cel 1	Area 2 cel 1	Area 3 cel 1	media cel 1	sd cel 1	Conc cel 1
1	2590			2590		
2	15590			15590		
3	29648			29648		
4	149696			149696		
5						
6						
7						
8						
24						
26						
28						
30						
32						

	Area 1 cel 2	Area 2 cel 1	Area 3 cel 1	media cel 1	sd cel 1	Conc cel 1
1	2590			2590		
2	15590			15590		
3	29648			29648		
4						
5						
6						
7						
8						
24						
26						
28						
30						
32						

	Area 1 cel 1	Area 2 cel 1	Area 3 cel 1	media cel 1	sd cel 1	Conc cel 1
1	2590			2590		
2	15590			15590		
3	29648			29648		
4						
5						
6						
7						
8						
24						
26						
28						
30						
32						

	Area 1 cel 1	Area 2 cel 1	Area 3 cel 1	media cel 1	sd cel 1	Conc cel 1
1	2590			2590		
2	15590			15590		
3	29648			29648		
4						
5						
6						
7						
8						
24						
26						
28						
30						
32						

# ANEXO H

## Determinación de la Constante de Velocidad de Absorción de primer orden Metodo de perfusión in situ de Doluisio (Closed Loop)

vol muestra 0,2 mL  
vol inicial 10,9  
vol final 7,5  
vf+muestra 8,7

-0,05492166 3,76718557  
0,00316714 0,0616712  
0,9868729 0,0662455  
300,713235 4  
1,31966991 0,01755387

### Datos

Tiempo (min)	Conc exp (mg/ml)
5	34,9
10	27,4
15	21,0
20	14,8
25	13,5
30	10,9

Vol muestra
10,53
10,17
9,80
9,43
9,07
8,70

k0 0,073

Tiempo (min)	Conc correg (mg/ml)
5	33,74
10	25,52
15	18,91
20	12,84
25	11,26
30	8,72

tiempo (min)	LN ( C )
5	3,52
10	3,24
15	2,94
20	2,55
25	2,42
30	2,17

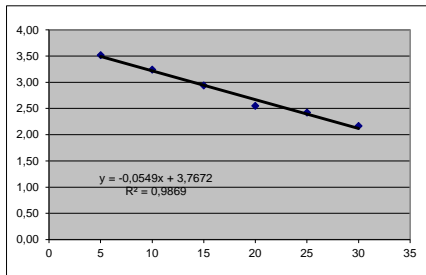
Teoricos (mg/ml)	(T-E) <sup>2</sup>
33,69	0,003
25,27	0,067
18,95	0,002
14,22	1,907
10,66	0,352
8,00	0,515

Estos datos pueden utilizarse para obtener la estimación inicial de Ka por regresión lineal de los logaritmos neperianos de la concentración frente al tiempo

estimacion Ka 0,0549

2,845 Suma de cuadrados.Hacer minima con solv

Ordenada 44,91  
Ka (min) 5,75E-02  
ka (h) 3,45E+00





# ANEXO I

Dosis (mg) 40  
 Fd 3 Factor de dilución  
 Vm (mL) 5,0 Volumen de muestra extraída en tiempo t  
 Vol. Medio (mL) 900 Volumen del medio de disolución

Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto	Tabla de resultados promedio			
									t (min)	% disuelto	DE	CV (%)
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0,0049	0,0146	0,0729	0	13,1149	13,1149	32,7873	5	31,85		
	10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	21,4343	21,5072	53,7680	10			
	15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	29,4119	29,6038	74,0095	15			
	20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553	36,8766	37,2319	93,0797	20			
	30	0,0140	0,0420	0,2100	0,5602	37,8000	38,3602	95,9005	30			
	45	0,0143	0,0429	0,2145	0,7702	38,6100	39,3802	98,4505	45			
	60	0,0148	0,0444	0,2220	0,9847	39,9600	40,9447	102,3618	60			
	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	5	0,0040	0,0120	0,0599	0	10,7737	10,7737	26,9343				
2	10	0,0073	0,0218	0,1092	0,0599	19,6554	19,7153	49,2881				
	15	0,0100	0,0300	0,1500	0,1691	27,0078	27,1768	67,9421				
	20	0,0139	0,0418	0,2089	0,3191	37,5952	37,9143	94,7859				
	30	0,0139	0,0418	0,2089	0,5280	37,5952	38,1232	95,3080				
	45	0,0143	0,0429	0,2147	0,7368	38,6540	39,3908	98,4770				
	60	0,0148	0,0444	0,2219	0,9516	39,9480	40,8996	102,2489				
	0	0	0	0	0	0	0	0				
	5	0,0045	0,0135	0,0674	0	12,1265	12,1265	30,3164				
	10	0,0078	0,0234	0,1170	0,0674	21,0671	21,1344	52,8361				
	15	0,0109	0,0326	0,1628	0,1844	29,3017	29,4862	73,7154				
3	20	0,0138	0,0414	0,2072	0,3472	37,3012	37,6483	94,1209				
	30	0,0146	0,0437	0,2183	0,5544	39,3010	39,8554	99,6386				
	45	0,0148	0,0444	0,2220	0,7728	39,9600	40,7328	101,8319				
	60	0,0148	0,0444	0,2220	0,9948	39,9600	40,9548	102,3869				
	0	0	0	0	0	0	0	0				
	5	0,0053	0,0158	0,0788	0	14,1852	14,1852	35,4630				
	10	0,0090	0,0269	0,1347	0,0788	24,2433	24,3221	60,8053				
	15	0,0128	0,0385	0,1925	0,2135	34,6543	34,8678	87,1695				
	20	0,0135	0,0405	0,2025	0,4060	36,4500	36,8560	92,1400				
	30	0,0136	0,0408	0,2040	0,6085	36,7200	37,3285	93,3213				
4	45	0,0140	0,0420	0,2100	0,8125	37,8000	38,6125	96,5313				
	60	0,0145	0,0435	0,2175	1,0225	39,1500	40,1725	100,4313				
	0	0	0	0	0	0	0	0				
	5	0,0054	0,0146	0,0729	0	13,1149	13,1149	32,7873				
	10	0,0087	0,0238	0,1191	0,0729	21,4343	21,5072	53,7680				
	15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	29,4119	29,6038	74,0095				
	20	0,0131	0,0410	0,2049	0,3553	36,8766	37,2319	93,0797				
	30	0,0139	0,0420	0,2100	0,5602	37,8000	38,3602	95,9005				
	45	0,0144	0,0429	0,2145	0,7702	38,6100	39,3802	98,4505				
	60	0,0148	0,0444	0,2220	0,9847	39,9600	40,9447	102,3618				
5	0	0	0	0	0	0	0	0				
	5	0,0043	0,0146	0,0729	0	13,1149	13,1149	32,7873				
	10	0,0080	0,0238	0,1191	0,0729	21,4343	21,5072	53,7680				
	15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	29,4119	29,6038	74,0095				
	20	0,0136	0,0410	0,2049	0,3553	36,8766	37,2319	93,0797				
	30	0,0144	0,0420	0,2100	0,5602	37,8000	38,3602	95,9005				
	45	0,0148	0,0429	0,2145	0,7702	38,6100	39,3802	98,4505				
	60	0,0150	0,0444	0,2220	0,9847	39,9600	40,9447	102,3618				
	0	0	0	0	0	0	0	0				
	5	0,0043	0,0146	0,0729	0	13,1149	13,1149	32,7873				
6	10	0,0080	0,0238	0,1191	0,0729	21,4343	21,5072	53,7680				
	15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	29,4119	29,6038	74,0095				
	20	0,0136	0,0410	0,2049	0,3553	36,8766	37,2319	93,0797				
	30	0,0144	0,0420	0,2100	0,5602	37,8000	38,3602	95,9005				
	45	0,0148	0,0429	0,2145	0,7702	38,6100	39,3802	98,4505				
	60	0,0150	0,0444	0,2220	0,9847	39,9600	40,9447	102,3618				
	0	0	0	0	0	0	0	0				
	5	0,0043	0,0146	0,0729	0	13,1149	13,1149	32,7873				
	10	0,0080	0,0238	0,1191	0,0729	21,4343	21,5072	53,7680				

# ANEXO J

Dosis (mg)	40
Fd	3 Factor de dilución
Vm (mL)	5,0 Volumen de muestra extraída en tiempo t
Vol. Medio (mL)	900 Volumen del medio de disolución

Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto
	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0,0049	0,0146	0,0729	0	13,1149	13,1149	32,7873
	10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	21,4343	21,5072	53,7680
1	15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	29,4119	29,6038	74,0095
	20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553	36,8766	37,2319	93,0797
	30	0,0140	0,0420	0,2100	0,5602	37,8000	38,3602	95,9005
	45	0,0143	0,0429	0,2145	0,7702	38,6100	39,3802	98,4505
	60	0,0148	0,0444	0,2220	0,9847	39,9600	40,9447	102,3618

# ANEXO K

Ejemplo de cálculo del % disuelto frente al tiempo en aparato tipo 1 o 2 USP SIN reposición de medio tras el muestreo  
Insertar en la columna C los datos de concentración y los cálculos se realizarán automáticamente.

En las hojas 2 a 5 los cálculos están resueltos paso a paso.

Dosis (mg)	40
Fd	3 Factor de dilución
Vm (mL)	5,0 Volumen de muestra extraída en tiempo t

Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Vol medio (mL)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto
	0	0	0	0	0	900	0	0	0
	5	-	-	-	0	900	-	-	-
	10	-	-	-	-	895,0	-	-	-
1	15	-	-	-	-	890,0	-	-	-
	20	-	-	-	-	885,0	-	-	-
	30	-	-	-	-	880,0	-	-	-
	45	-	-	-	-	875,0	-	-	-
	60	-	-	-	-	870,0	-	-	-

Dosis (mg) 40  
 Fd 3 Factor de dilución  
 Vm (mL) 5,0 Volumen de muestra extraída en tiempo t

Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Vol medio (mL)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto
	0	0	0	0	0	900			
	5	0,0049	0,0146	0,0729	0	900			
	10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	895,0			
1	15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919				
	20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553				
	30	0,0153	0,0460	0,2302	0,5602				
	45	0,0153	0,0460	0,2302	0,7904				
	60	0,0153	0,0458	0,2292	1,0206				

Dosis (mg) 40  
 Fd 3 Factor de dilución  
 Vm (mL) 5,0 Volumen de muestra extraída en tiempo t

Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Vol medio (mL)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto
	0	0	0	0	0	900		0	
	5	0,0049	0,0146	0,0729	0	900	13,1149		
	10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	895,0			
1	15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	890,0			
	20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553	885,0			
	30	0,0153	0,0460	0,2302	0,5602	880,0			
	45	0,0153	0,0460	0,2302	0,7904	875,0			
	60	0,0153	0,0458	0,2292	1,0206	870,0			

Dosis (mg) 40  
 Fd 3 Factor de dilución  
 Vm (mL) 5,0 Volumen de muestra extraída en tiempo t

Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Vol medio (mL)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto
	0	0	0	0	0	900		0	0
	5	0,0049	0,0146	0,0729	0	900	13,1149	13,1149	32,7873
	10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	895,0	21,3153	21,3881	
1	15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	890,0	29,0851	29,2770	
	20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553	885,0	36,2620	36,6173	
	30	0,0153	0,0460	0,2302	0,5602	880,0	40,5144	41,0746	
	45	0,0153	0,0460	0,2302	0,7904	875,0	40,2842	41,0746	
	60	0,0153	0,0458	0,2292	1,0206	870,0	39,8887	40,9093	

Dosis (mg) 40  
 Fd 3 Factor de dilución  
 Vm (mL) 5,0 Volumen de muestra extraída en tiempo t

Vaso	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	Vol medio (mL)	Q medio (mg)	Q total (mg)	% disuelto
	0	0	0	0	0	900	0	0	0
	5	0,0049	0,0146	0,0729	0	900	13,1149	13,1149	32,7873
	10	0,0079	0,0238	0,1191	0,0729	895,0	21,3153	21,3881	53,4703
1	15	0,0109	0,0327	0,1634	0,1919	890,0	29,0851	29,2770	73,1925
	20	0,0137	0,0410	0,2049	0,3553	885,0	36,2620	36,6173	91,5432
	30	0,0153	0,0460	0,2302	0,5602	880,0	40,5144	41,0746	102,6864
	45	0,0153	0,0460	0,2302	0,7904	875,0	40,2842	41,0746	102,6864
	60	0,0153	0,0458	0,2292	1,0206	870,0	39,8887	40,9093	102,2733

## ANEXO L

Ejemplo de cálculo del % disuelto acumulado frente al tiempo en aparato tipo 4 USP

Insertar en la columna C los datos de concentración y los cálculos se realizarán automáticamente.

En las hojas 2 a 5 los cálculos están resueltos paso a paso.

Dosis (mg) 32  
 Fd 2  
 Flujo (mL/min)= 8

Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	% disuelto
	0		0			
	5		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	10		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	15		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	20		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	30		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
1	45		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	60		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	90		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	120		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	150		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	180		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	210		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
	240		0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Dosis (mg) 32  
 Fd 2  
 Flujo (mL/min)= 8

Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	% disuelto
1	0	0	0			
	5	0,0020	0,0040			
	10	0,0031				
	15	0,0051				
	20	0,0075				
	30	0,0078				
	45	0,0137				
	60	0,0205				
	90	0,0145				
	120	0,0100				
	150	0,0066				
	180	0,0041				
	210	0,0029				
	240	0,0022				

Dosis (mg) 32  
 Fd 2  
 Flujo (mL/min)= 8

Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	% disuelto
1	0	0	0	0		
	5	0,0020	0,0040	0,1600		
	10	0,0031	0,0062			
	15	0,0051	0,0102			
	20	0,0075	0,0150			
	30	0,0078	0,0156			
	45	0,0137	0,0274			
	60	0,0205	0,0410			
	90	0,0145	0,0290			
	120	0,0100	0,0200			
	150	0,0066	0,0132			
	180	0,0041	0,0082			
	210	0,0029	0,0058			
	240	0,0022	0,0044			

Dosis (mg) 32  
 Fd 2  
 Flujo (mL/min)= 8

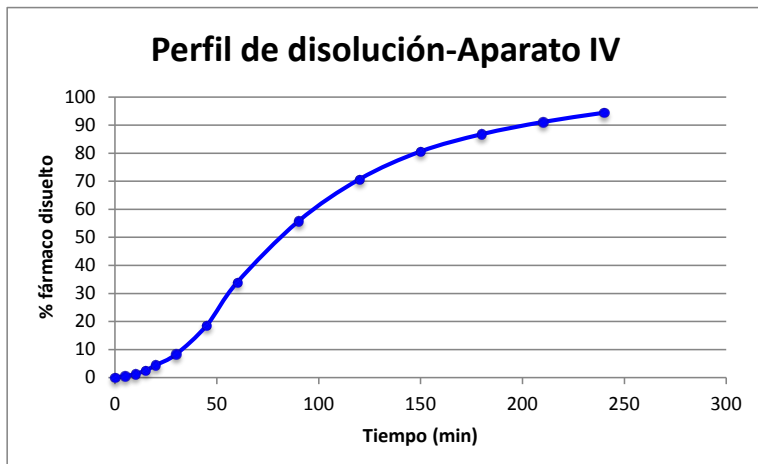
Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	% disuelto
	0	0	0	0	0	
	5	0,0020	0,0040	0,1600	0,1600	
	10	0,0031	0,0062	0,2480		
	15	0,0051	0,0102	0,4080		
	20	0,0075	0,0150	0,6000		
	30	0,0078	0,0156	1,2480		
1	45	0,0137	0,0274	3,2880		
	60	0,0205	0,0410	4,9200		
	90	0,0145	0,0290	6,9600		
	120	0,0100	0,0200	4,8000		
	150	0,0066	0,0132	3,1680		
	180	0,0041	0,0082	1,9680		
	210	0,0029	0,0058	1,3920		
	240	0,0022	0,0044	1,0560		

Dosis (mg) 32  
 Fd 2  
 Flujo (mL/min)= 8

Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	% disuelto
	0	0	0	0	0	0
	5	0,0020	0,0040	0,1600	0,1600	0,5000
	10	0,0031	0,0062	0,2480	0,4080	
	15	0,0051	0,0102	0,4080	0,8160	
	20	0,0075	0,0150	0,6000	1,4160	
	30	0,0078	0,0156	1,2480	2,6640	
1	45	0,0137	0,0274	3,2880	5,9520	
	60	0,0205	0,0410	4,9200	10,8720	
	90	0,0145	0,0290	6,9600	17,8320	
	120	0,0100	0,0200	4,8000	22,6320	
	150	0,0066	0,0132	3,1680	25,8000	
	180	0,0041	0,0082	1,9680	27,7680	
	210	0,0029	0,0058	1,3920	29,1600	
	240	0,0022	0,0044	1,0560	30,2160	

Dosis (mg) 32  
 Fd 2  
 Flujo (mL/min)= 8

Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	Q acum (mg)	% disuelto
	0	0	0	0	0	0
	5	0,0020	0,0040	0,1600	0,1600	0,5000
	10	0,0031	0,0062	0,2480	0,4080	1,2750
	15	0,0051	0,0102	0,4080	0,8160	2,5500
	20	0,0075	0,0150	0,6000	1,4160	4,4250
	30	0,0078	0,0156	1,2480	2,6640	8,3250
1	45	0,0137	0,0274	3,2880	5,9520	18,6000
	60	0,0205	0,0410	4,9200	10,8720	33,9750
	90	0,0145	0,0290	6,9600	17,8320	55,7250
	120	0,0100	0,0200	4,8000	22,6320	70,7250
	150	0,0066	0,0132	3,1680	25,8000	80,6250
	180	0,0041	0,0082	1,9680	27,7680	86,7750
	210	0,0029	0,0058	1,3920	29,1600	91,1250
	240	0,0022	0,0044	1,0560	30,2160	94,4250



# ANEXO M

Ejemplo de cálculo del % disuelto frente al tiempo (sin acumular) en aparato tipo 4 USP Insertar en la columna C los datos de concentración y los cálculos se realizarán automáticamente.

En las hojas 2 a 3 los cálculos estan resueltos paso a paso.

Dosis (mg)                    32  
 Fd                                2  
 Flujo (mL/min)=            8

Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	% disuelto
1	0	0	0	0	0
	5		0,0000	0,0000	0,0000
	10		0,0000	0,0000	0,0000
	15		0,0000	0,0000	0,0000
	20		0,0000	0,0000	0,0000
	30		0,0000	0,0000	0,0000
	45		0,0000	0,0000	0,0000
	60		0,0000	0,0000	0,0000
	90		0,0000	0,0000	0,0000
	120		0,0000	0,0000	0,0000
	150		0,0000	0,0000	0,0000
	180		0,0000	0,0000	0,0000
	210		0,0000	0,0000	0,0000
	240		0,0000	0,0000	0,0000

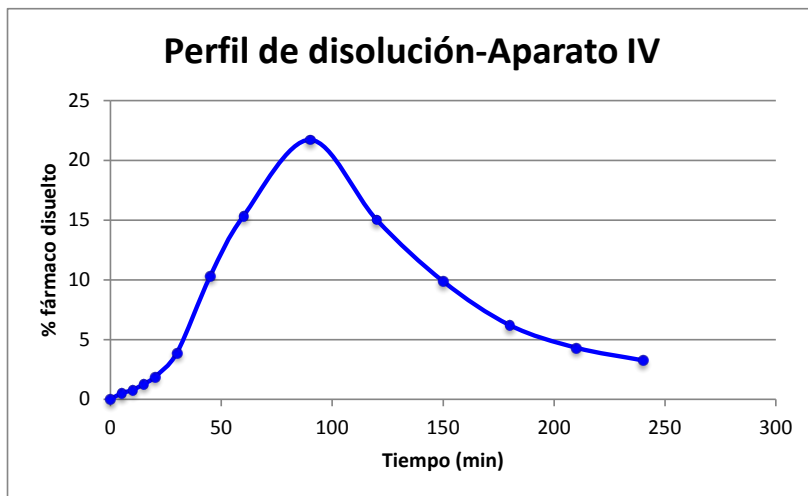
Dosis (mg)                    32  
 Fd                                2  
 Flujo (mL/min)=            8

Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	% disuelto
1	0	0	0	0	0
	5	0,0020	0,0040	0,1609	0,5028
	10	0,0031	0,0063	0,2506	
	15	0,0051	0,0102	0,4080	
	20	0,0075	0,0150	0,6000	
	30	0,0078	0,0156	1,2480	
	45	0,0137	0,0275	3,2997	
	60	0,0205	0,0409	4,9105	
	90	0,0145	0,0290	6,9498	
	120	0,0100	0,0200	4,8094	
	150	0,0066	0,0132	3,1598	
	180	0,0041	0,0083	1,9867	
	210	0,0029	0,0058	1,3818	
	240	0,0022	0,0043	1,0438	



Dosis (mg) 32  
Fd 2  
Flujo (mL/min)= 8

Celda	t (min)	Conc (mg/mL)	Conc correg	Qt (mg)	% disuelto
1	0	0	0	0	0
	5	0,0020	0,0040	0,1609	0,5028
	10	0,0031	0,0063	0,2506	0,7833
	15	0,0051	0,0102	0,4080	1,2750
	20	0,0075	0,0150	0,6000	1,8750
	30	0,0078	0,0156	1,2480	3,9000
	45	0,0137	0,0275	3,2997	10,3114
	60	0,0205	0,0409	4,9105	15,3452
	90	0,0145	0,0290	6,9498	21,7182
	120	0,0100	0,0200	4,8094	15,0295
	150	0,0066	0,0132	3,1598	9,8745
	180	0,0041	0,0083	1,9867	6,2084
	210	0,0029	0,0058	1,3818	4,3180
	240	0,0022	0,0043	1,0438	3,2618



# ANEXO N

t (min)	Referencia	Test	(R-T)^2	SUMA*1/n	E+1	F^(-0,5)	G*100	LOG	$f_2$
5	18,70	31,85							
10	36,54	54,04							
15	52,52	75,14							
20	67,76	93,38							
30	92,19	95,9949							
45	99,13	98,6986							
60	101,18	102,0254							

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

t (min)	Referencia	Test	(R-T)^2	SUMA*1/n	E+1	F^(-0,5)	G*100	LOG	$f_2$
5	18,70	31,85	172,93						
10	36,54	54,04							
15	52,52	75,14							
20	67,76	93,38							
30	92,19	95,9949							
45	99,13	98,6986							
60	101,18	102,0254							

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

t (min)	Referencia	Test	(R-T)^2	SUMA*1/n	E+1	F^(-0,5)	G*100	LOG	$f_2$
5	18,70	31,85	172,93						
10	36,54	54,04	306,32						
15	52,52	75,14	511,84						
20	67,76	93,38	656,51						
30	92,19	95,9949							
45	99,13	98,6986							
60	101,18	102,0254							
		SUMA	1647,61						

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

t (min)	Referencia	Test	(R-T)^2	SUMA*1/n	E+1	F^(-0,5)	G*100	LOG	$f_2$
5	18,70	31,85	172,93	411,90					
10	36,54	54,04	306,32						
15	52,52	75,14	511,84						
20	67,76	93,38	656,51						
30	92,19	95,9949							
45	99,13	98,6986							
60	101,18	102,0254							
		SUMA	1647,61						

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

t (min)	Referencia	Test	(R-T)^2	SUMA*1/n	E+1	F^(-0,5)	G*100	LOG	f <sub>2</sub>
5	18,70	31,85	172,93	411,90	412,90				
10	36,54	54,04	306,32						
15	52,52	75,14	511,84						
20	67,76	93,38	656,51						
30	92,19	95,9949							
45	99,13	98,6986							
60	101,18	102,0254							
		SUMA	1647,61						

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

t (min)	Referencia	Test	(R-T)^2	SUMA*1/n	E+1	F^(-0,5)	G*100	LOG	f <sub>2</sub>
5	18,70	31,85	172,93	411,90	412,90	0,05			
10	36,54	54,04	306,32						
15	52,52	75,14	511,84						
20	67,76	93,38	656,51						
30	92,19	95,9949							
45	99,13	98,6986							
60	101,18	102,0254							
		SUMA	1647,61						

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

t (min)	Referencia	Test	(R-T)^2	SUMA*1/n	E+1	F^(-0,5)	G*100	LOG	$f_2$
5	18,70	31,85	172,93	411,90	412,90	0,05	4,92		
10	36,54	54,04	306,32						
15	52,52	75,14	511,84						
20	67,76	93,38	656,51						
30	92,19	95,9949							
45	99,13	98,6986							
60	101,18	102,0254							
		SUMA	1647,61						

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

t (min)	Referencia	Test	(R-T)^2	SUMA*1/n	E+1	F^(-0,5)	G*100	LOG	$f_2$
5	18,70	31,85	172,93	411,90	412,90	0,05	4,92	0,69	
10	36,54	54,04	306,32						
15	52,52	75,14	511,84						
20	67,76	93,38	656,51						
30	92,19	95,9949							
45	99,13	98,6986							
60	101,18	102,0254							
		SUMA	1647,61						

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

t (min)	Referencia	Test	(R-T)^2	SUMA*1/n	E+1	F^(-0,5)	G*100	LOG	f <sub>2</sub>
5	18,70	31,85	172,93	411,90	412,90	0,05	4,92	0,69	34,60
10	36,54	54,04	306,32						
15	52,52	75,14	511,84						
20	67,76	93,38	656,51			5	18,70		
30	92,19	95,9949				10	36,54		
45	99,13	98,6986				15	52,52		
60	101,18	102,0254				20	67,76		
						30	92,19		
						45	99,13		
						60	101,18		
		SUMA	1647,61						

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

t (min)	Referencia	Test	(R-T)^2	SUMA*1/n	E+1	F^(-0,5)	G*100	LOG	f <sub>2</sub>
5	18,70	31,85	172,93	411,90	412,90	0,05	4,92	0,69	34,60
10	36,54	54,04	306,32						
15	52,52	75,14	511,84						
20	67,76	93,38	656,51						
30	92,19	95,9949							
45	99,13	98,6986							
60	101,18	102,0254							
		SUMA	1647,61						

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[ 1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\}$$

t (min)	Referencia	Test
0	0	0
5	18,70	31,85
10	36,54	54,04
15	52,52	75,14
20	67,76	93,38
30	92,19	95,9949
45	99,13	98,6986
60	101,18	102,0254

