

01092

**UNIVERSIDAD NACIONAL
DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

***CALIDAD BIOFARMACEUTICA DE
COMPRIMIDOS.
ENSAYOS IN VITRO E IN VIVO***

María Guillermina Volonté

1997

*TESIS
No 1092*

(043.2)
TESIS
01092

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1º subsuelo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-697/79 int. 129



DEX-57465

SENAE

Fecha 01-07-05

Inv. 2..... Inv..... B.57465

Lugar de Trabajo:

**CATEDRA DE ENSAYO Y
VALORACION DE MEDICAMENTOS**

Departamento de Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias Exactas (UNLP)

Directora de Tesis:

Dra. María Teresa Pizzorno

Co-Director de Tesis:

Dr. Héctor Martín Chechile

A mi esposo y a mis hijos

AGRADECIMIENTOS

** A la Dra. María Teresa Pizzorno, por su valioso apoyo y colaboración y sobre todo por la confianza que depositó en mí.*

** Al Dr. Chechile, siempre presente con su sabiduría y experiencia.*

** Al personal de la Unidad de Producción de Medicamentos, de la Facultad de Ciencias Exactas, cuyo aporte fue muy importante para concretar la parte experimental del trabajo.*

** A todos los que, en distintas etapas, participaron en este proyecto.*

** Al Colegio de Farmacéuticos de la Provincia de Buenos Aires, a Laboratorios Bagó y a la Universidad Nacional de La Plata, por brindarme el apoyo económico necesario para desarrollar el presente trabajo.*

** A los docentes de mi Cátedra, que me ayudaron a dedicarme, en estos últimos tramos de mi tesis, casi exclusivamente a ella. Gracias, Alicia, Pablo, Patricia, Graciela, Pato y Laura.*

** A Nilda, que desde hace años me alentó y motorizó para terminar este trabajo.*

** A Florencia y Agustina, por su incondicional compañía.*

** A Roberto, ya que sin su permanente estímulo, no hubiera podido saldar esta asignatura pendiente en mi vida.*

INDICE

INDICE

	Página
INTRODUCCION	
Biodisponibilidad	1
Definición de biodisponibilidad	1
Calidad Biofarmacéutica	1
Definición de Biofarmacia	2
Bioequivalencia	2
Cómo medimos la biodisponibilidad?	4
Evaluación de la biodisponibilidad/bioequivalencia	4
Investigación biofarmacéutica	5
Factores que influyen sobre la biodisponibilidad	5
Protocolo de un estudio de biodisponibilidad	7
Parámetros de biodisponibilidad	10
Cronofarmacocinética y biodisponibilidad	11
Análisis estadístico	12

Los outliers	14
Cinética de disolución de medicamentos	14
Clasificación de los modelos de disolución	17
Variables del sistema de disolución	17
Caducidad biofarmacéutica	21
Correlaciones <i>in vitro-in vivo</i>	22
Definición y niveles de correlaciones	26
Como establecer una correlación <i>in vitro-in vivo</i> ?	27
OBJETIVOS	30
PARTE EXPERIMENTAL	31
1. ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD RELATIVA Y BIOEQUIVALENCIA DE COMPRIMIDOS DE PARACETAMOL. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	32
MATERIALES Y MÉTODOS:	
1.1. Estudio de la influencia del aglutinante y del desintegrante sobre la disolución de comprimidos de Paracetamol	33
1.2. Estudios de biodisponibilidad relativa de comprimidos de Paracetamol, utilizando saliva y orina como fluidos biológicos	37
CÁLCULOS Y RESULTADOS:	
1.1. Estudio de la influencia del aglutinante y del desintegrante sobre la disolución de comprimidos de Paracetamol	43

1.2. Estudios de biodisponibilidad relativa de comprimidos de Paracetamol, utilizando saliva y orina como fluidos biológicos	62
DISCUSIÓN:	
1.1. Estudio de la influencia del aglutinante y del desintegrante sobre la disolución de comprimidos de Paracetamol	90
1.2. Estudios de biodisponibilidad relativa de comprimidos de Paracetamol, utilizando saliva y orina como fluidos biológicos	92
2. ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD RELATIVA Y BIOEQUIVALENCIA DE COMPRIMIDOS DE METOCLOPRAMIDA. ENSAYOS <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>	95
MATERIALES Y MÉTODOS	96
CÁLCULOS Y RESULTADOS	102
DISCUSIÓN	123
3. INFLUENCIA DE LA TECNOLOGIA DE ELABORACION SOBRE LA DISOLUCION DE COMPRIMIDOS DE AMPICILINA. ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	125
MATERIALES Y MÉTODOS	126
CÁLCULOS Y RESULTADOS	130
DISCUSIÓN	148

4. INFLUENCIA DEL DESINTEGRANTE SOBRE LA DISOLUCION DE COMPRIMIDOS DE CLORTALIDONA. ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	151
MATERIALES Y MÉTODOS	152
CÁLCULOS Y RESULTADOS	155
DISCUSIÓN	170
5. CONTROL BIOFARMACEUTICO DE COMPRIMIDOS DE CLORHIDRATO DE PROPRANOLOL. ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	172
MATERIALES Y MÉTODOS	173
CÁLCULOS Y RESULTADOS	177
DISCUSIÓN	196
CONCLUSIONES	198
REFERENCIAS	200

INTRODUCCION

INTRODUCCION

BIODISPONIBILIDAD

La **biodisponibilidad** de los medicamentos está considerada actualmente como una de las principales propiedades que hacen a la **calidad** de los mismos, ya que diferencias en la cantidad absorbida y/o en la velocidad de absorción, conducen a rendimientos terapéuticos distintos. (*Aiache et al., 1983*)

Indudablemente este será un problema planteado para aquellos medicamentos que se administren por una vía extravascular, por ejemplo los comprimidos, que requieren de una etapa de absorción, antes de llegar al torrente circulatorio. En cambio podemos considerar que la vía intravascular proporciona biodisponibilidad total, ya que el fármaco se incorpora en su totalidad a la circulación sistémica. (*Arancibia, 1993*)

Es sabido y reconocido que la biodisponibilidad es la característica del medicamento que da idea de la manera en que el principio activo es puesto a disposición del organismo, pero sin prejuzgar la forma en que este organismo va a disponer de él, ni de la forma en que dicho principio activo va a actuar sobre ese mismo organismo.

DEFINICION DE BIODISPONIBILIDAD

Cantidad relativa del medicamento que ha accedido a la circulación sistémica, después de su administración, y velocidad a la cual se ha producido dicho acceso.
(*Academy of Pharmaceutical Sciences*)

CALIDAD BIOFARMACEUTICA

La biodisponibilidad se ha convertido en una garantía farmacéutica, al igual que la pureza y la valoración del principio activo y por lo tanto debe ser objeto de control de su calidad.

Este concepto, relativamente novedoso, de control de calidad, involucra que los criterios estrictamente farmacotécnicos deben supeditarse a los biofarmacéuticos, al emitir un juicio sobre una forma de dosificación. De poco vale que una determinada forma farmacéutica satisfaga las exigencias farmacotécnicas convencionales, si la droga que a ella se incorpora, no se libera a la velocidad y en la cantidad precisa para obtener la respuesta terapéutica deseada. Es decir que se ha originado un nuevo concepto de calidad denominado **calidad biofarmacéutica**, estableciéndose que la efectividad clínica

de un producto farmacéutico no solo es atribuible a la actividad intrínseca del principio activo, sino también a la manera como ha sido formulado. (*Pareja, 1985*)

En la actualidad la ciencia de las formas farmacéuticas es mucho más que una tecnología, que sería una parte del conjunto de conocimientos que abarca el estudio de las relaciones entre la estructura y el comportamiento de los fármacos, ya formulados, en el organismo. En otras palabras: la preparación de un medicamento está supeditada a su aprovechamiento terapéutico. (*Pla Delfina, 1986*)

Así es como, la farmacocinética y la biofarmacia se pueden considerar dos disciplinas cuyo desenvolvimiento y expansión han contribuido notablemente al mejoramiento de la calidad de los medicamentos y a un más apropiado aprovechamiento de sus potencialidades en beneficio del paciente. (*Arancibia, 1981*)

Cuando se administra una droga en una determinada forma farmacéutica, interesa que se absorba de tal manera que el nivel plasmático que se logre caiga dentro de la llamada “franja terapéutica”, es decir, que supere la mínima concentración necesaria para ejercer el efecto terapéutico, pero que tenga efectos adversos mínimos. La dosificación del principio activo y su biodisponibilidad, son los dos elementos que permiten ubicarla dentro de dicha franja terapéutica. (*Rubio, 1992*)

DEFINICION DE BIOFARMACIA

Disciplina fundamental de la Farmacia que estudia la influencia de la formulación sobre la actividad terapéutica de una forma farmacéutica, en otras palabras, estudia la relación entre alguna propiedad física y química del principio activo, su forma de dosificación y los efectos biológicos observados después de su administración. (*Wagner, 1983*)

BIOEQUIVALENCIA

Dos formulaciones, de distinto origen, que presenten la misma biodisponibilidad serán **equivalentes biológicos** ó **bioequivalentes**, esto significa que pueden ser intercambiables en las prescripciones, sin necesidad de modificar el régimen posológico. No será suficiente con regular ciertas variables ligadas al propio medicamento, como son la vía de administración, los caracteres físicos de la droga y la tecnología farmacéutica para obtener medicamentos bioequivalentes, habrá que controlar las características de biodisponibilidad de dichas formulaciones. Este es un problema de actualidad, de gran interés para los profesionales farmacéuticos y médicos, cuya resolución, evaluación, control y proyecciones están lejos de encontrarse completamente resueltos y continúa siendo motivo de preocupación a nivel sanitario. (*Arancibia, 1993*)

La evaluación de la bioequivalencia es, por lo tanto, también, un procedimiento de control de calidad, en el que se compara el desempeño *in vivo* de un producto farmacéutico con respecto a otro considerado de referencia. Los estudios de bioequivalencia tienen por objetivo proteger al paciente de la ineficacia de una forma farmacéutica, asegurando un correcto nivel de calidad, por lo tanto deben ser realizados

de acuerdo a normas previamente establecidas, a protocolos muy bien diseñados y utilizando criterios de aceptación muy bien acordados y definidos.

La Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA) establece que el requisito de bioequivalencia de productos farmacéuticos puede cumplirse por uno ó más de los siguientes procedimientos:

1. Una prueba *in vivo* en humanos.
2. Una prueba *in vivo* en animales que se ha correlacionado con datos *in vivo* en humanos.
3. Una prueba *in vivo* en animales que no se ha correlacionado con datos *in vivo* en humanos.
4. Una prueba *in vitro* que se ha correlacionado con datos *in vivo* en humanos.
5. Una prueba *in vitro* corriente que no se ha correlacionado con datos de biodisponibilidad en humanos.

Para llegar a la conclusión de que dos formulaciones son bioequivalentes se deberá demostrar que ambas no exhiben una velocidad y una extensión de la absorción significativamente diferentes cuando se administran en la misma dosis, bajo condiciones experimentales similares, ya sea en dosis única ó múltiple. Por lo tanto, la bioequivalencia implica la comparación de dos ó más productos en lo referente a su velocidad y magnitud de absorción y para concluir que los mismos son bioequivalentes, habrá que verificar que estos dos importantes parámetros sean similares, aunque se hubieran comprobado equivalencias en los demás ensayos tradicionales de control de calidad.

Podríamos definir tres factores que condicionan la disponibilidad de un medicamento ó de sus metabolitos activos para el receptor ú órgano de destino : (a) la cantidad y la velocidad de cesión del fármaco desde su forma de dosificación y la posterior absorción de aquel cuando se encuentra ya disuelto; (b) el llamado "efecto del primer paso", el cual reduce la fracción de fármaco que llega a la circulación y se produce por metabolización del mismo a nivel de la pared intestinal y del sistema hepatoportal, por lo cual también se lo conoce como eliminación hepática presistémica y afecta considerablemente a aquellos principios activos que son "extraídos" en alto grado por el hígado, como por ejemplo el propranolol, isoproterenol, imipramina y (c) los procesos combinados de unión a las proteínas plasmáticas, fijación a los componentes tisulares, distribución a los distintos fluidos corporales, biotransformación metabólica y excreción por distintas vías. En los estudios de biodisponibilidad se intenta determinar las magnitudes de los dos primeros. En los estudios de bioequivalencia se intenta determinar únicamente la cantidad y velocidad de absorción como magnitudes relativas, pudiéndose desconocer , en términos absolutos, la cantidad de medicamento absorbida a partir del producto patrón. (*Wagner, 1983*)

En general, salvo las administraciones por vía endovenosa ó de uso tópico ó local, para el resto de las formas farmacéuticas se exigen estudios de bioequivalencia. Si existen casos de formulaciones similares, de un determinado principio activo, que han tenido respuestas diferentes ó que se haya demostrado bioinequivalencia, ó cuando el índice terapéutico de la droga es muy estrecho, se impone con mayor razón los estudios de bioequivalencia. También se exigen estos estudios cuando la solubilidad de la droga es

muy baja, cuando el tamaño de partícula es crítico para la velocidad de disolución del principio activo, cuando éste presenta polimorfismo ó cuando la relación entre el principio activo y los excipientes es mayor de 1:5, siempre que estos excipientes puedan interferir con la liberación y posterior absorción del mismo. (*Rubio, 1993*)

Por otra parte, también se exigen los estudios de bioequivalencia cuando la absorción se localiza en un tramo limitado del tracto gastrointestinal, es decir, si existe una ventana de absorción estrecha y localizada. También cuando exista un marcado efecto del primer paso hepático, ó si tenemos vidas medias cortas ó comportamientos farmacocinéticos no lineales. (*Rubio, 1993*)

CÓMO MEDIMOS LA BIODISPONIBILIDAD?

La **biodisponibilidad absoluta** es medida contra una dosis de referencia intravenosa, considerada 100% biodisponible. El método usual es administrar a un grupo de voluntarios por vía intravenosa y por vía oral, por ejemplo, una misma dosis de una determinada droga, según diseños estadísticos preestablecidos, como veremos más adelante con mayor detenimiento. Calculando las concentraciones plasmáticas de la droga, o bien la excreción urinaria de la misma o de un metabolito, se estimará la biodisponibilidad de la formulación oral por simple proporción con la intravenosa. Para ejemplificar esta definición, consideremos que la concentración máxima de una droga administrada oralmente resultó ser del 50% respecto a la intravenosa, la biodisponibilidad de la formulación oral es del 50%. El hecho que sea solamente de un 50% puede ser debido a una incompleta absorción, a un importante efecto del primer paso ó a una combinación de ambos.

EVALUACION DE LA BIODISPONIBILIDAD/BIOEQUIVALENCIA

La **biodisponibilidad relativa** es medida para una formulación de un principio activo, administrado por una determinada vía, por ejemplo oral, respecto a una segunda dosis, también oral, pero de otra formulación considerada de referencia. Comúnmente esta estimación se realiza para nuevos productos genéricos, donde la formulación de referencia es el producto innovador ó líder en el mercado, para esa droga. En estas determinaciones, si la droga esta sujeta a un efecto del primer paso, éste no necesariamente será detectado.

Es decir, que en ambos casos: Biodisponibilidad absoluta y relativa, expresamos a la biodisponibilidad en términos comparativos, ya sea con una administración intravascular ó extravascular.

Está demostrado que la biodisponibilidad de los productos farmacéuticos puede ser muy variable. El problema consiste en determinar si esa variabilidad puede tener una consecuencia terapéutica importante, debido a la producción de síntomas tóxicos ó a la reducción del efecto terapéutico.

Una forma de dosificación de un fármaco es un sistema de liberación del mismo y casi cualquier manipulación que afecte al sistema puede alterar la velocidad de

cesión del fármaco *in vivo*, así como la relación entre cantidad de droga cedida y cantidad efectiva existente en la forma de dosificación original.

INVESTIGACION BIOFARMACEUTICA

La **investigación biofarmacéutica** se inscribe en un contexto que aspira racionalizar, con mayor rigor científico, la etapa del desarrollo de un medicamento, es decir, adaptar óptimamente la vía de administración y la forma galénica a las características farmacocinéticas del principio activo que contiene.

Por ello en los últimos años esta línea de investigación ha centrado sus esfuerzos en optimizar los mecanismos de entrega de los medicamentos al organismo, mediante la búsqueda de nuevos excipientes y tecnologías que permitan modular la cantidad y la velocidad de ingreso de éstos al organismo. Fruto de estos esfuerzos han surgido excipientes modernos entre los cuales se destacan por ejemplo, los excipientes modificados, como el Aerosil ó el Avicel, o como las ciclodextrinas. (*Pezoa, 1994*)

Cuando dentro de este marco que nos brinda la investigación biofarmacéutica emprendemos un estudio de biodisponibilidad de un medicamento, estaremos respondiendo a alguno de estos tres objetivos:

- * Desarrollando una nueva forma farmacéutica ó proponiendo una nueva vía de administración de un principio activo que nos permita asegurar una distribución ideal en el organismo;

- * Controlando su calidad una vez que ha sido desarrollada;

- * Determinando la bioequivalencia entre medicamentos de distinto productor, sin emitir juicio sobre la cantidad de fármaco absorbido ó sobre la cinética de disponibilidad en el organismo de dicho fármaco. La comparación solo se utilizará para determinar la biodisponibilidad relativa del medicamento estudiado respecto a la referencia elegida. (*Aiache et al., 1983; Rubio et al., 1990*)

Este estudio implica, por las derivatizaciones prácticas que pudiera tener, la utilización de diseños experimentales que se aproximen lo más posible a las condiciones reales, por lo cual se impone el uso de voluntarios sanos para llevarlos a cabo. La elección de los mismos deberá ser realizada teniendo en cuenta los riesgos potenciales y los problemas éticos que conlleva la utilización del ser humano como sujeto de análisis, para lo cual se deberán respetar las recomendaciones de entidades tales como la FDA y proceder en concordancia con la Declaración de Helsinki de 1964, revisada en 1975 ó con las "Pautas para la evaluación de medicamentos destinados al hombre", informe de la OMS de 1975.

FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA BIODISPOBILIDAD

También en este punto se deberá tener en cuenta que la biodisponibilidad depende de una serie de factores que pueden resumirse en tres aspectos principales: factores de orden fisiológico, de orden tecnológico ó de formulación y factores externos, es decir, no vinculados con los dos anteriores.

Los **factores fisiológicos** son casi siempre de carácter individual, endógenos, clínicamente poco manejables, ya que en ellos se conjugan aspectos como la edad, estado de salud del individuo, condiciones de reposo, velocidad de vaciado gástrico (influenciada por los alimentos), motilidad gastrointestinal, riego esplácnico, secreción luminal, etc., que son de suma importancia en el momento de la selección de los voluntarios que intervienen en el estudio de biodisponibilidad. (*Cadorniga Carro, 1990*)

En lo que respecta a los **factores de orden tecnológico y de la formulación** en sí misma, de carácter exógenos, serán previsibles y rectificables y por lo tanto, sobre los que el farmacéutico puede actuar, en las etapas de preformulación y diseño, con el objeto de optimizar la formulación, es decir que ésta sea realmente eficaz clínicamente. Dichos factores dependen fundamentalmente del principio activo y de los excipientes, que se agregan a la formulación con distintos propósitos y que frecuentemente conducen a retardar ó favorecer, en mayor ó menor grado, la liberación del fármaco desde la forma farmacéutica, según su naturaleza y cantidad. También hemos mencionado a los factores tecnológicos propiamente dichos, como los métodos de granulación, la fuerza de compresión, etc. Ellos son los que ejercen una enorme influencia en la velocidad de disolución de los fármacos en los fluidos gastrointestinales y es sabido que aquella forma farmacéutica que cede rápidamente su principio activo al medio de disolución, tendrá mayores posibilidades de absorberse, en mejores condiciones, que aquella que la cede en forma lenta ó incompleta y en última instancia será, entonces, más rápidamente disponible para su distribución por la circulación sistémica. (*Cid Cárcamo, 1987*)

La velocidad de disolución de un fármaco en el tracto gastrointestinal humano, a partir de la forma que lo contiene, condiciona frecuentemente la velocidad con que aparece en la sangre, es decir su velocidad de absorción. Ello se debe al hecho de que la mayoría de los principios activos poseen un coeficiente de reparto bastante elevado entre membrana gastrointestinal y fluido intraluminal, lo que unido al gradiente favorable de concentración y a la buena agitación del sistema, se concreta en una transferencia rápida a través de la membrana gastrointestinal desde el instante en que el fármaco ha pasado a la solución en el fluido intraluminal. (*Wagner, 1983*)

Los denominados **factores externos**, que no dependen de la forma farmacéutica, ni son factores fisiológicos ó patológicos, pero que pueden afectar la biodisponibilidad, son numerosos. Muchos de ellos están ligados a hábitos personales o estilos de vida. Factores tales como el ejercicio, el stress, los hábitos alimenticios, consumo de drogas sociales, café, alcohol, tabaco y muchos otros, pueden modificar tanto la cantidad, como la velocidad de absorción de un fármaco administrado.

De todos ellos los **alimentos** pueden ocasionar cambios en la velocidad de absorción o en la cantidad absorbida de un medicamento, cuando se administran simultáneamente. Es decir que, en general, los alimentos alteran considerablemente la biodisponibilidad de los medicamentos y en consecuencia la respuesta farmacológica a los mismos. La repercusión de la interacción alimento-medicamento está determinada, en

primer lugar, por la clase de fármaco utilizado y en segundo lugar por el tipo y la cantidad de alimento ingerido. (*Du Souich et al., 1992*)

Los alimentos pueden influir sobre la absorción por diversos mecanismos:

- * Pueden modificar el pH del contenido gastrointestinal, con lo cual se repercute sobre las velocidades de desintegración y disolución de una forma farmacéutica sólida.
- * Pueden disminuir el vaciado gástrico.
- * Pueden dificultar el contacto del medicamento con la pared intestinal, al acelerar el peristaltismo del intestino y aumentar la viscosidad del medio.
- * Determinadas sustancias, presentes en los alimentos, pueden reaccionar con los medicamentos, convirtiéndolos en productos insolubles e inabsorbibles.
- * Pueden modificar las actividades de oxidación y conjugación de la mucosa intestinal, del hígado o del pulmón, alterando el metabolismo presistémico de determinados medicamentos.
- * Pueden provocar un aumento en el flujo sanguíneo al intestino.

La conclusión de todos estos efectos sobre la biodisponibilidad de un medicamento es variada y difícil de predecir, en unos casos disminuye la velocidad de absorción del principio activo, ejemplos: amoxicilina, metronidazol, paracetamol, etc. (*Welling, 1977; Toothaker y Welling, 1980*); en otros disminuye la cantidad absorbida, ejemplos: ampicilina, trimetoprima, captopril, etc. (*Hoppu et al., 1987; Winstanley y Orme, 1989*) y en un limitado número de casos, la cantidad absorbida aumenta, como en la griseofulvina, nitrofurantoína, carbamacepina y el metotrexate. (*Welling, 1977; Rubio, 1992*) Por otra parte, rara vez la presencia de alimentos aumenta la velocidad de absorción, caso de la difenilhidantoína y la penicilamina (*Osman et al., 1983*), mientras que en la mayoría de los casos no se observan cambios significativos en ambos parámetros, ejemplos: enalapril, ácido mefenámico, glibenclamida, ranitidina, ciprofloxacina, etc. (*Sartor et al., 1982; Hamaguchi et al., 1986; Volonté, 1993*)

PROTOCOLO DE UN ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD

Al decidir iniciar un estudio de biodisponibilidad, como ya hemos señalado, tiene especial importancia un buen diseño del **protocolo** con el cual se va a trabajar. En particular existen tres elecciones fundamentales que hay que considerar y son: la elección de los sujetos, la modalidad de administración y el elemento a analizar, es decir, principio activo inalterado ó sus metabolitos, además de seleccionar el fluido biológico en el cual se irán a monitorear.

Con respecto a los **sujetos**, éstos deberán ser voluntarios y sanos, ya que se conoce muy poco sobre la influencia de la enfermedad sobre la biodisponibilidad y por ello el voluntario sano aparece como el sujeto ideal, capaz de ofrecer una variabilidad mínima durante el estudio. Es sabido que esta variabilidad tanto podrá manifestarse entre los sujetos que participan en el estudio, como en un mismo sujeto en función del tiempo. Se tendrán que establecer estrictos criterios de aceptación de los sujetos teniendo en cuenta estado de salud, análisis bioquímicos, aspectos fisiológicos, edad, peso, sexo, ingesta de otros medicamentos, etc. Homoginizando lo más posible el grupo de sujetos, minimizamos las variabilidades no controladas que inevitablemente se presentarán.

La **forma de administración** del medicamento puede influir considerablemente en los resultados y en su interpretación. Un estudio de biodisponibilidad puede ser realizado luego de una toma única del medicamento ó en un régimen de dosis repetidas. Ambas modalidades presentan ventajas y desventajas. Entre las ventajas de la primera, dosis única, podemos mencionar la rapidez, comodidad y mayor seguridad de los sujetos y entre las desventajas la posibilidad de ofrecer problemas de tipo analítico planteados por las pequeñas cantidades de droga en el organismo.

Además, existe la posibilidad de que algunas drogas presenten resultados con alta variabilidad interindividual y sobre todo intraindividual, lo cual se puede producir por factores fisiológicos, como cambios en el flujo sanguíneo, en el tiempo de tránsito de la droga en el tracto gastrointestinal ó en el clearance, excesivo metabolismo de primer paso ó diferencias individuales en la velocidad y extensión del metabolismo de la droga. Existe un criterio, aceptado ampliamente, que establece como límite para una variabilidad intraindividual, calculada como Coeficiente de Variación (CV), a un 30%. Para drogas que presenten un CV intraindividual mayor del 30% no se recomienda como apropiado un diseño de una dosis única y sí conviene realizarlo con dosis múltiples, ya que esta variabilidad se reduce en los estudios realizados en el estado estacionario de las dosis múltiples, debido probablemente a factores de saturación de los procesos cinéticos no lineales. (*Blume et al., 1993*) Cabe recordar que en los sistemas lineales los procesos cinéticos involucrados son de primer orden, mientras que en los sistemas no lineales existe por lo menos un proceso cinético distinto al orden uno. En los primeros se cumple proporcionalidad entre las concentraciones obtenidas y la dosis administrada, ó más exactamente la fracción de dosis absorbida. En los sistemas no lineales no se cumple esa condición, en cambio sí hay un mayor crecimiento en los niveles obtenidos, que el aumento de la dosis administrada. (*Fagiolino, 1993*)

La modalidad de la dosis repetida tiene como ventaja, además de la mencionada, la mayor acumulación de principio activo en el organismo con sus consiguientes beneficios analíticos, además de representar las condiciones normales de empleo de un medicamento por parte de un ser humano. Sin embargo, la duración del ensayo y los mayores costos económicos y éticos han desaconsejado este diseño, salvo en casos muy justificados. La condición que sí deberá cumplirse es que se produzca un balance de las entradas de droga en el organismo exactamente equilibrado con el de las salidas. Una vez alcanzado este equilibrio ó estado estacionario, el tiempo del estudio se reduce al intervalo entre dos administraciones sucesivas. Para estimar el tiempo requerido para alcanzar dicho estado estacionario, en farmacocinética lineal, es decir, procesos cinéticos de primer orden, se utiliza frecuentemente la semivida de eliminación de la droga ($t_{1/2}$). Es frecuente considerar que por encima de cinco $t_{1/2}$ ya se alcanza el total de la concentración de droga en plasma. (*Chen y Pelsor, 1991*)

Para ciertos fármacos la eliminación no sigue este orden cinético, sino que la depuración de sustancias tiene lugar según un proceso de Michaelis-Menten, como es el caso de la teofilina (*Fagiolino et al., 1994*). Esto implica un patrón de eliminación dependiente de la concentración de fármaco en el organismo, las cinéticas pueden variar entre los órdenes cero y uno. Cuando la concentración de fármaco es alta, la velocidad

de eliminación es de orden cero, cuando los niveles son bajos la velocidad de eliminación pasa a ser de primer orden, es decir proporcional a la concentración de sustancia. (Fagiolino, 1993)

En ambos diseños de administración, la dosis deberá ser tal que no provoque riesgos al sujeto, garantice niveles cuantificables y tenga en cuenta efectos de primer paso. (Birkett, 1991). Cuando el estudio se hace con fines de establecer bioequivalencia entre dos productos de distinta procedencia, el diseño de administración de la dosis deberá ser aleatorio, cruzado y compensado.

Los diseños cruzados emplean grupos de sujetos a los cuales se les administran los productos a estudiar en diferentes períodos. Cada período de administración corresponde a un producto y deberán existir tantos grupos de individuos y períodos como productos en estudio. Los períodos pueden ser semanas ó períodos diferentes que se eligen de acuerdo a la vida media de eliminación del producto. En general entre un período y otro debe existir por lo menos 7 vidas medias de eliminación del fármaco en estudio, para que no exista interferencia con la siguiente administración. (Cid Cárcamo, 1987)

La ventaja en este tipo de diseño cruzado, es que como cada sujeto recibe todos los productos en estudio, puede eliminarse ó sino minimizarse el factor de variación individual en la absorción, ya que cada voluntario actuaría como su propio control.

En lo que respecta a la elección de los **elementos a analizar**, esta decisión dependerá de las posibilidades experimentales y de algunas hipótesis farmacocinéticas que influirán en la interpretación de los resultados. En general se recurre a la valoración del principio activo inalterado ó en su defecto a uno de sus metabolitos, preferentemente aquel que cuantitativamente sea más importante. Cuando se opta por esta alternativa se deberá controlar que se cumpla la hipótesis de linealidad entre el tránsito cuantitativo del metabolito y el del principio activo. El control de esta hipótesis se logra demostrando la proporcionalidad de las concentraciones plasmáticas de metabolito a distintas dosis del principio activo .

La **técnica de análisis** seleccionada para realizar el monitoreo de algunos de estos elementos alternativos, debe ser tal que reúna primordialmente las siguientes características : sensibilidad, precisión y selectividad, no siendo tan imperiosa la exactitud. En general los métodos cromatográficos son los más aceptados. También se usan en ocasiones, los métodos inmunoquímicos, aunque éstos reaccionan en forma cruzada con los metabolitos por lo que los valores obtenidos son superiores, otros serían los bioensayos microbiológicos, sobre todo para antibióticos. En todos los casos el método seleccionado tendrá que ser adecuadamente validado. (Albónico, 1976)

En cuanto al **fluido biológico** tanto podrá ser sangre, orina, como saliva, esta última no aceptada todavía a nivel de las Agencias Regulatorias de Medicamentos, pero de obvias ventajas éticas, al igual que la orina, por no involucrar recolección de muestras invasivas, como la primera (Gorodischer et al., 1994; Vázquez et al., 1993).

Hay numerosas investigaciones que avalan la buena correlación entre niveles salivales y plasmáticos de distintos fármacos. (Fagiolino *et al.*, 1996) Sin embargo existen también reportes sobre variaciones en los cocientes de niveles saliva/plasma (S/P) para determinadas drogas, adjudicando estas oscilaciones a los períodos en los que ocurre absorción del fármaco. (Obach *et al.*, 1988) Este fenómeno induce a que, al evaluar la bioequivalencia entre dos medicamentos de distinto origen, cuyos mecanismos ó tiempos de absorción pueden ser distintos y por lo tanto presentar altos y distintos cocientes S/P, se tomen precauciones especiales en el protocolo de muestreo, el cual debe ser muy intenso y a cortos intervalos de tiempo, a los efectos de que ambas formulaciones estén correctamente evaluadas en forma casi continua. (Fagiolino *et al.*, 1988; Vázquez *et al.*, 1992) De esta manera, los cocientes S/P pueden ser muy útiles para evidenciar fenómenos de absorción, constituyendo un buen indicador del perfil de liberación *in vivo* de un fármaco. (Fagiolino, 1990)

Por otra parte, no todas las drogas pueden ser cuantificadas en este fluido, ya que el grado de difusión de las mismas hacia la saliva, en concentraciones detectables y cuantificables, puede no ser muy importante. Sí, es adecuado este fluido para la detección de muchos principios activos, como por ejemplo cafeína (Suzuki *et al.*, 1989), sales de litio (Needham *et al.*, 1979; Obach *et al.*, 1988), fenitoína (McAuliffe *et al.*, 1977; Vázquez *et al.*, 1992), carbamazepina (Gorodischer y Koren, 1992; Vázquez *et al.*, 1992), fenobarbital (McAuliffe *et al.*, 1977; Gorodischer y Koren, 1992), teofilina (Chung y Shim, 1987; Fagiolino *et al.*, 1988; Levy *et al.*, 1994), digoxina (Allonen *et al.*, 1978), paracetamol (Van Bommel *et al.*, 1991; Fagiolino y Vázquez, 1993; Retaco *et al.*, 1996), entre otros.

En el caso de realizar el seguimiento urinario del principio activo, se deberá verificar otra hipótesis farmacocinética, como es la linealidad de la relación entre los fenómenos observados antes y después del riñón, ya que la posible intervención de mecanismos enzimáticos en la formación de la orina, excreción tubular activa, pueden alterar dicha linealidad. No ocurrirá esto en el caso de moléculas que no sufren esta excreción activa, debido al carácter pasivo de la filtración glomerular y de la reabsorción tubular de sustancias exógenas.

La sangre continúa siendo el material biológico analizable de preferencia, ya que es el principal fluido encargado de la distribución de las sustancias hacia todos los tejidos del organismo. No por ello debemos descartar otros fluidos biológicos de rápido equilibrio con la sangre, para la monitorización de las drogas en estudio.

PARAMETROS DE BIODISPONIBILIDAD

En la evaluación de la biodisponibilidad y/o en el establecimiento de la bioequivalencia de productos medicamentosos, los parámetros que más comúnmente se estiman son : el área bajo la curva de niveles de droga en el organismo (ABC), que puede calcularse desde tiempo cero a tiempo t , donde t es el último tiempo medido, ó puede determinarse hasta tiempo infinito, como $ABC_{0-\infty} = ABC_{0-t} + Ct/Ke$; la concentración máxima ($C_{máx.}$) ; el tiempo de máxima concentración ($T_{máx.}$) ; el tiempo medio de residencia (MRT) (Khoo *et al.*, 1985) ; la constante de velocidad de

eliminación (K_e) ; el tiempo durante el cual la concentración se mantiene por encima de un determinado porcentaje de la $C_{m\acute{a}x.}$, por ejemplo del 50% ($T_{50\%}$), todos ellos calculados en diseños de una sola dosis.

La cantidad máxima excretada por orina (E_{∞}) ; la velocidad máxima de excreción ($dE/dt_{m\acute{a}x.}$) y el tiempo de máxima velocidad ($t_{m\acute{a}x.}$), son calculados cuando utilizamos datos urinarios. (*Prandi y Fagiolino, 1993*) La velocidad de excreción en función del tiempo nos dá un gráfico que es practicamente igual a lo que sucede a nivel plasmático, porque los mecanismos de eliminación urinaria, son generalmente de primer orden y dependientes de la concentración plasmática, de tal manera que a mayor concentración plasmática, mayor eliminación urinaria. (*Rubio, 1993*)

En estudios de dosis múltiples se utilizan el área bajo la curva desde tiempo cero a tiempo τ , en el estado estacionario: ($ABC_{0-\tau}$)_{ss}, siendo τ el intervalo de dosificación ; la concentración máxima en el estado estacionario ($C_{ssm\acute{a}x}$) ó la concentración mínima en dicho estado ($C_{ssm\acute{i}n}$) ; el $T_{m\acute{a}x}$; la concentración media de droga en el estado estacionario, $C_{ssav} = ABC_{0-\tau}/\tau$; el grado ó índice de fluctuación ó fluctuación “peak-trough” (PTF), en el estado estacionario : $PTF = (C_{ssm\acute{a}x} - C_{ssm\acute{i}n})/C_{ssav}$ (*Arancibia, 1993*)

Para disminuir errores en la determinación de estos parámetros el número de muestras y por lo tanto el tiempo de muestreo, debe ser tal que el intervalo entre muestra y muestra sea muy pequeño.

De los distintos parámetros enunciados algunos son funciones complejas de los dos aspectos, cinético y cuantitativo, de la biodisponibilidad, por ejemplo la $C_{m\acute{a}x.}$, mientras que otros son indicadores de uno solo de estos aspectos, por ejemplo el ABC, parámetro de intensidad ó el $T_{m\acute{a}x.}$, parámetro de velocidad.

CRONOFARMACOCINETICA Y BIODISPONIBILIDAD

Se ha demostrado que hay una cierta variación circadiana, ya sea en parámetros farmacocinéticos como en el propio efecto farmacológico, en muchos fármacos, por lo cual se debe tomar muy en cuenta el factor cronofarmacocinético al diseñar un estudio de biodisponibilidad.

La **cronofarmacocinética** trata de los cambios en los parámetros farmacocinéticos que se producen en función del tiempo en que es administrado un determinado fármaco. Algunas de las funciones fisiológicas que presentan ritmo circadiano y que por lo tanto pueden influir sobre la biodisponibilidad, son: la temperatura corporal, la presión sanguínea, la secreción de ácido clorhídrico, la velocidad de vaciado gástrico, la concentración de proteínas plasmáticas, la actividad de las enzimas hepáticas, la velocidad de filtración glomerular, el pH urinario, etc.

En relación a este tema los estudios existentes son relativamente escasos. El grupo de fármacos más estudiados es el de los analgésicos y antiinflamatorios. Se han

informado cambios circadianos en el paracetamol (*Shively y Vesell, 1985*), aspirina (*Markiewick y Semenowicz, 1985*) e indometacina (*Clench, 1985*), entre otros.

El factor cronofarmacocinético implica realizar los estudios farmacocinéticos a la misma hora y con un grupo de voluntarios homogéneos, es decir, del mismo sexo, de pesos y edades similares. A esto habría que agregar la uniformidad en algunos aspectos tales como los periodos de actividad-reposo, horarios habituales de ingesta de alimentos y tipo de trabajo. (*Thielemann, 1992*).

ANALISIS ESTADISTICO

Los estudios biofarmacéuticos suponen, según lo antedicho oportunamente, realizar el ensayo en varios sujetos, tras lo cual se extraerá una conclusión estadística ya sea de biodisponibilidad ó bien de bioequivalencia, para lo cual se deberán fijar algunos requisitos, como ser: normal distribución e igualdad de varianzas, entre las distintas series de datos que se han extraído del ensayo. De acuerdo a las conclusiones que obtengamos aplicaremos los clásicos test estadísticos paramétricos, de hipótesis, en los cuales la hipótesis nula será que no hay diferencias significativas entre las formulaciones ensayadas, como el t-Student ó el ANOVA ó no paramétricos, como el test de Wilcoxon ó el test de Mann-Whitney. (*Steinijans y Diletti, 1983*)

Está ampliamente reconocido que un estudio de bioequivalencia no puede finalizar verificando la existencia de diferencias significativas ó no, entre dos formulaciones ensayadas, ya que éstas pueden diferir, sobre todo teniendo en cuenta la infinidad de variables que pueden afectar a dos medicamentos de distinto laboratorio productor. También puede existir falta de precisión analítica y/o heterogeneidad del grupo de sujetos participantes del estudio, todo lo cual puede llevar a sacar conclusiones erróneas. El tema radica en que, estadísticamente el encontrar una diferencia significativa no nos aporta demasiado al establecimiento de una bioinequivalencia, ya que es más importante establecer si esas diferencias son importantes, clínica ó terapéuticamente hablando. Dicho de otra manera, la significación estadística, como la que se obtiene mediante un ANOVA, es una función de la verdadera diferencia entre las formulaciones y la precisión del ensayo. Esta última está influenciada por el número de sujetos empleados en el estudio y por la variabilidad de los datos. Así por ejemplo puede encontrarse significación estadística a $p < 0.001$ para dos ABC promedios, aunque clínicamente esta diferencia no resulte importante. Alternativamente puede utilizarse un grupo escaso de sujetos, ensayar dos formulaciones, obtener la misma respuesta, que no resulta significativa, en este caso $p > 0.05$, y concluir que no hay diferencias entre ambas. Sin embargo, la variabilidad puede ser grande y se estaría aceptando una solución como correcta cuando en realidad no lo es. Por ello, lo que corresponde es establecer un **intervalo de confianza**, que nos indique en cuánto pueden diferir parámetros que reflejan el comportamiento de las formulaciones ensayadas, es decir, habrá que calcular la probabilidad de observar el apartamiento de ambos productos de un rango preestablecido. (*Fagiolino, 1994; Steinijans y Diletti, 1983*). Este es el rango de aceptación de bioequivalencia, establecido por las Oficinas Regulatorias y que por lo general es de $\pm 20\%$, el cual tiene en cuenta razones técnicas y de seguridad para el

paciente. Cuando se utilizan transformaciones logarítmicas de los datos, el rango se extiende entre 80% y 125%. (USP 23)

Estos intervalos de confianza pueden ser calculados de distintas maneras: intervalos de confianza simétricos ó de Westlake, de la hipótesis intervalar, de Schuirman, de Anderson, etc. (Westlake, 1973; Steinijans y Diletti, 1983) En cualquiera de los casos el procedimiento involucra el cálculo de un intervalo de confianza del 90%, para la relación entre variables farmacocinéticas medias del producto test y de la referencia y luego verificar si cae dentro del rango predeterminado. Para ampliar la información que brindan los intervalos de confianza, diversos autores han desarrollado estimaciones de tipo bayesiano de los intervalos de confianza, construyendo histogramas en los que se representan, en gráficas de barras, la probabilidad en ordenadas y los diferentes intervalos considerados, en abcisas. (Fagiolino, 1994; Fluehler et al., 1983)

En todas las pruebas de decisión anteriormente descriptas el análisis conducirá a tomar una determinación de bioequivalencia promedio entre dos formulaciones. Sin embargo, esta conclusión promedio puede no ser tal, cuando se analiza individuo por individuo, es decir podrá no llegarse a una bioequivalencia individual. A este respecto existe una regla de decisión denominada 75/75, propuesta por la FDA, en donde se consideran bioequivalentes dos formulaciones, cuya equivalencia promedio se verificó, si no menos del 75% de los individuos del estudio presentan una bioequivalencia comprendida entre 0.75 y 1.25 de la correspondiente a la formulación de referencia. (Cabana, 1983) Existen objeciones estadísticas a esta regla que la convierten en una herramienta discutible, siendo más aceptada la regla de decisión del 20%, apoyada en el uso de intervalos de confianza. (Haynes, 1981; Cadórniga Carro, 1992; Fagiolino, 1994)

En un estudio de bioequivalencia realizado con un genérico de diazepam, donde se utilizó Valium®, como producto de referencia, se trabajó con veintiseis voluntarios sanos que recibieron una dosis de 10 mg de principio activo, según un diseño cruzado y aleatorizado. (Locniskar et al., 1989) Aunque tanto el genérico como la referencia se habían comportado equivalentemente en la disolución *in vitro*, en medio de ácido clorhídrico 0.1 N, según condiciones de USP, la preparación genérica se disolvía menos y más lentamente en una buffer de acetato 0.05 N pH 4.5. En el estudio *in vivo*, el genérico presentaba una menor disposición a la circulación general, con valores medios de C_{max} y ABC menores que para la referencia, y de T_{max} significativamente mayor, estadísticamente comparados mediante análisis de varianza. Sin embargo los resultados satisfacían la regla 75/75. A pesar de ello, los autores concluyeron que en base a los criterios regulatorios ambas formulaciones no eran bioequivalentes y que dicha bioinequivalencia no podía predecirse utilizando el test de disolución oficial, pero sí lo podría hacer en base a su comportamiento de disolución a pH 4.5, sugiriendo que la disolución en medio ácido no era concordante con las condiciones de disolución *in vivo*.

Como otro ejemplo de análisis de bioequivalencia podemos citar el trabajo realizado sobre tres formulaciones orales de ácido pipemídico. Las mismas consistieron en dos lotes de cápsulas, de gelatina rígida, de distinto productor y una suspensión acuosa. El estudio se planteó como ensayo cruzado, con la participación de seis

voluntarios sanos a los que se administró en ayunas las formulaciones objeto de ensayo. Se realizó el seguimiento de la droga tanto por plasma como por orina. Los parámetros farmacocinéticos calculados fueron: constante de eliminación, cantidades máximas excretadas y tiempo medio de residencia (MRT) . Al aplicar el correspondiente análisis de varianza a estos parámetros se encontraron diferencias significativas, por lo cual afirmaron su bioinequivalencia. (*Cadorniga Carro et al., 1989*)

LOS OUTLIERS

En todo estudio de biodisponibilidad/bioequivalencia hay que considerar la presencia de los denominados "outliers", que están definidos por la USP como los sujetos que en un estudio de este tipo, presentan valores discordantes de uno ó más parámetros farmacocinéticos, cuando se los compara con otros valores del mismo estudio. Debido a que los estudios son llevados a cabo con diseños cruzados, el más importante tipo de outlier es cuando uno ó muy pocos sujetos difieren notablemente del resto de los sujetos en la respuesta al producto test versus la respuesta al producto de referencia. La existencia de un outlier puede ser indicativo de los siguientes problemas con dos formulaciones intercambiables:

* El sujeto produce una inusual respuesta, alta ó baja, con uno ó con el otro de los productos ensayados, debido a un problema con la propia forma de dosificación administrada.

* El sujeto puede ser representativo de un tipo de sujetos, presentes en la población general en menor número, para quién la biodisponibilidad relativa de los dos productos es marcadamente diferente que para la mayoría de la población, y para quién los dos productos no son bioequivalentes a pesar de que sí lo son para la mayoría de la población.

Es decir que los outliers son individuos atípicos que se salen del pool de observaciones. Deben ser identificados a través de test estadísticos y eliminados con una sólida justificación. (*USP 23*). Si bien hay autores que proponen, a través de la utilización de métodos estadísticos robustos, no paramétricos, no descartar los outliers, sino incluirlos en el estudio, penalizándolos adecuadamente para que no distorsionen el resultado final. Al utilizar métodos paramétricos clásicos, los outliers hacen que el método pierda eficiencia y no logre demostrar bioequivalencia, aún cuando las formulaciones produzcan perfiles plasmáticos similares para todos los demás sujetos. Los outliers tienen mucha influencia sobre los métodos paramétricos, en cambio los métodos no paramétricos son menos sensibles a la influencia de los mismos. (*Niselman et al., 1996*)

CINETICA DE DISOLUCION DE MEDICAMENTOS

De todos los medicamentos que se expenden en el mercado, ha sido en el campo de las formas farmacéuticas sólidas para uso oral, donde se han llevado a cabo el mayor número de investigaciones biofarmacéuticas, debido a que por su comodidad y facilidad de ingesta, son las formas farmacéuticas de mayor empleo en terapéutica. Pero también son las que mayores problemas de disponibilidad pueden presentar, ya que para llegar a la circulación sistémica, primeramente tendrán que desintegrarse, para luego

disolverse, y recién absorberse. Si el principio activo puede atravesar sin dificultades las membranas biológicas y la disolución es el proceso más lento, comparado con la absorción, será ésta la etapa limitante del proceso completo. (Pezoa, 1994)

Regulando las características cinéticas del proceso de disolución de un principio activo, desde su forma de dosificación, es posible controlar la cinética del proceso de absorción, lo que finalmente permitirá regular la evolución plasmática del principio activo en el organismo, es decir, su biodisponibilidad. Por este motivo, en los últimos años la **cinética de disolución de medicamentos** ha suscitado gran atención a los investigadores biofarmacéuticos. Así es como ha existido gran interés en conocer los factores de los cuales depende el proceso de disolución, así como la correlación de los resultados de estas experiencias con parámetros *in vivo*, con el objeto de obtener datos precisos que puedan ser utilizados en el control de calidad en la industria farmacéutica y aseguren la disponibilidad biológica del fármaco en el lugar de absorción, para lo cual se han incluido normas y técnicas al respecto en textos oficiales, que regulan el control de calidad de los productos medicamentosos. (Aiache et al., 1986; Cid Cárcamo, 1981)

Los objetivos de un test de disolución son: poder confirmar que la cantidad total de droga liberada esté tan cercana como sea posible del contenido total de droga en la forma farmacéutica y que la velocidad de liberación sea reproducible dentro y entre diferentes lotes de un mismo producto, y que a su vez sea la misma que la del producto innovador ó líder, el cual fue perfectamente biodisponible y clínicamente efectivo.

Resulta evidente la necesidad de establecer métodos de control *in vitro* que permitan evaluar las características de disolución de un fármaco desde su forma farmacéutica en un medio de disolución apropiado. Hasta el momento no ha sido posible establecer ninguna prueba *in vitro*, por perfeccionada que sea, que permita describir con plena seguridad el comportamiento de los productos farmacéuticos en el organismo humano. Por lo tanto, no puede considerarse a los **ensayos de disolución *in vitro*** como estudios de biodisponibilidad por sí solos. Pero pueden servir como métodos predictivos de la biodisponibilidad de diferentes productos farmacéuticos, si previamente se ha logrado establecer una correlación directa con los resultados obtenidos *in vivo*, que darán validez al modelo de estudio *in vitro*. En estudios de bioequivalencia, si bien no contribuyen a la toma de decisión, pueden aportar un complemento sumamente valioso. De este modo, los estudios de disolución *in vitro* representan una herramienta muy útil para caracterizar el comportamiento biofarmacéutico de diferentes lotes de producción de un mismo producto. (Carli et al., 1982)

Es decir que la forma de dosificación controla el régimen de entrada de la droga al organismo y la curva de concentración plasmática versus tiempo puede modularse para dar la forma deseada, cambiando el perfil de liberación de la forma de dosificación. Esta es ciertamente la meta de las formas farmacéuticas de liberación prolongada, en estos casos es razonable que se espere obtener una correlación *in vitro-in vivo*. En cambio si la disolución *in vivo* es mucho más rápida que la absorción, esta última será la etapa limitante del proceso de aparición de la droga en el organismo. En estos casos, por ejemplo, una forma de dosificación de liberación inmediata de una droga

muy soluble, es altamente improbable que exhiba una correlación entre los resultados de disolución *in vitro* e *in vivo*. (Skough et al., 1996)

El desarrollo de una forma farmacéutica no deberá apoyarse sobre los ensayos *in vivo*, al menos en su estado inicial. Los estudios de disolución y absorción *in vitro* aparecen como una necesidad de investigar métodos de estandarización secundaria de la biodisponibilidad, debido a las dificultades técnicas y al elevado costo de estos estudios, que limitan su multiplicación y reservan su utilización para finalidades precisas e importantes.

La validez y limitaciones de las pruebas *in vitro* en los estudios de biodisponibilidad han sido abordadas por distintos autores. Cabana en su artículo de revisión sobre pruebas *in vitro* y bioequivalencia en medicamentos, aporta datos de correlaciones *in vitro-in vivo* en determinadas sustancias y concluye que las pruebas de disolución *in vitro* pueden orientar sobre la bioequivalencia de los distintos lotes de una misma formulación. También sobre el mismo tópico aparecen otros trabajos en la literatura científica. (Steinijans et al., 1988) De la misma opinión son Riegelman y Upton, para los que las pruebas de disolución *in vitro* tienen una importancia sobresaliente en el desarrollo de formas farmacéuticas. (Cadorniga Carro, 1992)

Las condiciones del ensayo de disolución deben evaluarse minuciosamente, u optimizarse, cuando se disponen de datos de biodisponibilidad para varias formulaciones. La meta de la optimización es identificar condiciones de ensayo que provean la capacidad de discriminación máxima y la variabilidad mínima entre formulaciones que difieren en variables de fabricación clave. Un ensayo que cumple con este objetivo tendrá la más alta posibilidad de correlacionarse con la biodisponibilidad *in vivo*. En los estudios de optimización, la composición del medio (pH, fuerza iónica, concentración de agentes tensioactivos) y la hidrodinámica (tipo ó agitación del aparato) se modifican para determinar sus efectos sobre el régimen de disolución de lotes de comprimidos seleccionados. Usualmente se seleccionan para estos estudios, dos ó tres lotes que exhiben diferencias en la absorción *in vivo*, si se conocen, ó lotes que varíen en composición de la formulación ó en parámetros de fabricación. (Skough et al., 1996)

Muy interesantes resultan las investigaciones realizadas con el fin de establecer un test de disolución *in vitro*, que simule las condiciones de absorción *in vivo*, bajo condiciones de ayuno y de no ayuno, es decir, en presencia de una dieta rica en grasas. (Maturu et al., 1986; Aiache et al., 1989) La propuesta consiste en dejar en contacto y agitando, la forma farmacéutica durante dos horas, con un volumen pequeño de aceite de maní, aproximadamente 10 ml, al cabo de este tiempo se elimina el aceite y se procede a realizar el test de disolución en un medio que incremente su pH, partiendo de fluido gástrico simulado de pH 1.2 hasta fluido intestinal simulado con pH final de 7.5. La simulación del estado de ayuno se consigue en las mismas condiciones pero obviando el contacto con el aceite de maní. Este método fue aplicado a tres formulaciones de liberación controlada de teofilina, y sus resultados correlacionados con un estudio *in vivo*, administrando las formulaciones a voluntarios sanos, simultáneamente con un desayuno rico en grasas y cuatro horas antes de un desayuno standard. Esta correlación concluye con la posibilidad de aplicar este test *in vitro*, para evaluar de una

manera más simple, la complejidad de la absorción gastrointestinal en humanos expuestos a una dieta de alto contenido en grasas.

CLASIFICACION DE LOS MODELOS DE DISOLUCION

Es conveniente clasificar los modelos utilizados en estudios de disolución de acuerdo a la forma como participa el solvente en el proceso de disolución, (Pezoa et al., 1991), de esta manera, podemos enumerar tres grupos:

* *Sistemas de un compartimento cerrado*, donde generalmente se usan grandes volúmenes de líquidos no fisiológicos, que están disponibles para el proceso durante todo el tiempo.

* *Cámaras abiertas de flujo continuo*, que emplean también grandes cantidades de líquidos, pero solo una pequeña cantidad de ellos, similar al volumen presente en el tubo gastrointestinal, es la que realmente participa en el proceso de disolución. En estos modelos es muy importante la velocidad de flujo del líquido a través de la cámara.

* *Modelos de difusión y de diálisis*, donde la sustancia disuelta pasa a través de una membrana o una capa divisoria al interior de un segundo compartimento. (Northern et al., 1973; Razdan y Rastogi, 1990). El problema principal de este modelo es la composición y el área superficial de la membrana, de los cuales depende la permeabilidad.

VARIABLES DEL SISTEMA DE DISOLUCION

En un ensayo de disolución son muchas las variables que pueden modificar los resultados experimentales, ninguna de ellas debe dejar de considerarse y deben mantenerse bajo un estricto control para obtener resultados confiables. (Pezoa et al., 1991). Se pueden clasificar en:

1. *Variables dependientes del equipo de disolución*, como la geometría y la vibración del sistema, la velocidad de agitación, la temperatura, la posición vertical de la paleta ó del canastillo, la posición de muestreo, etc. (Kaneniwa y Watari, 1974; Langenbucher, 1974; Benzina et al., 1983)
2. *Variables dependientes del medio de disolución*, como el volumen, la presencia de gases, el pH, la evaporación del líquido, etc. (Sarapu y Clark, 1980)
3. *Variables relacionadas con la metodología analítica*, como el método de filtración de las muestras y el método analítico en sí mismo.

Con respecto a las variables dependientes del equipo de disolución, resulta interesante analizar los resultados encontrados al comparar el comportamiento de disolución de tabletas conteniendo doxiciclina, utilizando el método de la canastilla y el de la paleta, a distintas velocidades de rotación, 75 y 100 rpm, y a distintas alturas del dispositivo rotatorio, canastilla ó paleta, respecto al fondo del vaso de disolución, 2.5 y 4.5 cm. De acuerdo a los resultados, la posición de la canastilla no afecta la velocidad de disolución de la droga, mientras que la alta velocidad de rotación, aumenta significativamente la misma. En cambio el aparato que utiliza paleta es más sensible a la posición de la altura, especialmente a altas velocidades de rotación. (Posti y Salonen, 1983)

En otro trabajo realizado con tabletas de tolbutamida, se estudiaron las características de disolución de dos lotes que provienen de distintos elaboradores. Las muestras fueron evaluadas mediante el método del canastillo rotatorio y el método de la paleta. Mientras que todos los lotes pasaron exitosamente los controles de desintegración, variación de peso, contenido de droga y uniformidad de contenido, se observó una gran variabilidad inter e intra lote respecto a su comportamiento de disolución, no cumpliendo, en algunos casos, con las exigencias oficiales en cuanto a la cantidad disuelta. El autor señala el peligro de administrar a un paciente tabletas con diferentes características de disolución, ya que las tabletas de tolbutamida que se disuelvan más lentamente, pueden producir náuseas ó vómitos debido a la gran irritación gastrointestinal causada por un prolongado contacto de la droga con dicho tracto. (Ayres, 1980)

Con posterioridad y continuando con el análisis de comprimidos de tolbutamida, se analizó el comportamiento frente a la disolución de 62 lotes de comprimidos de esta droga, provenientes de seis elaboradores distintos. El propósito del estudio fue evaluar las características de disolución de lotes recientemente elaborados de tolbutamina, considerados equivalentes terapéuticos; evaluar estos mismos lotes luego de un envejecimiento provocado por la humedad y por último determinar el efecto de la exposición de las tabletas a un ambiente ácido gástrico simulado, sobre la disolución, tanto de las tabletas recién elaboradas como de las envejecidas. (Ayres et al., 1984) Nuevamente se encontró gran variabilidad inter e intra lote, altamente dependiente del elaborador. La respuesta del envejecimiento a tres niveles de humedad, 60, 75 y 98% de humedad relativa, también dependió del productor, con excepción del producto innovador que respondió bien en todos los casos. La disolución en algunos de los genéricos ensayados, ha sido dramáticamente deprimida frente al envejecimiento por humedad. El pretratamiento con fluido gástrico simulado modificó los perfiles de disolución de los genéricos, pero casi no afectó al producto innovador.

Con respecto a la gran variabilidad en los resultados de disolución, otros autores han postulado que el principal factor que afecta la uniformidad de la velocidad de disolución, se encuentra en las variaciones del peso de las tabletas. (Colombo et al., 1985) Esa variación en el peso a su vez está causada por las diferencias en la fuerza de compresión, durante el proceso de elaboración de los comprimidos. De esta manera un buen control de proceso, en lo referente a peso y fuerza de compresión, puede reducir la dispersión en la velocidad de disolución de las tabletas.

Continuando con el análisis de las variables que pueden influenciar el proceso de disolución, cabe tener en cuenta ciertas propiedades de la misma droga (Rees, 1977), como ser:

- # Factores que afectan la solubilidad de la droga, por ejemplo, polimorfismo, hidratos, solvatos, ácidos ó bases libres, complejación, soluciones sólidas, etc.
- # Factores que afectan el área superficial disponible para la disolución, por ejemplo, tamaño de partícula, tendencia a formar aglomerados, etc. (Kaneniwa y Watari, 1974; Finholt, 1974) Hay numerosas sustancias, como la aspirina, digoxina, griseofulvina, nitrofurantoína, fenotiazina, fenilbutazona, etc., que presentan una gran dependencia

entre la velocidad de disolución y el tamaño de la partícula y por lo tanto del área activa de la misma. (Rubio, 1993)

La disolución de la droga contenida en una tableta ó cápsula también depende de factores de formulación y proceso, como ser:

- # Cantidad, tipo de excipientes y método de incorporación de los mismos. (Finholt, 1974; Cooper, 1981; Haile et al., 1992)
- # Tipo de proceso de elaboración, por ejemplo, compresión directa, granulación húmeda, etc. (Finholt, 1974; Chowhan y Chatterjee, 1984; González et al., 1995)
- # Tamaño y distribución del polvo ó gránulos. (Finholt, 1974)
- # Fuerza y velocidad de compresión. (Iranloye y Parrott, 1978)
- # Tipo de cubierta aplicada a la tableta ó composición y propiedades de la cápsula. (Khalil et al., 1991)
- # Condiciones ambientales durante la elaboración y almacenamiento, tiempo de almacenamiento. (Finholt, 1974; Murthy y Ghebre-Sellassie, 1993)

Los parámetros de procedimiento y operación de la disolución *in vitro*, deben ser optimizados para ser sensibles a variables críticas de elaboración, dentro de un rango aceptable de valores esperados durante el proceso de elaboración. Las variables críticas de elaboración son aquellos métodos y materiales usados en el proceso de producción que pueden afectar significativamente la liberación de la droga desde el producto, por ejemplo el espesor de la cubierta, la concentración de los excipientes, la dureza de las tabletas, la fuerza de compresión, etc. Las especificaciones de la disolución *in vitro* ó rango de valores permitidos, debe corresponderse con el rango de valores de las variables críticas de elaboración que pueden esperarse durante un procedimiento de elaboración normal, usando un procedimiento *in vitro* perfectamente optimizado y desarrollado, para detectar diferencias en dichas variables. (Skelley et al., 1990)

Una aplicación práctica de lo anteriormente expresado lo encontramos, por ejemplo, en los estudios comparativos de disolución realizados sobre el alopurinol formulado como polvo simple y adicionado de distintos diluyentes y también formulado en cápsulas duras de gelatina con los diluyentes seleccionados como más adecuados. (Rivero et al., 1987) Se ha corroborado que la adición de celulosa microcristalina (Avicel) y de lactosa, aumentan la velocidad de disolución del citado fármaco, en cambio el agregado de fosfato dicálcico dihidratado (Emcompress) disminuye la velocidad de disolución del mismo. A su vez el comportamiento de disolución del alopurinol resulta más efectivo cuando se lo formula en cápsulas, este hecho podría deberse a que el principio activo, tras un corto período de latencia, se pone más rápidamente en contacto y de forma completa con el medio de disolución cuando se halla formulado en cápsulas en lugar de como mezclas de polvos.

En otro trabajo se analizó la influencia sobre la liberación *in vivo* de clorhidrato de diltiazem, formulado como un sistema de liberación controlada, a través de minimatrices hinchables que son cubiertas con un film polimérico, cuyo espesor representa una variable crítica con respecto a la liberación, ya que es de solubilidad pH-dependiente. (Caramella et al., 1989) Para evaluar tal influencia se elaboraron dos minimatrices con films de distinto espesor, los cuales fueron testeados contra una tableta

comercial. El comportamiento *in vitro* se analizó en fluido gástrico simulado, como medio de disolución, encontrándose que el perfil de la formulación con film de menor espesor, 35 μm , es similar al del comprimido comercial, mientras que la minimatriz con el film de espesor mayor, 75 μm , presenta un significativo "lag time" ó tiempo de latencia, el cual está vinculado al film, siendo además, la velocidad de disolución mucho más lenta que para la primera formulación. El estudio *in vivo* se realizó según un diseño de bloques balanceados incompletos, involucrando a seis voluntarios sanos. La droga fue cuantificada en plasma y los parámetros farmacocinéticos calculados fueron la C_{max} , T_{max} , $t_{1/2}$, $ABC_{0-\infty}$ y MRT. El análisis estadístico de estos parámetros, utilizando el test de Kruskal-Wallis y de Mann-Whitney, revelan diferencias significativas, adjudicadas a la gran variabilidad intersujetos observada y al limitado número de individuos del estudio. Las conclusiones a las cuales arriban indican que las minimatrices testeadas proveen una razonable liberación sostenida de la droga. Que la formulación de cubierta más delgada, probablemente debido a la ruptura rápida de ésta durante el tránsito gástrico, no produce modificaciones en la velocidad de liberación inicial con respecto a la formulación comercial. Que en el caso de la minimatriz con cubierta más gruesa, se observa una inicial disminución de la liberación de la droga, junto con un aplanamiento del perfil plasmático. Por otra parte la dependencia del pH de la permeabilidad del film puede causar que la liberación de la droga dependa del tiempo de residencia en el tracto gástrico. En resumen, la propuesta del film polimérico es factible pensando en obtener una liberación modificada, pero habría que mejorar la propuesta, en particular reduciendo la susceptibilidad de la misma a los cambios de pH.

Para analizar la influencia de la intensidad de agitación, el tamaño de la partícula y el pH del medio de disolución sobre la liberación *in vitro* de las drogas se trabajó con cápsulas duras de gelatina conteniendo ácido acetilsalicílico. (Newton y Muhammad, 1984) Los valores de $t_{50\%}$ disminuyeron al aumentar la velocidad de agitación de 120 a 320 rpm, para todas las fracciones de tamaño de partícula y para todos los valores de pH ensayados. Los tamaños de partículas estudiados comprenden un rango de 2.5 - 450 μm y los pH de 1 - 7. La influencia de la solubilidad de la droga, inducida por cambios en el pH del medio, se ve disminuida al aumentar la velocidad de agitación. El $t_{50\%}$ presenta valores por debajo de 50 minutos recién cuando disminuimos el tamaño de partícula a 5 y 2.5 μm .

Mediante el análisis del comportamiento de disolución *in vitro*, se estableció la escasa influencia que tenía la dureza de los comprimidos y la humedad relativa durante el almacenamiento, sobre comprimidos de liberación controlada de carbonato de litio, usando una matriz hidrofílica de carboximetilcelulosa sódica. (Arancibia et al., 1990) Se evaluó también la influencia del recubrimiento con una resina metacrílica y del medio de disolución empleado. El análisis estadístico de los resultados obtenidos con comprimidos de distinta dureza, demostró que no existe un efecto real de la misma sobre las características de cesión del litio desde los comprimidos estudiados, ya que las diferencias observadas en las velocidades iniciales de disolución no fueron estadísticamente significativas. La ausencia de efecto de la fuerza de compresión sobre la liberación de fármacos desde una matriz hidrofílica parece deberse al hecho de que la afinidad de los geles hidrofílicos por el agua compensaría cualquier efecto negativo que pudiera derivarse de la disminución de la porosidad ocasionada por el aumento de la

fuerza de compresión, produciendo la hidratación del gel y el establecimiento de la barrera gelificada con gran rapidez. Desde ese momento la velocidad de cesión se hace dependiente de la velocidad con que el fármaco difunde a través del gel y también de la velocidad a la que dicha barrera es removida mecánicamente por la agitación. El efecto de la humedad relativa de almacenamiento se investigó utilizando a su vez, comprimidos sin recubrir y con un recubrimiento pelicular, con el objeto de protegerlos de la humedad. Los controles de disolución obtenidos para los diferentes tiempos de exposición a la humedad relativa extrema (92%), arrojaron resultados que nos indican el escaso efecto producido por la humedad, no apreciándose claramente tendencia alguna. En cuanto al efecto del medio de disolución se ensayaron medios de pH 1.2, agua y pH 7.5. Los resultados indicaron un aumento significativo de la velocidad de cesión del litio a pH 1.2, atribuible al recubrimiento.

El rol de los aglutinantes en relación con el aumento de la dureza de comprimidos, inducida por la humedad residual del granulado, fue analizado en comprimidos conteniendo ácido salicílico. (*Chowhan, 1980*) Las tabletas obtenidas a partir de granulados conteniendo niveles de humedad superiores al 2%, aumentan su dureza durante el almacenamiento a temperatura ambiente, mientras que por debajo de un 2%, las tabletas no modifican su dureza. El mecanismo exacto por el cual la humedad afecta la dureza de los comprimidos no es bien conocido. Un posible mecanismo podría ser la recristalización de las drogas y/o de los excipientes solubles, en los espacios vacíos causados por la pérdida de la humedad. Por esta razón también, la magnitud del incremento de la dureza dependerá del tipo de aglutinante utilizado. Ese aumento de la dureza observada, no afectó en estos estudios, ni el tiempo de desintegración, ni la disolución de los comprimidos.

Con el fin de aumentar la velocidad de disolución de tolazamida, un hipoglucemiante de administración oral, se estudió la influencia de distintos tensioactivos no iónicos, polisorbatos y estearatos de polioxietilenglicoles, en distintas concentraciones. Estos tensioactivos, en una correcta concentración, pueden ser formulados con la droga, en cápsulas de gelatina ó comprimidos, para mejorar las características de disolución, con la finalidad última de aumentar la biodisponibilidad de la droga. (*Ismail y El-Zaher, 1986*)

CADUCIDAD BIOFARMACEUTICA

Se entiende por **caducidad biofarmacéutica ó biocaducidad**, al período de tiempo al cabo del cual se modifica significativamente la biodisponibilidad de un medicamento, sin una alteración química importante del principio activo contenido en el mismo. Relacionado con esta afirmación nos preguntamos entonces qué validez tendrán los estudios de biodisponibilidad efectuados inmediatamente después de realizada la preparación, si la misma se va a administrar luego de un período determinado de almacenamiento. (*Cadorniga Carro, 1992*)

Refiriéndonos a los comprimidos, es un hecho que la influencia del envejecimiento sobre la velocidad de disolución puede alterar la biodisponibilidad de los mismos. La estabilidad de la disolución, desde su fecha de elaboración hasta la de

vencimiento, es un parámetro crítico en lo que se refiere al control de calidad, al cumplimiento de normas regulatorias y al impacto sobre la biodisponibilidad del producto. Cambios significativos en los perfiles de liberación *in vitro* de un principio activo desde un producto farmacéutico, durante el almacenamiento, pueden alterar su disponibilidad biológica. (Murthy y Ghebre-Sellassie, 1993)

Los factores que afectan la estabilidad de la disolución de un producto durante su envejecimiento incluyen a los componentes de la formulación (principios activos y excipientes), a los factores de elaboración, a las condiciones de almacenamiento y de empaquetamiento. Pueden provocar cambios en la disolución, tanto de productos de liberación inmediata, como de liberación modificada. En estos últimos es más preponderante su influencia ya que, en aquellos que tienen un franja terapéutica muy estrecha, la inestabilidad de la disolución puede provocar serias consecuencias fisiológicas. Si la velocidad de liberación del principio activo es menor podría llevar a niveles plasmáticos subterapéuticos, en cambio si aumenta podría provocar problemas de toxicidad.

Estudios realizados sobre el efecto del envejecimiento en la velocidad de disolución y en la biodisponibilidad de tabletas de riboflavina, con cubierta azucarada, seguida esta última a través de los perfiles de excreción urinaria de cinco voluntarios sanos, nos revela una disminución muy marcada en ambos comportamientos, bien correlacionados entre sí. (Khalil *et al.*, 1991) Entre los posibles factores que contribuyen a la variabilidad en la disolución se incluyen diferencias en el espesor de la cubierta y/o en el nivel de interacción entre los componentes de la misma, que provocarían la insolubilidad de dicha cubierta azucarada durante el almacenamiento. En cuanto a la menor biodisponibilidad se ha postulado que se debe al hecho de que al tener la riboflavina un sitio determinado de absorción, en el intestino delgado, al no liberarse rápidamente la droga, puede pasar por el sitio de absorción sin absorberse.

Es esencial que las características de disolución de un forma farmacéutica, permanezcan inalterables durante toda la vida útil de la misma. En general se admite que si el perfil de disolución *in vitro* no se modifica por envejecimiento, no sufre alteraciones sustanciales la disponibilidad *in vivo*. (Cadorniga Carro, 1992) Dicho de otra manera, no es posible predecir qué cambios en la biodisponibilidad provocarán cambios en la disolución, sí es seguro que la ausencia de modificaciones en la disolución, asegura que la biodisponibilidad permanecerá intacta.

CORRELACIONES IN VITRO - IN VIVO

En aquellos casos donde la absorción de la droga desde un producto farmacéutico, es cinéticamente controlada por los procesos de liberación y disolución, es esperable que el test de disolución pueda ser capaz de proveer un modelo predictivo de la biodisponibilidad y la bioequivalencia. Pero se deben tener en cuenta los siguientes principios:

(a) Aunque la determinación final de la calidad desde el punto de vista de la biodisponibilidad/bioequivalencia, puede solamente ser obtenida en estudios *in vivo*, en animales ó humanos, tanto el costo como razones éticas demandan un modelo *in vitro*,

en casos tales como: el desarrollo de una nueva especialidad, la rutina del control de calidad de una producción y en ensayos preliminares de equivalencia ó variabilidad de productos elaborados por el mismo ó diferentes productores.

(b) El poder predictivo del test en relación a la biodisponibilidad y bioequivalencia, depende en alto grado de la droga. Solamente se podrá aplicar para aquellas drogas cuya velocidad de disolución sea limitante de la absorción *in vivo* y siempre que las condiciones del test sean reales. Por esta razón los sistemas cerrados donde prevalece un ambiente fisiológico son los que mayores posibilidades tienen de que los resultados obtenidos *in vitro* reflejen la performance de la especialidad *in vivo*. Aquellos test con condiciones arbitrarias y poco reales, como muy alta velocidad, pH no fisiológico ó alta proporción de solvente orgánico, no tendrán un valor real para predecir calidad biofarmacéutica, ya que nos pueden conducir a decisiones erróneas, aún cuando nos den aceptables correlaciones *in vitro-in vivo*.

(c) Por otra parte se debe admitir que la complejidad del proceso fisiológico condiciona el establecer un modelo *in vitro* perfecto. Las limitaciones están dadas por el estado del conocimiento de las condiciones típicas fisiológicas, por el costo experimental, por el tiempo insumido y por el sentido común. Cualquier interpretación de las implicancias *in vivo* de los resultados de un test *in vitro*, deben ser consideradas prudentemente debido a las desviaciones del modelo utilizado respecto al original fisiológico. Las mismas serán producto de factores tales como absorbabilidad de la droga disuelta, la cual no se incluye en el test pero afecta la correlación con la respuesta *in vivo*.

(d) Las decisiones sobre la calidad de un producto deben estar basadas en algunos conocimientos específicos de la droga, como ser, el uso propuesto para esa droga, el modo de aplicación, es decir, el tipo de tratamiento: por un largo período ó solo algunas dosis diarias, el efecto terapéutico, la farmacocinética de la droga, velocidad de absorción, de eliminación, tolerancia terapéutica, etc. (*Section Control Laboratories and Section Industrial Pharmacist of the Federation Internationale Pharmaceutique, 1981*)

Generalmente las especificaciones de disolución se definen por algunos de estos dos métodos: (1) con los valores del rango de disolución encontrados cuando se usó el lote de comprimidos del estudio central de biodisponibilidad y (2) con el rango de valores de diferentes lotes producidos durante la fase de desarrollo.

Ninguno de los dos suministra una validación *in vivo*. El procedimiento de disolución *in vitro* usado para control de calidad deberá ser validado mediante un apropiado estudio de biodisponibilidad. Para ello se puede testear uno ó más productos con características de velocidad modificadas ó evaluando alternativamente distintos procedimientos de disolución hasta que se pueda establecer alguna correlación de un grado aceptable. Se pueden usar los siguientes procedimientos: (a) preparar dos ó más formulaciones con diferentes características biofarmacéuticas. Los cambios en la disolución *in vitro* de estas formulaciones test, deben producirse solamente por cambios de procesos ó componentes que se han variado bajo condiciones normales de elaboración; (b) desarrollar un apropiado test *in vitro* que pueda distinguir entre esas formulaciones; (c) determinar las características de absorción de estas formulaciones en un pequeño grupo de sujetos. (*Skelly et al., 1990*)

Cuando la velocidad de disolución es independiente de las condiciones del test, por ejemplo, pH, tensioactivos, presión osmótica, agitación, etc. una curva simple definirá la velocidad de disolución. Esta curva de disolución es comparada con la función resultante de la deconvolución de la curva de concentración plasmática versus tiempo del estudio definitivo de biodisponibilidad/bioequivalencia. Si estas curvas son superponibles habrá correlación.

Es decir que, para una adecuada evaluación *in vitro* de la biodisponibilidad/bioequivalencia, los procedimientos llevados a cabo por el test y los requerimientos, deben estar respaldados por una **correlación** con datos *in vivo*, estas correlaciones deben evidenciar que las diferencias encontradas *in vitro* se corresponden con similares diferencias *in vivo* y viceversa. (USP 23)

Usualmente el fundamento para tratar de establecer una correlación *in vitro-in vivo* es el siguiente:

- * Permitir establecer una especificación de la disolución que provea la máxima seguridad de la consistencia lote a lote del desempeño del producto *in vivo*.

- * Permitir el uso de datos de disolución *in vitro*, considerando datos de biodisponibilidad adicionales, para justificar un cambio del lugar de fabricación, de los proveedores de materias primas o cambios menores en la formulación o en el proceso.

- * Puede usarse una correlación para el desarrollo y optimización de la formulación. (Skough et al., 1996)

La correlación con parámetros , tanto plasmáticos como urinarios, es el principal “background” para un significativo y predictivo test de disolución. Algunos puntos generales respecto de la correlación deben ser considerados previamente, como por ejemplo:

- * La correlación con el efecto terapéutico podría dar más información para el establecimiento de especificaciones, pero en realidad, en muchos casos, está más lejos del estado del conocimiento, por lo que resulta más conveniente correlacionar los resultados del test con cantidades ó concentraciones medibles en compartimentos bien definidos del cuerpo.

- * Estrictamente una correlación involucra que toda la función tiempo de disolución, ó al menos parámetros característicos de la curva de disolución, sean congruentes con su contraparte *in vivo*, la cual es función de la liberación/disolución *in vivo*.

- * Tendrá un valor práctico importante establecer algún tipo de regresión entre los dos sets de datos, es insuficiente asumir que ambos no son completamente independientes, una curva de calibración es necesaria, la cual permitirá una predicción confiable del comportamiento *in vivo* a partir del test *in vitro*. (Section Control Laboratories and Section Industrial Pharmacist of the Federation Internationale Pharmaceutique, 1981)

La correlación entre datos de disolución obtenidos con diferentes condiciones experimentales puede ser anticipada y bien verificada en ciertos casos. Ajustando condiciones como la velocidad de agitación ó el flujo, se han logrado correlaciones para un determinado número de drogas, aunque desafortunadamente, debido a diferencias en la formulación, un tipo de parámetros que da buena correlación para algunos productos, puede no cumplirla para otros. El riesgo de no obtener buenas

correlaciones es mayor cuanto más nos alejemos con nuestras condiciones experimentales de sus equivalentes fisiológicos, por ejemplo, cuando una pobre humectación de la droga es compensada con un aumento en la agitación, etc.

Diferencias en la biodisponibilidad observadas *in vivo* entre dos formulaciones, productos ó lotes, pueden reflejarse en similares diferencias en el test de disolución, podríamos afirmar, entonces, que existe una correcta correlación entre ambos comportamientos. En cambio, las correlaciones juzgadas como pobres son aquellas en donde : las diferencias significativas en disolución no muestran igual comportamiento en datos plasmáticos ó urinarios, las diferencias en los datos *in vivo* no son vistas *in vitro*, la disolución es mucho más rápida ó más lenta que los datos obtenidos *in vivo*. Una posible razón para una pobre correlación será una elección equivocada de las condiciones del test *in vitro*, por ejemplo, es conocido que una fuerte agitación tiende a enmascarar diferencias reales de los productos, a la vez que no se correlaciona bien con la agitación *in vivo* que es muy suave, etc. (*Section Control Laboratories and Section Industrial Pharmacist of the Federation Internationale Pharmaceutique, 1981*)

En ciertos casos, sin embargo, las limitaciones son debidas a procesos fisiológicos en sí mismos. Mientras que el test evalúa solamente los procesos de desintegración/disolución, existe la posibilidad de caminos en serie ó paralelo que no pueden ser considerados por las condiciones habituales de un test, como por ejemplo, perdidas irreversibles por degradación ó complejaciones en el tracto gastrointestinal, ó debidas al efecto del primer paso, absorción de partículas no disueltas, diferencias en la velocidad de distribución y metabolización, etc. Si estos efectos son significativos no se podrá establecer una buena correlación. En tales casos no se deben alterar las condiciones de la disolución con el fin de procurar obtener una buena correlación, sino que se debe ejecutar el test bajo las condiciones standarizadas, las cuales han mostrado ser correctas en otros casos.

La $C_{m\acute{a}x}$ y el $t_{m\acute{a}x}$, son los parámetros más simples *in vivo* para ser correlacionados con los parámetros de la curva de disolución, tales como cantidad disuelta a un tiempo dado (Q_t) ó tiempo necesario para disolver una determinada fracción ($t_{50\%}$ ó $t_{90\%}$). Otro parámetro muy adecuado para la evaluación de la disolución *in vitro* es la Eficiencia de Disolución ($ED\%$), definida como la relación, expresada en porcentaje, entre el área bajo la curva de disolución, medida hasta un determinado tiempo, y la superficie del rectángulo definido por la ordenada del 100% disuelto y la abscisa en el mismo tiempo. (*Khan, 1975*) Muchos investigadores la prefieren para realizar correlaciones ya que parece lógico que, mientras la disponibilidad *in vivo* de una droga, se estima por integración del área bajo la curva de los niveles plasmáticos, los resultados *in vitro* se expresen en forma similar. Además cuando se establece alguna relación entre la disolución y otra variable, como por ejemplo la fuerza de compresión, es quizás más real usar la $ED\%$, la cual tiene en cuenta el perfil de disolución como un todo, en oposición al $t_{50\%}$ ó al $t_{90\%}$, por ejemplo, que son valores correspondientes a un solo punto de la curva de disolución.

Estas correlaciones podríamos decir que son cualitativas, para correlaciones cuantitativas se requieren técnicas más elaboradas, por ejemplo: el método de Wagner-Nelson (*Wagner y Nelson, 1964*) que asume al cuerpo como un modelo de un compartimento solo; el método de Loo-Riegelman (*Loo y Riegelman, 1968*) que asume un modelo de dos compartimentos; el método de deconvolución numérica; el análisis de momentos estadísticos ó tiempos de residencia, etc. (*Section Control Laboratories and Section Industrial Pharmacist of the Federation Internationale Pharmaceutique, 1981*)

Históricamente las correlaciones *in vitro-in vivo* han sido utilizadas, principalmente, con productos de liberación inmediata. Más recientemente, similares relaciones se han usado para productos de liberación modificada. (*Stavchansky y McGinity, 1981*)

La información requerida para caracterizar los procesos de disposición de una droga, de una formulación de liberación controlada, debe incluir la misma de aquellas de liberación inmediata, por ejemplo: (1) parámetros de disposición, como clearance, volumen de distribución, semivida, tiempo medio de residencia; (2) linealidad ó no linealidad de la dosis ; (3) acumulación; (4) perfiles metabólicos y dependencia del órgano excretor, con especial atención al metabolito activo y a enantiómeros activos de mezclas racémicas; (5) circulación enterohepática; (6) parámetros de unión a proteínas; (7) efecto de la edad, género, raza, estado de la enfermedad relevante; (8) relación plasma:sangre. Además, en casos donde la droga tiene un limitado índice terapéutico ó donde hay evidencias de que la respuesta clínica varía significativamente como una función del momento del día, se recomienda que la variabilidad circadiana sobre los parámetros de disposición de la droga y la farmacodinámica de la misma sea caracterizada, para determinar cuales cambios en la velocidad de disposición de la droga con el tiempo, son esenciales para asegurar protección y eficacia. (*Skelley et al., 1990*)

DEFINICION Y NIVELES DE CORRELACIONES

El Subcomité de la USP sobre Biofarmacia definió las correlaciones *in vitro-in vivo* de la siguiente manera: ***establecimiento de una relación, preferentemente lineal, entre una propiedad biológica ó un parámetro derivado de una propiedad biológica, producida por una forma farmacéutica y una característica fisicoquímica de esa misma forma farmacéutica.***

Este mismo Subcomité categorizó, en orden de importancia, los distintos métodos de correlación, y lo hizo en distintos niveles:

* ***Correlación Nivel A.*** Esta categoría representa el nivel más alto de correlación. Demuestra una relación 1:1 entre disolución *in vitro* e *in vivo*. En esta correlación las curvas de disolución *in vitro* e *in vivo* son superponibles, las expresiones matemáticas que describen una, describen la otra también. Con este procedimiento de correlación se compara la curva de disolución *in vitro* del producto farmacéutico, con la curva de disolución *in vivo*, obtenida por deconvolución de los datos de nivel plasmático, usando ó el procedimiento de Wagner-Nelson (*Wagner y Nelson, 1963 - 1964*), el de Loo-

Rigelman (*Riegelman et al., 1968*) ó por deconvolución matemática directa. (*Vaughan y Dennis, 1978; Brockmeier et al., 1985*)

La absorción ó la liberación *in vivo* del principio activo a partir de una forma farmacéutica está considerada como la “función de entrada”, y las concentraciones plasmáticas obtenidas luego de una administración intravenosa, representa la “función de ponderación”, las concentraciones plasmáticas obtenidas a partir de una administración oral representa la “función del sistema”. La deconvolución permite calcular la entrada al sistema (porcentaje absorbido *in vivo*, porcentaje liberado *in vivo*) y la convolución, operación inversa, permite determinar la “función respuesta” a partir de una función de entrada, representada por los porcentajes disueltos *in vitro*. Este método permite simular una curva teórica de concentración plasmática luego de la administración de una forma farmacéutica, a partir de una cinética de disolución *in vitro*. (*Aiache y Beyssac, 1990*)

* **Correlación Nivel B.** Este procedimiento usa los principios del análisis de momentos estadísticos. Compara el Tiempo Medio de Disolución *in vitro* (MDT_{vitro}) con el Tiempo Medio de Residencia *in vivo* (MRT) ó con el Tiempo Medio de Disolución *in vivo* (MDT_{vivo}). (*Brockmeier, 1986; Arancibia, 1992*) Este segundo nivel de procedimiento de correlación también usa todos los datos *in vitro* e *in vivo*, pero no es considerado una correlación 1:1 pues no refleja la curva de niveles plasmáticos, ya que diferencias en las mismas pueden producir MRT similares. Cualquier dato que presente una correlación de nivel A, también lo hará a nivel B, pero no necesariamente ocurrirá lo inverso. (*Brockmeier y von Hattingberg, 1982; Brockmeier et al., 1983; Brockmeier, 1984*)

* **Correlación Nivel C.** Esta categoría relaciona un tiempo de disolución ($t_{50\%}$, $t_{90\%}$, etc.), ó ED%, con un parámetro farmacocinético, como el ABC, $C_{m\acute{a}x}$ ó $T_{m\acute{a}x}$. Representa una correlación de simples puntos y no refleja realmente el perfil plasmático completo, el cual puede ser un factor crítico para productos de liberación modificada.

COMO ESTABLECER UNA CORRELACION IN VITRO-IN VIVO?

La metodología biofarmacéutica a seguir para establecer correlaciones *in vitro-in vivo*, comprende cuatro etapas:

1. *Primera etapa.* A partir de una formulación cuyo comportamiento, tanto clínico como farmacocinético, es bien establecido y los valores conocidos, se preparan al menos dos formas galénicas con características biofarmacéuticas distintas. Por ejemplo, con velocidades de disolución distintas, obtenidas unicamente por modificaciones en el proceso de fabricación ó de los componentes susceptibles de variar en el curso de las condiciones de fabricación normales.
2. *Segunda etapa.* Desarrollar un método apropiado que permita la diferenciación de las distintas formulaciones. Este método debe demostrar la dependencia ó la independencia de la velocidad de disolución de las condiciones del ensayo, pH, volumen, agitación, etc.
3. *Tercera etapa.* Determinar la biodisponibilidad en un grupo reducido de voluntarios. Normalmente las diferencias de biodisponibilidad observadas son las mismas que las obtenidas *in vitro*.

4. *Cuarta etapa.* Establecer las correlaciones *in vitro-in vivo*, por el método de convolución-deconvolución, que permitirá asegurar el valor discriminatorio del test *in vitro* y encontrar los límites para el control de calidad.

El desarrollo de estas correlaciones es importante para la definición de productos genéricos, así como también para establecer los requerimientos oficiales sobre disolución *in vitro*.

Una buena correlación de nivel A se obtuvo en estudios realizados con comprimidos de matriz hidrofílica, de liberación prolongada, de teofilina. Para ello se trabajó con varias formulaciones, de las cuales se seleccionó, en base a estudios *in vitro*, la de matriz hidrofílica conteniendo Methocel como agente gelificante y se estudió comparativamente con una formulación de liberación rápida. El estudio *in vivo* se realizó con quince conejos de raza albina, monitoreando en suero la concentración de teofilina. Mediante la utilización del método de Wagner - Nelson, se calculó la fracción porcentual de dosis absorbida a distintos tiempos, hasta las 8 hs. luego de la administración del medicamento. Estos datos fueron correlacionados con los porcentajes disueltos a los mismos tiempos en el ensayo *in vitro*. Se realizó un análisis de regresión lineal confrontando los resultados de ambos ensayos, cuyo coeficiente de correlación fue: $r = 0.9994$. Las curvas de disolución y de absorción fueron muy próximas, por lo cual concluyen en un muy buen paralelismo entre los porcentajes de liberación *in vivo* y los de disolución *in vitro*. (Marín Bosca *et al.*, 1989)

En un trabajo realizado con seis preparaciones farmacéuticas de liberación prolongada conteniendo clorhidrato de diltiazem, se ha encontrado una buena correlación, de nivel B, entre los tiempos medio de disolución *in vitro* (MDT) con los tiempos medio de residencia *in vivo* (MRT). (Caramella *et al.*, 1993) Mientras que el ensayo *in vitro* consistió en analizar la disolución en medio acuoso y en ácido clorhídrico 0.1 N, al cual se le modificó el pH progresivamente, partiendo de pH 1 hasta pH 6.8; el ensayo *in vivo* se realizó sobre doce voluntarios sanos, mediante un diseño paralelo, no pudiéndose aplicar un diseño cruzado por el alto número de formulaciones, monitoreando la droga en plasma. Al intentar encontrar una correlación con los perfiles de disolución *in vitro* y de absorción *in vivo*, obtenidos por el método de Wagner - Nelson, solamente pudieron obtenerla con tres de las formulaciones.

En otra investigación llevada a cabo con tabletas de aminofilina y teofilina, se correlacionaron los perfiles de disolución obtenidos a partir de fluido gástrico artificial pH 1.5, de plasma artificial pH 7.4 y de fluido intestinal artificial pH 6.5, con los perfiles de absorción *in vivo*, obtenidos por el método de Wagner - Nelson, a partir de los datos de concentración plasmática, de doce voluntarios sanos. (Johansen, 1984) Buena correlación se logró con las tabletas de aminofilina a pH 1.5 y a pH 7.4, pero no obtuvieron correlaciones con las tabletas de teofilina en ninguno de los pH ensayados.

También trabajando con dos diferentes tabletas de aminofilina, pero de liberación modificada, y llevando a cabo los estudios de disolución en un medio que cambia progresivamente su pH desde 1.2 a 6.8 y los estudios *in vivo* en ocho voluntarios

sanos, encontraron correlaciones utilizando el análisis de momentos estadísticos. (Lin et al., 1990)

Un estudio de correlación *in vitro-in vivo* de comprimidos de hidroclorotiazida, fue realizado con veinte formulaciones, cuya inequivalencia galénica, producida por la variación de la presión de compresión, de la concentración de gelatina y de la proporción lactosa/almidón, fue demostrada mediante la medida de la dureza y del tiempo de desintegración, en cambio el ensayo de disolución no arrojó diferencias significativas. Al realizar el ensayo *in vivo*, a partir de la medida de la excreción urinaria en cinco voluntarios sanos, tampoco se encontraron diferencias significativas en los parámetros calculados, E_{12} y MRT, aunque sí observaron gran variabilidad interindividual que uniformiza las diferencias detectadas en los ensayos galénicos y que ya no aparecen en los ensayos de disolución. No era de esperar que se comporten distinto *in vivo* formulaciones con un comportamiento similar en disolución, por lo cual se apreció una cierta correlación cualitativa, entre los parámetros *in vitro* e *in vivo*. (Pellicer et al., 1990)

Un ejemplo de correlaciones de nivel C, encontramos en un trabajo realizado con distintas formulaciones de metenamina, nitrofurantoína y clorotiazida. Como parámetros *in vivo* se utilizaron datos de excreción urinaria. Encontraron buena correlación entre la máxima velocidad de excreción urinaria de metenamina y el tiempo en el cual se disuelve el 15% de principio activo. Para la nitrofurantoína la mejor correlación se encontró entre el porcentaje acumulativo de droga excretado en 12 horas y el porcentaje disuelto en una hora. Una buena correlación para la clorotiazida fue, el porcentaje de droga disuelta en un minuto ó el tiempo necesario para disolver el 15% de droga, con la velocidad máxima de excreción. (Yau y Meyer, 1981)

La literatura científica es abundante respecto a los tópicos reseñados en esta introducción, tanto en el análisis de la biodisponibilidad de principios activos, como en la determinación de las características de disolución, con un sentido predictivo del comportamiento *in vivo* de determinados fármacos. Asimismo encontramos, cada vez con más frecuencia, reportes sobre estudios de bioequivalencia, para dar sustento a la posibilidad de realizar intercambios en las prescripciones, sobre todo frente al gran auge de los genéricos. Las correlaciones que se imponen para darle validez a los métodos *in vitro*, son también objeto de publicaciones, donde encontramos distintos niveles de correlación, aún los más inesperados.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo fue analizar la velocidad de disolución, como un medio reconocido de evaluar la disponibilidad de medicamentos *in vitro*, realizando, para algunos casos, las correspondientes correlaciones con ensayos *in vivo*.

Además, desde el momento que se planteó este objetivo, una de las principales metas a desarrollar, fue la introducción de esta temática en la currícula de nuestros alumnos, incluyéndolos, parcialmente, en este proyecto.

Para tal fin se trabajó con genéricos elaborados en la Unidad de Producción de Medicamentos (UPM), perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) y con comprimidos de circulación actual en el mercado farmacéutico argentino. De esta manera se integró la función docente, con la investigación farmacéutica y con la función social, proyecto innovador en el ámbito universitario, a concretarse a partir de la creación de la UPM ; a la vez que se realizaron los estudios de mercado, sobre los mismos genéricos, tarea que consideramos indispensable, pero no siempre realizada, para asegurar óptimas garantías de confianza y calidad en el medicamento.

Los **objetivos específicos** de esta investigación fueron:

1. Desarrollar la mejor formulación (comprimidos de la UPM)
2. Realizar el control biofarmacéutico de todos los genéricos ensayados.
3. Analizar su bioequivalencia.
4. Iniciar a los alumnos en esta temática, incorporándolos al proyecto.

PARTE EXPERIMENTAL

PARTE EXPERIMENTAL

A los fines de un reordenamiento temático, se ha clasificado la parte experimental de este trabajo, de la siguiente manera:

1. Estudios de biodisponibilidad relativa y bioequivalencia de comprimidos de Paracetamol. Ensayos *in vitro* e *in vivo*.
2. Estudios de biodisponibilidad relativa y bioequivalencia de comprimidos de Metoclopramida. Ensayos *in vitro* e *in vivo*.
3. Influencia de la tecnología de elaboración sobre la disolución de comprimidos de Ampicilina. Ensayos *in vitro*.
4. Influencia del desintegrante sobre la disolución de comprimidos de Clortalidona. Ensayos *in vitro*.
5. Control biofarmacéutico de comprimidos de Clorhidrato de Propranolol. Ensayos *in vitro*.

Al desarrollar cada uno de los cinco items definidos, se detallarán para cada uno de ellos, los **Materiales y Métodos** empleados; los **Cálculos** aplicados, los **Resultados Experimentales** obtenidos y la **Discusión** de los mismos.

**1. ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD RELATIVA
Y BIOEQUIVALENCIA
DE COMPRIMIDOS DE PARACETAMOL .
ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*.**

MATERIALES Y METODOS

1. ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD RELATIVA Y BIOEQUIVALENCIA DE COMPRIMIDOS DE PARACETAMOL. ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

MATERIALES Y METODOS

1.1. Estudio de la influencia del aglutinante y del desintegrante sobre la disolución de comprimidos de paracetamol. Ensayos *in vitro*.

Materiales

- * Paracetamol, droga en polvo uso comercial, de título 99.5%
- * Polivinilpirrolidona (PVP), grado USP 23
- * Almidón, grado USP 23

* Comprimidos comerciales disponibles en el mercado farmacéutico argentino, conteniendo 500 mg de Paracetamol, de seis laboratorios productores distintos, identificados como Laboratorio (Lab.) A, B, C, D, E y F, correspondientes cada uno de ellos a una misma partida.

* Comprimidos no recubiertos, conteniendo 500 mg de Paracetamol, elaborados por el personal de la Unidad de Producción de Medicamentos (UPM), mediante granulación húmeda y compresión, utilizando punzones de 12 mm y una presión de 9.5-10 Tn/cm².

Dos partidas (UPM₀₁ y UPM₀₂) poseen la misma composición, pero se ha variado la manera de adicionar el aglutinante. En la UPM₀₁ se lo ha hecho como polvo mezclado con el resto de los componentes, en cambio en la UPM₀₂, el PVP se ha agregado disuelto en alcohol etílico, en solución al 4%. En la partida UPM₀₃, se ha disminuido el porcentaje de almidón respecto a las anteriores. Las modificaciones realizadas a las partidas fueron sugeridas a consecuencia de los resultados de disolución encontrados. (Tabla 1)

	COMPRIMIDOS DE PARACETAMOL		
	UPM ₀₁	UPM ₀₂	UPM ₀₃
Paracetamol	500	500	500
Almidón	90	90	45
Lactosa	90	90	80
PVP	13	13 ^(*)	18
Estearato de Mg	7	7	7

TABLA 1. Composición de los comprimidos de Paracetamol expresada en mg de componente por comprimido. (*) En solución etanólica al 4%.

- * Medio de disolución: Buffer Fosfato pH 5.8 . Preparado de la siguiente manera:
- | | |
|---|---------|
| Fosfato monobásico de potasio 0.2 M | 250 ml |
| Hidróxido de sodio 0.2 M | 18 ml |
| Agua destilada csp | 1000 ml |

La solución de fosfato monobásico de potasio 0.2 M se preparó pesando 27,22g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, grado p.a., que se disuelven en 1000 ml de agua destilada.

La solución de hidróxido de sodio 0.2 M se preparó pesando 4g de HONa , grado p.a., que se disuelven en 500 ml de agua destilada.

Equipos.

- * Equipo de disolución de comprimidos Alycar Mod. ADS150
- * Equipo de desintegración de comprimidos Erweka ZT6
- * Medidor de Resistencia a la rotura Modelo Strong-Cobb
- * Espectrofotómetro Beckman M26
- * Micropipeta automática Socorex de 100-1000 μL y Pipeta automática Eppendorf de 500-5000 μL .
- * Balanza Metler Toledo AG 204

Contenido de paracetamol

Se determinó el contenido de paracetamol de todos los comprimidos ensayados, mediante la utilización de un método por absorción al UV, en medio buffer fosfato pH 5.8, a 244 nm. Para ello se pesaron individualmente 20 comprimidos y se determinó el peso promedio. Se pulverizaron y se pesaron alícuotas correspondientes a 20 μg de principio activo (aproximadamente 30 mg de pulverizado) que se llevaron a 50 ml con la solución buffer pH 5.8 y se agitaron mecánicamente durante 30 minutos. Se filtraron y se realizaron diluciones 1:50 , también con solución buffer, de tal manera de obtener una concentración de 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ que se leyeron al UV a 244 nm. Se realizaron cinco réplicas de la valoración.

Validación del método

Para la validación del método se obtuvo una curva de calibración con paracetamol standard (título 100%), en medio buffer fosfato pH 5.8, en un rango de concentraciones entre 4-12 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para ello se prepararon, por duplicado, dos soluciones madres de paracetamol standard, de 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cada una, pesando 20 mg de droga que se disuelven en 50 ml de solución buffer. A partir de estas soluciones madres se prepararon cinco diluciones para obtener las siguientes concentraciones:

Dilución	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
0,5:50	4
1,5:100	6
1:50	8
2,5:100	10
1,5:50	12

Se leyeron al UV a 244 nm todas las diluciones y los datos de Absorbancia obtenidos, en función de la concentración, se analizaron por regresión lineal, utilizando el programa Microsoft Excel 5.0, evaluándose linealidad.

Resistencia a la rotura

Se determinó la resistencia a la rotura de los comprimidos mediante la utilización de un medidor Strong-Cobb, sobre diez comprimidos de cada partida, expresándose el resultado como valor medio en kg/pulg^2 .

Tiempo de desintegración

El tiempo de desintegración de los comprimidos fue determinado según las normas establecidas por la Farmacopea Argentina VI ed.

Estudio de disolución *in vitro*

Se efectuó de acuerdo a la normativa de USP 23, cuyas condiciones de trabajo son las siguientes:

Medio: 900 ml de buffer fosfato pH 5.8 a 37 °C

Aparato: 2 (Paleta)

rpm: 50

El ensayo se realizó bajo condiciones “non sink”, retirándose alícuotas de 5 ml a los 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos, reponiéndose el mismo volumen con medio buffer a igual temperatura; las muestras se filtraron y luego de una dilución 1:50, también con medio buffer, se valoraron mediante el método de absorción a 244 nm. Los resultados se expresaron en $\text{mg}/900 \text{ ml}$ de buffer, utilizando la curva de calibración calculada por ajuste línea¹ de cuadrados mínimos. Se analizaron seis comprimidos de cada especialidad ensayada.

Parámetros de disolución

A partir de las concentraciones de paracetamol disueltas a cada tiempo, se calcularon las constantes cinéticas y los parámetros de disolución siguientes: orden cinético, constante de disolución (k_d), tiempo en el cual se disuelve el 50 % del valor declarado en la formulación ($t_{50\%}$), cantidad disuelta a los 30 minutos (Q_{30}), cantidad

disuelta al cabo de la experiencia (Fd%), Eficiencia de la Disolución (ED%), Tiempo medio de disolución (MDT).

Análisis estadístico

Se calcularon los valores medios de los parámetros arriba mencionados con sus respectivas desviaciones standards. Con los valores de ED% se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se aplicó el método de comparación múltiple de la Mínima Diferencia Significativa (LSD), basado en la prueba t de Student

1.2. Estudios de biodisponibilidad relativa de comprimidos de paracetamol, utilizando saliva y orina como fluidos biológicos.

Materiales

* Comprimidos no recubiertos de paracetamol conteniendo 500 mg, elaborados en la UPM, correspondientes a la partida UPM₀₃, identificados como Formulación A, (Formulación Test).

* Comprimidos comerciales de paracetamol conteniendo 500 mg, del Laboratorio E, identificados como Formulación B, (Formulación Referencia).

Equipos

* Cromatógrafo líquido Konik KNK 500G con una bomba de doble pistón; equipado con un detector de longitud de onda variable, modelo 204 Linear; un inyector Rheodyne modelo 7125, con un loop fijo de 20 µL; un microprocesador KNK 029-375 y un integrador Spectra Physics, modelo Datajet SP 4600.

* Una columna Lichrocart RP-18 (250 mm x 4 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula, con un guarda columna Supelco (50 mm x 4.6 mm de diámetro interno) rellena con Pelliguard LC-18 de 40 µm de tamaño de partícula.

* Centrífuga Rolco CR 150.

* Micropipeta automática Socorex de 100-1000 µL y Pipeta automática Eppendorf de 500-5000 µL.

* Balanza Metler Toledo AG 204

Estudio de disolución *in vitro*

Ha sido realizado de acuerdo a USP 23, usando el método de la paleta, con buffer fosfato pH 5.8, como medio de disolución (según 1.1.). También se realizó el ensayo en medio de ácido clorhídrico 0.1 N, con el resto de las condiciones iguales a las ya descriptas.

El ensayo se realizó bajo condiciones “non sink”, retirándose alícuotas de 5 ml a los 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos, reponiéndose el mismo volumen con el medio utilizado, a igual temperatura; las muestras se filtraron y luego de una dilución 1:50, también con el mismo medio, se valoraron mediante el método de absorción a 244 nm. Los resultados se expresaron en mg/9 0 ml de medio, utilizando la curva de calibración calculada por ajuste lineal de cuadrados mínimos, en el caso del medio buffer y para HCl 0.1 N, se utilizaron soluciones de referencia, preparadas cada día de trabajo. Se analizaron seis comprimidos de cada especialidad ensayada.

Estudio in vivo

Participaron en este estudio cinco voluntarios sanos, de sexo femenino, de 22-30 años de edad, con un peso corporal entre 50-69 kg.

Se utilizó como criterio de admisión un buen estado de salud, corroborado por una historia clínica, ser no fumadores y no consumir ni medicamentos, ni bebidas alcohólicas en un período no menor a una semana antes de la experiencia.

Los voluntarios firmaron un acta de consentimiento, consignando sus datos personales y su conocimiento sobre el estudio que se realizaría, así como referencias respecto a consumos anteriores de paracetamol.

La modalidad de administración fue de una simple dosis de paracetamol, es decir, un comprimido de 500 mg de cada una de las formulaciones ensayadas, después de un ayuno de 12 horas, ingerido con aproximadamente 200 ml de agua y siempre por la mañana, entre las 7 - 9 hs., para minimizar la influencia del factor cronofarmacocinético sobre esta droga.

Se utilizó un diseño cruzado y aleatorizado, recibiendo tres voluntarios la Formulación A y dos voluntarios la Formulación B, en la primera semana del estudio. Luego de una semana de "washout" ó depuración de la droga del organismo, se invierte el orden, recibiendo los tres voluntarios la Formulación B y los otros dos la Formulación A.

Durante el día del tratamiento cada voluntario ingiere un menú standard, sugerido en unas planillas que se les suministran, junto con recomendaciones respecto a respetar el ayuno antes de la ingesta del comprimido, a la abstención de consumir bebidas conteniendo xantinas ó alcohol, debiendo consignar las horas de cada ingesta alimenticia. **(Planillas 1 y 2)**

Para el seguimiento de la droga se colectaron muestras de saliva, obtenidas espontáneamente a las 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6 y 7 horas, a partir de la administración del comprimido, que se recogieron en tubos eppendorf de 1,5 ml de capacidad, completándolos en todo su volumen. Las muestras fueron almacenadas en un freezer hasta el momento del análisis por HPLC.

También se colectaron muestras de orina, para determinar en ellas la cantidad de paracetamol excretado, a los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9 y 15 horas. Después de medir el volumen total de orina, una pequeña porción de la misma se almacenó en un freezer hasta el momento del análisis por HPLC.

Preparación de las muestras

Las muestras de saliva se centrifugaron con HClO₄ al 6% P/V, en una relación 1:0.8, a 3500 rpm durante 15 minutos, luego se diluyeron 1:5 ml con fase móvil, se

filtraron por membrana de nylon de 0.45 μm y se inyectaron en el cromatógrafo, por triplicado.

Las muestras de orina se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos, luego se diluyeron 1:10 ml con agua destilada, se filtraron por membrana de nylon de 0.45 μm y se inyectaron en el cromatógrafo, por triplicado.

Análisis de la droga

Las muestras fueron analizadas por HPLC con las siguientes condiciones cromatográficas.

Para saliva:

Fase móvil: Agua:Acetonitrilo:Trietilamina (94:6:0.5), ajustada a pH 2.5 con ácido fosfórico.

Flujo: 1 ml/minuto

Volumen de inyección: 20 μL

Temperatura: 30 °C

Detección: 254 nm

Para orina:

Fase móvil: Agua:Acetonitrilo:Trietilamina (99.99:0.01:0.5), ajustada a pH 2.5 con ácido fosfórico.

Flujo: 1.7 ml/minuto

Volumen de inyección: 20 μL

Temperatura: 30 °C

Detección: 254 nm

Validación del método

Para la validación del método se obtuvo una curva de calibración con paracetamol standard, en una matriz preparada con un pool, tanto de saliva como de orina blanco, de los voluntarios que intervinieron en el estudio.

El rango de concentraciones para el caso de la saliva fue de 0.3-2.0 mg/L. Para ello se prepararon, por duplicado, dos soluciones madres de paracetamol standard (título 100%) de 250 $\mu\text{g/ml}$, pesando 25 mg de droga que se disolvieron en 100 ml de agua destilada. Se realizó una dilución de cada madre, de 1:50 con Fase Móvil (F.M.), de tal manera de obtener una concentración de 5 $\mu\text{g/ml}$. Se midieron 0.3 ml (1.5 μg); 0.5 ml (2.5 μg); 1 ml (5 μg); 1.4 ml (7 μg) y 2 ml (10 μg) de cada dilución, se les agregó a cada una, 1 ml de saliva blanco y se llevó a 5 ml con F.M., de tal manera de obtener las siguientes concentraciones de paracetamol: 0.3; 0.5; 1; 1.4 y 2 mg/L. Cada solución así obtenida se filtró por membrana de nylon de 0.45 μm y se inyectó por triplicado en el cromatógrafo. Los datos de Area/1000 obtenidos, en función de la concentración fueron analizados por regresión lineal, utilizando el programa Microsoft Excel 5.0, evaluándose linealidad y precisión.

El rango de concentraciones para la orina fue de 1-8 mg/L. Para ello se prepararon, por duplicado, dos soluciones madres de paracetamol standard (título 100%) de 250 µg/ml, pesando 25 mg de droga que se disolvieron en 100 ml de agua destilada. Se realizó una dilución, de cada madre, de 1:25 con agua destilada, de tal manera de obtener una concentración de 10 µg/ml. Se midieron 1 ml (10 µg); 2 ml (20 µg); 4 ml (40 µg); 6 ml (60 µg) y 8 ml (80 µg) de cada dilución, se les agregó a cada una 1 ml de orina blanco y se llevó a 10 ml con agua destilada, de tal manera de obtener las siguientes concentraciones de paracetamol: 1; 2; 4; 6 y 8 mg/L. Cada solución así obtenida se filtró por membrana de nylon de 0.45 µm y se inyectó por triplicado en el cromatógrafo. Los datos de Area/1000 obtenidos, en función de la concentración fueron analizados por regresión lineal, utilizando el programa Microsoft Excel 5.0, evaluándose linealidad y precisión.

Parámetros de Biodisponibilidad

A partir de los perfiles de concentración de paracetamol en saliva en función del tiempo, se obtuvieron los siguientes parámetros: C_{max} , máxima concentración de droga en saliva; T_{max} , tiempo de máxima concentración; $ABC_{(0-7)}$, área bajo la curva de niveles salivales de paracetamol versus tiempo, desde 0 a 7 horas, calculada mediante el método de los trapezoides, $ABC_{(0-\infty)}$ y MRT, tiempo medio de residencia, estimado por la relación entre el área bajo la curva del primer momento estadístico (AMBC) y el área bajo la curva (ABC).

A partir de los perfiles de excreción urinaria de paracetamol, se obtuvieron los siguientes parámetros: E_{15} , máxima cantidad de paracetamol excretada luego de 15 horas de ser administrado el comprimido; $(dE/dt)_{max}$, máxima velocidad de excreción y t_{max} , tiempo de máxima velocidad.

Análisis estadístico

Se calcularon los valores medios de los parámetros arriba mencionados con sus respectivas desviaciones standards. Para los valores normalmente distribuidos se aplicaron los test paramétricos: t-Student, análisis de varianza (ANOVA) (Sokal y Rohlf, 1984) y el intervalo de confianza del 90%, basado en el Test de la Hipótesis Intervalar. (Steinijans y Diletti, 1983)

Para los valores que no siguen una distribución normal se utilizó el test no paramétrico de Wilcoxon. (Sokal y Rohlf, 1984)

PLANILLA 1

ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE PARACETAMOL**Muestras de saliva y orina****Ayuno:**

Desde las 22:00 hs. del día anterior a la toma de muestra. (Aproximadamente 12 hs de ayuno.)

Toma de muestra:

1. Recolectar muestras de saliva y orina antes de tomar el comprimido y colocarlas en el tubo eppendorf, llenándolo, y en el frasco, respectivamente, rotulados como T₀. En el caso de la orina no importa el volumen orinado, tratar de que esta muestra no corresponda a la primera del día.

2. Tomar el comprimido suministrado con abundante agua (un vaso entero de agua). Anotar el horario exacto de la toma en la planilla adjunta.

3. La primera muestra de saliva se tomará a los 15 minutos posteriores a la toma del comprimido (Tubo No.1) y la primera muestra de orina (Frasco No.1) se tomará a los 30 minutos posteriores a la toma del comprimido.

Seguir tomando muestras según indicación:

Muestra	Saliva	Orina
1	15 min.	30 min.
2	30 min.	1 h.
3	45 min.	2 h.
4	1 h.	3 h.
5	1.15 h.	4 h.
6	1.30 h.	5 h.
7	1.45 h.	7 h.
8	2 h.	9 h.
9	2.30 h.	15 h.
10	3 h.	-
11	3.30 h.	-
12	4 h.	-
13	5 h.	-
14	6 h.	-
15	7 h.	-

No olvidar registrar hora y volumen de cada muestra de orina en la planilla adjunta.

Alimentación del día del ensayo.

- Registrar la hora exacta de cada comida
- Desayuno: yoghurt o fruta.
- Almuerzo: carnes rojas con verduras. Agua.
- Merienda: jugo de fruta natural y tostadas con mermelada.
- Cena: pollo con ensalada. Agua.

Importante

- No ingerir te, café, mate, bebidas alcohólicas, medicamentos, durante el día del ensayo.
- Para cada muestra medir el total de la orina eliminada y colocar una pequeña cantidad en el recipiente rotulado suministrado, colocar en freezer.
- **No perder ninguna muestra.**

PLANILLA 2

ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE PARACETAMOL**Muestras de orina**

Frasco	Hora	Volumen
0		
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		

Hora en que tomó el comprimido:

Hora del desayuno:
Hora del almuerzo:
Hora de la merienda:
Hora de la cena:

Droga: Paracetamol
Especialidad:
Muestra: orina
Voluntario:
Edad:
Peso:

CALCULOS Y RESULTADOS

CALCULOS Y RESULTADOS

1.1. Estudio de la influencia del aglutinante y del desintegrante sobre la disolución de comprimidos de paracetamol. Ensayos *in vitro*.

1.1.1. Curva de calibración del método de absorción al UV a 244 nm, para determinar el contenido de paracetamol y para realizar el seguimiento de la disolución de los comprimidos, en medio buffer fosfato pH 5.8, método de regresión lineal.

La linealidad de la curva de calibración fue encontrada en el rango de concentraciones entre 4 - 12 µg/ml .

Los valores de Absorbancia a 244 nm para cada una de las soluciones de paracetamol standard preparadas, fueron:

Primera Réplica		Segunda Réplica	
Concentración (µg/ml)	A ₂₄₄	Concentración (µg/ml)	A ₂₄₄
4,00	0,254	4,00	0,256
6,00	0,375	6,00	0,368
8,00	0,507	6,00	0,504
10,00	0,627	10,00	0,629
12,00	0,765	12,00	0,762

El intercepto con el eje de las ordenadas (a) y la pendiente (b) con sus respectivos intervalos de confianza del 95%, fueron:

$$a = - 0.00421 \pm 0.0109$$

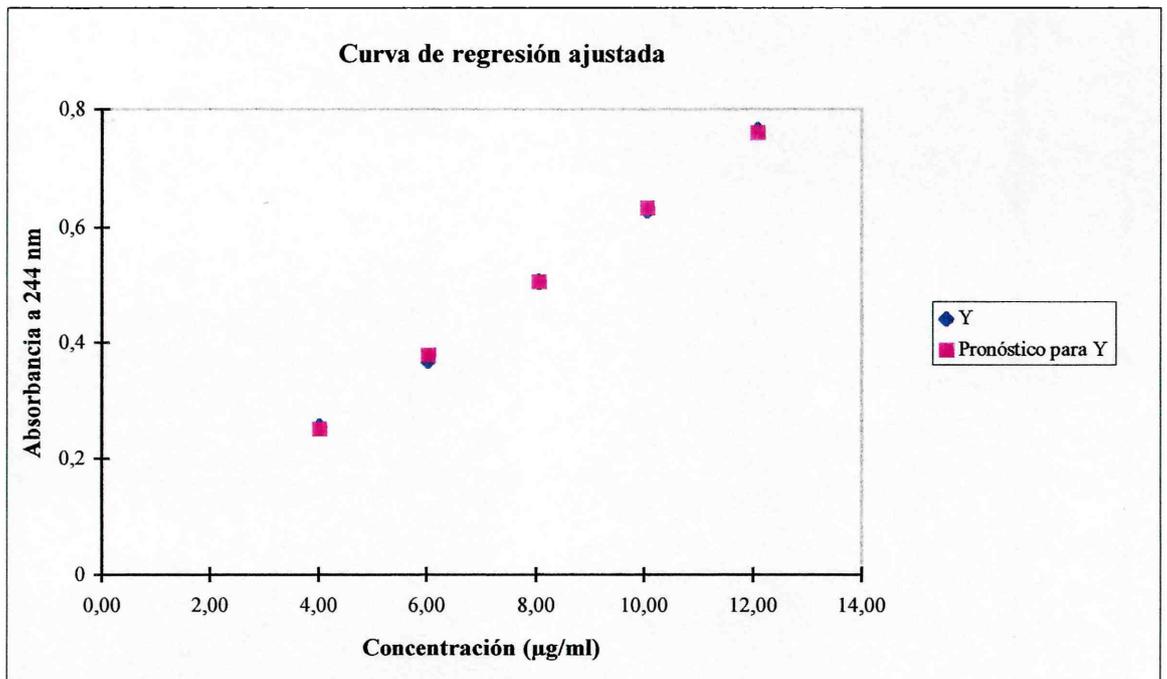
$$b = 0,06314 \pm 0.00128$$

con un coeficiente de correlación $r = 0.9997$ (Figura 1)

Con el fin de confirmar el análisis de regresión se realizó un Análisis de Residuales (Ri) , método gráfico por el cual la relación Ri vs. Concentración nos debe dar un modelo aleatorio de distribución y además la sumatoria de los Ri debe ser próxima a cero. Se encontró un valor de la sumatoria de: $\sum Ri = -9,992 \times 10^{-16}$ (Figura 2)

FIGURA 1

Curva de Calibración de paracetamol por el método de Absorción al UV
a 244 nm



Rango = 4 - 12 µg/ml

Ordenada al origen (a) y Pendiente (b) con sus respectivos intervalos de confianza del 95% :

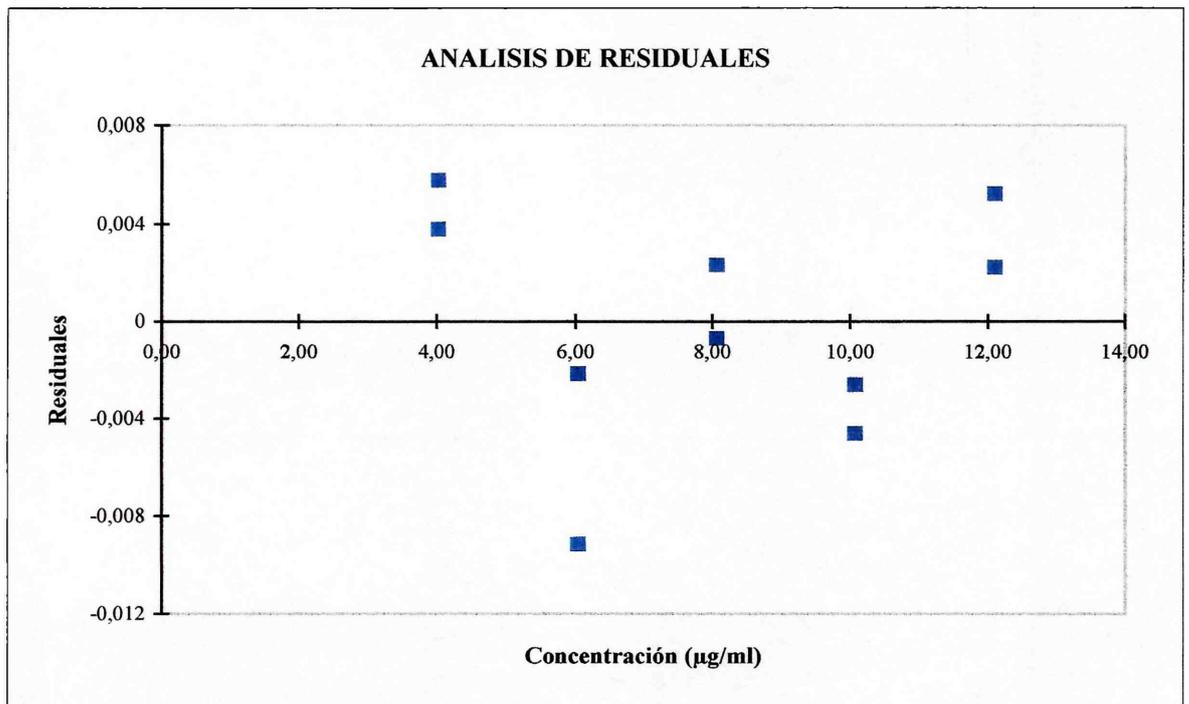
$$a = - 0,00421 \pm 0,0109$$

$$b = 0,06314 \pm 0,00128$$

Coefficiente de Correlación (r) = 0,9997

FIGURA 2

Método gráfico de Residuales para establecer linealidad en la curva de calibración de paracetamol por Absorción al UV a 244 nm



Sumatoria de Residuales = - 9,992E-16

Con la misma finalidad se realizó el análisis del Factor Respuesta, es decir la relación entre la señal, en nuestro caso Absorbancia a 244 nm, con la concentración, que en función de la misma, debe mantenerse constante a lo largo del rango de concentraciones de la curva de calibración. (Figura 3)

Ambos análisis, así como el coeficiente de correlación obtenido, han confirmado que el modelo usado para nuestro método analítico es lineal. (Myers, 1986)

1.1.2. Cálculo del contenido de paracetamol en cada una de las partidas, de todas las formulaciones ensayadas. El control se realizó por quintuplicado, utilizando la curva de calibración obtenida, mediante la siguiente ecuación:

$$C\% = \frac{(A_{244} - a)}{b} \cdot 2500 \cdot \frac{100}{P}$$

donde:

$C\%$ = Porcentaje del valor declarado de paracetamol en los comprimidos

A_{244} = Absorbancia a 244 nm de la solución preparada con el pulverizado de los comprimidos

a = ordenada al origen de la curva de calibración

b = pendiente de la curva de calibración

2500 = corrección por dilución

P = Cantidad declarada de paracetamol en la alícuota de pulverizado

Los resultados de la valoración de los comprimidos de paracetamol ensayados, expresados como porcentaje del valor declarado \pm desviación típica de la media, para $n = 5$, figuran en la **Tabla 2** :

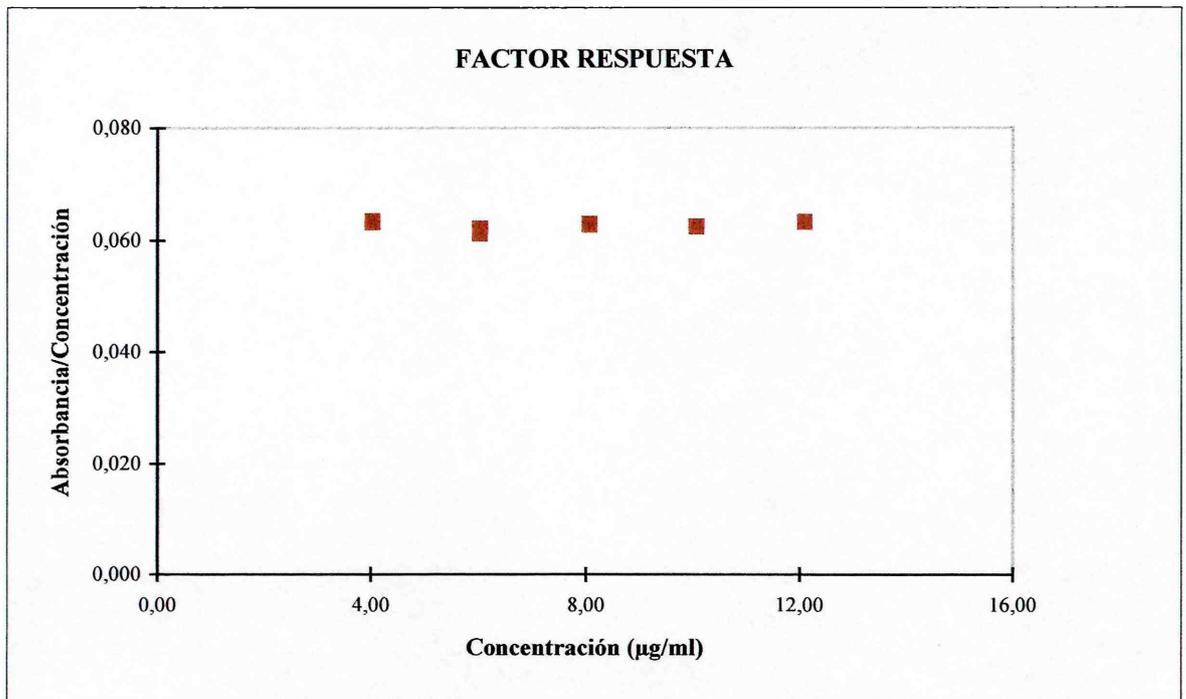
UPM ₀₁	UPM ₀₂	UPM ₀₃	Lab.A	Lab.B	Lab.C	Lab.D	Lab.E	Lab.F
108.8 \pm 0.74	105.6 \pm 0.32	106.2 \pm 0.74	103.2 \pm 0.47	103.2 \pm 0.31	103.1 \pm 0.68	93.81 \pm 0.43	106.1 \pm 0.57	87.45 \pm 1.2

TABLA 2. Control del contenido de Paracetamol en los comprimidos ensayados. Los valores tabulados corresponden al valor medio \pm Sm, expresados como porcentaje de la cantidad declarada de paracetamol.

Sm: desviación típica de la media

FIGURA 3

Análisis del Factor Respuesta para establecer linealidad en la curva de calibración de paracetamol por el método de Absorción al UV a 244 nm



Los resultados de los ensayos de resistencia a la rotura y de tiempo de desintegración para todos los comprimidos ensayados figuran en la **Tabla 3**

Comprimidos	td ± Sm	RR ± Sm
UPM ₀₁	1.04 ± 0.02	20.03 ± 0.6
UPM ₀₂	3.75 ± 0.55	22.33 ± 0.5
UPM ₀₃	16.6 ± 1.35	17.83 ± 1.2
Lab. A	5.57 ± 0.86	7.85 ± 0.4
Lab. B	1.44 ± 0.06	14.07 ± 1.0
Lab. C	5.00 ± 0.45	13.5 ± 0.7
Lab. D	0.2 ± 0.02	12.38 ± 0.3
Lab. E	19.13 ± 3.3	25.33 ± 0.5
Lab. F	1.34 ± 0.56	5.88 ± 0.3

TABLA 3. Valores medios de Tiempo de Desintegración y de Resistencia a la Rotura.
 td: Tiempo de Desintegración, expresado en minutos
 RR: Resistencia a la Rotura, expresada en kg/pulg²
 Sm: Desviación típica de la media.

1.1.3. Cálculo de la concentración de paracetamol disuelta a cada tiempo en el ensayo de disolución, expresada como mg/900ml :

$$C_{ti} = \frac{(A_{244} - a)}{b} \cdot \frac{50}{1000} \cdot 900 + \text{Auxiliar}$$

donde:

- C_{ti} = Concentración de Paracetamol a tiempo t_i
- A_{244} = Absorbancia a 244 nm de cada alícuota muestreada a los distintos tiempos
- a = ordenada al origen de la curva de calibración
- b = pendiente de la curva de calibración
- 50 = corrección por dilución
- 1000 = conversión de μg a mg
- 900 = volumen total del medio de disolución
- Auxiliar* = corrección por cada alícuota de 5 ml muestreada, siendo:
 $\text{Auxiliar} = (\mu\text{g}/5 \text{ ml})_{ti} + (\mu\text{g}/5 \text{ ml})_{t(i-1)}$

Un modelo de la hoja de cálculo para obtener la concentración de paracetamol disuelta a cada tiempo, en el ensayo de disolución *in vitro*, aparece en la **Tabla 4**, siendo el correspondiente a la partida de comprimidos UPM₀₃. De igual manera se procedió para el resto de los comprimidos.

1.1.4. Cálculo del porcentaje del valor declarado de paracetamol disuelto a cada tiempo en el ensayo de disolución:

$$C_n \% = \frac{(A_{244} - a)}{b} \cdot \frac{50}{1000} \cdot 900 + \text{Auxiliar} \cdot \frac{100}{C_\infty}$$

donde: C_∞ = Concentración declarada de paracetamol

Con los porcentajes de paracetamol disueltos a cada tiempo, se trazaron los perfiles de disolución, para cada partida de los comprimido ensayados, los cuales aparecen en las **Figuras 4, 5 y 6**.

1.1.5. Determinación del orden cinético con que se disuelve el paracetamol, calculado mediante la obtención de los coeficientes de correlación de las relaciones Cantidad de paracetamol disuelta en función del tiempo, es decir: C_t vs. t (orden cero), y del logaritmo de la cantidad no disuelta de paracetamol en función del tiempo, es decir: $\lg(1 - (C_t/C_\infty))$ vs. t ; donde C_t es la concentración de paracetamol a tiempo t , expresada en mg/900 ml y C_∞ es la concentración declarada de paracetamol, expresada en mg/900 ml, (primer orden).

1.1.6. Determinación de la constante de disolución (**kd**) de paracetamol y del tiempo en el que se disuelve el 50% de la droga (**t_{50%}**) a partir de conocer la cinética con que se disuelve el paracetamol, según las siguientes ecuaciones:

Para orden cero: $kd = \frac{C_t}{t}$

$$t_{50\%} = \frac{C_\infty}{2kd}$$

Para primer orden: $kd = -\lg\left[1 - \left(\frac{C_t}{C_\infty}\right)\right] \cdot \frac{2.303}{t}$

$$t_{50\%} = \frac{0.693}{kd}$$

Todos los comprimidos ensayados conteniendo paracetamol, siguen una cinética de disolución de primer orden. En las **Figuras 7, 8 y 9** se grafica el logaritmo de la cantidad no disuelta de paracetamol en función del tiempo para todas las partidas estudiadas. Con las pendientes de las rectas obtenidas se han estimado las respectivas constantes de disolución de primer orden (**kd**).

Los valores de **kd** y de **t_{50%}**, calculados para todos los comprimidos ensayados, se encuentran tabulados en la **Tabla 5**.

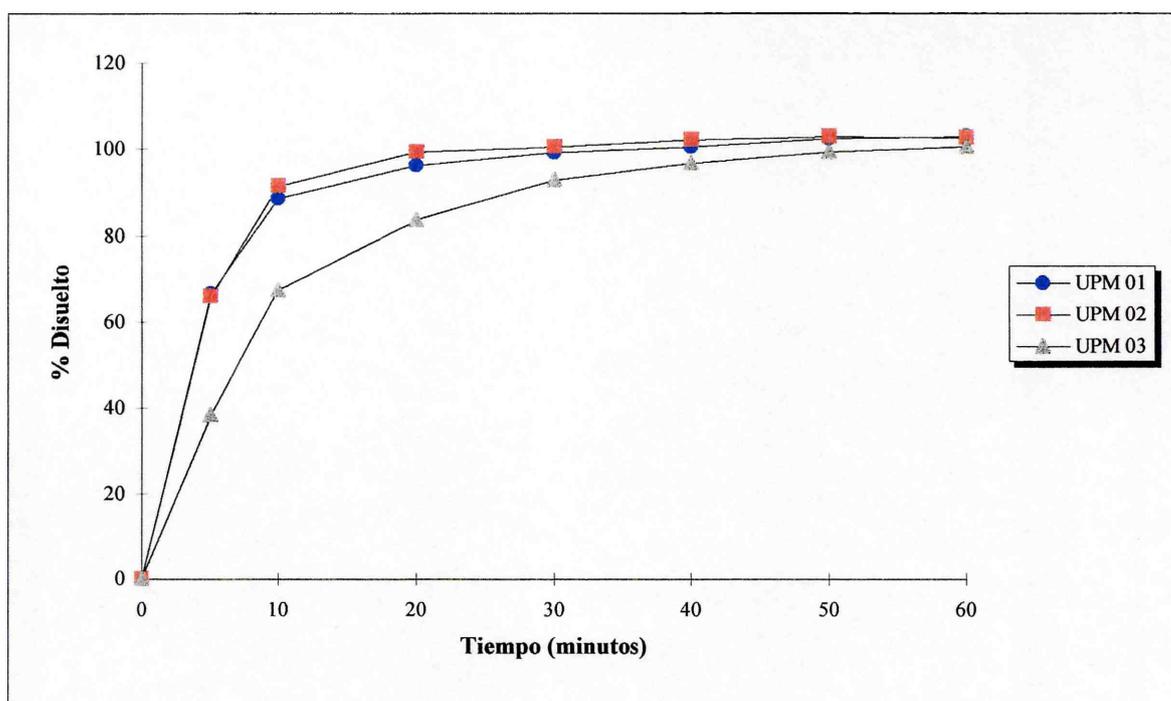
TABLA 4

Tiempo	A244	µg/ml	µg/5ml	Auxiliar	mg/900ml	%
Comprim. 1						
5	0,19	3,08	769,88	769,88	138,58	26,11
10	0,461	7,37	1841,74	2611,62	331,51	62,46
20	0,608	9,69	2423,15	5034,77	436,17	82,17
30	0,705	11,23	2806,80	7841,57	505,22	95,18
40	0,742	11,81	2953,15	10794,72	531,57	100,14
50	0,769	12,24	3059,94	13854,65	550,79	103,77
60	0,761	12,11	3028,30	16882,95	545,09	102,69
Comprim. 2						
5	0,354	5,67	1418,53	1418,53	255,34	48,10
10	0,54	8,62	2154,20	3572,73	387,76	73,05
20	0,72	11,46	2866,13	6438,86	515,90	97,19
30	0,743	11,83	2957,10	9395,96	532,28	100,28
40	0,743	11,83	2957,10	12353,06	532,28	100,28
50	0,743	11,83	2957,10	15310,17	532,28	100,28
60	0,746	11,88	2968,97	18279,13	534,41	100,68
Comprim. 3						
5	0,441	7,05	1762,63	1762,63	317,27	59,77
10	0,535	8,54	2134,42	3897,05	384,20	72,38
20	0,607	9,68	2419,20	6316,25	435,46	82,04
30	0,69	10,99	2747,48	9063,73	494,55	93,17
40	0,707	11,26	2814,71	11878,44	506,65	95,45
50	0,733	11,67	2917,55	14795,99	525,16	98,94
60	0,742	11,81	2953,15	17749,14	531,57	100,14
Comprim. 4						
5	0,191	3,10	773,83	773,83	139,29	26,24
10	0,456	7,29	1821,96	2595,79	327,95	61,78
20	0,613	9,77	2442,93	5038,72	439,73	82,84
30	0,716	11,40	2850,31	7889,03	513,06	96,66
40	0,76	12,10	3024,34	10913,37	544,38	102,56
50	0,774	12,32	3079,71	13993,0 ⁹	554,35	104,44
60	0,785	12,49	3123,22	17116,31	562,18	105,91
Comprim. 5						
5	0,282	4,54	1133,76	1133,76	204,08	38,45
10	0,556	8,87	2217,48	3351,24	399,15	75,20
20	0,644	10,26	2565,54	5916,77	461,80	87,00
30	0,706	11,24	2810,76	8727,53	505,94	95,32
40	0,728	11,59	2897,77	11625,31	521,60	98,27
50	0,749	11,92	2980,83	14606,14	536,55	101,08
60	0,75	11,94	2984,79	17590,93	537,26	101,22
Comprim. 6						
5	0,305	4,90	1224,73	1224,73	220,45	41,53
10	0,561	8,95	2237,26	3461,98	402,71	75,87
20	0,66	10,52	2628,82	6090,80	473,19	89,15
30	0,691	11,01	2751,43	8842,24	495,26	93,30
40	0,723	11,51	2878,00	11720,23	518,04	97,60
50	0,736	11,72	2929,42	14649,65	527,29	99,34
60	0,751	11,95	2988,74	17638,39	537,97	101,35

TABLA 4. Concentraciones de paracetamol disueltas a cada tiempo.
Comprimidos UPM03 conteniendo 530,8 mg de paracetamol.

FIGURA 4

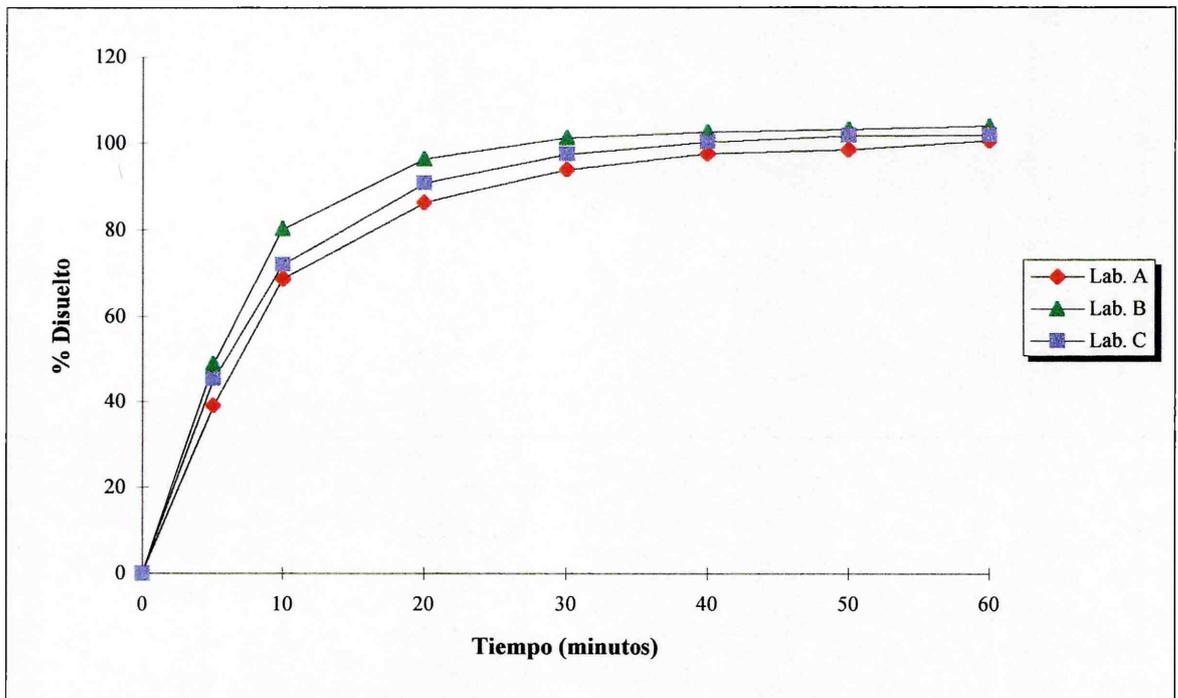
Perfiles de disolución de los comprimidos de Paracetamol UPM



Perfiles de disolución correspondientes a los porcentajes medios, para n=6,
de los comprimidos elaborados en la UPM

FIGURA 5

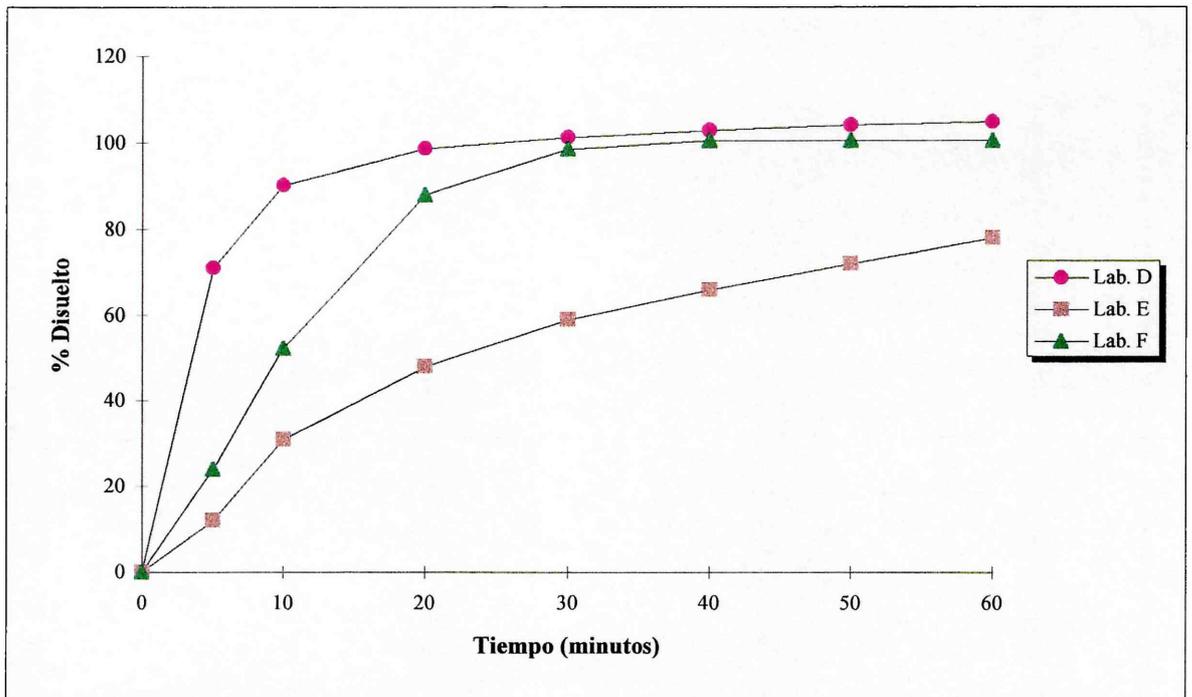
Perfiles de disolución de los comprimidos de Paracetamol de los Laboratorios A, B y C



Perfiles de disolución correspondientes a los porcentajes medios, para $n=6$, de los comprimidos de los Laboratorios A, B y C

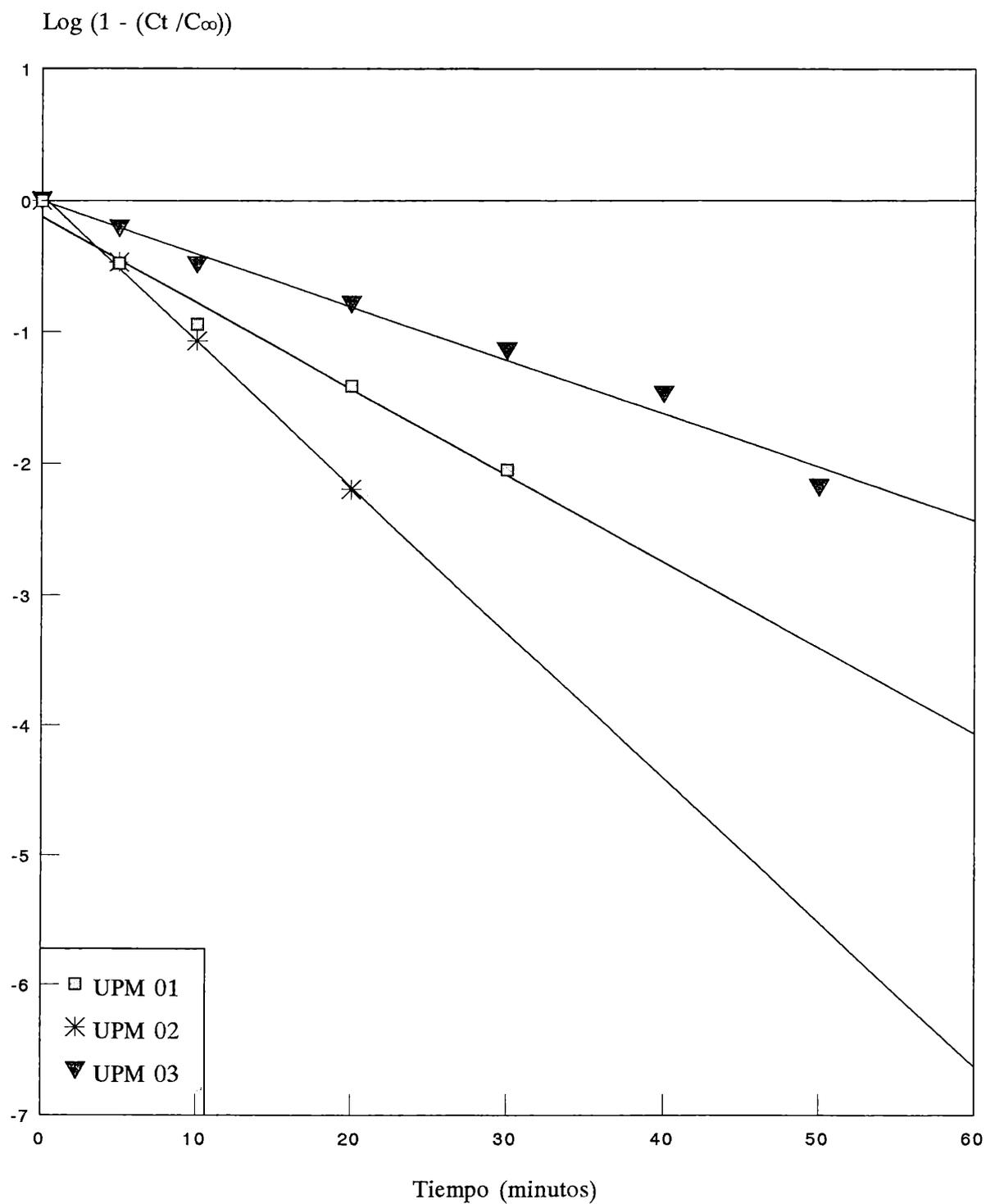
FIGURA 6

Perfiles de disolución de los comprimidos de Paracetamol de los Laboratorios D, E y F



Perfiles de disolución correspondientes a los porcentajes medios, para n=6,
de los comprimidos de los Laboratorios D, E y F

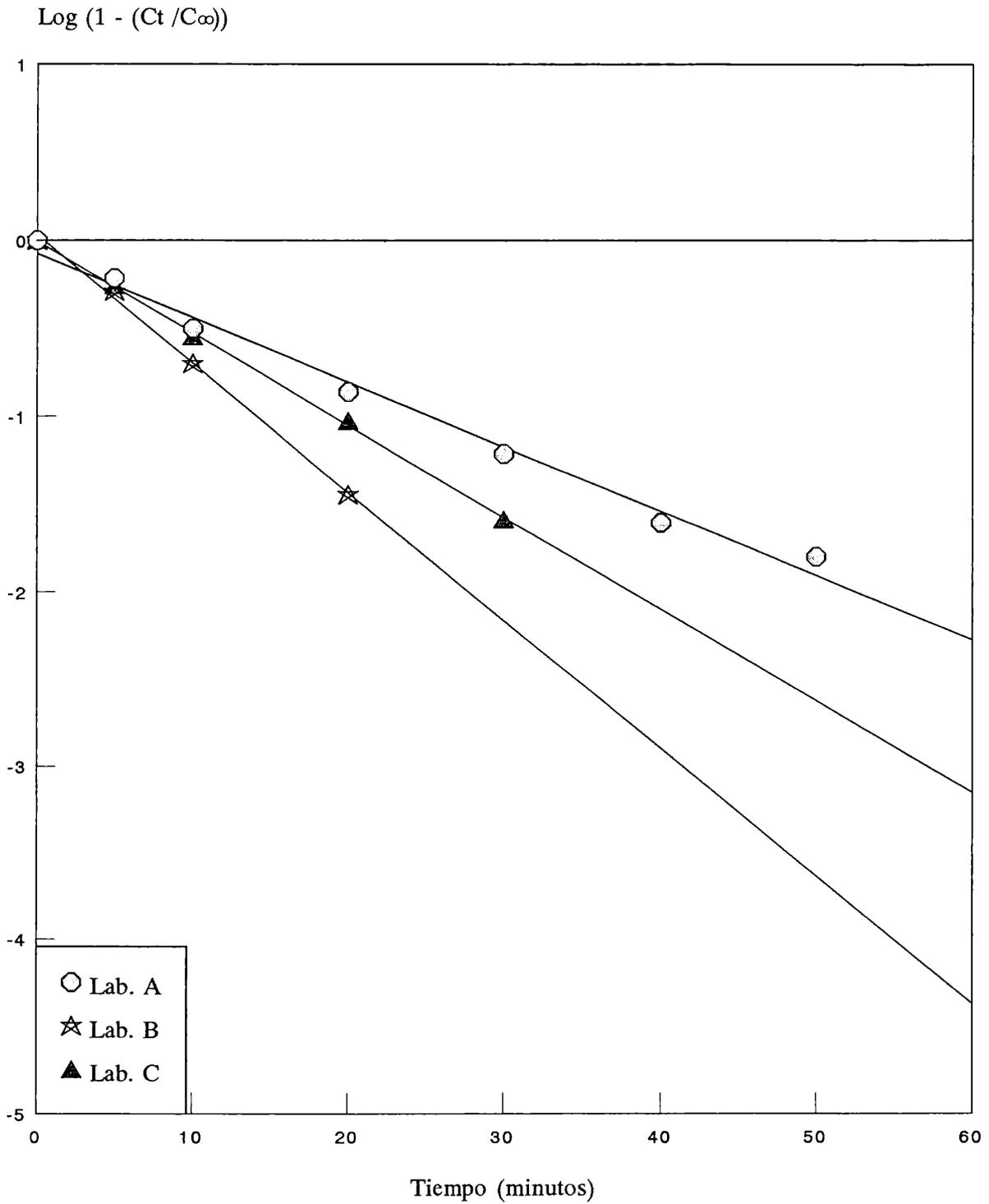
FIGURA 7
 Logaritmo cantidad no disuelta de paracetamol en función del tiempo
 Comprimidos UPM



UPM 01: a=-0.2405 b=-0.0604 r=0.9943
 UPM 02: a= 0.0956 b=-0.1149 r=0.9998
 UPM 03: a=-0.0007 b=-0.0406 r=0.9885

FIGURA 8

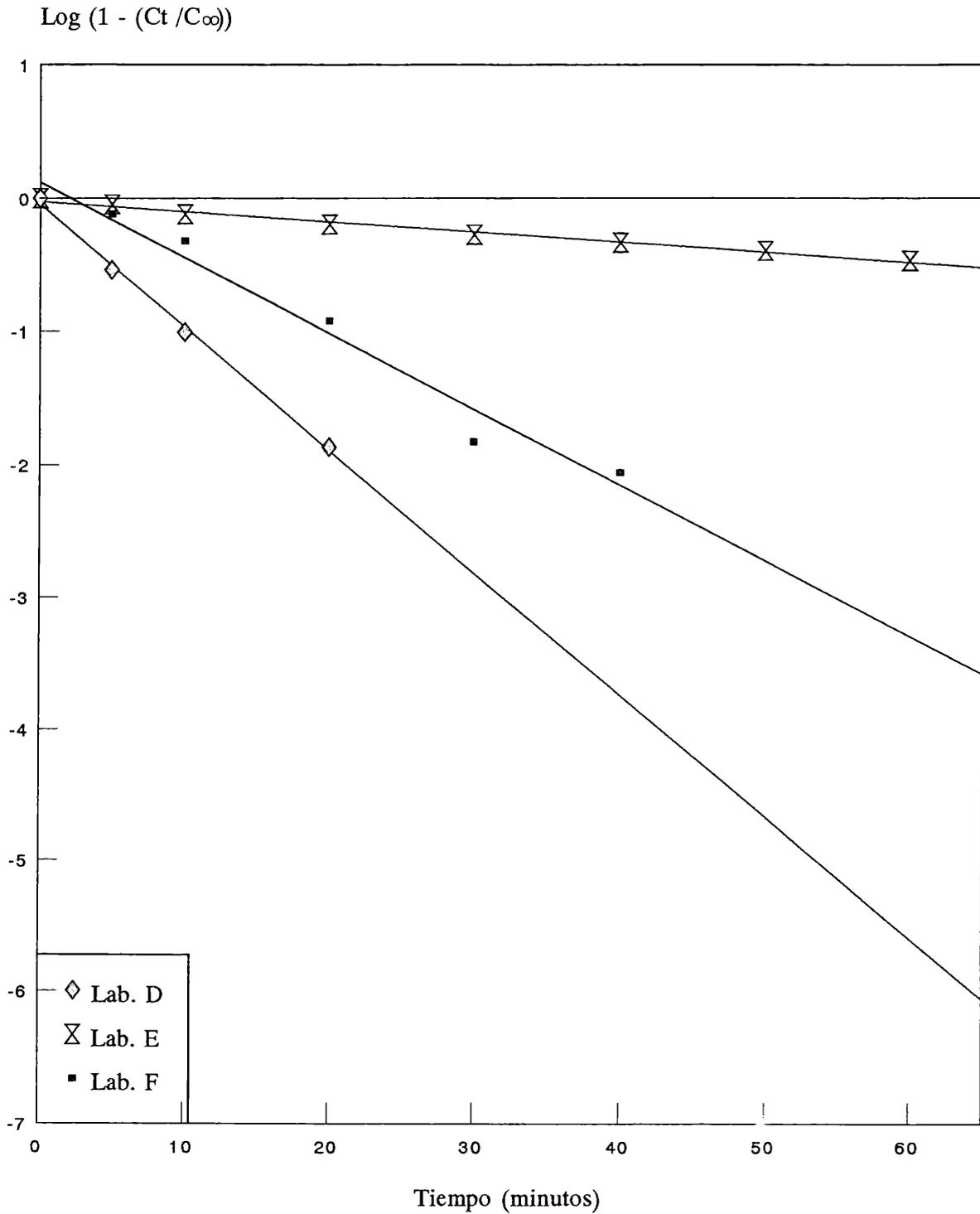
Logaritmo cantidad no disuelta de paracetamol en función del tiempo
Comprimidos Laboratorios A, B y C



Lab. A: a=-0.1191 b=-0.0354 r=0.9942
Lab. B: a= 0.0766 b=-0.0764 r=0.9996
Lab. C: a=-0.0069 b=-0.0523 r=0.9994

FIGURA 9

Logaritmo cantidad no disuelta de paracetamol en función del tiempo
Comprimidos Laboratorios D, E y F



Lab. D: a=-0.1113 b=-0.0879 r=0.9997

Lab. E: a=-0.0372 b=-0.0073 r=0.9945

Lab. F: a= 0.3142 b=-0.0684 r=0.9897

1.1.7. Determinación de la cantidad disuelta de paracetamol a los 30 minutos, que de acuerdo con la normativa de USP 23 no debe ser inferior al 80% de la cantidad total (Q_{30}), calculada mediante la ecuación:

$$Q_{30} = \frac{(A_{30} - a)}{b} \cdot \frac{50}{1000} \cdot 900 + \text{Auxiliar} \cdot \frac{100}{C_{\infty}}$$

donde: A_{30} = Absorbancia a 244 nm de la alícuota correspondiente a los 30 minutos.

Los valores de Q_{30} obtenidos figuran en la **Tabla 5**.

1.1.8. Determinación del porcentaje total de paracetamol disuelto al término de la experiencia, es decir, 60 minutos. (**Fd%**), calculado mediante la ecuación:

$$Fd\% = \frac{(A_{60} - a)}{b} \cdot \frac{50}{1000} \cdot 900 + \text{Auxiliar} \cdot \frac{100}{C_{\infty}}$$

donde: A_{60} = Absorbancia a 244 nm de la alícuota correspondiente a los 60 minutos.

Los porcentajes totales disueltos al cabo de los 60 minutos de cada ensayo de disolución (**Fd%**) figuran en la **Tabla 5**.

1.1.9. Determinación de la Eficiencia de Disolución (**ED%**), calculada mediante la siguiente expresión:

$$ED\% = \frac{ABC}{t \cdot Q_{100}} \cdot 100$$

donde:

ABC = Área bajo la curva de disolución

Q_{100} = Cantidad correspondiente al 100% de paracetamol disuelto

t = Tiempo máximo elegido para el cálculo del ABC, en nuestro caso 60 minutos.

1.1.9.1. Cálculo del ABC mediante el método de los trapezoides el cual consiste en dividir la curva en tantos trapezios como datos de cantidad disuelta de droga se dispongan, determinar el área de cada trapezio y luego sumarlos.

$$\text{AreaTrapezio} = \sum \frac{C_i + C_{(i+1)}}{2} \cdot (t_{(i+1)} - t_i)$$

donde:

C_i = Concentración disuelta a cualquier tiempo t_i

$C_{(i+1)}$ = Concentración disuelta al tiempo siguiente $t_{(i+1)}$

La ED% para cada partida de comprimidos figuran en la **Tabla 5**.

1.1.10. Cálculo del Tiempo Medio de Disolución (MDT) mediante la siguiente ecuación:

$$MDT = \frac{\int_0^{60} t \cdot \frac{dC}{dt}}{\int_0^{60} \frac{dC}{dt}}$$

Los valores de MDT para cada partida de comprimidos figuran en la **Tabla 5**.

1.1.11. Aplicación de un ANOVA con los valores medios de ED% entre los comprimidos elaborados en la UPM y los de los distintos Laboratorios del mercado, con el objeto de analizar si existen diferencias significativas entre las distintas formulaciones (*Sokal y Rohlf, 1984*).

Aplicación del método de comparación múltiple de la Mínima Diferencia Significativa (LSD), basado en la prueba t de Student, a fin de establecer cuales son los valores medios de ED% que difieren entre sí. (*Cid Cárcamo, 1982*)

En la **Tabla 6** se detalla el ANOVA realizado con los valores de ED% de todos los comprimidos analizados y en la **Tabla 7**, el resultado del Test de la Mínima Diferencia Significativa (LSD).

En el capítulo de discusión se analizan los resultados encontrados.

TABLA 5

Comprimidos	kd	t 50%	Q30 ± Sm	Fd% ± Sm	ED% ± Sm	MDT
UPM 01	0,1389	4,99	99,14 ± 0,83	102,87 ± 0,4	91,48 ± 0,96	33,44 ± 0,88
UPM 02	0,2648	2,62	100,45 ± 0,19	102,62 ± 0,45	92,88 ± 0,31	32,51 ± 0,06
UPM 03	0,0935	7,41	92,88 ± 0,97	101,99 ± 0,66	82,15 ± 0,77	34,33 ± 0,29
Lab. A	0,0816	8,49	93,87 ± 0,86	100,46 ± 0,89	84,24 ± 0,98	36,91 ± 1,59
Lab. B	0,1758	3,94	101,25 ± 0,5	103,82 ± 0,58	87,38 ± 2,46	34,61 ± 0,99
Lab. C	0,1205	5,75	97,45 ± 0,66	101,88 ± 0,55	86,27 ± 0,91	33,88 ± 0,18
Lab. D	0,2026	3,42	101,19 ± 0,29	104,8 ± 0,43	93,29 ± 0,41	32,74 ± 0,26
Lab. E	0,0169	40,9	59,03 ± 3,71	78,41 ± 5,47	50,17 ± 3,53	37,62 ± 0,43
Lab. F	0,1575	4,39	98,51 ± 0,46	100,42 ± 0,98	81,37 ± 0,55	35,19 ± 0,13

TABLA 5. Parámetros de disolución calculados para los comprimidos de paracetamol analizados.

La kd está expresada en 1/minutos

El t 50% está expresado en minutos

El MDT está expresado en minutos

Sm : Desviación típica de la media para n = 6

TABLA 6

Origen de la Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	F
Entre laboratorios	19441,04	8	2430,13	107,56
Error	1016,67	45	22,59	
Total	20457,7	53	385,99	

TABLA 6. Resultado del análisis de varianza realizado con los valores medios de ED% de todos los comprimidos de paracetamol ensayados.
 $F_{0,05}(8,45) = 2.34$

TABLA 7

		Lab.D	UPM 02	UPM 01	Lab.B	Lab.C	Lab.A	UPM 03	Lab.F	Lab.E
	ED%	93,29	92,88	88,71	87,38	86,27	84,11	82,15	81,37	50,17
Lab.D	93,29	0								
UPM 02	92,88	0,41	0							
UPM 01	88,71	4,58	4,17	0						
Lab.B	87,38	5,91	5,5	1,33	0					
Lab.C	86,27	7,02	6,61	2,44	1,11	0				
Lab.A	84,11	9,18	8,77	4,6	3,27	2,16	0			
UPM 03	82,15	11,14	10,73	6,56	5,23	4,12	1,96	0		
Lab.F	81,37	11,92	11,51	7,34	6,01	4,9	2,74	0,78	0	
Lab.E	50,17	43,12	42,71	38,54	37,21	36,1	33,94	31,98	31,2	0

TABLA 7. Aplicación del método de comparación múltiple basado en la Mínima Diferencia Significativa (LSD), utilizando los valores medios de ED% de los comprimidos de paracetamol.

(LSD) 0.05, 45 = 5.54

1.2. Estudios de biodisponibilidad relativa de comprimidos de paracetamol, utilizando saliva y orina como fluidos biológicos.

1.2.1. Cálculo de las concentraciones de paracetamol disueltas a cada tiempo de muestreo en el ensayo *in vitro*, tanto en medio buffer fosfato pH 5.8, es decir el medio oficial de USP 23, como en HCl 0.1 N, medio alternativo ensayado para confirmar correlaciones *in vitro-in vivo*, según se indicó en 1.1.3. y 1.1.4.

En la **Figura 10** se muestran los perfiles de disolución *in vitro*, en los dos medios de disolución ensayados, buffer fosfato pH 5.8 y HCl 0.1 N y en la **Tabla 8** aparecen los porcentajes disueltos a los 30 y a los 60 minutos, en ambos medios y para las dos formulaciones, con sus respectivos valores medios y sus desviaciones standards, para n = 6.

1.2.2. Cálculo de la curva de calibración del método por HPLC para determinar los niveles de paracetamol en las muestras de **saliva**:

La linealidad de la curva de calibración por HPLC, para realizar el seguimiento de los niveles de paracetamol en saliva, fue encontrada en el rango de concentraciones entre 0.3 - 2.0 mg/L .

Los valores de Area/1000 para cada una de las soluciones de paracetamol standard preparadas en saliva blanco, fueron:

Primera Réplica		Segunda Réplica	
Concentración (mg/L)	Area/1000 ^(*)	Concentración (mg/L)	Area/1000 ^(*)
0,3	12,24	0,3	13,86
0,5	22,64	0,5	23,95
1,0	44,59	1,0	47,02
1,4	61,57	1,4	64,76
2,0	88,77	2,0	92,99

(*) Valor medio de tres inyecciones de la misma solución standard

El intercepto con el eje de las ordenadas (a) y la pendiente (b), con sus respectivos intervalos de confianza del 95%, fueron:

$$a = 0.013 \pm 2.32$$

$$b = 45.41 \pm 1.92$$

con un coeficiente de correlación $r = 0.9986$ (**Figura 11**)

FIGURA 10
Perfiles de disolución in vitro de las Formulaciones A y B conteniendo Paracetamol, en Buffer Fosfato pH 5.8 y HCl 0.1 N

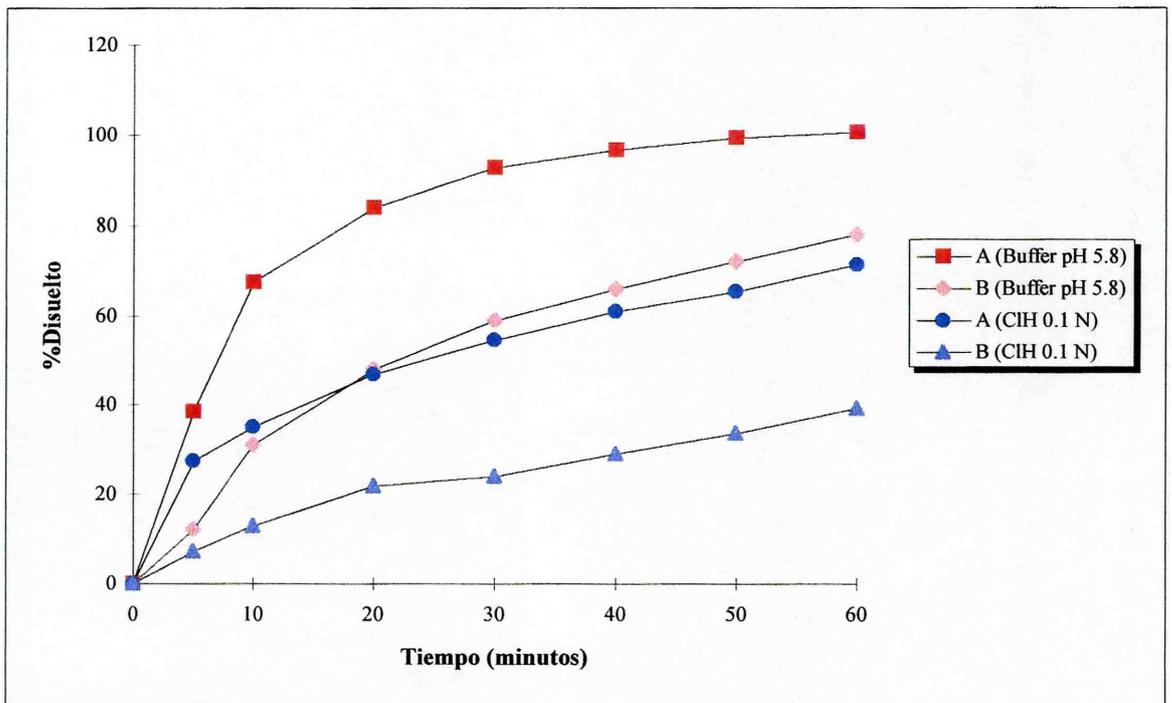


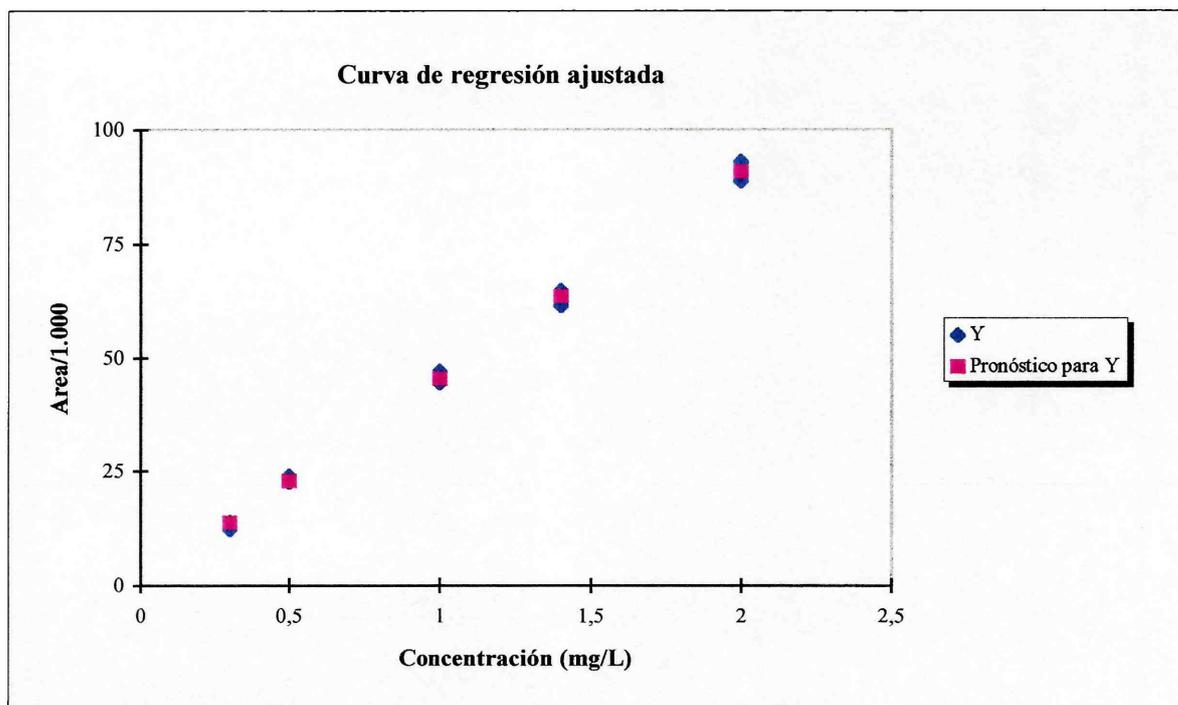
TABLA 8

TIEMPO (minutos)	A		B	
	Buffer fosfato	HCl 0,1 N	Buffer fosfato	HCl 0,1 N
30	92,88 ± 0,97	54,63 ± 2,9	59,03 ± 3,71	23,95 ± 4,31
60	101,99 ± 0,66	71,32 ± 6,08	78,71 ± 5,47	39,39 ± 4,29

TABLA 8. Porcentajes medios de paracetamol disueltos a los 30 y a los 60 minutos en los medios de disolución ensayados, buffer fosfato pH 5.8 y HCl 0.1N con las desviaciones típicas del valor medio ($\pm S_m$) para $n = 6$

FIGURA 11

Curva de Calibración de Paracetamol en saliva por HPLC



Rango = 0,3 - 2 mg/L

Ordenada al origen (a) y Pendiente (b) con sus respectivos intervalos de confianza del 95%:

$$a = 0,013 \pm 2,32$$

$$b = 45,41 \pm 1,92$$

Coefficiente de Correlación (r) = 0,9986

Con el fin de confirmar el análisis de regresión se realizó un Análisis de Residuales (R_i), método gráfico por el cual la relación R_i vs. Concentración nos debe dar un modelo aleatorio de distribución y además la sumatoria de los R_i debe ser próxima a cero. Se encontró un valor de : $\sum R_i = -3,553 \times 10^{-15}$ (**Figura 12**)

Con la misma finalidad se realizó el análisis del Factor Respuesta, es decir la relación entre la señal, en nuestro caso Area/1000, con la concentración, que en función de la misma, debe mantenerse constante a lo largo del rango de concentraciones de la curva de calibración. (**Figura 13**)

Ambos análisis, así como el coeficiente de correlación obtenido, han confirmado que el modelo usado para nuestro método analítico es lineal. (*Myers, 1986*)

En la **Figura 14** se puede observar un cromatograma tipo de la determinación de paracetamol en saliva, por el método de HPLC.

1.2.3. Cálculo de la Precisión del Sistema, expresada como el Coeficiente de Variación (CV) de cinco inyecciones de la misma solución de un standard de paracetamol en saliva blanco, siendo:

$$CV = \frac{S_{(n-1)}}{\bar{X}} \cdot 100$$

donde:

$S_{(n-1)}$ = desviación standard

\bar{X} = Promedio de los cinco valores de Area

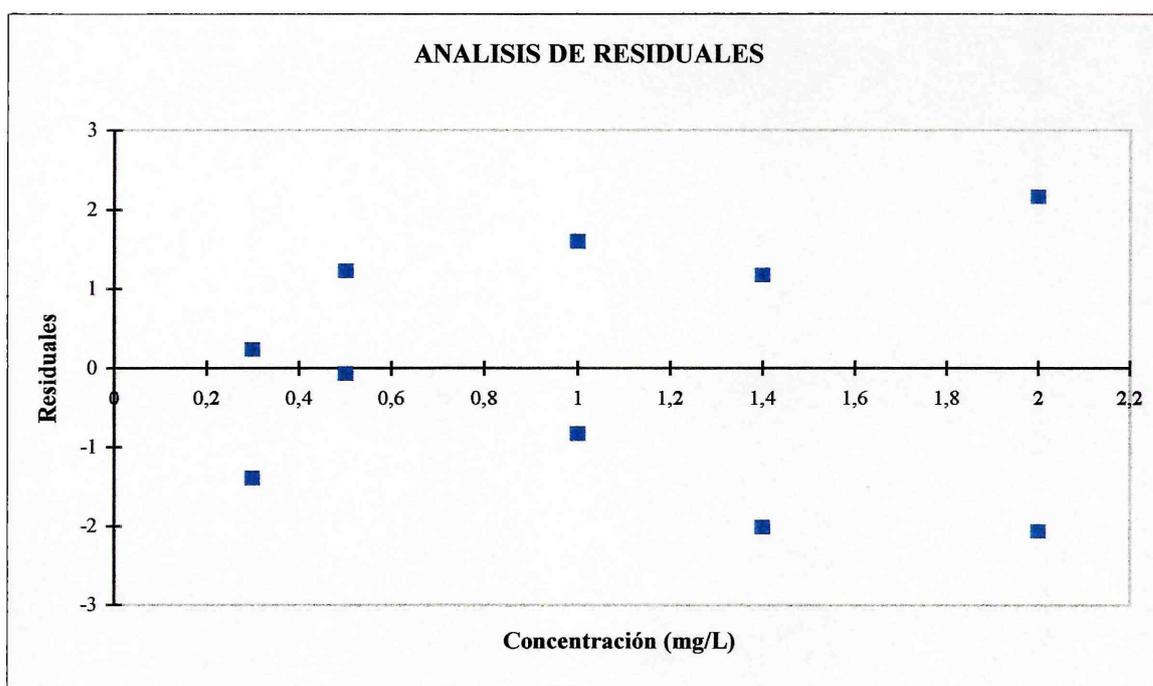
La precisión del sistema fue de 2.5 %, expresada como Coeficiente de Variación (CV)

1.2.4. Cálculo de la Precisión del método, expresada como el CV de cinco muestras de saliva conteniendo paracetamol standard.

La precisión del método fue de 5.2 %, también expresada como CV.

FIGURA 12

Método gráfico de Residuales para establecer linealidad en la curva de calibración de paracetamol en saliva por HPLC



Sumatoria de Residuales = - 3,553E-15

FIGURA 13
Análisis del Factor Respuesta para establecer linealidad en la curva de calibración de paracetamol en saliva por HPLC

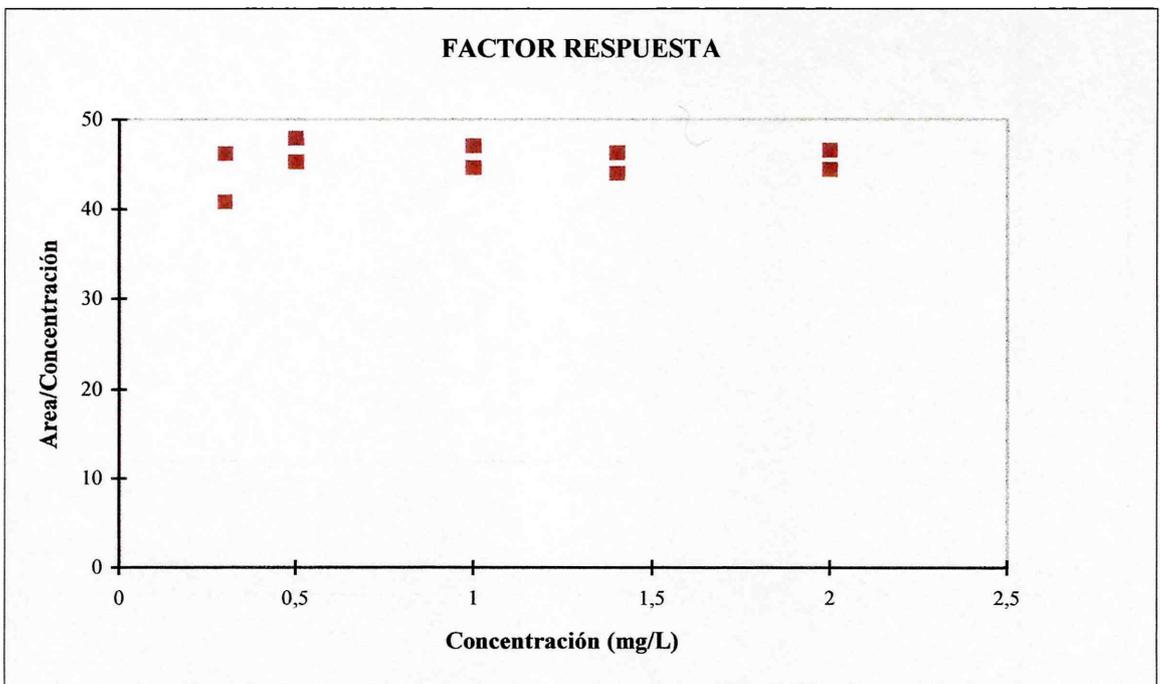
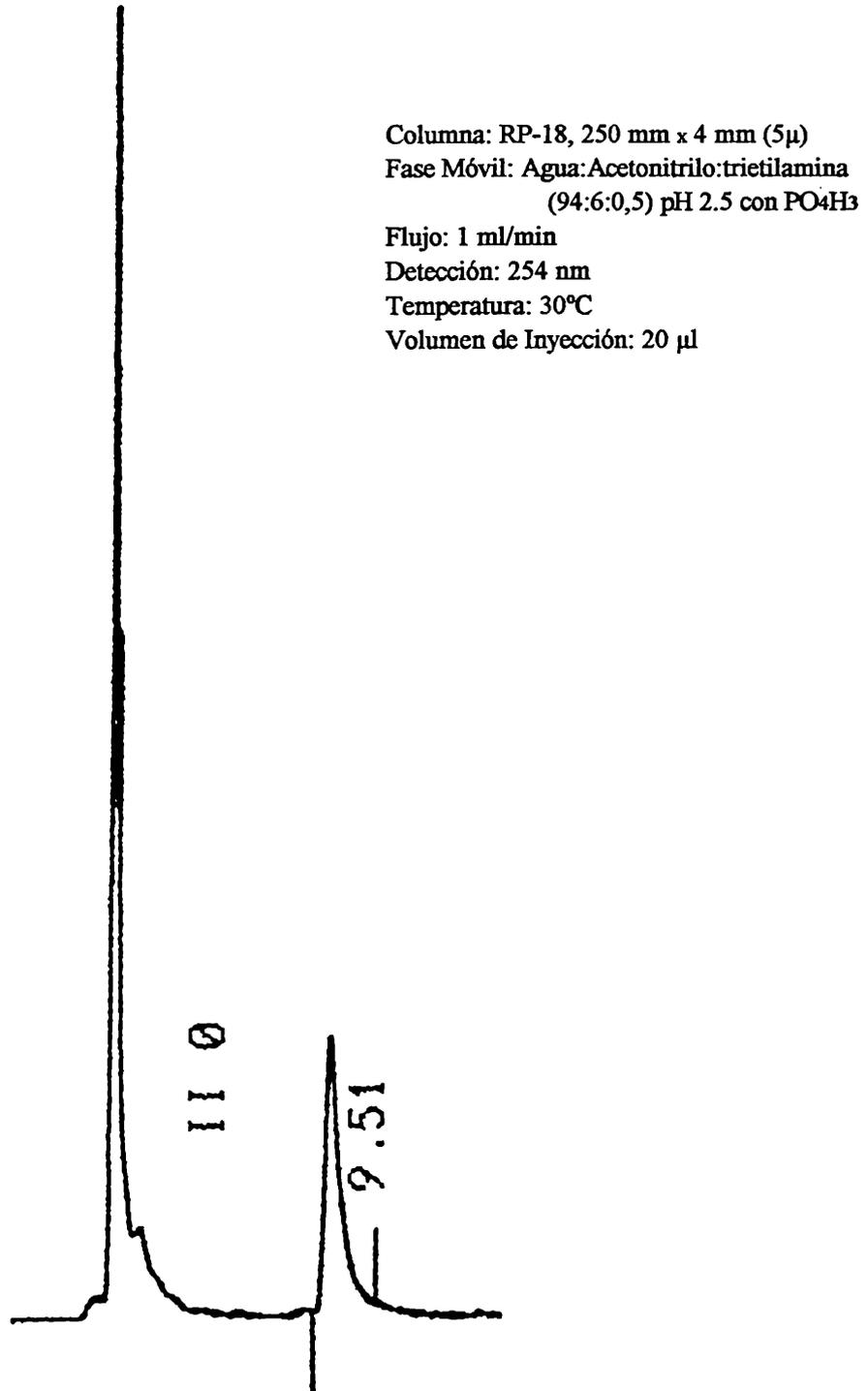


FIGURA 14
Cromatograma tipo de Paracetamol en saliva



Tiempo de retención de Paracetamol = 9.51

1.2.5. Cálculo de los niveles de paracetamol en saliva, expresándolos como concentración en mg/L, a cada tiempo de muestreo, mediante la utilización de la curva de calibración, realizada en saliva, de acuerdo a:

$$C_{ti} = \frac{(Area_{ti} - a)}{b} \cdot f$$

donde:

- C_{ti} = Concentración de paracetamol en saliva al tiempo de muestreo t_i
- $Area_{ti}$ = Area/1000 de la muestra correspondiente al tiempo t_i
- a = ordenada al origen de la curva de calibración
- b = pendiente de la curva de calibración
- f = factor de dilución

Un modelo de la hoja de cálculo para obtener las concentraciones de paracetamol en saliva a cada tiempo, aparece en la **Tabla 9**, siendo el correspondiente a la Formulación B. De igual manera se procedió para el resto de los comprimidos.

En la **Tabla 10** aparecen los valores de los niveles salivales de paracetamol obtenidos a todos los tiempos de muestreo, para cada sujeto y para cada formulación.

En la **Figura 15** se muestran los perfiles medios de niveles salivales de paracetamol en los cinco voluntarios, después de la administración de las dos formulaciones ensayadas.

1.2.6. Cálculos de los siguientes parámetros:

1.2.6.1. Cálculo del $ABC_{(0-7)}$: mediante el método de los trapezoides según se indicó en 1.1.9.1. En la **Figura 16** se representan los valores de $ABC_{(0-7)}$ para cada sujeto y para cada formulación.

1.2.6.2. Cálculo del Tiempo Medio de Residencia (MRT): a partir del cociente entre el área del primer momento de la curva de niveles salivales (AMBC) y el área bajo la curva de concentración salival de paracetamol versus tiempo (ABC). El AMBC se define como el área bajo la curva del producto tiempo t y la concentración salival C_s desde tiempo 0 hasta tiempo 7 hs.:

$$MRT = \frac{\int_0^7 t \cdot C_s \cdot dt}{\int_0^7 C_s \cdot dt}$$

Las áreas se calculan con el método de los trapezoides según se indicó en 1.1.9.1.

TABLA 9

Droga: Paracetamol
 Especialidad: Formulación B
 Muestra: saliva
 Hora de administración: 9:15
 Voluntario: M.G.
 Edad: 25 años
 Peso: 58 kg

Muestra	Tiempo	Hora	Area	Dil.1:5 mg/L
1	0,25	9:30	13685	1.4
2	0,5	9:45	17803	1,96
3	0,75	10:00	18167	2,0
4	1	10:15	19075	2,1
5	1,25	10:30	49031	5,4
6	1,5	10:45	99340	10,94
7	1,75	11:00	57500	6.33
8	2	11:15	51022	5.62
9	2,5	11:45	39885	4.39
10	3	12:15	31227	3.44
11	3,5	12:45	30857	3.4
12	4	13:15	28927	3.18
13	5	14:15	21240	2.34
14	6	15:15	19879	2.19
15	7	16:15	17775	1.96

TABLA 9. Concentraciones de paracetamol en saliva a cada tiempo, para un voluntario al cual se le administró un comprimido de la Formulación B.

TABLA 10

Sujeto Formulación Tiempo	1		2		3		4		5	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0,25	2,1	1,74	0,5	1,11	2,35	0,66	1,93	1,86	1,15	1,4
0,5	1,9	1,41	0,62	4,15	3,62	1,06	3,42	1,85	3,17	1,96
0,75	2,2	2,39	1,18	5,42	6,11	1,07	10,7	2,55	3,74	2
1	3,83	3,06	2,72	6,29	6,71	1,59	5,58	3,8	2,13	2,1
1,25	4,09	2,88	4,12	7,55	4,56	2,42	5,85	4,6	3,15	5,4
1,5	3,96	3,04	4,88	6,53	3,55	3,64	5,74	3,98	2,57	10,94
1,75	3,65	1,96	3	9,22	3,19	5,98	6,36	3,74	2,48	6,33
2	2,96	3,67	4,2	9,51	3,32	7,5	7,31	3,07	3,11	5,62
2,5	2,78	3,78	4,06	5,59	4,36	8,55	5,81	3,6	2,81	4,39
3	3,51	5,47	3,96	4,96	3,92	3,99	5,16	3,73	3,64	3,44
3,5	3,59	4,11	3,02	3,86	3,9	3,71	4,07	3,48	3,5	3,4
4	2,88	2,63	4,1	3,2	3	2,71	2,82	3,55	3	3,18
5	2,97	3,04	3,5	3	2,5	1,98	2,62	2,76	2,8	2,34
6	1,59	2,53	2,87	2,6	1,66	2,82	2,53	1,95	2,27	2,19
7	1,57	1,89	0,96	1,99	1,16	1,66	1,96	1,41	1,5	1,96

TABLA 10. Niveles salivales de paracetamol, expresados en mg/L, a los distintos tiempos de muestreo, expresados en horas, para las Formulaciones A y B y para todos los voluntarios que participaron en el estudio.

FIGURA 15
Perfiles medios de la concentración de paracetamol en saliva, en función del tiempo

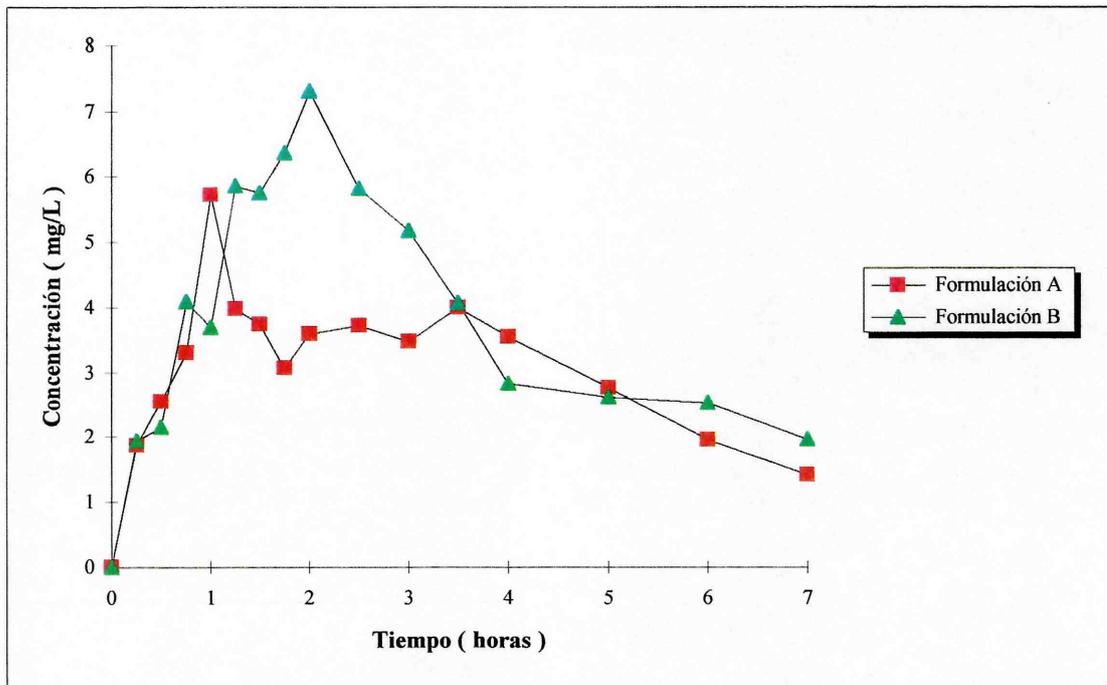
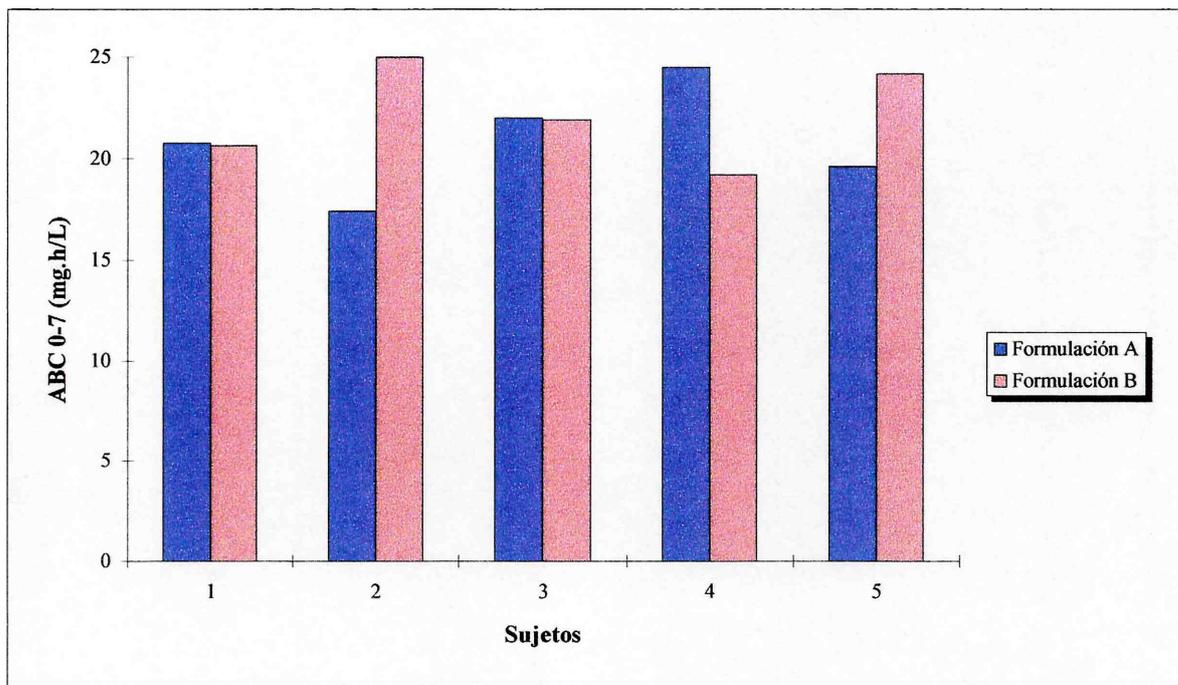


FIGURA 16
Area Bajo la Curva de niveles salivales para las dos Formulaciones de Paracetamol



ABC (0-7) de niveles salivales de paracetamol para cada sujeto
y para cada formulación administrada

1.2.6.3. Cálculo del $ABC_{(0-\infty)}$: a partir de sumarle al $ABC_{(0-7)}$ el cociente entre el último valor de concentración medido y la constante de velocidad aparente de eliminación, β , de primer orden. Esta última se calcula a su vez, como la pendiente de la recta de regresión lineal de los logaritmos naturales de los últimos valores de concentración salival, en función del tiempo:

$$ABC_{(0-\infty)} = ABC_{(0-7)} + \frac{C_7}{\beta}$$

En la **Tabla 11** figuran los parámetros de biodisponibilidad calculados a partir de los niveles salivales de paracetamol, para cada voluntario y para cada formulación, con sus correspondientes valores medios y sus dispersiones. Los mismos son: la máxima concentración de paracetamol encontrada en saliva ($C_{m\acute{a}x}$), el tiempo de máxima concentración ($T_{m\acute{a}x}$), el Area Bajo la Curva de niveles salivales ($ABC_{(0-7)}$), el $ABC_{(0-\infty)}$ y el Tiempo Medio de Residencia (MRT)

Para la Formulación A, el valor medio de la constante de velocidad aparente de eliminación, con su desviación típica de la media, fue de $\beta = 0,257 \pm 0,03$, calculada con los cinco últimos puntos de las curvas de niveles salivales de paracetamol en función del tiempo, para cada sujeto. Para la Formulación B fue de $\beta = 0,305 \pm 0,06$, teniendo en cuenta los últimos tres puntos de las curvas respectivas.

1.2.7. Cálculo de la curva de calibración del método por HPLC para determinar los niveles de paracetamol en las muestras de orina:

La linealidad de la curva de calibración por HPLC, para realizar el seguimiento de los niveles de paracetamol en orina, fue encontrada en el rango de concentraciones entre 1 - 8 mg/L.

Los valores de Area/1000 para cada una de las soluciones de paracetamol standard preparadas en orina blanco, fueron:

Primera Réplica		Segunda Réplica	
Concentración (mg/L)	Area/1000 ^(*)	Concentración (mg/L)	Area/1000 ^(*)
1,00	17,81	1,00	17,91
2,00	35,97	2,00	36,12
4,00	87,92	4,00	88,92
6,00	122,49	6,00	123,25
8,00	123,25	8,00	180,86

^(*) Valor medio de tres inyecciones de la misma solución standard

El intercepto con el eje de las ordenadas (a) y la pendiente (b), con sus respectivos intervalos de confianza del 95%, fueron:

$$a = - 8.55 \pm 4.8$$

$$b = 23.63 \pm 0.98$$

con un coeficiente de correlación $r = 0.9965$ (**Figura 17**)

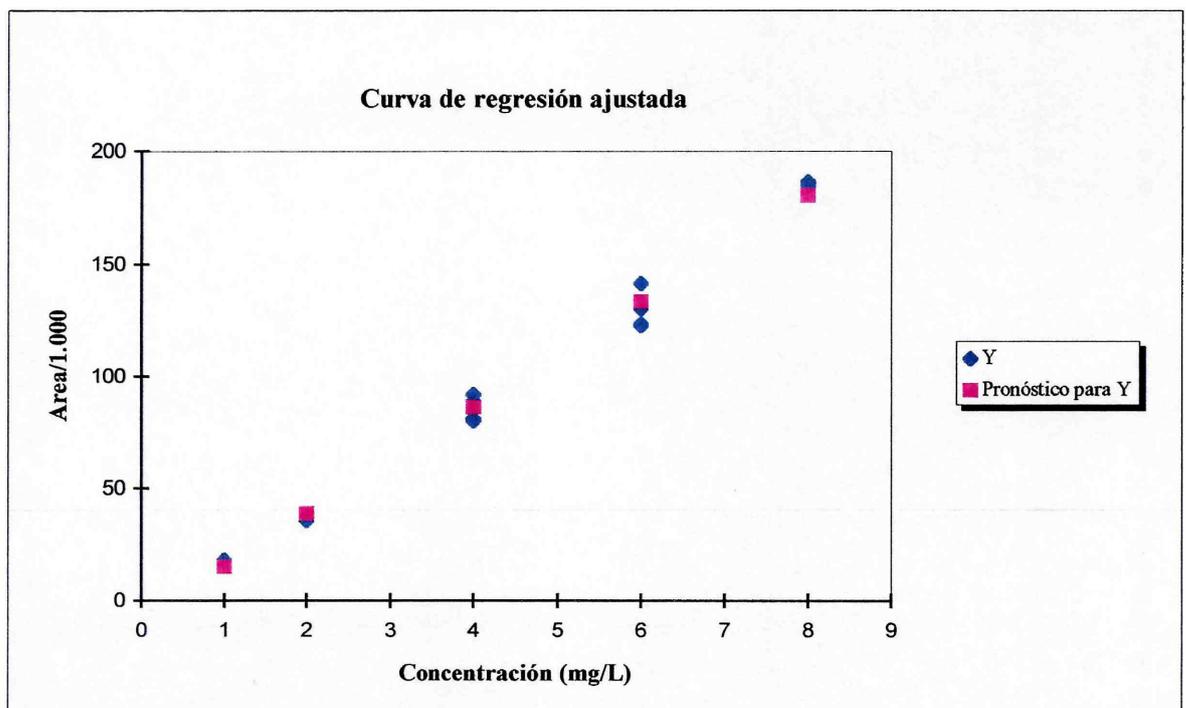
TABLA 11

Sujetos	T máx. (h)		C máx. (mg/L)		ABC (0-7) (mg.h/L)		ABC (0-∞) (mg.h/L)		MRT (h)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	1,25	3	4,09	5,47	20,79	20,66	27,09	27,13	3,4	3,5
2	1,5	2	4,88	9,51	17,44	25	20,5	32,45	3	2,3
3	1	2,5	6,71	8,55	22	21,9	25,47	25,04	2,9	3,3
4	0,75	1,25	10,7	4,6	24,5	19,2	36,24	23,55	3,2	3,5
5	0,75	1,5	3,74	10,94	19,6	24,18	26,42	41,84	3,5	3
Media	1,05	2,05	6,02	7,81	20,87	22,18	27,14	30	3,2	3,12
Sm	0,14	0,32	1,27	1,2	1,18	1,08	2,55	3,32	0,11	0,22

TABLA 11 . Parámetros de biodisponibilidad para las Formulaciones A y B, a partir de niveles salivales.

FIGURA 17

Curva de Calibración de Paracetamol en orina por HPLC



Rango = 1 - 8 mg/L

Ordenada al origen (a) y Pendiente (b), con sus respectivos intervalos de confianza del 95%:

$$a = - 8,55 \pm 4,8$$

$$b = 23,63 \pm 0,98$$

Coeficiente de Correlación (r) = 0,9965

Con el fin de confirmar el análisis de regresión se realizó un Análisis de Residuales (R_i), método gráfico por el cual la relación R_i vs. Concentración nos debe dar un modelo aleatorio de distribución y además la sumatoria de los R_i debe ser próxima a cero. Se encontró un valor de: $\sum R_i = 3,553 \times 10^{-14}$ (Figura 18)

Con la misma finalidad se realizó el análisis del Factor Respuesta, es decir la relación entre la señal, en nuestro caso Area/1000, con la concentración, que en función de la misma, debe mantenerse constante a lo largo del rango de concentraciones de la curva de calibración. (Figura 19)

Ambos análisis, así como el coeficiente de correlación obtenido, han confirmado que el modelo usado para nuestro método analítico es lineal. (Myers, 1986)

En la Figura 20 se puede observar un cromatograma tipo de la determinación de paracetamol en orina por el método de HPLC.

1.2.8. Cálculo de la Precisión del Sistema, expresada como el Coeficiente de Variación (CV) de cinco inyecciones de la misma solución de un standard de paracetamol en orina blanco, según se indicó en 1.2.3.

La precisión del sistema fue de 3.5 %, expresada como Coeficiente de Variación (CV)

1.2.9. Cálculo de la Precisión del método, expresada como el CV de cinco muestras de orina conteniendo paracetamol standard.

La precisión del método fue de 4.0 %, también expresada como CV.

1.2.10. Cálculo de la cantidad acumulativa de paracetamol en orina expresada en mg, mediante la utilización de la curva de calibración realizada en orina, según la siguiente expresión:

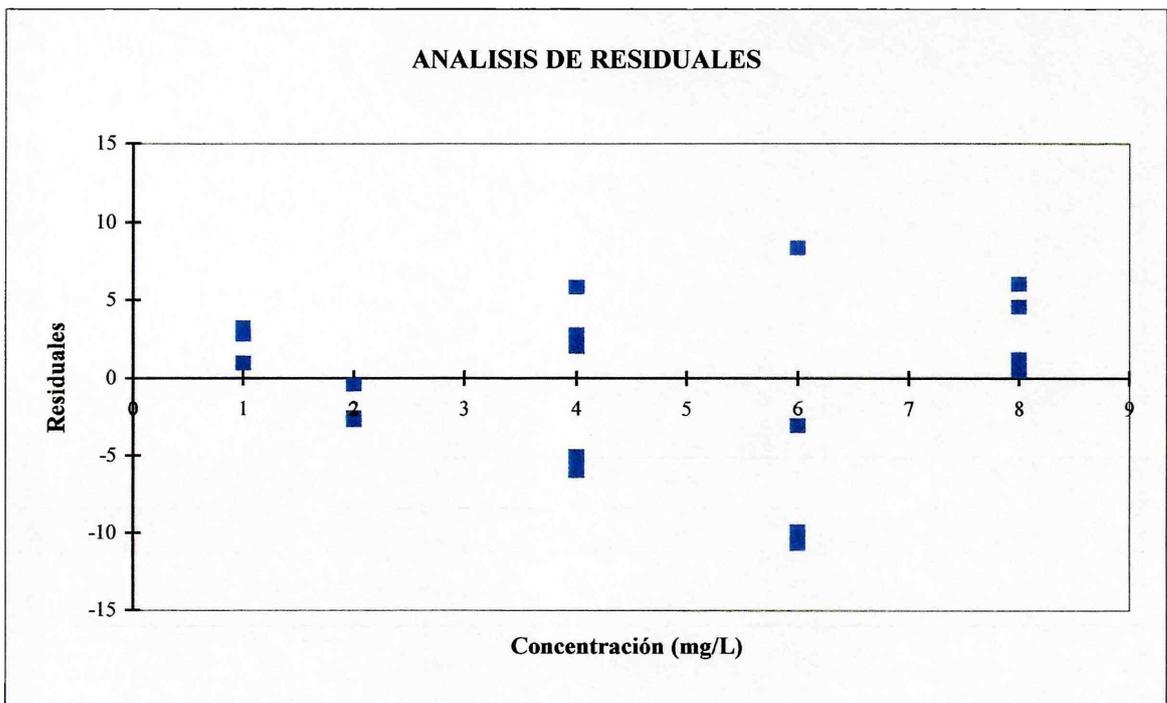
$$Cant. Acum. = \frac{(Area_{t_i} - a)}{b} \cdot f \cdot Vol. + D$$

donde:

$Cant. Acum.$	= cantidad acumulativa de paracetamol en orina a un tiempo t_i
$Area_{t_i}$	= Area/1000 de la muestra correspondiente al tiempo t_i
a	= ordenada al origen de la curva de calibración
b	= pendiente de la curva de calibración
f	= factor de dilución
$Vol.$	= Volumen total de orina excretado al tiempo t_i
D	= cantidad acumulativa de paracetamol en orina a un tiempo $t_{(i-1)}$

Un modelo de la hoja de cálculo para obtener las cantidades acumulativas de paracetamol en orina a cada tiempo, aparece en la Tabla 12, siendo el correspondiente a la Formulación B. De igual manera se procedió para el resto de los comprimidos.

FIGURA 18
 Método gráfico de Residuales para establecer linealidad en la curva de calibración de paracetamol en orina por HPLC



Sumatoria de Residuales = 3,553E-14

FIGURA 19

Análisis del Factor Respuesta para establecer linealidad en la curva de calibración de paracetamol en orina por HPLC

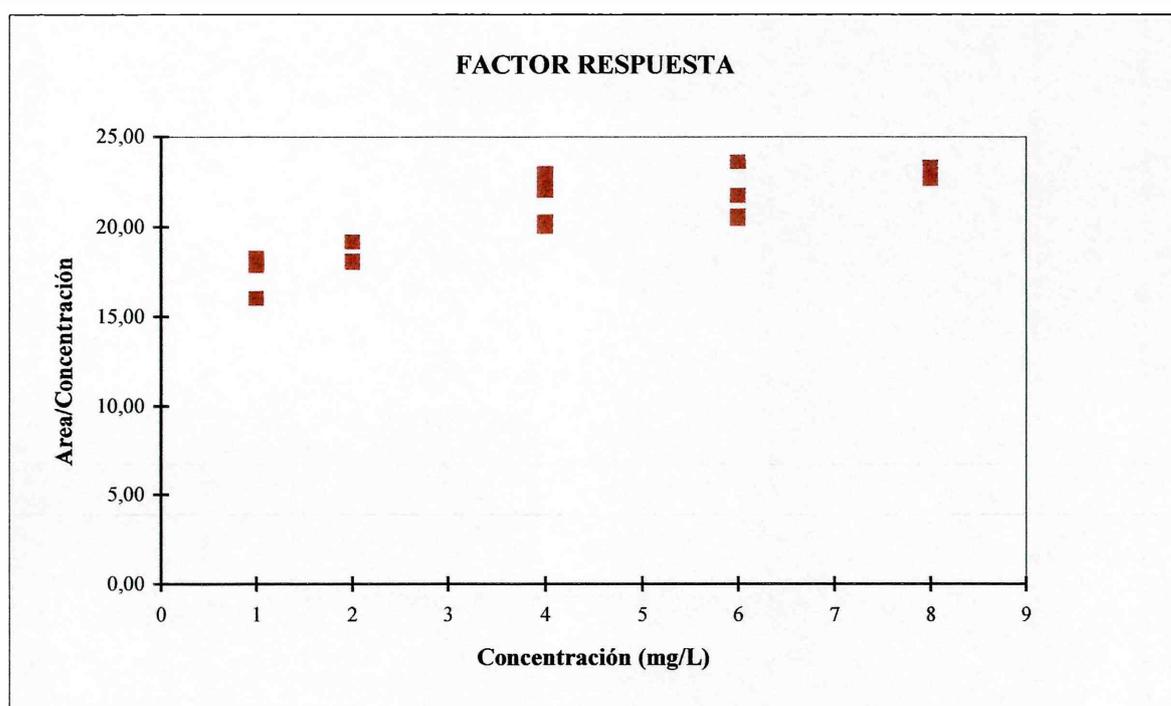
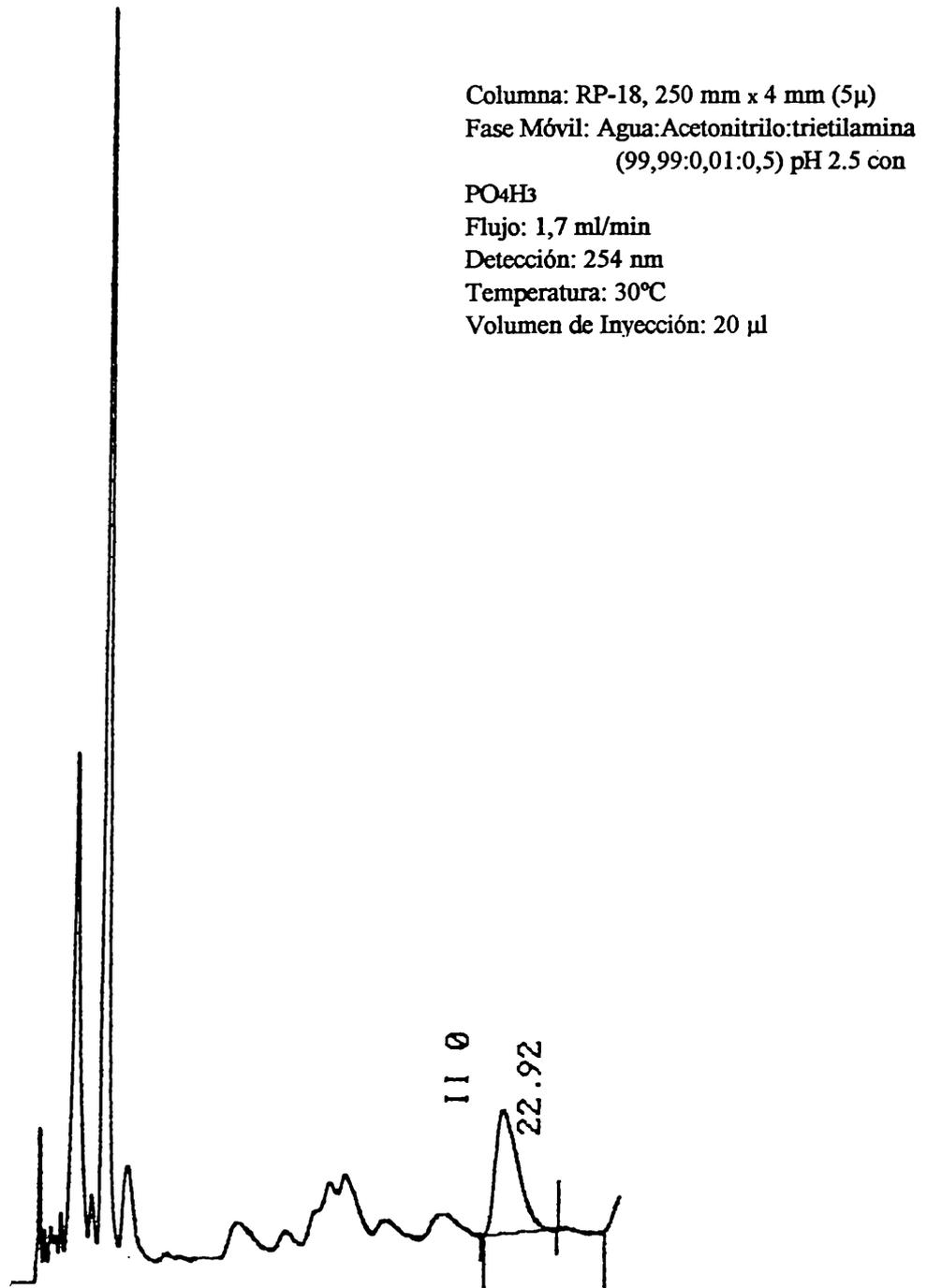


FIGURA 20
Cromatograma tipo de Paracetamol en orina



Tiempo de retención de Paracetamol = 22.92

TABLA 12

Droga: Paracetamol
 Especialidad: Formulación B
 Muestra: orina.
 Hora de administración: 7:00
 Voluntario: P.R.
 Edad: 30
 Peso: 60 kg.

Muestra	Tiempo	Hora	Volumen	Area	mg excretad.	mg acum.
1	0,5	7:30	75	33456	1,3	1,3
2	1	8:00	40	41562	0,8	2,2
3	2	9:00	100	78081	3,7	5,8
4	3	10:00	42	114195	2,2	8,0
5	4	11:00	12	106495	0,6	8,6
6	5	12:00	60	74958	2,1	10,7
7	7	14:00	150	40754	3,1	13,9
8	9	16:00	495	83211	0,6	14,4
9	15	22:00	40	15160	0,008	14,4

TABLA 12. Cantidades acumulativas de paracetamol en orina a cada tiempo, para un voluntario al cual se le administró un comprimido de la Formulación B.

Nota: De la muestra 1 a la 7 las diluciones de orina fueron de 1:10
 En la muestra 8 la dilución fue de 3:10
 En la muestra 9 la dilución fue de 2:10

En la **Figura 21** se muestran los perfiles medios de excreción urinaria acumulativa de paracetamol, para ambas formulaciones y en la **Figura 22** la cantidad acumulativa para cada sujeto y para cada formulación.

1.2.11. Cálculo de la velocidad de excreción urinaria, expresada en mg/h, de la siguiente manera:

$$\left(\frac{dE}{dt}\right)_{(t_1+t_2)/2} = \frac{E_{t_2} - E_{t_1}}{t_2 - t_1}$$

donde:

$$\begin{aligned} dE/dt &= \text{Velocidad de excreción} \\ E_{t_2} &= \text{Cantidad excretada al tiempo } t_2 \\ E_{t_1} &= \text{Cantidad excretada al tiempo } t_1 \end{aligned}$$

Un modelo de la hoja de cálculo para obtener las velocidades de excreción de paracetamol en orina, aparece en la **Tabla 13**, siendo el correspondiente a la Formulación A. De igual manera se procedió para el resto de los comprimidos.

En la **Tabla 14** aparecen los valores de los parámetros de biodisponibilidad, calculados a partir de los niveles urinarios de droga, para cada voluntario y para cada formulación, con sus correspondientes valores medios y sus dispersiones. Los mismos son: cantidad máxima excretada de paracetamol al cabo de las 15 horas luego de ser administrado el comprimido (E_{15}), la máxima velocidad de excreción urinaria $(dE/dt)_{\text{máx}}$ y el tiempo de máxima velocidad de eliminación, $t_{\text{máx}}$.

En la **Figura 23** se grafica la velocidad media de eliminación urinaria de paracetamol en función del tiempo, para ambas formulaciones.

1.2.12. Cálculo de la Biodisponibilidad Relativa (F) de paracetamol, a partir de la concentración máxima de droga en saliva, del área bajo la curva de niveles salivales y de la cantidad máxima de paracetamol excretada por orina, según las siguientes ecuaciones:

$$F = \frac{C_{\text{max}}_{\text{Test}}}{C_{\text{max}}_{\text{Ref.}}} \quad ; \quad F = \frac{ABC_{(0-7)_{\text{Test}}}}{ABC_{(0-7)_{\text{Ref.}}}} \quad ; \quad F = \frac{E_{15_{\text{Test}}}}{E_{15_{\text{Ref.}}}}$$

donde:

Test: Formulación Test (Formulación A)

Ref.: Formulación Referencia (Formulación B)

Los valores de F obtenidos para los cinco voluntarios, son los siguientes:

	Biodisponibilidad Relativa (F)				
	1	2	3	4	5
$C_{m\acute{a}x}$	0,77	0,51	0,78	2,32	0,34
$ABC_{(0-7)}$	1,01	0,7	1,0	1,28	0,81
E_{15}	1,32	1,01	1,6	0,97	1,02

1.2.13. Análisis estadístico. Se realizó un ANOVA con los porcentajes de paracetamol disueltos a los 30 y 60 minutos, tanto en medio buffer fosfato pH 5.8, como en medio de HCl 0.1 N.

A su vez, también se realizó un ANOVA con los valores de $C_{m\acute{a}x}$, $ABC_{(0-7)}$ y MRT, obtenidos a partir de los niveles salivales y en cuanto a los valores de $T_{m\acute{a}x}$, se les aplicó el test no paramétrico de Wilcoxon.

En lo que respecta a las cantidades excretadas de paracetamol en los primeros tiempos (0.5, 1 y 2 horas), fueron analizadas mediante el test t-Student, así como también la velocidad de eliminación durante la primera hora.

Se establecieron los límites de confianza del 90%, basado en el test de la hipótesis intervalar, para las $ABC_{(0-7)}$ de los perfiles salivales y para los valores de E_{15} , de ambas formulaciones. (Steinijans y Diletti, 1983)

Los resultados del ANOVA, realizado con los datos de disolución, nos indican que hay diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los porcentajes disueltos a los 30 y a los 60 minutos de ambas formulaciones, en los dos medios ensayados.

Los resultados del ANOVA realizado con los $C_{m\acute{a}x}$, $ABC_{(0-7)}$ y MRT salivales, nos demuestran que no hay diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$):

Parámetros	F	F crítico
$C_{m\acute{a}x}$	1,04	5,32
$ABC_{(0-7)}$	0,68	5,32
MRT	0,1	5,32

Mientras que el resultado del test de Wilcoxon para los $T_{m\acute{a}x}$ nos dice que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los mismos.

El resultado del test t-Student usado para las cantidades excretadas en los primeros tiempos y para las velocidades de excreción de ambas formulaciones, muestran diferencias significativas entre los tratamientos ($p < 0.05$).

Los intervalos de confianza calculados fueron:

Parámetros	Intervalo de Confianza
$ABC_{(0-7)}$	0.79 - 1.36
E_{15}	0.72 - 1.09

Región de Tolerancia: 0.8 - 1.25

En el capítulo de discusión se analizan los resultados encontrados.

FIGURA 21
Perfiles medios de excreción urinaria acumulativa de Paracetamol

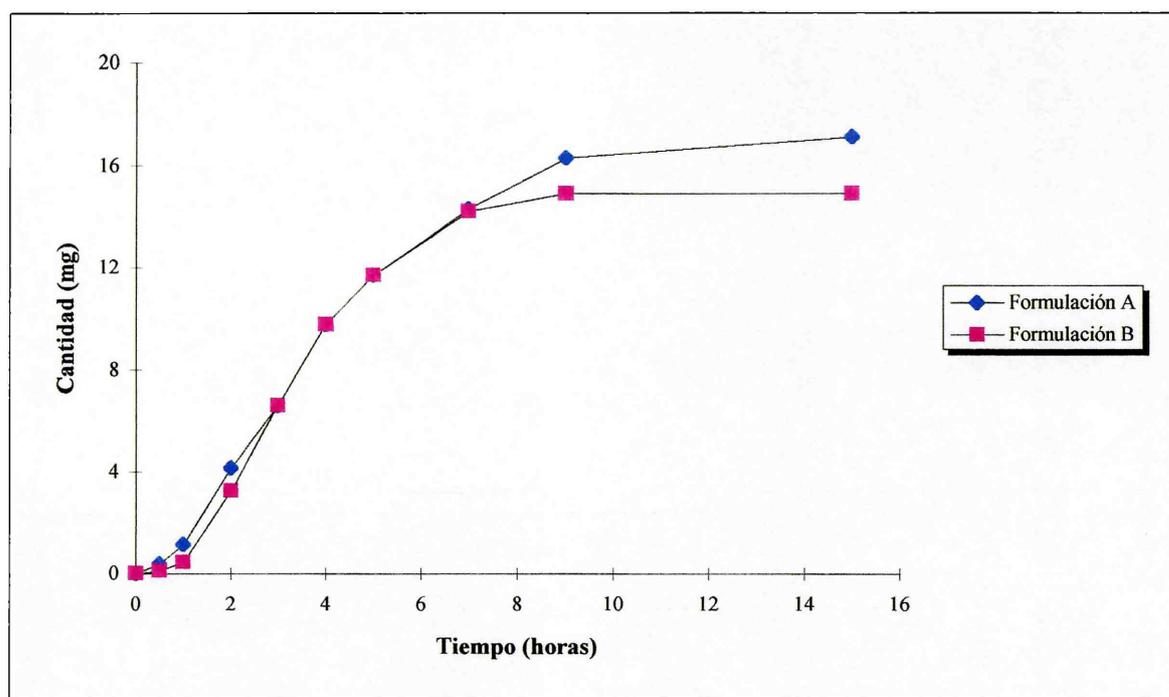
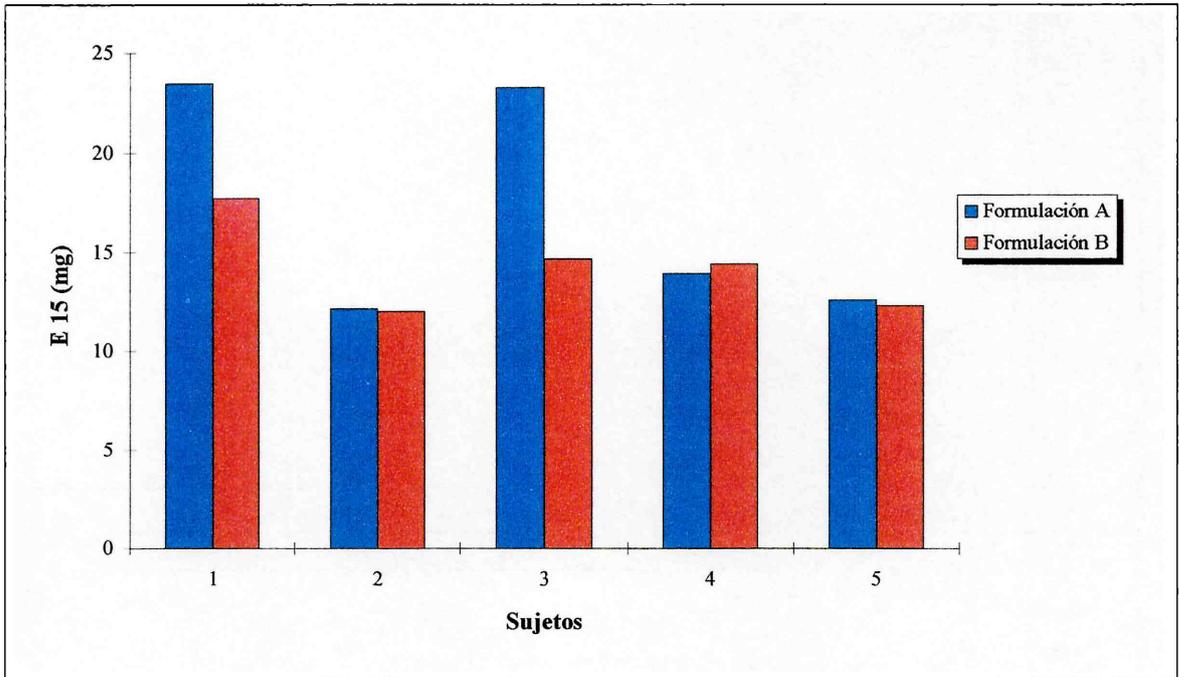


FIGURA 22
Cantidad acumulativa de paracetamol en orina para las Formulaciones A y B



Cantidad acumulativa de paracetamol en orina, para cada sujeto y para cada formulación administrada

TABLA 13

Droga: Paracetamol
 Especialidad: Formulación A
 Muestra: orina.
 Hora de administración: 8:00
 Voluntario: P.R.
 Edad: 30
 Peso: 60 kg.

T	mg acum.	t	dE/dt
0,5	0,4	0	0
1	2,6	0,75	4,52
2	7,7	1,5	5,09
3	8,5	2,5	0,80
4	10,9	3,5	2,40
5	12,5	4,5	1,60
7	13,4	6	0,45
9	13,9	8	0,25
15	13,9	12	0,00

TABLA 13. Velocidad de excreción de paracetamol en orina, para un voluntario al cual se le administró un comprimido de la Formulación A.

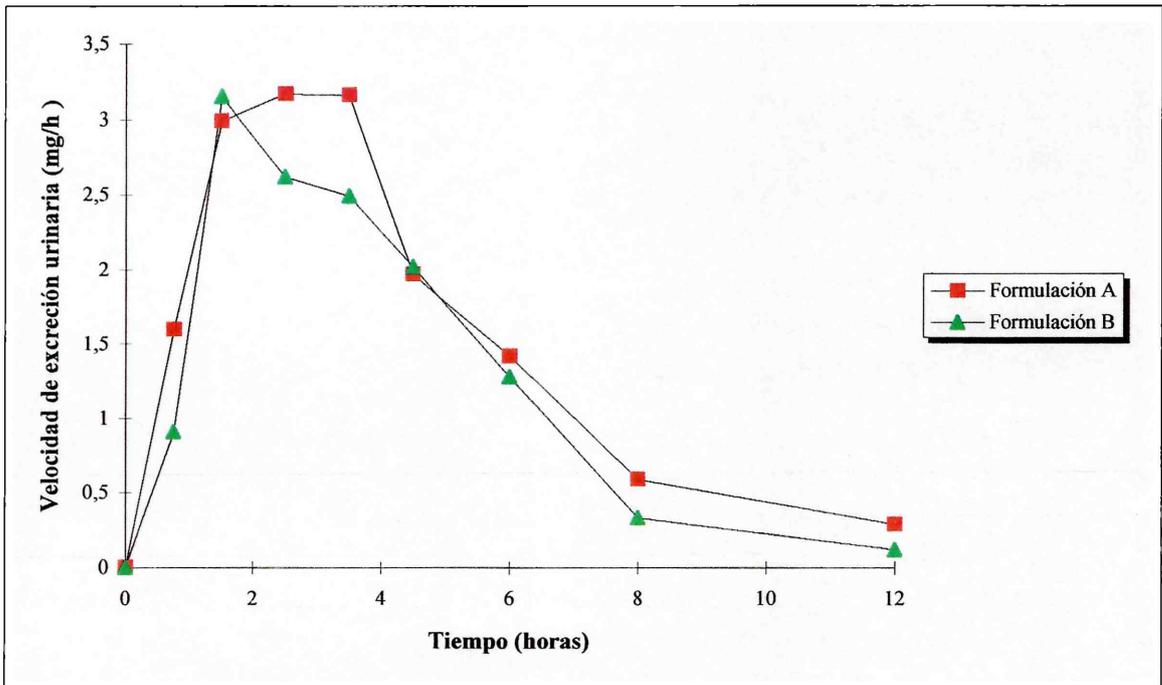
T : tiempo de muestreo de orina
 t : tiempo medio del muestreo de orina

TABLA 14

Sujetos	E15 (mg)		(dE/dt)máx. (mg/h)		tmáx. (h)	
	A	B	A	B	A	B
1	23,48	17,76	6,1	5,06	3,5	3,5
2	12,15	12,05	2,89	2,72	3,5	3,5
3	23,31	14,66	5,18	2,21	2,5	2,5
4	13,93	14,4	5,09	5,15	1,5	1,5
5	12,59	12,28	2,38	3,64	1,5	1,5
Media	17,09	14,23	4,33	3,76	2,5	2,5
Sm	2,59	1,03	0,72	0,6	0,45	0,45

TABLA 14 Parámetros de biodisponibilidad para las Formulaciones A y B, a partir de niveles urinarios de paracetamol

FIGURA 23
Perfiles medios de velocidad de excreción urinaria de paracetamol



DISCUSION

DISCUSION

1. ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD RELATIVA Y BIOEQUIVALENCIA DE COMPRIMIDOS DE PARACETAMOL. ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

1.1. Estudio de la influencia del aglutinante y del desintegrante sobre la disolución de comprimidos de paracetamol. Ensayos *in vitro*.

Es sabido que los factores de formulación son importantes en la liberación del fármaco desde la forma farmacéutica. Uno de ellos es la presencia del agente aglutinante, como es el caso de la Polivinilpirrolidona (PVP), de naturaleza hidrofílica, siendo su influencia sobre la disolución variable, ya que tanto puede aumentar, disminuir ó no modificar su velocidad, dependiendo, entre otros factores, del modo en que dicho agente es incorporado a la formulación. (*Badawi y El-Sayed, 1980; Chowhan, 1980; Itiola y Pilpel, 1986; Wan y Lim, 1990*)

Al analizar la influencia del aglutinante sobre la disolución de los comprimidos de paracetamol elaborados en la UPM, se pudo observar, tal cual figura en la **Tabla 5**, que las *kd* de las partidas UPM₀₁ y UPM₀₂ son significativamente distintas, duplicándose el valor de la misma en el caso de la UPM₀₂, es decir la correspondiente a la que se adicionó el PVP en forma de solución, mientras que el *t*_{50%} ha disminuido a la mitad, como lógica correlación con el valor de *kd* obtenido.

A su vez los valores de *MDT*, *Q*₃₀ y *Fd*% prácticamente no poseen diferencias entre sí, lo que indicaría que el distinto comportamiento en la disolución de las partidas se manifiesta en los primeros minutos del proceso y no en el tiempo estipulado por USP, ni en el ensayo en su totalidad.

Teniendo en cuenta que el paracetamol forma complejos con aglutinantes hidrofílicos como el PVP, cuya velocidad de disolución es mayor que la de la droga libre, la incorporación del mismo como solución, facilitaría la formación de dichos complejos, acelerando la velocidad de penetración del medio de disolución en la superficie de las partículas de polvo, aumentando así la velocidad de disolución de la droga. (*Jurgensen Eide, 1973; Lipman y Summers, 1980*)

Otro factor a tener en cuenta es la presencia del desintegrante, un ejemplo es el almidón, que es responsable, según su concentración, de influenciar la disgregación, por lo cual se debe optimizar su porcentaje a fin de modificar el proceso de disolución en procura de una mejora en la formulación. (*Karr et al., 1990; Underwood y Cadwallader, 1972; Pilpel et al., 1978*)

La disminución de la cantidad de almidón en la formulación, del 13% al 6%, afectó considerablemente el tiempo de desintegración, como se puede observar en la **Tabla 4**, y provocó menor velocidad de disolución en los primeros minutos del proceso, mejorando las características organolépticas de la forma farmacéutica al evitar efectos desagradables, como por ejemplo una prematura disolución en la boca, lo que provocaría un rechazo por parte del paciente debido al sabor extremadamente amargo de la droga.

En la **Tabla 5**, en la **Figura 4** y en la **Figura 7** se puede observar el descenso en el valor de kd de los comprimidos de la partida UPM_{03} respecto a las anteriores, con el consiguiente aumento del $t_{50\%}$, no afectándose ni el MDT , ni el Q_{30} ni el $Fd\%$, lo que indicaría solamente una disminución del porcentaje de paracetamol disuelto en los primeros minutos.

De los controles realizados a la formulación, el contenido de paracetamol nos indica que salvo los comprimidos del Laboratorio F, todos los demás cumplen con las especificaciones de USP 23, que nos indica un contenido de principio activo entre 90% y 110% del valor declarado. (**Tabla 3**)

Respecto al tiempo de desintegración y a la resistencia a la rotura, cuyos resultados figuran en la **Tabla 4**, salvo lo ya puntualizado de la partida UPM_{03} y observado también para los comprimidos del Laboratorio E, no hemos podido establecer ninguna otra correlación de estos parámetros con los de disolución, lo cual indicaría una independencia de este proceso con las propiedades de desintegración y dureza de los comprimidos, dato éste que coincide con otros diversos casos. (*Jaminet et al., 1969; Rees et al., 1970; Hekimoglu et al., 1987*)

Se realizó un análisis de varianza con los valores medios de $ED\%$ entre los comprimidos elaborados en la UPM y los de circulación en el mercado farmacéutico, con el objeto de analizar si existen ó no diferencias significativas entre las distintas formulaciones. La comparación de las varianzas mediante la prueba F nos muestra, como se ve en la **Tabla 6**, que existen diferencias significativas entre ellas ($p < 0.05$).

A fin de establecer específicamente cuales son los valores medios que difieren entre sí, se aplicó el método de comparación múltiple de la Mínima Diferencia Significativa (LSD), basado en la prueba t de Student, como se observa en la **Tabla 7**.

Los resultados obtenidos demuestran que entre los comprimidos correspondientes a la partida UPM_{03} y los de los laboratorios A, B, C y F no existen diferencias significativas, lo que nos indicaría equivalencia farmacéutica entre los mismos.

Entre los comprimidos de la partida UPM_{03} y los comprimidos UPM_{01} y UPM_{02} , laboratorios E y D, existen diferencias significativas.

Los comprimidos UPM_{01} son equivalentes con los de la partida UPM_{02} . Pero no existe en el conjunto de lotes de comprimidos ensayados, ninguno que sea equivalente con todos los demás.

1.2. Estudios de biodisponibilidad relativa de comprimidos de paracetamol, utilizando saliva y orina como fluidos biológicos.

En esta etapa del trabajo se decidió realizar un estudio *in vivo*, con cinco voluntarios sanos, realizando el seguimiento de la droga en saliva y orina, utilizando los comprimidos correspondientes a la partida UPM₀₃, (Formulación A) por considerar que de las elaboradas en la UPM era la que ofrecía un mejor diseño y los comprimidos del Laboratorio E, (Formulación B) seleccionándose esta especialidad por dos razones: es una especialidad de gran comercialización en nuestro mercado farmacéutico y además era la que había presentado en el ensayo *in vitro*, mayores diferencias de comportamiento con las demás. Nuestro objetivo fue determinar si *in vivo* presentaban el mismo comportamiento que *in vitro*.

Es sabido que el Paracetamol es un analgésico y antipirético no salicílico, que requiere una rápida liberación desde la forma farmacéutica para producir un inmediato efecto. Algunos autores han informado resultados de estudios de biodisponibilidad llevados a cabo tanto en plasma (Lefebvre *et al.*, 1987; Ameer *et al.*, 1983; Paulsen y Kreilgard, 1984; Salvadó *et al.*, 1988), en saliva (Van Bommel *et al.*, 1991; Fagiolino y Vázquez, 1993; Vázquez *et al.*, 1993) como en orina (Sotiropoulus *et al.*, 1981; Wilson *et al.*, 1982; Hekimoglu *et al.*, 1987)

El primer paso fue optimizar un método por HPLC que nos permitiera, con una muy buena precisión, realizar el seguimiento selectivo del paracetamol en los fluidos biológicos seleccionados, como se puede apreciar en las Figuras 14 y 20. La validación del método nos aseguró estar trabajando en las condiciones adecuadas, ver Figuras 11, 12, 13, 17, 18 y 19.

Respecto de los niveles salivales encontrados podemos apreciar que excepto en uno de los voluntarios, los valores obtenidos a los 30 y a los 60 minutos, luego de la administración de la droga, fueron más altos para la Formulación A que para la B (Tabla 10). Este comportamiento se correlaciona con el presentado *in vitro*, ya que, tanto en medio buffer fosfato pH 5.8 como en HCl 0.1 N, a esos mismos tiempos se disuelve más la Formulación A que la B. (Tabla 8)

Una comparación de las $ABC_{(0-7)}$ y de las $ABC_{(0-\infty)}$, nos demuestra que, excepto en dos voluntarios, los valores obtenidos son mayores para la Formulación A que para la B. (Tabla 11 y Figura 16)

El análisis estadístico realizado con los parámetros de biodisponibilidad obtenidos a partir de los niveles salivales (Tabla 11), nos indica un retardo de la Formulación B para alcanzar la $C_{máx}$, lo cual también se correlaciona con los resultados encontrados *in vitro*. Pero también se observa que a pesar del más rápido comienzo del proceso de absorción por parte de la Formulación A, la velocidad de absorción posterior parece ser similar puesto que los MRT no muestran diferencias significativas, lo cual también es

acorde con lo encontrado *in vitro*, donde los valores de MDT para todas las formulaciones ensayadas no ofrecían diferencias importantes (**Tabla 5**) (Aarons, 1987)

Teniendo en cuenta el valor de MRT , informado en bibliografía, de una solución de administración oral de paracetamol, también evaluada por sus niveles salivales (3.1 h) (Fagiolino y Vázquez, 1993) y considerando la siguiente ecuación:

$$MDT_{vivo} = MRT_{comp.} - MRT_{sol.}$$

donde:

MDT_{vivo} : Tiempo Medio de Disolución *in vivo* de los comprimidos

$MRT_{comp.}$: Tiempo Medio de Residencia de los comprimidos

$MRT_{sol.}$: Tiempo Medio de Residencia de la solución oral

sabiendo que los valores medios de MRT de la Formulación A es de 3.2 h y de la Formulación B es de 3.12 h, (**Tabla 11**) podemos calcular los valores de MDT_{vivo} para las dos formulaciones ensayadas, siendo:

$$MDT_{vivo} \text{ Formulación A : } 0.1 \text{ h}$$

$$MDT_{vivo} \text{ Formulación B : } 0.08 \text{ h}$$

Con estos valores podemos calcular el llamado factor “time-scaling” (TS), que se obtiene con el cociente entre el MDT_{vivo} y el MDT_{vitro} :

$$TS = \frac{MDT_{vivo}}{MDT_{vitro}}$$

este factor nos indica cuán aproximado ó no está el ensayo *in vitro* respecto a la disolución *in vivo* (Brockmeier, 1986; Van Bommel et al., 1991).

En nuestro caso, teniendo en cuenta que el MDT_{vitro} de UPM₀₃ (Formulación A) es de 0.57 h y del Laboratorio E (Formulación B) es de 0.63 h (**Tabla 5**):

$$TS_{Form. A} = 0.17 \quad \text{y} \quad TS_{Form. B} = 0.13$$

valores que (<1) nos están indicando que la velocidad de liberación *in vitro* es más lenta que la velocidad de liberación *in vivo*, y que además la liberación de la Formulación A es más rápida que la de la Formulación B, tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que su MDT_{vitro} es menor y su TS es mayor.

En cuanto a los resultados obtenidos utilizando los niveles de droga sin metabolizar excretados en orina, del orden del 3,5% de la dosis, y la velocidad de excreción (**Tabla 14 y Figuras 21, 22 y 23**), podemos apreciar que los valores de E_{15} son mayores para la Formulación A y que el análisis estadístico de las cantidades eliminadas en los primeros tiempos y de la velocidad de excreción, también de estos

primeros momentos, muestra que existen diferencias significativas ($p < 0.05$), indicando que el seguimiento en orina permite apreciar las diferencias en la velocidad de absorción inicial ya observadas en saliva y en el ensayo *in vitro*.

En cuanto a la obtención de intervalos de confianza con los valores de $ABC_{(0.7)}$ y E_{15} , con el fin de establecer criterios de bioequivalencia, estos fueron los siguientes: 0.79-1.36 y 0.72-1.09, respectivamente. Si consideramos que la región de tolerancia es de 0.8-1.25, nos encontramos con rangos que por muy estrecho margen están fuera de dicha región, lo cual no nos permite afirmar la existencia de una equivalencia biológica, quizás debido al escaso número de voluntarios con los que se planeó el ensayo. A esta misma conclusión podemos llegar al analizar los valores de Biodisponibilidad Relativa (F), donde encontramos más variabilidad en los datos obtenidos de relacionar las C_{max} en saliva, que los provenientes de relacionar las $ABC_{(0.7)}$ y los E_{15} .

Como una conclusión final de la discusión de los resultados de esta etapa del presente trabajo, podemos decir que se ha logrado correlacionar cualitativamente el ensayo *in vitro* con el estudio *in vivo*, cumpliendo el objetivo preestablecido.

**2. ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD RELATIVA
Y BIOEQUIVALENCIA
DE COMPRIMIDOS DE METOCLOPRAMIDA.
ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*.**

MATERIALES Y METODOS

2. ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD RELATIVA Y BIOEQUIVALENCIA DE COMPRIMIDOS DE METOCLOPRAMIDA. ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

MATERIALES Y METODOS

Materiales

* Metoclopramida clorhidrato, droga en polvo, uso comercial, grado USP 23.

* Comprimidos no recubiertos, conteniendo 10 mg de metoclopramida clorhidrato, elaborados por el personal de la Unidad de Producción de Medicamentos (UPM), mediante granulación húmeda y compresión, identificados como Formulación A, (Formulación Test), cuya composición es:

Metoclopramida, clorhidrato	10 mg
Almidón	94 mg
Lactosa	93 mg
PVP K30	5,5 mg
Almidón seco	5 mg
Estearato de magnesio	2,5 mg

* Comprimidos comerciales disponibles en el mercado farmacéutico argentino, conteniendo 10 mg de metoclopramida clorhidrato, identificados como Formulación B, (Formulación Referencia).

Equipos

* Cromatógrafo líquido Konik KNK 500G con una bomba de doble pistón; equipado con un detector de longitud de onda variable, modelo 204 Linear; un inyector Rheodyne modelo 7125, con un loop fijo de 20 μ L; un microprocesador KNK 029-375 y un integrador Spectra Physics, modelo Datajet SP 4600.

* Una columna Lichrocart RP-18 (125 mm x 4 mm de diámetro interno y 5 μ m de tamaño de partícula), con un guarda columna Supelco (50 mm x 4.6 mm de diámetro interno) rellena con Pelliguard LC-18 de 40 μ m de tamaño de partícula.

* Centrífuga Rolco CR 150.

* Equipo de disolución Sotax AT7

* Espectrofotómetro Beckmann M26

* Micropipeta automática Socorex de 100-1000 μ L y Pipeta automática Eppendorf de 500-5000 μ L.

* Balanza Metler Toledo AG 204

Estudio de disolución *in vitro*

Ha sido realizado de acuerdo a USP 23, usando el método de la canastilla, empleando 900 ml de agua como medio de disolución y también usando 900 ml de ácido clorhídrico 0.1 N, como medio, ambos a 37 °C y a 50 rpm.

El ensayo se realizó bajo condiciones “non sink”, retirándose alícuotas de 5 ml a los 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos, reponiéndose el mismo volumen con el medio utilizado, a igual temperatura.

Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos y se analizaron por absorción al UV a 272 nm.

Los resultados se expresaron en mg/900 ml de medio, utilizando soluciones de referencia preparadas cada día de trabajo, en concentraciones de 16 μ g/ml, para lo cual se pesaron 20 mg de clorhidrato de metoclopramida standard (título 100%) que se disolvieron en 50 ml del medio de disolución, se realizó una dilución 1:25 en el mismo medio, y se leyó su Absorbancia a 272 nm. Se analizaron seis comprimidos de cada especialidad en estudio.

Estudio *in vivo*

Participaron en este estudio ocho voluntarios sanos, cuatro de sexo femenino y cuatro masculino, de 24-30 años de edad, con un peso corporal entre 49-75 kg.

Se utilizó como criterio de admisión un buen estado de salud, corroborado por una historia clínica, ser no fumadores y no consumir ni medicamentos, ni bebidas alcohólicas en un período no menor a una semana antes de la experiencia.

Los voluntarios firmaron un acta de consentimiento, consignando sus datos personales y su conocimiento sobre el estudio que se realizaría, así como referencias respecto a consumos anteriores de metoclopramida.

Se utilizó la modalidad de dosis única, administrando dos comprimidos de 10 mg de clorhidrato de metoclopramida, es decir, una dosis de 20 mg, con aproximadamente

200 ml de agua, luego de un ayuno de 12 horas, ingeridos siempre por la mañana, entre las 6 - 8 hs., para cada una de las formulaciones ensayadas. Con esta dosis nos aseguramos niveles cuantificables de la droga en el fluido biológico en estudio, sin presentar riesgo alguno en los sujetos sometidos al ensayo.

Se utilizó un diseño cruzado, aleatorizado y compensado, recibiendo cuatro voluntarios la Formulación A y cuatro voluntarios la Formulación B, en la primera semana del estudio. Luego de una semana de "washout" ó depuración de la droga del organismo, se invierte el orden de administración.

Durante el día del tratamiento cada voluntario ingiere un menú standard, sugerido en unas planillas que se les suministran, junto con recomendaciones respecto a respetar el ayuno antes de la ingesta de los comprimidos y a la abstención de consumir bebidas conteniendo xantinas ó alcohol, debiendo consignar las horas de cada ingesta alimenticia. **(Planillas 3 y 4)**

Para el seguimiento de la droga se colectaron muestras de orina a los siguientes tiempos :0, 0.5, 1, 1.5, 2.5, 3.5, 4.5, 5.5, 8.5, 11.5, 14.5 y 24.5 horas a partir de la administración de los comprimidos. Por estudios preliminares donde el muestreo se realizó hasta las 36.5 hs posteriores a la toma de los comprimidos, se determinó que a las 24.5 hs la eliminación de la droga era total, por lo tanto, éste fue tomado como el último tiempo a muestrear. Una vez medido el volumen total de orina eliminada, una porción de la misma se almacenó en un freezer hasta el momento del análisis por HPLC.

Preparación de las muestras

Las muestras de orina se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos, luego se diluyeron 2:5 ml con fase móvil, se filtraron por membrana de nylon de 0.45 µm y se inyectaron en el cromatógrafo, por triplicado.

Análisis de la droga

Las muestras de orina fueron analizadas por HPLC con las siguientes condiciones cromatográficas:

Fase móvil: Agua con 1,3 % de trietilamina, ajustada a pH 6.8 con solución de ácido acético (1:10) : Metanol : Acetonitrilo (76:16:8)

Flujo: 1,2 ml/minuto

Volumen de inyección: 20 µL

Temperatura: 30 °C

Detección: 309 nm

Validación del método

Para la validación del método se obtuvo una curva de calibración con metoclopramida clorhidrato, standard, en una matriz preparada con un pool de orina blanco, de los voluntarios que intervinieron en el estudio.

El rango de concentraciones fue de 0.4 - 6 µg/ml. Para ello se prepararon, por duplicado, dos soluciones madres de clorhidrato de metoclopramida standard (título 100%) de 1000 µg/ml, pesando 50 mg de droga que se disolvieron en 50 ml de agua destilada. Se realizó una dilución, de cada madre, de 1:10 con agua destilada, de tal manera de obtener una concentración de 100 µg/ml. Se midieron, de cada dilución, 0,1 ml (10 µg) y se llevaron a 25 ml con una mezcla orina blanco:fase móvil (4:10); 0,3 ml (30 µg) y se llevaron a 50 ml con la misma mezcla; 0,1 ml (10 µg) que se llevaron a 10 ml ; 0,2 ml (20 µg) que se llevaron a 10 ml, 0,4 ml (40 µg) que se llevaron a 10 ml y 0,6 ml (60 µg) que también se llevaron a 10 ml, siempre con la mezcla orina:fase móvil, de tal manera de obtener las siguientes concentraciones de metoclopramida: 0,4; 0,6; 1,0; 2,0; 4,0 y 6,0 µg/ml. Cada solución así obtenida se filtró por membrana de nylon de 0.45 µm y se inyectó por triplicado en el cromatógrafo. Los datos de Area/10000 obtenidos, en función de la concentración fueron analizados por regresión lineal, utilizando el programa Microsoft Excel 5.0, evaluándose linealidad , precisión y recuperación.

Parámetros de Biodisponibilidad

A partir de los perfiles de excreción urinaria de metoclopramida, se obtuvieron los siguientes parámetros: $E_{24,5}$, máxima cantidad de droga excretada luego de 24.5 horas de ser administrados los comprimidos; $(dE/dt)_{max}$, máxima velocidad de excreción y t_{max} , tiempo de máxima velocidad de excreción.

Análisis estadístico

Se calcularon los valores medios de los parámetros arriba mencionados con sus respectivas desviaciones standards, para los mismos no fueron considerados los valores del voluntario No. 1, por comportarse de manera anómala en comparación con el resto. Luego de aplicar una prueba de rechazo de datos, Test de Dixon (*Dean y Dixon, 1951; Miller y Miller, 1993*) fue considerado un “outlier” y por lo tanto eliminado de los cálculos.

Se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar los porcentajes disueltos en el ensayo *in vitro* y también para los datos de $E_{24,5}$ y de $(dE/dt)_{max}$. (*Sokal y Rohlf, 1984*) Para concluir sobre la bioequivalencia de las dos formulaciones se calculó el intervalo de confianza del 90%, basado en el Test de la Hipótesis Intervalar, para los valores de $E_{24,5}$, normalmente distribuidos. (*Steinijans y Diletti, 1983*)

PLANILLA 3

ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE METOCLOPRAMIDA**Muestras de orina****Ayuno:**

Desde las 22:00 hs. del día anterior a la toma de muestra. (Aproximadamente 12 hs de ayuno.)

Toma de muestra:

1. Recolectar una muestra de orina antes de tomar los comprimidos y colocarla en el frasco rotulados como T₀. No importa el volumen orinado, tratar de que esta muestra no corresponda a la primera del día.
2. Tomar los comprimidos suministrados con abundante agua (un vaso entero de agua). Anotar el horario exacto de la toma en la planilla adjunta.
3. La primera muestra (Frasco No.1) se tomará a los 30 minutos posteriores a la toma de los comprimidos.

Seguir tomando muestras según indicación:

Muestra	Orina
1	30 min.
2	1 h.
3	1.30 h.
4	2.5 h.
5	3.5 h.
6	4.5 h.
7	5.5 h.
8	8.5 h.
9	11.5 h.
10	14.5 h.
11	24.5 h.

No olvidar registrar hora y volumen de cada muestra de orina en la planilla adjunta.

Alimentación del día del ensayo.

- Registrar la hora exacta de cada comida
- Desayuno: yoghurt o fruta.
- Almuerzo: carnes rojas con verduras. Agua.
- Merienda: jugo de fruta natural y tostadas con mermelada.
- Cena: pollo con ensalada. Agua.

Importante

- No ingerir te, café, mate, bebidas alcohólicas, medicamentos, durante el día del ensayo.
- Para cada muestra medir el total de la orina eliminada y de ese total tomar una pequeña cantidad en el recipiente rotulado, suministrado.
- **No perder ninguna muestra.**
- El intervalo de la toma puede variar en más o menos 10 minutos.

PLANILLA 4

ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD DE METOCLOPRAMIDA**Muestras de orina**

Frasco	Hora	Volumen
0		
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11		
12		
13		
14		
15		

Hora en que tomó el comprimido:

Hora del desayuno:
Hora del almuerzo:
Hora de la merienda:
Hora de la cena:

Droga: Metoclopramida
Especialidad:
Muestra: orina
Voluntario:
Edad:
Peso:

CALCULOS Y RESULTADOS

CALCULOS Y RESULTADOS

2.1. Cálculo de la concentración de metoclopramida disuelta a cada tiempo de muestreo en el ensayo *in vitro*, tanto en agua, es decir el medio oficial de USP 23, como en HCl 0.1 N, medio alternativo ensayado para confirmar correlaciones *in vitro-in vivo*, utilizando soluciones standards de metoclopramida en concentraciones de 16 µg/ml, preparadas cada día de trabajo, según las siguientes ecuaciones:

$$C_{ti} = \frac{(Amt_{.272} \cdot Cst.)}{Ast_{.272}} \cdot \frac{900}{1000} + Auxiliar$$

donde:

- C_{ti} = Concentración de Metoclopramida a tiempo t_i , expresada en mg/900 ml
 Amt_{272} = Absorbancia a 272 nm de cada alícuota muestreada a los distintos tiempos
 Ast_{272} = Absorbancia a 272 nm de la solución Standard de metoclopramida
 Cst = Concentración de la solución Standard de metoclopramida
 1000 = conversión de µg a mg
 900 = volumen total del medio de disolución
 $Auxiliar$ = corrección por cada alícuota de 5 ml muestreada, siendo:

$$Auxiliar = (\mu g/5 \text{ ml})_{ti} + (\mu g/5 \text{ ml})_{t(i-1)}$$

$$C_{ti} \% = \frac{(Amt_{.272} \cdot Cst.)}{Ast_{.272}} \cdot \frac{900}{1000} + Auxiliar \cdot \frac{100}{C_{\infty}}$$

donde:

- $C_{ti} \%$ = Concentración de metoclopramida a tiempo t_i , expresada en porcentaje del valor declarado.
 C_{∞} = Concentración declarada de metoclopramida.

Un modelo de la hoja de cálculo para obtener la concentración de metoclopramida disuelta a cada tiempo, expresada como mg/900 ml y como porcentaje del valor declarado, en el ensayo de disolución *in vitro*, aparece en la **Tabla 15**, siendo el correspondiente a la Formulación A, en medio acuoso. De igual manera se procedió para el resto de los ensayos.

En la **Figura 24** se muestran los perfiles de disolución de ambas formulaciones en los dos medios ensayados.

2.2. Determinación del orden cinético con que se disuelve la metoclopramida, en los dos medios de disolución ensayados, calculado mediante la obtención de los coeficientes de correlación de las relaciones: Cantidad de metoclopramida disuelta en función del tiempo, es decir: C_t vs. t (orden cero), y del logaritmo de la cantidad no disuelta de metoclopramida en función del tiempo, es decir: $\lg(1 - (C_t/C_{\infty}))$ vs. t ; donde C_t es la concentración de metoclopramida a tiempo t , expresada en mg/900 ml y C_{∞} es la concentración declarada de metoclopramida, expresada en mg/900 ml, (primer orden).

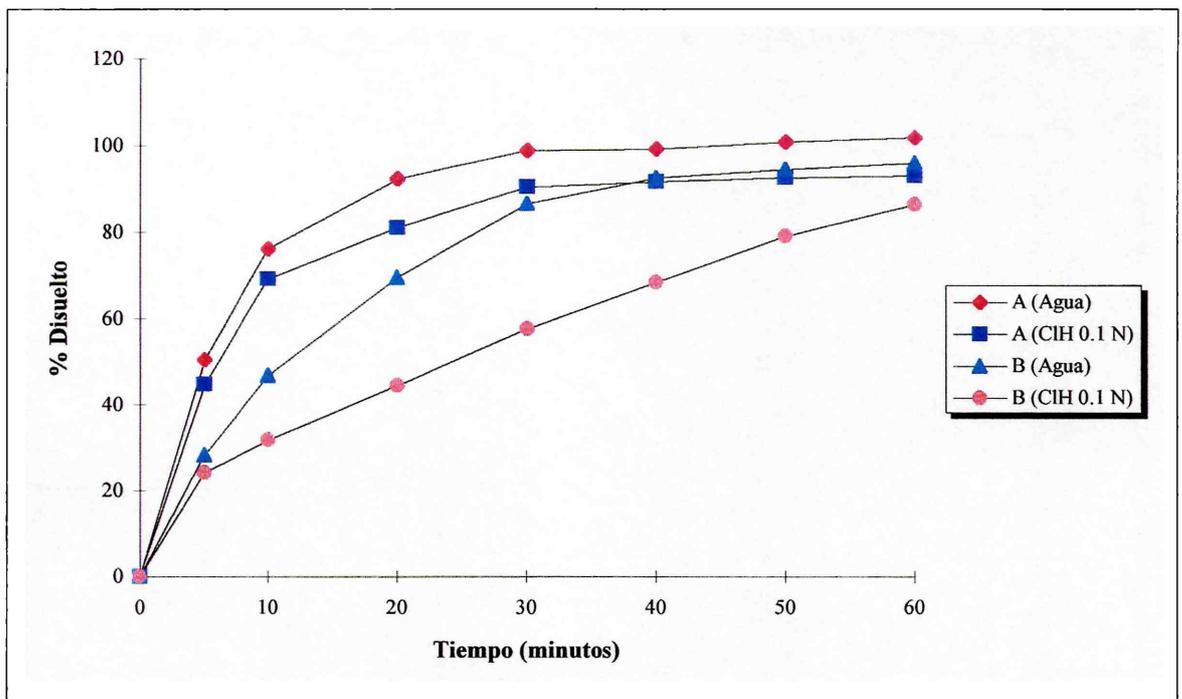
TABLA 15

Tiempo	A272	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/5ml}$	Auxiliar	mg/900ml	%
Comprim. 1						
5	0,209	5,91	29,56	29,56	5,32	52,40
10	0,331	9,36	46,81	76,37	8,46	83,29
20	0,393	11,12	55,58	131,94	10,08	99,29
30	0,391	11,06	55,29	187,24	10,08	99,34
40	0,4	11,31	56,57	243,80	10,37	102,14
50	0,401	11,34	56,71	300,51	10,45	102,95
60	0,401	11,34	56,71	357,22	10,51	103,51
Comprim. 2						
5	0,202	5,71	28,57	28,57	5,14	50,39
10	0,326	9,22	46,10	74,67	8,33	81,60
20	0,378	10,69	53,46	128,12	9,70	95,02
30	0,384	10,86	54,30	182,43	9,90	97,04
40	0,399	11,29	56,43	238,85	10,34	101,31
50	0,401	11,34	56,71	295,56	10,45	102,37
60	0,401	11,34	56,71	352,27	10,50	102,92
Comprim.3						
5	0,193	5,46	27,29	27,29	4,91	48,15
10	0,282	7,98	39,88	67,17	7,21	70,62
20	0,365	10,32	51,62	118,79	9,36	91,71
30	0,371	10,49	52,47	171,26	9,56	93,72
40	0,38	10,75	53,74	225,00	9,84	96,47
50	0,4	11,31	56,57	281,56	10,41	101,99
60	0,401	11,34	56,71	338,27	10,49	102,79
Comprim.4						
5	0,145	3,88	19,40	19,40	3,49	34,39
10	0,28	7,49	37,47	56,87	6,76	66,59
20	0,372	9,96	49,78	106,65	9,02	88,78
30	0,385	10,30	51,52	158,17	9,38	92,35
40	0,408	10,92	54,60	212,76	9,99	98,31
50	0,41	10,97	54,86	267,63	10,09	99,32
60	0,412	11,03	55,13	322,76	10,19	100,34
Comprim.5						
5	0,277	7,41	37,07	37,07	6,67	65,44
10	0,346	9,26	46,30	83,37	8,37	82,11
20	0,399	10,68	53,39	136,76	9,69	95,08
30	0,405	10,84	54,19	190,95	9,89	97,03
40	0,41	10,97	54,86	245,82	10,07	98,74
50	0,414	11,08	55,40	301,21	10,22	100,22
60	0,419	11,21	56,07	357,28	10,39	101,95
Comprim.6						
5	0,214	5,73	28,64	28,64	5,15	52,27
10	0,294	7,87	39,34	67,98	7,11	72,10
20	0,34	9,10	45,50	113,47	8,26	83,73
30	0,378	10,12	50,58	164,06	9,22	93,47
40	0,38	10,17	50,85	214,90	9,32	94,47
50	0,385	10,30	51,52	266,42	9,49	96,21
60	0,4	10,71	53,53	319,95	9,90	100,40

TABLA 15. Concentraciones de metoclopramida disueltas a cada tiempo en medio acuoso. Formulación A.

FIGURA 24

Perfiles de disolución in vitro de las Formulaciones A y B conteniendo Metoclopramida, en agua y en HCl 0.1 N



2.3. Determinación de la constante de disolución (kd) de metoclopramida y del tiempo en el que se disuelve el 50% de la droga (t_{50%}), a partir de conocer la cinética con que se disuelve, en ambos medios, según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Para orden cero: } kd = \frac{Ct}{t}$$

$$t_{50\%} = \frac{C_{\infty}}{2kd}$$

$$\text{Para primer orden: } kd = -\lg\left[1 - \left(\frac{Ct}{C_{\infty}}\right)\right] \cdot \frac{2.303}{t}$$

$$t_{50\%} = \frac{0.693}{kd}$$

Las dos formulaciones, en medio acuoso, se disuelven de acuerdo a una cinética de primer orden, en cambio en medio de ácido clorhídrico la Formulación B lo hace siguiendo una cinética de orden cero, mientras que la Formulación A sigue una cinética de primer orden.

En la **Tabla 16** se encuentran los valores de kd y de t_{50%}, calculados para las dos formulaciones en los dos medios ensayados.

2.4. Determinación de la cantidad disuelta de metoclopramida a los 30 minutos, que de acuerdo con la normativa de USP 23 no debe ser inferior al 75 % de la cantidad total (Q₃₀), calculada mediante la ecuación:

$$Q_{30} = \frac{(A_{30} \cdot Cst.)}{Ast_{.272}} \cdot \frac{900}{1000} + Auxiliar \cdot \frac{100}{C_{\infty}}$$

donde: A₃₀ = Absorbancia a 272 nm de la alícuota correspondiente a los 30 minutos.

Los valores de Q₃₀ obtenidos figuran en la **Tabla 16**.

2.5. Determinación del porcentaje total de metoclopramida disuelto al término de la experiencia, es decir, 60 minutos. (Fd%), calculado mediante la ecuación:

$$Fd\% = \frac{(A_{60} \cdot Cst.)}{Ast_{.272}} \cdot \frac{900}{1000} + Auxiliar \cdot \frac{100}{C_{\infty}}$$

donde: A₆₀ = Absorbancia a 272 nm de la alícuota correspondiente a los 60 minutos.

Los porcentajes totales disueltos al cabo de los 60 minutos de cada ensayo de disolución (Fd%) figuran en la **Tabla 16**.

2.6. Determinación de la Eficiencia de Disolución (ED%), calculada mediante la siguiente expresión:

$$ED\% = \frac{ABC}{t \cdot Q_{100}} \cdot 100$$

donde:

ABC = Área bajo la curva de disolución

Q_{100} = Cantidad correspondiente al 100% de metoclopramida disuelta

t = Tiempo máximo elegido para el cálculo del ABC, en nuestro caso 60 minutos.

2.6.1. Cálculo del ABC mediante el método de los trapecios el cual consiste en dividir la curva en tantos trapecios como datos de cantidad disuelta de droga se dispongan, determinar el área de cada trapecio y luego sumarlos.

$$AreaTrapecio = \sum \frac{C_i + C_{(i+1)}}{2} \cdot (t_{(i+1)} - t_i)$$

donde:

C_i = Concentración disuelta a cualquier tiempo t_i

$C_{(i+1)}$ = Concentración disuelta al tiempo siguiente $t_{(i+1)}$

La ED% para cada formulación y en cada medio de disolución figuran en la **Tabla 16**.

TABLA 16

Parámetros	A		B	
	Agua	HCl 0.1 N	Agua	HCl 0.1 N
kd	0,1334	0,0414	0,0483	0,129*
t50%	5,19	16,72	14,35	38,76
ED%	88,85 ± 1,9	82,63 ± 1,73	62,00 ± 5,21	54,64 ± 1,93
Q30	98,82 ± 0,89	90,37 ± 0,70	86,65 ± 0,65	57,53 ± 0,83
Fd%	101,98 ± 0,65	92,86 ± 0,41	95,82 ± 1,40	86,28 ± 0,69

TABLA 16. Parámetros de disolución calculados para los comprimidos de las Formulaciones A y B, en medio acuoso y en medio de HCl 0.1N
 La kd está expresada en 1/minutos
 * kd expresada en (mg/ml)/minutos
 El t50% está expresado en minutos

2.7. Cálculo de la curva de calibración del método por HPLC para determinar los niveles de metoclopramida en las muestras de orina:

La linealidad de la curva de calibración por HPLC, para realizar el seguimiento de los niveles de metoclopramida en orina, fue encontrada en el rango de concentraciones entre 0.4 - 6 µg/ml .

Los valores de Area/10000 para cada una de las soluciones de metoclopramida standard preparadas en orina blanco, fueron:

Primera Réplica		Segunda Réplica	
Concentración (µg/ml)	Area/10000 ^(*)	Concentración (µg/ml)	Area/10000 ^(*)
0,4	2,13	0,4	1,69
0,6	2,86	0,6	2,84
1,0	5,68	1,0	5,35
2,0	11,29	2,0	10,93
4,0	22,09	4,0	21,44
6,0	34,46	6,0	32,72

(*) Valor medio de tres inyecciones de la misma solución standard

El intercepto con el eje de las ordenadas (a) y la pendiente (b), con sus respectivos intervalos de confianza del 95%, fueron:

$$a = - 0.328 \pm 0.26$$

$$b = 5.944 \pm 0.09$$

con un coeficiente de correlación $r = 0.999$ (**Figura 25**)

Con el fin de confirmar el análisis de regresión se realizó un Análisis de Residuales (Ri) , método gráfico por el cual la relación Ri vs. Concentración nos debe dar un modelo aleatorio de distribución y además la sumatoria de los Ri debe ser próxima a cero. Se encontró un valor de : $\sum Ri = 4,35 \times 10^{-14}$ (**Figura 26**)

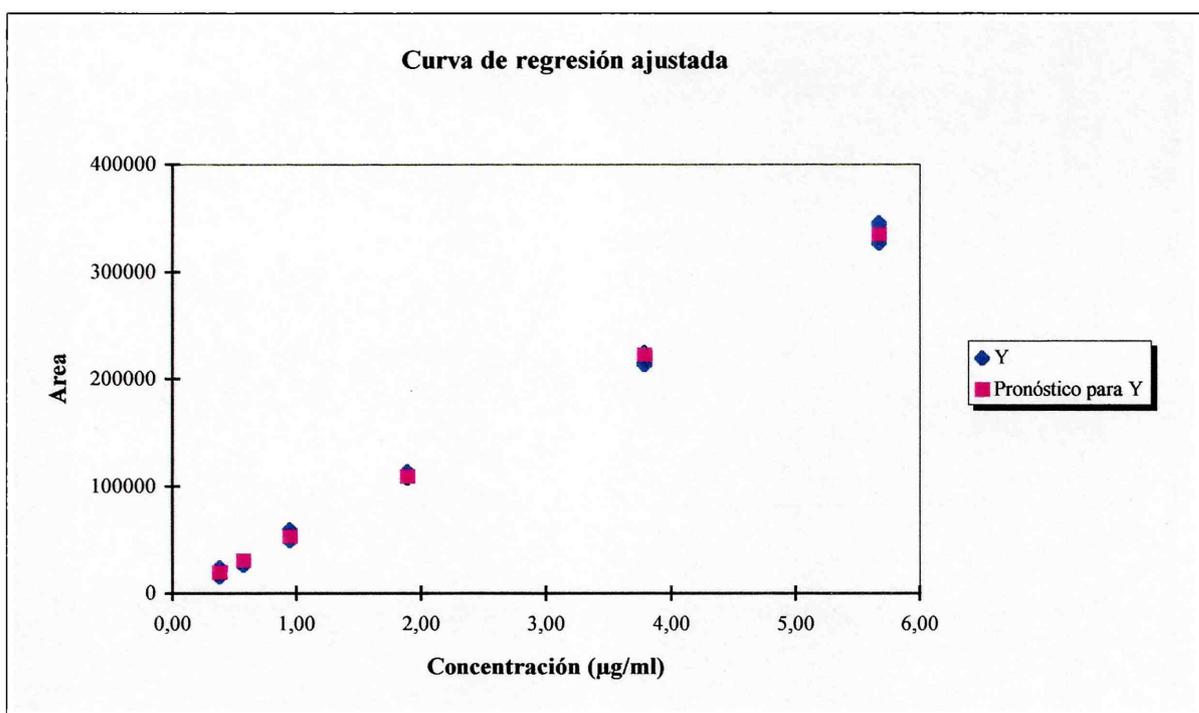
Con la misma finalidad se realizó el análisis del Factor Respuesta, es decir la relación entre la señal, en nuestro caso Area/10000, con la concentración, que en función de la misma, debe mantenerse constante a lo largo del rango de concentraciones de la curva de calibración. (**Figura 27**)

Ambos análisis, así como el coeficiente de correlación obtenido, han confirmado que el modelo usado para nuestro método analítico es lineal. (*Myers, 1986*)

En la **Figura 28** se puede observar un cromatograma tipo de la determinación de metoclopramida en orina por el método de HPLC.

FIGURA 25

Curva de Calibración de Metoclopramida en orina por HPLC



Rango = 0,4 - 6 µg/ml

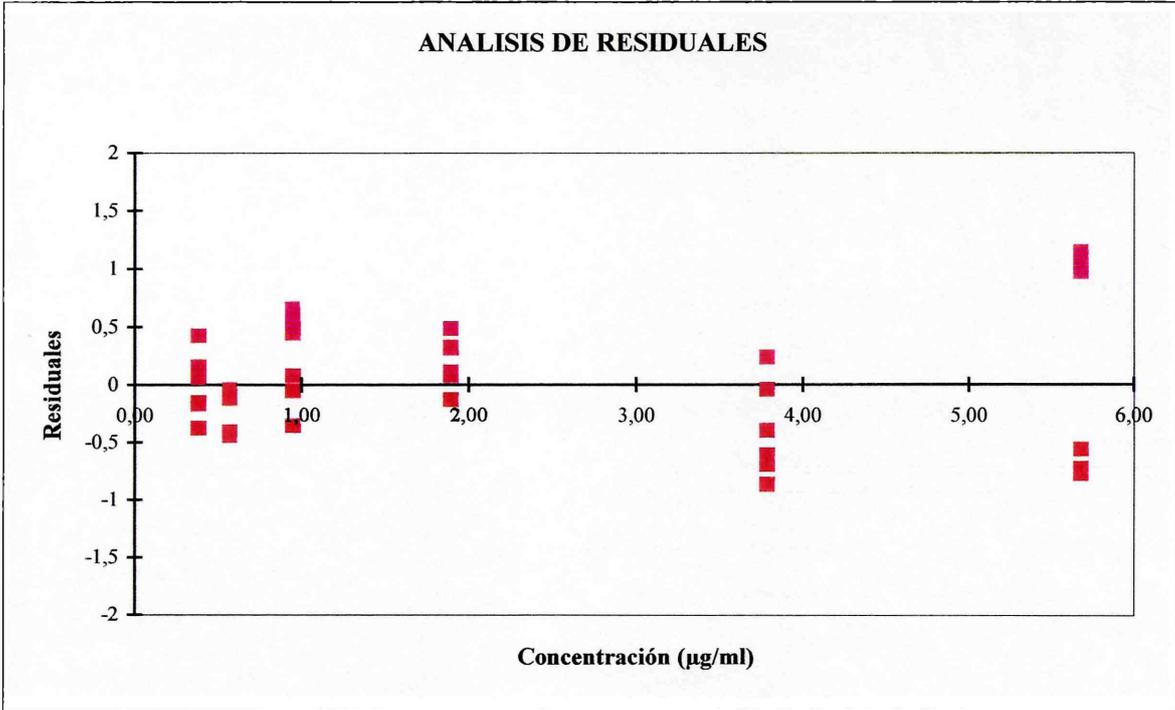
Ordenada al origen (a) y Pendiente (b) con sus respectivos intervalos de confianza del 95 %, considerando Area/10000:

$$a = - 0,328 \pm 0,264$$

$$b = 5,943 \pm 0,090$$

Coeficiente de Correlación (r) = 0,999

FIGURA 26
 Método gráfico de Residuales para establecer linealidad en la curva de calibración de metoclopramida en orina por HPLC



Sumatoria de Residuales = 4,35E-14

FIGURA 27

Análisis del Factor Respuesta para establecer linealidad en la curva de calibración de metoclopramida en orina por HPLC

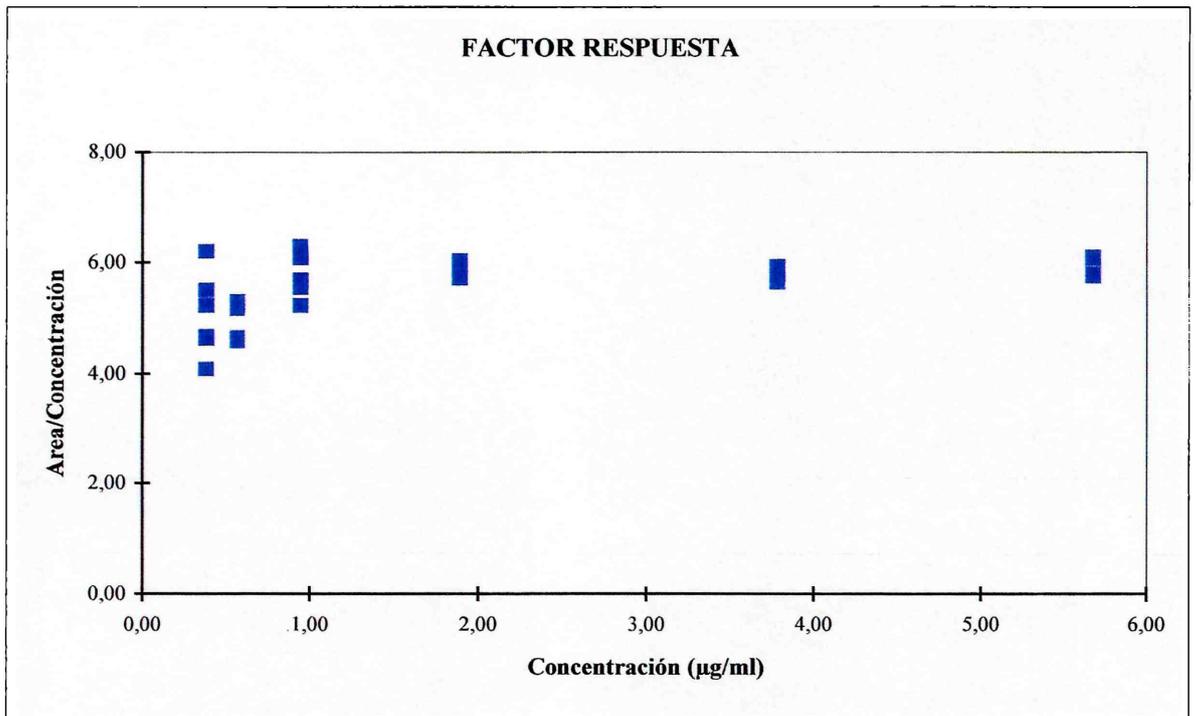
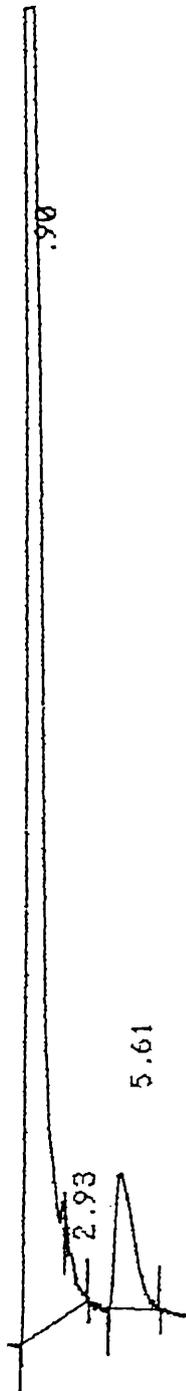


FIGURA 28
Cromatograma tipo de Metoclopramida en orina



Columna: RP-18, 125 mm x 4 mm (5 μ)
Fase Móvil: Agua con 1,3% trietilamina a pH 6.8
con AcOH:Metanol:Acetonitrilo
(77:16:8)

Flujo: 1,2 ml/min
Detección: 309 nm
Temperatura: 30°C
Volumen de Inyección: 20 μ l

Tiempo de retención de Metoclopramida = 5.61

2.8. Cálculo de la Precisión del Sistema, expresada como el Coeficiente de Variación (CV) de seis inyecciones de la misma solución de un standard de metoclopramida en orina blanco, siendo:

$$CV = \frac{S_{(n-1)}}{\bar{X}} \cdot 100$$

donde:

$S_{(n-1)}$ = desviación standard

\bar{X} = Promedio de los seis valores de Area

La precisión del sistema fue de 0.9 %, expresada como Coeficiente de Variación (CV)

2.9. Cálculo de la Precisión del método, expresada como el CV de cinco muestras de orina conteniendo metoclopramida standard.

La precisión del método fue de 3.8 %, también expresada como CV.

2.10. Cálculo de la Precisión interdía, expresada como el CV de cuatro inyecciones de la misma muestra en cuatro días distintos.

La precisión interdía fue de 3.5 %, expresada como CV.

2.11. Cálculo de la exactitud del método realizando un ensayo de recuperación, utilizando nueve muestras preparadas con standard de metoclopramida agregado a blancos de orina, en concentraciones comprendidas dentro del rango de la curva de calibración, expresada como % medio de Recuperación \pm desviación típica de la media.

El porcentaje de recuperación fue de 97.43 ± 0.52 , expresado como % medio \pm desviación típica del valor medio, para $n = 9$.

2.12. Cálculo de la cantidad acumulativa de metoclopramida en orina expresada en mg, mediante la utilización de la curva de calibración, según la siguiente expresión:

$$Cant. Acum. = \frac{(Area_{t_i} - a)}{b} \cdot f \cdot Vol. + D$$

donde:

$Cant. Acum.$ = cantidad acumulativa de metoclopramida en orina a un tiempo t_i

$Area_{t_i}$ = Area/10000 de la muestra correspondiente al tiempo t_i

a = ordenada al origen de la curva de calibración

b = pendiente de la curva de calibración

f = factor de dilución

$Vol.$ = Volumen total de orina excretado al tiempo t_i

D = cantidad acumulativa de metoclopramida en orina a un tiempo $t_{(i-1)}$

Un modelo de la hoja de cálculo para obtener las cantidades acumulativas de metoclopramida en orina a cada tiempo, aparece en la **Tabla 17**, siendo el

correspondiente a la Formulación A. De igual manera se procedió para el resto de los comprimidos.

En la **Figura 29** se muestran los perfiles medios de excreción urinaria acumulativa de metoclopramida, para ambas formulaciones y en la **Figura 30** la cantidad acumulativa para cada sujeto y para cada formulación.

2.13. Cálculo de la velocidad de excreción urinaria, expresada en mg/h, mediante la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{dE}{dt}\right)_{(t_1+t_2)/2} = \frac{E_{t_2} - E_{t_1}}{t_2 - t_1}$$

donde:

dE/dt = Velocidad de excreción

E_{t_2} = Cantidad excretada al tiempo t_2

E_{t_1} = Cantidad excretada al tiempo t_1

Un modelo de la hoja de cálculo para obtener la velocidad de excreción máxima de metoclopramida en orina, aparece en la **Tabla 18**, siendo el correspondiente a la Formulación A. De igual manera se procedió para el resto de los comprimidos.

En la **Tabla 19** aparecen los valores de los parámetros de biodisponibilidad, calculados a partir de los niveles urinarios de droga, para cada voluntario y para cada formulación, con sus correspondientes valores medios y sus dispersiones. Los mismos son: cantidad máxima excretada de metoclopramida al cabo de las 24,5 horas luego de ser administrados los comprimidos ($E_{24,5}$); máxima velocidad de excreción urinaria $(dE/dt)_{\text{máx}}$ y el tiempo de máxima velocidad de eliminación, $t_{\text{máx}}$.

En la **Figura 31** se grafica la media de la velocidad de eliminación urinaria de metoclopramida en función del tiempo, para ambas formulaciones.

2.14. Cálculo de la Biodisponibilidad Relativa (**F**) de metoclopramida, a partir de la cantidad máxima de droga excretada por orina, según la siguiente ecuación:

$$F = \frac{E_{24,5_{Test}}}{E_{24,5_{Ref.}}}$$

donde:

Test: Formulación Test (Formulación A)

Ref.: Formulación Referencia (Formulación B)

Los valores de **F** obtenidos para los ocho voluntarios, son los siguientes:

	Biodisponibilidad Relativa (F)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
$E_{24,5}$	0,68	0,94	0,91	1,0	1,5	0,75	1,15	1,14

2.15. Análisis estadístico. Aplicación de un ANOVA con los porcentajes disueltos en los distintos tiempos ensayados, tanto en agua como en HCl 0.1 N para las dos formulaciones.

Aplicación de un ANOVA con los valores de excreción urinaria, $E_{24,5}$, y con los datos de velocidad máxima de excreción.

Se establecieron los límites de confianza del 90%, basado en el test de la hipótesis intervalar, para los valores de $E_{24,5}$, de ambas formulaciones. (*Steinijans y Diletti, 1983*)

En la **Tabla 20** se vuelcan los resultados del ANOVA, realizado con los porcentajes disueltos en el ensayo de disolución, con los valores de $E_{24,5}$ y con las velocidades máximas de excreción.

El intervalo de confianza calculado para la cantidad excretada a las 24,5 hs fue de 0.81 - 1.17. (Región de tolerancia: 0.8 - 1.25)

En el capítulo de discusión se analizan los resultados encontrados.

TABLA 17

Droga: Metoclopramida.
 Especialidad: Formulación A
 Muestra: orina.
 Voluntario: G.Y.
 Hora de administración: 7:20
 Edad: 27
 Peso: 55 kg.

Muestra	Tiempo	Hora	Volumen	Area	mg excret.	mg acum.
1	0,5	7:50	15	47848	0,065	0,065
2	1	8:20	70	59409	0,369	0,434
3	1,5	8:50	400	25951	0,984	1,417
4	2,5	9:50	80	42453	0,308	1,725
5	3,5	10:50	120	54333	0,582	2,307
6	4,5	11:50	140	39643	0,506	2,813
7	5,5	12:50	50	49468	0,222	3,034
8	8,5	15:50	100	26057	0,247	3,281
9	11,5	18:50	65	12824	0,088	3,369
10	14,5	21:50	320	10264	0,365	3,734
11	24,5	7:50	100	9158	0,105	3,839

TABLA 17. Cantidades acumulativas de metoclopramida en orina a cada tiempo, para un voluntario al cual se le administraron dos comprimidos de la Formulación A.

Las muestras fueron diluidas 1:5

FIGURA 29
Perfiles medios de excreción urinaria acumulativa de Metoclopramida

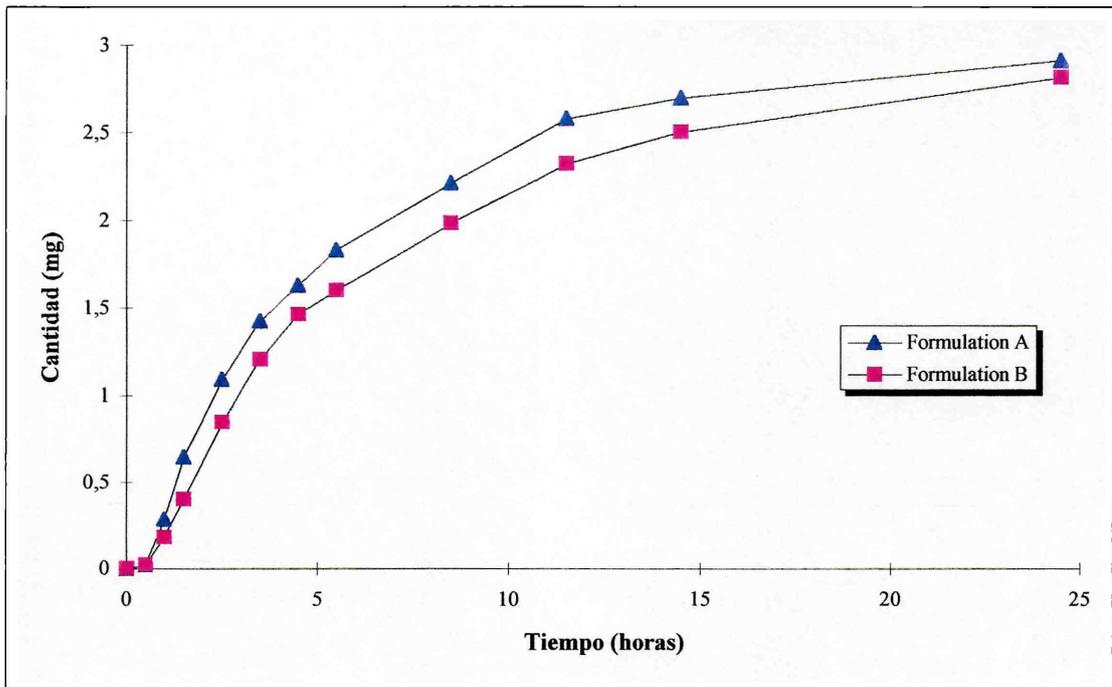
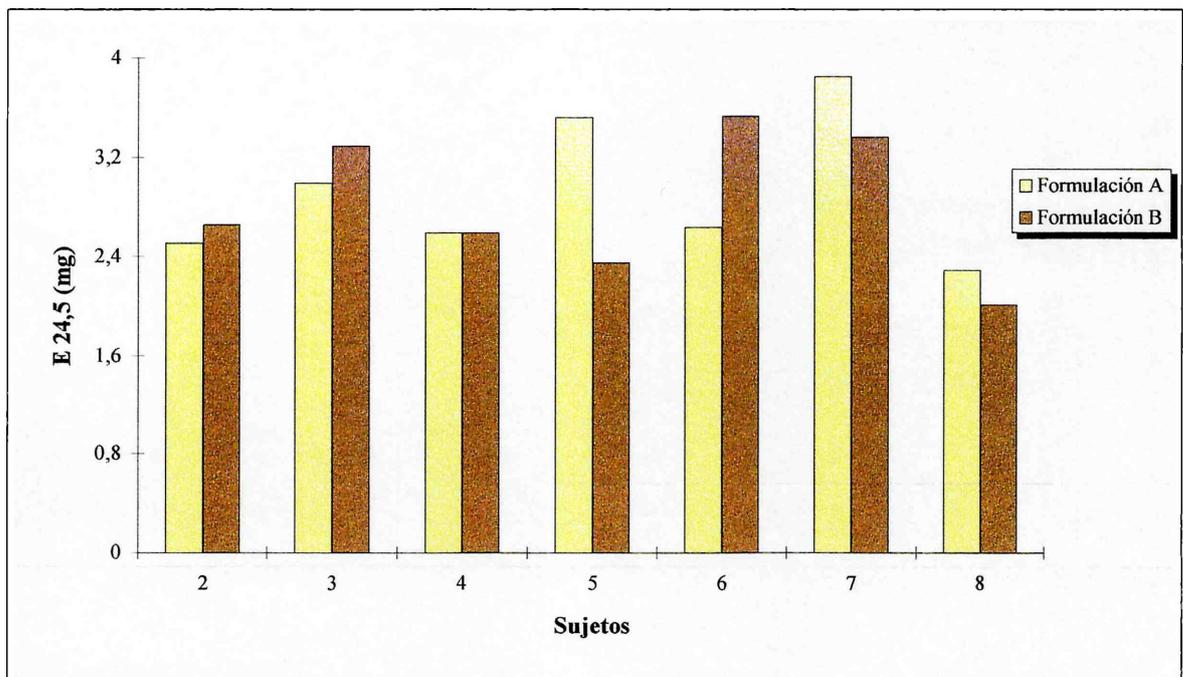


FIGURA 30
Cantidad acumulativa de metoclopramida en orina para las Formulaciones A y B



Cantidad acumulativa de metoclopramida en orina, para cada sujeto y para cada formulación administrada

TABLA 18

Droga: Metoclopramida.
 Especialidad: Formulación A
 Muestra: orina.
 Hora de administración: 6:15
 Voluntario: M.C.
 Edad: 25
 Peso: 49 kg.

T	mg acum.	t	dE/dt
0,5	0,05	0	0
1	0,30	0,75	0,501
1,5	0,96	1,25	1,314
2,5	1,50	2	0,541
3,5	1,81	3	0,316
4,5	1,99	4	0,175
5,5	2,20	5	0,209
8,5	2,66	7	0,155
11,5	3,62	10,00	0,318
14,5	3,68	13,00	0,019
24,5	3,85	19,50	0,017

TABLA 18. Velocidad de excreción de metoclopramida en orina, para un voluntario al cual se le administró dos comprimidos de la Formulación A.

T : tiempo de muestreo de orina

t : tiempo medio del muestreo de orina

TABLA 19

Sujetos	E24,5 (mg)		(dE/dt)máx. (mg/h)		tmáx. (h)	
	A	B	A	B	A	B
1	6,77	9,99	1,67	1,33	2	2
2	2,51	2,66	0,74	0,46	0,75	2
3	2,99	3,29	0,75	0,69	2	0,75
4	2,59	2,59	0,58	0,46	0,75	2
5	3,52	2,35	0,46	0,42	1,5	1,25
6	2,63	3,53	0,59	0,56	2	3
7	3,85	3,36	1,31	0,61	1,25	1,25
8	2,29	2,01	0,58	0,37	0,75	2
Media	2,91	2,83	0,72	0,51	1,29	1,75
Sm	0,22	0,21	0,11	0,04	0,21	0,38

TABLA 19. Parámetros de biodisponibilidad para las Formulaciones A y B, a partir de niveles urinarios de clorhidrato de metoclopramida.

FIGURA 31

Perfiles medios de velocidad de excreción urinaria de Metoclopramida

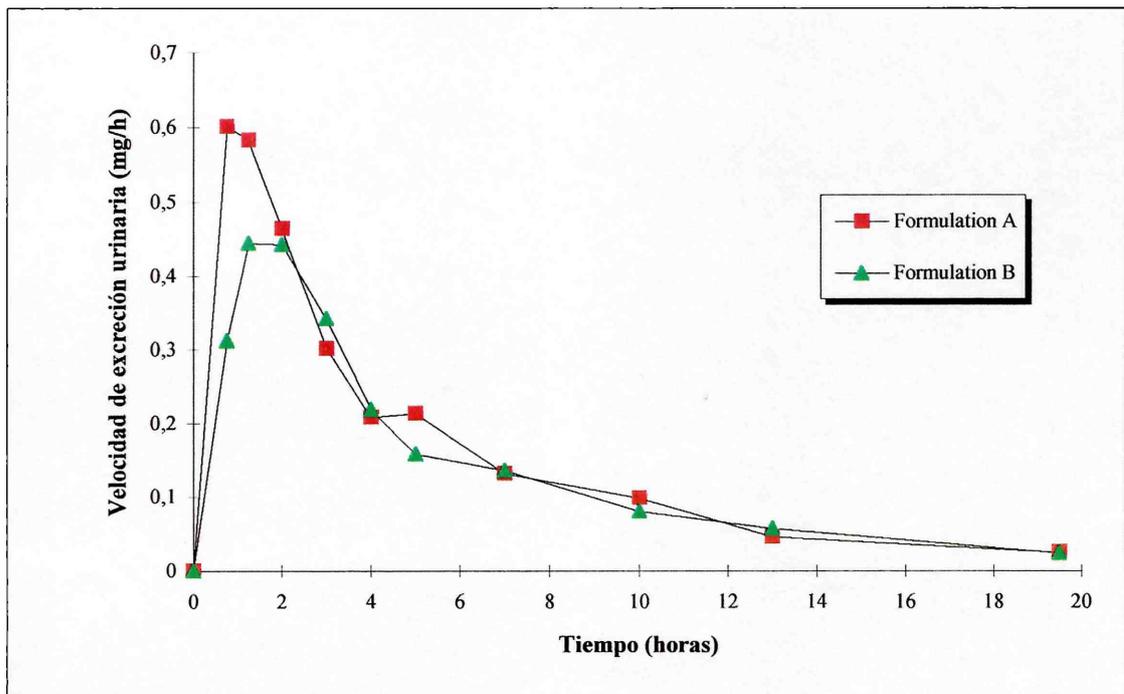


TABLA 20

PARAMETROS	ANOVA		
	F		P
	calculado	crítico	
% Disuelto en Agua	0,82	1,93	0,61
% Disuelto en HCl 0.1 N	1,18	2,44	0,33
E 24,5	0,075	4,75	0,79
(dE/dt)máx.	3,23	4,75	0,097

TABLA 20. Resultados del ANOVA realizado con los parámetros de disolución y de excreción urinaria de metoclopramida

DISCUSSION

DISCUSION

2. ESTUDIOS DE BIODISPONIBILIDAD RELATIVA Y BIOEQUIVALENCIA DE COMPRIMIDOS DE METOCLOPRAMIDA. ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

El Clorhidrato de Metoclopramida es una droga perteneciente al grupo de las benzamidas, utilizada en el tratamiento de náuseas y vómitos, que ejerce la mayoría de sus efectos a nivel del sistema nervioso central, característico del bloqueo de los receptores dopaminérgicos. (*Teng et al., 1977; Dollery, 1991*)

Se absorbe con rapidez y por completo después de su administración oral, pero el primer paso hepático reduce su biodisponibilidad a un 75%, aproximadamente. El fármaco se distribuye con rapidez en la mayoría de los tejidos y atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica. Hasta un 30% de la droga se excreta sin cambios en la orina, y el resto se elimina por orina y bilis después de su conjugación con ácido glucurónico ó sulfúrico. (*Goodman Gilman et al., 1990*)

En esta parte del trabajo se analizó la biodisponibilidad de una formulación desarrollada y elaborada en la Unidad de Producción de Medicamentos (UPM), conteniendo clorhidrato de metoclopramida, que ofreció un buen comportamiento en el ensayo de disolución *in vitro*, comparándola con una partida de comprimidos de amplia utilización en el mercado farmacéutico argentino. Nuestro objetivo fue determinar si *in vivo* presentaba el mismo comportamiento que *in vitro* y si podíamos considerar ambas formulaciones bioequivalentes, para completar el control de calidad biofarmacéutico de las mismas.

El primer paso fue analizar su comportamiento *in vitro*. Ambas formulaciones cumplieron con los requisitos de USP 23, respecto a la cantidad de principio activo disuelto a los 30 minutos, en medio acuoso. También analizamos la disolución en ácido clorhídrico 0.1 N, que fue significativamente menor (**Tabla 16 y Figura 24**). El resultado del ANOVA realizado con los porcentajes disueltos en los distintos tiempos para las dos formulaciones, en ambos medios, nos indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) en ninguno de los casos, **Tabla 20**. Es decir, que ambas formulaciones ofrecieron el mismo comportamiento de disolución, aún en distintas condiciones.

Para realizar el seguimiento de la droga *in vivo*, el primer paso fue optimizar un método por HPLC que nos permitiera realizar dicho seguimiento de una manera selectiva, en el fluido biológico seleccionado, orina, esta selectividad la podemos apreciar en la **Figura 28**. La validación del método nos aseguró estar trabajando en las condiciones adecuadas, ver **Figuras 25, 26 y 27**. Además los valores de precisión y el

porcentaje de recuperación de droga desde el fluido biológico, del orden del 97%, completaron una buena validación del método.

Al realizar el ANOVA con los valores de excreción urinaria acumulativa y con los datos de velocidad máxima de excreción, no aparecen diferencias significativas ($p > 0.05$), entre las dos formulaciones, (**Tabla 20**) lo cual nos está revelando un comportamiento estadísticamente similar en cuanto a absorción y eliminación de la droga y que a su vez se correlaciona con los resultados encontrados *in vitro*.

Aunque estadísticamente no encontramos diferencias, podemos apreciar en la **Tabla 19** y en la **Figura 29**, los perfiles de excreción acumulativa, que nos muestran niveles muy similares, aunque levemente superiores para la Formulación A, es decir la elaborada en la UPM. Al realizar la comparación individual entre sujetos, **Figura 30**, podemos notar que mientras en el sujeto 4 los niveles acumulados son iguales, tres sujetos presentan cantidades excretadas mayores frente a la administración de la Formulación A que a la B, en tanto los otros tres es a la inversa, no hemos considerado al sujeto 1, por ser un outlier, como ya fue aclarado.

Este mismo comportamiento aparece en la **Figura 31** donde registramos la velocidad de excreción de ambas partidas de comprimidos, cuyos perfiles también nos revelan una mayor velocidad de la Formulación A, sobre todo inicialmente, hasta aproximadamente las 2 horas, luego de administrada la formulación.

Por otra parte hemos corroborado la similitud de los niveles encontrados de metoclopramida libre, en la excreción urinaria, con los informados por otros autores (*Bateman et al., 1978*) que luego de administrar 10 mg de clorhidrato de metoclopramida, detectan alrededor de un 12 % de la dosis en la excreción urinaria de voluntarios sanos, mientras que nuestras experiencias arrojan un porcentaje cercano al 15%.

Para confirmar estos resultados y llegar a una conclusión sobre la bipequivalencia de las formulaciones, se calcularon los límites del intervalo de confianza del 90%, para la cantidad excretada a las 24.5 horas, los cuales fueron 0.81 - 1.17. Si consideramos que la región de tolerancia es de 0.80 - 1.25, podemos afirmar que ambas formulaciones son bioequivalentes, es decir que podrán ser intercambiables en una prescripción, por presentar la misma biodisponibilidad.

**3. INFLUENCIA DE LA TECNOLOGIA DE
ELABORACION
SOBRE LA DISOLUCION DE COMPRIMIDOS DE
AMPICILINA. ENSAYOS *IN VITRO*.**

MATERIALES Y METODOS

3. INFLUENCIA DE LA TECNOLOGIA DE ELABORACION SOBRE LA DISOLUCION DE COMPRIMIDOS DE AMPICILINA. ENSAYOS *IN VITRO*

MATERIALES Y METODOS

Materiales

- * Ampicilina, trihidrato, droga en polvo uso comercial, grado USP 23
- * Almidón, lactosa, PVP y estearato de magnesio, grado USP 23
- * Aerosil y Avicel PH 101, NF 18

* Comprimidos comerciales disponibles en el mercado farmacéutico argentino, conteniendo 500 mg de Ampicilina, de cuatro laboratorios productores distintos, identificados como Laboratorios (Lab.) A, B, C y D , correspondientes cada uno de ellos a una misma partida.

* Comprimidos no recubiertos, conteniendo 500 mg de Ampicilina, expresada como ampicilina anhidra, elaborados por el personal de la Unidad de Producción de Medicamentos (UPM), mediante dos métodos distintos.

Una partida (AUPM₀₁) fue preparada por granulación por vía húmeda y compresión. Otra partida (AUPM₀₂) fue elaborada por el método de granulación por vía seca, es decir, doble compresión ó compresión directa, utilizando los mismos excipientes que para la AUPM₀₁, con excepción del PVP. Una tercera partida (AUPM₀₃) fue preparada también por el mismo método de compresión directa, pero empleando excipientes modificados, como son la celulosa microcristalina ó Avicel y el dióxido de silicio coloidal ó Aerosil.

Las modificaciones realizadas a las partidas fueron sugeridas a consecuencia de los resultados de disolución encontrados.

La composición de las diferentes partidas figura en la **Tabla 21**:

	COMPRIMIDOS DE AMPICILINA		
	AUPM ₀₁	AUPM ₀₂	AUPM ₀₃
Ampicilina, trihidrato	580	580	580
Almidón	80	60	10
Lactosa	60	80	-
PVP	20	-	-
Estearato de magnesio	10	40	10
Aerosil	-	-	4
Avicel	-	-	156

TABLA 21. Composición de los comprimidos de Ampicilina, expresada en mg de componente por comprimido.

Equipos

* Equipo de disolución de comprimidos Alycar Mod. AD150

* Espectrofotómetro Beckman M26

* Cromatógrafo líquido Konik KNK 500G con una bomba de doble pistón; equipado con un detector de longitud de onda variable, modelo 204 Linear; un inyector Rheodyne modelo 7125, con un loop fijo de 20 μL ; un microprocesador KNK 029-375 y un integrador Spectra Physics, modelo Datajet SP 4600.

* Una columna Lichrocart RP-18 (125 mm x 4 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula, con un guarda columna Supelco (50 mm x 4.6 mm de diámetro interno) rellena con Pelliguard LC-18 de 40 μm de tamaño de partícula.

* Micropipeta automática Socorex de 100-1000 μL y Pipeta automática Eppendorf de 500-5000 μL .

* Balanza Metler Toledo AG 204

Contenido de ampicilina

Se determinó el contenido de ampicilina de todos los comprimidos ensayados mediante la utilización de dos métodos: absorción al UV en medio de agua destilada, a 265 nm y por HPLC. Para ello se pesaron individualmente 20 comprimidos y se determinó el peso promedio. Se pulverizaron y se pesaron alícuotas correspondientes a 20 mg de principio activo (aproximadamente 30 mg de pulverizado) que se llevaron a 50 ml con agua destilada, de tal manera de obtener una concentración de 0,4 mg/ml, se agitaron mecánicamente durante 30 minutos, se filtraron y se leyeron al UV a 265 nm. Los resultados, expresados en porcentaje del valor declarado, se obtuvieron a partir de

una curva de calibración calculada por el método de regresión lineal de mínimos cuadrados. Se realizaron cinco réplicas de la valoración.

Del mismo pulverizado de los comprimidos se pesaron alícuotas correspondientes a 25 mg de ampicilina (aproximadamente 38 mg de pulverizado) que se llevaron a 25 ml con agua destilada, de tal manera de obtener una concentración de 1 mg/ml, se agitaron mecánicamente durante 30 minutos, se filtraron por membrana de nylon de 0.45 μm y se inyectaron en el cromatógrafo por triplicado. Los resultados, expresados en porcentaje del valor declarado, se obtuvieron a partir de soluciones de referencia, preparadas cada día de trabajo, con ampicilina standard de título 99.4% y 0.48% de humedad, en concentraciones de 1 mg/ml, para lo cual se pesaron 25 mg de ampicilina standard que se disolvieron en 25 ml de agua destilada, se filtraron por membrana de nylon de 0.45 μm y se inyectaron, también por triplicado, en el cromatógrafo. Se realizaron tres réplicas de la valoración.

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

Fase móvil: Fosfato monobásico de potasio 0.1 M : Acetonitrilo (70:30)

Flujo: 1 ml/minuto

Volumen de inyección: 20 μL

Temperatura: 25 °C

Detección: 254 nm

Validación del método de Absorción al UV

Para la validación del método de Absorción al UV, a 265 nm, se obtuvo una curva de calibración en medio de agua destilada, en un rango de concentraciones entre 0,16 - 0,8 mg/ml. Para ello se prepararon, por duplicado, dos soluciones madres de ampicilina standard (título 99.4%, con 0.48% de humedad) de 0,8 mg/ml, pesando 20 mg de droga standard que se disuelven en 25 ml de agua destilada. A partir de estas soluciones madres se prepararon tres diluciones para obtener las siguientes concentraciones:

Dilución	Concentración (mg/ml)
5:25	0,16
5:10	0,40
4:5	0,64
-	0,80

Se leyeron al UV a 265 nm todas las diluciones obtenidas y los datos de Absorbancia en función de la concentración, se analizaron por regresión lineal, utilizando el programa Microsoft Excel 5.0, evaluándose linealidad.

Estudio de disolución *in vitro*

Se efectuó de acuerdo a la normativa de USP 23, cuyas condiciones de trabajo son las siguientes:

Medio: 900 ml de agua destilada a 37 °C

Aparato: 1 (canastillo)

rpm: 100

El ensayo se realizó bajo condiciones “non sink”, retirándose alícuotas de 5 ml a los 5, 10, 20, 30, 40, 45, 50 y 60 minutos, reponiéndose el mismo volumen con agua destilada a 37 °C; las muestras se filtraron y se valoraron mediante el método de absorción a 265 nm. Los resultados se expresaron en mg/900 ml de agua destilada y en porcentaje del valor declarado, utilizando la curva de calibración calculada. Se analizaron seis comprimidos de cada especialidad ensayada.

Parámetros de disolución

A partir de las concentraciones de ampicilina disueltas a cada tiempo, se calcularon las constantes cinéticas y los parámetros de disolución siguientes: orden cinético, constante de disolución (kd), tiempo en el cual se disuelve el 50 % del valor declarado en la formulación ($t_{50\%}$), cantidad disuelta a los 45 minutos (Q_{45}), cantidad disuelta al cabo de la experiencia (Fd%), Eficiencia de la Disolución (ED%), Tiempo medio de disolución (MDT).

Análisis estadístico

Se calcularon los valores medios de los parámetros arriba mencionados con sus respectivas desviaciones standards. Con los valores de ED% se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se aplicó el método de comparación múltiple de la Mínima Diferencia Significativa (LSD), basado en la prueba t de Student

CALCULOS Y RESULTADOS

CALCULOS Y RESULTADOS

3.1. Curva de calibración del método de absorción al UV a 265 nm, para determinar el contenido de ampicilina y para realizar el seguimiento de la disolución de los comprimidos, en medio acuoso, método de regresión lineal.

La linealidad de la curva de calibración fue encontrada en el rango de concentraciones entre 0,16 - 0,8 mg/ml .

Los valores de Absorbancia a 265 nm para cada una de las soluciones de ampicilina standard preparadas, teniendo en cuenta que se pesaron 20,6 mg de standard que se llevaron a 25 ml con agua destilada y que se realizaron las correspondientes correcciones por título (99.4%) y por contenido de humedad (0.48%), fueron:

Primera Réplica		Segunda Réplica	
Concentración (mg/ml)	A ₂₆₅	Concentración (mg/ml)	A ₂₆₅
0,1648	0,178	0,1648	0,174
0,412	0,413	0,412	0,427
0,6592	0,647	0,6592	0,638
0,824	0,783	0,824	0,786

El intercepto con el eje de las ordenadas (a) y la pendiente (b) con sus respectivos intervalos de confianza del 95%, fueron:

$$a = 0.030707 \pm 0.0096$$

$$b = 0,922413 \pm 0.0192$$

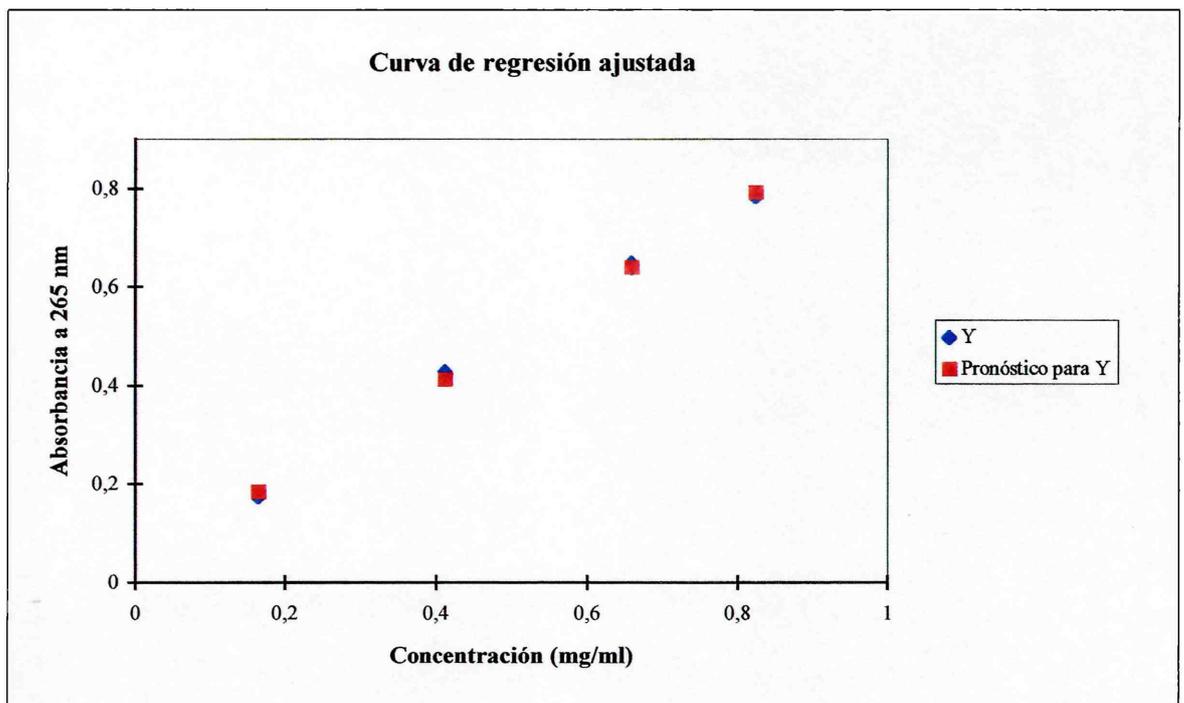
con un coeficiente de correlación $r = 0.9995$ (**Figura 32**)

Con el fin de confirmar el análisis de regresión se realizó un Análisis de Residuales (Ri), método gráfico por el cual la relación Ri vs. Concentración nos debe dar un modelo aleatorio de distribución y además la sumatoria de los Ri debe ser próxima a cero. Se encontró un valor de la sumatoria de: $\sum Ri = -9,992 \times 10^{-16}$ (**Figura 33**)

Con la misma finalidad se realizó el análisis del Factor Respuesta, es decir la relación entre la señal, en nuestro caso Absorbancia a 265 nm, con la concentración, que en función de la misma, debe mantenerse constante a lo largo del rango de concentraciones de la curva de calibración. (**Figura 34**)

FIGURA 32

Curva de calibración de ampicilina por Absorción al UV a 265 nm



Rango = 0,16 - 0,8 mg/ml

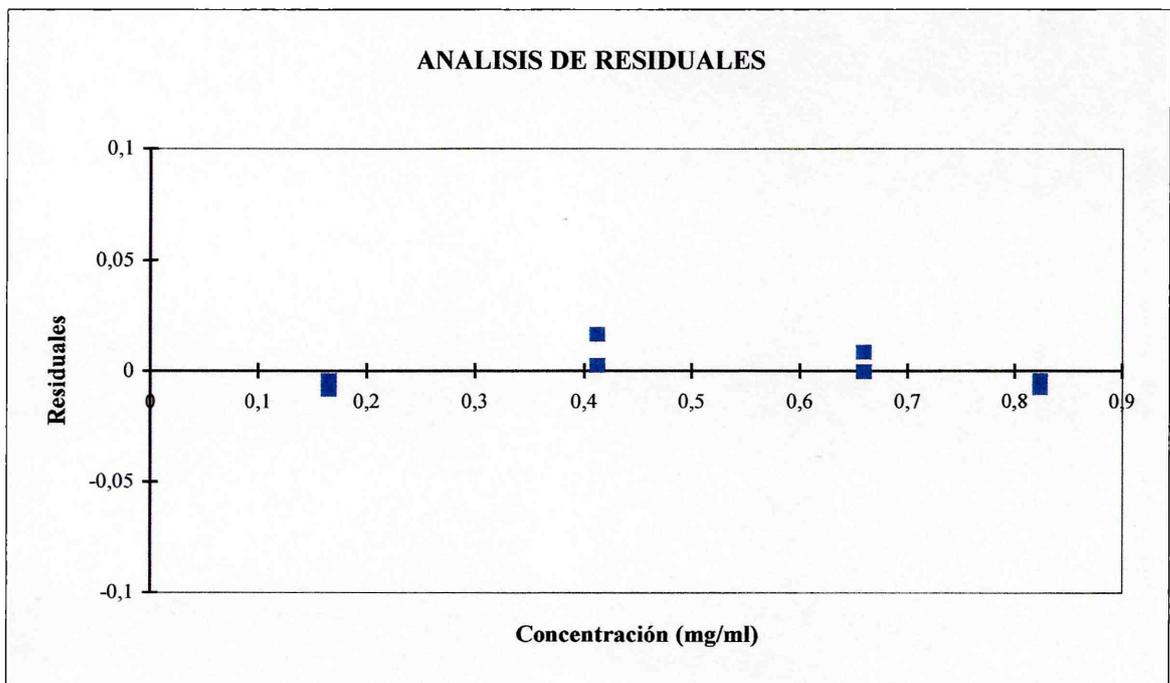
Ordenada al origen (a) y Pendiente (b) con sus respectivos

intervalos de confianza del 95%:

 $a = 0,030707 \pm 0,018$ $b = 0,922413 \pm 0,032$ Coeficiente de Correlación (r) = 0,9996

FIGURA 33

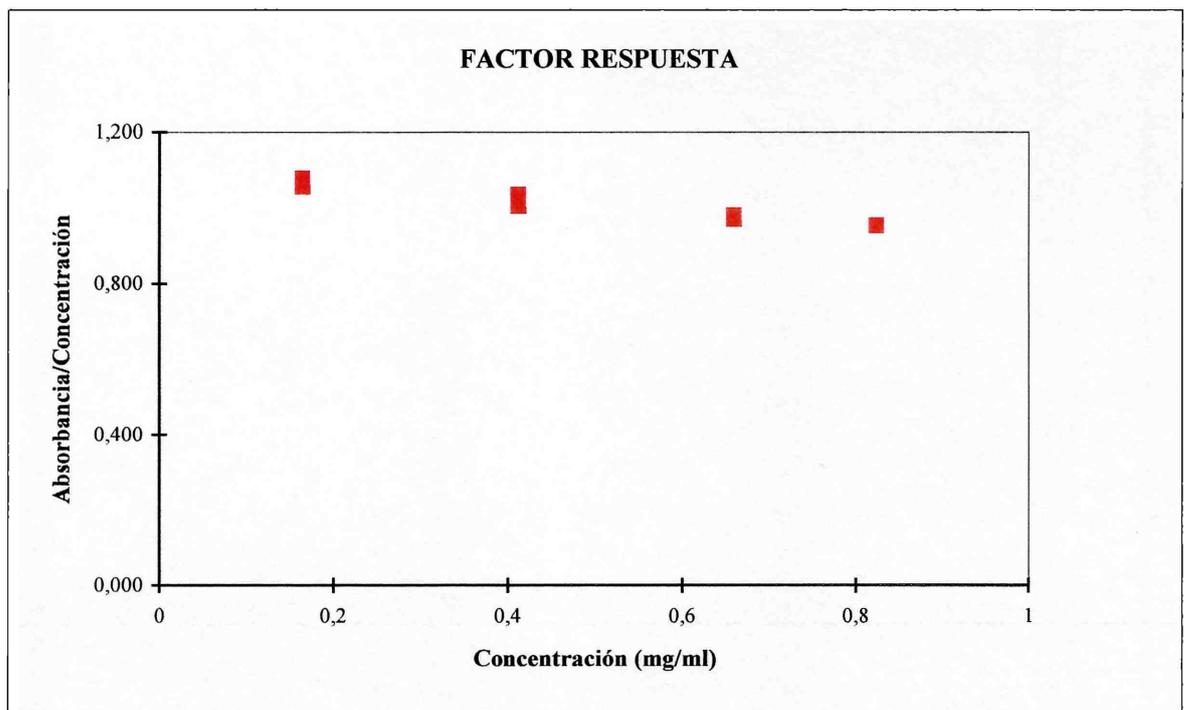
Método gráfico de Residuales para establecer linealidad en la curva de calibración de ampicilina por Absorción al UV a 265 nm



Sumatoria de Residuales = 8,8818E-16

FIGURA 34

Análisis del Factor Respuesta para establecer linealidad en la Curva de calibración de ampicilina por Absorción al UV a 265 nm



Ambos análisis, así como el coeficiente de correlación obtenido, han confirmado que el modelo usado para nuestro método analítico es lineal. (Myers, 1986)

3.2. Cálculo del contenido de ampicilina en cada una de las partidas, de todas las formulaciones ensayadas. El control se realizó por el método de absorción a 265 nm, por quintuplicado, utilizando la curva de calibración obtenida, mediante la siguiente ecuación:

$$C\% = \frac{(A_{265} - a)}{b} \cdot 50 \cdot \frac{100}{P}$$

donde:

- $C\%$ = Porcentaje del valor declarado de ampicilina en los comprimidos
 A_{265} = Absorbancia a 265 nm de la solución preparada con el pulverizado de los comprimidos
 a = ordenada al origen de la curva de calibración
 b = pendiente de la curva de calibración
 50 = corrección por dilución
 P = cantidad declarada de ampicilina en la alícuota del pulverizado

Para el control realizado aplicando el método de HPLC se utilizaron soluciones de referencia, preparadas cada día de trabajo, en concentraciones de 1 mg/ml y para los cálculos se utilizó la siguiente expresión:

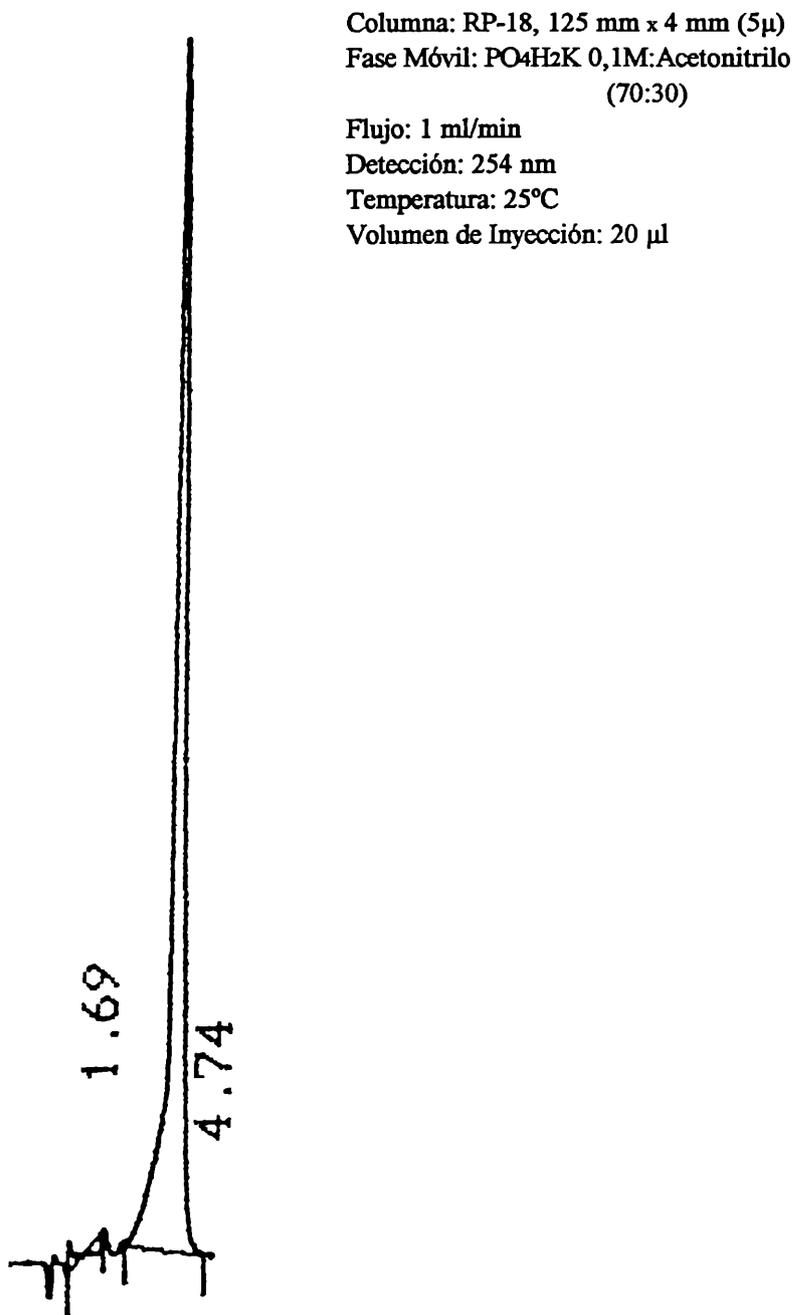
$$C\% = \frac{(Area_{mt} \cdot C_{st})}{Area_{st}} \cdot \frac{100}{C_{mt}}$$

donde:

- $Area_{mt}$ = Área de la muestra de ampicilina
 C_{st} = Concentración de la solución standard de ampicilina
 $Area_{st}$ = Área del standard de ampicilina
 C_{mt} = Concentración declarada de ampicilina en la alícuota del pulverizado

En la **Figura 35** se puede observar un cromatograma tipo de la determinación de ampicilina por HPLC.

FIGURA 35
Cromatograma tipo de Ampicilina



Tiempo de retención de Ampicilina = 4.74

Los resultados de la valoración de los comprimidos de ampicilina ensayados, expresados como porcentaje del valor declarado \pm desviación típica de la media, para $n = 5$, en el caso del método de absorción al UV y para $n = 3$, en el caso del método por HPLC, figuran en la **Tabla 22** :

Comprimidos	UV a 265 nm	HPLC
AUPM ₀₁	114,30 \pm 0,92	113,89 \pm 1,23
AUPM ₀₂	119,72 \pm 1,07	119,02 \pm 0,88
AUPM ₀₃	96,98 \pm 0,99	93,58 \pm 0,28
Lab. A	109,84 \pm 1,35	99,50 \pm 1,56
Lab. B	104,45 \pm 0,85	102,09 \pm 1,90
Lab. C	96,82 \pm 0,31	96,66 \pm 0,97
Lab. D	101,68 \pm 0,82	104,43 \pm 0,89

TABLA 22. Contenido de ampicilina de los comprimidos ensayados. Los valores tabulados corresponden al valor medio \pm Sm, expresados como % de la cantidad declarada de ampicilina.
Sm: desviación típica de la media

3.3. Cálculo de la concentración de ampicilina disuelta a cada tiempo en el ensayo de disolución, expresada como mg/900ml :

$$C_{ti} = \frac{(A_{265} - a)}{b} \cdot 900 + \text{Auxiliar}$$

donde:

- C_{ti} = Concentración de Ampicilina a tiempo t_i
 A_{265} = Absorbancia a 265 nm de cada alícuota muestreada a los distintos tiempos
 a = ordenada al origen de la curva de calibración
 b = pendiente de la curva de calibración
 900 = volumen total del medio de disolución
 Auxiliar = corrección por cada alícuota de 5 ml muestreada, siendo:
 Auxiliar = (mg/5 ml) _{t_i} + (mg/5 ml) _{$t_{(i-1)}$}

Un modelo de la hoja de cálculo para obtener la concentración de ampicilina disuelta a cada tiempo, en el ensayo de disolución *in vitro*, aparece en la **Tabla 23**, siendo el correspondiente a la partida de comprimidos del Laboratorio A. De igual manera se procedió para el resto de los comprimidos.

3.4. Cálculo del porcentaje del valor declarado de ampicilina disuelto a cada tiempo en el ensayo de disolución:

$$C_i \% = \frac{(A_{265} - a)}{b} \cdot 900 + Auxiliar \cdot \frac{100}{C_\infty}$$

donde:

C_∞ = Concentración declarada de ampicilina

Con los porcentajes de ampicilina disuelto a cada tiempo se trazaron los perfiles de disolución, para cada partida de los comprimidos ensayados, los cuales aparecen en las **Figuras 36 y 37**.

3.5. Determinación del orden cinético con que se disuelve la ampicilina, calculado mediante la obtención de los coeficientes de correlación de las relaciones Cantidad de ampicilina disuelta en función del tiempo, es decir: C_t vs. t (orden cero), y del logaritmo de la cantidad no disuelta de ampicilina en función del tiempo, es decir: $\lg(1 - (C_t/C_\infty))$ vs. t ; donde C_t es la concentración de ampicilina a tiempo t , expresada en mg/900 ml y C_∞ es la concentración declarada de ampicilina, expresada en mg/900 ml, (primer orden).

3.6. Determinación de la constante de disolución (kd) de la ampicilina y del tiempo en el que se disuelve el 50% de la droga ($t_{50\%}$) a partir de conocer la cinética con que se disuelve, según las siguientes ecuaciones:

Para orden cero: $kd = \frac{C_t}{t}$

$$t_{50\%} = \frac{C_\infty}{2kd}$$

Para primer orden: $kd = -\lg\left[1 - \left(\frac{C_t}{C_\infty}\right)\right] \cdot \frac{2.303}{t}$

$$t_{50\%} = \frac{0.693}{kd}$$

Todos los comprimidos ensayados conteniendo ampicilina, siguen una cinética de disolución de primer orden. En las **Figuras 38 y 39**, se grafica el logaritmo de la cantidad no disuelta de ampicilina en función del tiempo para todas las partidas estudiadas. Con las pendientes de las rectas obtenidas se han estimado las respectivas constantes de disolución de primer orden (kd).

Los valores de kd y de $t_{50\%}$, calculados para todos los comprimidos ensayados, se encuentran tabulados en la **Tabla 24**.

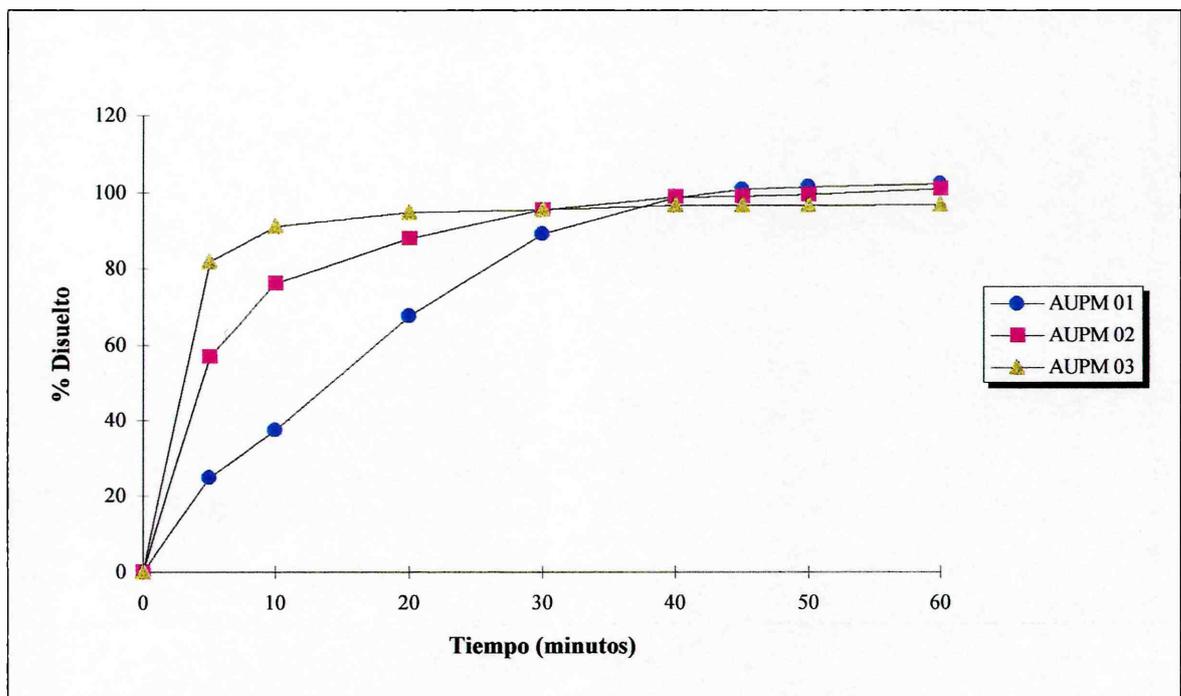
TABLA 23

Tiempo	A 265	mg/ml	mg/5 ml	Auxiliar	mg/900 ml	%
Comprim.1						
5	0,148	0,127	0,636	0,636	114,431	19,73
10	0,199	0,182	0,912	1,548	164,822	28,42
20	0,401	0,401	2,007	3,555	362,806	62,55
30	0,473	0,479	2,397	5,952	435,056	75,01
40	0,503	0,512	2,560	8,512	466,721	80,47
45	0,5	0,509	2,544	11,055	466,354	80,41
50	0,508	0,517	2,587	13,642	476,703	82,19
60	0,515	0,525	2,625	16,267	486,119	83,81
Comprim.2						
5	0,118	0,095	0,473	0,473	85,163	14,68
10	0,196	0,179	0,896	1,369	161,733	27,88
20	0,4	0,400	2,002	3,371	361,651	62,35
30	0,498	0,507	2,533	5,903	459,262	79,18
40	0,537	0,549	2,744	8,647	499,843	86,18
45	0,539	0,551	2,755	11,402	504,538	86,99
50	0,522	0,533	2,663	14,065	490,708	84,60
60	0,54	0,552	2,760	16,826	510,931	88,09
Comprim.3						
5	0,113	0,089	0,446	0,446	80,285	13,84
10	0,184	0,166	0,831	1,277	149,999	25,86
20	0,348	0,344	1,720	2,997	310,828	53,59
30	0,435	0,438	2,191	5,188	397,425	68,52
40	0,468	0,474	2,370	7,558	431,811	74,45
45	0,491	0,499	2,495	10,053	456,620	78,73
50	0,474	0,481	2,403	12,455	442,529	76,30
60	0,494	0,502	2,511	14,966	464,444	80,08
Comprim.4						
5	0,156	0,136	0,679	0,679	122,236	21,08
10	0,234	0,220	1,102	1,781	199,012	34,31
20	0,417	0,419	2,094	3,875	378,648	65,28
30	0,457	0,462	2,311	6,185	419,766	72,37
40	0,466	0,472	2,359	8,544	430,857	74,29
45	0,466	0,472	2,359	10,904	433,216	74,69
50	0,476	0,483	2,413	13,317	445,332	76,78
60	0,471	0,477	2,386	15,704	442,867	76,36
Comprim.5						
5	0,233	0,219	1,096	1,096	197,357	34,03
10	0,39	0,389	1,947	3,044	351,623	60,62
20	0,484	0,491	2,457	5,501	445,276	76,77
30	0,536	0,548	2,739	8,239	498,464	85,94
40	0,502	0,511	2,554	10,794	468,033	80,70
45	0,516	0,526	2,630	13,424	484,246	83,49
50	0,513	0,523	2,614	16,038	483,949	83,44
60	0,487	0,495	2,473	18,511	461,198	79,52
Comprim.6						
5	0,079	0,052	0,262	0,262	47,115	8,12
10	0,14	0,118	0,592	0,854	106,888	18,43
20	0,339	0,334	1,671	2,525	301,625	52,00
30	0,429	0,432	2,159	4,684	391,100	67,43
40	0,467	0,473	2,365	7,049	430,331	74,20
45	0,472	0,478	2,392	9,440	437,574	75,44
50	0,469	0,475	2,376	11,816	437,039	75,35
60	0,48	0,487	2,435	14,251	450,146	77,61

TABLA 23. Concentraciones de ampicilina disueltas a cada tiempo, para seis comprimidos del Laboratorio A conteniendo 580 mg de ampicilina.

FIGURA 36

Perfiles de disolución de los comprimidos de Ampicilina AUPM

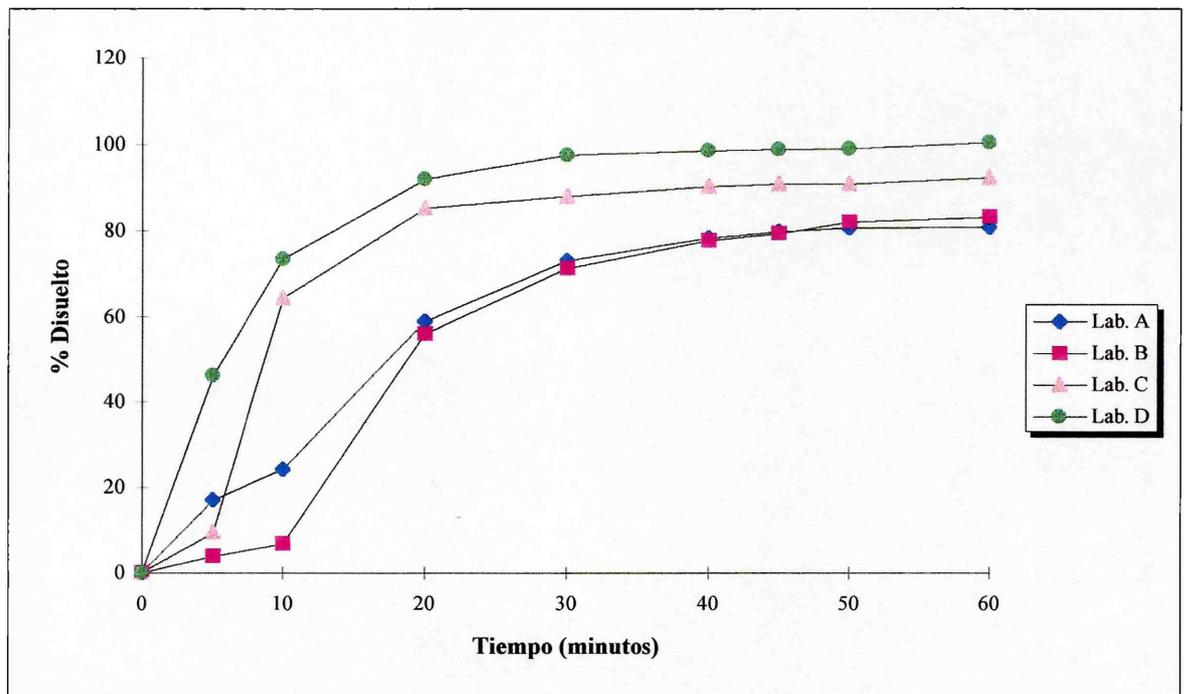


Perfiles de disolución correspondientes a los porcentajes medios, para $n = 6$

de los comprimidos elaborados en la UPM

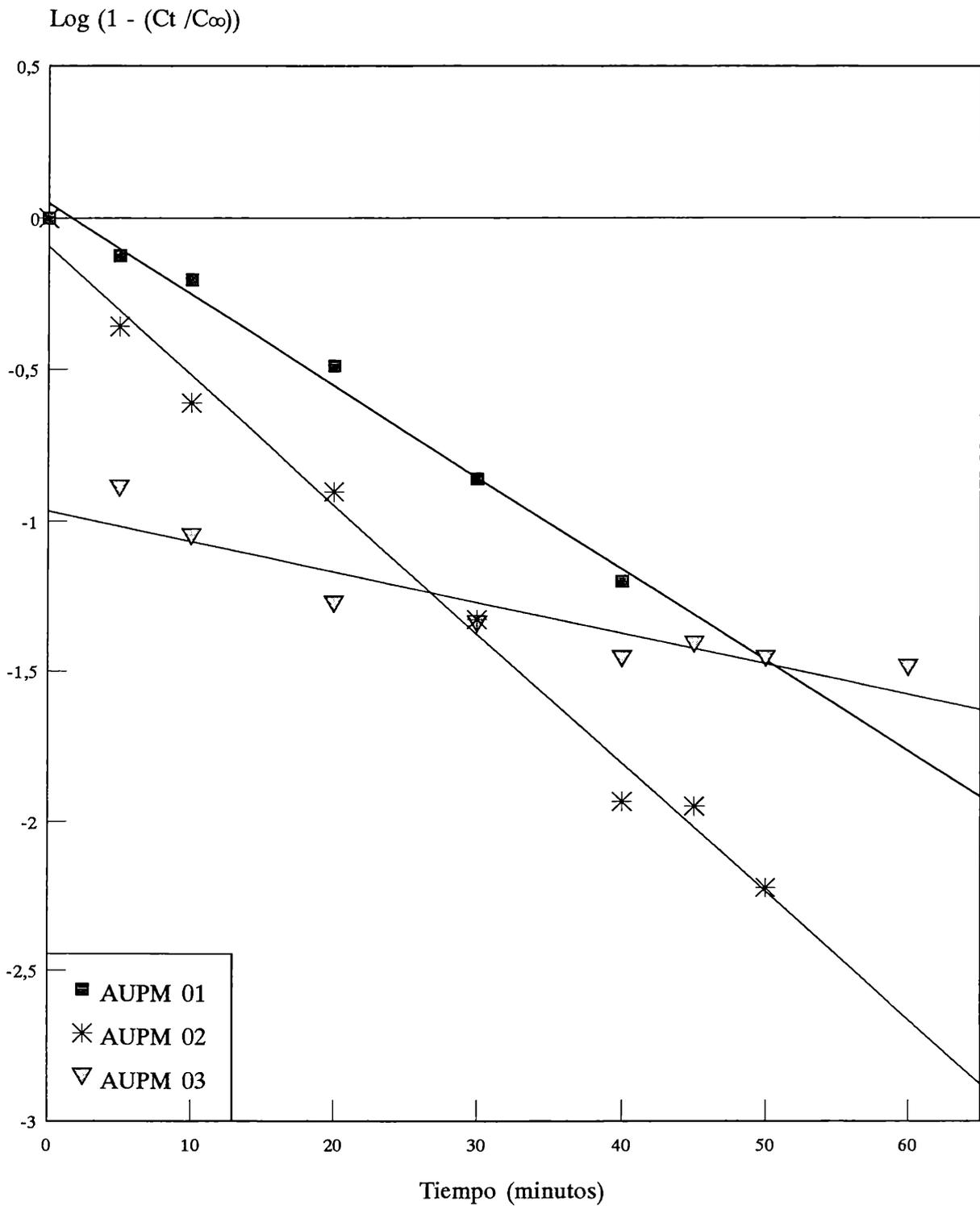
FIGURA 37

Perfiles de disolución de los comprimidos de Ampicilina
de los Laboratorios A, B, C y D



Perfiles de disolución correspondientes a los porcentajes medios, para $n = 6$,
de los comprimidos de los Laboratorios A, B, C y D

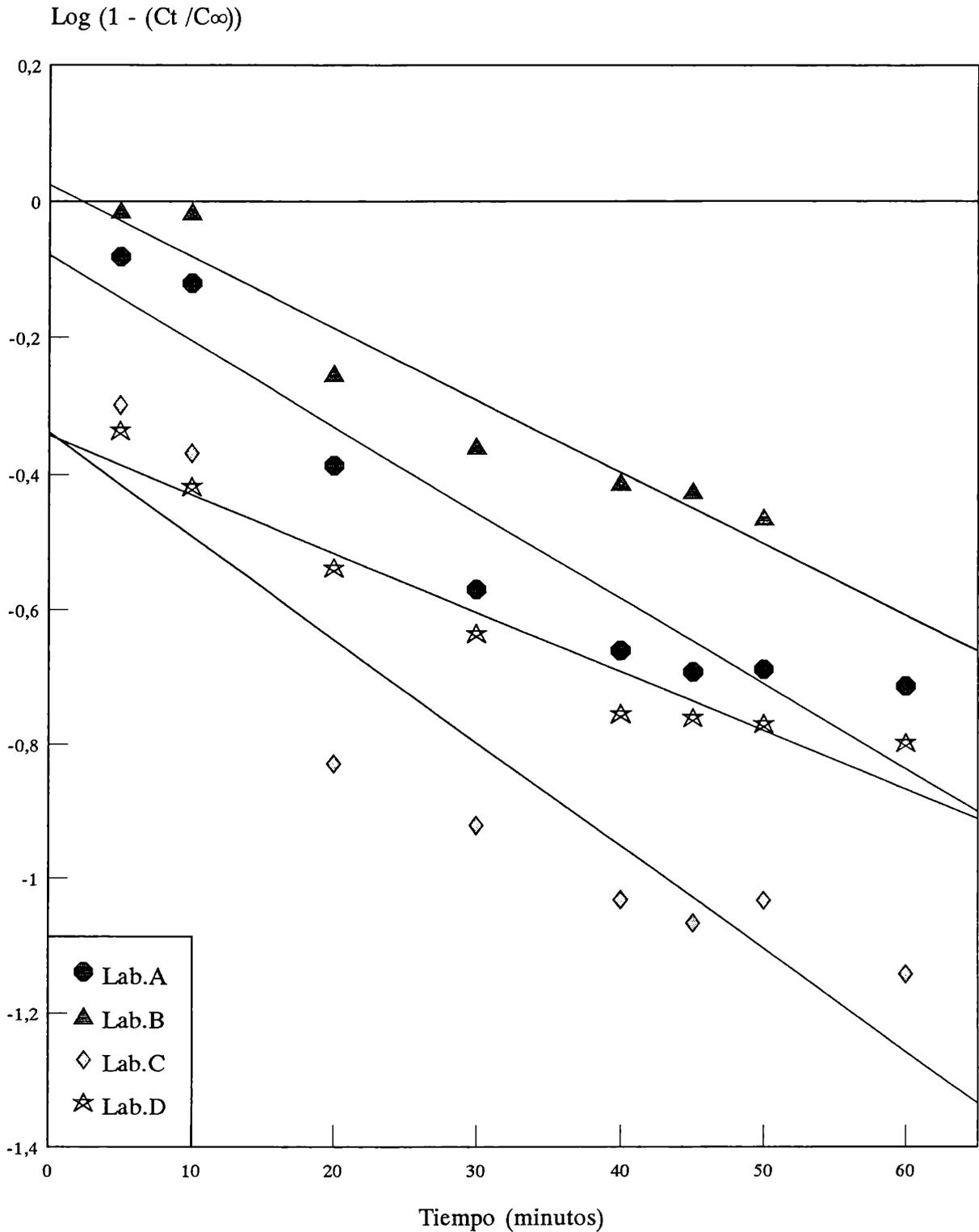
FIGURA 38
 Logaritmo cantidad no disuelta de ampicilina en función del tiempo
 Comprimidos UPM



AUPM 01: a= 0,0855 b=-0,03148 r=0,9958
 AUPM 02: a=-0,1457 b=-0,04141 r=0,9950
 AUPM 03: a=-0,9662 b=-0,01016 r=0,9237

FIGURA 39

Logaritmo cantidad no disuelta de ampicilina en función del tiempo
Comprimidos Laboratorios A, B, C y D



Lab.A: $a=-0,0789$ $b=-0,01264$ $r=0,9464$; Lab.B: $a=-0,0059$ $b=-0,00902$ $r=0,9406$

Lab.C: $a=-0,3388$ $b=-0,01533$ $r=0,9270$; Lab.D: $a=-0,3424$ $b=-0,00874$ $r=0,9689$

3.7. Determinación de la cantidad disuelta de ampicilina a los 45 minutos, que de acuerdo con la normativa de USP 23 no debe ser inferior al 75% de la cantidad total (Q_{45}), calculada mediante la ecuación:

$$Q_{45} = \frac{(A_{45} - a)}{b} \cdot 900 + Auxiliar \cdot \frac{100}{C_{\infty}}$$

donde:

A_{45} = Absorbancia a 265 nm de la alícuota correspondiente a los 45 minutos.

Los valores de Q_{45} obtenidos figuran en la **Tabla 24**.

3.8. Determinación del porcentaje total de ampicilina disuelto al término de la experiencia, es decir, 60 minutos. (**Fd%**), calculado mediante la ecuación:

$$Fd\% = \frac{(A_{60} - a)}{b} \cdot 900 + Auxiliar \cdot \frac{100}{C_{\infty}}$$

donde:

A_{60} = Absorbancia a 265 nm de la alícuota correspondiente a los 60 minutos.

Los porcentajes totales disueltos al cabo de los 60 minutos de cada ensayo de disolución (**Fd%**) figuran en la **Tabla 24**.

3.9. Determinación de la Eficiencia de Disolución (**ED%**), calculada mediante la siguiente expresión:

$$ED\% = \frac{ABC}{t \cdot Q_{100}} \cdot 100$$

donde:

ABC = Área bajo la curva de disolución

Q_{100} = Cantidad correspondiente al 100% de ampicilina disuelto

t = Tiempo máximo elegido para el cálculo del ABC, en nuestro caso 60 minutos.

3.9.1. Cálculo del ABC mediante el método de los trapecios el cual consiste en dividir la curva en tantos trapecios como datos de cantidad disuelta de droga se dispongan, determinar el área de cada trapecio y luego sumarlos.

$$AreaTrapecio = \sum \frac{C_i + C_{(i+1)}}{2} \cdot (t_{(i+1)} - t_i)$$

donde:

$$C_i = \text{Concentración disuelta a cualquier tiempo } t_i$$

$$C_{(i+1)} = \text{Concentración disuelta al tiempo siguiente } t_{(i+1)}$$

La ED% para cada partida de comprimidos figuran en la **Tabla 24**.

3.10. Cálculo del Tiempo Medio de Disolución (MDT) mediante la siguiente ecuación:

$$MDT = \frac{\int_0^{60} t \cdot \frac{dC}{dt}}{\int_0^{60} \frac{dC}{dt}}$$

Los valores de MDT para cada partida de comprimidos figuran en la **Tabla 24**.

3.11. Aplicación de un ANOVA con los valores medios de ED% entre los comprimidos elaborados en la UPM y los de los distintos Laboratorios del mercado, con el objeto de analizar si existen diferencias significativas entre las distintas formulaciones (*Sokal y Rohlf, 1984*).

Aplicación del método de comparación múltiple de la Mínima Diferencia Significativa (LSD), basado en la prueba t de Student, a fin de establecer cuales son los valores medios de ED% que difieren entre sí. (*Cid Cárcamo, 1982*)

En la **Tabla 25** se detalla el ANOVA realizado con los valores de ED% de todos los comprimidos analizados y en la **Tabla 26**, el resultado del Test de la Mínima Diferencia Significativa (LSD).

En el capítulo de discusión se analizan los resultados encontrados.

TABLA 24

Comprimidos	kd	t 50%	Q45 ± Sm	Fd% ± Sm	ED% ± Sm	MDT ± Sm
AUPM 01	0,0725	9,56	100,82 ± 1,18	102,31 ± 1,50	75,90 ± 1,49	36,60 ± 0,26
AUPM 02	0,0954	7,26	98,84 ± 0,82	100,89 ± 1,12	86,30 ± 3,02	33,54 ± 0,84
AUPM 03	0,0234	29,62	96,10 ± 0,78	96,73 ± 0,85	90,09 ± 1,39	31,87 ± 0,15
Lab. A	0,0291	23,81	79,96 ± 1,93	80,91 ± 1,77	59,45 ± 1,54	36,43 ± 0,37
Lab. B	0,0207	33,36	79,27 ± 2,13	83,22 ± 2,12	55,42 ± 1,64	39,15 ± 0,08
Lab. C	0,0353	19,63	90,79 ± 1,35	92,22 ± 1,80	74,31 ± 1,76	35,00 ± 0,33
Lab. D	0,0201	34,42	98,72 ± 0,69	100,47 ± 0,61	85,87 ± 0,80	33,64 ± 0,20

TABLA 24. Parámetros de disolución calculados para los comprimidos de ampicilina analizados.

La kd está expresada en 1/minutos

El t 50% está expresado en minutos

El MDT está expresado en minutos

Sm : Desviación típica de la media para n = 6

TABLA 25

Origen de la Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	F
Entre laboratorios	6132,34	6	1022,06	45,75
Error	714,83	32	22,34	
Total	6847,17	38	1044,4	

TABLA 25. Resultado del análisis de varianza realizado con los valores medios de ED% de todos los comprimidos de ampicilina ensayados.
 $F_{0,05}(6,32) = 2,40$

TABLA 26

		Lab.B	Lab.A	Lab.C	AUPM 01	Lab.D	AUPM 02	AUPM 03
	ED%	55,42	59,45	74,31	75,9	85,87	86,3	90,09
AUPM 03	90,09	34,67	30,64	15,78	14,19	4,22	3,79	0
AUPM 02	86,3	30,88	26,85	11,99	10,4	0,43	0	
Lab.D	85,87	30,45	26,42	11,56	9,97	0		
AUPM 01	75,9	20,48	16,45	1,59	0			
Lab.C	74,31	18,89	14,86	0				
Lab.A	59,45	4,03	0					
Lab.B	55,42	0						

TABLA 7. Aplicación del método de comparación múltiple basado en la Mínima Diferencia Significativa (LSD), utilizando los valores medios de ED% de los comprimidos de ampicilina.

(LSD) 0.05, 45 = 5.53

DISCUSION

DISCUSION

3. INFLUENCIA DE LA TECNOLOGIA DE ELABORACION SOBRE LA DISOLUCION DE COMPRIMIDOS DE AMPICILINA. ENSAYOS *IN VITRO*.

La determinación de la velocidad de disolución de un principio activo, desde una forma farmacéutica, es elemental para el diseño y desarrollo de una óptima formulación. Para ello la aplicación del Test de Disolución, codificado en diversas farmacopeas, constituye la herramienta válida a utilizar. (*El-Yazigi, 1981; Kuu et al., 1989*)

La influencia del procedimiento de elaboración de comprimidos sobre la velocidad de disolución de las drogas aparece en la literatura farmacéutica como uno de los factores a optimizar para lograr formas farmacéuticas de buena calidad. (*Bremer et al., 1969; Finholt, 1974; Yang et al., 1979*)

En esta etapa del presente trabajo se analizó la influencia del método de compresión sobre la velocidad de disolución de comprimidos de ampicilina. La ampicilina es un potente antibiótico ampliamente utilizado en una serie de infecciones, con mínimos efectos colaterales y tóxicos. (*Hassanzadeh, 1991*) Con este propósito se elaboraron partidas de dicho antibiótico por vía húmeda y por vía seca, utilizándose excipientes convencionales y modificados, (*Shangraw et al., 1981; Enezian, 1972; Lerk et al., 1979*) como la celulosa microcristalina ó Avicel y el dióxido de silicio coloidal ó Aerosil, los cuales confieren mayor fluidez y compresibilidad al proceso. (*Augsburger y Shangraw, 1966; Reier y Shangraw, 1966; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 1983*)

El primer paso fue seleccionar un método analítico adecuado para realizar la valoración de los comprimidos analizados y para realizar el seguimiento de disolución. La intención fue optimizar un método alternativo al de USP 23, que recomienda para disolución, un método automatizado, colorimétrico, con hidroxilamina y sales férricas, mientras que USP 22, indicaba un análisis espectrofotométrico, sin aclarar condiciones de trabajo. Con este propósito se pusieron a punto dos métodos analíticos: absorción al UV a 265 nm, en medio acuoso y HPLC. La correlación encontrada con los resultados de la valoración de los comprimidos por ambos métodos, **Tabla 22**, nos permitió seleccionar al primer método, por ser más sencillo y accesible, para realizar el seguimiento de la disolución de ampicilina, habiéndose validado adecuadamente, **Figuras 32, 33 y 34**.

Como puede observarse en la **Figura 36** los comprimidos de la partida AUPM₀₂, es decir, los elaborados por doble compresión, se disolvieron más rápidamente que los AUPM₀₁, elaborados por vía húmeda, porque como es sabido, la compresión directa optimiza la desintegración, y cada partícula primaria del principio activo, es liberada

desde la tableta, estando más disponible a la disolución que en el caso de una granulación húmeda. (*Shangraw, 1990*)

Además, los comprimidos de ampicilina elaborados por vía húmeda corren el riesgo de degradarse en el proceso de humectación y sobre todo de secado posterior, lo cual requeriría un control de temperatura más estricto, no muy conveniente desde el punto de vista de producción. En nuestro caso, dado el pequeño tamaño del lote elaborado, fue cuidadosamente controlada la temperatura de secado, para evitar posibles efectos deletéreos.

Este comportamiento de disolución de las partidas AUPM₀₁ y AUPM₀₂, también se aprecia en los valores de ED%, **Tabla 24**, que eleva el porcentaje de aproximadamente 76% de la AUPM₀₁ a 86% en la AUPM₀₂, mientras el valor de MDT permanece más alto en el primer caso que en los comprimidos elaborados por la vía seca, lo cual nos estaría indicando que la primer formulación requiere un tiempo medio mayor para disolverse que la segunda.

Si bien estos resultados fueron satisfactorios los comprimidos obtenidos por doble compresión, en los cuales se usaron excipientes convencionales, presentaron propiedades de friabilidad desventajosas, posiblemente debido al hecho de haberse utilizado excipientes no modificados, que son poco compresibles y pueden provocar una mala cohesión del comprimido, que se hace fácilmente friable, este es el caso del almidón, que en su forma nativa no es recomendable para compresión directa. (*Manudhane et al., 1969*)

En la elaboración de la tercer partida, AUPM₀₃, se utilizaron excipientes modificados como el Aerosil y el Avicel, de mejor comportamiento frente a la compresión por una vía seca, obteniéndose comprimidos con buenas características de friabilidad. En cuanto a los parámetros de disolución de esta partida, también fueron satisfactorios, obteniéndose una ED% del orden del 90%, superior incluso a las ED% de los comprimidos comerciales ensayados, así como también presenta el menor valor de MDT de todo el resto de las partidas analizadas.

En los perfiles de disolución de los comprimidos de los Laboratorios comerciales, **Figura 37**, se observa un marcado tiempo de latencia en los correspondientes a los Laboratorios B y C, debido a la presencia de un recubrimiento laqueado en los mismos.

Se realizó un análisis de varianza con los valores medios de ED% de todos los comprimidos ensayados, observándose diferencia significativas ($p < 0.05$) entre los mismos. (**Tabla 25**)

Se completó este análisis aplicando el método de comparación múltiple de la mínima diferencia significativa (LSD) cuyos resultados aparecen en la **Tabla 26**.

Del análisis de los mismos se demuestra que: entre los comprimidos de la partida AUPM₀₃, el Laboratorio D y la AUPM₀₂ no existen diferencias significativas, lo que nos indicaría equivalencia farmacéutica entre los mismos. Sí, existen diferencias significativas

entre los comprimidos del lote AUPM₀₃ y AUPM₀₁, Laboratorios A, B y C. Los comprimidos de más baja ED% , es decir los de los Laboratorios A y B, no presentan diferencias significativas entre sí.

Como conclusión de esta etapa del trabajo, podemos afirmar que los comprimidos de ampicilina elaborados por un método de doble compresión por vía seca, ofrecen mejores características de disolución *in vitro*, que los elaborados por vía húmeda, siendo los excipientes recomendados para este tipo de elaboración, los denominados modificados, como el Avicel y el Aerosil. También con esta conclusión estamos reafirmando la posibilidad de considerar a los ensayos de disolución *in vitro* válidos para optimizar una formulación, regulando las características cinéticas del proceso de disolución, para poder así controlar el proceso de absorción *in vivo*.

**4. INFLUENCIA DEL DESINTEGRANTE SOBRE LA
DISOLUCION DE COMPRIMIDOS DE
CLORTALIDONA. ENSAYOS *IN VITRO*.**

MATERIALES Y METODOS

4. INFLUENCIA DEL DESINTEGRANTE SOBRE LA DISOLUCION DE COMPRIMIDOS DE CLORTALIDONA. ENSAYOS IN VITRO.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

* Clortalidona, droga en polvo uso comercial, grado USP 23

* Almidón, lactosa, PVP y estearato de magnesio, grado USP 23

* Comprimidos comerciales disponibles en el mercado farmacéutico argentino, conteniendo 50 mg y 100 mg de Clortalidona, de dos laboratorios productores distintos, identificados como Laboratorios (Lab.) A y B , respectivamente, correspondientes cada uno de ellos a una misma partida.

* Comprimidos no recubiertos, conteniendo 50 mg de Clortalidona, elaborados por el personal de la Unidad de Producción de Medicamentos (UPM), mediante granulación húmeda y compresión.

Una partida (CUPM₀₁) fue preparada conteniendo 6% del aglutinante, PVP, y adicionando el desintegrante, almidón, juntamente con el resto de los ingredientes, es decir, en forma intragranular. Mientras que la otra partida (CUPM₀₂) fue elaborada con un porcentaje menor de PVP, 4%, y adicionando parte del almidón en combinación con el lubricante, estearato de magnesio, para lograr una desintegración extragranular. Las modificaciones realizadas a las partidas fueron sugeridas a consecuencia de los resultados de disolución encontrados. La composición de las dos partidas figura en la **Tabla 27**:

	COMPRIMIDOS DE CLORTALIDONA	
	CUPM₀₁	CUPM₀₂
Clortalidona	50	50
Almidón	112,5	105
Lactosa	112,5	75
PVP	18	10
Estearato de magnesio	7	2,5
Almidón seco	-	2,5

TABLA 27. Composición de los comprimidos de Clortalidona, expresada en mg de componente por comprimido.

Equipos

- * Equipo de disolución de comprimidos Alycar Mod. AD150
- * Espectrofotómetro Beckman M26
- * Micropipeta automática Socorex de 100-1000 μL y Pipeta automática Eppendorf de 500-5000 μL .
- * Balanza Metler Toledo AG 204

Contenido de clortalidona

Se determinó el contenido de clortalidona de todos los comprimidos ensayados mediante la utilización de un método de absorción al UV en medio de agua destilada, a 275,6 nm. Para ello se pesaron individualmente 20 comprimidos y se determinó el peso promedio. Se pulverizaron y se pesaron alícuotas correspondientes a 7 mg de principio activo (aproximadamente 20 mg de pulverizado) que se llevaron a 10 ml con metanol, se agitaron mecánicamente durante 30 minutos, se filtraron y se realizaron diluciones de 2:25 con agua destilada, de tal manera de obtener una concentración de 56 $\mu\text{g/ml}$, se leyeron al UV a 275,6 nm. Los resultados, expresados en porcentaje del valor declarado, se obtuvieron a partir de una curva de calibración calculada por el método de regresión lineal de mínimos cuadrados. Se realizaron cinco réplicas de la valoración.

Validación del método

Para la validación del método de Absorción al UV, a 275,6 nm, se obtuvo una curva de calibración en medio de agua destilada, en un rango de concentraciones entre 40 - 120 $\mu\text{g/ml}$. Para ello se prepararon, por duplicado, dos soluciones madres de clortalidona standard (título 101,1 %, con 0.32 % de humedad) de 0,8 mg/ml, pesando 20 mg de droga standard que se disuelven en 25 ml de metanol. A partir de estas soluciones madres se prepararon seis diluciones en agua destilada, para obtener las siguientes concentraciones:

Dilución	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
0,5:10	40
0,7:10	56
1:10	80
1,25:10	100
1,4:10	112
1,5:10	120

Se leyeron al UV a 275,6 nm todas las diluciones obtenidas y los datos de Absorbancia en función de la concentración se analizaron por regresión lineal, utilizando el programa Microsoft Excel 5.0, evaluándose linealidad.

Estudio de disolución *in vitro*

Se efectuó de acuerdo a la normativa de USP 23, cuyas condiciones de trabajo son las siguientes:

Medio: 900 ml de agua destilada a 37 °C

Aparato: 2 (paleta)

rpm: 100

El ensayo se realizó bajo condiciones “non sink”, retirándose alícuotas de 5 ml a los 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 minutos, reponiéndose el mismo volumen con agua destilada a 37 °C; las muestras se filtraron y se valoraron mediante el método de absorción a 275,6 nm. Los resultados se expresaron en mg/900 ml de agua destilada y en porcentaje del valor declarado, utilizando la curva de calibración calculada. Se analizaron seis comprimidos de cada especialidad ensayada.

Parámetros de disolución

A partir de las concentraciones de clortalidona disueltas a cada tiempo, se calcularon las constantes cinéticas y los parámetros de disolución siguientes: orden cinético, constante de disolución (kd), tiempo en el cual se disuelve el 50 % del valor declarado en la formulación ($t_{50\%}$), cantidad disuelta a los 60 minutos (Q_{60}), cantidad disuelta al cabo de la experiencia (Fd%), Eficiencia de la Disolución (ED%), Tiempo medio de disolución (MDT).

Análisis estadístico

Se calcularon los valores medios de los parámetros arriba mencionados con sus respectivas desviaciones standards. Con los valores de ED% se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se aplicó el método de comparación múltiple de la Mínima Diferencia Significativa (LSD), basado en la prueba t de Student

CALCULOS Y RESULTADOS

CALCULOS Y RESULTADOS

4.1. Curva de calibración del método de absorción al UV a 275,6 nm, para determinar el contenido de clortalidona y para realizar el seguimiento de la disolución de los comprimidos, en medio acuoso, método de regresión lineal.

La linealidad de la curva de calibración fue encontrada en el rango de concentraciones entre 40 - 120 µg/ml .

Los valores de Absorbancia a 275,6 nm para cada una de las soluciones de clortalidona standard preparadas, teniendo en cuenta que se pesaron 20 mg de standard que se llevaron a 25 ml con metanol y que se realizaron las correspondientes correcciones por título (101,1%) y por contenido de humedad (0.32%), fueron:

Primera Réplica		Segunda Réplica	
Concentración (µg/ml)	A _{275,6}	Concentración (µg/ml)	A _{275,6}
40,31	0,254	40,31	0,254
56,44	0,353	56,44	0,355
80,88	0,472	80,88	0,524
101,1	0,589	101,1	0,545
112,87	0,713	112,87	0,721
121,32	0,761	121,32	0,767

El intercepto con el eje de las ordenadas (a) y la pendiente (b) con sus respectivos intervalos de confianza del 95%, fueron:

$$a = 0,001026 \pm 0,063$$

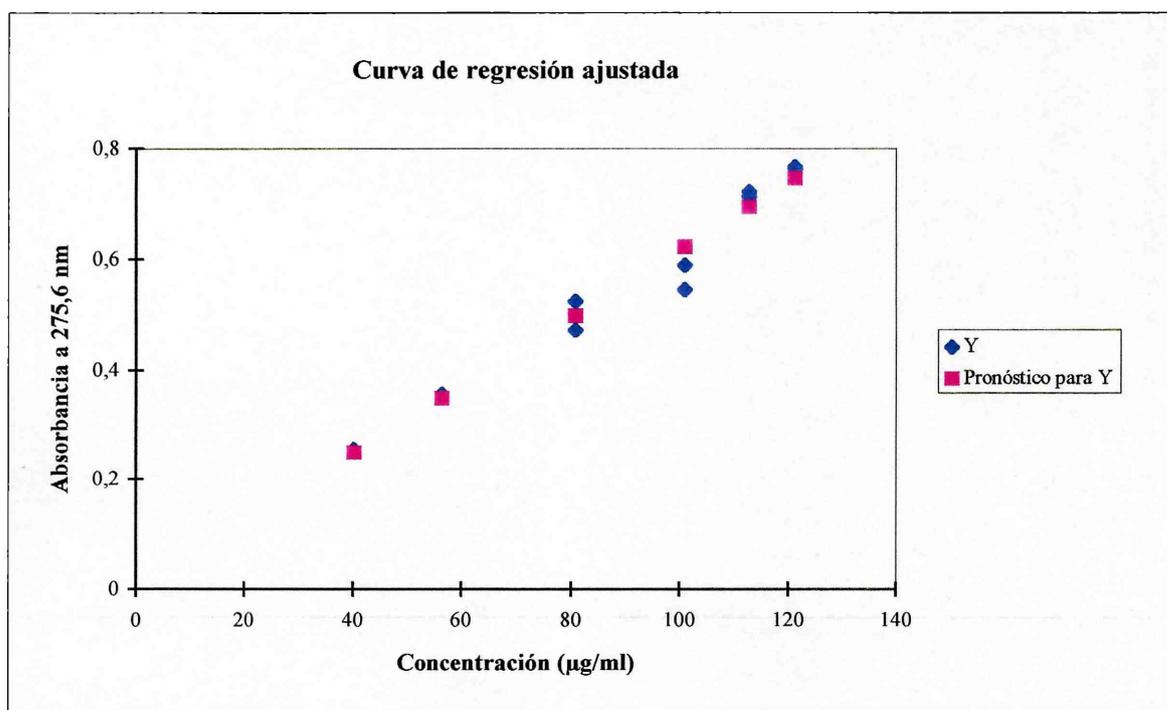
$$b = 0,006137 \pm 0,00069$$

con un coeficiente de correlación $r = 0.99009$ (Figura 40)

Con el fin de confirmar el análisis de regresión se realizó un Análisis de Residuales (Ri), método gráfico por el cual la relación Ri vs. Concentración nos debe dar un modelo aleatorio de distribución y además la sumatoria de los Ri debe ser próxima a cero. Se encontró un valor de la sumatoria de: $\sum Ri = 0$ (Figura 41)

FIGURA 40

Curva de Calibración de clortalidona por el método de Absorción al UV a 275,6 nm



Ordenada al origen (a) y Pendiente (b) con sus respectivos

intervalos de confianza del 95%:

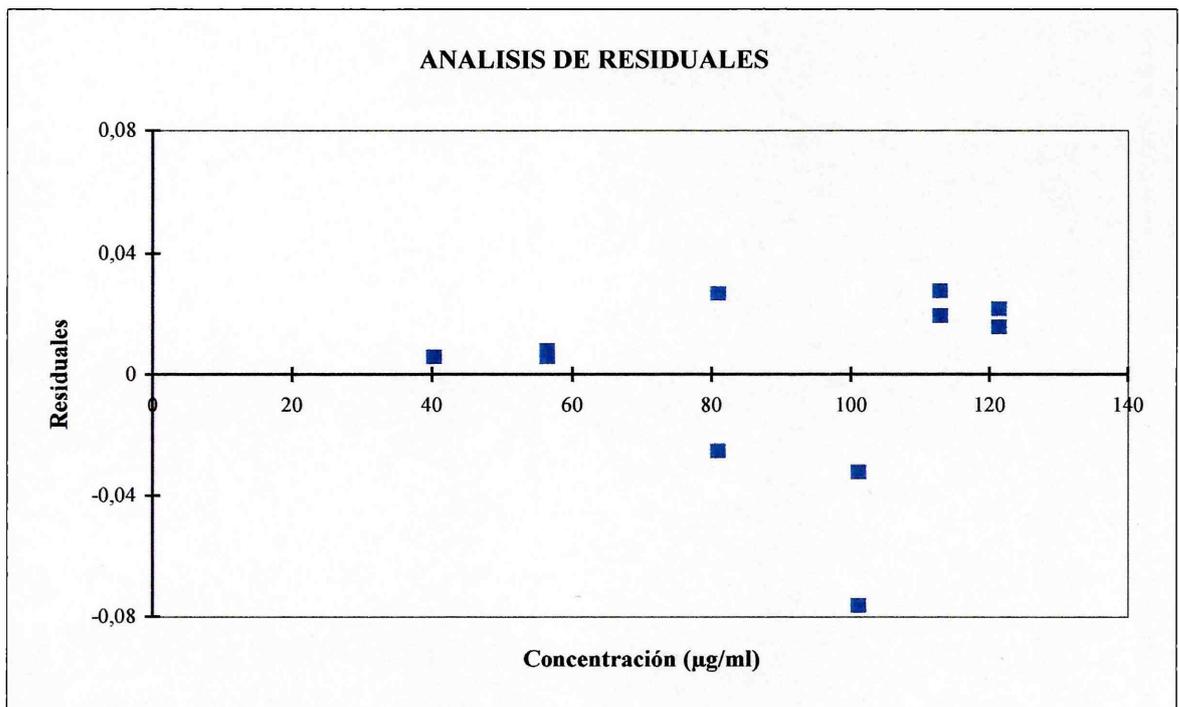
$$a = 0,001026 \pm 0,063$$

$$b = 0,006137 \pm 0,00069$$

Coefficiente de Correlación (r) = 0,99009

FIGURA 41

Método gráfico de Residuales para establecer linealidad en la curva de calibración de clortalidona por Absorción al UV a 275,6 nm



Con la misma finalidad se realizó el análisis del Factor Respuesta, es decir la relación entre la señal, en nuestro caso Absorbancia a 275,6 nm, con la concentración, que en función de la misma, debe mantenerse constante a lo largo del rango de concentraciones de la curva de calibración. (Figura 42)

Ambos análisis, así como el coeficiente de correlación obtenido, han confirmado que el modelo usado para nuestro método analítico es lineal. (Myers, 1986)

4.2. Cálculo del contenido de clortalidona en cada una de las partidas, de todas las formulaciones ensayadas. El control se realizó por el método de absorción a 275,6 nm, por quintuplicado, utilizando la curva de calibración obtenida, mediante la siguiente ecuación:

$$C\% = \frac{(A_{275,6} - a)}{b} \cdot 125 \cdot \frac{100}{P}$$

donde:

- $C\%$ = Porcentaje del valor declarado de clortalidona en los comprimidos
 $A_{275,6}$ = Absorbancia a 275,6 nm de la solución preparada con el pulverizado de los comprimidos
 a = ordenada al origen de la curva de calibración
 b = pendiente de la curva de calibración
 125 = corrección por dilución
 P = cantidad declarada de clortalidona en la alícuota del pulverizado

Los resultados de la valoración de los comprimidos de clortalidona ensayados, expresados como porcentaje del valor declarado \pm desviación típica de la media, para $n = 5$, figuran en la **Tabla 28** :

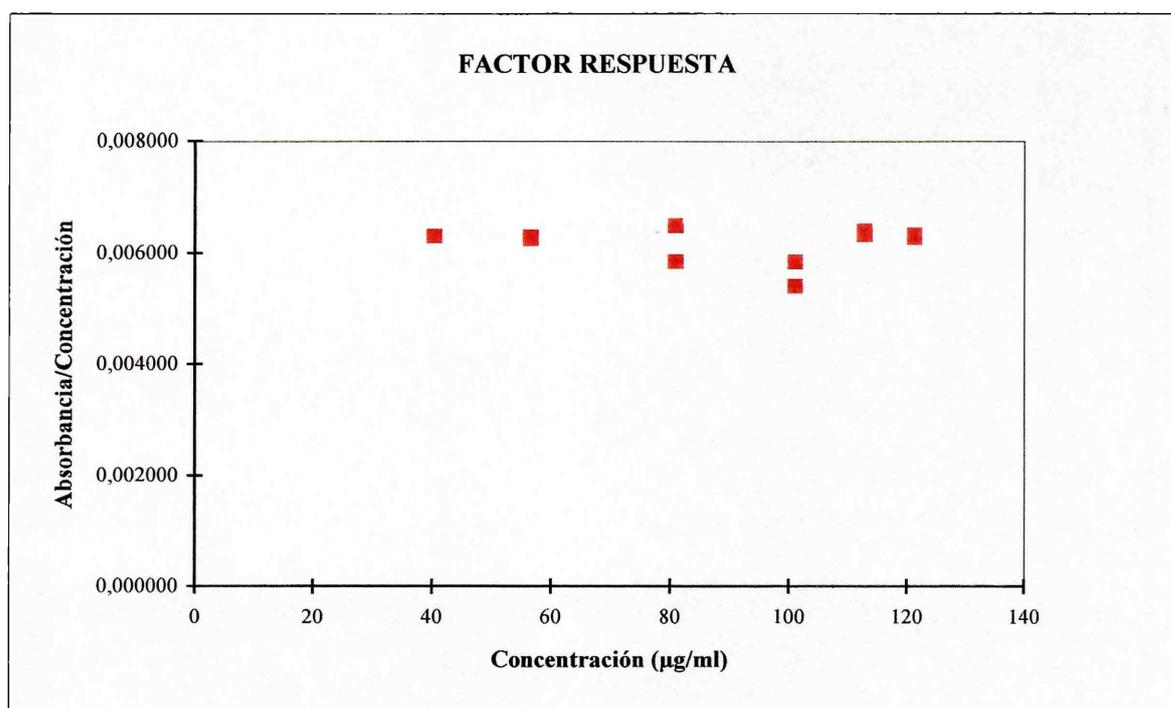
CUPM ₀₁	CUPM ₀₂	Lab. A	Lab. B
117,15 \pm 0,93	112,00 \pm 0,95	99,99 \pm 0,44	93,30 \pm 0,25

TABLA 28. Control del contenido de clortalidona en los comprimidos ensayados. Los valores tabulados corresponden al valor medio \pm Sm, expresados como porcentaje de la cantidad declarada de clortalidona.

Sm: desviación típica de la media

FIGURA 42

Análisis del Factor Respuesta para establecer linealidad en la curva de calibración de clortalidona por el método de Absorción al UV a 275,6 nm



4.3. Cálculo de la concentración de clortalidona disuelta a cada tiempo en el ensayo de disolución, expresada como mg/900ml :

$$C_{ti} = \frac{(A_{275,6} - a)}{b} \cdot \frac{900}{1000} + \text{Auxiliar}$$

donde:

- C_{ti} = Concentración de clortalidona a tiempo t_i
 $A_{275,6}$ = Absorbancia a 275,6 nm de cada alícuota muestreada a los distintos tiempos
 a = ordenada al origen de la curva de calibración
 b = pendiente de la curva de calibración
 900 = volumen total del medio de disolución
 1000 = conversión de μg a mg
 Auxiliar = corrección por cada alícuota de 5 ml muestreada, siendo:
 $\text{Auxiliar} = (\mu\text{g}/5 \text{ ml})_{t_i} + (\mu\text{g}/5 \text{ ml})_{t_{(i-1)}}$

Un modelo de la hoja de cálculo para obtener la concentración de clortalidona disuelta a cada tiempo, en el ensayo de disolución *in vitro*, aparece en la **Tabla 29**, siendo el correspondiente a la partida de comprimidos CUPM₀₂. De igual manera se procedió para el resto de los comprimidos.

4.4. Cálculo del porcentaje del valor declarado de clortalidona disuelto a cada tiempo en el ensayo de disolución:

$$C_{ti} \% = \frac{(A_{275,6} - a)}{b} \cdot \frac{900}{1000} + \text{Auxiliar} \cdot \frac{100}{C_{\infty}}$$

donde:

C_{∞} = Concentración declarada de clortalidona

Con los porcentajes de clortalidona disuelto a cada tiempo se trazaron los perfiles de disolución, para cada partida de los comprimido ensayados, los cuales aparecen en la **Figura 43**.

4.5. Determinación del orden cinético con que se disuelve la clortalidona, calculado mediante la obtención de los coeficientes de correlación de las relaciones Cantidad de clortalidona disuelta en función del tiempo, es decir: C_t vs. t (orden cero), y del logaritmo de la cantidad no disuelta de clortalidona en función del tiempo, es decir: $\lg(1 - (C_t/C_{\infty}))$ vs. t ; donde C_t es la concentración de clortalidona a tiempo t , expresada en mg/900 ml y C_{∞} es la concentración declarada de clortalidona, expresada en mg/900 ml, (primer orden).

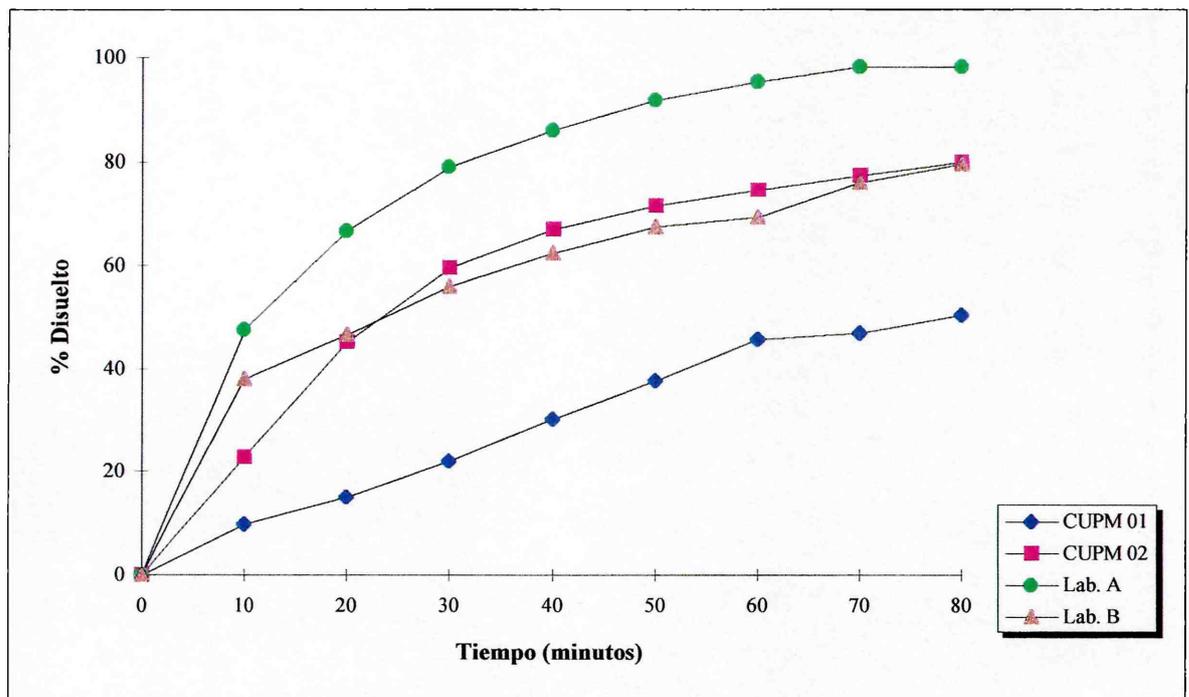
TABLA 29

Tiempo	A275,6	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/5 ml}$	Auxiliar	mg/900 ml	%
Comprim.1						
10	0,16	18,618	93,09	93,09	16,76	30,47
20	0,23	28,813	144,07	237,16	26,03	47,32
30	0,283	36,532	182,66	419,82	33,12	60,21
40	0,318	41,630	208,15	627,97	37,89	68,89
50	0,336	44,252	221,26	849,23	40,45	73,55
60	0,337	44,397	221,99	1071,21	40,81	74,19
70	0,351	46,436	232,18	1303,40	42,86	77,93
80	0,359	47,602	238,01	1541,40	44,14	80,26
Comprim.2						
10	0,108	11,045	55,22	55,22	9,94	18,07
20	0,219	27,211	136,06	191,28	24,55	44,63
30	0,278	35,804	179,02	370,30	32,42	58,94
40	0,314	41,047	205,24	575,54	37,31	67,84
50	0,328	43,087	215,43	790,97	39,35	71,55
60	0,341	44,980	224,90	1015,87	41,27	75,04
70	0,349	46,145	230,73	1246,59	42,55	77,36
80	0,349	46,145	230,73	1477,32	42,78	77,78
Comprim.3						
10	0,126	13,666	68,33	68,33	12,30	22,36
20	0,226	28,231	141,15	209,48	25,48	46,32
30	0,297	38,572	192,86	402,34	34,92	63,50
40	0,318	41,630	208,15	610,49	37,87	68,85
50	0,339	44,689	223,44	833,94	40,83	74,24
60	0,344	45,417	227,08	1061,02	41,71	75,83
70	0,36	47,747	238,74	1299,76	44,03	80,06
80	0,372	49,495	247,47	1547,23	45,85	83,35
Comprim.4						
10	0,12	12,792	63,96	63,96	11,51	20,93
20	0,241	30,415	152,08	216,04	27,44	49,89
30	0,308	40,174	200,87	416,91	36,37	66,13
40	0,329	43,232	216,16	633,07	39,33	71,50
50	0,346	45,708	228,54	861,61	41,77	75,95
60	0,353	46,728	233,64	1095,25	42,92	78,03
70	0,378	50,369	251,84	1347,09	46,43	84,41
80	0,384	51,243	256,21	1603,30	47,47	86,30
Comprim.5						
10	0,087	14,009	70,05	70,05	12,61	22,92
20	0,164	26,556	132,78	202,83	23,97	43,58
30	0,21	34,051	170,26	373,08	30,85	56,09
40	0,237	38,451	192,26	565,34	34,98	63,60
50	0,25	40,569	202,85	768,18	37,08	67,41
60	0,276	44,806	224,03	992,21	41,09	74,72
70	0,274	44,480	222,40	1214,61	41,02	74,59
80	0,289	46,924	234,62	1449,24	43,45	78,99
Comprim.6						
10	0,086	13,846	69,23	69,23	12,46	22,66
20	0,158	25,578	127,89	197,12	23,09	41,98
30	0,207	33,563	167,81	364,94	30,40	55,28
40	0,237	38,451	192,26	557,19	34,97	63,58
50	0,257	41,710	208,55	765,74	38,10	69,27
60	0,253	41,058	205,29	971,03	37,72	68,58
70	0,269	43,665	218,33	1189,36	40,27	73,22
80	0,265	43,014	215,07	1404,43	39,90	72,55

TABLA 29. Concentraciones de clortalidona disueltas a cada tiempo, para seis comprimidos CUPM 02, conteniendo 55 mg de clortalidona.

FIGURA 43

Perfiles de disolución de los comprimidos de Clortalidona :
CUPM 01, CUPM 02, Laboratorios A y B



Perfiles de disolución correspondientes a los porcentajes medios, para $n = 6$,
de los comprimidos de clortalidona CUPM 01, CUPM 02, Laboratorios A y B.

4.6. Determinación de la constante de disolución (**kd**) de clortalidona y del tiempo en el que se disuelve el 50% de la droga (**t_{50%}**) a partir de conocer la cinética con que se disuelve, según las siguientes ecuaciones:

Para orden cero: $kd = \frac{Ct}{t}$

$$t_{50\%} = \frac{C_{\infty}}{2kd}$$

Para primer orden: $kd = -\lg\left[1 - \left(\frac{Ct}{C_{\infty}}\right)\right] \cdot \frac{2.303}{t}$

$$t_{50\%} = \frac{0.693}{kd}$$

Todos los comprimidos ensayados conteniendo clortalidona, siguen una cinética de disolución de primer orden. En la **Figura 44**, se grafica el logaritmo de la cantidad no disuelta de clortalidona en función del tiempo para todas las partidas estudiadas. Con las pendientes de las rectas obtenidas se han estimado las respectivas constantes de disolución de primer orden (**kd**).

Los valores de **kd** y de **t_{50%}**, calculados para todos los comprimidos ensayados, se encuentran tabulados en la **Tabla 30**.

4.7. Determinación de la cantidad disuelta de clortalidona a los 60 minutos, que de acuerdo con la normativa de USP 23 no debe ser inferior al 50% de la cantidad total (**Q₆₀**), calculada mediante la ecuación:

$$Q_{60} = \frac{(A_{60} - a)}{b} \cdot \frac{900}{1000} + \text{Auxiliar} \cdot \frac{100}{C_{\infty}}$$

donde:

A_{60} = Absorbancia a 275,6 nm de la alícuota correspondiente a los 60 minutos.

Los valores de **Q₆₀** obtenidos figuran en la **Tabla 30**.

4.8. Determinación del porcentaje total de clortalidona disuelto al término de la experiencia, es decir, 80 minutos. (**Fd%**), calculado mediante la ecuación:

$$Fd\% = \frac{(A_{80} - a)}{b} \cdot \frac{900}{1000} + \text{Auxiliar} \cdot \frac{100}{C_{\infty}}$$

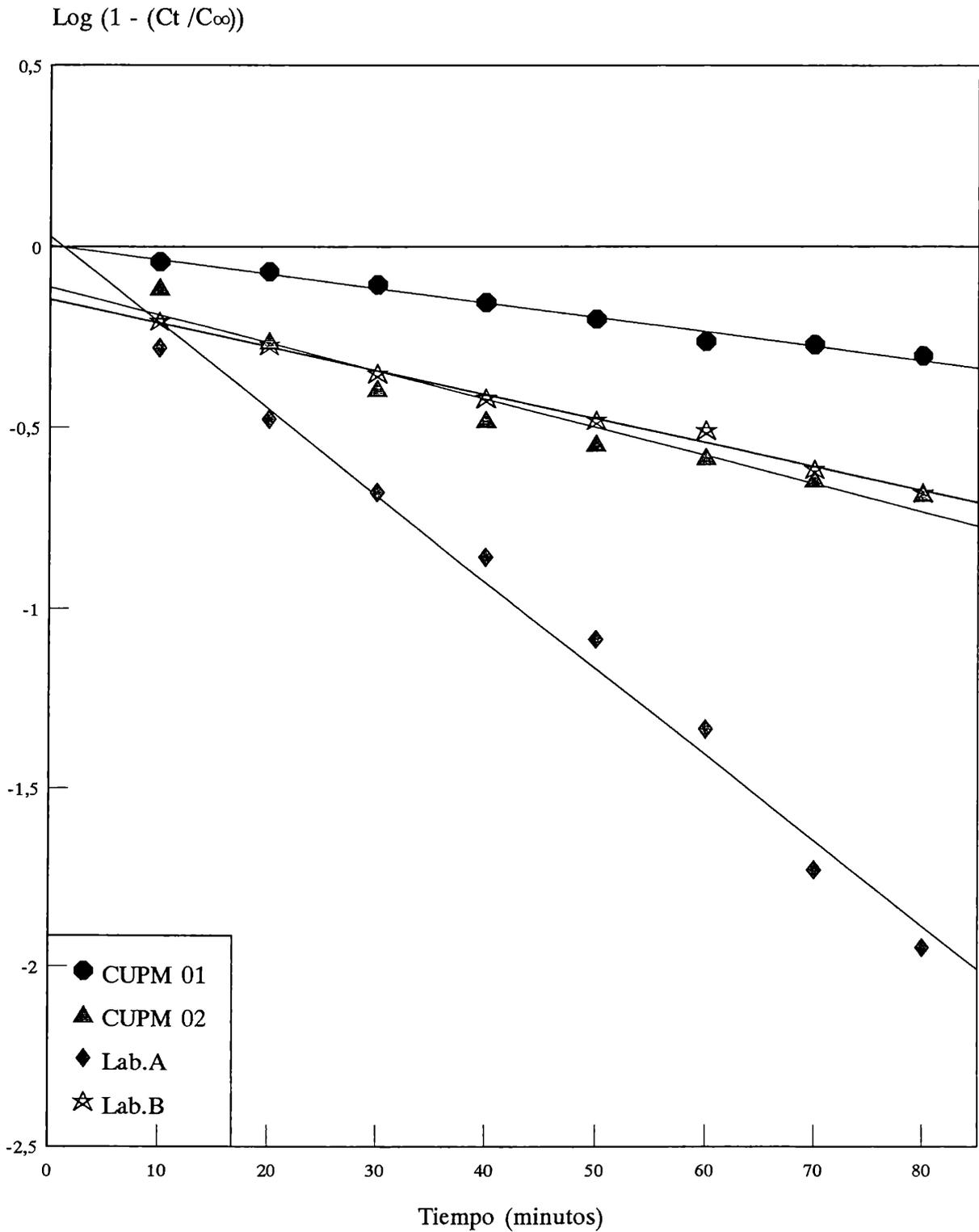
donde:

A_{80} = Absorbancia a 275,6 nm de la alícuota correspondiente a los 80 minutos.

Los porcentajes totales disueltos al cabo de los 80 minutos de cada ensayo de disolución (**Fd%**) figuran en la **Tabla 30**.

FIGURA 44

Logaritmo cantidad no disuelta de clortalidona en función del tiempo
 Comprimidos CUPM 01, CUPM 02, Laboratorios A y B



CUPM 01: a= 0,0037 b=-0,00401 r=0,9914; Lab.A: a= 0,0282 b=-0,0239 r=0,9933
 CUPM 02: a=-0,1121 b=-0,00776 r=0,9695; Lab.B: a=-0,1461 b=-0,0066 r=0,9961

4.9. Determinación de la Eficiencia de Disolución (ED%), calculada mediante la siguiente expresión:

$$ED\% = \frac{ABC}{t \cdot Q_{100}} \cdot 100$$

donde:

ABC = Área bajo la curva de disolución

Q_{100} = Cantidad correspondiente al 100% de clortalidona disuelto

t = Tiempo máximo elegido para el cálculo del ABC, en nuestro caso 80 minutos.

4.9.1. Cálculo del ABC mediante el método de los trapecios el cual consiste en dividir la curva en tantos trapecios como datos de cantidad disuelta de droga se dispongan, determinar el área de cada trapecio y luego sumarlos.

$$AreaTrapecio = \sum \frac{C_i + C_{(i+1)}}{2} \cdot (t_{(i+1)} - t_i)$$

donde:

C_i = Concentración disuelta a cualquier tiempo t_i

$C_{(i+1)}$ = Concentración disuelta al tiempo siguiente $t_{(i+1)}$

La ED% para cada partida de comprimidos figuran en la **Tabla 30**.

4.10. Cálculo del Tiempo Medio de Disolución (MDT) mediante la siguiente ecuación:

$$MDT = \frac{\int_0^{80} t \cdot \frac{dC}{dt}}{\int_0^{80} \frac{dC}{dt}}$$

Los valores de MDT para cada partida de comprimidos figuran en la **Tabla 30**.

4.11. Aplicación de un ANOVA con los valores medios de ED% entre los comprimidos elaborados en la UPM y los de los dos Laboratorios del mercado, con el objeto de analizar si existen diferencias significativas entre las distintas formulaciones (*Sokal y Rohlf, 1984*).

Aplicación del método de comparación múltiple de la Mínima Diferencia Significativa (LSD), basado en la prueba t de Student, a fin de establecer cuales son los valores medios de ED% que difieren entre sí. (*Cid Cárcamo, 1982*)

8En la **Tabla 31** se detalla el ANOVA realizado con los valores de ED% de todos los comprimidos analizados y en la **Tabla 32**, el resultado del Test de la Mínima Diferencia Significativa (LSD).

TABLA 30

Comprimidos	kd	t 50%	Q60 ± Sm	Fd% ± Sm	ED% ± Sm	MDT ± Sm
CUPM 01	0,00924	75,04	45,70 ± 2,41	50,41 ± 2,78	30,80 ± 2,83	52,74 ± 0,89
CUPM 02	0,01787	38,78	74,40 ± 1,28	79,87 ± 1,93	57,02 ± 1,07	48,32 ± 0,18
Lab. A	0,05508	12,58	95,36 ± 0,97	98,10 ± 0,72	77,13 ± 1,14	46,98 ± 0,093
Lab. B	0,0152	45,59	69,19 ± 2,66	79,54 ± 3,53	58,88 ± 2,47	47,37 ± 0,16

TABLA 30. Parámetros de disolución calculados para los comprimidos de clortalidona analizados.

La kd está expresada en 1/minutos

El t 50% está expresado en minutos

El MDT está expresado en minutos

Sm : Desviación típica de la media para n = 6

TABLA 31

Origen de la Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	F
Entre laboratorios	6546,72	3	2182,24	73,07
Error	597,28	20	29,86	
Total	7144	23	2212,1	

TABLA 31. Resultado del análisis de varianza realizado con los valores medios de ED % de todos los comprimidos de clortalidona ensayados.
 $F_{0,05}(3,20) = 3,10$

TABLA 32

		CUPM 01	CUPM 02	Lab. B	Lab. A
	ED%	30,8	57,02	58,88	77,13
Lab. A	77,13	46,33	20,11	18,25	0
Lab. B	58,88	28,08	1,86	0	
CUPM 02	57,02	26,22	0		
CUPM 01	30,8	0			

TABLA 32. Aplicación del método de comparación múltiple basado en la Mínima Diferencia Significativa (LSD), utilizando los valores medios de ED% de los comprimidos de clortalidona.

(LSD) 0.05, 20 = 6.58

DISCUSSION

DISCUSION

4. INFLUENCIA DEL DESINTEGRANTE SOBRE LA DISOLUCION DE COMPRIMIDOS DE CLORTALIDONA. ENSAYOS *IN VITRO*.

La clortalidona es uno de los diuréticos más frecuentemente utilizado en casos de hipertensión, insuficiencia cardíaca y edemas. Debido a su limitada solubilidad en agua, los estudios de disolución de formas farmacéuticas sólidas que contengan esta droga, se convierten en imprescindibles en el momento de evaluar su calidad. (*Ibrahim y Shawky, 1983*)

Por esta razón se decidió estudiar la disolución de comprimidos de clortalidona, desarrollados y elaborados en la Unidad de Producción de Medicamentos (UPM), realizando el control biofarmacéutico, que nos permite evaluar las características de liberación del principio activo, desde la forma farmacéutica al medio de disolución. El fin último del trabajo fue diseñar la mejor formulación, es decir, aquella que asegure una óptima liberación de clortalidona en los medios biológicos.

Se analizó la influencia del desintegrante, utilizando almidón, sobre el comportamiento de disolución de los comprimidos. El propósito del desintegrante es facilitar la ruptura del comprimido después de su administración. Los agentes desintegrantes pueden adicionarse previo a la granulación ó durante la lubricación, paso previo a la compresión ó en ambos procesos. Las diferentes propiedades en la desintegración están relacionadas con los distintos mecanismos por los cuales los desintegrantes afectan la ruptura de los comprimidos. Los desintegrantes pueden ser intragranulares ó extragranulares, los cuales dan formulaciones que se desintegran más rápidamente que los intragranulares, aunque se ha llegado a sugerir una combinación de ambos métodos de granulación. (*Peck et al., 1981*)

Por ello se prepararon dos partidas de comprimidos de clortalidona, una en la cual se adicionó el almidón conjuntamente con el resto de los excipientes de tal manera de obtener una desintegración de tipo intragranular (CUPM₀₁) y la otra partida combinando el lubricante (estearato de magnesio) con parte del almidón, secado previamente a 80-90 °C para remover el agua adsorbida, y lograr así una desintegración extragranular (CUPM₀₂). Puesto que los lubricantes más efectivos son los más hidrofóbicos, es decir los que repelen el agua y recubren el gránulo, no es sorprendente que tales materiales puedan impedir la humectación, desintegración y posterior disolución de la tableta, este efecto será más pronunciado cuando el principio activo es poco soluble, como el caso de la clortalidona. (*Chowhan y Chi, 1986*) Para superar este problema, se combinó parte del almidón con el estearato de magnesio, para facilitar la humectación del gránulo ya que los almidones muestran una gran afinidad por el agua a

través de una acción capilar, resultando en la expansión y subsecuente desintegración del comprimido. (*Finholt, 1974*)

Para realizar el seguimiento de la disolución de clortalidona en función del tiempo, y para determinar el contenido de principio activo en las distintas formulaciones ensayadas, se optimizó un método de absorción al UV, a 275,6 nm, cuya validación, respecto a linealidad, se puede observar en las **Figuras 40, 41 y 42**.

Como se indica en la **Tabla 30** y en las **Figuras 43 y 44**, los comprimidos CUPM₀₁ presentaron un bajo perfil de disolución, producto de la desintegración intragranular seguida por los comprimidos. El porcentaje disuelto a los 60 minutos no alcanzó a cumplir con las especificaciones de USP 23, que nos dice que a ese tiempo se debe disolver no menos del 50% de la cantidad de droga declarada, encontrándonos en este caso con niveles menores al 46%, alcanzándose recién a los 80 minutos el 50% de droga disuelta. Este comportamiento se ve reflejado a su vez, en una muy baja ED%, del orden del 31%, mientras que por lógico contraste, el MDT es el más alto de todos los comprimidos ensayados, cercano a los 53 minutos.

En cambio, podemos apreciar que las modificaciones farmacotécnicas realizadas, al adicionar el almidón en conjunto con el estearato de magnesio, han mejorado profundamente las características de disolución, ya que el Q₆₀ es superior al 74% y la ED% es del orden del 57%, con un valor de MDT de 48 minutos, muy cercano al MDT de las formulaciones del mercado farmacéutico. Es decir, que los comprimidos CUPM₀₂, no solo cumplen con el test de disolución de USP 23, sino que presentan valores de ED% y de MDT aceptables.

Los comprimidos de los Laboratorios A y B cumplen con el test de disolución de USP 23, la ED% del Laboratorio B es aceptable, mientras que la del Laboratorio A es superior a la de los restantes comprimidos ensayados.

Se realizó un análisis de varianza con los valores medios de ED% de todos los comprimidos ensayados, observándose diferencia significativas ($p < 0.05$) entre los mismos. (**Tabla 31**)

Se completó este análisis aplicando el método de comparación múltiple de la mínima diferencia significativa (LSD) cuyos resultados aparecen en la **Tabla 32**.

De esta manera se comprobó estadísticamente, que solamente los comprimidos CUPM₀₂ y los del Laboratorio B son equivalentes.

**5.CONTROL BIOFARMACEUTICO DE COMPRIMIDOS
DE CLORHIDRATO DE PROPRANOLOL.
ENSAYOS *IN VITRO*.**

MATERIALES Y METODOS

5. CONTROL BIOFARMACEUTICO DE COMPRIMIDOS DE CLORHIDRATO DE PROPRANOLOL. ENSAYOS *IN VITRO*.

MATERIALES Y METODOS

Materiales

- * Clorhidrato de propranolol, droga en polvo uso comercial, de título 101,7%
- * Almidón, lactosa, polivinilpirrolidona (PVP) y estearato de magnesio, grado USP 23.
- * Comprimidos comerciales disponibles en el mercado farmacéutico argentino, conteniendo 40 mg de clorhidrato de propranolol, de cuatro laboratorios productores distintos, identificados como Laboratorio (Lab.) A, B, C y D, correspondientes cada uno de ellos a un mismo lote; a su vez, del Laboratorio D se ensayaron tres partidas distintas, identificadas como Lab. D₀₁, D₀₂ y D₀₃, respectivamente.
- * Comprimidos no recubiertos, conteniendo 40 mg de clorhidrato de propranolol, elaborados por el personal de la Unidad de Producción de Medicamentos (UPM), mediante granulación húmeda y compresión, utilizando punzones de 10 mm, identificados como PUPM, cuya composición es:

Clorhidrato de propranolol	40 mg
Almidón	118 mg
Lactosa	118 mg
PVP	18 mg
Estearato de magnesio	6 mg

- * Solución acuosa de Acido clorhídrico (1:100)

Equipos.

- * Equipo de disolución de comprimidos Alycar Mod. ADS150
- * Equipo de desintegración de comprimidos Erweka ZT6
- * Equipo de Resistencia a la rotura Schleuniger-2E
- * Equipo de Friabilidad Erweka TA
- * Espectrofotómetro Beckman M26
- * Micropipeta automática Socorex de 100-1000 μ L y Pipeta automática Eppendorf de 500-5000 μ L.
- * Balanza Metler Toledo AG 204

Contenido de clorhidrato de propranolol

Se determinó el contenido de clorhidrato de propranolol de todos los comprimidos ensayados, mediante la utilización de un método de absorción al UV, en medio de ácido clorhídrico (1:100), a 292 nm. Para ello se pesaron individualmente 20 comprimidos y se determinó el peso promedio. Se pulverizaron y se pesaron alícuotas correspondientes a 15 mg de principio activo (aproximadamente 112 mg de pulverizado) que se llevaron a 25 ml con la solución de HCl (1:100) y se agitaron mecánicamente durante 30 minutos. Se filtraron y se realizaron diluciones 1:25, también con solución clorhídrica, de tal manera de obtener una concentración de 24 μ g/ml que se leyeron al UV a 292 nm. Se realizaron cinco réplicas de la valoración.

Validación del método

Para la validación del método se obtuvo una curva de calibración con clorhidrato de propranolol standard (título 100%, con 0,14% de humedad), en medio de ácido clorhídrico (1:100) en un rango de concentraciones entre 10 - 40 μ g/ml. Para ello se prepararon, por duplicado, dos soluciones madres de propranolol standard de 0,5 mg/ml, pesando 25 mg de droga que se disolvieron en 50 ml de solución clorhídrica. A partir de estas soluciones madres se prepararon cuatro diluciones para obtener las siguientes concentraciones:

Dilución	Concentración (µg/ml)
0,5:25	10
1:25	20
1,5:25	30
2:25	40

Se leyeron al UV a 292 nm todas las diluciones y los datos de Absorbancia obtenidos, en función de la concentración se analizaron por regresión lineal, utilizando el programa Microsoft Excel 5.0, evaluándose linealidad.

Uniformidad de contenido

Sobre diez comprimidos de cada lote se realizó el ensayo de uniformidad de contenido, disgregando cada comprimido en 5 ml de HCl (1:100) y completando con metanol a 50 ml, agitando 45 minutos, filtrando y diluyendo 1:25 con metanol, de tal manera de obtener una concentración de 32 µg/ml, según el valor declarado de principio activo. Se leyó su absorbancia a 292 nm, utilizando, para calcular su concentración, una solución de referencia, preparada cada día de trabajo, pesando 20 mg de clorhidrato de propranolol standard que se disolvieron en 50 ml de metanol y luego se hizo una dilución 1:10, también en metanol, de tal manera de obtener una concentración de 40 µg/ml.

Resistencia a la rotura

Se determinó la resistencia a la rotura de los comprimidos, sobre diez comprimidos de cada partida, expresándose el resultado como valor medio en kg/pulg².

Tiempo de desintegración

El tiempo de desintegración de los comprimidos fue determinado según las normas establecidas por la Farmacopea Argentina VI ed., expresándose su resultado en minutos.

Friabilidad

Se determinó la friabilidad de los comprimidos sobre diez comprimidos, expresándose el resultado como porcentaje promedio de la pérdida de peso de los mismos.

Estudio de disolución in vitro

Se efectuó de acuerdo a la normativa de USP 23, cuyas condiciones de trabajo son las siguientes:

Medio: 1000 ml de ácido clorhídrico (1:100) a 37 °C

Aparato: 1 (canastilla)

rpm: 100

El ensayo se realizó bajo condiciones “non sink”, retirándose alícuotas de 5 ml a los 5, 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos, reponiéndose el mismo volumen con ácido clorhídrico (1:100) a igual temperatura; las muestras se filtraron y se valoraron mediante el método de absorción a 292 nm. Los resultados se expresaron en mg/1000 ml de medio clorhídrico, utilizando la curva de calibración calculada por ajuste lineal de cuadrados mínimos. Se analizaron seis comprimidos de cada especialidad ensayada.

Parámetros de disolución

A partir de las concentraciones de propranolol disueltas a cada tiempo, se calcularon las constantes cinéticas y los parámetros de disolución siguientes: orden cinético, constante de disolución (kd), tiempo en el cual se disuelve el 50 % del valor declarado en la formulación ($t_{50\%}$), cantidad disuelta a los 30 minutos (Q_{30}), cantidad disuelta al cabo de la experiencia (Fd%), Eficiencia de la Disolución (ED%), Tiempo medio de disolución (MDT).

Análisis estadístico

Se calcularon los valores medios de los parámetros arriba mencionados con sus respectivas desviaciones standards. Con los valores de ED% se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y se aplicó el método de comparación múltiple de la Mínima Diferencia Significativa (LSD), basado en la prueba t de Student

CALCULOS Y RESULTADOS

CALCULOS Y RESULTADOS

5.1. Curva de calibración del método de absorción al UV a 292 nm, para determinar el contenido de clorhidrato de propranolol y para realizar el seguimiento de la disolución de los comprimidos, en medio de ácido clorhídrico (1:100), método de regresión lineal.

La linealidad de la curva de calibración fue encontrada en el rango de concentraciones entre 10 - 40 µg/ml .

Los valores de Absorbancia a 292 nm para cada una de las soluciones de clorhidrato de propranolol standard preparadas, teniendo en cuenta que se realizaron las correcciones por el porcentaje de humedad del standard, fueron:

Primera Réplica		Segunda Réplica	
Concentración (µg/ml)	A ₂₉₂	Concentración (µg/ml)	A ₂₉₂
9,98	0,197	9,98	0,199
19,97	0,393	19,97	0,395
29,96	0,586	29,96	0,586
39,94	0,778	39,94	0,776

El intercepto con el eje de las ordenadas (a) y la pendiente (b) con sus respectivos intervalos de confianza del 95%, fueron:

$$a = 0,00659 \pm 0,00373$$

$$b = 0,01932 \pm 0,000136$$

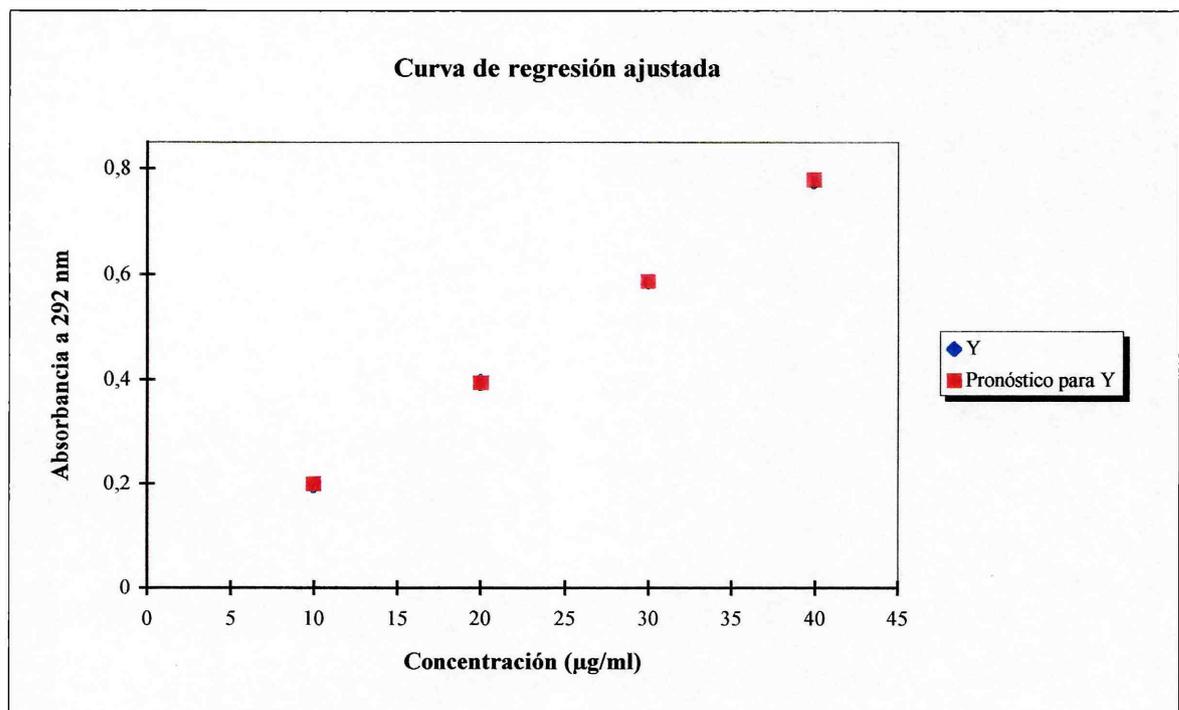
con un coeficiente de correlación $r = 0.99997$ (**Figura 45**)

Con el fin de confirmar el análisis de regresión se realizó un Análisis de Residuales (Ri) , método gráfico por el cual la relación Ri vs. Concentración nos debe dar un modelo aleatorio de distribución y además la sumatoria de los Ri debe ser próxima a cero. Se encontró un valor de la sumatoria de: $\sum Ri = 1,1102 \times 10^{-16}$ (**Figura 46**)

Con la misma finalidad se realizó el análisis del Factor Respuesta, es decir la relación entre la señal, en nuestro caso Absorbancia a 292 nm, con la concentración, que en función de la misma, debe mantenerse constante a lo largo del rango de concentraciones de la curva de calibración. (**Figura 47**)

FIGURA 45

Curva de calibración de Clorhidrato de Propranolol
por Absorción al UV a 292 nm



Ordenada al origen (a) y Pendiente (b) con sus respectivos intervalos de confianza del 95%:

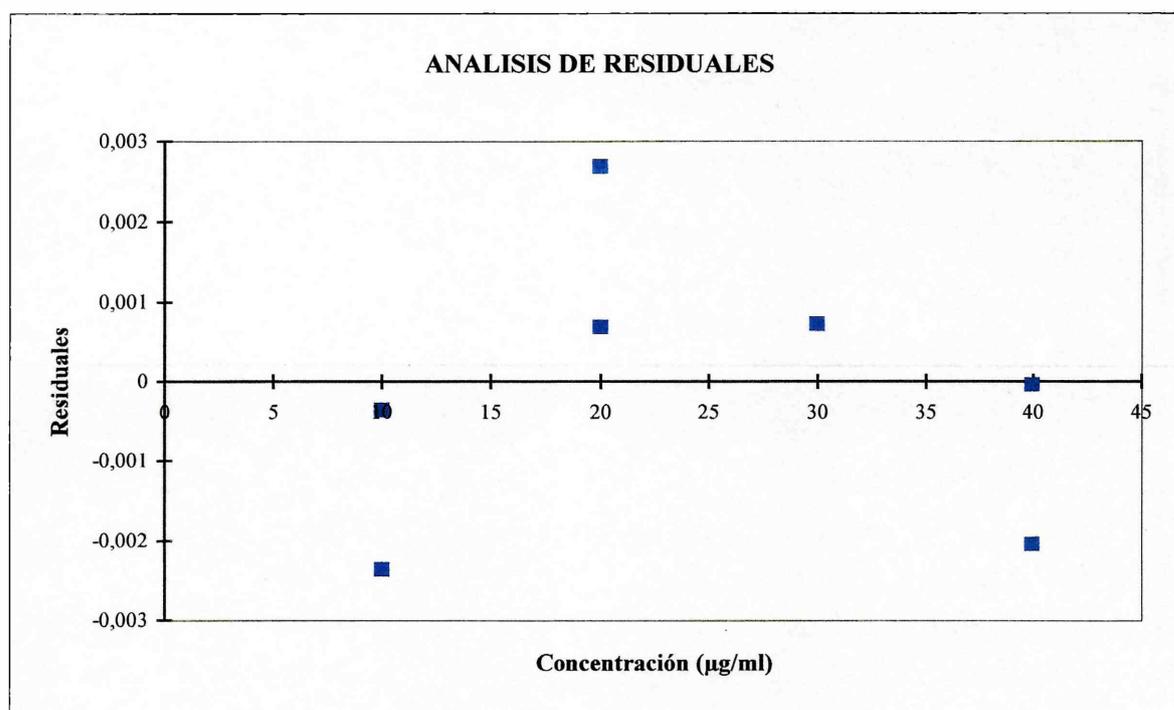
$$a = 0,00659 \pm 0,00373$$

$$b = 0,01932 \pm 0,000136$$

$$\text{Coeficiente de Correlación } (r) = 0,99997$$

FIGURA 46

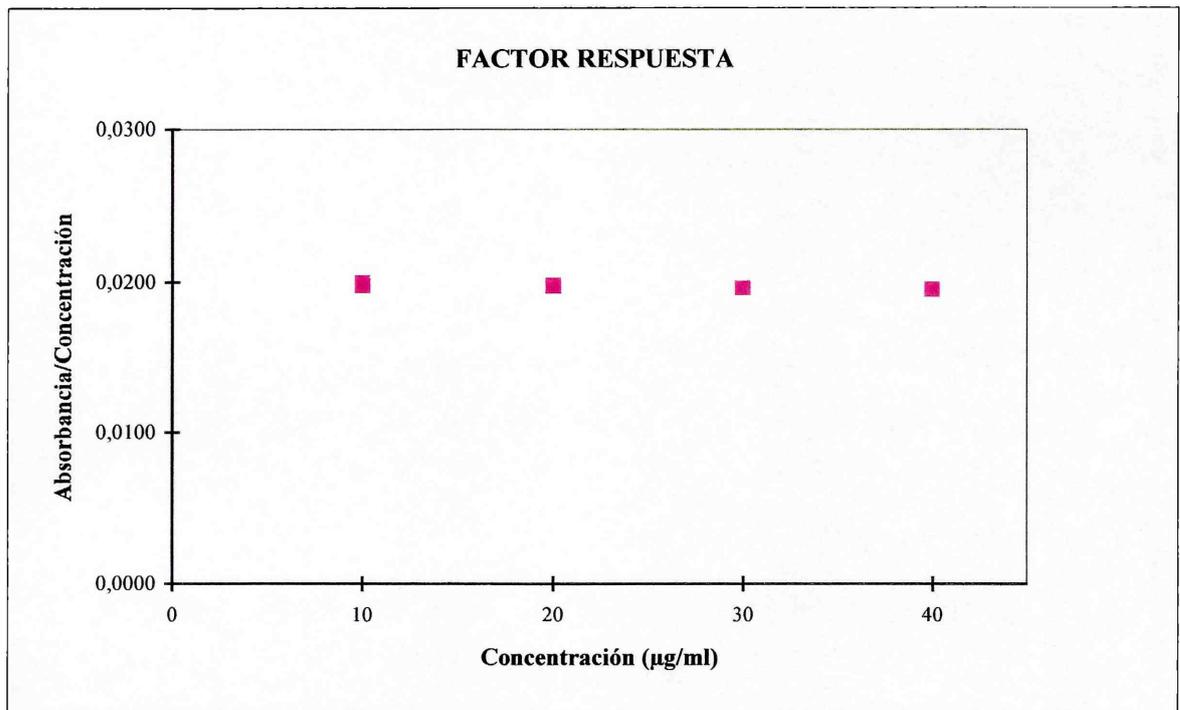
Método gráfico de Residuales para establecer linealidad en la curva de calibración de clorhidrato de propranolol por Absorción al UV a 292 nm



Sumatoria de Residuales = 1,1102E-16

FIGURA 47

Análisis del Factor Respuesta para establecer linealidad en la curva de calibración de Clorhidrato de Propranolol por el método de Absorción al UV a 292 nm



Ambos análisis, así como el coeficiente de correlación obtenido, han confirmado que el modelo usado para nuestro método analítico es lineal. (Myers, 1986)

5.2. Cálculo del contenido de clorhidrato de propranolol en cada una de las partidas, de todas las formulaciones ensayadas. El control se realizó por quintuplicado, utilizando la curva de calibración obtenida, mediante la siguiente ecuación:

$$C\% = \frac{(A_{292} - a)}{b} \cdot 625 \cdot \frac{100}{P}$$

donde:

$C\%$ = Porcentaje del valor declarado de clorhidrato de propranolol en los comprimidos

A_{292} = Absorbancia a 292 nm de la solución preparada con el pulverizado de los comprimidos

a = ordenada al origen de la curva de calibración

b = pendiente de la curva de calibración

625 = corrección por dilución

P = Cantidad declarada de clorhidrato de propranolol en la alícuota del pulverizado

Los resultados de la valoración de los comprimidos de clorhidrato de propranolol ensayados, expresados como porcentaje del valor declarado \pm desviación típica de la media, para $n = 5$, figuran en la **Tabla 33** :

PUPM	Lab. A	Lab. B	Lab. C	Lab. D ₀₁	Lab. D ₀₂	Lab. D ₀₃
105,98 \pm 0,59	99,02 \pm 0,47	101,17 \pm 1,16	100,19 \pm 0,88	96,33 \pm 0,31	94,84 \pm 0,77	100,89 \pm 0,61

TABLA 33. Control del contenido de clorhidrato de propranolol en los comprimidos ensayados. Los valores tabulados corresponden al valor medio \pm Sm, expresados como porcentaje de la cantidad declarada de clorhidrato de propranolol.

Sm: desviación típica de la media

5.3. En el ensayo de uniformidad de contenido se aplicó la siguiente expresión, para calcular el porcentaje de droga presente en cada comprimido:

$$C\% = \frac{(A_{mt} \cdot C_{st})}{A_{st}} \cdot \frac{100}{C_{mt}}$$

donde:

$C\%$ = Porcentaje del valor declarado de clorhidrato de propranolol en cada comprimido

A_{mt} = Absorbancia a 292 nm de la muestra preparada con cada comprimido

A_{st} = Absorbancia a 292 nm de la solución standard de clorhidrato de propranolol

C_{st} = Concentración de la solución standard de clorhidrato de propranolol

C_{mt} = Concentración declarada de clorhidrato de propranolol en la muestra preparada con cada comprimido

Los resultados de los ensayos de uniformidad de contenido, resistencia a la rotura, tiempo de desintegración y friabilidad, para todos los comprimidos ensayados figuran en la **Tabla 34**:

Comprimidos	Unif. Cont.	RR \pm Sm	td \pm Sm	Friab.
PUPM	100,13 - 105,53	5,5 \pm 0,22	5,0 \pm 0,4	0,30
Lab. A	94,71 - 100,72	6,2 \pm 0,12	3,0 \pm 0,6	0,28
Lab. B	94,30 - 107,56	- ^a	- ^a	- ^a
Lab. C	98,78 - 101,89	6,2 \pm 0,45	5,15 \pm 0,05	0,25
Lab. D ₀₁	- ^a	- ^a	- ^a	- ^a
Lab. D ₀₂	97,42 - 106,23	2,8 \pm 0,75	23 \pm 1,47	0,40
Lab. D ₀₃	98,20 - 103,40	3,9 \pm 0,72	4,0 \pm 0,45	0,41

TABLA 34. Uniformidad de contenido (Unif. Cont.), expresada como rango de los porcentajes obtenidos.

Valores medios de Resistencia a la Rotura (RR) expresada en kg/pulg²

Tiempo de Desintegración (td) expresado en minutos

Friabilidad (Friab.), expresada como porcentaje medio de pérdida de peso.

Sm: desviación típica de la media

^a No fue posible determinar estos parámetros por falta de unidades del mismo lote.

5.4. Cálculo de la concentración de propranolol disuelta a cada tiempo en el ensayo de disolución, expresada como mg/1000ml :

$$C_{ti} = \frac{(A_{292} - a)}{b} \cdot \frac{1000}{1000} + \text{Auxiliar}$$

donde:

- C_{ti} = Concentración de clorhidrato de propranolol a tiempo t_i
 A_{292} = Absorbancia a 292 nm de cada alícuota muestreada a los distintos tiempos
 a = ordenada al origen de la curva de calibración
 b = pendiente de la curva de calibración
 1000 = conversión de μg a mg
 1000 = volumen total del medio de disolución
 Auxiliar = corrección por cada alícuota de 5 ml muestreada, siendo:
 $\text{Auxiliar} = (\mu\text{g}/5 \text{ ml})_{ti} + (\mu\text{g}/5 \text{ ml})_{t(i-1)}$

Un modelo de la hoja de cálculo para obtener la concentración de clorhidrato de propranolol disuelta a cada tiempo, en el ensayo de disolución *in vitro*, aparece en la **Tabla 35**, siendo el correspondiente a la partida de comprimidos PUPM. De igual manera se procedió para el resto de los comprimidos.

5.5. Cálculo del porcentaje del valor declarado de clorhidrato de propranolol disuelto a cada tiempo en el ensayo de disolución:

$$C_{ti} \% = \frac{(A_{292} - a)}{b} \cdot \frac{1000}{1000} + \text{Auxiliar} \cdot \frac{100}{C_{\infty}}$$

donde:

C_{∞} = Concentración declarada de clorhidrato de propranolol

Con los porcentajes de clorhidrato de propranolol disuelto a cada tiempo se trazaron los perfiles de disolución, para cada partida de los comprimidos ensayados, los cuales aparecen en las **Figuras 48 y 49**.

5.6. Determinación del orden cinético con que se disuelve el clorhidrato de propranolol, calculado mediante la obtención de los coeficientes de correlación de las relaciones Cantidad de clorhidrato de propranolol disuelta en función del tiempo, es decir: C_t vs. t (orden cero), y del logaritmo de la cantidad no disuelta de clorhidrato de propranolol en función del tiempo, es decir: $\lg(1 - (C_t/C_{\infty}))$ vs. t ; donde C_t es la concentración de clorhidrato de propranolol a tiempo t , expresada en mg/1000 ml y C_{∞} es la concentración declarada de clorhidrato de propranolol, expresada en mg/1000 ml, (primer orden).

TABLA 35

Tiempo	A 292	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/5ml}$	Auxiliar	mg/1000ml	%
Comprim.1						
5	0,199	9,965	49,827	49,827	9,97	23,45
10	0,457	23,321	116,607	166,434	23,37	54,99
20	0,773	39,680	198,400	364,834	39,85	93,76
30	0,819	42,061	210,307	575,141	42,43	99,83
40	0,821	42,165	210,825	785,966	42,74	100,56
50	0,819	42,061	210,307	996,273	42,85	100,82
60	0,816	41,906	209,530	1205,803	42,90	100,95
Comprim.2						
5	0,245	12,347	61,733	61,733	12,35	29,05
10	0,492	25,133	125,667	187,400	25,20	59,28
20	0,766	39,318	196,588	383,988	39,51	92,95
30	0,812	41,699	208,495	592,483	42,08	99,02
40	0,817	41,958	209,789	802,273	42,55	100,12
50	0,813	41,751	208,754	1011,027	42,55	100,12
60	0,809	41,544	207,719	1218,745	42,55	100,13
Comprim.3						
5	0,243	12,243	61,216	61,216	12,24	28,81
10	0,523	26,738	133,691	194,906	26,80	63,06
20	0,763	39,162	195,812	390,718	39,36	92,61
30	0,807	41,440	207,201	597,919	41,83	98,43
40	0,813	41,751	208,754	806,673	42,35	99,64
50	0,806	41,388	206,942	1013,615	42,20	99,28
60	0,805	41,337	206,683	1220,298	42,35	99,65
Comprim.4						
5	0,245	12,347	61,733	61,733	12,35	29,05
10	0,556	28,446	142,232	203,965	28,51	67,08
20	0,776	39,835	199,177	403,142	40,04	94,21
30	0,809	41,544	207,719	610,861	41,95	98,70
40	0,819	42,061	210,307	821,168	42,67	100,41
50	0,814	41,803	209,013	1030,181	42,62	100,29
60	0,809	41,544	207,719	1237,899	42,57	100,17
Comprim.5						
5	0,291	14,728	73,640	73,640	14,73	34,65
10	0,585	29,948	149,739	223,378	30,02	70,64
20	0,779	39,991	199,953	423,332	40,21	94,62
30	0,8	41,078	205,389	628,721	41,50	97,65
40	0,8	41,078	205,389	834,110	41,71	98,13
50	0,802	41,181	205,907	1040,017	42,02	98,86
60	0,799	41,026	205,130	1245,147	42,07	98,98
Comprim.6						
5	0,288	14,573	72,863	72,863	14,57	34,29
10	0,556	28,446	142,232	215,096	28,52	67,10
20	0,782	40,146	200,730	415,825	40,36	94,97
30	0,814	41,803	209,013	624,838	42,22	99,34
40	0,824	42,320	211,601	836,439	42,95	101,05
50	0,81	41,595	207,977	1044,417	42,43	99,84
60	0,81	41,595	207,977	1252,394	42,64	100,33

TABLA 35. Concentraciones de Clorhidrato de Propranolol disueltos a cada tiempo, para seis comprimidos de PUPM, conteniendo 42,5 mg de Clorhidrato de Propranolol

FIGURA 48

Perfiles de disolución de los comprimidos de Clorhidrato de Propranolol
PUPM, Laboratorios A, B y C

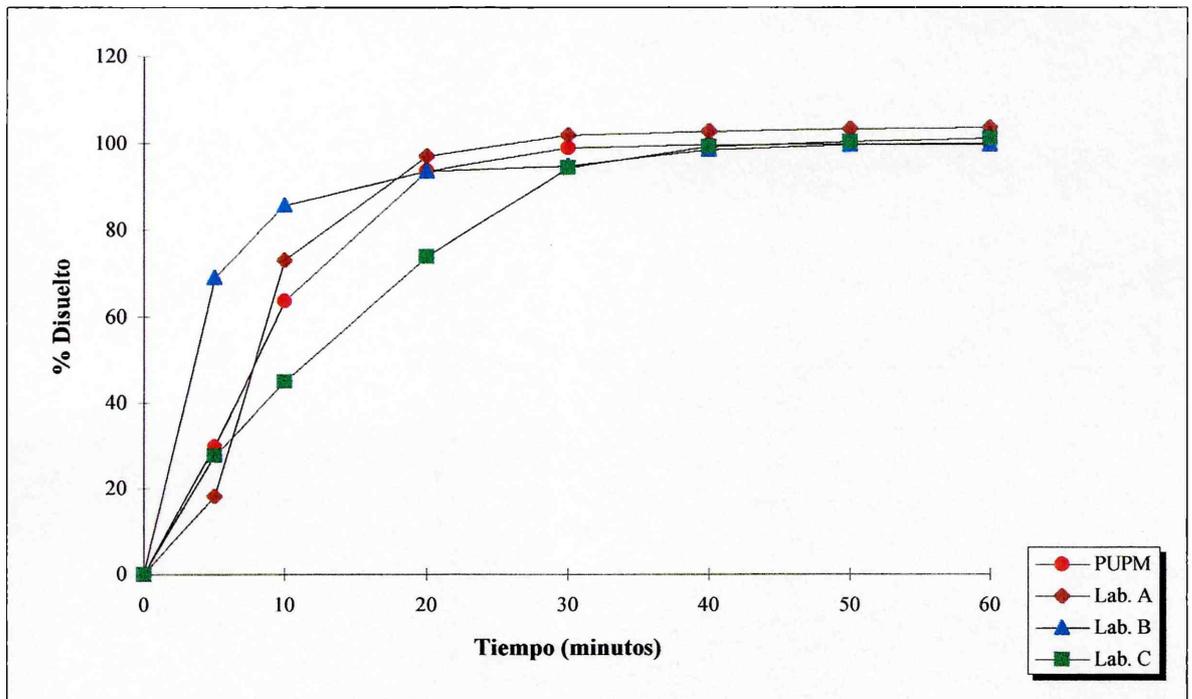
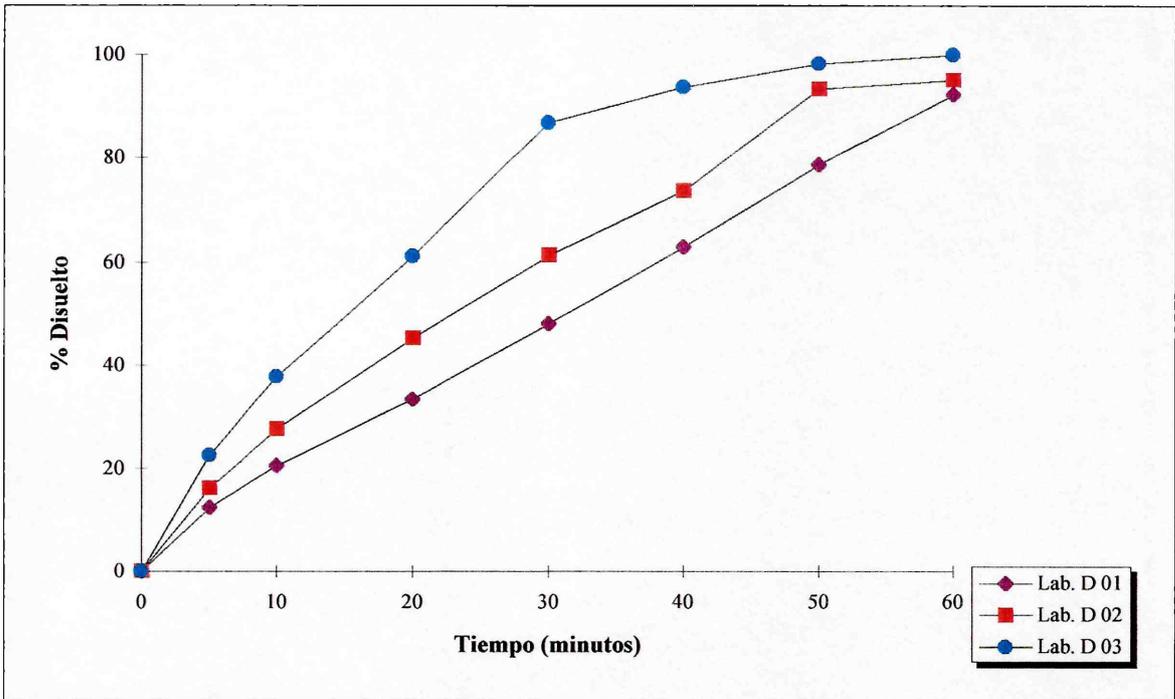


FIGURA 49
 Perfiles de disolución de los comprimidos de Clorhidrato de Propranolol
 Laboratorios D 01, D 02 y D 03



5.7. Determinación de la constante de disolución (**kd**) del clorhidrato de propranolol y del tiempo en el que se disuelve el 50% de la droga (**t_{50%}**) a partir de conocer la cinética con que se disuelve el clorhidrato de propranolol, según las siguientes ecuaciones:

Para orden cero: $kd = \frac{Ct}{t}$

$$t_{50\%} = \frac{C_{\infty}}{2kd}$$

Para primer orden: $kd = -\lg\left[1 - \left(\frac{Ct}{C_{\infty}}\right)\right] \cdot \frac{2.303}{t}$

$$t_{50\%} = \frac{0.693}{kd}$$

Todos los comprimidos ensayados conteniendo clorhidrato de propranolol, se disolvieron con una cinética de primer orden, excepto las partidas 01 y 02 del Laboratorio D que siguieron una cinética de orden cero. En las **Figuras 50 y 51** se grafica el logaritmo de la cantidad no disuelta de clorhidrato de propranolol en función del tiempo, para las partidas que siguen una cinética de primer orden y en la **Figura 52** la cantidad no disuelta en función del tiempo, para las que siguen una cinética de orden cero. Con las pendientes de las rectas obtenidas se han estimado las respectivas constantes de disolución (kd).

Los valores de kd y de t_{50%}, calculados para todos los comprimidos ensayados, se encuentran tabulados en la **Tabla 36**.

5.8. Determinación de la cantidad disuelta de clorhidrato de propranolol a los 30 minutos, que de acuerdo con la normativa de USP 23 no debe ser inferior al 75% de la cantidad total (**Q₃₀**), calculada mediante la ecuación:

$$Q_{30} = \frac{(A_{30} - a)}{b} \cdot \frac{1000}{1000} + Auxiliar \cdot \frac{100}{C_{\infty}}$$

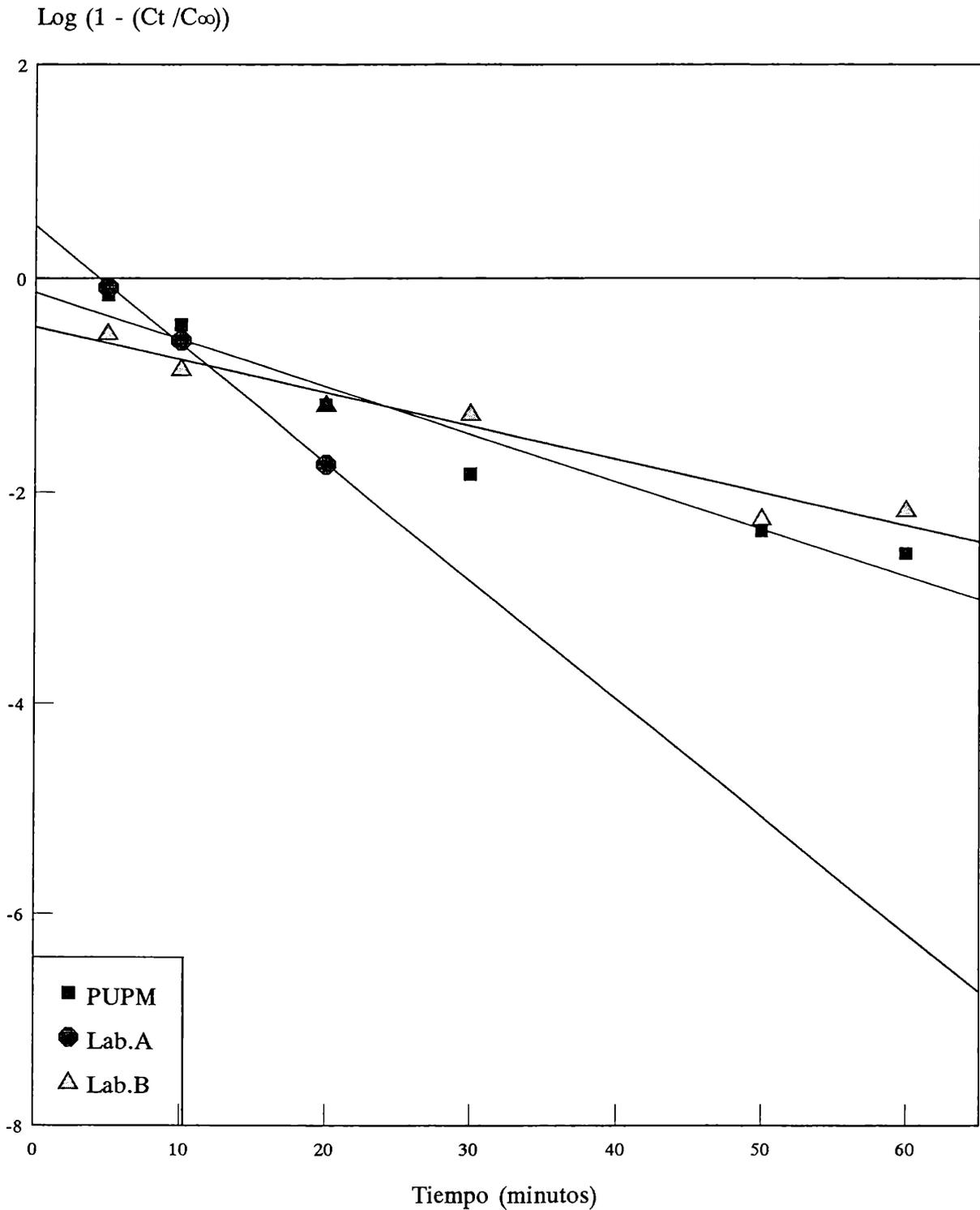
donde:

A_{30} = Absorbancia a 292 nm de la alícuota correspondiente a los 30 minutos.

Los valores de Q₃₀ obtenidos figuran en la **Tabla 36**.

FIGURA 50

Logaritmo cantidad no disuelta de propranolol en función del tiempo
Comprimidos PUPM, Laboratorios A y B



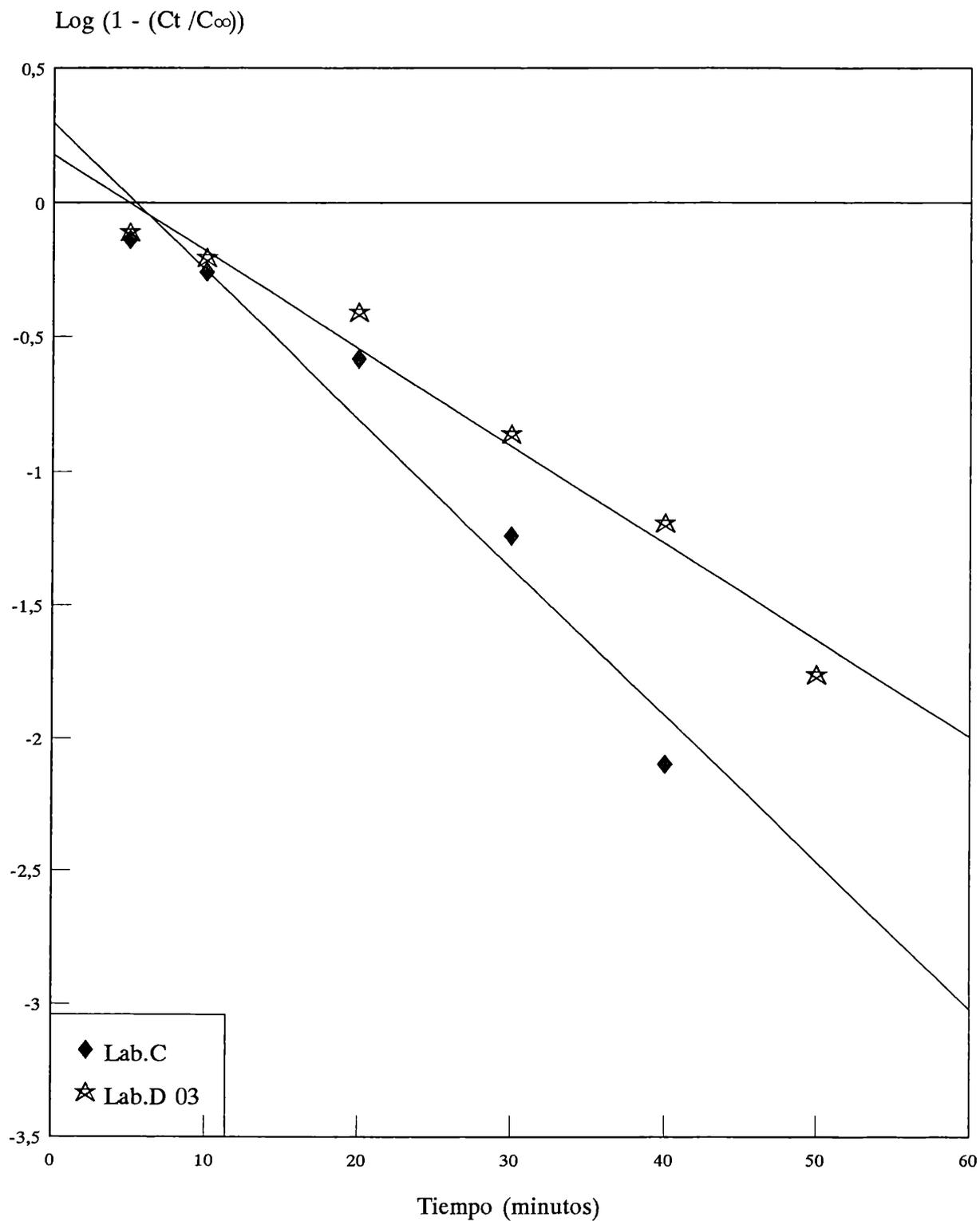
PUPM: a = -0,1329 b = -0,0444 r = 0,9728

Lab.A: a = 0,4905 b = -0,1112 r = 0,9994

Lab.B: a = -0,4582 b = -0,0311 r = 0,9761

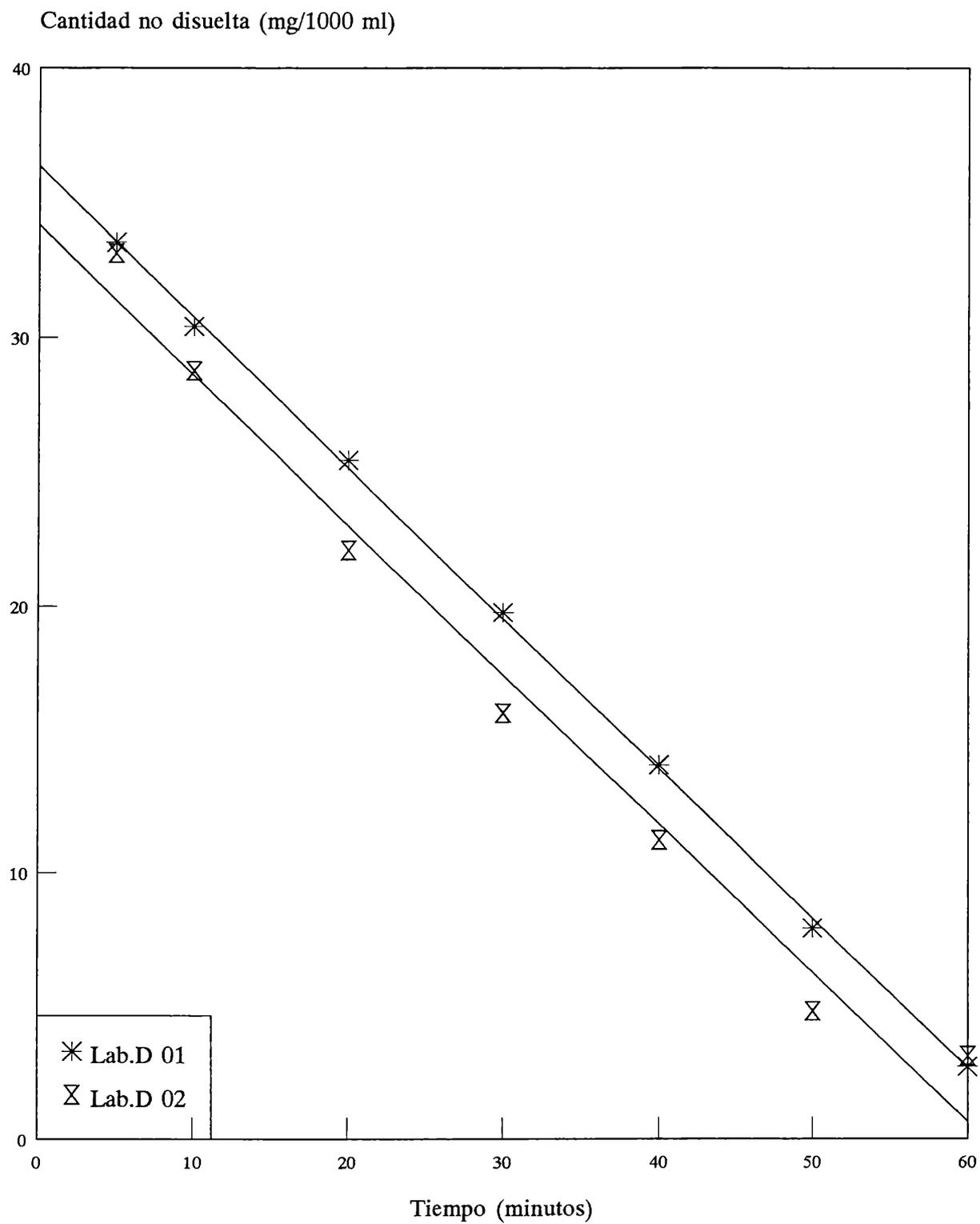
FIGURA 51

Logaritmo cantidad no disuelta de propranolol en función del tiempo
 Comprimidos Laboratorios C y D 03



Lab. C: a = 0,2982 b = -0,0553 r = 0,9759
 Lab. D 03: a = 0,1786 b = -0,0362 r = 0,9864

FIGURA 52
Cantidad no disuelta de propranolol en función del tiempo
Comprimidos Laboratorio D 01 y D 02



Lab.D 01: $a = 36,36$ $b = -0,5617$ $r = 0,9997$

Lab.D 02: $a = 34,17$ $b = -0,5588$ $r = 0,9909$

5.9. Determinación del porcentaje total de clorhidrato de propranolol disuelto al término de la experiencia, es decir, 60 minutos. (**Fd%**), calculado mediante la ecuación:

$$Fd\% = \frac{(A_{60} - a)}{b} \cdot \frac{1000}{1000} + Auxiliar \cdot \frac{100}{C_{\infty}}$$

donde:

A_{60} = Absorbancia a 292 nm de la alícuota correspondiente a los 60 minutos.

Los porcentajes totales disueltos al cabo de los 60 minutos de cada ensayo de disolución (**Fd%**) figuran en la **Tabla 36**.

5.10. Determinación de la Eficiencia de Disolución (**ED%**), calculada mediante la siguiente expresión:

$$ED\% = \frac{ABC}{t \cdot Q_{100}} \cdot 100$$

donde:

ABC = Área bajo la curva de disolución

Q_{100} = Cantidad correspondiente al 100% de clorhidrato de propranolol disuelto

t = Tiempo máximo elegido para el cálculo del ABC, en nuestro caso 60 minutos.

5.10.1. Cálculo del ABC mediante el método de los trapezoides el cual consiste en dividir la curva en tantos trapezoides como datos de cantidad disuelta de droga se dispongan, determinar el área de cada trapecio y luego sumarlos.

$$AreaTrapezio = \sum \frac{C_i + C_{(i+1)}}{2} \cdot (t_{(i+1)} - t_i)$$

donde:

C_i = Concentración disuelta a cualquier tiempo t_i

$C_{(i+1)}$ = Concentración disuelta al tiempo siguiente $t_{(i+1)}$

La **ED%** para cada partida de comprimidos figuran en la **Tabla 36**.

5.11. Cálculo del Tiempo Medio de Disolución (**MDT**) mediante la siguiente ecuación:

$$MDT = \frac{\int_0^{60} t \cdot \frac{dC}{dt}}{\int_0^{60} \frac{dC}{dt}}$$

Los valores de **MDT** para cada partida de comprimidos figuran en la **Tabla 36**.

TABLA 36

Comprimidos	kd	t 50%	Q30 ± Sm	Fd% ± Sm	ED% ± Sm	MDT ± Sm
PUPM	0,102	6,77	98,83 ± 0,31	100,03 ± 0,27	83,98 ± 0,62	34,42 ± 0,15
Lab. A	0,256	2,71	101,78 ± 0,48	103,61 ± 0,37	86,75 ± 0,77	34,54 ± 0,27
Lab. B	0,072	9,68	94,80 ± 1,77	99,57 ± 1,55	89,18 ± 0,96	32,58 ± 0,16
Lab. C	0,127	5,44	94,27 ± 1,98	101,08 ± 0,65	77,23 ± 1,69	35,99 ± 0,37
Lab. D 01	0,562*	34,12	48,12 ± 0,93	92,24 ± 1,45	48,50 ± 0,62	39,57 ± 0,29
Lab. D 02	0,559*	35,1	61,28 ± 1,55	95,06 ± 2,72	59,17 ± 1,05	38,22 ± 0,21
Lab. D 03	0,083	8,31	86,79 ± 3,81	100,18 ± 0,70	71,04 ± 2,69	36,99 ± 0,55

TABLA 36. Parámetros de disolución calculados para los comprimidos de clorhidrato de propranolol analizados.

La kd está expresada en 1/minutos

* kd expresada en (mg/litro)/minutos

El t 50% está expresado en minutos

El MDT está expresado en minutos

Sm : Desviación típica de la media para n = 6

5.12. Aplicación de un ANOVA con los valores medios de ED% entre los comprimidos elaborados en la UPM y los de los distintos Laboratorios del mercado, con el objeto de analizar si existen diferencias significativas entre las distintas formulaciones (*Sokal y Rohlf, 1984*).

Aplicación del método de comparación múltiple de la Mínima Diferencia Significativa (LSD), basado en la prueba t de Student, a fin de establecer cuales son los valores medios de ED% que difieren entre sí. (*Cid Cárcamo, 1982*)

En la **Tabla 37** se detalla el ANOVA realizado con los valores de ED% de todos los comprimidos analizados y en la **Tabla 38**, el resultado del Test de la Mínima Diferencia Significativa (LSD).

TABLA 37

Origen de la Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	F
Entre laboratorios	8187,003	6	1364,5	94,79
Error	475,031	33	14,395	
Total	8662,034	39	1378,89	

TABLA 37. Resultado del análisis de varianza realizado con los valores medios de ED% de todos los comprimidos de clorhidrato de propranolol
 $F_{0,05}(6,33) = 2,39$

TABLA 38

		Lab.B	Lab.A	PUPM	Lab.C	Lab.D 03	Lab.D 02	Lab.D 01
	ED%	89,18	86,75	83,98	77,23	71,04	59,17	48,5
Lab.D 01	48,5	40,68	38,25	35,48	28,73	22,54	10,67	0
Lab.D 02	59,17	30,01	27,58	24,81	17,53	11,87	0	
Lab.D 03	71,04	18,14	15,71	12,94	6,19	0		
Lab.C	77,23	11,95	9,52	6,75	0			
PUPM	83,98	5,2	2,77	0				
Lab.A	86,75	2,43	0					
Lab.B	89,18	0						

TABLA 38. Aplicación del método de comparación múltiple basado en la Mínima Diferencia Significativa (LSD), utilizando los valores medios de ED% de los comprimidos de clorhidrato de propranolol
(LSD) 0.05, 33 = 4.66

DISCUSSION

DISCUSION

5. CONTROL BIOFARMACEUTICO DE COMPRIMIDOS DE CLORHIDRATO DE PROPRANOLOL. ENSAYOS *IN VITRO*.

El clorhidrato de propranolol es un agente bloqueante β -adrenérgico no selectivo, utilizado en el tratamiento de la hipertensión, arritmias cardíacas, angina de pecho y en la profilaxis del infarto secundario agudo de miocardio. (Mcevoy, 1992; Roscoe et al., 1982)

Cuando se administra como forma farmacéutica sólida oral, primero ocurre la disolución del fármaco en los fluidos gastrointestinales y luego su transferencia a través de las membranas biológicas, para distribuirse posteriormente mediante la circulación general hacia el sitio de acción.

El clorhidrato de propranolol sufre un efecto del primer paso a través del hígado que provoca una extracción hepática importante, por ello es necesario, como primera medida, asegurarnos que la formulación libere adecuadamente este principio activo al medio biológico.

En este punto del trabajo se han presentado los resultados obtenidos al analizar la calidad biofarmacéutica *in vitro* de una partida de comprimidos de clorhidrato de propranolol, desarrollada y elaborada en la Unidad de Producción de Medicamentos, comparándola con cuatro especialidades de circulación actual en el mercado farmacéutico argentino, controlando una serie de parámetros que hacen a la calidad de las mismas, con el objeto de comprobar si son equivalentes entre sí y por los tanto si pueden ser intercambiables en una prescripción.

Para realizar el seguimiento de la disolución de propranolol en función del tiempo, y para determinar el contenido de principio activo en las distintas formulaciones ensayadas, se optimizó un método de absorción al UV, a 292 nm, cuya validación, respecto a linealidad, se puede observar en las **Figuras 45, 46 y 47**.

Los comprimidos elaborados en la UPM (PUPM) presentaron resultados satisfactorios tanto en lo que se refiere a su contenido, (**Tabla 33**) uniformidad de contenido, dureza, friabilidad y desintegración (**Tabla 34**), como a su comportamiento frente al ensayo de disolución (**Tabla 36 y Figura 48**). Con valores de $t_{50\%}$ y Q_{30} correctos, ED% del orden de 84%, similar a la de los laboratorios A y B, de mejor comportamiento que el resto, con MDT también muy semejante, 34 minutos. Podemos, de esta manera, afirmar que cumplen con el control biofarmacéutico realizado.

De las partidas del mercado ensayadas, la correspondiente al Laboratorio D₀₁, presentó características de disolución muy pobres, no cumpliendo con las exigencias de USP 23, respecto a la cantidad disuelta a los 30 minutos, solamente alcanzó un 48%, mientras que lo recomendado es de 75%, incluso los comprimidos se disolvieron de acuerdo a una cinética de orden cero, probablemente por la poca cantidad de droga disuelta en un gran volumen de medio de disolución (1000 ml). Similar comportamiento presentó otra partida del mismo Laboratorio, la D₀₂, con un Q₃₀ de 61,28%, una ED% muy baja, del orden del 60%, lo cual se correlaciona con los resultados elevados de tiempo de disgregación y de MDT, mucho más altos que el del resto de las partidas. Al analizar una tercera partida del mismo laboratorio, la D₀₃, mejoraron todos los parámetros de disolución. Este comportamiento nos indica la importancia de realizar un control biofarmacéutico interlotes para asegurar características de liberación del principio activo, uniformes y óptimas. Los restantes comprimidos comerciales ensayados cumplieron con las especificaciones normatizadas.

Se realizó un análisis de varianza con los valores medios de ED% de todos los comprimidos ensayados, observándose diferencia significativas ($p < 0.05$) entre los mismos. (**Tabla 37**)

Se completó este análisis aplicando el método de comparación múltiple de la mínima diferencia significativa (LSD) cuyos resultados aparecen en la **Tabla 38**.

El análisis de los mismos demuestra que entre los comprimidos correspondientes a la UPM (PUPM) y al Laboratorio A, no existen diferencias significativas, lo que nos indicaría equivalencia farmacéutica entre los mismos. Tampoco existen diferencias significativas entre los comprimidos de los Laboratorios A y B, en cambio los comprimidos de los Laboratorios C, D₀₁, D₀₂ y D₀₃ no son equivalentes con ninguno de los demás lotes ensayados.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Como conclusiones generales, luego de analizar los resultados encontrados en este trabajo, podemos afirmar, que:

- ⇒ Los estudios de disolución *in vitro* son importantes y sumamente valiosos en la etapa de preformulación de una forma farmacéutica sólida de administración oral, pues nos permiten predecir su comportamiento *in vivo* con alta probabilidad, a la vez que son útiles para optimizar la formulación.
- ⇒ El control biofarmacéutico interlotes de genéricos formulados como comprimidos, es necesario para asegurar características de liberación del principio activo en el medio biológico, uniformes y óptimas.
- ⇒ Con un buen diseño del protocolo de un estudio de biodisponibilidad, ha sido posible correlacionar cualitativamente el ensayo de disolución *in vitro*, con el estudio *in vivo*, de los comprimidos ensayados.

Como conclusiones particulares respecto a los principios activos, formulados como comprimidos, que han sido evaluados en este trabajo, podemos afirmar, que:

- ⇒ La velocidad de disolución del **Paracetamol**, desde comprimidos en los cuales el aglutinante, polivinilpirrolidona, ha sido incorporado como solución etanólica al 4%, es mayor que cuando el mismo se adiciona en conjunto con el resto de los excipientes. Postulamos que este comportamiento es debido a que se acelera la formación de complejos entre el paracetamol y el aglutinante hidrofílico utilizado, cuya velocidad de disolución es mayor que la droga libre.
- ⇒ La disminución del porcentaje de almidón, utilizado como disgregante, en la formulación de comprimidos de **Paracetamol**, de un 13% a un 6%, disminuye la velocidad de disolución y por ende de liberación del principio activo al medio de disolución.

- ⇒ La biodisponibilidad de los comprimidos de **Paracetamol** puede evaluarse a partir de los niveles salivales y de la excreción urinaria del principio activo. Los resultados encontrados *in vitro* se correlacionaron con los hallados *in vivo*.
- ⇒ La biodisponibilidad de los comprimidos de **Metoclopramida** puede evaluarse a partir de los niveles de excreción urinaria. Los resultados encontrados *in vitro* se correlacionaron con los hallados *in vivo*. Las formulaciones ensayadas, una de las cuales es un genérico elaborado por la Unidad de Producción de Medicamentos de la UNLP, y la otra una formulación del mercado, de amplia utilización, pueden ser consideradas bioequivalentes, es decir, intercambiables en una prescripción.
- ⇒ Comprimidos de **Ampicilina** elaborados por vía seca, método de doble compresión utilizando excipientes modificados, del tipo del Avicel y el Aerosil, se disuelven más rápidamente que cuando se elaboran por vía húmeda y por lo tanto dejan disponible para su absorción al principio activo, con mayor rapidez. Este comportamiento es debido a que la compresión directa optimiza la desintegración y cada partícula primaria del principio activo, es liberada desde el comprimido, estando más disponible a la disolución.
- ⇒ La desintegración extragranular de comprimidos de **Clortalidona** mejoró considerablemente las características de disolución que ofrecían los mismos comprimidos pero con una desintegración intragranular. Este tipo de desintegración se logró incorporando parte del desintegrante utilizado, el almidón, combinado con el lubricante, estearato de magnesio. De esta manera se neutralizó el efecto hidrofóbico del lubricante, facilitándose la humectación del gránulo, ya que el almidón muestra una gran afinidad por el agua a través de una acción capilar y mejorando la disolución del principio activo, que de por sí es poco soluble.
- ⇒ El control biofarmacéutico realizado a una partida de comprimidos de **Propranolol**, elaborada en la Unidad de Producción de Medicamentos, de la UNLP, comparándola con las especialidades de circulación en el mercado farmacéutico argentino, que contienen este principio activo, resultó satisfactorio. Se pudo comprobar la falta de reproducibilidad en la disolución de distintos lotes de una especialidad, de un mismo laboratorio productor, lo cual nos está indicando la importancia del control de disolución *in vitro*, en la evaluación de la calidad biofarmacéutica de las formas farmacéuticas.
- ⇒ En estos tres últimos estudios no se llevaron a cabo los ensayos *in vivo* dado que no hemos tenido suficiente tiempo, pero los mismos ya están diagramados y pronto a iniciarse las primeras experiencias tendientes a analizar su comportamiento en saliva.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

Aarons L. (1987) *J. Pharm. Sci.* **76**: 853-855.

Academy of Pharmaceutical Sciences, A.Ph.A. (1972) *Guidelines for Biopharmaceutical Studies in Man*, Washington DC, Appendix I, p.17.

Aiache J. M., Devisaguett J. P., Guijot-Hermann A. M. (1983) En: *Biofarmacia*, Ed. Manual Moderno, México, D.F., pp. 86-126.

Aiache J. M., Aiache S., Renoux R. (1986) *Boll. Chim. Farmaceutico* **125**: 130-137.

Aiache J. M., Pierre N., Beyssac E., Prasad V. K., Skelly J. P. (1989) *J. Pharm. Sci.* **78**: 261-263.

Aiache J. M., Beyssac E. (1990) *S.T.P. Pharma* **6**: 678-685.

Albónico S. M. (1976) *SAFYBI* **16**: 1064-1079.

Allonen H., Iisalo E., Kangas L., Lammintausta R., Salonen M. (1978) *Int. J. Clin. Pharmacol.* **16**: 420-423.

Ameer B., Divoll M., Abernethy D. R., Greenblatt D. J., Shargel L. (1983) *J. Pharm. Sci.* **72**: 955-958.

Arancibia A. (1981) *A.U.F.Y.B.I.* **14**: 10-25.

Arancibia A., Mella F., Selman J., Gai M. N. (1990) *An. Real Acad. Farm.* **56**: 333-346.

Arancibia A. (1992) En: *Biodisponibilidad de medicamentos - Simposio Internacional I*. Eds. Arancibia A. y Pezoa R. Universidad de Chile. Santiago de Chile. pp.25-51.

Arancibia A. (1993) En: *Biodisponibilidad de medicamentos - Simposio Internacional II*. Eds. Arancibia A., Gai M. N. y Mella F. Universidad de Chile. Santiago de Chile. pp.21-38

Augsburger L. L., Shangraw R. F. (1966) *J. Pharm. Sci.* **55**: 418-420.

Ayres J. W. (1980) *Amer. J. Hosp. Pharm.* **37**: 1329-1332.

Ayres J. W., Huang H.P., Albert K. (1984) *J. Pharm. Sci.* **73**: 1629-1634.

- Badawi A. A., El-Sayed A. A. (1980) *J. Pharm. Sci.* **69**: 492-497.
- Bateman D. N., Kahn C., Mashiter K., Davies D. S. (1978) *Br. J. Clin. Pharmacol.* **6**: 401-407.
- Benzina C., Gonthier Y., Jeannin C., Vérain A. (1983) *Expo-Congr. Int. Technol. Pharm.* 3rd. 5: 115-125.
- Birkett D. F. (1991) *Australian Prescriber* **14**: 14-16.
- Blume H. H., Scheidel B., Siewert M. (1993) En: *Bio-International Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics*. Eds. Midha K. K., Blume H. H., Stuttgart, Alemania, pp. 37-52.
- Bremer P. O., Kolstad B., Finholt P. (1969) *Medd. Norsk. Farm. Selsk.* **31**: 67-70.
- Brockmeier D., von Hattingberg H. M. (1982) *Arzneim.-Forsch.* **32**: 248-251.
- Brockmeier D., Voegelé D., von Hattingberg H. M. (1983) *Arzneim.-Forsch.* **33**: 598-601.
- Brockmeier D. (1984) *Arzneim.-Forsch.* **34**: 1604-1607.
- Brockmeier D., Dengler H. J., Voegelé D. (1985) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **28**: 291-300.
- Brockmeier D. (1986) *Acta Pharm. Technol.* **32**: 164-174.
- Cabana B. E. (1983) *J. Pharm. Sci.* **72**: 98-99.
- Cadórñiga Carro R., Negro Alvarez M. S., Molina Martínez J. (1989) *Pharmaklinik* **3**: 43-53.
- Cadórñiga Carro R. (1990) *SAFYBI*, **30**: 2939-2959.
- Cadórñiga Carro R. (1992) En: *Biodisponibilidad de medicamentos - Simposio Internacional I*. Eds. Arancibia A. y Pezoa R. Universidad de Chile. Santiago de Chile. pp.71-87.
- Cadórñiga Carro R. (1992) En: *Biodisponibilidad de medicamentos - Simposio Internacional I*. Eds. Arancibia A. y Pezoa R. Universidad de Chile. Santiago de Chile. pp.283-296.
- Caramella C., Ferrari F., Bonferoni M. C., Gazzaniga A., Sangalli M. E., Conte U. (1989) *Boll. Chim. Farmaceutico* **128**: 310-314.
- Caramella C., Ferrari F., Bonferoni M. C., Sangalli M. E., De Bernardi Di Valserra M., Feletti F., Galmozzi M. R. (1993) *Biopharm. Drug Disp.* **14**: 143-160.

- Carli F., Ceriani D., Frattini C., Gorlato P., Maffione G., Moro L., Neri G., Ciranni Signoretti E. (1982) *Ann.Ist. Super. Sanità* **18**: 551-558.
- Cid Cárcamo E. (1981) En: *Cinética de disolución de medicamentos*. Ed. Secretaría General de la OEA. Washington DC. pp. 1-9.
- Cid Cárcamo E. (1982) En: *Introducción a la Farmacocinética*. Ed. Secretaría General de la OEA. Washington DC. pp. 77-95.
- Cid Cárcamo E. (1987) *SAFYBI*, **27**: 2361-2366.
- Clench E. (1985) En: *Topics in Pharmaceutical Sciences*. Eds. Breimer D. D. and Speiser P. Elsevier Sciences Publishers. pp. 167-178.
- Colombo P., Caramella C., Conte U., Gazzaniga A., La Manna A., Geddo M. (1985) *Acta Pharm. Technol.* **31**: 63-66.
- Cooper J. (1981) *SAFYBI*, **21**: 1544-1554.
- Chen M-L., Pelsor F. R. (1991) *J. Pharm. Sci.* **80**: 406-408.
- Chowhan Z. T. (1980) *J. Pharm. Sci.* **69**: 1-4.
- Chowhan Z. T., Chatterjee B. (1984) *Int. J. Pharm. Tech. & Prod. Mfr.* **5**: 6-12.
- Chowhan Z. T., Chi L. H. (1986) *J. Pharm. Sci.* **75**: 542-545.
- Chung B-H., Shim Ch-K. (1987) *J. Pharm. Sci.* **76**: 784-787.
- Dean R. B., Dixon W. J. (1951) *Anal. Chem.* **23**: 636-638.
- Dollery C. (1991) En: *Therapeutics drugs*. Ed. Churchill Livingstone, Madrid, España. pp. 148-152.
- Du Souich P., Caillé G., Perreault S. (1992) En: *Biodisponibilidad de medicamentos - Simposio Internacional I*. Eds. Arancibia A. y Pezoa R. Universidad de Chile. Santiago de Chile. pp.53-69.
- El-Yazigi A. (1981) *J. Pharm. Sci.* **70**: 535-537.
- Enezian E. E. (1972) *Pharm. Acta Helv.* **47**: 321-323.
- Fagiolino P., Galante G., Cousillas A., Vila P., Stareczek S., Vivero E., Lois G., Prandi C. (1988) *Rev. A.E.F.H.* **12**: 51-57.
- Fagiolino P. (1990) *Acta Farm. Bonaerense* **9**: 3-13.

- Fagiolino P., (1993) *Rev. Farm. Sudamericana*, 1: 35-39.
- Fagiolino P., Vázquez M. (1993) *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. Special Issue 3*: 164-168. Proceedings of the 5th Eur. Congr. Biopharm. Pharmacokinet. Brussels, Belgium (1993).
- Fagiolino P. (1994) *SAFYBI*, 34: 20-34.
- Fagiolino P., Turlier M., Paysseé H., Aiache J. M. (1994) *Acta Farm. Bonaerense* 13: 181-192.
- Fagiolino P., Vazquez M., Aiache J. M., Modamio P., Mariño E. L. (1996) Comunicación personal.
- Finholt P. (1974) En: *Dissolution Technology*, Eds. Leeson L. J., Carstensen J. T. The Industrial Pharmaceutical Technology Section of the Academy of Pharmaceutical Science, N.Y., Washington DC. pp. 106-146.
- Fluehler H., Grieve A. P., Mandallaz D., Mau J., Moser H. A. (1983) *J. Pharm. Sci.* 72: 1178-1181.
- González M., Retaco P., Pizzorno M. T., Volonté M. G. (1995) *Boll. Chim. Farmaceutico*. 134: 448-453.
- Goodman Gilman A., Goodman L. S., Rall T. W., Murad F. (1990) En: *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. pp. 901-903.
- Gorodischer R., Koren G. (1992) *Dev. Pharmacol. Ther.* 19: 161-177.
- Gorodischer R., Burtin P., Hwang P., Levine M., Koren G. (1994) *Ther. Drug Monit.* 16: 437-443.
- Haile M. M., Pizzorno M. T., Volonté M. G. (1992) *Acta Farm. Bonaerense* 11: 63-72.
- Hamaguchi T., Shinkuma D., Yamanaka Y., Mizuno N. (1986) *J. Pharm. Sci.* 75: 891-893.
- Handbook of Pharmaceutical Excipients (1983) American Association and the Pharmaceutical Society of Great Britain, Washington D.C. pp53 y 253.
- Hassanzadeh M. K. (1991) *Drug Dev. Ind. Pharm.* 17: 1795-1810.
- Hekimoglu S., Ayanoglu-Dülger G., Hincal A. A. (1987) *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.* 25: 93-96.

- Hoppu K., Tuomisto J., Koskimies O., Simell O. (1987) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **32**: 427-429.
- Ibrahim S. A., Shawky S. (1983) *Expo.-Congr. Int. Technol. Pharm. 3rd.* **5**: 134-143.
- Iranloye T. A., Parrott E. L. (1978) *J. Pharm. Sci.* **67**: 535-539.
- Ismail S., El-Zaher A.A. (1986) *J. Pharm. Belg.* **41**: 308-313.
- Itiola O. A., Pilpel N. (1986) *J. Pharm. Pharmacol.* **38**: 81-86.
- Jaminet F., Delattre L., Delporte J. P. (1969) *Pharm. Acta Helv.* **44**: 418-432.
- Johansen H. (1984) *Arch. Pharm. Chem., Sci. Ed.* **12**: 71-78.
- Jürgensen Eide G. (1973) *Acta Pharm. Suec.* **10**: 229-246.
- Kaneniwa N., Watari N. (1974) *Chem. Pharm. Bull.* **22**: 1699-1705.
- Karr J. Y., Shiromani P. K., Bavitz J. F. (1990) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **16**: 821-835.
- Khalil S. A. H., Barakat N. S., Boraie N. A. (1991) *S.T.P. Pharma Sci.* **1**: 189-194.
- Khan K. A. (1975) *J. Pharm. Pharmac.* **27**: 48-49
- Khoo K-Ch., Gibaldi M., Brazzell R. K. (1985) *J. Pharm. Sci.* **74**: 1340-1342.
- Kuu W. Y., Prisco M. R., Wood R. W., Roseman T. J. (1989) *Int. J. Pharm.* **55**: 77-89.
- Langenbucher F. (1974) *Pharm. Acta Helv.* **49**: 187-192.
- Lefebvre C., Barthelemy C., Robert H., Guyot-Hermann A. M. (1987) *Proc.-Eur. Congr. Biopharm. Pharmacokinet., 3rd.* **1**: 40-49.
- Lerk C. F., Bolhuis G. K., de Boer A. H. (1979) *J. Pharm. Sci.* **68**: 205-207.
- Levy G., Ellis E., Koysooko R. (1994) *Pediatrics* **53**: 873-876.
- Lin S. Y., Kao Y. H., Chang H. N. (1990) *J. Pharm. Sci.* **79**: 326-330.
- Lipman E. C., Summers M. P. (1980) *J. Pharm. Pharmacol.* **32**, Suppl.: 21P.
- Locniskar A., Greenblatt D. J., Harmatz J. S., Shader R. I. (1989) *Biopharm Drug Disp.* **10**: 597-605.
- Loo J. C. K., Riegelman S. (1968) *J. Pharm. Sci.* **57**: 918-928.

- Manudhane K. S., Avinash M. C., Hyo-Y-Kim, Shangraw R. F. (1969) *J. Pharm. Sci.* **58**: 616-619.
- Marín Boscá M. T., Sánchez Morcillo J., Cerezo Galán A. (1989) *Rev. S.E.F.H.* **3**: 199-204.
- Markiewick, Semenowicz (1985) En: *Topics in Pharmaceutical Sciences*. Eds. Breimer D. D. and Speiser P. Elsevier Sciences Publishers. pp. 167-178.
- Maturu P. K., Prasad V- K., Worsley W. N., Shiu G. K., Skelly J. P. (1986) *J. Pharm. Sci.* **75**: 1205-1206.
- McAuliffe J. J., Sherwin A. L., Leppik I. E., Bayle S. A., Pippenger C. E. (1977) *Neurology* **27**: 409-413.
- Mcevoy G. K. (1992) En: *American Hospital Formulary Service Drug Information*. Ed. Bethesda: American Society of Hospital Pharmacists. pp. 913-920.
- Miller J. C., Miller J. N. (1993) En: *Estadística para Química Analítica*. Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, Wilmington, Delaware. pp. 49-51.
- Murthy K. S., Ghebre-Sellassie I. (1993) *J. Pharm. Sci.* **82**: 113-126.
- Myers R. H. (1986) En: *Classical and Modern Regression with Applications*. Ed. Duxbury Press, Boston.
- Needham T. E., Javid P., Brown W. (1979) *J. Pharm. Sci.* **68**: 952-954.
- Newton J. M., Muhammad N. A. H. (1984) *J. Pharm. Pharmacol.* **36**: 42-44.
- Niselman A. V., García Ben M., Rubio M. C. (1996) *SAFYBI*, **35**: 32-41.
- Northern R. E., Lach J. L., Fincher J. H. (1973) *Amer. J. Hosp. Pharm.* **30**: 622-627.
- Obach R., Borja J., Pruñonosa J., Vallès J. M., Torrent J., Izquierdo I., Jané F. (1988) *Ther. Drug Monit.* **10**: 265-268.
- Osman M. A., Patel R. B., Schuna A., Sundstrom W. R., Welling P. G. (1983) *Clin. Pharmacol. Ther.* **33**: 465-470.
- Pareja B. (1985) *SAFYBI*, **25**: 2048-2059.
- Paulsen H., Kreilgard B. (1984) *Arch. Pharm. Chem., Sci. Ed.* **12**: 97-102.
- Peck G. E., Baley G. J., Mc Curdy V. E., Banker G. S. (1981) En: *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Lieberman H. A., Lachman L., Schwartz J. B. Marcel Dekker, Inc. New York, Vol.I, pp. 108-113.

- Pellicer S., Martin C., Goñi M. (1990) *An. Real Acad. Farm.* **56**: 325-331.
- Pezoa R., Concha A. M., Gaete G. (1991) *SAFYBI*, **31**: 43-51
- Pezoa R. (1994) *SAFYBI*, **33**: 22-49.
- Pilpel N., Otuyemi S. O., Kurup T. R. R. (1978) *J. Pharm. Pharmacol.* **30**: 214-219.
- Pla Delfina J. M. (1986) *SAFYBI*, **26**: 2232-2244.
- Posti J., Salonen M. (1983) *Acta Pharm. Fenn.* **92**: 113-120.
- Prandi C., Fagiolino P. (1993) *Acta Farm. Bonaerense* **12**: 131-136.
- Razdan B., Rastogi K. C. (1990) *S.T.P. Pharma.* **6**: 238-241
- Razdan B., Rastogi K. C. (1990) *S.T.P. Pharma.* **6**: 242-246
- Rees J. E., Hersey J. A., Cole E. T. (1970) *J. Pharm. Pharmacol.* **22**, Suppl.: 64S-69S.
- Rees J. E. (1977) *Boll. Chim. Farm.* **116**: 499-505.
- Reier G. E., Shangraw R. F. (1966) *J. Pharm. Sci.* **55**: 510-511.
- Retaco P., González M., Pizzorno M. T., Volonté M. G. (1996) *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **21**: 295-300.
- Riegelman S., Loo J. C. K., Rowland M. (1968) *J. Pharm. Sci.* **57**: 117-123.
- Rivero M. I., Lauroba J., Peraire C., Obach R., Doménech J., Moreno J. (1987) *C.I.F.* **6**: 149-154.
- Roscoe R., Cooper J., Wilson T. W., Joshi N. N., Midha K. K. (1982) *Biopharm. Drug Dispos.* **3**: 105-114.
- Rubio M., Masana M., Garcilazo E., De los Santos A., Di Girolamo G. (1990) *Biopharm. Drug Dispos.* **11**: 77-83.
- Rubio M. (1992) *SAFYBI*, **32**: 40-51.
- Rubio M. (1993) *SAFYBI*, **33**: 34-56.
- Salvadó A., Cemeli J., del Pozo A. (1988) *C.I.F.* **7**: 206-209.
- Sarapu A. C., Clark L. (1980) *J. Pharm. Sci.* **69**: 129.

Sartor G., Lundquist I., Melander A., Schersten B., Wahlin-Boll E. (1982) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **21**: 403-408.

Section Control Laboratories and Section Industrial Pharmacists of the Fédération Internationale Pharmaceutique (F.I.P.) (1981) *Drugs Made Ger.* **24**: 90-105.

Shangraw R. F., Wallace J. W., Bowers F. M. (1981) *Pharm. Technology* **5**: 44-49.

Shangraw R. F. (1990) En: *Pharmaceutical Dosage Forms*. Ed. Lieberman H. A., Lachman L., Schwartz J. B. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 195.

Shively C., Vesell E. (1985) En: *Topics in Pharmaceutical Sciences*. Eds. Breimer D. D. and Speiser P. Elsevier Sciences Publishers. pp. 167-178.

Skelley J. P., Amidon G. L., Barr W. H., Benet L. Z., Carter J. E., Robinson J. R., Shah V. P., Yacobi A. (1990) *J. Pharm. Sci.* **79**: 849-854

Skough J. W., Haslstead G. W., Rohrs B. R., Freeman J. E., Fagan D. T. (1996) *Pharm. Technol.* **26**: 4-22.

Sokal R. R., Rohlf F. J. (1984) En: *Introducción a la Bioestadística*. Ed. Reverté, Barcelona. pp. 120-170.

Sotiropoulos J. B., Deutsch T., Plakogiannis F. M. (1981) *J. Pharm. Sci.* **70**: 422-425.

Stavchansky A., McGinity J. W. (1981) En: *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Lieberman H. A., Lachman L., Schwartz J. B. Marcel Dekker, Inc. New York, Vol.II, pp. 393-480.

Steinijans V. W., Diletti E. (1983) *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **24**: 127-136.

Steinijans V. W., Diletti E. (1983) *Acta Pharm. Technol.* **29**: 147-158.

Steinijans V. W., Dietrich R., Trautmann H., Sauter R., Benedikt G. (1988) *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* **38**: 1238-1240.

Suzuki Y., Uematsu T., Mizuno A., Fujii K., Nakashima M. (1989) *Ther. Drug Monit.* **11**: 88-92.

Teng L., Bruce R. B., Dunning L. K. (1977) *J. Pharm. Sci.* **66**: 1615-1618.

Thielemann A. M. (1992) En: *Biodisponibilidad de medicamentos - Simposio Internacional I*. Eds. Arancibia A. y Pezoa R. Universidad de Chile. Santiago de Chile. pp.213-218.

Toothaker R. D., Welling P. G. (1980) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**: 173-199.

- Underwood T. W., Cadwallader D. E. (1972) *J. Pharm. Sci.* **61**: 239-243.
- U. S. Pharmacopeia 23th (1995) U. S. Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, pp. 1924-1932.
- Van Bommel E. M. G., Raghoobar M., Tukker J. J. (1991) *Biopharm. Drug Dispos.* **12**: 355-366.
- Van Bommel E. M. G., Raghoobar M., Tukker J. J. (1991) *Biopharm. Drug Dispos.* **12**: 367-373.
- Vaughan D., Dennis M. (1978) *J. Pharm. Sci.* **67**: 663-665.
- Vazquez M., Fagiolino P., Savio E. (1992) *Rev. O.F.I.L.* , **2**: 10-14.
- Vázquez M., Fagiolino P., De Nucci G., Parrillo S., Piñeyro A. (1993) *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. Special Issue 3*: 177-183. Proceedings of the 5th Eur. Congr. Biopharm. Pharmacokinet. Brussels, Belgium (1993).
- Vázquez M., Fagiolino P., Rubio M., Maletta-Fraile L. (1993) *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. Special Issue 3*: 169-173. Proceedings of the 5th Eur. Congr. Biopharm. Pharmacokinet. Brussels, Belgium (1993).
- Volonté M. G. (1993) *Acta Farm. Bonaerense* , **12**: 125-129.
- Wagner J. G., Nelson E. (1963) *J. Pharm. Sci.* **52**: 610-611.
- Wagner J. G., Nelson E. (1964) *J. Pharm. Sci.* **53**: 1392-1403.
- Wagner J. G. (1983) En: *Farmacocinética Clínica*, Ed. Reverté. Barcelona, España. pp.347-369.
- Wan L. S. C., Lim K. S. (1990) *S.T.P. Pharma* **6**: 567-573.
- Welling P. G. (1977) *J. Pharmacokin. Biopharm.* **5**: 291-334.
- Westlake W. J. (1973) *J. Pharm. Sci.* **62**: 1579-1588.
- Wilson J. M., Slattery J. T., Forte A. J., Nelson S. D. (1982) *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **227**: 453-462.
- Winstanley P. A., Orme M. L. (1989) *Br. J. Clin. Pharmac.* **28**: 621-628.
- Yang K. Y., Glemza R., Jarowski C. I. (1979) *J. Pharm. Sci.* **68**: 560-562.
- Yau M. K. T., Meyer M. C. (1981) *J. Pharm. Sci.* **70**: 1017-1023.

CALIDAD BIOFARMACEUTICA DE COMPRIMIDOS. ENSAYOS IN VITRO E IN VIVO

María Guillermina Volonté

1997

FE DE ERRATAS:

* Página 75:

Donde dice:

Concentración (mg/L)	Area/1000
8,00	123,25

Debe decir:

Concentración (mg/L)	Area/1000
8,00	186,08

* Página 91:

Donde dice: **Tabla 4**

Debe decir: **Tabla 3**

Donde dice: **Tabla 3**

Debe decir: **Tabla 2**

* Páginas 48, 102, 136, 160 y 183:

Donde dice:

$$\text{Auxiliar} = (\mu\text{g}/5 \text{ ml})_{t_i} + (\mu\text{g}/5 \text{ ml})_{t_{(i-1)}}$$

Debe decir:

$$\text{Auxiliar} = (\text{mg}/5 \text{ ml})_{t_1} + \dots + (\text{mg}/5 \text{ ml})_{t_{(i-1)}}$$