

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



TESIS DOCTORAL

Caracterización biofarmacéutica de zolpidem, cloperastina y pravastatina

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sarín Gabriela Colón Useche

Directoras

Pilar Pastoriza Abal
Marival Bermejo Sanz
María Isabel González Álvarez

Madrid, 2014

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN BIOFARMACÉUTICA DE
ZOLPIDEM, CLOPERASTINA Y PRAVASTATINA.**

Sarín Gabriela Colón Useche

Directoras

Dra. Pilar Pastoriza Abal

Dra. Marival Bermejo Sanz

Dra. María Isabel González Alvarez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Madrid, 2014

DRA. PILAR PASTORIZA ABAL, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, **DRA. MARIVAL BERMEJO SANZ**, CATEDRÁTICA DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA, ÁREA DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA DE LA UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE Y **DRA. MARÍA ISABEL GONZALEZ ALVAREZ**, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR DEL DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA, ÁREA DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA DE LA UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “**Caracterización biofarmacéutica de Zolpidem, Cloperastina y Pravastatina**” ha sido elaborada bajo su DIRECCIÓN por la Licenciada en Farmacia **Dña. Sarín Gabriela Colón Useche** en el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad Complutense de Madrid y de la Universidad Miguel Hernández de Elche y, hallándose concluida autorizan su presentación a fin de que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en Madrid a 05 de Junio de 2014.

Fdo. Marival Bermejo
Sanz

Fdo. María Isabel González
Alvarez

Fdo. Pilar Pastoriza
Abal

*Si hoy comenzara mi existencia y
Dios me permitiera tomar tres decisiones sobre mi vida,
le pediría:
que mis padres fueran Digna Useche y Elkar Colón,
que ellos decidieran llamarme Sarín Gabriela
y nacer en Mérida, Venezuela*

A mi Madre

A Jesús Ignacio

A Carlos José y Sirel Carolina

Agradecimiento

Madre amada...no puedo comenzar este agradecimiento sin nombrarte...tenerte como guía ha sido la mayor bendición que Dios me podía dar...gracias por tantos valores, gracias por tanta entrega y abnegación...gracias por tu incomparable amor...gracias por darnos tanto...gracias por darnos todo...estoy segura que desde el cielo me acompañas en este transcendental momento de mi trayectoria académica, tal como estuviste a mi lado en cada evento de mi vida.
Te echo mucho de menos.

A mis Directoras, muchísimas gracias:

Marival, gracias por permitirme esta experiencia...por regalarme la oportunidad de sentirme parte de un grupo maravilloso que día a día me colmaron de experiencias y aprendizaje...gracias por compartir tus conocimientos y estar dispuesta siempre a enseñarme lo que necesitaba aprender...gracias por tu testimonio de trabajo, eres un gran ejemplo para los que tenemos el privilegio de trabajar contigo; pero sobre todo, gracias por entender mis situaciones particulares y ayudarme a caminar en medio de ellas.

Isabel, no existen palabras para decirte GRACIAS...mi agradecimiento para contigo es en mayúscula e infinito...tengo que agradecerte no solo lo que me enseñaste en el plano académico (que es mucho muchísimo), tengo que agradecerte además lo que aprendí en el plano personal...gracias por las lecciones de cómo observar todas las aristas del prisma...por tu visión de grupo...por tu pasión por la investigación...gracias por ayudarme siempre...gracias por abrirme los ojos cuando era incapaz de observar la realidad.

Pilar, gracias por regalarme siempre la palabra que necesitaba escuchar...por recordarme lo afortunada que soy al tener la oportunidad de pasar estos años aquí y lo que eso ha significado para mi, mi hijo y mi familia...gracias por ser justa y equilibrada...gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme.

Irene, aunque tu firma no esté en mi tesis, en mi corazón eres mi directora...siempre te consideraré como tal. Gracias por recibirme, por abrirme las puertas a este sueño, por no perder la paciencia con mis trámites administrativos, que fueron muchos...gracias por brindarme la oportunidad de trabajar contigo y con tu equipo...gracias por tu desprendimiento y por demostrarme lo que significa la amistad con tu forma de hacer las cosas...gracias por todo lo que me enseñaste.

A mis otros "jefes":

Marta, gracias por estar siempre allí y hacerme sentir que cuento contigo...por ser un poco mi espejo de "hermana mayor"...por entender mis miedos y mis interrogantes...por regalarme risas en el momento preciso...gracias por tu empatía y solidaridad...gracias, muchísimas gracias por tu amistad.

Víctor, gracias por recibirme en el labo...gracias por enseñarme a caminar entre sus equipos, técnicas y cálculos...gracias por tu paciencia y pedagogía...fuiste un excelente "Doctorando mayor"...infinitas gracias por integrarme y hacerme sentir que estaba "en casa".

Al Grupo de Absorción Intestinal y Farmacocinética de la UMH:

el "**Dream team**" como nos llama la jefa...en conjunto (Directoras, Jefes y Compañer@s) habéis logrado hacer de estos años una experiencia inolvidable y feliz...gracias a todos por cada instante, por cada sonrisa, por cada lección. Gracias por acompañarme y darme el apoyo que necesitaba en el momento más difícil de mi vida. Espero que a pesar de la distancia física, podamos seguir compartiendo ciencia y una amistad fraterna.

Nacho: gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme...gracias por tu solidaridad y por buscar tiempo para enseñarme cosas...gracias por compartir conmigo tus aprendizajes y avances.

Vero: gracias por cada sonrisa...gracias por ser alegría constante, por acompañarme en mis "tremenduras"...gracias por ayudarme, acompañarme y por recordarme constantemente que "somos UN EQUIPO".

Mayte: gracias por permitirme conocer otras perspectivas de la vida...gracias por consolarme cuando lo necesitaba, gracias por escucharme...gracias por compartir conmigo tus experiencias y hacerme sentir que mi opinión cuenta para ti...gracias por tu compañía, tu apoyo y por tu ayuda.

Andrés: "y apareciste de pronto, cuando menos pensaba...cruzando toda frontera"...gracias por toda tu compañía, por tu ayuda, por tu apoyo, por tu paciencia, por regalarme tu tiempo...fuiste el compañero perfecto en estos últimos meses...el calificativo perfecto para ti es "oportuno".

Isa Lozoya, Alejandro, Adrián y Tere...estar en Valencia no ha permitido que compartamos lo que hubiese querido, pero igual os agradezco haberme regalado tiempo y gratos momentos que estarán en mi recuerdo por siempre.

A los que siento también mis compañeros: Migue, Alcides, Nela, Nasim y Reinaldo...a todos gracias...por compartir conmigo tantos y tan buenos momentos...son más que compañeros de ciencia...a ustedes me une sentimiento de amistad...gracias por enriquecer mi perspectiva de la vida...por ratificarme que independientemente de la religión, sistema social o político, son más las cosas que nos unen que las que nos separan.

Al personal PAS de la Universidad Miguel Hernández, en especial a Emilio, Darío y Paco del SEA que pacientemente me acompañaron en los días de animales. A Pedro Aracil por su apoyo y ayuda siempre que necesitaba alguna cosa en el labo.

A mis compañeros de la Complu: fueron ustedes con quienes comencé mi recorrido por España...me enseñaron a hablar Español de España...me permitieron entender la cultura de este país: Claudia, María del Mar, María, Loly, Patricia, Marta, Vanesa, Esther, Pseudý, Irene...muchas gracias por todo...son inolvidables tantas horas en el laboratorio...gracias por compartir conmigo y por regalarme tiempo, conocimientos y amistad.

A la Universidad de Los Andes por permitir que viniera en las mejores condiciones posibles a realizar mi sueño...en especial a mis compañeros del Departamento de Análisis y Control de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, que durante estos años me acompañaron en la distancia y me han apoyado siempre. A la DAP y su personal, por procurar eficiente y eficazmente mi bienestar durante todos estos años, superando con éxito las dificultades por las que ha pasado el país.

A la Prof. Laura...mucho que agradecerle: su afecto, apoyo y confianza...gracias por estar dispuesta a colaborar conmigo en todo momento...gracias por permitirme sentir que tengo un espacio reservado en LAM, que usted cuida celosamente para mí...gracias por estar siempre allí y por tener una trayectoria intachable y motivadora. Gracias al Prof. Andrés, a Milenita y a Nelson, a quienes sentí siempre cercanos y con quienes siempre puedo contar...gracias por estar a mi lado a pesar de la distancia.

A mis amigos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la ULA, que siempre han apostado por mi éxito: **María Alejandra**, no tengo cómo agradecerle tu compañía y apoyo en los primeros días de mi vida en España...infinitas gracias...**Sheila, Marveya, Adriana, Alba, Lisseth, Edith, Dioli, Elvira** y **Yonel** por darme muestras de afecto verdadero y por hacerme sentir que la amistad es un lazo que vence el tiempo y las distancias...gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas.

Al Sr. **Francisco Castillo**: mi laboratorio no será el mismo sin usted...quiero en esta memoria ratificar mi admiración, respeto y afecto hacia usted...es y siempre será "el compañero perfecto"...infinitas gracias por todo lo que me ha dado.

A **mis estudiantes**...los del pasado y los del futuro...mis exalumnos porque fueron un motivo para emprender este proyecto y los que serán mis estudiantes, para quienes quiero ser día a día una mejor docente y así sentirme profesora de Farmacéuticos éticos y que amen su profesión.

Los amigos son la familia que uno escoge...Dios me permitió encontrar en España dos ángeles...dos hermanas: **Thais** y **Marcela**, ustedes son más que mis amigas...gracias por todo...este agradecimiento quiero hacerlo extensivo a sus respectivas familias: **Fran, Luis Alfredo** y **Albey, Juan David**...infinitas gracias por tanto afecto, solidaridad, apoyo y amistad incondicional. Les echaré mucho de menos...pero las distancias hoy son muy cortas...nos encontraremos a menudo, lo prometo!

A mis otros amigos Venezolanos: **Waiki** y **César, Lisbeth, Mary Cruz, Héctor, Yuriely** y **Chato, Yudy, Lorenita, Mariela, Nonon, Elena** y **Chinca** a quienes he sentido cercanos a lo largo de estos años...gracias por regalarme su amistad.

A mis **tías, tíos** y **primos**...a la mamita **Soledad** y familia...al abuelito **Chirinos** y familia: es una sensación inigualable sentir que a pesar del tiempo, tengo un puerto seguro donde volver y ese puerto es mi familia...lugar de refugio y alegría...son de las bendiciones más grandes que he recibido...mil gracias a todos por el apoyo, por creer en mi y por inyectarme optimismo siempre.

A mi **Papá**: gracias por la vida papito...gracias por tantas lecciones...gracias por los valores...gracias por procurarme un hogar seguro y bonito...gracias por esperar con fe que esta etapa terminara exitosamente.

A mis hermanos: **Carlucho** y **Sirel**...gracias por ser mis compañeros de vida...GRACIAS, GRACIAS Y GRACIAS...nuestros padres nos dieron muchísimas cosas; para mi, ustedes dos son lo mejor de todo...sin ustedes mi vida no sería lo bonita que es...gracias por hacerme sentir que no estoy sola, que cuento con dos amigos incondicionales...este paso de mi vida académica tiene mucho de los dos...síntanse parte de él. Agradezco también el apoyo y el afecto de **María Angélica** y **Carlos**, que son además de mis cuñados, mis otros hermanos...muchas gracias.

Jesús Ignacio: mi pequeño...mi compañero...mi motivo...mi gran amor...llenas de esperanza cada instante de mi vida...mi mejor momento del día: verte salir del cole...mi mayor alegría: verte crecer...gracias por haberme acompañado pacientemente durante todos estos años...gracias por escogerme como tu mamá...gracias por enseñarme el significado del amor infinito e incondicional...gracias por ser mi luz, mi esperanza y mi alegría...gracias por darme equilibrio a mi existencia...eres lo mejor que he hecho en la vida...esta tesis lleva tu nombre...es tuya también mi tesoro hermoso.

Abstract

Biopharmaceutical characterization of Zolpidem, Cloperastine and Pravastatin.

Biopharmaceutic classification system classifies drugs according to their solubility and permeability. These two parameters along with dissolution rate in lumen are the main determinants of oral absorption.

This scientific framework is useful in all the phases of drug development with regulatory implications as it determines when a biowaiver could be granted to demonstrate bioequivalence in multisource products containing high solubility drugs. A biowaiver is the permission to use *in vitro* dissolution test data as a surrogate of the *in vivo* pharmacokinetic data in human volunteers for bioequivalence assessment with the associated ethical and economical positive implications.

This research work is part of a Project whose overall aim is to find an *in vitro* dissolution test able to replicate the results of previously failing *in vivo* bioequivalence studies. The final goal is to find *in vitro* and *in situ* models to predict drug product performance *in vivo*.

Following the advice of the Spanish Agency of Drug Products and Sanitary Products, pharmaceutical formulations of Zolpidem hemitartrate, Sodium Pravastatine and Cloperastine fendizoate were studied. These drugs were selected based on their BCS class as well as for the availability of drug formulations thanks to the collaboration of pharmaceutical companies manufacturing these products.

In vivo bioequivalence studies of Zolpidem and Pravastatin showed that in spite of the products passing the bioequivalence standards, their C_{max} confidence interval do not include 100% value. i.e. the central point ratio was biased toward the borderline limit of the acceptance limits. Previous information of the physicochemical characteristics of these drugs and their oral fraction absorbed was available.

It is generally accepted that excipients are inactive and that they do not modify oral bioavailability. Nevertheless some studies have shown changes in oral absorption due to excipient effects. It has been observed in Caco-2 cell *in vitro* tests that some excipients can modify intestinal permeability. In other experimental models it has been demonstrated that paracellular route can be affected by excipients as well as interfering with transporters functionality.

The objectives of this study were:

- ✓ To quantify the solubility and permeability of the drugs in study: Zolpidem, Pravastatin and Cloperastine.
- ✓ To measure the lipophilicity of the studied drugs.
- ✓ To classify Zolpidem, Pravastatin and Cloperastine according to the biopharmaceutical classification system.
- ✓ To study the ability of *in vitro* dissolution methods to predict the *in vivo* behavior in human volunteers of the oral solid immediate release formulations tested.
- ✓ To explore *in situ* methodologies to predict *in vivo* performance of the oral solid immediate release formulations studied.
- ✓ To assess, using *in situ* methods, if there are any differences in the oral absorption processes of the different oral formulations studied.
- ✓ To assess the effect of the excipients in the dissolution and absorption processes using *in vitro* methods.

The experimental design included the determination of the drugs solubility, partition coefficients, dissolution rate and permeability *in situ* and *in vitro* of all the available formulations.

Solubility tests and permeability *in vitro* assays concluded the BCS classification as 1 for Zolpidem, 2 for Cloperastine and 3 for Pravastatin.

The distribution coefficient LogD correctly classified in the Biopharmaceutic classification system Zolpidem and Cloperastine, comparing the experimental value of LogD_{6,8} with the reported value for Metoprolol. Pravastatin classification by lipophilicity was unsuccessful, because the drug is an efflux transporter substrate which decreases its permeability in the biological system.

Dissolution rate studies in USP II apparatus with pharmacopeia media and with biorrelevant media did not allow finding any conditions to predict *in vivo* results for Zolpidem and Pravastatin. Test Cloperastine formulation showed a higher fraction dissolved than the reference one in pH 1.2 and 6.8 in accordance with the *in vivo* results in human volunteers.

To explain the *in vivo* behavior of Pravastatine and Zolpidem products, their permeability was studied in Caco-2 cells and *in situ* in rats. The *in vitro* model was useful to detect the increase of Pravastatin permeability due to lactose and sodium croscamellose. Polietilenglycol 400 and 6000, titanium dioxide and talc showed a decrease in Zolpidem permeability in the *in situ* and the *in vitro* models. More studies will be necessary to study the influence of these excipients on gastric emptying.

The conclusions of this research are:

1. In agreement with the solubility and permeability studies realized in this research project, Zolpidem is a drug with high solubility and high permeability thus it is confirmed as class 1 substance according to Biopharmaceutics Classification System, BCS. Pravastatin is a class 3 substance according to its high solubility and low permeability. Cloperastine has low solubility and high permeability; consequently it is a drug of BCS class 2.
2. Zolpidem, Pravastatin and Cloperastine present experimental values of distribution coefficients ($\log D_{6,8}$) 2,34, -0,16 and 2,93, respectively, whereas the reported value of Metoprolol is -0.62 ($\log D_{7,0}=-0,62$). Therefore, lipophilicity ($\log D_{6,8}$) is a physicochemical parameter that not allow to correctly classify all the assayed compounds according the Biopharmaceutics Classification System. Pravastatin in spite of being a class 3 drug with lo experimental permeability would be classified as high permeability as its lipophilicity value is greater than that of Metoprolol. The discrepancy may be due to the involvement of a secretion mechanism in Pravastatin absorption while for drugs that are absorbed by passive diffusion lipophilicity may be a good provisional screening index.
3. The dissolution media used for Zolpidem do not reflect the *in vivo* behavior of the oral formulations. These media have not detected any significant difference between formulations which, while meeting the bioequivalence standard had Cmax confidence interval ratios that did not include 100% value.
4. Pravastatin presents the reverse situation thus the media tested are too discriminative in spite of all formulations showing *in vivo* bioequivalence. This confirms that for highly soluble drugs, there is no correlation between the rate of *in vitro* and *in vivo* dissolution. For immediate release formulations of class 1 and 3 drugs the only possible inference is that if there is no difference *in vitro*, it will not be difference *in vivo* but when a

difference *in vitro* appears no conclusion can be establish about the *in vivo* performance.

5. For Cloperastine, it has been possible to find dissolution conditions that reproduce the observed sequence *in vivo*. The dissolution media at pH 1,2 and 6,8 in apparatus 2 (paddle) and with an agitation speed of 50 rpm reflect the same rank order than taht observed *in vivo* in healthy volunteers. However, at pH 4,5 the differences are not detected, possibly due to the low solubility of the drug at this pH.
6. Zolpidem present *in vitro* and *in situ* a passive diffusion absorption mechanism. Pravastatin as well as Cloperastine behaves *in vitro* and *in situ* as an efflux carrier substrate.
7. The absorption process of the formulations presented significant differences only for Pravastatin in the *in vitro* model while in the *in situ* model these differences are not detected probably due to the higher data variability. This demonstrates that the *in vitro* model is more sensitive to the excipients effects, and it detects differences which are not necessarily observed in the more complex animal model. The increase in permeability of Pravastatin BE-A formulation indicates that this slight increase in C_{max} could be due to some formulation excipient which increases the drug permeability.

As future objectives it will be relevant to establish *in vitro-in vivo* relationships to predict plasma profiles from *in vitro* dissolution data for the different formulations.

Resumen

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB) agrupa los fármacos según su solubilidad y permeabilidad. Estos dos parámetros, junto a la velocidad de disolución de la formulación en el lumen intestinal, son los que rigen el proceso de absorción por vía oral.

Este marco científico es útil en todas las etapas de vida de un medicamento y tienen un gran impacto a nivel regulatorio, ya que permite establecer las bioexenciones como procedimiento para demostrar la bioequivalencia de genéricos que contienen fármacos de alta solubilidad. Las bioexenciones sustituyen los estudios de bioequivalencia en voluntarios sanos por ensayos *in vitro* de velocidad de disolución, con las repercusiones positivas que supone desde el punto de vista ético y económico.

Este trabajo de investigación forma parte de un proyecto cuyo objetivo final consiste en dar respuesta *in vitro* a los ensayos de bioequivalencia fallidos o exitosos. El objetivo es encontrar modelos *in vitro* o *in situ* que permitan predecir el comportamiento en los estudios con voluntarios sanos.

A sugerencia de la Agencia Española de Medicamentos se estudian formulaciones de Zolpidem hemitartrato, Pravastatina sódica y Cloperastina fendizoato. Los fármacos se seleccionaron por su clase SCB y por disponer de datos del estudio *in vivo* de bioequivalencia, así como la disponibilidad de las formulaciones gracias a la cooperación de las empresas de genéricos involucradas. Los estudios de bioequivalencia *in vivo* mostraron para Zolpidem y Pravastatina que aún siendo bioequivalentes con el producto de referencia, el intervalo de confianza de C_{max} no incluye el 100% por estar desplazado hacia uno de los extremos.

De estos fármacos se disponía de información sobre sus características fisicoquímicas y su capacidad de absorción y de la fracción de dosis absorbida por vía oral. El diseño experimental de la tesis consistió en determinar la solubilidad y lipofilia de los fármacos y la velocidad de disolución y permeabilidad *in situ* e *in vitro* de las distintas formulaciones.

En general se asume que la mayoría de excipientes son inertes y no modifican la biodisponibilidad del fármaco. Sin embargo, algunos estudios evidencian cambios en la absorción debido a excipientes. Se ha observado *in vitro* en Caco-2 que algunos excipientes modifican la permeabilidad intestinal. En otros

modelos se ha demostrado que la ruta paracelular de absorción se ve afectada por la presencia de algunos excipientes y también pueden interferir con la funcionalidad de los transportadores intestinales.

Los objetivos planteados fueron los siguientes:

- ✓ Determinar la solubilidad y permeabilidad de los fármacos en estudio: Zolpidem, Pravastatina y Cloperastina.
- ✓ Determinar la lipofilia de los fármacos estudiados.
- ✓ Clasificar según el SCB los fármacos Zolpidem, Pravastatina y Cloperastina.
- ✓ Explorar metodologías *in vitro* de disolución para predecir el comportamiento en humanos de las formulaciones sólidas orales de liberación inmediata ensayadas.
- ✓ Explorar metodologías *in situ* para predecir el comportamiento en humanos de las formulaciones sólidas orales de liberación inmediata ensayadas.
- ✓ Evaluar, mediante métodos *in situ*, si existen diferencias en los procesos de absorción del fármaco en las distintas formulaciones estudiadas.
- ✓ Evaluar el efecto de los excipientes utilizados en cada una de las formas farmacéuticas de uso oral ensayadas.

Los estudios de solubilidad y permeabilidad en modelo *in vitro* permitieron clasificar como clase I a Zolpidem, clase II a Cloperastina y clase III a Pravastatina.

El estudio de coeficiente de reparto permitió clasificar correctamente en el SCB a Zolpidem y Cloperastina, al comparar el valor de $\text{Log } D_{6,8}$ obtenido experimentalmente con el reportado para Metoprolol. En el caso de Pravastatina la clasificación por lipofilia no fue correcta, debido a que este fármaco es sustrato de transportadores de secreción lo que disminuye su permeabilidad en el sistema biológico.

Se realizaron estudios de velocidad de disolución en el aparato de paletas con los medios establecidos en Farmacopea Europea y con medios biopredictivos a fin de encontrar aquel que permitiera predecir el comportamiento *in vivo*. No ha sido posible para Zolpidem y Pravastatina. Para la formulación de Cloperastina los medios a pH 1,2 y 6,8 permitieron observar un mayor porcentaje disuelto que en el producto referencia, en consonancia con lo observado en voluntarios sanos.

Para responder a los interrogantes sobre el comportamiento en humanos de Pravastatina y Zolpidem se estudiaron, en el modelo *in vitro*, usando células Caco-2 y en el modelo *in situ* (rata), el efecto de los excipientes sobre la permeabilidad. El modelo *in vitro* resultó útil para establecer que la lactosa y la croscarmelosa sódica incrementan la permeabilidad de Pravastatina.

En el modelo *in vitro* e *in situ* se observó que el polietilenglicol 400 y 6000, el dióxido de titanio y el talco disminuyen la permeabilidad de Zolpidem. Serían necesarios más estudios para determinar si algún excipiente afecta el vaciado gástrico.

Las conclusiones de la presente investigación son las siguientes:

1. De acuerdo con los estudios de solubilidad y permeabilidad realizados en esta memoria, Zolpidem es un fármaco de alta solubilidad y alta permeabilidad y se confirma su clasificación como tipo 1 del SCB. Pravastatina es una sustancia de alta solubilidad y baja permeabilidad que lo definen como clase 3, y Cloperastina presenta baja solubilidad y alta permeabilidad por lo que es un fármaco de la clase 2.
2. El Zolpidem, la Pravastatina y la Cloperastina presentan valores de coeficientes de reparto experimental ($\log D_{6,8}$) de 2,34, -0,16 y 2,93, respectivamente, siendo todos ellos superiores al reportado del Metoprolol ($\log D_{7,0} = -0,62$). Por tanto, este parámetro fisicoquímico de lipofilia ($\log D_{6,8}$) no permite clasificar a todos los compuestos ensayados de forma correcta en el SCB. La Pravastatina clasificada en la clase 3 con baja permeabilidad tiene un valor de lipofilia superior al del metoprolol que lo clasificaría en la clase 1. La discrepancia puede deberse al mecanismo de secreción del que es sustrato Pravastatina mientras que para los fármacos que se absorben por difusión pasiva la lipofilia puede ser un buen índice de cribado provisional.
3. Los medios de disolución empleados para Zolpidem no han reflejado el comportamiento *in vivo* de este principio activo. Estos medios no han detectado diferencias significativas entre las formulaciones que, aunque cumpliendo el estándar de bioequivalencia, presentan diferentes valores de C_{max} .
4. Para la Pravastatina se da el fenómeno inverso y los medios ensayados son en exceso discriminativos cuando todas las formulaciones *in vivo* han resultado bioequivalentes. Esto confirma que para los fármacos de alta solubilidad, en realidad no existe correlación entre la velocidad de disolución *in vitro* e *in vivo* y la única inferencia posible es que si no hay

diferencias *in vitro* no las habrá *in vivo*, pero si hay diferencia *in vitro* no se puede extraer ninguna conclusión sobre lo que ocurrirá *in vivo*.

5. En el caso de la Cloperastina, si ha sido posible encontrar unas condiciones de disolución que reproducen la secuencia observada *in vivo*. Los medios de disolución a pH 1,2 y 6,8 en el aparato tipo 2 o de paletas a 50 rpm reflejan la misma secuencia que la observada *in vivo* en voluntarios sanos. Sin embargo, a pH 4,5 estas diferencias no se detectan debido, posiblemente, a la menor solubilidad a este pH.
6. El Zolpidem presenta *in vitro* e *in situ* un mecanismo de absorción pasiva. La Cloperastina y la Pravastatina se comportan *in vitro* e *in situ* como sustratos de un transportador de secreción.
7. El proceso de absorción de las formulaciones solo presenta diferencias significativas *in vitro* para la Pravastatina mientras que *in situ* no se observa debido a la alta variabilidad encontrada en estos ensayos. Ello demuestra que el modelo *in vitro* es más sensible al efecto de los excipientes detectando cambios que no se observan, necesariamente, en el modelo animal más complejo. El incremento en permeabilidad de la formulación de Pravastatina denominada BE-A indica que este ligero incremento en C_{max} puede deberse a algún componente de la formulación que aumenta la permeabilidad.

Como objetivo futuro sería importante establecer correlaciones *in vivo-in vitro* para predecir concentraciones plasmáticas a partir de datos de velocidad de disolución para las distintas formulaciones de estos fármacos.

Abreviaturas

An: Número de absorción
AUC: Área bajo la curva
BE-A: Formulación bioequivalente alto (Pravastatina)
BE-B: Formulación bioequivalente bajo (Zolpidem)
BE: Producto bioequivalente
C_{max}: Concentración plasmática máxima
CV: Coeficiente de variación
D: Coeficiente de reparto
DMSO: Dimetilsulfóxido
DMSO: Dimetilsulfóxido
D_n: Número de disolución
D_o: Número de dosis
EMA: Agencia Europea de Medicamentos
*f*₂: Factor de similitud
FaSSGF: Fluido gástrico simulado en estado de ayunas
FaSSIF: Fluido intestinal simulado en estado de ayunas
FDA: Food and Drug Administration
FeSSIF: Fluido intestinal en estado postprandial
HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución
ka: Constante de absorción o constante de velocidad de absorción intrínseca
LSS: Laurilsulfato sódico
No-BE: Formulación no bioequivalente (Cloperastina)
OMS: Organización Mundial de la Salud
P-gp: Glicoproteína-P
P_{eff}: Coeficiente de permeabilidad
PEG: Polietilenglicol
Ph.Eur.: Farmacopea Europea
SCB: Sistema de Clasificación Biofarmacéutico
SGF: Fluido gástrico simulado
SIF: Fluido intestinal simulado
TiO₂: Dióxido de titanio

Índice

Abstract	i
Resumen	v
Abreviaturas	ix
1. Introducción	1
A. Absorción intestinal	1
1. Lugares de absorción	1
2. Mecanismos de absorción	3
2.1. Difusión pasiva	3
2.2. Mecanismos especializados de transporte	7
3. Parámetros de absorción	16
3.1. Constante de velocidad de absorción	16
B. Sistema de Clasificación Biofarmacéutico	17
1. Bioexenciones basadas en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.	19
1.1. Modelos experimentales para determinar la permeabilidad intestinal	23
1.2. Efecto de los excipientes sobre la permeabilidad	27
1.3. Métodos para determinar la solubilidad	30
1.4. Metodología de disolución	34
C. Correlaciones <i>In vivo-In vitro</i>	51
D. Fármacos a estudiar	52
1. Zolpidem	52
1.1. Propiedades fisicoquímicas	53
1.2. Propiedades farmacocinéticas	53
1.3. Problema de bioequivalencia	53
1.4. Excipientes de las formulaciones ensayadas	54
2. Pravastatina	55
2.1. Propiedades fisicoquímicas	55
2.2. Propiedades farmacocinéticas	55
2.3. Problemas de bioequivalencia	56
2.4. Excipientes de las formulaciones ensayadas	57
3. Cloperastina	57
3.1. Propiedades fisicoquímicas	58
3.2. Propiedades farmacocinéticas	58
3.3. Problemas de bioequivalencia	58
3.4. Excipientes de las formulaciones ensayadas	58
2. Objetivos y Planteamiento	61
3. Materiales y Métodos	65
A. Compuestos y productos ensayados	65
1. Zolpidem hemitartrato	65
2. Pravastatina sódica	66

3.	Cloperastina fendizoato	66
B.	Técnicas experimentales	66
1.	Concentración de saturación	66
1.1.	Soluciones de trabajo	66
1.2.	Técnica experimental	66
1.3.	Tratamiento de las muestras	67
2.	Coefficiente de reparto	67
2.1.	Soluciones de trabajo	67
2.2.	Técnica experimental	68
2.3.	Tratamiento matemático	68
3.	Perfiles de disolución	69
3.1.	Aparato de disolución	69
3.2.	Condiciones de los perfiles de disolución	69
3.3.	Técnica experimental	69
3.4.	Medios de disolución	70
3.5.	Prueba de comparación	71
4.	Estudio de permeabilidad <i>in vitro</i>	72
4.1.	Soluciones de trabajo	73
4.2.	Técnica experimental	75
4.3.	Cálculo de la permeabilidad	82
5.	Ensayo de absorción en animales	84
5.1.	Animales de experimentación	84
5.2.	Soluciones de trabajo	84
5.3.	Técnica experimental en intestino delgado completo	86
5.4.	Protocolo del ensayo	87
5.5.	Ensayo de reabsorción de agua	88
5.6.	Tratamiento de muestras	88
C.	Valoración de muestras	90
1.	Método espectrofotométrico	90
2.	Método cromatográfico	90
3.	Validación de los métodos analíticos	92
3.1.	Ensayo de linealidad	92
3.2.	Ensayo de precisión y exactitud	92
3.3.	Límite de detección y cuantificación	93
D.	Métodos matemáticos y estadísticos	93
1.	Análisis de regresión	93
2.	Pruebas de comparación de medias	93
2.1.	Análisis de varianza global: ANOVA de un factor	94
2.2.	Prueba de comparación múltiple: <i>Prueba de Scheffé</i>	94
4.	Resultados	95
A.	Zolpidem	95
1.	Validación de los métodos analíticos	95
1.1.	Método cromatográfico	95
1.2.	Método espectrofotométrico	97
2.	Concentración de saturación	98
3.	Coefficiente de reparto	99

4. Ensayos <i>in vitro</i> en células Caco-2 para determinar la permeabilidad de Zolpidem	99
5. Perfiles de disolución	102
6. Ensayos <i>in vitro</i> en células Caco-2 para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de Zolpidem	113
7. Ensayos <i>in situ</i> para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de Zolpidem	115
8. Ensayos <i>in vitro</i> en células Caco-2 para determinar el efecto de excipientes sobre la permeabilidad de Zolpidem	117
9. Ensayos <i>in situ</i> para determinar el efecto de excipientes sobre la permeabilidad de Zolpidem	121
B. Pravastatina	129
1. Validación de los métodos analíticos	129
1.1. Método cromatográfico	129
1.2. Método espectrofotométrico	130
2. Concentración de saturación	131
3. Coeficiente de reparto	133
4. Ensayos <i>in vitro</i> en células Caco-2 para determinar la permeabilidad de Pravastatina	133
5. Perfiles de disolución	137
6. Ensayos <i>in vitro</i> en células Caco-2 para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de Pravastatina	149
7. Ensayos <i>in situ</i> para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de Pravastatina	151
8. Ensayos <i>in vitro</i> en células Caco-2 para determinar el efecto de excipientes sobre la permeabilidad de Pravastatina	153
C. Cloperastina	166
1. Validación del método analítico	166
2. Concentración de saturación	167
3. Coeficiente de reparto	169
4. Ensayos <i>in vitro</i> en células Caco-2 para determinar la permeabilidad de Cloperastina	169
5. Perfiles de disolución	172
6. Ensayos <i>in vitro</i> en células Caco-2 para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de Cloperastina	175
7. Ensayo <i>in situ</i> para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de Cloperastina	177
5. Discusión	181
A. Compuestos ensayados	181
B. Diseño de estudios	182
1. Diseño de estudios para cálculo de la solubilidad del fármaco	182
2. Diseño de estudio para el cálculo de la lipofilia del fármaco	182
3. Diseño de estudios de disolución	183
4. Estudio de permeabilidad	183
4.1. Técnica <i>in vitro</i>	183
4.2. Técnica <i>in situ</i>	185

C. Métodos analíticos	186
D. Interpretación de resultados	187
1. Zolpidem	187
1.1. Concentración de saturación	187
1.2. Coeficiente de reparto	187
1.3. Perfiles de disolución	188
1.4. Ensayo de permeabilidad	188
2. Pravastatina	191
2.1. Concentración de saturación	191
2.2. Coeficiente de reparto	192
2.3. Ensayo de disolución	192
2.4. Ensayos de permeabilidad	193
3. Cloperastina	196
3.1. Concentración de saturación	196
3.2. Coeficiente de reparto	196
3.3. Ensayo de disolución	196
3.4. Ensayo de permeabilidad	197
6. Conclusiones	199
7. Referencias bibliográficas	201

1. Introducción

A. Absorción intestinal

La absorción de nutrientes, xenobióticos y fármacos administrados por vía oral ocurre principalmente a lo largo del tracto gastrointestinal. Puede existir también absorción en la mucosa sublingual y rectal, pero esto ocurre a partir de formas de dosificación destinadas para tal fin.

1. Lugares de absorción

El tracto gastrointestinal se compone de tres tramos bien diferenciados morfológicamente: estómago, intestino delgado y colon. La absorción puede producirse en cualquiera de los tres tramos, pero se realiza principalmente en el intestino delgado pues este tramo está especializado en esta función. El intestino delgado posee numerosas estructuras morfológicas encaminadas a aumentar su superficie, y por ende, su capacidad de absorción mediante difusión pasiva.



Figura 1-1. Esquema de las distintas modificaciones en el intestino (1)

Así, destaca la presencia de tres modificaciones que se desarrollan a partir de la estructura cilíndrica fundamental (2, 3).

- Válvulas conniventes o pliegues de Kerkring.
- Vellosidades intestinales o villi.
- Microvellosidades presentes en las células columnares absorbentes o enterocitos.

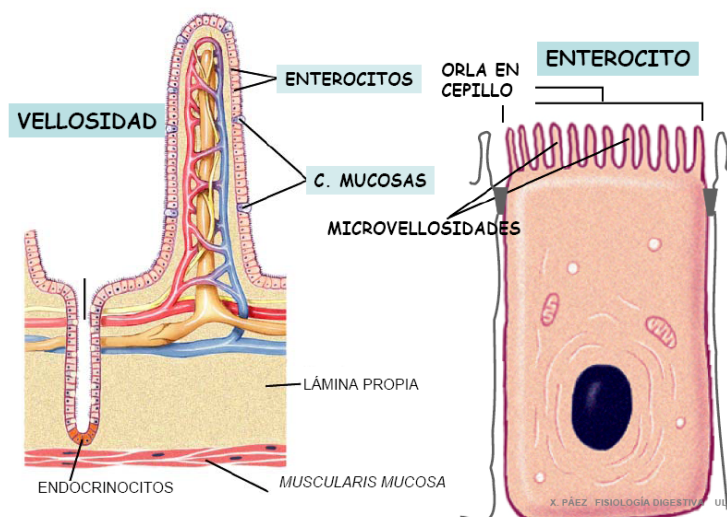


Figura 1-2. Estructura del villi y microvilli (1)

Otra característica importante del intestino delgado es la presencia de poros acuosos. Éstos se caracterizan por presentar cargas y por poseer un

diámetro reducido, lo cual hace que representen un camino restringido a la absorción de moléculas o iones de peso molecular inferior a 200-250 Daltons, en función de la estereoquímica del compuesto (4).

Además, este epitelio presenta numerosas proteínas transportadoras que son indispensables para la incorporación de nutrientes (aminoácidos, azúcares, vitaminas...) y el mantenimiento de la homeostasis. Estos constituyentes son un punto clave en la comprensión del fenómeno de la absorción.

2. Mecanismos de absorción

Los mecanismos de absorción a través de la membrana de las células que forman el epitelio de la mucosa son básicamente de dos tipos:

1. Difusión pasiva
2. Mecanismos especializados de transporte, entre los que se distingue:
 - transporte activo
 - transporte facilitado

La absorción de cualquier sustancia puede incluir uno de los mecanismos mencionados anteriormente o la combinación de los mismos.

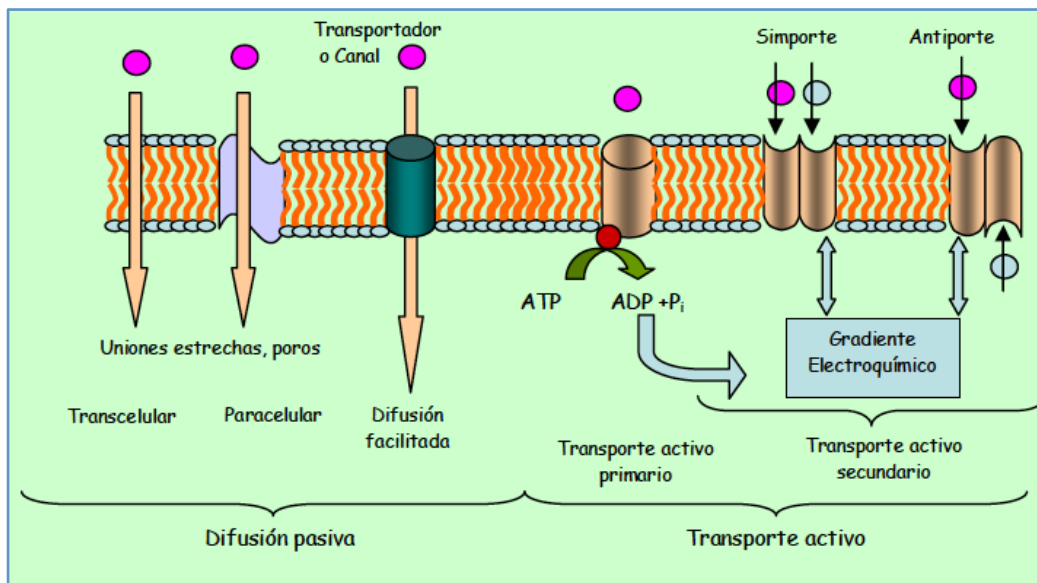


Figura 1-3. Mecanismos de transporte

2.1. Difusión pasiva

La absorción por difusión pasiva es el proceso predominante en la absorción de sustancias. Se caracteriza por realizarse siempre a favor de gradiente de concentración y sin consumo de energía (5). Es un proceso complejo tanto por factores extracelulares (zona luminal) como intracelulares o tisulares (zona

serosa), además de las características de la membrana lipoidea fundamental, situada en el borde superior de las células columnares y alineada paralelamente a la superficie de las microvellosidades (6).

Engloba dos tipos principales de procesos o rutas:

- Ruta paracelular: paso a través de las uniones intercelulares.
- Ruta transcelular: difusión a través de membranas lipoideas.

2.1.1. Ruta paracelular

Dentro de la difusión pasiva se puede considerar la entrada de xenobióticos que ocurre a través de los espacios intercelulares y/o poros acuosos de la membrana, es decir, entre las aberturas que dejan las uniones entre las células columnares adyacentes. En este caso, la difusión es una función inversa del tamaño molecular del fármaco. En general esta vía queda restringida a los solutos de bajo peso molecular e hidrofilia elevada (7) y no se incluiría la membrana lipídica en el ruta global de difusión del xenobiótico.

2.1.2. Ruta transcelular

La difusión del soluto a través de la membrana celular intestinal es la vía mayoritaria. Consiste en un reparto de las moléculas de soluto entre el fluido del lumen intestinal y la bicapa lipídica que forma la membrana celular, de tal modo que las moléculas se desplazan desde la zona donde se encuentran más concentradas hasta aquella donde la concentración es menor.

Las sustancias liposolubles pueden atravesar fácilmente las membranas hasta que el soluto se equilibre a ambos lados de la bicapa.

Las moléculas polares atraviesan canales formados por las proteínas. Algunas proteínas transmembrana presentan una estructura tridimensional en la cual los radicales polares de ciertos aminoácidos se disponen formando un canal hidrofílico. Algunos canales se mantienen permanentemente abiertos, otros sólo lo hacen cuando llega una molécula mensajera que se une a una zona receptora específica e induce a una variación de la configuración que abre el canal, o bien cuando ocurren cambios en la polaridad de la membrana.

Este mecanismo de absorción depende de las propiedades fisicoquímicas del soluto, en especial del grado de ionización y de la lipofilia, ya que en general sólo se absorbe la fracción no disociada de la molécula, que es más lipófila.

La ruta global de difusión que debe seguir el xenobiótico para alcanzar el plasma puede dividirse en tres zonas:

a) Interfase lumen-membrana (zona luminal)

Está constituida por tres zonas continuas de distinta naturaleza fisicoquímica. En la figura 1-4 se esquematiza su disposición:

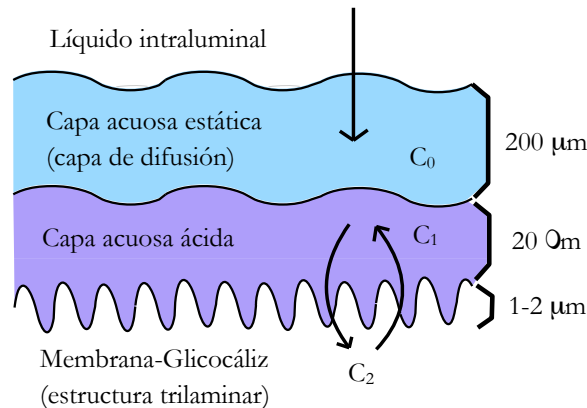


Figura 1-4. Disposición de la interfase lumen-membrana, tomada de (8)

La primera zona que se distingue es la que abarca el lumen intestinal constituido por el *líquido luminal*. El pH de este líquido no es homogéneo a lo largo de todo el intestino. De hecho, en el hombre, entre la zona próxima al estómago y el tramo final del intestino, el pH oscila entre 6 y 8, respectivamente (9).

En contacto directo con el fluido luminal se encuentra la *capa acuosa estática de difusión o capa límite*, que posee un espesor de unos 300 μm. La composición de esta capa y la del fluido luminal es la misma, sin embargo, las moléculas de agua en la capa de difusión generan una resistencia a la penetración de solutos. Esta resistencia es el factor limitativo para la absorción de sustancias de marcado carácter lipófilo. La capa acuosa estática es sensible al arrastre y puede eliminarse parcial o totalmente por agitación, lavado energético del intestino y en presencia de tensoactivos sintéticos (10, 11).

Adyacente a la capa de difusión se encuentra una capa mucosa que contiene más del 90% de agua y entre 0,5 y 5% de mucina (12).

Posteriormente y en contacto con la membrana se encuentra una *capa acuosa ácida o microclima* cuyo pH es algo más ácido que el líquido intraluminal, ya que presenta valores entre 5,3 y 6,1 (13). Esta capa está poco estudiada, su espesor parece ser del orden de 20 μm y no se ha demostrado que interfiera en el proceso de absorción salvo en casos excepcionales.

b) Membrana Lipoidea

Se trata de una membrana trilaminar con características diferenciales del resto de membranas celulares. Según el modelo fluido propuesto por Singer y Nicholson, presenta una zona central formada por dos capas fosfolipídicas con sus cadenas hidrocarbonadas unidas entre sí por fuerzas de Van der Waals, de forma

que los grupos polares quedan recubriendo las caras interna y externa de la bicapa. Además existen proteínas globulares que recubren algunas zonas o se interponen entre los lípidos (14).

Está compuesta por una lámina que sirve de “contenedor” para el citosol y los distintos compartimientos internos de la células, así como también otorga protección mecánica. Está formada principalmente por fosfolípidos (fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina), colesterol, glúcidos y proteínas (integrales y periféricas).

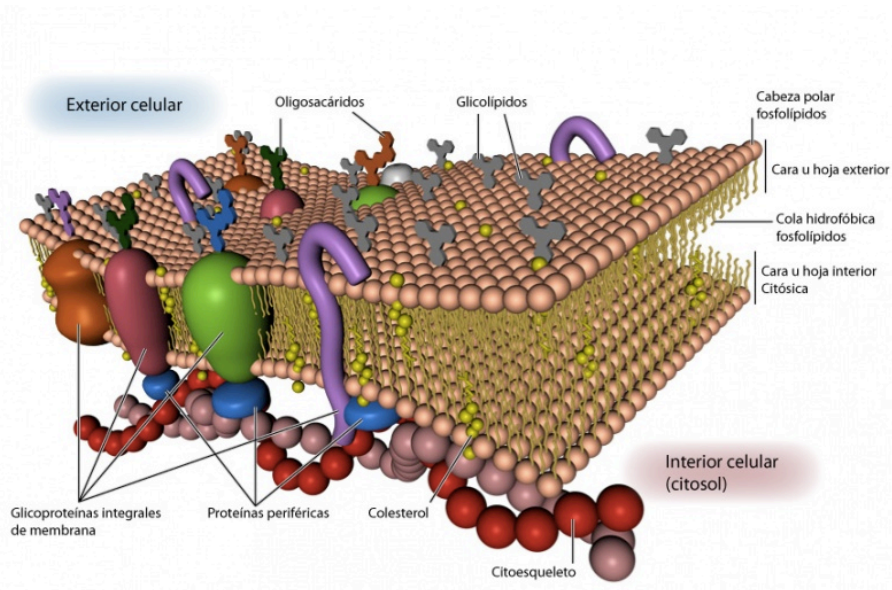


Figura 1-5. Membrana lipídica (15).

Las principales características de esta membrana son su espesor, una micra superior al resto de membranas biológicas (16) y su composición química, ya que posee un elevado contenido de proteínas (con una relación proteína/lípido tres veces superior a la normal), lo que indica la existencia de enzimas y proteínas transportadoras. La proporción lipídica también es distinta a otras membranas.

Presentan proporciones esfingomielina/lecitina de 30% y colesterol/fosfolípidos de un 20%, que son superiores a las del resto. Además se encuentra una elevada proporción de glicolípidos (54%) debido a la existencia del glicocáliz que es rico en mucopolisacáridos (17).

c) Interfase membrana-plasma

El xenobiótico debe atravesar distintos elementos que componen esta interfase, desde el interior de la célula columnar hasta llegar al plasma sanguíneo.

Al parecer, parte de las moléculas quedan retenidas en las estructuras subcelulares, pero esta retención no influye en la difusión del soluto en el interior de la célula. En este espacio se puede producir interacción con enzimas

biotransformadoras que pueden modificar o inactivar el soluto. La membrana basal presenta una resistencia a la penetración de los solutos mucho menor que la observada para la membrana apical (18). En esta membrana también se localizan transportadores de diferentes características pero en menor cantidad.

Una vez atravesada la membrana basal, el camino difusional no encuentra grandes obstáculos ya que la trama capilar está muy próxima y los endotelios capilares, altamente porosos, no ofrecen resistencia a la difusión de solutos a su través.

2.2. Mecanismos especializados de transporte

La existencia de estructuras, generalmente de naturaleza proteica, es lo que hace posible los mecanismos especializados de transporte; ya que dichas estructuras son capaces de transportar el soluto de un lado a otro de la membrana.

El transporte se caracteriza por la unión específica entre la sustancia a transportar y la proteína, cuya traslocación provoca el paso del compuesto a través de la membrana y es un mecanismo con un papel fundamental en la absorción oral y la biodisponibilidad de fármacos y en otros contextos como la resistencia a fármacos (19, 20), excreción y metabolitos en hígado y riñón, toxicidad de algunos fármacos (21) y en algunas características farmacocinéticas y farmacodinámicas de otros (22-24).

2.2.1. Tipos de transporte especializado

2.2.1.1. Difusión facilitada

Se denomina también difusión mediada por portadores, ya que aunque se realiza mediante proteínas específicas de membrana, no requiere consumo de energía metabólica.

Las moléculas que no pueden cruzar la membrana por libre difusión, pueden hacerlo por la acción de proteínas transmembrana específicas, que actúan como transportadoras. Existen dos tipos de proteínas transportadoras: las proteínas canales, que una vez abiertas, forman pequeños poros a través de los cuales los iones de tamaño y carga apropiada pueden cruzar la membrana por difusión libre; y las proteínas carriers o acarreadoras que se unen a moléculas específicas y luego sufren cambios conformacionales abriendo canales a través de los cuales las moléculas que van a ser transportadas pueden pasar a través de la membrana y ser liberadas luego del otro lado.

Los sistemas de cotransporte se pueden clasificar en (25):

- **Simporte:** transporte simultáneo de dos moléculas en la misma dirección.
- **Antiporte:** transporte simultáneo de dos moléculas en direcciones opuestas.

Es un proceso rápido y presenta una considerable especificidad por el sustrato. Las proteínas transportadoras son a menudo inducibles y la velocidad de transporte sigue una cinética de Michaelis-Menten (25).

2.2.1.2. Transporte activo

Se produce de forma unidireccional, en contra de gradiente electroquímico y de concentración. Es el transporte neto de un soluto en contra de un gradiente de concentración, no puede producirse espontáneamente, sino que requiere una fuente de energía para conducir un soluto a través de la membrana celular desde un compartimento de baja concentración a uno de alta. Es necesaria la participación de proteínas integrales de membrana. La unión entre sustrato y transportador es específica y dado que existe un número determinado de los mismos, el proceso es saturable.

El transporte activo se divide en subtipos según la energía necesaria para producirlo y el sentido del transporte. Así:

a) Según la fuente de energía utilizada para producirlo (26):

- **Transporte activo directo:** La energía deriva directamente del la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP).
- **Transporte activo indirecto:** Transporte facilitado donde la molécula cotransportada pasa a través de la membrana a favor de un gradiente de concentración iónico entre ambos lados, generado previamente por un transporte activo directo.

b) Según el sentido del transporte en el lumen intestinal:

- **Transporte activo de absorción (influx):** Las proteínas que intervienen transportan el fármaco a través de la membrana en sentido lumen-sangre. Las proteínas de la familia MRP actúan de este modo, excepto las MRP2.
- **Transporte de secreción o efflux:** Las proteínas que intervienen impiden el paso de fármaco a través de la membrana, devolviendo al lumen intestinal las moléculas de fármaco que atraviesan la membrana del enterocito. Como resultado, la absorción es menor de la esperada. Las principales proteínas de membrana implicadas en este tipo de transporte son la Glicoproteína-P y MRP2.

2.2.2. Transportadores

Los transportadores de membrana se encuentran en numerosos epitelios, entre ellos la membrana intestinal, que se caracteriza por gran riqueza y diversidad de los mismos. En concreto, el intestino delgado presenta numerosas estructuras que actúan como transportadores específicos de sustancias tales como nutrientes (azúcares, vitaminas, aminoácidos y ácidos biliares) y compuestos estructuralmente relacionados (27). Estas proteínas portadoras se encuentran en las membranas luminales y/o basales de los enterocitos y pueden facilitar el paso de sustancias a la zona citosólica o serosa. Por tanto, pueden condicionar la absorción o la secreción de sus sustratos.

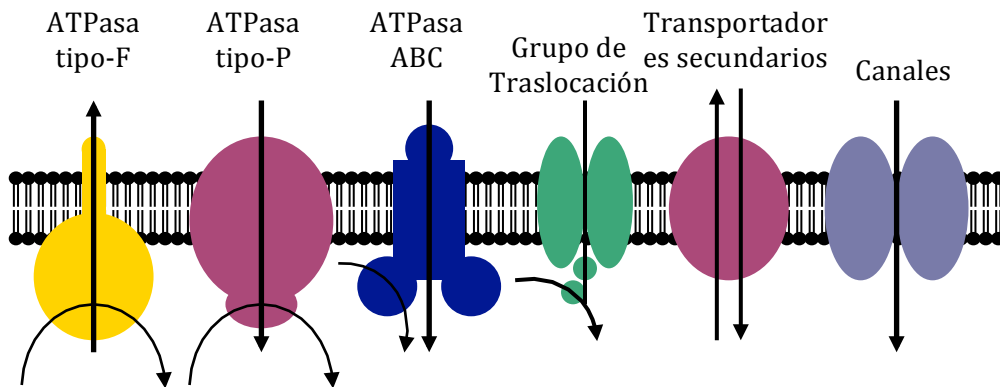


Figura 1-6. Esquema de los transportadores intestinales

Debido a su importancia y al número cada vez mayor de proteínas transportadoras identificadas, es necesario recurrir a su clasificación, que puede hacerse bien en función de su mecanismo de funcionamiento, en función del tipo de soluto transportado o según el origen filogenético. Cada vez son más las fuentes monográficas en las que se obtiene información sobre las diferentes clasificaciones establecidas, la mayoría accesible a través de páginas web. Entre ellas destaca:

- HUGO Human Gene Nomenclature Committee (<http://www.genenames.org>)

Este comité es la institución encargada de asignar el nombre oficial de estas proteínas y clasificarlas en superfamilias genéticas denominadas SLC (Solute Carrier) y ABC (ATP- binding cassette). Se conocen 55 familias dentro de SLC, con 362 miembros que aumentan rápidamente (28). La superfamilia ABC comprende 7 familias con 49 miembros; en la clase B de la misma se encuentra la Glicoproteína-P (ABCB1) que deriva del gen de multirresistencia a fármacos

(MDR1), mientras que la clase C presenta miembros de la subfamilia de proteínas de resistencia a fármacos (MRP).

Inicialmente se estudiaron con detalle los transportadores responsables de la absorción intestinal de sustancias con gran relevancia biológica como aminoácidos, dipéptidos y glucosa. Se demostró su dependencia con la energía y la especificidad para el sustrato, y más tarde surgieron numerosos estudios en los que se puso de manifiesto su contribución a la absorción de distintas sustancias con actividad terapéutica. En todos ellos se demuestra, por una parte, el carácter no lineal de la cinética de absorción y, por otra, la competencia que provoca la presencia simultánea de sustratos similares desde el punto de vista estructural. Ambas características apuntan hacia el carácter saturable y selectivo de estos fenómenos.

Al profundizar en estos fenómenos se hizo patente la ubicación de estas moléculas que se hallan relacionadas con otros procesos, como la excreción renal, excreción biliar o el paso a través de la barrera hematoencefálica. El aspecto común en estos procesos es el transporte saturable y específico a través de una membrana.

Si nos restringimos al ámbito de este trabajo es necesario señalar que ya en la década de los 90, se identificaron distintos portadores de membrana que actúan en el sentido inverso a los citados, es decir, generar un flujo de secreción desde el enterocito hacia el lumen intestinal (29).

Entre las proteínas transmembrana de transporte activo destaca la llamada superfamilia de transportadores ABC (ATP-binding cassette). Dentro de esta gran superfamilia destacan:

- Glicoproteína-P, también llamada MDR1.
- Subfamilia de proteínas de resistencia a fármacos, MRP.

En la Figura 1-7 se esquematiza la localización de los transportadores mejor estudiados en las membranas de los enterocitos intestinales y el sentido en el que realizan el transporte.

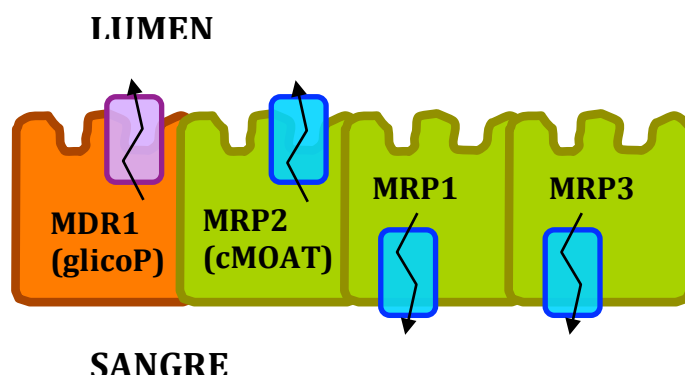


Figura 1-7. Esquema de localización de los transportadores MDR y MRP en la membrana del enterocito

Como se observa, la Glicoproteína-P y el portador MRP2 son capaces de realizar un proceso de secreción activa hacia el lumen intestinal y, por tanto, podrán interferir en la absorción de xenobióticos, reduciéndola.

2.2.2.1. Glicoproteína-P

La Glicoproteína-P (P-gp) fue descubierta en varios tumores celulares como causante de las resistencias a fármacos. Sin embargo, la Glicoproteína-P es altamente expresada en diversos tejidos como el tracto gastrointestinal, hígado, riñón, células de los capilares del endotelio cerebral y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Se halla también en linfocitos CD4 y CD8 y se ha observado que su expresión aumenta cuando éstos son estimulados. Su presencia se ha detectado también en páncreas, pulmón, corazón, glándulas adrenales, testículos, útero, médula ósea, así como en otras células del sistema inmunitario: "Natural killer" y linfocitos B (30-33).

La Glicoproteína-P posee un peso molecular de 170 kD (30, 34) y su modelo topológico se representa en la figura 1-8.

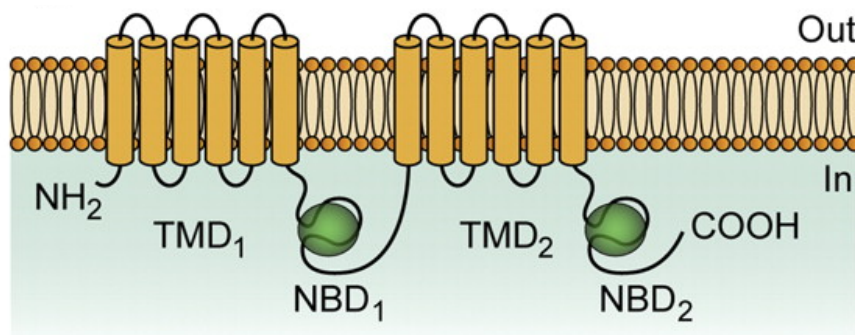


Figura 1-8. Modelo topológico de la Glicoproteína-P (35)

La Glicoproteína-P está codificada por genes que pertenecen al sistema de multirresistencia a fármacos (MDR). La Glicoproteína-P codificada por el gen MDR1 está ligada a la capacidad detoxificadora frente a fármacos, mientras que la codificada por el gen MDR2 parece estar involucrada en el transporte hepático de fosfolípidos (36).

Se cree que la principal función de la P-gp es proteger al organismo frente a fármacos y tóxicos, dificultando su absorción, aumentando su eliminación del organismo a través de hígado y riñón, y dificultando su penetración en diversos compartimientos del organismo.

La P-gp presenta polimorfismo genético. Se han hallado polimorfismos en 27 posiciones del gen MDR-1 (ó ABCB1), que codifica por la P-gp. Muchos de estos polimorfismos se hallan relacionados entre sí. El más importante es el polimorfismo C/T en el exon 26 (C3435T). Se ha observado una correlación

significativa entre este polimorfismo y la expresión de la P-gp. En un estudio, los pacientes homocigóticos T en la posición 3435 presentaron niveles plasmáticos de NFV menores en comparación con los homocigóticos C (37). Sin embargo, los estudios realizados hallan datos contradictorios. Mientras que unos autores indican que los individuos homocigóticos T en la posición 3435 presentan un mayor funcionalismo de la P-gp (38), otros autores demuestran el efecto contrario (39). Se cree que ello puede ser debido a la presencia de algún tipo de regulación a través de promotores, todavía no identificada, de la zona del gen donde se halla esta región polimórfica. Los individuos de raza africana presentan una menor frecuencia de genotipo T/T y una mayor frecuencia del genotipo C/C que los de raza caucásica.

En general se ha visto que la mayoría de los sustratos de la Glicoproteína-P son moléculas hidrofóbicas que contienen un átomo de nitrógeno básico y dos anillos aromáticos planares. El peso molecular de los sustratos de la Glicoproteína-P se encuentra entre 300 y 2000 Daltons (40). Numerosos estudios han intentado establecer una relación entre estructura e interacción, pero se enfrentan a la dificultad de que se han descrito tres mecanismos de interacción con la Glicoproteína-P (41) y que la metodología de trabajo varía mucho de unos autores a otros. Los mecanismos descritos hasta la fecha son (42, 43):

- Interacción directa con uno o más de los sitios de unión, actuando como inhibidor competitivo o no competitivo.
- Interacción con el ATP, ya sea inhibiendo la unión de éste, su formación o su acoplamiento en la translocación del sustrato.
- Interacción con la membrana lipídica de las células, ya sea por modificación del entorno celular o por interacción de la unión fármaco-membrana.

La resistencia oncológica a múltiples agentes antineoplásicos se considera una de las mayores causas de fallo clínico en el tratamiento quimioterápico de pacientes con cáncer. El mecanismo de resistencia consiste en una disminución en la acumulación intracelular de fármaco por sobreexpresión de la Glicoproteína-P (P-gp). Esta proteína actúa como una bomba extrusora de fármaco (transportador de secreción), dependiente de energía. La secreción se realiza a través de un canal que forma en la membrana plasmática.

2.2.2.2. Sistema de resistencia múltiple a fármacos (MRP)

Actualmente hay 49 miembros conocidos de la familia de transportadores ABC clasificados en 7 subfamilias. Esta clasificación se puede encontrar en la página web: <http://nutrigene.4t.com/humanabc.htm>. (44)

Los transportadores MRP forman parte de la familia de transportadores ABC. En la tabla 1-1 se especifican las diferentes subfamilias en las que se clasifican los transportadores ABC (45).

ABC1 Superfam. A	MDR /TAP Superfam. B	MRP /CFTR Superfam. C	ALD Superfam. D	OABP Superfam .E	GCN₂₀ Superfam .F	White Superfam. G
ABCA1	ABCB1 (MDR1 o P-GP)	ABCC1 (MRP1)	ABCD1 (ALDP)	ABCE1 (OABP)	ABCF1	ABCG1
ABCA2		ABCC2 (MRP2 o cMOAT)	ABCD2 (ALDR)		ABCF2	ABCG2 (BCRP)
ABCA3	ABCB2 (TAP1)				ABCF3	
ABCA4	ABCB3 (TAP2)	ABCC3 (MRP3)	ABCD3			ABCG4
ABCA5						ABCG5
ABCA6	ABCB4 (MDR3)	ABCC4 (MRP4)	ABCD4			ABCG8
ABCA7	ABCB5	ABCC5 (MRP5)				
ABCA8	ABCB6					
ABCA9	ABCB7	ABCC6 (MRP6)				
ABCA10	ABCB8	ABCC7 (CFRT)				
ABCA12	ABCB9					
ABCA13	ABCB10	ABCC8 (SUR1)				
	ABCB11 (BSEP o SPGP)	ABCC9 (SUR2)				
		ABCC10 (MRP7)				
		ABCC11 (MRP8)				
		ABCC12 (MRP9)				
		ABCC13				

Tabla 1-1. Clasificación de la familia de transportadores ABC es subfamilias (45)

Hasta la fecha se han caracterizado trece miembros en la subfamilia ABCC, todos ellos proteínas transmembrana con un peso molecular aparente de 190 kDa.

Se pueden dividir en dos grupos según tengan o no el dominio transmembrana 0 (TMD0 o MSD0) (46).

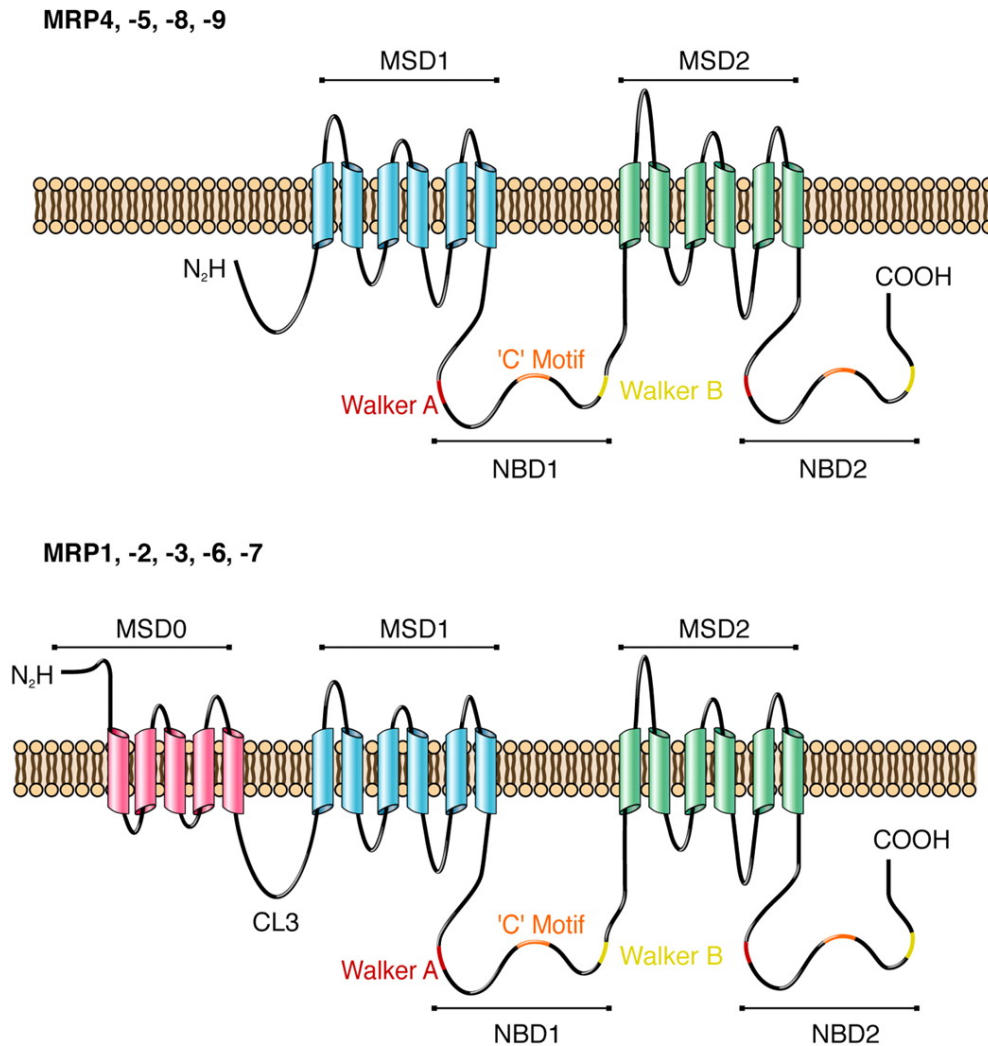


Figura 1-9. Modelos topológicos de membrana para MRPs (46)

La relación entre la topología de la membrana y la actividad del transporte no está totalmente demostrada. Se sabe, por ejemplo, que para la proteína MRP1 el dominio TMD0 es independiente de la actividad del transporte (47).

En el intestino destaca especialmente la presencia de MRP2 (también llamado ABCC2 o cMOAT) y CFTR (también llamado ABCC7). En cuanto a su localización celular se ha podido observar, utilizando monocapas polarizadas de células renales, que MRP2 se sitúa en la membrana apical (33).

En la Figura 1-10 se muestra la localización subcelular de la familia MRP. En la célula izquierda están representadas las MRPs con tres TMD y en la célula de la derecha las MRPs con dos TMD (46).

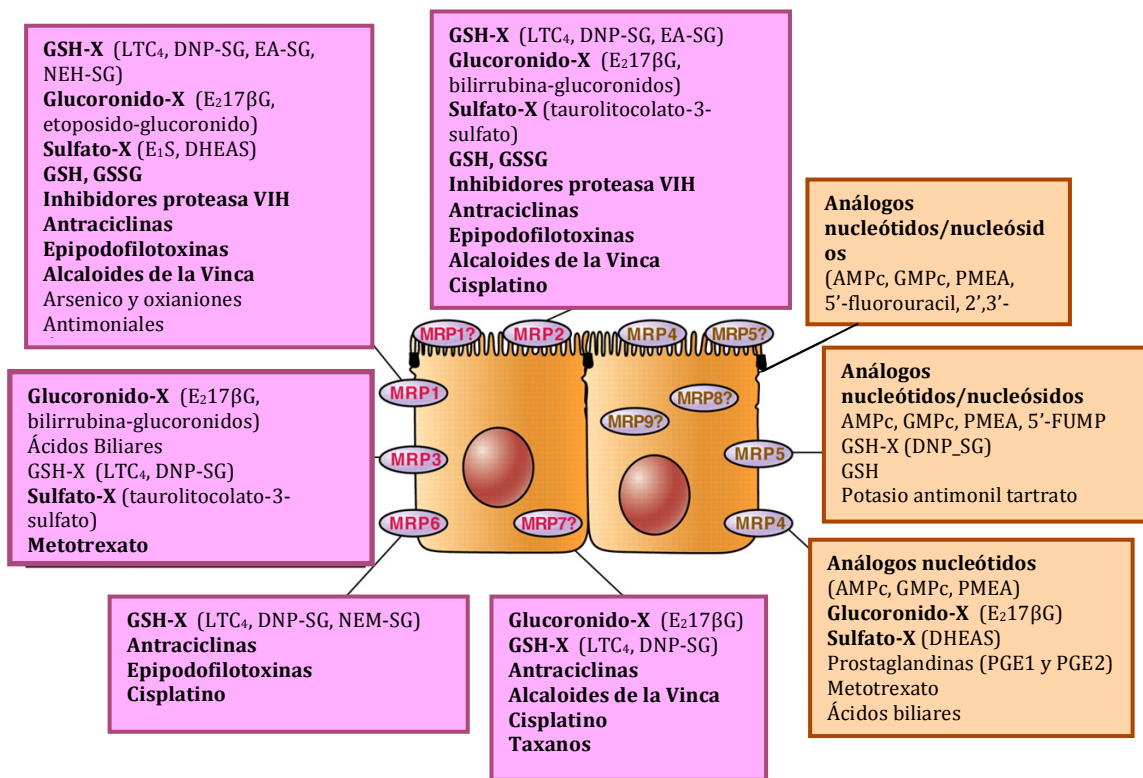


Figura 1-10. Localización subcelular y sustratos específicos de las MRPs (46).

Se muestra la posición subcelular de cada MRP sobre la membrana apical o basolateral. La presencia de una MRP en ambas ubicaciones indica que la célula presenta diferencias específicas en la distribución subcelular. En el caso de las MRPs 7, 8 y 9 el signo de interrogación indica que se desconoce su localización subcelular exacta (46).

En la tabla 1-2 se detalla la nomenclatura y distribuciones de la familia de transportadores MRP (48).

Familia MRP	Familia ABCC	Otros nombres	Distribución
MRP1	ABCC1	MRP	Pulmón y la mayoría de tejidos
MRP2	ABCC2	cMOAT EBCR	Hígado, intestino delgado y riñón
MRP3	ABCC3	MOAT-D MLP-2	Riñón, intestino delgado, colon, páncreas y vesícula biliar
MRP4	ABCC4	MOAT-B	La mayoría de tejidos
MRP5	ABCC5	MOAT-C	La mayoría de tejidos y cerebro
MRP6	ABCC6	MOAT-E MLP-1 ARA	Riñón e hígado
CFTR	ABCC7		Pulmón, intestino y colangiocitos
SUR1	ABCC8		Páncreas
SUR2	ABCC9		Corazón
MRP7	ABCC10		Colon, piel y testículos
MRP8	ABCC11		Mama y testículos
MRP9	ABCC12		Mama y testículos
MRP10*	ABCC13		Colon, glándulas salivares, médula ósea y en hígado fetal

Tabla 1-2. Nomenclatura y distribución de los transportadores MRP (*nombre no confirmado).

3. Parámetros de absorción

La mayoría de los modelos experimentales evalúan la absorción intestinal, tanto en magnitud como en velocidad, a partir de datos de concentración remanente en lumen a distintos tiempos. Según el diseño resulta más conveniente obtener un tipo u otro de parámetro representativo del fenómeno de desaparición del soluto en estudio. Los parámetros más utilizados son la constante de velocidad de absorción de primer orden y el coeficiente de permeabilidad.

Existe además la opción de cuantificar la aparición del soluto en estudio en sangre portal. Es una estimación más precisa del fenómeno de la absorción pero presenta inconvenientes de tipo experimental.

3.1. Constante de velocidad de absorción

La constante de absorción o constante de velocidad de absorción intrínseca, k_a , es el parámetro que rige la velocidad a la que se absorbe un compuesto en condiciones estandarizadas y reproducibles, generalmente en animales de experimentación como sustrato biológico, tras aislar convenientemente el lugar de absorción (algún tramo o todo el tracto intestinal). Al caracterizar este parámetro,

se debe evitar que la disolución del soluto a ensayar sea un factor limitativo de la absorción, para ello éste debe estar totalmente disuelto.

El valor de la constante de absorción intrínseca está condicionado por los siguientes factores:

- Factores característicos de la técnica experimental: área superficial de la membrana absorbente, pH de la solución, grado de agitación, temperatura de la zona y viscosidad del medio. Si la técnica experimental está convenientemente estandarizada, estos factores pueden considerarse constantes.
- Factores característicos del fármaco: lipofilia intrínseca (afinidad de la molécula hacia la membrana absorbente), peso, volumen y área molecular y la configuración espacial y electrónica; que determinan su coeficiente de difusión tanto en el medio acuoso como en el lipídico. Esta última condiciona además, su interacción con transportadores.

El valor de k_a se calcula por ajuste de las concentraciones remanentes en el lugar de absorción frente al tiempo, asumiendo una cinética de primer orden.

La ecuación 1-1 muestra la relación entre la constante de velocidad de absorción y el coeficiente de permeabilidad (P_{eff})

$$P_{eff} = k_a \cdot r/2 \quad (1-1)$$

donde r es el radio del intestino.

B. Sistema de Clasificación Biofarmacéutico

Al aplicar la primera Ley de Fick de difusión a la membrana intestinal se puede escribir:

$$J = \frac{1}{A} \cdot \frac{\partial M}{\partial t} = P_{eff} \cdot C_s \quad (1-2)$$

donde, J representa el transporte de fármaco a través del intestino, P_{eff} es la permeabilidad efectiva del fármaco, C_s es la concentración del fármaco en el lumen intestinal y A es la superficie del intestino. De acuerdo con esta ecuación, la permeabilidad y la solubilidad son los factores que determinan el transporte del fármaco a través de la membrana intestinal (49). Si se considera la Ley de Fick para definir los factores que determinan la biodisponibilidad de un fármaco administrado por vía oral, se puede establecer que la velocidad de absorción de un fármaco depende de su permeabilidad a través de la membrana y de su concentración en el lumen. La cantidad total de fármaco que se absorbe depende

de estos mismos factores y del tiempo que permanece el fármaco disponible para su absorción. A su vez, la concentración del fármaco en el lumen depende de su solubilidad y de la velocidad de disolución *in vivo*.

Por lo anteriormente expuesto se puede afirmar que dos formas farmacéuticas orales de liberación inmediata, que contengan el mismo principio activo y tengan los mismos perfiles de concentración en función del tiempo en el lumen intestinal, tendrán la misma velocidad y grado de absorción. Para que esta premisa se cumpla ninguno de los componentes de las formulaciones puede afectar la permeabilidad de la membrana o el tiempo de tránsito intestinal y ambas formulaciones deben tener el mismo perfil de disolución en todas las condiciones luminales.

Siendo la solubilidad y la permeabilidad los principales factores que determinan la absorción de fármacos por vía oral, el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB) clasifica los fármacos en función de su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal (figura 1-11). El SCB clasifica los fármacos en alta y baja solubilidad y alta y baja permeabilidad (50). Inicialmente se consideraba que un fármaco es de alta solubilidad cuando su dosis más alta es soluble en un vaso de agua (250 mL) a pH entre 1 y 7,5; y de alta permeabilidad cuando su grado de absorción, determinada experimentalmente, es igual o mayor que 90% (51).

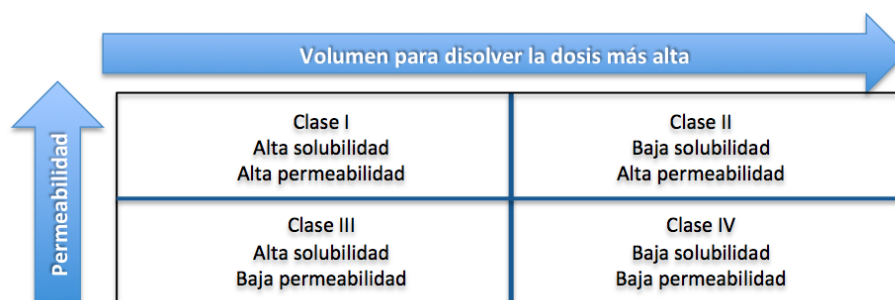


Figura 1-11. Clasificación de los fármacos según SCB.

El SCB establece tres números adimensionales para caracterizar un fármaco: número de absorción (An), número de dosis (Do) y número de disolución (Dn).

El número de absorción es la relación entre la permeabilidad (P_{eff}), el radio del intestino (R) y el tiempo de residencia (T_{res}). Este número también puede expresarse como la razón entre el tiempo de residencia y el tiempo de absorción (T_{abs}), como se muestra en la ecuación 1-3.

$$An = \frac{P_{eff}}{R} \cdot \langle T_{res} \rangle = \frac{\langle T_{res} \rangle}{\langle T_{abs} \rangle} \quad (1-3)$$

Como se puede deducir de la ecuación anterior, los compuestos con altos valores de permeabilidad se absorben en corto tiempo y por tanto se absorberán completamente durante su tránsito intestinal, siempre que no existan factores que modifiquen su liberación desde la forma farmacéutica o su solubilidad.

La fracción absorbida (F) de una solución sigue una función exponencial y se puede calcular según la ecuación 1-4 que establece la relación entre fracción absorbida y número de absorción.

$$F = 1 - e^{-2An} \quad (1-4)$$

El número de dosis es la relación entre la concentración que tiene la dosis en el lumen intestinal y la solubilidad del fármaco (ecuación 1-5).

$$D_0 = \frac{D/250}{C_s} \quad (1-5)$$

Donde, D es la dosis del fármaco, 250 es el volumen de agua con que se administra la dosis al paciente, que usualmente es un vaso de agua, y C_s es la solubilidad del fármaco.

Cuando un fármaco posee una alta solubilidad, la disolución no está limitada por la solubilidad y, por tanto, la absorción no depende de estos factores.

En fármacos cuya solubilidad y permeabilidad es alta, quien controla la velocidad de absorción es el vaciamiento gástrico.

El número de disolución es la relación entre el tiempo de residencia y el tiempo de disolución (T_{diss}). El tiempo de disolución depende de la solubilidad (C_s), la difusividad (D), densidad (ρ) y radio inicial de las partículas (r) (ecuación 1-6).

$$Dn = \left(\frac{3D}{r^2}\right) \cdot \left(\frac{C_s}{\rho}\right) \cdot \langle T_{res} \rangle = \frac{T_{res}}{T_{diss}} \quad (1-6)$$

Una disolución rápida asegura que la disolución *in vivo* no es el factor limitante del proceso de absorción (49).

1. Bioexenciones basadas en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.

Una **bioexención** es la posibilidad de sustituir el ensayo de bioequivalencia *in vivo* por datos obtenidos en ensayos de disolución *in vitro*. Se aplica a formas farmacéuticas orales sólidas de liberación inmediata con acción sistémica y consiste en el estudio comparativo de los perfiles de disolución *in vitro* entre la formulación que se ensaya y el producto de referencia.

En principio, las bioexenciones fueron usadas por los fabricantes de los productos innovadores, cuando éstos necesitaban demostrar que cambios post-registro o de escala, no afectaban el desempeño de las formulaciones. Posteriormente, se aceptaron también para la aprobación de productos genéricos que contienen principios activos con ciertas características de solubilidad y permeabilidad, lo que supone una reducción de los estudios realizados *in vivo* y en consecuencia, una disminución tanto en los gastos de investigación de los genéricos como en la repercusión ética que tienen los estudios en humanos.

El SCB ha proporcionado una sólida base científica para decidir cuándo los estudios de bioequivalencia *in vitro* son suficientes o incluso más discriminativos que los estudios *in vivo*. Amidon y colaboradores defienden que para los fármacos clase I y III, los ensayos de disolución pueden aportar inclusive mayor evidencia de bioequivalencia que los estudios *in vivo*, ya que en estos últimos se pueden producir variaciones en los niveles plasmáticos del fármaco que pueden deberse a modificaciones en el tránsito intestinal y gástrico, no permitiendo observar las diferencias entre las formulaciones a comparar (52).

Según el SCB en aquellas formulaciones sólidas de liberación inmediata que contengan fármacos de alta solubilidad (clase I y III), que disuelvan al menos el 85% de la sustancia activa en 15 minutos o menos, se puede asegurar que la biodisponibilidad del fármaco no está limitada por la disolución; en esos casos, el paso limitante de la velocidad de absorción es el vaciado gástrico (53).

La Food and Drug Administration (FDA) contempla las bioexenciones basadas en el SCB para productos administrados por vía oral, que se disuelvan rápidamente ($\geq 85\%$ en 15 minutos) y contengan fármacos altamente solubles y altamente permeables. Se recomienda que se estudien los perfiles de disolución a pH 1,2; 4,5 y 6,8 (54).

La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) establece en la guía sobre investigación en bioequivalencia que pueden optar a la bioexención basada en el SCB aquellos fármacos altamente solubles con absorción en humanos conocida y que no sean de estrecho margen terapéutico. La bioexención se aplica a formas farmacéuticas sólidas de liberación inmediata y acción sistémica que tengan la misma forma farmacéutica que el innovador y siempre que cumplan con las siguientes condiciones:

- Principios activos con alta solubilidad y alta absorción (clase I) cuyas formulaciones presenten muy rápida ($\geq 85\%$ en 15 minutos) o rápida ($\geq 85\%$ en 30 minutos) disolución *in vitro* y que los perfiles entre el producto de referencia y la formulación ensayada sean similares a pH 1,2; 4,5 y 6,8. Los excipientes que pueden afectar la biodisponibilidad deben ser cualitativa y cuantitativamente los mismos. En general, se prefiere que los excipientes usados sean los mismos y en cantidades similares.
- Principios activos con alta solubilidad y baja absorción (clase III) cuyas formulaciones presenten muy rápida disolución *in vitro* y que los perfiles

entre el producto de referencia y la formulación ensayada sean similares a pH 1,2; 4,5 y 6,8. Los excipientes que pueden afectar la biodisponibilidad deben ser cualitativa y cuantitativamente los mismos y los demás excipientes deben ser cualitativamente los mismos y cuantitativamente muy similares (55).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera las bioexenciones basadas en el SCB para formas de dosificación orales bajo las siguientes condiciones:

- Formas de dosificación que contengan fármacos altamente solubles y altamente permeables (clase I) cuando la formulación presenta rápida velocidad de disolución (al menos 85% de fármaco disuelto en 30 minutos) y los perfiles del producto multifuente y del producto de referencia son similares a pH 1,2; 4,5 y 6,8. Si el producto multifuente y el de referencia son de muy rápida velocidad de disolución (al menos 85% de fármaco disuelto en 15 minutos) se consideran equivalentes sin ser necesaria la comparación de sus perfiles.
- Formas de dosificación con fármacos altamente solubles y poco permeables (clase III). Se recomienda que tanto el producto de referencia como el producto multifuente tengan una muy rápida velocidad de disolución. Para esta clase de principios activos recomienda una evaluación más exhaustiva cuando el grado de absorción sea bajo, el sitio de absorción del fármaco está restringido a la región proximal del intestino o cuando el mecanismo de absorción sufre inhibición/competición.
- Formas de dosificación con fármacos de alta solubilidad a pH 6,8; pero baja solubilidad a pH 1,2 y 4,5 y con alta permeabilidad (algunos fármacos de la clase II con propiedades de ácido débil). En este caso recomienda que el producto multifuente sea de rápida velocidad de disolución a pH 6,8 y que presente perfiles de disolución similares al producto de referencia a pH 1,2; 4,5 y 6,8.

Con respecto a los excipientes recomienda como regla general que las composición del producto multifuente y el producto de referencia sean muy similares para así disminuir el riesgo de una decisión inapropiada de bioequivalencia por una bioexención basada en el SCB (56).

Tsume y colaboradores han propuesto una subclasificación dentro del SCB de las clases II y IV (57) en la que se considera si un fármaco es ácido (a), base (b) o neutro (c). En la tabla 1-3 se observa la clasificación propuesta.

Subclasificación SCB	Solubilidad a pH 2	Solubilidad a pH 6,5	Permeabilidad
I	Alta	Alta	Alta
IIa	Baja	Alta	Alta
IIb	Alta	Baja	Alta
IIc	Baja	Baja	Alta
III	Alta	Alta	Baja
IVa	Baja	Alta	Baja
IVb	Alta	Baja	Baja
IVc	Baja	Baja	Baja

Tabla 1-3. Subclasificación del SCB según la solubilidad, permeabilidad y pKa de los fármacos.

En esta subclasificación se considera el pKa del fármaco y de acuerdo a ello, los fármacos con pKa menor a 5 pertenecen a la subclase “a”, los que tengan un pKa mayor que 6 son de la subclase “b” y lo que no posean pKa o un pKa menor que 0 o mayor que 8, son de la subclase “c”. Las subclases propuestas se basan en las propiedades de los fármacos y pueden ser usadas en el desarrollo de métodos de disolución predictivos del comportamiento *in vivo* y de metodologías para predecir la absorción.

Los fármacos de la subclase IIa son clasificados como de baja solubilidad debido a su poca solubilidad a pH gástrico, sin embargo, podrían comportarse de manera similar a los fármacos de la clase I. Así, los ácidos débiles de la subclase IIa pueden ser completamente absorbidos por su alta permeabilidad, además de su alta solubilidad y rápida disolución en el intestino delgado y grueso; y suficiente tiempo de residencia a lo largo del intestino. Por ello, una forma farmacéutica sólida de liberación inmediata de un fármaco tipo ácido débil con pKa menor o igual a 5 y de alta permeabilidad, tendría suficiente tiempo para disolverse y absorberse completamente y por tanto podría optar a una bioexención con una base científica sólida.

Las bases débiles que pueden ser clasificadas como IIb presentan alta solubilidad en el estómago y tramo proximal del intestino delgado pero baja solubilidad en la porción distal del intestino delgado, ciego e intestino grueso. Los fármacos con estas características pueden precipitar cuando alcanzan la zona distal del intestino, ya que pasan de un medio que favorece su disolución (estómago) a condiciones menos favorables. Los factores que determinan la absorción de este tipo de fármacos son la velocidad de vaciado gástrico, la permeabilidad y la precipitación.

Para los fármacos neutros (IIc) la solubilidad no está condicionada por cambios en el pH del tracto gastrointestinal, aunque la desintegración y disolución podrían verse afectadas por el medio gástrico. La solubilidad del fármaco y la velocidad de disolución se ven determinadas por el tamaño de las partículas, así como por la distribución en el tamaño de éstas, factores inherentes a la formulación y la condiciones del entorno luminal. Este grupo de fármacos pueden

presentar alto grado de absorción en el ciego y colon debido a que gran cantidad del fármaco alcanza esta zona del intestino (57).

1.1. Modelos experimentales para determinar la permeabilidad intestinal

De acuerdo a la FDA, un fármaco es considerado altamente permeable cuando el grado de absorción en humanos es igual o mayor del 90% de la dosis administrada, determinado mediante un estudio de balance de masas o en comparación con una dosis intravenosa de referencia, siempre que se demuestre que el fármaco es estable en el tracto gastrointestinal (58). La EMA coincide con las recomendaciones de la OMS y marcan en 85% el grado de absorción que debe presentar un fármaco para que sea considerado altamente permeable (55, 56).

Hay métodos alternativos que pueden ser usados para la determinación de la permeabilidad de los fármacos. Estos métodos incluyen el método de perfusión en humanos *in vivo*, métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro* en modelo animal y el modelo *in vitro* a través de monocapas de células epiteliales cultivadas (56, 58). En estos métodos, se clasifica un fármaco como altamente permeable cuando su permeabilidad es igual o mayor que la de un estándar interno con alta permeabilidad. El método deber ser desarrollado, validado y demostrar que es adecuado para el establecimiento de la permeabilidad de fármacos, con el uso de varios fármacos modelo y el de un control negativo. La FDA sugiere una lista de fármacos que pueden ser usados como modelo (58).

El Metoprolol ha sido ampliamente usado como límite para clasificar los fármacos según su permeabilidad, aunque algunos autores consideran que es una referencia conservadora para clasificar entre alta y baja permeabilidad. El Metoprolol ha sido estudiado con la técnica de intubación en humanos, demostrando que es un fármaco que se absorbe bien tanto en duodeno como en yeyuno. La fracción de dosis absorbida de Metoprolol está muy bien documentada en estudios realizados mediante la excreción del fármaco y metabolitos radiomarcados, después de su administración oral e intravenosa (59).

1.1.1. Determinación de la permeabilidad en humanos

a.) Métodos indirectos

- *Estudio farmacocinético de balance de masas*: es un estudio farmacocinético completo que se realiza con el fármaco radiomarcado. Se realiza en voluntarios sanos a los que se les administra por vía oral el fármaco y luego se recolectan muestras de sangre, orina y heces a fin de cuantificar el fármaco y sus metabolitos en todas las muestras biológicas obtenidas de cada voluntario (60).

- *Estudio de biodisponibilidad absoluta*: en este tipo de estudios se compara la biodisponibilidad de un fármaco administrado por vía oral con los datos de una dosis intravenosa, obteniéndose información útil sobre la distribución y eliminación del fármaco e indirectamente se determina la permeabilidad oral y la influencia de enzimas y transportadores presistémicos. El fármaco puede estudiarse en plasma sanguíneo o en orina y debe conocerse con exactitud los metabolitos que se pueden encontrar en la muestra biológica estudiada. El método analítico debe ser adecuado para cuantificar tanto el fármaco como los metabolitos. La razón entre el área bajo la curva de la dosis oral y la dosis intravenosa, permite el cálculo de la biodisponibilidad absoluta del fármaco administrado por vía oral (61).

b.) Método directo

El estudio directo de la permeabilidad en humanos, se realiza mediante la perfusión de un solo paso sin recirculación de la región del intestino donde se quiere conocer la permeabilidad de un fármaco. La determinación de la permeabilidad se basa en el cálculo de la absorción intestinal como función de la desaparición de un fármaco en el segmento estudiado, por lo que la permeabilidad intestinal reflejará la velocidad de transporte a través de la barrera epitelial del intestino, expresada en centímetros por segundo (62).

1.1.2. Determinación de la permeabilidad en modelos *in vitro*

a.) Ensayo de permeabilidad de Membrana Artificial Paralela (PAMPA)

En esta técnica se utiliza una membrana artificial para simular el comportamiento de la membrana celular y se emplea para predecir la absorción transcelular pasiva (63). En esta técnica se utiliza una placa de microvaloración con numerosos insertos de naturaleza hidrofóbica como soporte y una membrana de permeación de los compuestos en estudio formada por una mezcla de lecitina y un disolvente orgánico inerte (64).

Es un sistema que permite realizar ensayos múltiples, por lo que su principal ventaja es la posibilidad de investigar numerosos compuestos por día. La desventaja que presenta es que proporciona una clasificación sencilla de los solutos estudiados en baja, media y alta probabilidad de absorción intestinal.

En etapas posteriores se han hecho modificaciones en el método para tener en cuenta la difusión paracelular (65) y se han correlacionado los datos de permeabilidad en Caco-2 con los obtenidos con las membranas artificiales de numerosos compuestos (66).

b.) Cultivo celular monocapa Caco-2

Actualmente, las monocapas de células Caco-2 cultivadas en filtros permeables se utilizan para la realización de estudios de transporte transepitelial de numerosos fármacos y nutrientes (67). En muchos casos es posible investigar si un fármaco es transportado de forma activa o pasiva a través del epitelio intestinal; si el transporte es activo, permite identificar el portador más importante (68, 69).

La línea celular Caco-2 fue establecida en 1977 por Fogh y colaboradores (70) a partir de carcinoma de colon humano. Es la única línea celular capaz de diferenciarse morfológica y funcionalmente como células con gran similitud a enterocitos de manera espontánea (71, 72).

Este tipo de células presentan uniones estrechas (tight junctions) además de una clara polarización (cara apical y basal).

Otra característica importante que asemeja esta línea celular a la membrana intestinal es la existencia de muchas de las enzimas del borde de cepillo como hidrolasas (aminopeptidas-N, fosfatasa alcalina, olipeptidilpeptidasa IV, sacarosa-isomaltasa, lactasa) y enzimas de fase III como la Glicoproteína-P y otros sistemas de transporte especializado para aminoácidos, dipéptidos, vitaminas y citostáticos (73). Asimismo, la membrana basolateral está asociada a actividad ATP-asa dependiente de sodio-potasio y a receptores hormonales. También se encuentran enzimas intracelulares, tanto de fase I (oxidación), como las CYP, incluida la CYP3A, y de fase II (conjugación), como la glutatión S-transferasa y sulfotransferasa (74, 75).

El primer estudio en el que se estableció una correlación entre el coeficiente de permeabilidad obtenido en monocapas Caco-2 y la fracción de fármaco absorbida después de su administración oral en humanos, sugería que estas monocapas podrían utilizarse para identificar fármacos con posibles problemas a nivel de absorción (2). Estudios más recientes indican que este modelo *in vitro* permite clasificar la permeabilidad de los fármacos de forma similar a otros modelos de absorción más complejos, como los tejidos intestinales aislados o los modelos de perfusión *in situ* (76).

Las ventajas que presentan los cultivos celulares frente a los modelos de absorción convencionales son:

- Rápida determinación de la permeabilidad y metabolismo de los fármacos
- Estudio de los mecanismos de absorción bajo condiciones controladas
- Evaluación rápida de métodos que mejoren la absorción de fármacos
- Realización de estudios con líneas celulares humanas
- Minimizan la experimentación animal.

Finalmente, es necesario tener en cuenta que existen diferencias entre los valores de permeabilidad obtenidos para un mismo fármaco en distintos

laboratorios, debido a la variabilidad en las condiciones experimentales y en las propias líneas celulares (7).

c.) Modelos basados en tejidos

En estos modelos se emplean segmentos intestinales (generalmente de animales, aunque en ocasiones se usan tejidos humanos) para el estudio de la absorción de fármacos. En general el ensayo consiste en colocar el fármaco a estudiar en solución en la zona mucosa del tejido y se determina la velocidad de absorción por la desaparición del fármaco de la solución o por la aparición de fármaco en la zona serosa. En estos modelos se conserva las características de las membranas biológicas y además son útiles en la determinación de la absorción gastrointestinal de diferentes segmentos del intestino (63).

Existen dos grandes tipos de sistemas experimentales que se basan en ellos: cámaras de difusión y sacos evertidos

Las **cámaras de difusión** son modelos de absorción que cuantifican el flujo transepitelial de fármacos a través del tejido epitelial intacto. El segmento intestinal que se somete a estudio se aísla y secciona convenientemente con el fin de obtener capas planas de tejido. Éstas se disponen posteriormente sobre las células de difusión estándar, disponibles comercialmente, que se rellenan con un tampón adecuado que simula los fluidos extracelulares (77). Este sistema experimental es muy versátil y permite la cuantificación de la permeabilidad de un tejido, el transporte intestinal paracelular y transcelular, la secreción intestinal y la influencia del metabolismo intestinal en la biodisponibilidad de un fármaco (78).

El método de **sacos evertidos** se emplea en la realización de estudios de acumulación de fármacos en segmentos intestinales completos. Para ello, los segmentos intestinales se invierten y dividen en pequeñas secciones a modo de anillos. Éstos se incuban en tampones oxigenados que contienen el fármaco problema, en condiciones de agitación y temperatura controladas (79).

El sistema de sacos evertidos permite el estudio de las limitaciones que puede presentar un fármaco frente a la absorción intestinal debido a su solubilidad, la evaluación de la conversión de un profármaco en fármaco por la acción del tejido intestinal, así como la discriminación de los mecanismos de absorción de fármacos en transporte pasivo o activo (79, 80).

1.1.3. Determinación de la permeabilidad en modelos *in situ*

En los modelos *in situ*, el aporte neural, endocrino, sanguíneo y linfático de la zona en estudio permanece intacto y por tanto, son sensibles a influencias farmacológicas y fisiológicas. Dentro de estos modelos se pueden realizar dos métodos:

a) Método de paso único sin recirculación (single pass): en este método el segmento del intestino que se desea estudiar, se perfunde a velocidad controlada con la solución del fármaco. Con esta técnica se puede controlar la concentración del fármaco, el pH, la osmolaridad y la velocidad de entrada del mismo. El cálculo de la permeabilidad se realiza por medida de la desaparición del fármaco del lumen intestinal, en estado estacionario (81).

b) Método de Doluisio o in situ con recirculación (closed loop): en este método la solución a ensayar se mantiene en el segmento intestinal del cual se toman muestras para observar la desaparición del fármaco (82, 83).

1.2. Efecto de los excipientes sobre la permeabilidad

En general, se ha considerado que los excipientes son sustancias inertes y por tanto no afectan la biodisponibilidad de los fármacos, no obstante, en los últimos años se han llevado a cabo investigaciones que sustentan que ciertos excipientes pueden afectar la absorción. En este sentido, se ha observado que algunos excipientes pueden modificar el vaciado gástrico, el tránsito intestinal, provocar cambios en la membrana intestinal y/o tener efecto sobre transportadores específicos del tracto gastrointestinal.

El aumento de la velocidad de **vaciado gástrico** supone un aumento en la velocidad de absorción de los fármacos. El paracetamol formulado con bicarbonato de sodio provoca una más rápida velocidad de absorción que otras formulaciones sin este excipiente, debido a un aumento en la velocidad del vaciado gástrico (84).

El efecto de algunos excipientes sobre el vaciado gástrico ha sido estudiado en ratas. Soluciones de sacarosa 50% retrasan marcadamente el vaciado gástrico y de forma contraria una solución al 1% de carboximetilcelulosa, lo acelera ligeramente (85). Pestel y colaboradores en el mismo modelo animal en el que emplearon una suspensión de sulfato de bario como “comida de ensayo”, observaron que tras la administración de PEG 400 con concentración de 20%, se enlenteció significativamente el vaciado gástrico. El vaciamiento gástrico se redujo ligeramente por hidroxietilcelulosa en concentración de 1% e hidroxipropil- γ -ciclodextrina al 20%. La hidroxipropil- β -ciclodextrina al 20% y el polisorbato 80 al 0,5% no tuvieron ningún efecto sobre el vaciado gástrico (86).

El aumento de la velocidad de **tránsito intestinal** puede disminuir de forma significativa la absorción de fármacos (87). Adkin y colaboradores demostraron que el manitol disminuye el tiempo de tránsito intestinal provocando una reducción estadísticamente significativa en los valores de AUC y Cmax de cimetidina al compararla con una solución control de sacarosa (88). Un estudio posterior demostró que el efecto del manitol sobre la reducción del tiempo de tránsito intestinal es dosis dependiente; a mayor concentración de manitol, menor

tiempo de tránsito intestinal (89). El efecto del manitol (azúcar no absorbible) sobre el tránsito intestinal podría deberse a su efecto osmótico; una presión osmótica alta en el lumen intestinal puede provocar aumento en el peristaltismo y retención de agua (90).

Chen y colaboradores investigaron el efecto del sorbitol sobre la bioequivalencia de formulaciones de ranitidina comparándolas con formulaciones que contenían el mismo fármaco y sacarosa, encontrando que la presencia de sorbitol disminuye significativamente la biodisponibilidad de ranitidina. Los autores atribuyen la diferencia en la biodisponibilidad de ranitidina entre la solución que contenía sorbitol y la que contenía sacarosa, al incremento del volumen del tracto gastrointestinal por efecto osmótico del sorbitol y por el aumento de la motilidad intestinal que reduce el tiempo de contacto de la ranitidina con la región proximal del intestino delgado (91).

El polietilenglicol 400 (PEG 400) puede aumentar la motilidad intestinal y acelerar el tránsito por el intestino delgado (92). Un ejemplo del efecto de este excipiente sobre la absorción es la disminución de la biodisponibilidad de ranitidina formulada en pelets, que se reduce 31% en presencia de PEG 400 debido a la disminución del tiempo de tránsito intestinal (93). Sin embargo, concentraciones muy bajas del mismo excipiente mejora la absorción de ranitidina, posiblemente por modulación de la permeabilidad intestinal (94).

Algunos excipientes pueden alterar la **membrana intestinal**. Este efecto puede ser porque afecten las uniones intercelulares o por interacción con los lípidos de la membrana, lo que provoca cambios en sus propiedades físicas y funcionales (95). Tal es el caso de los surfactantes que reducen la viscosidad de la membrana e incrementan su elasticidad por lo que incrementan la absorción de compuestos por las vías paracelular y transcelular (96, 97). El lauril sulfato de sodio incrementó la permeabilidad de manitol y otros fármacos de baja permeabilidad en una investigación realizada en células Caco-2, por lo que los autores sugieren que este excipiente provoca la ruptura de las uniones intercelulares bajo las condiciones de estudio (98).

Takizawa y colaboradores estudiaron el efecto de diferentes excipientes sobre la permeabilidad de la membrana intestinal, usando el método *in vitro* del saco evertido en yeyuno e íleon de rata, encontrando que metil- β -ciclodextrina, carboximetil almidón sódico, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución y croscarmelosa sódica incrementaron la permeabilidad de 5(6)-carboxifluoresceína (marcador de transporte paracelular) en yeyuno, pero sin cambios en la permeabilidad de dicho compuesto en el íleon. Por otro lado, estos autores confirmaron que hidroxipropilcelulosa en concentración de 0,02% (m/V) disminuía la permeabilidad en yeyuno e íleon de 5(6)-carboxifluoresceína, mientras que a una concentración de 0,20% (m/V) la permeabilidad se veía incrementada significativamente. De acuerdo a sus resultados, se puede deducir que algunos excipientes pueden modificar la permeabilidad de fármacos que se

absorben por la vía paracelular, siendo más susceptible el yeyuno que el íleon a tal efecto (99).

El transporte del manitol se realiza principalmente por vía paracelular por lo que es usado como marcador de la integridad de las uniones intercelulares en ensayos con células Caco-2, por esta razón este excipiente puede competir con cualquier fármaco que se absorba por vía paracelular y puede detectar cambios en las uniones intercelulares (95).

El bicarbonato de sodio demostró ser capaz de modificar la interacción que ocurre entre la fluvastatina sódica con los fosfolípidos de la membrana, lo que pone de manifiesto que este excipiente puede cambiar las interacciones entre el fármaco y los lípidos de la membrana, involucradas en el transporte pasivo de la fluvastatina (100).

EDTA, que se emplea como conservador en algunas formulaciones puede acomplejar el calcio extracelular, que está implicado en la regulación de las uniones intercelulares, y por tanto aumentar la permeabilidad paracelular en el intestino de fármacos de pequeño tamaño (95, 101, 102).

Como se mencionó previamente, los transportadores son proteínas que median el flujo transcelular de xenobióticos y nutrientes. La interacción de un transportador con un compuesto depende de sus propiedades fisicoquímicas. Algunos excipientes pueden influir en la **actividad de los transportadores** y por tanto en la absorción de ciertos sustratos. Algunos excipientes pueden alterar el transporte activo de absorción o el de secreción que intervienen en la absorción de fármacos, tales como agentes anticancerosos, antibióticos y antivirales; lo que puede conllevar a fallos terapéuticos o a efectos secundarios tóxicos, especialmente en el caso de fármacos de estrecho margen terapéutico (95).

Los cambios en la fluidez de la membrana intestinal provocada por los surfactantes pueden alterar el microambiente de la cara apical de la célula y por tanto se afecta el reconocimiento de los sustratos, la unión enzima transportadora-sustrato y/o la actividad del ATP necesaria para el transporte activo de absorción y secreción (103).

El Polisorbato 80 demostró incrementar la biodisponibilidad de digoxina en ratas. El aumento en AUC y C_{max} observado fue atribuido a la inhibición de la P-gp provocada por este surfactante no iónico (104).

Los poliacrilatos (polímeros acrílicos), que pueden actuar como tensoactivos o quelantes, han demostrado que pueden acomplejar cationes bivalentes como zinc y calcio, por lo que pueden prevenir la asociación de estos iones con ciertos transportadores y de este modo inactivar su actividad (105).

El derivado soluble de la vitamina E (D- α -tocoferil polietilenglicol succinato) parece aumentar la absorción de sustratos de la P-gp, tales como doxorubicina, vinblastina y paclitaxel, mediante inhibición del proceso de secreción del transportador (106). Un conjugado similar de vitamina E, el colecalciferol polietilenglicol succinato demostró una inhibición similar de la P-gp en células Caco-2 (107).

El aceite de ricino hidrogenado PEG-40 (Cremophor™ RH40) inhibe la P-gp e incrementa la biodisponibilidad de digoxina (un sustrato de P-gp) en un 20% comparado con una formulación sin este surfactante (108).

Los copolímeros en bloque como Pluronic® son surfactantes no iónicos que inhiben el transporte de secreción de P-gp y MRP por un mecanismo similar para ambos transportadores. Los copolímeros en bloque inhiben la actividad de la ATPasa de los transportadores de secreción y además provocan una disminución en la concentración de ATP intracelular (109).

Se ha demostrado que PEG interacciona con ciertos transportadores de secreción como P-gp. La secreción de rodamina 123, un sustrato de P-gp, disminuye significativamente en presencia de PEG 400, 2000 y 20000 en intestino de rata usando cámaras de difusión. Este efecto inhibitorio fue dependiente de la concentración de 0,1 a 20% (m/V). A pesar de la disminución de la secreción de rodamina en ese modelo experimental, solo hubo aumento significativo de la absorción del compuesto en un modelo *in situ* por efecto de PEG20000 (110).

En modelos *in vitro* se demostró que las ciclodextrinas inhiben la función de transportadores de secreción como P-gp y MRP2 (111). La acción de la 2,6-di-O-metil-β-ciclodextrina sobre los transportadores de secreción antes mencionados fue investigada en ratas, encontrándose que esta ciclodextrina inhibe el transportador de secreción y mejora la biodisponibilidad oral del tacrolimus (112). Estas alteraciones en la función de P-gp y MRP2 fueron debidas a la liberación de colesterol de la monocapa y en consecuencia esto podría disminuir la actividad de secreción de los transportadores en las caveolas de la membrana (111, 113).

1.3. Métodos para determinar la solubilidad

La FDA establece que un fármaco es altamente soluble cuando la dosis más alta que se prescribe es soluble en un volumen igual o menor que 250 mL en el intervalo de pH entre 1,2 y 7,5 a 37°C (58). La EMA establece que un fármaco es altamente soluble cuando la dosis más alta que se administra por vía oral como formulación de liberación inmediata, se disuelve completamente en 250 mL de solución amortiguadora en el rango de pH entre 1 y 6,8 a 37±1°C (55). La OMS considera que una sustancia activa es altamente soluble cuando las dosis más alta recomendada en el listado de medicamentos esenciales de la OMS y que se comercializa como forma farmacéutica sólida es soluble en un volumen igual o menor que 250 mL en un rango de pH entre 1,2 y 6,8 a 37°C (56).

Tanto la EMA como la FDA recomiendan el método de agitación del matraz o cualquier otro método debidamente justificado para la determinación de la solubilidad.

Se deben considerar ciertos factores antes de la determinación de la solubilidad: el tamaño de partícula, la forma cristalina, la capacidad de ionización y el contra ión, en caso de ser una sal. También se debe considerar la capacidad de

agregación y formación de micelas que pueda presentar el sólido, así como la adsorción que pueda producirse por exceso del mismo (114-116).

El tamaño de la partícula influye en la superficie del sólido en contacto con el solvente, por tanto, al disminuir el tamaño de la partícula, aumenta la superficie específica y aumenta la velocidad de disolución.

La solubilidad se ve afectada por la forma cristalina del fármaco. Las formas amorfas, que se presentan cuando la cristalización de las moléculas que forman la estructura del sólido ocurre en forma desordenada, generalmente son más solubles que las formas cristalinas. Si el fármaco presenta polimorfos, es decir, si se puede encontrar en más de una forma cristalina, éstos pueden presentar distintas características de solubilidad (116). La hidratación de la molécula también puede tener efecto en la solubilidad, las formas hidratadas de una molécula presentan solubilidades significativamente inferiores que las formas anhidras.

La mayoría de los fármacos son ácidos o bases débiles que en disolución se encuentran disociados. La ecuación de Henderson-Hasselbach puede explicar lo que sucede a compuestos ionizables cuando se disuelven en medios con diferentes valores de pH.

En una solución saturada de un ácido monoprótico, se puede establecer el siguiente equilibrio:



$$S_o = [HA] \tag{1-8}$$

En el equilibrio y ecuación anterior $HA_{(s)}$ representa el ácido en forma sólida, HA el ácido en solución y S_o es la solubilidad intrínseca del ácido no disociado.

Como se trata de un ácido débil ionizable, en solución se establece el siguiente equilibrio con una constante de disociación Ka :



$$Ka = [H^+] \cdot [A^-] / [HA] \tag{1-10}$$

En donde H^+ representa los iones hidrogenión, y A^- el ácido ionizado.

La solubilidad, S , a un determinado pH es definido como la suma de las concentraciones de las especies disueltas en la fase acuosa y por tanto se puede escribir la siguiente igualdad:

$$S = [A^-] + [HA] \tag{1-11}$$

Al sustituir en la ecuación anterior las ecuaciones 1-8 y 1-10 se obtiene:

$$S = Ka[HA]/[H^+] + [HA] \quad (1-12)$$

$$S = S_o(Ka/[H^+] + 1) \quad (1-13)$$

En el caso de bases débiles monopróticas, la solubilidad a un determinado pH será la suma de las concentraciones de la base libre, B y la base ionizada BH^+ , según la ecuación:

$$S = [B] + [BH^+] \quad (1-14)$$

Por tanto, la ecuación análoga a 1-13 para las bases débiles es:

$$S = S_o([H^+]/Ka + 1) \quad (1-15)$$

(117).

Los métodos para determinar la solubilidad pueden clasificarse en tres categorías de acuerdo a la disponibilidad del compuesto y/o de la información del mismo:

- Compuesto en forma sólida
- Solución del compuesto en dimetilsulfóxido (DMSO)
- Información química estructural (predicción *in silico*) (118)

Los métodos que se realizan con el compuesto en forma sólida son considerados de referencia pero requieren generalmente grandes cantidades de la sustancia. Los otros dos métodos, por el contrario, requieren poca o ninguna cantidad de sustancia, por lo que son utilizados en las fases iniciales del desarrollo de nuevas moléculas.

1.3.1. Determinación de la solubilidad con el compuesto en forma sólida

a.) Método de agitación del matraz

Es conocido también como método del equilibrio de solubilidad. Es el método clásico para determinar la solubilidad y es considerado el método de referencia. Se basa en la saturación de un medio con el compuesto a estudiar con el fin de alcanzar el equilibrio. Para ello se coloca un exceso de compuesto sólido en viales de entre 2 y 20 mL que contienen el medio que es generalmente una solución amortiguadora, previamente ajustada al pH objeto de estudio. Los viales

se tapan y la suspensión resultante se agita a una temperatura constante (25 o 37 °C) durante un tiempo determinado. La observación de material no disuelto indica que se ha formado una solución saturada. Una vez alcanzado este equilibrio, la muestra se filtra o centrifuga a fin de separar el sobrenadante del sólido no disuelto y se cuantifica. Si se utiliza Cromatografía Líquida de Alta Resolución como método de cuantificación, se pueden separar las impurezas del compuesto de interés, disminuyendo de esta forma la probabilidad de obtener resultados falsos. Con este método se obtiene la solubilidad termodinámica (117, 119).

b.) Titulación potenciométrica

Este método puede aplicarse a sustancias ionizables y se basa en el cambio característico de una curva de titulación ácido-base provocada por la precipitación de la sustancia estudiada. Para realizar la titulación se adicionan volúmenes exactamente medidos de una solución estandarizada de ácido o base a una solución que contiene la sustancia a estudiar y cloruro de potasio 0,15 M (para aumentar la exactitud en la medida del pH). Se burbujea argón al sistema a fin de evitar que el dióxido de carbono de la atmósfera pueda alterar el valor del pH. El valor del pH se debe ir controlando continuamente a través de un electrodo de vidrio. El gráfico que se construye con valor del pH en función del volumen utilizado de ácido o base, es la curva de titulación potenciométrica (119).

1.3.2. Determinación de la solubilidad con solución del compuesto en DMSO

En este método la sustancia está disuelta en DMSO y la solución se añade en forma progresiva a una solución amortiguadora para provocar la precipitación. La concentración puede determinarse por turbidimetría, espectrofotometría UV, HPLC o cromatografía líquida con detección de masas. Antes de la cuantificación es necesario recoger el precipitado del seno de la solución por filtración y/o centrifugación, excepto en el método turbidimétrico, en el que esta precaución no es necesaria.

El DMSO forma soluciones sobresaturadas y puede provocar una sobreestimación de la solubilidad termodinámica. Los cambios en el pH durante el ensayo no se detectan con este método (118, 119).

Con el uso de DMSO se determina la solubilidad aparente. Para ello una solución concentrada de la sustancia objeto de estudio se adiciona de forma progresiva en una solución amortiguadora. La concentración que posea la muestra en el momento en que ocurre la precipitación es considerada el valor de solubilidad. (118). Se pensaba que el precipitado obtenido era siempre amorfo, sin embargo, Sugano y colaboradores demostraron que el precipitado de más de la mitad de los compuestos modelo utilizados en su estudio eran cristalinos, como así lo demostraron por microscopía de luz polarizada. Los autores observaron, además,

que se requiere un tiempo de incubación de 20 horas para obtener precipitados cristalinos y valores de solubilidad similares a los del equilibrio de solubilidad (120).

1.3.3. Estimación de la solubilidad con información química estructural (predicción *in silico*).

Existen diversos programas computacionales que permiten la estimación de la solubilidad a través de algoritmos que emplean la lipofilia para realizar el cálculo, ya sea usando directamente el valor de LogP o calculando la lipofilia a partir de parámetros característicos de la molécula. Glomme y colaboradores correlacionaron datos de solubilidad obtenidos experimentalmente con los estimados por el programa WSKOWWIN (Syracuse Research Corporation) que emplea la ecuación de Yalkowsky (ecuación 2.37) para calcular la solubilidad, en la que S y P son la solubilidad y el coeficiente de partición, respectivamente y PF es el punto de fusión.

$$\log S = 0,8 - \log P - 0,01(PF - 25) \quad (1-16)$$

Los autores encontraron una buena correlación entre los valores experimentales de solubilidad y los obtenidos por el algoritmo de Yalkowsky (119).

1.4. Metodología de disolución

El ensayo de disolución es un ensayo oficial establecido en las distintas farmacopeas para evaluar la liberación del fármaco de formulaciones sólidas y semisólidas (121). Fue adoptado en 1970 por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) en donde se describía el aparato de cestillo, que hoy se conoce como aparato 1 de disolución. El aparato 2 o de paletas fue introducido en la USP en 1978 y el número de monografías en las que aparece este ensayo ha aumentado de forma significativa con los años (122). Estos dos aparatos son los más utilizados debido a que durante décadas este ensayo ha sido un requisito de control de calidad de formas farmacéuticas sólidas (123).

El procedimiento para el ensayo de disolución se ha homologado internacionalmente en las diferentes farmacopeas, aunque hay algunas secciones que son específicas de cada farmacopea (124). En general, en las farmacopeas se describen los diferentes aparatos de disolución, el procedimiento a seguir para el ensayo y las especificaciones que deben cumplir los productos (125, 126).

El ensayo de disolución permite estudiar *in vitro* la velocidad con la cual un principio activo, contenido en una forma farmacéutica, es cedido a un medio de disolución. Cuando este ensayo se aplica a formas farmacéuticas sólidas de

liberación inmediata, la disgregación de la formulación ocurre antes de comenzar la disolución de la sustancia activa, tal como sucede *in vivo*.

Los estudios de disolución pueden servir para varios propósitos:

a.) Control de calidad:

- Para obtener información sobre los lotes utilizados en estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia y estudios clínicos y con ello establecer las especificaciones de control de calidad.
- Como herramienta de control de calidad que permita evaluar y demostrar la consistencia del proceso de fabricación.
- Para obtener información sobre el producto de referencia utilizado en estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia y estudios clínicos.

b.) Bioequivalencia:

- En bioexenciones, que permiten demostrar similitud entre diferentes formulaciones de un principio activo y el producto de referencia (variaciones en la formulación, cambios durante el desarrollo y aprobación de genéricos).
- Para investigar homogeneidad entre los lotes de las formulaciones desarrolladas y el producto de referencia, como base para la selección de los adecuados en el estudio *in vivo* (55).

En el desarrollo de productos usando el enfoque de calidad por el diseño, el ensayo de disolución es una herramienta muy importante para evaluar las variables del proceso y los factores que pueden afectar el desempeño del producto (127).

Los estudios de disolución, como herramienta para demostrar la bioequivalencia, resultan un recurso útil ya que son fáciles de implementar y como se utilizan de forma rutinaria en la industria farmacéutica, generalmente se dispone de la experticia necesaria por parte del operario para minimizar los errores analíticos.

Para evaluar los efectos de cambios en la formulación, la consistencia del proceso de fabricación y para demostrar la bioequivalencia, es necesario comparar los perfiles de disolución obtenidos. Los perfiles de disolución son gráficos de los porcentajes de fármaco disueltos acumulados en función del tiempo y éstos se comparan matemáticamente usando el factor de similitud (f_2), que utiliza las diferencias entre la media del porcentaje disuelto de cada producto a comparar en cada intervalo de muestreo para proporcionar un solo número con el que se cuantifica la similitud entre ambos perfiles (124).

1.4.1. Factores que afectan la velocidad de disolución

Los factores que pueden provocar cambios en la velocidad de disolución, pueden agruparse en tres categorías para su estudio:

- a) Factores inherentes al fármaco y a la formulación
- b) Factores relacionados con el diseño del ensayo
- c) Factores concernientes a la configuración y desempeño del equipo

a) Factores inherentes al fármaco y a la formulación

Las primeras investigaciones sobre los factores que afectan la velocidad de disolución fueron realizadas por Noyes y Whitney en 1897, que establecieron la ecuación que lleva su nombre. Los estudios de Nerst y Brünner en 1904 que aplicaron la ley de difusión de Fick a la ecuación inicialmente propuesta por Noyes y Whitney permitieron establecer la relación matemática que resume los principales factores que determinan la velocidad de disolución (122). La ecuación que se presenta a continuación (ecuación 2-17), basada en las modificaciones de Nerst-Brünner y Levich del modelo de Noyes-Whitney permite identificar los factores que determinan la velocidad de disolución:

$$\partial C / \partial t = \frac{A \cdot D}{h} \cdot \frac{(C_s - C_t)}{V} \quad (1-17)$$

De acuerdo a la ecuación anterior la velocidad de disolución de una sustancia depende de:

- El área superficial efectiva del sólido a disolver (A). A menor tamaño de partícula la superficie de contacto aumenta.
- El coeficiente de difusión de la sustancia (D). Depende principalmente de la naturaleza de la molécula pero también depende de la viscosidad de los fluidos del tracto gastrointestinal.
- El espesor de la capa de difusión (h). Éste depende en gran medida de la hidrodinámica del sistema, que es muy difícil simular *in vitro* por lo complejo de la motilidad intestinal.
- La solubilidad en saturación del fármaco bajo condiciones intraluminales (C_s). Depende principalmente de la hidrofilia de la molécula.
- La cantidad de fármaco en solución (C_t). Este parámetro dependerá de la dosis
- Volumen del medio de disolución (V).

Algunos de estos parámetros están determinados principalmente por las propiedades fisicoquímicas del fármaco en si, pero además son fuertemente

influenciadas por las condiciones del tracto gastrointestinal y por las características de la forma de dosificación (128).

b.) Factores relacionados con el diseño del ensayo

La **agitación y la hidrodinámica** son factores que determinan la velocidad de disolución. En general, la relación entre la velocidad de disolución y la agitación es directamente proporcional. La hidrodinámica de los métodos de disolución es problemática, no solo porque las condiciones *in vivo* no se consideraron en el diseño, sino porque además las condiciones hidrodinámicas varían dentro del vaso de disolución. Varios autores han intentado establecer la relación entre la velocidad de agitación y la hidrodinámica *in vivo*, pero los resultados son inconsistentes. Otra fuente de variable en la hidrodinámica, especialmente en el aparato de paletas es el efecto de cono (figura 1-12), que puede ocurrir en el fondo del vaso de disolución. Diversos estudios confirman la presencia de una “zona muerta” en la parte inferior del vaso, justo debajo de la paleta y este fenómeno puede enlentecer la velocidad de disolución (129-131). Este efecto se produce porque las partículas con alta densidad forman un montículo que inhibe la disolución en la zona por debajo de la paleta. Formulaciones con grandes cantidades de excipientes insolubles probablemente formen una masa densa en el fondo del vaso de disolución. El efecto de cono fue observado tanto en fármacos altamente solubles como en los poco solubles, aunque el efecto posee mayor impacto en los últimos (132). Este problema se encuentra frecuentemente en la etapa de desarrollo del método de disolución y de no ser abordado de forma correcta, puede ser contraproducente en el desarrollo de la formulación (123).

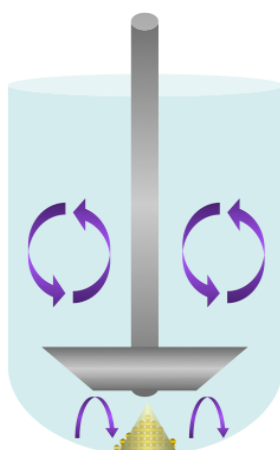


Figura 1-12. Esquema del efecto de cono debajo del aparato de paleta

Dependiendo de la **ubicación de la forma farmacéutica** en el vaso de disolución, se pueden obtener resultados muy diferentes (123, 133). La ubicación en un lugar preciso del vaso no resulta sencillo de conseguir y algunas estrategias que han sido propuestas no se han validado ninguna de ellas.

La **temperatura** a la que se realiza el ensayo tiene un efecto significativo en la velocidad de disolución (123). El ensayo generalmente se realiza a 37°C para simular la temperatura corporal. Este parámetro tiene que estar controlado a lo largo del ensayo.

El **medio de disolución** es otro factor a considerar. Pueden afectar la velocidad de disolución tanto el volumen como la naturaleza del medio utilizado.

El ensayo de disolución debe realizarse en condiciones de mínima concentración, condiciones sumidero o gradiente máximo (sink), de modo que la concentración de fármaco en el fluido de disolución no rebase nunca el 20% de su concentración de saturación, por esta razón se suele usar un volumen de medio en el rango entre 500 y 1000 mL. Esta condición no se asemeja a lo que sucede *in vivo*, ya que en el intestino, el volumen no depende solo de la capacidad para mantener condiciones sink, y esta condición se mantiene por la absorción del fármaco que se encuentra en solución. Si se ingieren alimentos el volumen del estómago puede ser de 1L y en condiciones de ayuno, si se administra un medicamento con un vaso de agua, el volumen será un poco mayor a 250 mL (123). Klein y Shah demostraron que la hidrodinámica del sistema de “mini-paletas” es escalable a la configuración del aparato 2. El sistema de “mini-paletas” permite el uso de volúmenes más fisiológicos (200 mL) (134).

La **desgasificación del medio** es una variable a considerar en los ensayos de disolución. Al usar medios que no han sido previamente desgasificados, se pueden formar burbujas alrededor de la formulación en estudio, una vez ésta se ha introducido en el vaso; lo que puede afectar los resultados de disolución en algunos productos y aumentar la variabilidad inter-vaso e inter-ensayo. La USP recomienda el calentamiento del medio de disolución a 41°C e inmediatamente filtrar con vacío a través de una membrana filtrante con tamaño de poro de 0,45 µm. La filtración debe realizarse con agitación vigorosa además del vacío durante 5 minutos. Un estudio que comparó varios métodos de desgasificación concluyó que el total de gases disueltos en el método descrito en la USP, sin el calentamiento previo, es similar al que se obtiene con el calentamiento por lo que los autores sugieren que se elimine dicha fase de calentamiento (135).

c.) Factores concernientes a la configuración y desempeño del equipo

La alineación del equipo, que significa la verificación de la verticalidad del eje y su ubicación en el centro del vaso, pueden afectar la velocidad de disolución. Equipos desalineados arrojarán velocidades de disolución mayores que las correspondientes a equipos perfectamente alineados.

La altura del sistema de agitación también puede modificar la velocidad de disolución.

Irregularidades en la superficie y forma interior del vaso, así como desviaciones en concentricidad para la forma esférica del fondo pueden provocar

alteraciones en el flujo y como resultado un aumento en la variabilidad en los resultados.

La posición de la cánula para la toma de muestra puede afectar los resultados de un perfil de disolución. Existe además una variabilidad inter-analista en el muestreo manual. El muestreo automatizado puede eliminar los problemas asociados a la toma de muestra (124).

Las fuentes de vibración del entorno cercano al equipo de disolución son una fuente de error en los ensayos de disolución. Gao y colaboradores encontraron que los comprimidos desintegrables son sensibles a las vibraciones tanto en el aparato de paletas como en el de cestillos. Los comprimidos no desintegrables fueron menos sensibles pero presentan una alta variabilidad en algunos casos por efecto de la vibración. Los autores concluyen que la importancia de la vibración en el ensayo de disolución depende de la fuente de vibración, el producto estudiado y el tipo de aparato (136).

Con la finalidad de controlar todos los factores del diseño y desempeño del equipo de velocidad de disolución que puedan afectar los resultados se ha propuesto una rigurosa cualificación del equipo, del proceso y de la verificación de los parámetros críticos de forma periódica realizando una calibración mecánica. Dentro de los parámetros a evaluar en la calibración mecánica se contempla la velocidad de agitación, la altura de la paleta o cestillo, la verticalidad del vaso, el centrado del vaso y del eje, la verticalidad del eje y la rotación del eje (137).

1.4.2. Medios biopredictivos

Los medios contemplados en las Farmacopeas solo simulan los efectos del pH sobre la liberación del fármaco. Algunos medios que están descritos en la USP contienen surfactantes (polisorbato 80 o laurilsulfato de sodio) que incrementan la solubilidad de algunos fármacos en solución acuosa. Estos medios son útiles para realizar el control de calidad, pero cuando se busca que el ensayo de disolución sea una herramienta de predicción de lo que ocurre *in vivo*, es necesario desarrollar medios adaptados a las condiciones fisiológicas (121). A los medios que simulan propiedades y/o condiciones fisiológicas a fin de predecir y discriminar el comportamiento de formulaciones *in vivo*, se les puede llamar medios biopredictivos.

Según Dokoumetzidis y Macheras, este tipo de medios se originaron en la década de 1980, cuando se probaron una variedad de metodologías *in vitro* basadas en ensayos de disolución usando medios tales como ácido oleico, desoxicolato de sodio y leche. Estos métodos fueron desarrollados para predecir el “efecto de los alimentos” en la absorción de formulaciones de liberación controlada de teofilina, cuando se administraba en forma concomitante con los alimentos (122).

En el desarrollo y la selección de un medio biopredictivo que resulte útil para predecir el comportamiento de una formulación *in vivo*, se debe considerar en igual medida las propiedades fisicoquímicas del fármaco, las características de la formulación y las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal (128).

Tanto la composición como las propiedades del contenido gastrointestinal influyen en la solubilidad de las sustancias activas y por tanto en su velocidad de disolución.

A continuación se señalan las principales características de los fluidos intestinales que pueden influir sobre la disolución de fármacos; es oportuno resaltar que éstas no se mantienen constantes a lo largo del tracto gastrointestinal y que, además, se debe considerar que la presencia de alimentos es el desencadenante de la liberación de muchas secreciones en el intestino, por lo que la composición de los fluidos intestinales en estado de ayuno difieren de la composición después de haber ingerido alimentos.

a.) Composición de los fluidos gastrointestinales

Sistema tampón y contenido de iones hidronio: La concentración de iones hidronio regula el pH y por tanto la disolución de fármacos ionizables. En el estómago se segrega ácido clorhídrico que aporta iones hidronio por lo que el medio en esta zona del tracto gastrointestinal es normalmente ácido. La concentración en ayuno de ácido clorhídrico es de 0,01-0,1 M y es de 10^{-3} a 10^{-7} M después de la ingesta de alimentos (138). El principal tampón fisiológico es el bicarbonato y es el responsable del gradiente de pH que se presenta a lo largo del lumen intestinal. El bicarbonato es secretado por el páncreas y por las células epiteliales del duodeno para neutralizar la secreción gástrica y de esta forma proteger el epitelio duodenal del daño que puede provocar el ácido. La concentración de bicarbonato en el intestino es dinámica y varía según el estado prandial y la zona del intestino. En duodeno y yeyuno en condiciones de ayuno la concentración de bicarbonato encontrada fue de 2 a 30 mM (138).

Sales biliares: La bilis, que es producida por el hígado y depositado en la vesícula biliar hasta que se libera al lumen intestinal, está constituida por sales biliares, fosfolípidos, bicarbonato, colesterol, pigmentos biliares y desechos orgánicos. Las sales biliares se pueden combinar con los lípidos para formar micelas, lo que mejora la solubilidad de algunos fármacos y además disminuyen la tensión superficial y por tanto mejorar la humectación de sólidos. En el estómago en condiciones de ayuno se han encontrado valores de 0,10 mM y después de la administración de alimentos la concentración reportada es de 0,06 mM (138). En el duodeno en condiciones de ayuno, Kalantzi y colaboradores determinaron una concentración de 2,6 mM y en yeyuno se había encontrado previamente una concentración de 2 mM (139).

Enzimas: Las enzimas digestivas pueden clasificarse según su función en lipasas (disocian enlaces covalentes de lípidos para convertirlos en glicerol y ácidos grasos), peptidasas (son proteolíticas) y amilasas (rompen enlaces glucídicos entre monosacáridos) (140).

La lipasa en el estómago en condiciones de ayuno se considera de poca importancia porque es activa a pH entre 3 y 6. La actividad de esta enzima en el estómago después de la alimentación se encuentra en el rango entre 11,4 y 43,9 U/mL (138).

La pepsina es la principal peptidasa del tracto gastrointestinal. Se ha encontrado que su concentración en el estómago en ayunas oscila entre 0,11 y 0,22 mg/mL; mientras que después de la ingesta de alimentos es de 0,26 a 1,72 mg/mL (139).

Otros componentes: En los fluidos del tracto gastrointestinal se han encontrado y cuantificado otra serie de componentes como lípidos, fosfolípidos e iones como potasio, sodio, cloruro y calcio (138).

b.) Propiedades de los fluidos gastrointestinales

pH: El pH del tracto gastrointestinal tiene un importante efecto sobre la disolución de medicamentos administrados por vía oral, especialmente en aquellos que contienen fármacos con valores pKa dentro del rango fisiológico de pH. El pH del lumen intestinal depende de muchas variables como la condición prandial, tiempo después de administración de alimentos, volumen y contenido de los alimentos, así como del volumen de las secreciones. El valor del pH varía gradualmente a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, desde valores muy bajos en el estómago hasta un pH básico en la última sección del intestino.

Poder amortiguador: La capacidad tamponadora puede definirse como “la cantidad de ácido o base fuerte que deben añadirse a un litro de solución tampón para producir un cambio de pH de una unidad” y se expresa en $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{pH}^{-1}$. La capacidad tamponadora de los fluidos intestinales puede afectar la velocidad de disolución, especialmente de fármacos ionizables. La capacidad amortiguadora depende del pH del medio, de la concentración del tampón y del pKa del mismo.

Osmolaridad: La osmolaridad puede afectar la liberación del fármaco y el comportamiento de los excipientes.

Viscosidad: El aumento de la viscosidad generalmente provoca una disminución del vaciamiento gástrico y prolonga el tránsito gastrointestinal.

Tensión superficial: la tensión superficial puede influir en la humectación de las formas de dosificación y por tanto afectar la disolución. Así, una alta tensión superficial disminuye la capacidad de humectación de sólidos.

En las tablas 1-4, 1-5 y 1-6 que se presentan a continuación, se señalan los valores de las propiedades del estómago, duodeno y yeyuno, respectivamente, que fueron obtenidas experimentalmente y se encuentran disponibles en la bibliografía.

Propiedad	En ayuno	Después de la ingesta de alimentos
pH	1-2,5	4,4-5,4
Capacidad tamponadora (mmol·L ⁻¹ ·pH ⁻¹)	7-18	14-28
Osmolaridad (mOsmol·kg ⁻¹)	171-276	217-559
Tensión superficial (mN·m ⁻¹)	41,9-45,7	30-31
Viscosidad (cP)	-	10-2000

Tabla 1-4. Propiedades de los fluidos en el estómago en condiciones de ayuno y después de la ingesta de alimentos (138).

Propiedad	En ayuno	Después de la ingesta de alimentos
pH	6,2	5,2-6,2
Capacidad tamponadora (mmol·L ⁻¹ ·pH ⁻¹)	5,6	18-30
Osmolaridad (mOsmol·kg ⁻¹)	178	250-367
Tensión superficial (mN·m ⁻¹)	33,3-46,0	32,2-36,7

Tabla 1-5. Propiedades de los fluidos en el duodeno en condiciones de ayuno y después de la ingesta de alimentos (138).

Propiedad	En ayuno	Después de la ingesta de alimentos
pH	5,3-8,1	6,1
Capacidad tamponadora (mmol·L ⁻¹ ·pH ⁻¹)	2,4-2,8	13,2-14,6
Osmolaridad (mOsmol·kg ⁻¹)	200-278	-
Tensión superficial (mN·m ⁻¹)	28-33,7	27

Tabla 1-6. Propiedades de los fluidos en el yeyuno en condiciones de ayuno y después de la ingesta de alimentos (138).

En el desarrollo de medios de disolución *in vitro* que resulten biopredictivos, es importante que su contenido imite los fluidos gastrointestinales, por lo que el pH, la concentración y medio tamponante sean similares a las encontradas *in vivo*. Las sales biliares, electrolitos, enzimas y los lípidos también deben ser similares a los que se encuentran en el tracto gastrointestinal (141).

c.) Medios que simulan las condiciones del tracto gastrointestinal

c.1.) Medios descritos en la Farmacopea

- Agua

La ventaja de usar agua como medio de disolución es que se trata de un medio simple que se ha sido ampliamente usado en controles de calidad. Se puede aceptar su uso si se tiene en cuenta que muchas formulaciones deben ser ingeridas con un vaso de agua. Además, en el caso de pacientes con hipoclorhidria (debido a la edad o tratamiento con antiácidos), el agua puede servir como medio ya que refleja ese aumento de pH gástrico y la baja capacidad amortiguadora. Para conseguir que el agua tenga capacidad amortiguadora se debe añadir una solución de HCl/NaCl o tampón acetato con un valor de pH de 5 (128). La Farmacopea Europea recomienda que sólo se use este medio cuando las variaciones de pH no tengan influencia en las características de la disolución (126).

- Soluciones tampón con pH entre 1,2 y 7,5

Estas soluciones están establecidas en las Farmacopeas porque el pH es sin duda un parámetro fundamental del tracto gastrointestinal que influye en la solubilidad de los fármacos. Las soluciones descritas la Farmacopea Europea (Ph.Eur.) con pH entre 1,2 y 1,5 contienen cloruro de sodio y ácido clorhídrico con concentración de la sal de 50 mM. Las soluciones de pH 4,5 se preparan con acetato de sodio y ácido acético y la concentración de la sal es de 36,5 mM y las que tienen un pH entre 5,8 y 6,8 contienen fosfato monobásico de potasio e hidróxido de sodio con concentración de 50 mM para la sal (126). Los sistemas tampón usados en cada rango de pH, corresponden a sus valores de pKa, ya que la capacidad tamponadora de un par conjugado se ve favorecida por la cercanía del pKa al valor del pH de la solución preparada. La alta concentración iónica utilizada persigue mantener constante el pH, que puede verse modificado por la disolución del fármaco estudiado o por efecto de los excipientes de la formulación.

- Fluido gástrico simulado (SGF, por sus siglas en inglés)

Este medio se ha usado tradicionalmente para simular las condiciones gástricas en ayunas. Contiene ácido clorhídrico, cloruro sódico, 3,2 g de pepsina y agua, y tiene un pH de 1,2 (125). Este medio no refleja exactamente las condiciones fisiológicas en el estómago, ya que el rango de pH en este órgano es de 1,5-1,9; para bases débiles muy poco solubles esta diferencia de pH puede sobreestimar la velocidad de disolución *in vivo*. La concentración de pepsina y la tensión superficial de este medio también se diferencian de los valores fisiológicos.

- Fluido intestinal simulado (SIF, por sus siglas en inglés)

Este medio se describió hace más de 50 años en la USP e inicialmente tenía un pH de 7,5. Estudios posteriores han concluido que ese pH es característico del

íleon, y que para que los fármacos se absorban tienen que haberse disuelto en tramos más proximales (duodeno y yeyuno proximal), por lo que el pH de este medio SIF se cambió a 6,8 en la USP publicada en el año 2000 (128). Este medio contiene fosfato monobásico de potasio, hidróxido de sodio y 10 g de pancreatina; su pH es 6,8 (125).

Los medios establecidos en las diferentes Farmacopeas son útiles en control de calidad, pero no representan todos los aspectos clave de la composición del tracto gastrointestinal, que pueden ser relevantes en la liberación del fármaco a partir de la forma farmacéutica ensayada (142).

c.2.) Medios que simulan las condiciones de la zona proximal del tracto gastrointestinal

La zona proximal del tracto gastrointestinal posee características y propiedades diferentes que dependen de su anatomía y del estado prandial, como se explicó anteriormente. Es por esto que los medios que intentan simular *in vitro* las condiciones de esta zona del intestino, fueron desarrollados como fluido gástrico que asemeja el estómago y fluido intestinal que mimetiza la región proximal del intestino. Para simular el estado prandial se han desarrollado métodos en estado de ayunas o en estado posterior a la ingesta de alimentos para ambos fluidos. A continuación se resume la composición de cada medio y su utilidad.

- Fluido gástrico simulado en estado de ayunas (FaSSGF, por sus siglas en inglés)

Este medio fue propuesto por Vertzoni y colaboradores en 2005, cuya composición y propiedades se resumen en la tabla 1-7. Este medio parece ser más apropiado que los propuestos previamente porque la disminución de la tensión superficial del medio es provocada por concentraciones fisiológicas de pepsina en vez de surfactantes sintéticos (142). Este medio es capaz de predecir la solubilidad de fármacos poco solubles a nivel estomacal en condiciones de ayuno.

FaSSGF pH 1,6	
Composición	
Taurocolato sódico (μM)	80
Lecitina (μM)	20
Pepsina (mg/mL)	0,1
Cloruro de sodio (mM)	34,2
Ácido clorhídrico c.s.	pH 1,6
Propiedades	
pH	1,6
Osmolaridad (mOsm/kg)	120,7 \pm 2,5
Capacidad tampón (mmol/L/pH)	-
Tensión superficial (mN/m)	42,6

Tabla 1-7. Composición del medio FaSSGF (143)

- Fluidos gástricos que simulan la presencia de alimentos

La composición gástrica en el estado postprandial depende del tipo de alimento ingerido. El medio ideal sería un homogeneizado de la comida usada en un estudio clínico, pero la dificultad del análisis del fármaco en estas condiciones limita el uso de este medio. Los medios alternativos propuestos incluyen leche homogeneizada de vaca con un contenido de grasa de 3,5% y Ensure® Plus, que poseen propiedades fisicoquímicas similares a las que tiene la comida estándar establecida por la FDA para evaluar el efecto de los alimentos en los estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia (142).

El problema más importante al tratar de simular el medio gástrico en presencia de alimentos es que la composición del mismo cambia en la medida en que se realiza la digestión y se produce el vaciado gástrico. El desarrollo de medios “instantáneos”, que correspondan a las etapas más representativas después de la ingesta de alimentos, puede ser una alternativa. Jantratid y colaboradores han propuesto tres medios “instantáneos” usando leche, que simulan los cambios que ocurren a nivel gástrico durante los primeros 200 minutos después de la ingesta de alimentos. Los investigadores han dividido este espacio de tiempo en tres etapas a las que denominaron fase temprana, fase media y fase tardía. La composición de los tres medios propuestos se muestra en la tabla 1-8. El medio de la fase media, parece reflejar mejor los cambios generales que ocurren con la ingesta de alimentos, por lo que ha sido designado como fluido gástrico simulado en estado postprandial (FeSSGF, por sus siglas en inglés) (144).

Fase			
Composición	Temprana	Media (FeSSGF)	Tardía
Cloruro de sodio (mM)	148	237,02	122,6
Ácido acético (mM)	-	17,12	-
Acetato de sodio (mM)	-	29,75	-
Ácido ortofosfórico (mM)	-	-	5,5
Dihidrógeno fosfato de sodio (mM)	-	-	32
Leche/solución tampón	1:0	1:1	1:3
Ácido clorhídrico/hidróxido de sodio c.s.	pH 6,4	pH 5	pH 3
Propiedades			
pH	6,4	5	3
Osmolaridad (mOsm/kg)	559	400	300
Capacidad tampón (mmol/L/pH)	21,33	25	25
Tensión superficial (mN/m)	49,7 ± 0,3	52,3 ± 0,3	58,1 ± 0,2

Tabla 1-8. Composición de los medios que simulan la presencia de alimentos en el estómago (144).

- **Fluido intestinal simulado en estado de ayunas (FaSSIF, por sus siglas en inglés)**

Este medio simula las condiciones del intestino delgado en ayunas. Tiene un pH representativo de los valores que se pueden encontrar entre la mitad del duodeno hasta el íleon proximal; contiene sales biliares (taurocolato sódico) y fosfolípidos (lecitina) que facilitan la humectación del sólido y la solubilización de compuestos lipófilos (128). La composición de este medio se detalla en la tabla 1-9.

FaSSIF pH 6,5	
Composición	
Taurocolato sódico (mM)	3
Lecitina (mM)	0,75
Dihidrógeno fosfato de sodio (g)	3,438
Cloruro de sodio (g)	6,186
Hidróxido de sodio c.s.	pH 6,5
Agua desionizada c.s.	1L
Propiedades	
pH	6,5
Osmolaridad (mOsm/kg)	~270
Capacidad tampón (mEq/L/pH)	~12
Tensión superficial (mN/m)	54

Tabla 1-9. Composición del medio FaSSIF (128)

- **FaSSIF-V2**

En 2008, Jantratid y colaboradores propusieron una ligera modificación en el medio FaSSIF, llamándolo FaSSIF-V2. Ésta consiste en una disminución de la cantidad de lecitina a 0,2 mM y un cambio del tampón fosfato por tampón maleato. La osmolaridad de este medio es de 180 ± 10 mOsm/kg (142).

- **Fluido intestinal simulado en estado postprandial (FeSSIF, por sus siglas en inglés)**

La primera versión de este medio fue propuesto en 1998 y su objetivo era simular las principales características de los fluidos intestinales. Fue diseñado en base a los datos recogidos en la literatura sobre la concentración de sales biliares y lecitina así como datos del pH en humanos. Se consideró además la capacidad tampón medida en perro como modelo (145). La composición de este medio se muestra en la tabla 1-10.

FeSSIF pH 5,0	
Composición	
Taurocolato sódico (mM)	15
Lecitina (mM)	3,75
Ácido acético (g)	8,65
Cloruro de sodio (g)	11,874
Hidróxido de sodio (lentejas) g	4,04
Agua desionizada c.s.	1L
Propiedades	
pH	5,0
Osmolaridad (mOsm/kg)	~670
Capacidad tampón (mEq/L/pH)	~72
Tensión superficial (mN/m)	48

Tabla 1-10. Composición del medio FeSSIF (128).

Estudios en humanos, posteriores al diseño de FeSSIF, revelaron que las condiciones de los fluidos intestinales después de la ingesta de alimentos difiere en algunos aspectos del FeSSIF inicialmente propuesto. Por ejemplo, la concentración de sales biliares es menor *in vivo*; el FeSSIF no contiene productos que provoquen lipólisis que, junto con la bilis, puede aumentar la solubilidad de los fármacos poco solubles. Por esta razón se propuso una nueva versión del medio al que se designó como FeSSIF-V2 (142).

- **FeSSIF-V2**

Este medio mimetiza los cambios en el pH, capacidad tampón, osmolaridad y concentración de componentes biliares provocados por los alimentos en el intestino. Este medio tiene una cantidad menor de componentes biliares que su predecesor (FeSSIF), pero esto se compensa con la inclusión de monoglicéridos y

ácidos grasos libres que pueden mejorar la solubilidad y disolución de fármacos poco solubles (144). En la tabla 1-11 se muestra la composición del medio FeSSIF-V2.

FeSSIF-V2 pH 5,8	
Composición	
Taurocolato sódico (mM)	10
Lecitina (mM)	2
Monooleato de glicerilo (mM)	5
Oleato de sodio (mM)	0,8
Ácido maleico (mM)	55,02
Hidróxido de sodio (mM)	81,65
Cloruro de sodio (mM)	125,5
Propiedades	
pH	5,8
Osmolaridad (mOsm/kg)	390 ± 10
Capacidad tampón (mEq/L/pH)	25
Tensión superficial (mN/m)	40,5 ± 0,2

Tabla 1-11. Composición del medio FeSSIF (144)

Las versiones V2 de los medios FaSSIF y FeSSIF demostraron una mejor capacidad de predicción *in vivo* que sus predecesores (144).

- **Medios preparados con tensoactivos sintéticos**

Los medios FaSSIF y FeSSIF han resultado muy útiles para predecir el comportamiento de fármacos poco solubles, sin embargo, debido a su composición compleja, estos medios son costosos y actualmente, requieren ser preparados el mismo día del ensayo porque son inestables (146). Por esta razón, en la actualidad se están desarrollando investigaciones encaminadas a sustituir los componentes biliares por tensoactivos sintéticos.

Taupitz y Klein, desarrollaron medios que contenían entre 0,1 y 0,5% de laurilsulfato sódico (LSS) y concentraciones entre 0,1 y 0,25% de tween 80. En el estudio realizado, utilizaron tamoxifeno como fármaco modelo clase II y obtuvieron perfiles de disolución de dicho fármaco con FaSSIF/FeSSIF que fueron comparados con los medios desarrollados utilizando tensoactivos sintéticos. Las concentraciones más bajas con gran capacidad discriminatoria fueron 0,175% y 0,1% para LSS y tween 80, respectivamente. Los autores señalan que los surfactantes sintéticos permiten el diseño de medios con capacidad discriminatoria para formulaciones que contienen fármacos poco solubles, pero aclaran que es necesario hacer un uso crítico de la cantidad de surfactante que se usa a fin de tener medios realmente predictivos (147).

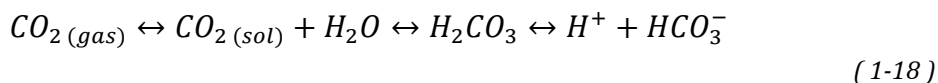
- Medios con incremento de la viscosidad

Los cambios en la absorción de fármacos en presencia de alimentos ha sido explicado por distintos mecanismos. Uno de ellos es el aumento de la viscosidad intraluminal, ya que éste influye sobre la desintegración y disolución de las formas de dosificación. El aumento de la viscosidad es un mecanismo que ha sido ampliamente documentado como predominante en los cambios de absorción de fármacos en presencia de alimentos y por tanto, debe ser considerado en el desarrollo de medios biopredictivos que persigan evaluar la influencia de la administración de alimentos de forma concomitante con una formulación (148). En este sentido, existen experiencias positivas usando hidroxipropilmetilcelulosa como agente viscosante, con el que se han diseñado medios a partir de soluciones tampón establecidas en la Farmacopea. Estos medios permiten estudiar el efecto del aumento de la viscosidad del medio sobre la velocidad de disolución de fármacos clase III, en los que es más probable que se produzca un efecto negativo con la administración de alimentos (148-150).

c.3.) Tampón bicarbonato

El principal sistema tampón que se encuentra en el intestino delgado es el bicarbonato. Este tampón además refleja la composición iónica y capacidad tampón de los fluidos intestinales (151). Por esta razón, este tampón puede considerarse esencial para una simulación de las condiciones intestinales muy semejantes a la reales, especialmente cuando el objetivo es predecir la disolución de formas farmacéuticas orales que contienen sustancias activas y excipientes ionizables (152).

El tampón bicarbonato está formado por el par conjugado bicarbonato/ácido carbónico ($\text{HCO}_3^-/\text{H}_2\text{CO}_3$). El ácido carbónico es un ácido débil con pKa 6,4; que es capaz de producir de forma espontánea su anhídrido correspondiente (CO_2) cuando se encuentra en solución acuosa (ecuación 1-19).



La pérdida de dióxido de carbono desde el seno de una solución tampón de bicarbonato, que por consiguiente cambia las concentraciones del par conjugado bicarbonato/ácido carbónico, es la razón por la que mantener el pH de esta solución en condiciones experimentales resulta difícil e impreciso. Esta dificultad es el factor que limita la utilización de este tampón en los estudios de disolución *in vitro*, a pesar de ser el tampón fisiológico (153). En su lugar se han usado los tampones como el fosfato y el acetato, que difieren en pKa con respecto al bicarbonato. Por otro lado, las concentraciones que se usan de los tampones fosfato y acetato son mucho mayores que las que se encuentran fisiológicamente de bicarbonato. La solución tampón de fosfato recomendada por la Ph.Eur. es de 50 mM a pH 6,8 y la de acetato con pH 4,5 es de 36,5 mM (126) que contrasta con

la concentración de 15 mM de bicarbonato, que se ha encontrado como valor medio en el tracto gastrointestinal. La capacidad tampón depende del pKa y de la concentración del par conjugado, como es de esperarse según lo expuesto anteriormente, las soluciones comúnmente usadas *in vitro* difieren enormemente en su capacidad tampón del bicarbonato fisiológico (141).

Ante el inconveniente que se presenta con las soluciones tampón de bicarbonato, de no poder mantener el pH constante, Garbacz y colaboradores diseñaron un equipo de disolución acoplado a un controlador automático para monitorizar y ajustar el pH de medios con bicarbonato al que denominaron pHysio-stat. Demostraron que este sistema puede usar mezclas de gases con diferentes presiones parciales de dióxido de carbono o solo dióxido de carbono para ajustar el pH de soluciones tampón de bicarbonato, en un rango entre 5,5 y 8,4 que son los intervalos de pH que se pueden encontrar en el intestino en condiciones pre y postprandiales (152).

Otro enfoque para el diseño de medios que simulen las condiciones encontradas en el tracto gastrointestinal determinadas por el tampón bicarbonato, es el propuesto por Sheng y colaboradores, quienes encontraron que el uso de tampón fosfato con menos concentración o fuerza iónica pueden ser sustitutos del tampón bicarbonato (141). De acuerdo con esta investigación, fue propuesto un medio tampón de baja concentración iónica de fosfato partiendo de la composición del medio SIF descrito en la Farmacopea, que fue llamado LSIF, por sus siglas en inglés. Este medio fue preparado usando una concentración de 10 mM de fosfato a pH 6,0 y 6,8 para evaluar los ácidos débiles ibuprofeno y ketoprofeno como fármacos modelo. Los resultados de los perfiles obtenidos con estos medios permitieron observar diferencias en las velocidades de disolución de los fármacos que no fueron posibles usando medios de alta concentración iónica de fosfato, como los descritos en las farmacopeas (154).

d.) Consideraciones prácticas para la selección de medios

En formas farmacéuticas de liberación inmediata que contienen fármacos altamente solubles (Clase I y III del SCB) no se requiere del diseño de medios muy sofisticados. Los medios que se proponen en las guías de bioexenciones pueden resultar útiles y predictivos. Para los fármacos de la clase II del SCB, en los que la velocidad de disolución es el parámetro que limita su absorción, se requiere de ensayos de disolución diseñados de tal forma que permitan predecir su comportamiento *in vivo*, lo que generalmente se consigue con un medio biopredictivo (128).

Como se mencionó anteriormente, una característica del fármaco que es importante evaluar es su naturaleza química, ya que el tratamiento que se debe considerar es distinto si el compuesto es neutro, ácido débil o base débil. La

capacidad de ionización de ácidos y bases débiles hacen que su solubilidad dependa del pH del medio (57).

Mediante estudios hechos con danazol, fenitoína e itraconazol como fármacos modelo de compuestos neutro, ácido débil y base débil respectivamente; Klein, S. concluye que para compuestos neutros los medios FaSSIF y FeSSIF son herramientas útiles para predecir su biodisponibilidad. En el caso de ácidos débiles, a pesar de la influencia que puede tener el pH en la ionización del fármaco y en consecuencia en su solubilidad, resulta fundamental considerar el impacto de los componentes biliares sobre la solubilidad de esta clase de fármacos, por lo que FaSSIF y FeSSIF son medios predictivos más eficaces que los establecidos en las Farmacopeas. Para las bases débiles, cuya solubilidad se ve favorecida a nivel estomacal, el SGF con pH modificado entre 1,8 y 2,0, así como FaSSIF y FeSSIF pueden ser usados como herramientas en la etapa de desarrollo de formulaciones de este tipo de fármacos (128).

Si una sustancia activa posee una ventana de absorción, es decir, que se absorbe en un determinado tramo del tracto gastrointestinal, puede resultar útil investigar la disolución al pH que tiene la zona específica de absorción.

C. Correlaciones *In vivo-In vitro*

El término correlación se emplea para referirse a una relación que existe entre variables. Desde el punto de vista biofarmacéutico las correlaciones están referidas a la relación entre un parámetro de liberación *in vitro* y un parámetro de biodisponibilidad *in vivo* (155). Según la FDA una correlación *in vivo-in vitro* es un modelo matemático predictivo que describe la relación entre una propiedad *in vitro* de una formulación y una respuesta relevante *in vivo*. La velocidad de disolución del fármaco es la propiedad *in vitro* que normalmente se emplea y la concentración plasmática o la cantidad de fármaco que se absorbe es la respuesta *in vivo* (156).

El objetivo principal de desarrollar y validar una correlación *in vivo-in vitro* es establecer la prueba de disolución como sustituto de estudios de bioequivalencia en humanos, lo que puede reducir el número de este tipo de estudios durante la etapa inicial de desarrollo y además se pueden permitir ciertos cambios posteriores a la aprobación, apoyados en los resultados de los perfiles de disolución (157).

De acuerdo a la capacidad para reflejar los la totalidad de la curva plasmática después de la administración de una formulación, se pueden describir cuatro niveles de correlación:

- Nivel A: Este es el nivel más alto de correlación y representa una relación punto a punto entre la velocidad de disolución *in vitro* y la velocidad de absorción o disolución del fármaco en el organismo. En esta correlación los

perfiles de disolución *in vitro* y la velocidad de absorción *in vivo* son directamente superponibles o se pueden hacer superponibles mediante el uso de una constante de corrección (125).

- Nivel B: Se correlacionan momentos estadísticos como el tiempo medio de disolución *in vitro* con el tiempo medio de residencia *in vivo*. En este nivel se utilizan todos los datos *in vivo* e *in vitro*, pero no se considera una correlación punto a punto porque no refleja la curva real de nivel plasmático *in vivo* (158).
- Nivel C: Es una correlación de un solo punto, en la que se relaciona un parámetro de la disolución con un parámetro farmacocinético (159).
- Nivel C múltiple: es una correlación que implica uno o varios parámetros farmacocinéticos que se relacionan con el fármaco disuelto a distintos tiempos del ensayo *in vitro*. Debe basarse en, al menos, tres tiempos del ensayo de disolución para que estén representadas la fase inicial, media y final del perfil de disolución (156).

D. Fármacos a estudiar

1. Zolpidem

El Zolpidem es una imidazopiridina cuyo nombre químico es 2-(4-metilfenil)-N,N-6-trimetil-imidazol[1,2- α]piridin-3-acetamida (125) y su estructura puede observarse en la figura 1-13. Es un agente hipnótico no benzodiazepínico (160) agonista de los receptores benzodiazepínicos del complejo GABA_A y tiene selectividad por los subtipos del receptor BZ-1 (omega-1) y poca afinidad por los otros subtipos (161, 162). Está indicado en el tratamiento del insomnio ya que se comporta como inductor del sueño; sin los efectos de relajante muscular y anticonvulsivante de las benzodiazepinas (162).

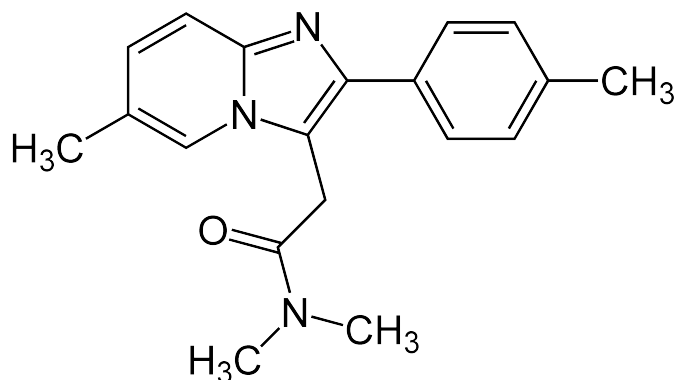


Figura 1-13. Estructura química del Zolpidem.

1.1. Propiedades fisicoquímicas

El Zolpidem es una base muy débil con un valor de pKa de 5,65 y logP de 3,02 (163). En las formas farmacéuticas sólidas orales, el Zolpidem es empleado en forma de sal como Zolpidem Tartrato. Esta sal es un polvo blanco a blanquecino, higroscópico (125). Posee un peso molecular de 764,87 g/mol, punto de fusión de 196°C y una solubilidad de 23 mg/mL (164).

1.2. Propiedades farmacocinéticas

Dosis y presentación: La máxima dosis recomendada es de 10 mg y se presenta como comprimidos de 5 y 10 mg.

Absorción: Tras la administración oral, la biodisponibilidad de Zolpidem es alrededor del 70%, alcanzando el máximo de concentración plasmática entre 0,5 y 3 horas tras la ingesta.

Distribución: A dosis terapéuticas, la farmacocinética es lineal, el grado de unión a proteínas plasmáticas es de alrededor del 92%. La semivida plasmática de eliminación es aproximadamente 2,4 horas (0,7-3,5 horas). El volumen de distribución en adultos es de $0,54 \pm 0,02$ L/kg.

Excreción: Zolpidem se excreta en forma de metabolitos inactivos (metabolismo hepático), principalmente en orina (56%) y en heces (37%). No tiene efecto inductor sobre las enzimas hepáticas. En sujetos ancianos el aclaramiento está reducido. El pico de concentración plasmática está aumentado aproximadamente el 50% sin una prolongación significativa de la vida media (alrededor de 3 horas). El volumen de distribución disminuye a $0,34 \pm 0,05$ L/kg en los muy ancianos.

En pacientes con insuficiencia renal, tanto dializados como no, existe una moderada reducción del aclaramiento. Los otros parámetros farmacocinéticos no se afectan.

Biodisponibilidad: En pacientes con insuficiencia hepática, la biodisponibilidad de Zolpidem está aumentada, el aclaramiento está reducido y la vida media de eliminación prolongada (aproximadamente 10 horas)(165). El aclaramiento en voluntarios sanos es de 276 ± 16 mL/min y de $3,9 \pm$ mL/min/Kg (166).

1.3. Problema de bioequivalencia

Durante el presente estudio se compararon dos formulaciones con el producto de referencia. En la tabla 1-12 se muestran los datos de los estudios de bioequivalencia de ambas formulaciones.

Parámetro	Intervalo de Confianza 90%	
	BE-B	BE
$C_{m\acute{a}x}$	80,29-97,70%	81,83-101,05%
$AUC_{0-\infty}$	85,90-104,71%	83,55-101,54%

Tabla 1-12. Análisis estadístico de los estudios de bioequivalencia de las formulaciones estudiadas de Zolpidem comparadas con la referencia.

Como se puede observar en la tabla 1-12, la primera formulación (BE-B) no incluye el 100% en el intervalo de confianza para $C_{m\acute{a}x}$. Este producto aunque es bioequivalente, su intervalo está en la parte inferior de la curva, por lo que en el presente estudio es denominado bioequivalente bajo (BE-B) y la otra formulación demostró bioequivalencia para ambos parámetros, por lo que fue denominado como bioequivalente (BE).

1.4. Excipientes de las formulaciones ensayadas

En la tabla 1-13 se pueden observar los excipientes presentes tanto en el producto de referencia como en las formulaciones BE y BE-B.

Excipiente	Referencia	BE-B	BE
Lactosa	√	√	
Celulosa microcristalina	√	√	
Hipromelosa	√	√	
Carboximetilalmidón de sodio		√	
Almidón glicolato de sodio	√		
Estearato de magnesio	√	√	√
Talco		√	
PEG400	√		
PEG6000		√	
TiO ₂	√	√	
Cellactose			√
Croscarmelosa			√
Dióxido de silicón coloidal			√
Opaglos AG-7350			√
Opadry blanco			√

Tabla 1-13. Excipientes de las distintas formulaciones estudiadas de Zolpidem (167).

2. Pravastatina

La Pravastatina cuya nomenclatura es (3R,5R)-7-[(1S,2S,6S,8S,8aR)-6-hidroxi-2-metil-8-[(2S)-2-metilbutanoil]oxi-1,2,6,7,8,8a-hexahidronaftalen-1-yl]-3,5-ácido dihidroxiheptanoico (168) (figura 1-14), es un inhibidor semisintético de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa usado ampliamente para el tratamiento de la hipercolesterolemia (169).

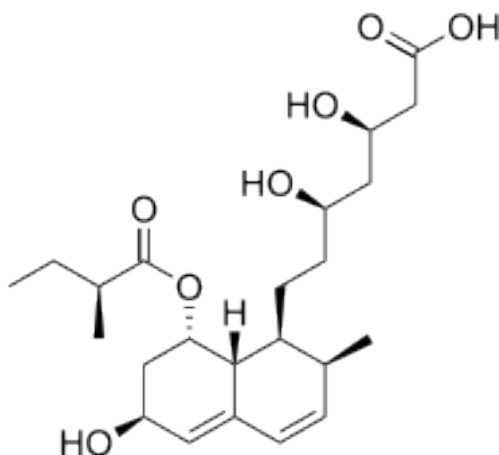


Figura 1-14. Estructura química de Pravastatina.

2.1. Propiedades fisicoquímicas

La Pravastatina es un ácido débil con un pKa de 4,21 y logP de 1,65 (168). Para su administración oral se emplea bajo la forma de sal sódica. La Pravastatina sódica es un polvo higroscópico blanco a blanco amarillento. Fácilmente soluble en agua y en metanol; prácticamente insoluble en acetonitrilo y cloroformo (125). La Pravastatina sódica posee un peso molecular de 446,52 g/mol y un punto de fusión de 138-142 °C (164).

2.2. Propiedades farmacocinéticas

Dosis y presentación: La máxima dosis recomendada es de 40 mg. Se presenta en comprimidos de 10, 20 y 40 mg.

Absorción: Pravastatina se administra por vía oral en su forma activa. Se absorbe rápidamente, alcanzando los niveles plasmáticos máximos después de 1 - 1,5 horas de su administración. En promedio, se absorbe el 34% de la dosis administrada oralmente, con una biodisponibilidad absoluta del 17%.

La presencia de alimentos en el tracto gastrointestinal produce una reducción de la biodisponibilidad, pero el efecto hipolipemiante de Pravastatina es idéntico independientemente de la ingesta de alimentos.

Después de su absorción, el 66% de Pravastatina experimenta un efecto de primer paso en el hígado, que es su principal lugar de acción y el lugar principal de la síntesis de colesterol y del aclaramiento del colesterol LDL. Los estudios *in vitro* han demostrado que Pravastatina es transportada al interior de los hepatocitos con una captación sustancialmente menor por otras células. Debido a su importante efecto de primer paso hepático, las determinaciones plasmáticas de Pravastatina tienen sólo un valor limitado para predecir el efecto hipolipemiante. Las concentraciones plasmáticas son proporcionales a las dosis administradas.

Distribución: Aproximadamente el 50% de la Pravastatina circulante se une a proteínas plasmáticas. El volumen de distribución es de aproximadamente 0,5 L/Kg. Una pequeña cantidad de Pravastatina pasa a la leche humana.

Metabolismo y eliminación: Pravastatina no se metaboliza de manera significativa por el sistema del citocromo P450 y no parece ser un sustrato ni inhibidor de la glicoproteína P pero sí es un sustrato de otras proteínas transportadoras.

Después de la administración oral, el 20% de la dosis inicial se elimina en la orina y el 70% en las heces. La vida media de eliminación plasmática (oral) es de 1,5 a 2 horas.

Después de la administración intravenosa, el 47% de la dosis se elimina por excreción renal y el 53% por excreción biliar y biotransformación. El principal producto de degradación de Pravastatina es el metabolito 3- α -hidroxi isomérico. Este metabolito tiene de 1/10 a 1/40 de la actividad inhibitoria de HMG-CoA reductasa del fármaco precursor.

El aclaramiento sistémico de Pravastatina es de 0,81 L/h/Kg y el aclaramiento renal es 0,38 L/h/Kg indicando secreción tubular (170).

2.3. Problemas de bioequivalencia

Durante el presente estudio se ensayaron dos formulaciones que fueron comparadas con el producto de referencia. En la tabla 1-14 se muestran los datos de los estudios de bioequivalencia de ambas formulaciones.

Parámetro	Intervalo de Confianza 90%	
	BE-A	BE
$C_{m\acute{a}x}$	100,20-126,30%	94,70-122,90%
$AUC_{0-\infty}$	92,50-107,50%	95,10-115,60%

Tabla 1-14. Análisis estadístico de los estudios de bioequivalencia de las formulaciones estudiadas de Pravastatina comparadas con la referencia.

Como se puede observar en la tabla anterior, la primera formulación (BE-A) no incluye el 100% en el intervalo de confianza para $C_{m\acute{a}x}$. Este producto aunque es bioequivalente, su intervalo está en la parte superior de la curva, por lo que en el

presente estudio es denominado bioequivalente alto (BE-A) y la otra formulación demostró bioequivalencia para ambos parámetros, por lo que fue denotado como bioequivalente (BE).

2.4. Excipientes de las formulaciones ensayadas

En la tabla 1-15 se pueden observar los excipientes presentes tanto en el producto de referencia como en las formulaciones BE y BE-B.

Excipiente	Referencia	BE-A	BE
Croscarmelosa sódica	√	√	
Estearato de magnesio	√	√	√
Oxido de magnesio pesado	√		
Celulosa microcristalina	√	√	√
Oxido de hierro amarillo	√	√	√
Sílice coloidal		√	
Carbonato de magnesio pesado		√	
Lactosa	√	√	
Povidona K30	√		√
Fosfato cálcico monobásico anhidro			√
Almidón glicolato de sodio			√
Trometamol			√
Fosfato sódico dibásico dihidrato			√

Tabla 1-15. Excipientes de las distintas formulaciones estudiadas de Pravastatina (167).

3. Cloperastina

La Cloperastina, cuyo nombre químico es 1-[2-[(4-clorofenil)fenilmetoxi]etil]piperidina (164) (figura 1-15), es un fármaco con acción antitusiva central que posee además acción antihistamínica (171).

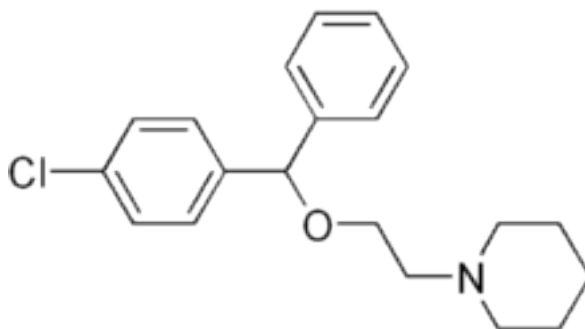


Figura 1-15. Estructura química de la Cloperastina.

3.1. Propiedades fisicoquímicas

La Cloperastina es una base débil con un pKa de 8,82 y logP de 5,11 (172). La Cloperastina puede encontrarse en forma de sal de clorhidrato o de fendizoato. La primera es usada en la formulación de comprimidos y la sal de fendizoato es empleada para preparar formulaciones líquidas. La Cloperastina fendizoato posee un peso molecular de 648,2 g/mol (173).

3.2. Propiedades farmacocinéticas

Dosis y presentación: La máxima dosis recomendada es de 10 mL (35,4 mg de Cloperastina fendizoato) y la presentación como suspensión tiene una concentración de 3,54 mg/mL.

La Cloperastina administrada oralmente presenta una buena biodisponibilidad ya que posee una buena absorción en el tracto gastrointestinal y el pico sérico se obtiene alrededor de los 60-90 minutos.

La Cloperastina se metaboliza y se elimina rápidamente en la orina y los metabolitos hepáticos se eliminan en 24 horas tras la administración (174).

3.3. Problemas de bioequivalencia

Parámetro	Intervalo de Confianza 90%	
	No BE	BE
$C_{m\acute{a}x}$	<i>Datos no proporcionados</i>	
$AUC_{0-\infty}$		

Tabla 1-16. Análisis estadístico de los estudios de bioequivalencia de las formulaciones estudiadas de Cloperastina comparadas con la referencia.

3.4. Excipientes de las formulaciones ensayadas

En la tabla 1-17 se pueden observar los excipientes presentes en el producto de referencia y en las formulaciones BE y No BE.

Excipiente	Referencia	BE y No BE
Sacarosa	√	
Celulosa microcristalina	√	
Carmelosa sódica	√	
Polioxil-40-estearato	√	
Parahidroxibenzoato de metilo	√	√
Parahidroxibenzoato de propilo	√	√
Aroma de plátano	√	√
Sacarina sódica		√
Goma xantan		√
Glicerol		√
Carbómeros		√
Estearato de macrogol		√
Agua purificada	√	√

Tabla 1-17. Excipientes de las formulaciones estudiadas de Cloperastina (167).

2. Objetivos y Planteamiento

La administración vía oral es la más utilizada y mejor aceptada por la comodidad que supone el cumplimiento posológico sobre todo en tratamientos prolongados. La absorción de un fármaco administrado en una forma farmacéutica por vía oral depende de su liberación desde la formulación, disolución bajo condiciones fisiológicas y permeabilidad a través del tracto gastrointestinal.

Los principales condicionantes de la absorción por vía oral son la permeabilidad, solubilidad y velocidad de disolución. El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico propuesto por Amidon y colaboradores en 1995 establece la clasificación de fármacos de acuerdo a su solubilidad y permeabilidad en cuatro clases: I de alta solubilidad y permeabilidad, II de baja solubilidad y alta permeabilidad, III de alta solubilidad y baja permeabilidad y IV de baja solubilidad y permeabilidad (50).

El SCB tiene gran utilidad en el descubrimiento de nuevos fármacos, en el desarrollo de formas farmacéuticas y es una base científica en materia regulatoria sobre bioequivalencia (57). En este sentido, en la guía de bioequivalencia de la EMA se establece que para fármacos de las clases I y III se puede demostrar bioequivalencia entre formulaciones sólidas de liberación inmediata, sustituyendo

los datos en humanos por estudios de perfiles de disolución, siempre que se cumplan una serie de requisitos. Este procedimiento se conoce a nivel científico y regulatorio como bioexención.

Los ensayos de disolución tiene gran importancia en todas las fases de desarrollo y vida de los medicamentos destinados a la administración oral. Los ensayos de disolución se utilizan para evaluar la calidad lote-lote de un producto farmacéutico, el desarrollo de nuevas formulaciones y asegurar que la calidad y desempeño del producto no se modifican después de ciertos cambios en la formulación, proceso de fabricación, lugar de fabricación y cambios de escala. Son además un recurso que permite la aprobación de genéricos por bioexención que es un mecanismo más rápido, económico y no implica las limitaciones bioéticas propias de los estudios *in vivo*.

Considerando que hasta el momento el uso de bioexenciones basadas en el SCB para los fármacos de las clases I y III ha sido un éxito, Kostewicz y colaboradores opinan que el uso de los ensayos de disolución podría ampliarse con el empleo de medios biopredictivos siempre que se realicen las validaciones necesarias con datos clínicos (123).

Los excipientes usados en las formas farmacéuticas de administración oral se han considerado inertes, sin embargo, estudios recientes han demostrado que algunos excipientes pueden afectar el vaciamiento gástrico, la motilidad intestinal, la integridad de la membrana y pueden afectar el transporte mediado por transportadores.

Dada la importancia que tiene la clasificación según el SCB, la necesidad de desarrollar metodologías que permitan predecir el comportamiento de formulaciones orales en humanos y la necesidad de establecer el efecto de los excipientes sobre la permeabilidad, se han planteado los siguientes objetivos:

- ✓ Determinar la solubilidad y permeabilidad de los fármacos en estudio: Zolpidem, Pravastatina y Cloperastina.
- ✓ Determinar la lipofilia de los fármacos estudiados.
- ✓ Clasificar según el SCB los fármacos Zolpidem, Pravastatina y Cloperastina.
- ✓ Explorar metodologías *in vitro* de disolución para predecir el comportamiento en humanos de las formulaciones sólidas orales de liberación inmediata ensayadas.
- ✓ Explorar metodologías *in situ* para predecir el comportamiento en humanos de las formulaciones sólidas orales de liberación inmediata ensayadas.
- ✓ Evaluar, mediante métodos *in situ*, si existen diferencias en los procesos de absorción del fármaco en las distintas formulaciones estudiadas.

- ✓ Evaluar el efecto de los excipientes utilizados en cada una de las formas farmacéuticas de uso oral ensayadas.

3. Materiales y Métodos

A. Compuestos y productos ensayados

1. Zolpidem hemitartrato

- Principio activo (patrón): fue proporcionado por un Laboratorio Farmacéutico.
- La formulación bioequivalente baja (BE-B) y la bioequivalente (BE) fueron proporcionados por un Laboratorio Farmacéutico.
- El producto de referencia (Stilnox®, Sanofi-Aventis, S.A.) fue adquirido en una farmacia local.

Los comprimidos ensayados del producto de referencia y los de las formulaciones BE-B y BE contenían 10 mg de fármaco.

2. Pravastatina sódica

- Principio activo (patrón): fue donado por un Laboratorio Farmacéutico.
- Las formulaciones bioequivalente alta (BE-A) y bioequivalente (BE) fueron suministradas por un Laboratorio Farmacéutico.
- El producto de referencia (Lipemol®, Bristol-Myers Squibb, S.A.) fue adquirido en una farmacia local.

Los comprimidos ensayados de todas las formulaciones estudiadas contenían 40 mg.

3. Cloperastina fendizoato

- Principio activo (patrón): fue dispensado por un Laboratorio Farmacéutico.
- El producto de referencia (Flutox®, Zambon) fue adquirido en una farmacia local.
- Los biolotes bioequivalente (BE) y no bioequivalente (No BE) fueron cedidos por un Laboratorio Farmacéutico.

Las suspensiones estudiadas poseían una concentración de 3,54 mg/mL de Cloperastina fendizoato.

B. Técnicas experimentales

1. Concentración de saturación

Con la finalidad de calcular el número de dosis (Do) se determinó la concentración de saturación a 37°C de cada fármaco a los pH de referencia (1,2; 4,5 y 6,8).

1.1. Soluciones de trabajo

- Tampón cloruro 50 mM pH 1,2
- Tampón acetato 36,5 mM pH 4,5
- Tampón fosfato 50 mM pH 6,8

Todas las soluciones fueron preparadas según lo establecido en la Ph.Eur.

1.2. Técnica experimental

Se colocaron cantidades exactamente pesadas de la sustancia activa en tubos Pyrex de 12 mL de cierre hermético con tapón recubierto de teflón y se le

agregó la solución tampón correspondiente. Se agita durante 3 minutos en un vortex (Genic 2 Scientific Industries) y a continuación fueron introducidos en el agitador orbital termorregulado (Stuart orbital incubator SI50) a 37°C programado a 100 movimientos oscilantes por minuto. A lo largo del ensayo fue verificada la presencia de sólido no disuelto a fin de garantizar que la solución se encontraba en condición de saturación. El pH de las soluciones fue medido a lo largo del ensayo (pHmetro Crison pH-Meter Basic 20+), no requiriendo ningún ajuste.

1.3. Tratamiento de las muestras

Se tomaron tres muestras a los tiempos programados (1h, 4h, 8h y 24h) y se centrifugaron a 5000 r.p.m. durante 10 minutos. Del sobrenadante se tomó un volumen conveniente que fue diluido a fin de evitar la precipitación del fármaco durante la cuantificación. La dilución fue realizada con la misma solución tampón donde se realizó el ensayo de solubilidad de la muestra correspondiente. Para la cuantificación de cada muestra se utilizó el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) adecuado y el cálculo de solubilidad fue realizado por interpolación en la curva de calibrado de los valores de área obtenidos para cada muestra.

2. Coeficiente de reparto

Se determinó el coeficiente de reparto en n-octanol que representa un parámetro capaz de reproducir el carácter lipófilo de las membranas biológicas absorbentes.

2.1. Soluciones de trabajo

Como fase acuosa se utilizó tampón fosfato 50 mM a pH 6,80 y como fase orgánica se utilizó n-octanol (Sigma-Aldrich).

La fase acuosa se satura con la fase orgánica y viceversa, obteniéndose tampón fosfato saturado en n-octanol (fase acuosa) y n-octanol saturado en tampón fosfato (fase orgánica). Para ello se mezclan volúmenes iguales de ambos en un embudo de decantación, se deja en reposo 24 horas y se separan las fases por decantación.

La solución de cada compuesto se realiza en la fase acuosa ya saturada, ajustando el pH final a 6,80.

2.2. Técnica experimental

Con el objeto de evitar una dispersión excesiva de los valores experimentales, es conveniente que las cantidades finales de soluto en las dos fases sean de magnitud semejante. Para ello se acostumbra a modificar la relación de volúmenes de las fases que se mezclan, dentro de márgenes razonables, en función del coeficiente de reparto que se vaya a determinar. En los compuestos ensayados la concentración de preparación de las soluciones y la relación de volúmenes (n-octanol y solución del fármaco) se detalla en la tabla 3-1.

Fármaco	Concentración de la solución (mg/mL)	Volumen de solución de fármaco (mL)	Volumen de n-octanol (mL)
Zolpidem	0,04	2	4
	0,09	2	4
Pravastatina	0,16	2	4
	0,45	2	4
Cloperastina	$7,79 \cdot 10^{-3}$	10	0,125

Tabla 3-1. Concentración de las soluciones de fármaco y volúmenes de ambas fases usadas en el coeficiente de repartos.

Se introdujeron los volúmenes señalados de solución de fármaco y de fase orgánica en tubos Pyrex de 12 mL y se sometieron a agitación en dos secuencias. En la primera se sometieron a agitación rápida (120 sacudidas por minuto) durante 15 minutos y en la segunda se trasladaron a un agitador orbital termorregulado (Stuart orbital incubator SI50) a $37 \pm 0,5$ °C durante 24 horas. Se prepararon suficientes tubos a fin de extraer muestras a 1, 2, 4 y 24 horas después de iniciado el ensayo.

Una vez extraídos los tubos se centrifugaron a 4500 r.p.m. durante 10 minutos para separar ambas fases. Se comprobó el pH de la fase acuosa, para asegurar que el reparto se había producido a pH 6,80. Seguidamente, se tomó una alícuota de la fase acuosa que fue valorada mediante HPLC.

2.3. Tratamiento matemático

La concentración de compuesto se calcula por interpolación en una curva de calibrado preparada paralelamente al ensayo.

El coeficiente de reparto (D) se calculó según la relación de concentración de compuesto entre la fase orgánica y la acuosa de acuerdo con la expresión:

$$D = \frac{C_o}{C_a} = \frac{\frac{Q_{ai} - Q_{af}}{V_o}}{C_a} = \frac{Q_{ai} - C_a \cdot V_a}{C_a \cdot V_o}$$

(3-1)

en la que C_o es la concentración de compuesto en la fase orgánica, C_a la concentración de compuesto en la fase acuosa. C_o no se puede calcular directamente, por lo que se obtiene por diferencia entre la cantidad de compuesto en la fase acuosa al inicio del proceso Q_{ai} y la cantidad que queda al final Q_{af} , dividida por el volumen de fase orgánica utilizada, V_o . La concentración de compuesto en la fase acuosa (C_a) se obtiene directamente mediante la valoración de la muestra. Se calculó posteriormente el logaritmo decimal del coeficiente de partición (Log D).

3. Perfiles de disolución

3.1. Aparato de disolución

El equipo empleado en el presente estudio corresponde al aparato II de disolución descrito en la Ph.Eur., marca Pharma-Test PT-DT70 acoplado a un sistema de muestreo automático constituido por una bomba peristáltica ISMATEC IPC y un colector de fracciones Pharma-Test PTFC-2 que permite retirar de cada vaso de disolución un volumen nominal de 5 mL y reponer dicho volumen en los tiempos programados para la toma de muestras. El sistema de toma de muestras dispone de un filtro de polietileno con tamaño de poro 10 μm (Pharma-Test) en cada vaso, que impide la extracción de partículas no disueltas.

3.2. Condiciones de los perfiles de disolución

Para la realización de los perfiles se emplearon 900 mL de medio de disolución en cada vaso. El equipo fue programado a una velocidad de 50 r.p.m. y la temperatura fue de 37°C. Los tiempos de toma de muestra para los perfiles de Zolpidem y Pravastatina fueron de 5, 10, 15, 20, 30 y 60 minutos. En los perfiles de Cloperastina se tomaron muestras a los 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 y 90 minutos.

3.3. Técnica experimental

Para comenzar el perfil se debe preparar el medio de disolución tamponado a ensayar y medir el pH del mismo; si éste requiere algún tipo de ajuste debe hacerse antes de seguir con el protocolo de trabajo. Se permitió un error en el valor del pH de $\pm 0,05$. Una vez ajustado el pH se procede a desgasificar el medio, que se realiza mediante filtración al vacío a través de membrana filtrante Millipore tipo HNWP de nylon de 0,45 μm con agitación magnética por 10 minutos (125, 135). El medio desgasificado se coloca en el vaso de disolución para que alcance los 37°C. Cuando todos los vasos tienen la temperatura adecuada, se mide el pH en

cada vaso. Posteriormente, se coloca una unidad posológica en cada vaso de disolución (procurando en el caso de los comprimidos, que éstos caigan en el centro del vaso) y se inicia el perfil (tiempo cero) al comenzar la agitación. Al finalizar el ensayo se mide nuevamente el pH de cada vaso.

Las muestras obtenidas de las formulaciones de Zolpidem fueron valoradas directamente por espectrofotometría en la región ultravioleta (U.V.). En el caso de los productos estudiados de Pravastatina, las muestras se diluyeron en proporción 1:2 con el correspondiente medio de disolución y posteriormente fue determinada la absorbancia de las soluciones resultantes por espectrofotometría.

La valoración de las muestras de Cloperastina se realizó por HPLC con detección U.V. .

La cantidad disuelta a cada tiempo de muestreo, de todos los fármacos estudiados fue calculada por interpolación en una curva de calibrado de los valores de absorbancia o de área obtenidos para cada muestra.

3.4. Medios de disolución

Los medios de disolución ensayados para cada compuesto se muestran en las tablas 3-2, 3-3 y 3-4.

pH	Composición	Concentración (mM)
1,2	Cloruro de sodio/ácido clorhídrico	50
4,5	Acetato de sodio/ácido acético	36,5
6,8	Fosfato diácido de potasio/ácido fosfórico	50
2,0	Cloruro de sodio/ácido clorhídrico	50
6,0	Fosfato diácido de potasio/ácido fosfórico	50
6,5	Fosfato diácido de potasio/ácido fosfórico	50
1,2	Cloruro de sodio/ácido clorhídrico	5
6,0	Fosfato diácido de potasio/ácido fosfórico	10
6,5	Fosfato diácido de potasio/ácido fosfórico	10
6,8	Fosfato diácido de potasio/ácido fosfórico	10
4,5	Fosfato diácido de potasio/ácido fosfórico	10

Tabla 3-2. Medios ensayados en los perfiles de disolución de Zolpidem.

pH	Composición	Concentración (mM)
1,2	Cloruro de sodio/ácido clorhídrico	50
4,5	Acetato de sodio/ácido acético	36,5
6,8	Fosfato diácido de potasio/ácido fosfórico	50
2,0	Cloruro de sodio/ácido clorhídrico	50
6,0	Fosfato diácido de potasio/ácido fosfórico	50
6,5	Fosfato diácido de potasio/ácido fosfórico	50
1,2	Cloruro de sodio/ácido clorhídrico	5
3,0	Cloruro de sodio/ácido clorhídrico	5
6,0	Fosfato diácido de potasio/ácido fosfórico	10
6,5	Fosfato diácido de potasio/ácido fosfórico	10
6,8	Fosfato diácido de potasio/ácido fosfórico	10
4,5	Fosfato diácido de potasio/ácido fosfórico	10

Tabla 3-3. Medios ensayados en los perfiles de disolución de Pravastatina.

pH	Composición	Concentración (mM)
1,2	Cloruro de sodio/ácido clorhídrico	50
4,5	Acetato de sodio/ácido acético	36,5
6,8	Fosfato diácido de potasio/ácido fosfórico	50

Tabla 3-4. Medios ensayados en los perfiles de disolución de Cloperastina.

3.5. Prueba de comparación

Para determinar que la velocidad de disolución del fármaco desde la formulación test es similar a la de referencia, se comparan los perfiles de disolución obtenidos mediante el factor de similitud.

El factor de similitud, f_2 , es un parámetro matemático propuesto en la guía de la EMA y en la guía de la FDA. Es un parámetro independiente del modelo cinético de la disolución que mide la similitud en el porcentaje de disolución entre las dos curvas. La expresión matemática del factor de similitud es la siguiente:

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \cdot \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \cdot 100 \right\} \quad (3-2)$$

donde n es el número de pares de puntos que se comparan, R_t es el porcentaje de fármaco disuelto desde la formulación de referencia a cada tiempo y T_t es el porcentaje de fármaco disuelto desde la formulación test a cada tiempo.

Para el cálculo del factor de similitud se debe emplear un número de puntos tal que incluya sólo el primer valor mayor del 85% de la cantidad máxima disuelta para cualquiera de las dos formulaciones (55). Si el f_2 es mayor o igual a 50 indica que las curvas son similares.

Sólo en los casos en que al menos el 85% del fármaco se disuelve en 15 minutos, se acepta que los perfiles de disolución son similares sin necesidad de hacer cálculos matemáticos (55).

4. Estudio de permeabilidad *in vitro*

Los estudios de permeabilidad *in vitro* se han realizado en monocapas celulares de carcinoma de colon, CaCo-2. Se ha utilizado la línea celular ATCC, cedida por el Dr. Hu de Washington State University (EEUU).

Se determinó la permeabilidad apical-basolateral de Zolpidem en un ámbito de concentraciones de entre 4 y 120 μM ; de Pravastatina en concentraciones que abarcan entre 50 y 1000 μM y de Cloperastina a diferentes concentraciones entre 20 y 200 μM . Se realizaron estudios adicionales en presencia de Azida sódica (1 mM), empleando solución de Zolpidem 12 μM , Pravastatina 50 μM y Cloperastina 20 μM .

Con la finalidad de observar el efecto de los excipientes sobre la permeabilidad de los fármacos, se realizaron estudios de permeabilidad apical-basolateral preparando soluciones a partir de las formulaciones estudiadas en una concentración equivalente a dosis/250mL. Las concentraciones así obtenidas fueron de 52 μM para Zolpidem, 358 μM para Pravastatina y 15 μM para Cloperastina. Posteriormente, se estudió la permeabilidad del principio activo (API, por sus siglas en inglés) en presencia de los excipientes por separado. Para determinar el efecto de cada excipiente sobre la difusión pasiva se prepararon soluciones que contenían el excipiente a estudiar y Metoprolol 100 μM .

Los requisitos básicos para el mantenimiento de esta línea celular son:

- Estufa de incubación a una temperatura de 37°C, 5% de dióxido de carbono (CO_2) y 90% de humedad relativa para mantener los frascos de cultivo con células en crecimiento.
- Cámara de flujo laminar vertical para trabajar con las células minimizando el riesgo de contaminación del cultivo.
- Bomba de vacío para aspirar el medio de cultivo y otras soluciones que se desee retirar del frasco de cultivo.
- Centrífuga, preferiblemente con termorregulación.
- Microscopio para examinar las membranas celulares y contar células.
- Baño de agua con agentes inhibidores del crecimiento bacteriano y fúngico, a 37°C, para calentar las soluciones a utilizar.
- Pipeteador automático y pipetas estériles de diferentes volúmenes.

Los protocolos utilizados fueron previamente validados por el grupo de investigación y se describen en los siguientes epígrafes.

4.1. Soluciones de trabajo

a.) Medios de cultivo

El medio de cultivo se prepara a partir de diferentes soluciones de nutrientes. Tiene que ser estéril para evitar contaminaciones de las células, se ha de mantener a una temperatura de entre 2 y 8°C, y en estas condiciones su periodo de validez es de aproximadamente 2 meses.

La composición del medio de cultivo de la línea celular CaCo-2 es la siguiente:

Hepes	5 mL
Penicilina G (10 ⁴ uds/ml)-Estreptomicina (10 ⁴ µg/ml).....	5 mL
Suero bovino fetal.....	50 mL
DMEM Glutamax.....	450 mL

b.) Soluciones para el pase

PBS-EDTA: Mezcla de solución salina tamponada con fosfatos Dulbecco y EDTA disódico. Se comercializa en solución estéril a pH 7.4 por Gibco® y se utiliza para el lavado de la monocapa y la eliminación de los residuos de suero.

Tripsina-EDTA: Está compuesta por 0,5% de tripsina y 0,2% de EDTA-disódico exenta de Ca⁺² y Mg⁺². Se comercializa en solución estéril por Gibco®. Esta solución se diluye 1/5 en PBS-EDTA estéril. Se utiliza para separar las células de los frascos en el proceso de pase de uno a otro.

c.) Soluciones para el experimento

Solución tamponada (HBSS): Antes de realizar el experimento, se lava la monocapa con una solución de sales comercializada, Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), a la que se añade 5 mL de una solución tamponada de HEPES 1M estéril en 500 mL de HBSS.

Soluciones de los compuestos a ensayar:

- Soluciones de fármaco:
Zolpidem: se disuelve Zolpidem en DMSO (<1% del volumen final) y posteriormente se ajusta hasta el volumen final con HBSS adicionado con HEPES. Las concentraciones estudiadas de Zolpidem son: 120, 40, 12 y 4 µM.

Pravastatina: se disuelve directamente Pravastatina en HBSS adicionado con HEPES. Las concentraciones estudiadas son: 1000, 500, 100 y 50 μM .

Cloperastina: se disuelve directamente Cloperastina en HBSS adicionado con HEPES. Las concentraciones estudiadas son: 200, 100, 50 y 20 μM .

- Soluciones en presencia de inhibidor:

Zolpidem: La concentración de Zolpidem en esta solución es 12 μM y la de Azida sódica es de 1 mM.

Pravastatina: Pravastatina y Azida sódica en HBSS a concentraciones de 50 μM y 1 mM, respectivamente.

Cloperastina: La concentración de Cloperastina es de 20 μM y la de Ázida sódica es de 1 mM.

- Soluciones de productos:

Zolpidem: se pesó la cantidad de polvo de comprimidos, de cada uno de los productos estudiados, equivalente a un comprimido (10 mg de Zolpidem), previamente pulverizado y se dispersó en HBSS adicionado con HEPES. Las dispersiones resultantes fueron colocadas en ultrasonidos durante 10 minutos, se filtraron a través de filtros de acetato de celulosa de tamaño de poro de 0,45 μm y la concentración final fue de 52 μM . Se preparó una solución del fármaco a la misma concentración y en las mismas condiciones por pesada directa de la sustancia activa y disolución en HBSS adicionado con HEPES.

Pravastatina: se prepararon soluciones del Pravastatina 358 μM con el mismo procedimiento descrito para el compuesto anterior.

Cloperastina: se diluyó una cantidad de suspensión equivalente a 17,7 mg de Cloperastina con HBSS adicionado con HEPES, de cada uno de los productos estudiados. La dispersiones resultantes, de concentración 14 μM , fueron colocadas en ultrasonidos durante 10 minutos y posteriormente filtradas a través de filtros de acetato de celulosa de tamaño de poro de 0,45 μm . Se preparó una solución de la sustancia activa bajo las mismas condiciones de los productos. La concentración de la solución resultante fue de 14 μM .

- Soluciones con excipientes:

En la tabla 3-5 se muestran los diferentes excipientes que fueron combinados con Pravastatina y Metoprolol para realizar el ensayo en el sentido apical-basolateral. La concentración de Pravastatina fue de 358 μM y la de Metoprolol fue 100 μM .

Excipiente	Concentración (mg/L)
Estearato de magnesio	8
Estearato de magnesio	12
Estearato de magnesio	16
Celulosa microcristalina	15
Celulosa microcristalina	250
Celulosa microcristalina	550
Sílice coloidal	8
Croscarmelosa sódica	60
Lactosa anhidra	1000
Oxido de magnesio	50
Carbonato de magnesio	120

Tabla 3-5. Concentraciones de cada excipiente estudiado con Pravastatina 358 μM y Metoprolol 100 μM .

En la tabla 3-6 se señalan los diferentes excipientes con sus respectivas cantidades, que fueron combinados con Zolpidem y Metoprolol para realizar el ensayo en el sentido apical-basolateral. La concentración de Zolpidem fue de 52 μM y la de Metoprolol fue 100 μM .

Excipiente	Concentración (mg/L)
Dióxido de titanio	5
Dióxido de titanio	9
Polietilenglicol 400 (PEG 400)	1,5
Polietilenglicol 6000 (PEG 6000)	1
Talco	6

Tabla 3-6. Concentraciones de cada excipiente estudiado en solución con Zolpidem 52 μM y Metoprolol 100 μM .

4.2. Técnica experimental

a) Congelación

Las células se pueden conservar indefinidamente sumergidas en nitrógeno líquido, pero la conservación a tan baja temperatura requiere un tratamiento previo de las células, puesto que un descenso demasiado rápido de la temperatura y la formación de cristales de gran tamaño pueden provocar daños irreversibles en las membranas celulares.

Para evitar la formación de cristales de gran tamaño, se suspenden las células en medio de cultivo con alto contenido en proteínas, compuesta por suero

bovino fetal y DMSO (1:10). El DMSO disminuye la fragilidad de la membrana, pero debido a su toxicidad celular, el proceso de congelación requiere realizarse en el menor tiempo posible.

Para que se realice un descenso controlado de la temperatura, se utilizan unos dispositivos de criopreservación que contienen una solución de isopropanol, en los cuales la temperatura desciende 1°C/min hasta los -80°C.

El proceso de congelación comienza con la separación de las células de la pared del frasco de cultivo en el que se están manteniendo. Una vez obtenida la suspensión de células, se centrifuga durante 3 min a 1500 rpm. Se aspira el sobrenadante y se resuspenden las células en 5 ml de medio de cultivo rico en proteínas y con DMSO al 10%. Rápidamente, se introduce 1 ml de esta solución en cada criovial y se introduce en el dispositivo de criopreservación. Éste se almacena durante 24 horas en un congelador a -20°C, posteriormente se traslada a un congelador a -80°C durante 48 horas y finalmente se introducen los crioviales en el tanque de nitrógeno líquido.

b) Descongelación

El proceso de descongelación debe realizarse rápidamente puesto que las células están congeladas en una solución de DMSO al 10% que es tóxica para las células a temperatura ambiente. Se saca el criovial del tanque de nitrógeno y se introduce en un baño termostático a 37°C. Una vez se ha descongelado la suspensión de células se pipetea su contenido y se introduce rápidamente en un tubo de plástico estéril con medio de cultivo atemperado, con el fin de disminuir la concentración de DMSO. Este tubo se centrifuga durante 3 minutos a 1500 rpm, se aspira el sobrenadante y se añade medio de cultivo. Se resuspenden las células en 5 ml de medio de cultivo y se introduce esta suspensión de células en un frasco de cultivo de 25 cm² de superficie y se almacenan en la estufa de incubación. A las 24 horas se cambia el medio de cultivo del frasco y se sigue el protocolo de crecimiento de las células en los frascos de cultivo.

c) Crecimiento en frascos de cultivo

Las células se mantienen en crecimiento en frascos de cultivo estériles de manera que se forma en la base una monocapa de células adheridas a la pared del frasco.

Los dos aspectos relevantes del crecimiento en frascos son:

Cambio frecuente de medio de cultivo: se reponen los nutrientes necesarios para un correcto crecimiento a la vez que se eliminan los productos procedentes del metabolismo celular, que pueden alterar el pH del medio.

Cambio frecuente de frasco de cultivo: se controla la densidad de crecimiento ya que las células deben tener espacio suficiente para crecer en forma de monocapa.

Los frascos de cultivo se extraen de la estufa de incubación, se pulverizan con alcohol al 70% y se introducen en la cámara de flujo laminar. Las botellas de todas las soluciones estériles, incluyendo el frasco de cultivo, deben permanecer abiertas el menor tiempo posible para evitar contaminaciones, de modo que se abren y se cierran cada vez que se necesite.

Los frascos de cultivo utilizados son de una superficie de 25 cm² en la descongelación y posteriormente de 75 cm² para el mantenimiento de la línea celular. Para un crecimiento adecuado, se requiere que la cantidad de medio de cultivo sea de 5 mL y de 12 mL respectivamente. Además, estos frascos poseen en el tapón unos orificios de ventilación con un filtro, de modo que las células están en contacto con el aire enriquecido en CO₂ de la estufa incubadora sin riesgo de contaminación.

d) Cambio a un nuevo frasco de cultivo

Cuando la monocapa celular ha alcanzado la confluencia en el frasco de cultivo, se deben cambiar las células de frasco. La obtención de la confluencia se confirma mediante inspección visual de la monocapa en el microscopio.

Para realizar el cambio, en primer lugar, se debe tener preparadas y atemperadas las soluciones de trabajo necesarias: PBS-EDTA, Tripsina-EDTA diluida y medio de cultivo.

Se toma el frasco de cultivo de la estufa incubadora y se introduce en la campana de flujo laminar. Una vez dentro, se abre el tapón y se retira el medio de cultivo. Posteriormente se procede al lavado de la monocapa añadiendo 0,2 mL/cm² de PBS-EDTA, con el fin de eliminar restos de suero que podrían disminuir la eficacia de la tripsina. Se cierra el tapón y se introduce el frasco en la estufa incubadora durante 10 min. Pasado este tiempo, se saca de la estufa y se introduce de nuevo en la campana de flujo laminar.

El siguiente paso consiste en la separación de las células de la pared del frasco. Para ello, se abre el tapón, se retira el PBS-EDTA del lavado y se añade 0,03 mL/cm² de tripsina-EDTA diluida. Se cierra el tapón y se introduce en la estufa incubadora hasta que las células se separen de la pared del frasco por agitación del mismo (aproximadamente 10 min). Se introduce el frasco en la campana de flujo laminar, se abre el tapón y se añade 0,1-0,2 mL/cm² de medio de cultivo, consiguiendo que la tripsina se inactive parcial o totalmente gracias tanto a la dilución como a la presencia de suero bovino fetal en el medio de cultivo.

Por último, se agita la suspensión de células obtenida al añadir el medio, aspirándola repetidamente con la ayuda de un pipeteador automático y una pipeta estéril. Una vez la suspensión ha sido agitada, se toma una alícuota que se introduce en un nuevo frasco en el que previamente se había añadido medio de

cultivo, de forma que se consiga la dilución adecuada para un correcto mantenimiento de la línea celular. Esta alícuota depende del tamaño del frasco de cultivo y de la velocidad de crecimiento celular de la línea utilizada. En la línea celular Caco-2 se utilizan alícuotas de 2 mL de suspensión de células en 10 mL de medio, consiguiéndose una dilución 1:5 que permite el cambio de frasco cada 3-4 días.

El nuevo frasco de cultivo se cierra, se identifica adecuadamente y se introduce de nuevo en la estufa incubadora. Al día siguiente del cambio de frasco se debe proceder al cambio de medio de cultivo con el fin de eliminar las células que hayan muerto en el procedimiento. Es necesario el transcurso de 4 ó 5 horas para que las células estén perfectamente adheridas a la pared del frasco.

e) Sembrado celular

Los experimentos de permeabilidad se llevan a cabo en monocapas celulares que han crecido sobre una membrana de policarbonato, de 0,4 μm de tamaño de poro, y con una superficie de 4,2 cm^2 .

Estas membranas están formando la base de un receptáculo denominado inserto, que se sitúa en el interior de las hendiduras (pocillos) de una placa de plástico. Cuando se sitúa los insertos en los pocillos de la placa se forman dos cámaras separadas de diferente volumen, llamadas cámara apical (dentro del inserto) y basal (entre el inserto y el pocillo).

En primer lugar, se introduce en la campana de flujo laminar las placas y los insertos, dentro de su envase estéril, y se procede al montaje de la placa. Una vez preparadas, se dejan dentro de la campana de flujo laminar a la espera de sembrar las células.

Se toma el frasco de cultivo de la estufa de incubación y se introduce en la campana de flujo laminar. Se realiza el mismo proceso que para el cambio de frasco hasta la obtención de la suspensión celular. Una vez obtenida la suspensión, se toma todo el volumen del frasco de cultivo y se introduce en un tubo de centrifuga que se cierra adecuadamente y se centrifuga a 1500 r.p.m. durante 3 min. Una vez centrifugado, se introduce en la campana de flujo laminar y se abre para retirar el sobrenadante.

En el fondo del tubo queda un sedimento de células, que se resuspende en medio de cultivo, manteniendo la misma dilución. Se cierra el tubo y se repite el procedimiento de centrifugación y resuspensión. Una vez obtenida una suspensión de células homogénea, se toma una gota por capilaridad con la ayuda de una pipeta Pasteur y se introduce en el hemocitómetro y se observa al microscopio para hacer el recuento (figura 3-1).

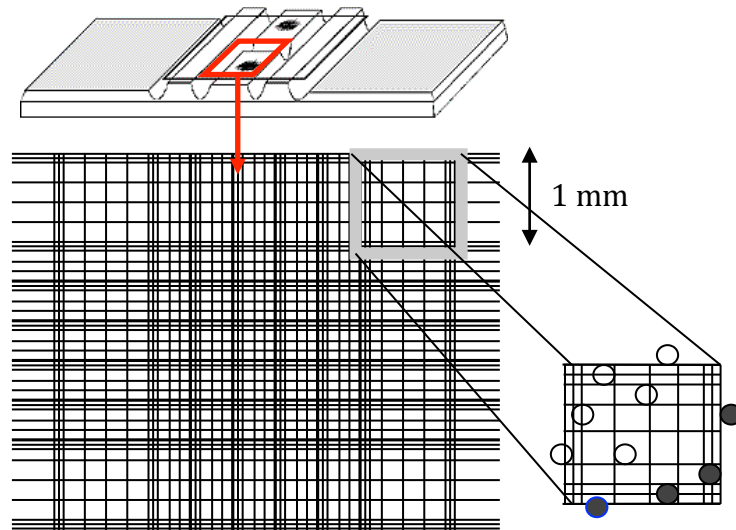


Figura 3-1. Imagen de un hemocitómetro y su vista al microscopio para proceder al recuento de células.

El hemocitómetro está dividido en cuadrantes, de modo que en cada cuadrante hay 0,1 μl de suspensión de células. Se cuentan las células que hay en tres de los cuadrantes, para tener la medida del número de células por triplicado, teniendo en cuenta que sólo se cuentan las células que estén totalmente dentro del cuadrante y las que estén en contacto con dos de los cuatro márgenes del cuadrante.

Una vez se han contado las células, se calcula el volumen de la alícuota que hay que tomar para preparar la suspensión definitiva para la siembra, teniendo en cuenta:

1. La concentración final de la suspensión es de 250 células/ μL en las células Caco-2.
2. El volumen final de suspensión que necesario para sembrar todas las placas previstas: en placas de 6 pocillos con una superficie de 4,2 cm^2 /inserto, se necesitan 2 mL/inserto, es decir 12 mL/placa, de modo que se preparan 15 mL.

Se añade en un tubo estéril el volumen de medio de cultivo y de suspensión celular necesario para obtener la concentración deseada.

Finalmente, se toman las placas previamente preparadas en la cámara de flujo laminar y se añade 3 mL de medio de cultivo en la cámara basal y 2 mL de suspensión celular en la cámara apical. La suspensión celular debe depositarse en el interior del inserto dejando caer las gotas de una en una en el centro, sin tocar las paredes del inserto.

Una vez sembradas las placas, se dejan reposar 10 min en la cámara de flujo laminar para que las células se asienten y posteriormente se introducen en la estufa incubadora. Estas placas no tienen un cierre hermético, de forma que no se

pueden rociar con alcohol al 70%, por lo que es especialmente importante su manipulación adecuada para evitar contaminaciones.

Los experimentos se realizan a los 21 días de la siembra, momento en el que se considera que se ha alcanzado la confluencia y se han expresado los transportadores de membrana, sin llegar a manifestarse fenómenos de envejecimiento celular.

f) Mantenimiento de las placas sembradas

Al día siguiente de la siembra se debe cambiar el medio de cultivo para eliminar las células que hayan muerto en el proceso. A partir de este día, el medio de cultivo se debe cambiar cada 2-3 días hasta el día del experimento. El día de antes del ensayo se cambia por medio de cultivo que no contiene antibióticos (penicilina/estreptomicina).

Para cambiar el medio de cultivo se cogen las placas de la estufa incubadora y se introducen rápidamente en la campana de flujo laminar. Con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril y la bomba de vacío se retira el medio de cultivo de ambas cámaras. Hay que tener especial precaución de no tocar la membrana de policarbonato en la que están las células sembradas (se puede inclinar un poco la placa).

Una vez retirado el medio, se cierra la placa y se toma con una pipeta estéril y un pipeteador automático el volumen de medio atemperado necesario para rellenar la placa. Se abre la placa y se repone el medio, manteniendo los mismos volúmenes: 3 mL en la cámara basal y 2 mL en la cámara apical. En este caso, el medio depositado en la cámara apical debe dejarse caer poco a poco por la pared del inserto, para no dañar la monocapa en crecimiento.

g) Ensayo de permeabilidad

El ensayo se puede dividir en 6 fases (lavado de la membrana, comprobación de la integridad de la monocapa, administración de la solución de estudio, toma de muestras, comprobación de la integridad de la monocapa y estudio de recuperación del compuesto) que se detallan a continuación.

1. Lavado de la membrana

Antes de realizar el experimento, se debe lavar la membrana. Para ello, se retira el medio de cultivo con la ayuda de una pipeta Pasteur y la bomba de vacío y se añade el mismo volumen de solución tamponada (HBSS). Esta operación se repite dos veces, retirando la solución tamponada y añadiendo nueva.

2. *Comprobación de la integridad de la monocapa*

Una vez se ha lavado la membrana, se procede a la comprobación de la integridad de la monocapa. Esto se lleva a cabo mediante la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) con un micro-polímetro Millicell-ERS®.

En primer lugar, se coloca un inserto sin crecimiento en una placa y se añade solución tamponada. Se coloca el electrodo largo en la cámara basal y el electrodo corto en la cámara apical. Se calibra el micro-polímetro ajustando el voltaje a cero, y sin retirar los electrodos se procede a la medida de la resistencia en tres direcciones. Esta medida del inserto sin crecimiento (blanco) nos permite evaluar la integridad de la monocapa por comparación. Una vez obtenidas las medidas del blanco, se procede a la medida de la resistencia en los insertos en los que se va a realizar el experimento. La medida se realiza en la misma solución tamponada para mantener las condiciones y en tres direcciones para asegurar la integridad de la monocapa en toda la superficie del inserto.

Para considerar adecuada la integridad de la monocapa, las medidas de la resistencia en los insertos con crecimiento celular deben ser superiores en 90 unidades o más a las medidas del blanco. En caso de que la medida no cumpla con el requerimiento establecido, se desecha el inserto.

Cuando todas las medidas han sido tomadas, se deja reposar las placas en el incubador a 37°C durante una hora, antes de empezar el experimento.

Después de la toma de muestras y antes del estudio de recuperación del compuesto, se repite el proceso de medición de la resistencia eléctrica, con el fin de asegurar que la integridad de la monocapa no se ha visto afectada durante el experimento.

3. *Administración de la solución de estudio*

Para administrar el compuesto, se debe primero retirar la solución tamponada con una pipeta Pasteur y la bomba de vacío.

Las placas utilizadas tienen seis pocillos, el estudio se realizó en tres insertos en dirección apical-basal para cada solución ensayada. Para ello, se coloca 2,2 mL de solución de estudio atemperada en la cámara apical y 3 mL de solución tamponada en la cámara basal en los insertos donde se realiza el estudio en dirección apical-basal, y 2 mL de solución tamponada en la cámara apical y 3,2 mL de solución de estudio en la cámara basal, en los insertos en los que el estudio se realiza en dirección basal-apical.

4. *Toma de muestras*

La duración de la toma de muestras depende de la velocidad de transporte de cada compuesto. En este trabajo, los estudios se realizaron en un período

total de 90 minutos con toma de muestra en los siguientes tiempos: 15, 30, 45 y 90 minutos.

La muestra a tiempo 0 corresponde con una muestra tomada en la cámara dadora (donde se administra la solución de estudio) nada más administrar. Las muestras siguientes se toman en la cámara receptora (en la que se pone solución tamponada), excepto la última (90 min ó 4 horas) que se toma en ambas cámaras. Después de tomar cada muestra se repone el volumen, 200 μL , con solución tamponada.

5. *Estudio de recuperación del compuesto*

Una vez finalizada la toma de muestras y medida la resistencia eléctrica transepitelial, se realiza un estudio de recuperación del compuesto, para comprobar que se cumple el balance de masas, de modo que se asegura que el compuesto no se haya degradado o metabolizado.

Durante el estudio de absorción, se coloca la solución con el compuesto en una de las cámaras y se mide la aparición de dicho compuesto en la otra cámara. Para ello es necesario que el compuesto pase a través de la membrana celular, pudiendo quedar en parte retenido en ella, bien en el interior de las células o bien adherido a estructuras subcelulares. El estudio de recuperación del compuesto retenido en las células consta de dos fases:

Congelación-Descongelación rápida: con la ayuda de unas pinzas, se extrae las membranas de policarbonato con las monocapas de células adheridas y se introducen en tubos de centrífuga de 1,5 mL que contienen 1 mL de solución tamponada. Estos tubos con las membranas se sumergen en nitrógeno líquido y posteriormente en un baño a 37°C. Este proceso se realiza tres veces consecutivas, se centrifuga los tubos durante 3 min a 1500 rpm y se toma una muestra de 500 μL .

Adición de Metanol: en los tubos con las membranas, que contienen 500 μL de solución tamponada, se añaden 500 μL de metanol y se agitan enérgicamente. Después se centrifuga los tubos 8 min a 8000 rpm y se toma una muestra de 500 μL .

La suma de la cantidad de compuesto retenido y la cantidad de compuesto en ambas cámaras en las muestras del último tiempo debe corresponder con la cantidad de compuesto de la muestra obtenida a tiempo 0.

4.3. Cálculo de la permeabilidad

La valoración de las muestras permite conocer la cantidad de fármaco que aparece en el compartimento receptor a cada tiempo. El proceso que describe este

paso de fármaco desde el compartimento dador al receptor puede describirse como una difusión pasiva mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial Q}{\partial t} = P_{eff} \cdot S \cdot (C_{dador} - C_{receptor}) \quad (3-3)$$

donde $\partial Q/\partial t$ representa la velocidad de difusión del fármaco, P_{eff} es el coeficiente de permeabilidad efectiva, S es el área de difusión y C_{dador} es el compartimento dador y $C_{receptor}$ es la concentración de fármaco en el compartimento receptor.

Para resolver esta ecuación teniendo en cuenta el cambio continuo de las concentraciones en los compartimentos dador y receptor, se debe expresar la ecuación en una única variable: se iguala la concentración en el compartimento dador a la diferencia entre la cantidad de fármaco total y la cantidad en el compartimento receptor:

$$C_{dador} = \frac{C_{dadorINICIAL} \cdot V_{dador} - C_{receptor} \cdot V_{receptor}}{V_{dador}} \quad (3-4)$$

donde $C_{dadorINICIAL}$ es la concentración inicial de fármaco en el compartimento dador, V_{dador} es el volumen del compartimento dador y $V_{receptor}$ es el volumen en el compartimento receptor.

Combinando las ecuaciones 3-3 y 3-4 se obtiene una solución para el cálculo de las concentraciones teóricas en el compartimento receptor:

$$C_{receptor} = \frac{Q_{total}}{V_{receptor} + V_{dador}} + \left(C_{receptor0} - \frac{Q_{total}}{V_{receptor} + V_{dador}} \right) \cdot e^{-P_{eff0,1} \cdot S \cdot \left(\frac{1}{V_{receptor}} + \frac{1}{V_{dador}} \right) \cdot t} \quad (3-5)$$

donde Q_{total} es la cantidad total de fármaco en el sistema, $C_{receptor0}$ es la concentración en el compartimento receptor al inicio del intervalo de tiempo considerado, $P_{eff0,1}$ es la permeabilidad y S el área del inserto en cm^2 (175).

De este modo, a cada tiempo donde se conoce la concentración experimental en el compartimento receptor, se calcula la concentración teórica y se realiza un ajustado no lineal de los datos experimentales minimizando la suma de cuadrados residual: se calcula la suma de los cuadrados de las diferencias entre las concentraciones experimentales y teóricas a cada tiempo, y se estima la permeabilidad que conduce al menor valor de suma de cuadrados residual. Para la estimación de la permeabilidad mediante la ecuación no lineal se utilizó la herramienta Solver de una hoja MS Excel® 2011.

Este procedimiento de estimación de la permeabilidad es válido en cualquier caso. Sin embargo, cuando la concentración de fármaco en el compartimento receptor es muy pequeña frente a la concentración en el compartimento dador (<10%), se considera que el sistema trabaja en condiciones sumidero. Bajo estas condiciones la ecuación 3-3 se puede simplificar, y reorganizando los términos se obtiene una expresión explícita para el cálculo de la permeabilidad:

$$P_{ef} = \frac{b}{S \cdot C} \quad (3-6)$$

donde b es la pendiente de la recta de cantidades acumuladas frente al tiempo, S el área de la membrana y C es la concentración inicial de fármaco en el compartimento dador.

Los cálculos para la obtención de los valores de permeabilidad efectiva han sido realizados mediante una hoja de cálculo MS Excel® 2011. Los análisis estadísticos para determinar si las diferencias entre las permeabilidades en ambas direcciones son significativas se han realizado mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 21.

5. Ensayo de absorción en animales

5.1. Animales de experimentación

Los animales usados en este estudio fueron ratas albinas macho de raza Wistar procedentes del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche (núcleo San Juan). Los animales se mantuvieron en perfectas condiciones de higiene y climatización y recibían una dieta equilibrada. Para los ensayos se seleccionaron animales con edades entre dos y tres meses. Tras 4 horas de ayuno, su peso osciló entre 250 y 320 g.

5.2. Soluciones de trabajo

A continuación se describen las soluciones empleadas en los ensayos *in situ*.

a) Solución anestésica

Para llevar a cabo la intervención quirúrgica previa a los ensayos de perfusión *in situ*, se requiere anestesia general profunda del animal. A tal efecto se empleó una solución de pentobarbital sódico (Eutanax inyectable) preparada a la concentración de 200 mg/mL.

Para facilitar la administración de la anestesia, por vía intraperitoneal, se empleó una solución de pentobarbital sódico preparada a partir del inyectable comercial (Eutanax inyectable) en proporción 1:10 en agua destilada. De esta solución se administra una dosis de 0,15 mL por cada 100 g de peso del animal, lo que equivale a 30 mg de pentobarbital sódico por kg de animal.

b) Soluciones de lavado intestinal

Solución de lavado A

Es una solución isotónica que permite eliminar restos de quimo que pudieran quedar en la luz intestinal. Su composición es:

NaCl		9,00 g
KCl		0,34 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O		0,19 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O		0,76 g
H ₂ O destilada	c.s.p.	1 L

Solución de lavado B

Es una solución de suero fisiológico regulada a pH 7,00 mediante una solución de tampón fosfato según Sørensen a razón de 10 mL de tampón por litro de solución. Es empleada para acondicionar la mucosa intestinal antes de realizar los ensayos de absorción. La composición de esta solución es:

NaCl		9,00 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1/15 M	3,9 mL
Na ₂ HPO ₄	1/15 M	6,1 mL
H ₂ O destilada	c.s.p.	1 L

c) Soluciones de perfusión

Con el objeto de comparar el efecto de los excipientes sobre la absorción de los principios activos estudiados, se prepararon soluciones con los productos a razón de dosis en 250 mL, ya que los estudios de bioequivalencia en humanos se realizan dándole al voluntario un vaso de agua. Se preparó además una solución que contenía solo el principio activo.

Zolpidem hemitartrato

Las soluciones de trabajo se prepararon mediante pesada exacta alrededor de un comprimido (10 mg de la sustancia activa) de cada uno de los productos estudiados, previamente pulverizados y posteriormente dispersos en solución de lavado B. La solución resultante fue colocada en ultrasonidos por 10 minutos y la concentración resultante es de 0,04 mg/mL.

Para la preparación de la solución de Zolpidem hemitartrato patrón se pesó la cantidad de principio activo necesario para obtener la misma concentración empleando líquido de lavado B para su disolución y fue ultrasonificada durante 10 minutos.

Pravastatina sódica

Para obtener las soluciones de trabajo se pesó exactamente alrededor de un comprimido (40 mg de la sustancia activa) de cada uno de los productos estudiados, previamente pulverizados y posteriormente dispersos en solución de lavado B. La solución resultante fue colocada en ultrasonidos durante 10 minutos y la concentración final fue de 0,16 mg/mL.

La solución de Pravastatina sódica patrón se preparó por pesada de la sustancia activa y posterior disolución en líquido de lavado B; la concentración de esta solución fue igualmente de 0,16 mg/ml y ésta fue ultrasonificada durante 10 minutos.

Cloperastina fendizoato

Las soluciones fueron preparadas diluyendo una cantidad de suspensión equivalente a 17,7 mg del Cloperastina fendizoato con líquido de lavado B para obtener una concentración de 0,0708 mg/mL. La solución resultante fue colocada en ultrasonidos durante 10 minutos.

La solución del patrón fue preparada pesando la cantidad necesaria del compuesto para obtener una concentración de 0,0708 mg/mL usando como solvente líquido de lavado B. La solución resultante fue igualmente colocada en ultrasonidos durante 10 minutos.

5.3. Técnica experimental en intestino delgado completo

La técnica de experimentación utilizada es una modificación de la propuesta por Doluisio y colaboradores (176). El animal se somete a un periodo de ayuno de 2-4 horas, permitiéndole el acceso libre a agua para garantizar su hidratación. Tras anestésiar el animal y comprobar que ha alcanzado el grado de anestesia profunda necesario, se procede a colocarlo en posición decúbito supino sobre el tablero quirúrgico y se inmoviliza por las extremidades con cinta adhesiva sin que adquiera una posición forzada. Posteriormente se descubre la cavidad abdominal mediante sección de la piel, desde 2 cm por encima del poro genital en forma de diagonal hasta 1 cm del apéndice xifoides. A continuación se separan los rectos abdominales cortando por la línea alba. El siguiente paso consiste en localizar el duodeno, en el que desemboca el conducto biliar. Este conducto debe ligarse para evitar que se produzca un ciclo enterohepático en caso de que el fármaco se excretara por la bilis al intestino.

A continuación, se practica un pequeño corte en bisel en el extremo duodenal. Se introduce el extremo de una cánula de vidrio acodada y se fija al intestino. El otro extremo de la cánula se conecta mediante un tubo de polietileno, a una llave de tres pasos tipo Stopcock. A su vez, ésta encaja a rosca con una jeringa de 10 mL de capacidad, sujeta mediante una pinza a un soporte vertical.

Posteriormente, se localiza el otro extremo (íleo-cecal) y se efectúa una incisión de forma que se proceda sin dificultad a la limpieza de la mucosa, mediante el paso por la jeringa conectada y a través del intestino de las soluciones de la solución de lavado A, termostataadas a 37°C, tantas veces como sea necesario hasta que la mucosa quede libre de residuos y de sales biliares (aproximadamente 50 mL).

Una vez finalizado el lavado, se conecta otra cánula en el extremo final y se lava con el líquido de lavado B. Luego esta cánula se une a su vez a una llave de tres pasos y a otra jeringa. Todo el conjunto se sujeta a un soporte vertical, con la ayuda de unas pinzas. Por último se bombea aire a través del intestino en ambas direcciones con la finalidad de eliminar los restos de la solución de lavado B.

Un factor a considerar es la posible desecación de la cavidad abdominal. Con objeto de evitarla se vierte en ella pequeños volúmenes de suero fisiológico atemperado a 37°C y se cubre con una torunda de algodón empapada en el mismo líquido.

▷ Jeringa-exterior

Permite el paso de solución o aire desde la jeringa al exterior.

▷ Jeringa-intestino

Permite el paso de solución o aire desde la jeringa al intestino o viceversa.

▷ Intestino-exterior

Permite el paso de solución o aire desde el intestino al exterior.

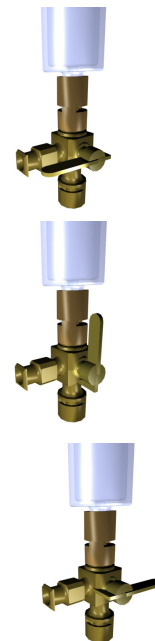


Figura 3-2. Esquema de las tres posiciones de la llave de tres pasos de tipo Stopcock

5.4. Protocolo del ensayo

Se perfunden 10 mL de la solución a ensayar, atemperada a 37 °C. Cuando toda la solución esté dentro del intestino delgado, se pone en marcha el cronómetro.

La toma de muestras se realiza cada 5 minutos alternativamente por cada una de las jeringas. La primera muestra se toma por la jeringa distal y la última,

por la proximal. Se recoge un total de 6 muestras (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min) de 200 μ L de solución cada una.

5.5. Ensayo de reabsorción de agua

Después de tomar la última muestra se lleva a cabo el ensayo de reabsorción de agua. Para ello se desconecta la cánula de la jeringa íleo-cecal y se coloca en un tubo de centrifuga de 15 mL. Con la jeringa que queda conectada, se toma aire y se ejerce presión para extraer el líquido remanente a través de la cánula. Seguidamente se corta el mesenterio y se separa el asa intestinal del resto del animal. Una vez aislado el intestino, se presiona desde el principio hasta el final asegurando que se vacíe completamente. Finalizado el ensayo, el animal se sacrifica usando el mismo compuesto que en la anestesia: pentobarbital sódico, administrando por vía intraperitoneal una dosis de 90 mg/Kg.

El volumen recogido se centrifuga durante 10 minutos a 5000 rpm. De esta forma sedimentan en el tubo de muestra los restos de mucosa arrastrados, se retira el residuo y se mide el volumen que ocupa el sobrenadante. Para calcular el volumen final, se le adiciona a este valor el volumen recogido durante la toma de muestras.

5.6. Tratamiento de muestras

Las muestras biológicas se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante obtenido de cada muestra se congeló a -20 °C hasta el momento de ser analizadas, para evitar la degradación del fármaco. Cada muestra se inyectó en el cromatógrafo líquido (HPLC) por duplicado.

5.6.1. Cálculo de la velocidad de reabsorción de agua

Existe un proceso de reabsorción de agua simultáneo al proceso de absorción de la sustancia ensayada de modo que la solución remanente en lumen se concentra y puede quedar falseado por exceso (177).

Con el fin de estimar las concentraciones reales de compuesto se calculó el volumen remanente a cada tiempo de toma de muestra. Dado que el volumen varía según una cinética de orden cero (177), la ecuación diferencial del proceso y su forma integrada son:

$$\frac{\partial V}{\partial t} = -k_0 \tag{3-7}$$

$$V = V_0 - k_0 \cdot t \tag{3-8}$$

Siendo V el volumen remanente en el intestino a cada a cada tiempo; V_0 , el volumen remanente a tiempo inicial y k_0 , la constante de velocidad de reabsorción de agua (mL/min).

Mediante regresión lineal por mínimos cuadrados de los volúmenes obtenidos, se obtienen los parámetros V_0 y k_0 , con los que se determinan los volúmenes teóricos para cada tiempo de toma de muestra (V_t). Con los V_t se corrigen los valores experimentales de las concentraciones de soluto en las muestras, con la siguiente ecuación:

$$C = E \cdot \frac{V_t}{V_0} \tag{3-9}$$

donde C corresponde a la concentración de soluto corregida y E , a la concentración obtenida experimentalmente.

5.6.2. Cálculo de la constante aparente de la velocidad de absorción

Las constantes aparentes de velocidad de absorción se han determinado a partir del siguiente modelo:

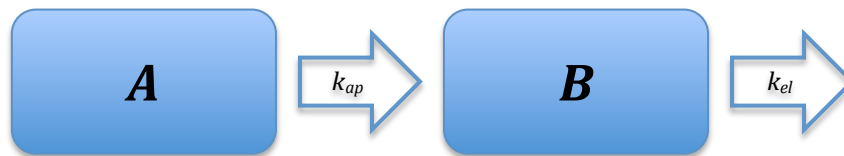


Figura 3-3. Modelo para determinar la constante aparente de absorción. Compartimiento A: lugar donde se produce la absorción (intestino). Compartimiento B: organismo.

La desaparición del compuesto del compartimento A se debe únicamente a la absorción y durante los 30 min que dura el ensayo sigue una cinética aparente de primer orden según la siguiente ecuación:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -K_{ap} \cdot C \tag{3-10}$$

donde C corresponde a la concentración remanente de fármaco en el intestino y K_{ap} , a la constante de velocidad de absorción aparente de primer orden. Su forma integrada es:

$$C = C_0 \cdot e^{-k_{ap} \cdot t} \tag{3-11}$$

donde C es la concentración de fármaco a tiempo t y C_0 , la concentración inicial de fármaco disponible para la absorción ($t=0$). El valor de C_0 obtenido es siempre

menor que la concentración perfundida debido a varios procesos simultáneos: dilución con el poco volumen que pudiese quedar de la solución de lavado, adsorción a la membrana intestinal y entrada rápida del compuesto en los enterocitos. El descenso de C_0 se debe mayoritariamente a la carga de la sustancia en la mucosa, cuyo equilibrio se alcanza en los primeros minutos de la perfusión y pasados 5 minutos el proceso ha finalizado totalmente. Por esta razón, la toma de muestras se inicia a ese tiempo.

Para obtener un valor representativo de la constante de velocidad de absorción, el ensayo se realiza en un mínimo de 5 animales para cada solución ensayada, con lo que se obtiene un valor medio que se considere representativo.

C. Valoración de muestras

1. Método espectrofotométrico

Para cuantificar las muestras de los perfiles de disolución de Zolpidem y Pravastatina se usó el método espectrofotométrico en la región U.V. empleando para ello el espectrofotómetro BioMate3S UV-Visible Spectrophotometer Thermo Scientific. A las muestras de los perfiles de Zolpidem y la curva de calibración correspondiente se les determinó la absorbancia a una longitud de onda de 245 nm. En el caso de Pravastatina la longitud de onda empleada fue de 238 nm.

2. Método cromatográfico

Para el análisis de las muestras de los demás estudios realizados se empleó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección por ultravioleta. El sistema cromatográfico utilizado ha sido un Sistema Alliance® HPLC, que consta de los siguientes módulos:

- Bomba cuaternaria e inyector automático integrado: Módulo de Separaciones Waters™ 2695
- Detector de absorbancia Waters™ 2487 doble λ
- Detector programable de fluorescencia Waters 2475
- Registrador-integrador Empower™

En cuanto a las condiciones cromatográficas, se utilizó una fase estacionaria inversa compuesta por una precolumna Phenomenex® KJ0-4282, con dos filtros de 2 μm y relleno con micropartículas C-18 de 40 μm de tamaño y una columna de acero inoxidable Waters™ modelo Nova Pak® C-18 de 150 mm de longitud; 3,9 mm de diámetro y tamaño de partícula de 4 μm . Las otras condiciones cromatográficas se describen a continuación según el fármaco analizado:

Zolpidem:

- Fase móvil: mezcla en proporción volumétrica 60:40 de solución acuosa de ácido trifluoroacético 6,5 mM y acetonitrilo.
- Flujo: 1 mL/min
- Temperatura de la columna: 30°C
- Tiempo de retención: 2,5 minutos
- Detección: Ultravioleta a 245 nm

Pravastatina:

- Fase móvil: mezcla en proporción volumétrica 50:40:10 de metanol, solución acuosa de ácido trifluoroacético 6,5 mM y acetonitrilo, respectivamente.
- Flujo: 1 mL/min
- Temperatura de la columna: 30°C
- Tiempo de retención: 3 minutos
- Detección: Ultravioleta a 238 nm

Cloperastina:

- Fase móvil: mezcla en proporción volumétrica 60:40 de solución acuosa de trietanolamina 22 mM pH 3,00 (ajustado con ácido fosfórico) y acetonitrilo.
- Flujo: 1,8 mL/min
- Temperatura de la columna: 50°C
- Tiempo de retención: 4,5 minutos
- Detección: Ultravioleta a 227 nm

Metoprolol:

- Fase móvil: mezcla en proporción volumétrica 20:60:20 de metanol, solución acuosa de ácido trifluoroacético 6,5 mM y acetonitrilo.
- Flujo: 1 mL/min
- Temperatura de la columna: 30°C
- Tiempo de retención: 2 minutos
- Detección: Fluorescencia con longitud de onda de excitación de 231 nm y de emisión de 307 nm

Todos los componentes de la fase móvil fueron filtrados mediante un filtro Millipore GVWP de 230 nm de diámetro de poro antes de añadirse al sistema cromatográfico, para eliminar posibles partículas en suspensión.

3. Validación de los métodos analíticos

Los métodos analíticos fueron validados evaluando los parámetros de linealidad, precisión y exactitud, así mismo, se establecieron los límites de detección y cuantificación.

Para determinar la concentración de compuesto en las muestras, se preparó una curva de calibrado que fue inyectada en el HPLC en las mismas condiciones y el mismo día que las muestras a estudiar. Igual procedimiento se siguió para los métodos espectrofotométricos.

3.1. Ensayo de linealidad

Las rectas de calibración deben abarcar un ámbito de concentraciones adecuado para interpolar las áreas de los cromatogramas y las absorbancias de las muestras.

Se realizó una regresión lineal entre las áreas de los cromatogramas obtenidos y las concentraciones teóricas:

$$y = m \cdot x + b \quad (3-12)$$

donde y es el área del cromatograma, o la absorbancia según el caso, y x la concentración teórica.

Se utilizó una hoja de cálculo Excel 2007 para realizar las regresiones. Para comprobar la dependencia lineal de las rectas se utilizó el coeficiente de correlación r . Cuanto más próximo está r a la unidad, mejor es el modelo.

3.2. Ensayo de precisión y exactitud

Para comprobar la precisión y exactitud del método analítico se valoraron muestras patrón de concentración conocida dentro de la recta de calibración. Se calculó la exactitud para cada concentración patrón utilizando los errores absolutos y relativos:

$$\varepsilon_{absoluto} = C_{teórica} - C_{experimental} \quad (3-13)$$

$$\varepsilon_{relativo} = \frac{C_{teórica} - C_{experimental}}{C_{teórica}} \times 100 \quad (3-14)$$

donde $C_{teórica}$ corresponde a la concentración teórica del patrón y $C_{experimental}$ corresponde a la concentración calculada mediante la interpolación en la recta de calibración.

La precisión se calculó mediante el coeficiente de variación de la media de los valores de las concentraciones estimadas.

3.3. Límite de detección y cuantificación

Se estableció el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) de acuerdo con las siguientes expresiones:

$$LD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{m} \quad (3-15)$$

$$LC = \frac{10 \cdot \sigma}{m} \quad (3-16)$$

en las que σ es la desviación estándar de la ordenada en el origen de la recta de regresión y m es la pendiente de la misma.

D. Métodos matemáticos y estadísticos

1. Análisis de regresión

Se empleó un análisis lineal simple por mínimos cuadrados para determinar la constante de velocidad de reabsorción de agua, así como las rectas de calibración para la valoración del fármaco y el coeficiente de permeabilidad de los ensayos *in vitro* (P_{AB}). Todo ello se realizó con el programa Excel.

El análisis por regresión no lineal simple se realizó en Excel con la Herramienta Solver. Se aplicó para la determinación de las constantes de velocidad de absorción aparentes (k_{ap}) en cada condición experimental y para los coeficientes de permeabilidad (P_{AB}) en condiciones no sink.

2. Pruebas de comparación de medias

Se han utilizado pruebas paramétricas, dado que se cumplen las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas entre los grupos. Además las observaciones son independientes, es decir, el valor de una observación en un grupo no proporciona información sobre el valor de la observación en otro grupo.

Las pruebas paramétricas de comparación entre medias que se han realizado en este trabajo fueron las siguientes:

2.1. Análisis de varianza global: ANOVA de un factor

Este análisis se realiza para detectar diferencias significativas entre las constantes de absorción aparentes (k_{ap}) obtenidas en las diferentes condiciones. Se seleccionó un nivel de significación α de 0,05

Asimismo se aplica para discriminar si los coeficientes de permeabilidad (P_{AB}) varían en función de la concentración.

2.2. Prueba de comparación múltiple: *Prueba de Scheffé*

Esta prueba se basa en comparar todos los grupos de valores uno por uno con todos los demás de forma independiente, para poder así establecer las diferencias significativas entre dos grupos de datos. Se seleccionó un nivel de significación α de 0,05.

4. Resultados

A. Zolpidem

1. Validación de los métodos analíticos

1.1. Método cromatográfico

Con la finalidad de validar las concentraciones obtenidas durante el proceso de valoración de las muestras se realizaron estudios de linealidad a las curvas de calibración utilizadas. En la tabla 4-1 se muestra el coeficiente de determinación “ r^2 ” de las curvas de calibración, que siempre fue superior a 0,990. En la tabla también se detallan los errores estándar (EE) de la ordenada en el origen y de la pendiente de la recta.

Zolpidem (μM)	Ordenada en el origen	EE	Pendiente	EE	r^2
0,012-1,2	-3799,30	3487,40	180268,96	5226,99	0,9958
0,12-12	-22157,55	10110,16	189782,62	1754,86	0,9996
1,2-120	-47419,98	34766,36	188827,63	557,05	0,9999

Tabla 4-1. Ensayo de linealidad de las curvas de calibración empleados para la valoración de las muestras por HPLC a las distintas concentraciones de Zolpidem ensayadas.

En la tabla 4-2 se detallan los resultados de los ensayos de precisión y exactitud realizados sobre patrones de concentración conocida a través del error absoluto (Ea) y error relativo (Er %). En la tabla 4-3 se presentan los límites de detección y cuantificación.

Recta	0,012-1,2	0,12-12	1,2-120
Patrón 5%			
$C_{\text{Teórica}}$	0,06	0,60	6,00
$C_{\text{Experimental}}$	0,07	0,64	5,90
CV (%)	7,63	4,43	0,48
Ea	0,08	0,06	-0,10
Er (%)	8,3	6,67	-1,74
Patrón 10%			
$C_{\text{Teórica}}$	0,12	1,20	12,00
$C_{\text{Experimental}}$	0,13	1,21	12,06
CV (%)	9,20	0,70	1,92
Ea	0,01	0,01	0,06
Er (%)	9,31	0,72	0,50
Patrón 70%			
$C_{\text{Teórica}}$	0,84	8,40	84,00
$C_{\text{Experimental}}$	0,80	8,27	84,26
CV (%)	3,52	0,68	0,04
Ea	-0,04	-0,13	0,26
Er (%)	-4,64	-1,56	0,31

Tabla 4-2. Ensayo de exactitud y precisión de las curvas de calibración empleadas para la valoración de las muestras a distintas concentraciones de Zolpidem ensayadas.

Zolpidem (μM)	Límite de detección (μM)	Límite de cuantificación (μM)
0,012-1,2	0,06	0,19
0,12-12	0,16	0,48
1,2-120	0,61	1,84

Tabla 4-3. Límites de detección y cuantificación en de la técnica de valoración empleada para determinar la concentración de Zolpidem en las muestras.

1.2. Método espectrofotométrico

Se estudió la linealidad de las curvas de calibración utilizadas para valorar las muestras a los pH 1,2; 4,5 y 6,8 cuyos intervalos de concentración fueron entre $1,33 \cdot 10^{-2}$ y $6,65 \cdot 10^{-4}$ mg/mL. En la tabla 4-4 se pueden observar el coeficiente de determinación “r²” de las curvas de calibración, que siempre fue superior a 0,990. En la tabla también se detallan los errores estándar (EE) de la ordenada en el origen y de la pendiente de la recta.

pH	Ordenada en el origen	EE	Pendiente	EE	r ²
1,2	$-2,10 \cdot 10^{-3}$	$2,54 \cdot 10^{-3}$	57,21	0,30	0,9999
4,5	$-5,25 \cdot 10^{-3}$	$3,54 \cdot 10^{-3}$	55,59	0,40	0,9998
6,8	$2,04 \cdot 10^{-3}$	$4,74 \cdot 10^{-3}$	85,52	0,53	0,9999

Tabla 4-4. Ensayo de linealidad de las curvas de calibración empleados para la valoración de las muestras de perfiles de disolución de Zolpidem por espectrofotometría a los distintos pH estudiados.

En la tabla 4-5 se detallan los resultados de los ensayos de precisión y exactitud realizados sobre patrones de concentración conocida a través del error absoluto (Ea) y error relativo (Er %).

Recta	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
Patrón 10%			
C _{Teórica}	$1,33 \cdot 10^{-3}$	$1,33 \cdot 10^{-3}$	$1,33 \cdot 10^{-3}$
C _{Experimental}	$1,39 \cdot 10^{-3}$	$1,43 \cdot 10^{-3}$	$1,37 \cdot 10^{-3}$
CV (%)	4,68	4,21	5,11
Ea	$6,43 \cdot 10^{-5}$	$9,56 \cdot 10^{-5}$	$3,76 \cdot 10^{-5}$
Er (%)	4,83	7,19	2,83
Patrón 50%			
C _{Teórica}	$6,65 \cdot 10^{-3}$	$6,65 \cdot 10^{-3}$	$6,65 \cdot 10^{-3}$
C _{Experimental}	$6,62 \cdot 10^{-3}$	$6,66 \cdot 10^{-3}$	$6,68 \cdot 10^{-3}$
CV (%)	1,93	4,25	1,42
Ea	$-2,89 \cdot 10^{-5}$	$1,00 \cdot 10^{-5}$	$2,60 \cdot 10^{-5}$
Er (%)	-0,43	0,15	0,39
Patrón 80%			
C _{Teórica}	$1,06 \cdot 10^{-2}$	$1,06 \cdot 10^{-2}$	$1,06 \cdot 10^{-2}$
C _{Experimental}	$1,03 \cdot 10^{-2}$	$1,03 \cdot 10^{-2}$	$1,08 \cdot 10^{-2}$
CV (%)	2,90	3,17	1,28
Ea	$-3,14 \cdot 10^{-4}$	$-3,46 \cdot 10^{-4}$	$1,28 \cdot 10^{-4}$
Er (%)	-2,95	-3,26	1,21

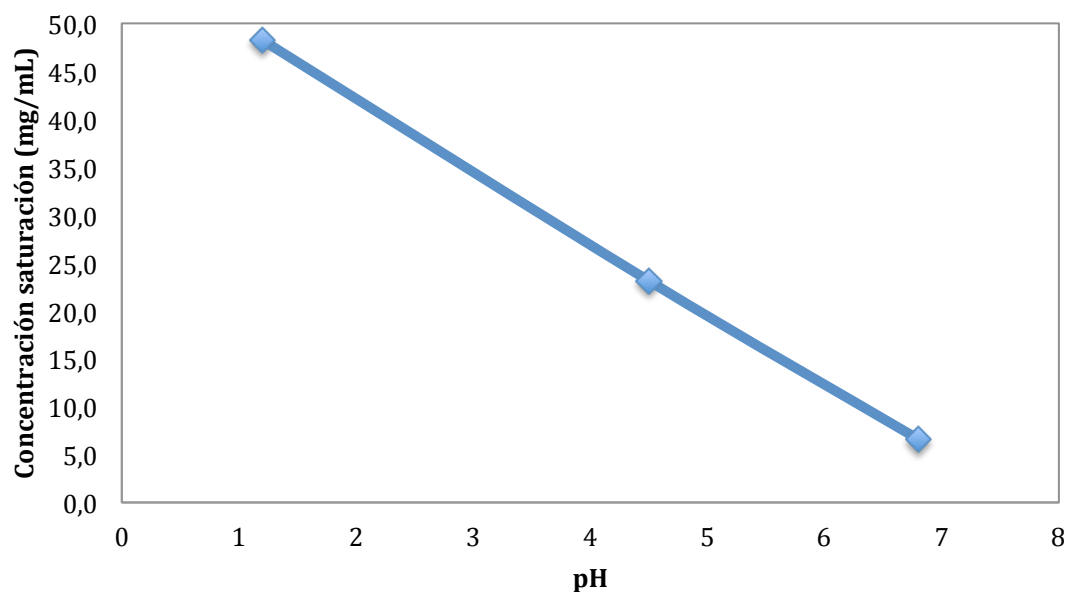
Tabla 4-5. Ensayo de exactitud y precisión de las curvas de calibración empleadas para la valoración de las muestras de perfiles de disolución de Zolpidem a distintos pH.

2. Concentración de saturación

En la tabla 4-6 se muestran las concentraciones experimentales de Zolpidem individualmente y promedio en condición de saturación a partir de la sal Zolpidem Hemitartrato a cada pH estudiado y a los distintos tiempos de muestreo. En la gráfica 4-1 se muestra el perfil de solubilidad-pH.

pH	Tiempo (h)	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV(%)	Do
1,2	18	36,19	39,97	5,36	13,40	$0,91 \cdot 10^{-03}$
		43,76				
	24	47,74	48,24	0,70	1,46	
		48,73				
			44,11	5,70	12,92	
4,5	18	34,21	33,76	0,64	1,90	$1,41 \cdot 10^{-03}$
		33,30				
	24	23,01	23,13	0,17	0,75	
		23,25				
			28,44	6,15	21,62	
6,8	18	6,39	6,06	0,47	7,77	$6,32 \cdot 10^{-03}$
		5,73				
	24	6,40	6,60	0,28	4,30	
		6,81				
			6,33	0,45	7,04	

Tabla 4-6. Concentración de saturación de Zolpidem a los distintos pH estudiados.



Gráfica 4-1. Perfil de solubilidad en función del pH de Zolpidem a 37 °C.

3. Coeficiente de reparto

En la tabla 4-7 se especifican los valores individuales y promedios de reparto en n-octanol y solución acuosa tamponada a pH 6,8 ($D_{6,8}$).

Tiempo (h)	D solución 0,098 mg/mL	D solución 0,042 mg/mL	Promedio	Desviación estándar	CV(%)	Log $D_{6,8}$
1	201,95	211,96				
1		223,41				
2	213,46	222,04				
4	215,06	232,39	219,09	7,87	3,59	2,34
4	219,95	227,33				
24	221,41	213,21				
24	220,94	225,03				

Tabla 4-7. Coeficientes de reparto ($D_{6,8}$) en n-octanol de Zolpidem a partir de dos concentraciones de solución acuosa.

4. Ensayos *in vitro* en células Caco-2 para determinar la permeabilidad de Zolpidem

Las tablas que se muestran a continuación (4-8, 4-9, 4-10, 4-11 y 4-12) corresponden a las concentraciones experimentales obtenidas en el compartimiento receptor, de los estudios de soluciones de Zolpidem a diferentes concentraciones.

Para la estimación de la permeabilidad se ha utilizado en todos los casos la aproximación no lineal (ecuación 3-5).

Zolpidem 120 μ M			
Tiempo (min)	Concentraciones (μ M). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	16,66	14,29	15,79
30	19,19	18,39	20,26
60	28,00	26,53	32,56
90	32,49	30,68	38,36
Pe _{eff} (cm/s)	$4,14 \cdot 10^{-05}$	$3,95 \cdot 10^{-05}$	$5,94 \cdot 10^{-05}$
Pe _{eff} ±DE (cm/s)	$4,68 \cdot 10^{-05} \pm 1,10 \cdot 10^{-05}$		

Tabla 4-8. Concentraciones (μ M) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Zolpidem 120 μ M en la línea celular Caco-2.

Zolpidem 52 μM			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	3,88	3,58	1,92
30	9,70	9,55	10,27
60	14,88	15,35	13,86
90	16,89	15,86	15,60
Peff (cm/s)	$6,83 \cdot 10^{-05}$	$6,38 \cdot 10^{-05}$	$6,24 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$6,48 \cdot 10^{-05} + 3,11 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-9. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Zolpidem 52 μM en la línea celular Caco-2.

Zolpidem 12 μM			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,50	0,33	0,28
30	0,87	1,12	1,09
60	2,00	2,19	2,25
90	3,04	3,65	3,42
Peff (cm/s)	$4,91 \cdot 10^{-05}$	$6,42 \cdot 10^{-05}$	$5,98 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$5,77 \cdot 10^{-05} + 7,76 \cdot 10^{-06}$		

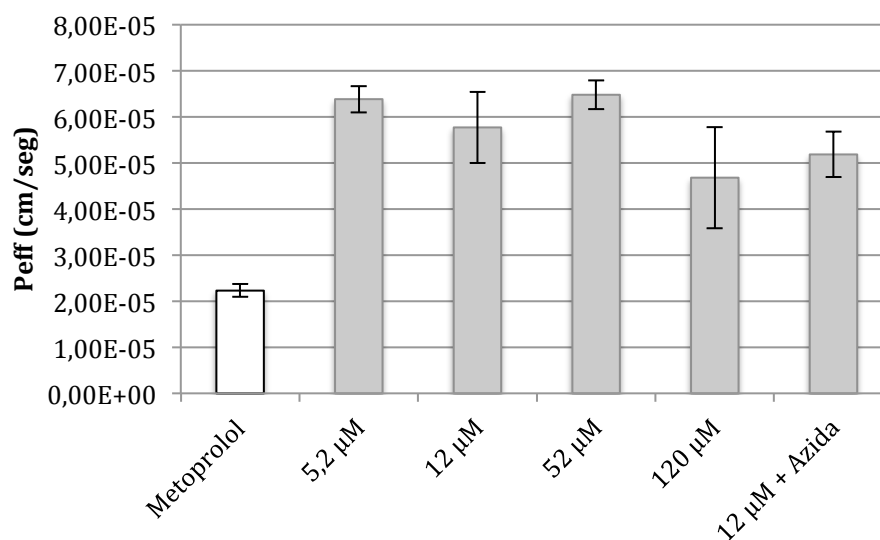
Tabla 4-10. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Zolpidem 12 μM en la línea celular Caco-2.

Zolpidem 5,2 μM			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,28	0,13	0,19
30	0,54	0,47	0,55
60	0,89	0,86	0,91
90	1,31	1,17	1,22
Peff (cm/s)	$6,71 \cdot 10^{-05}$	$6,15 \cdot 10^{-05}$	$6,29 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$6,39 \cdot 10^{-05} + 2,89 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-11. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Zolpidem 5,2 μM en la línea celular Caco-2.

Zolpidem 12 μ M - Azida sódica 1 mM			
Tiempo (min)	Concentraciones (μ M). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,97	0,72	1,00
30	1,10	0,93	1,11
60	2,08	2,46	2,61
90	3,16	3,34	3,33
Peff (cm/s)	$4,64 \cdot 10^{-05}$	$5,60 \cdot 10^{-05}$	$5,31 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$5,19 \cdot 10^{-05} \pm 4,90 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-12. Concentraciones (μ M) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Zolpidem 12 μ M en presencia de Azida sódica 1mM en la línea celular Caco-2.



Gráfica 4-2. Representación gráfica de las permeabilidades de las distintas concentraciones de Zolpidem y de la solución de Zolpidem en presencia de Azida Sódica.

A continuación se detallan los análisis estadísticos de comparación de las permeabilidades obtenidas para cada inserto en las distintas concentraciones ensayadas.

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	2,37	0,12	NS
ANOVA		0,08	NS

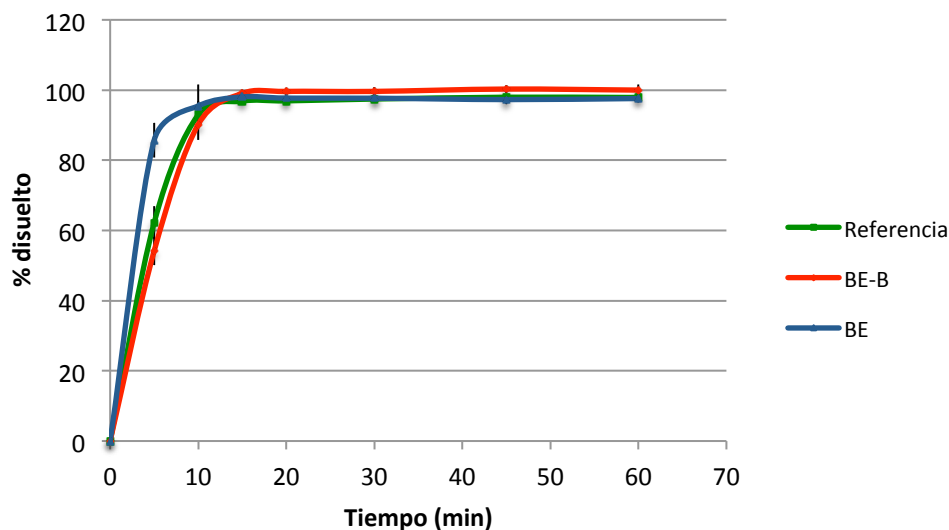
Tabla 4-13. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades apical-basolateral de distintas concentraciones de Zolpidem (μ M).

5. Perfiles de disolución

En las tablas 4-14, 4-15 y 4-16 se resumen los valores de medios de porcentaje disuelto de Zolpidem en función del tiempo del producto de referencia y las formulaciones BE-B y BE en los medios recomendados por la guía de bioexenciones de la EMA. Estos medios fueron preparados según lo establecido en la Ph.Eur.. Las representaciones gráficas de estos perfiles se pueden observar en las gráficas 4-3, 4-4 y 4-5.

pH 1,2. Tampón 50 mM-Cloruro. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-B		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	62,24 \pm 4,63	7,43	54,18 \pm 4,02	7,43	85,72 \pm 4,98	5,81
10	92,96 \pm 3,85	4,14	90,19 \pm 4,38	4,85	95,48 \pm 6,22	6,51
15	96,86 \pm 1,13	1,17	99,05 \pm 1,02	1,03	98,06 \pm 1,25	1,28
20	96,94 \pm 0,69	0,71	99,64 \pm 1,05	1,05	97,72 \pm 1,33	1,36
30	97,46 \pm 0,62	0,64	99,64 \pm 1,23	1,23	97,70 \pm 1,28	1,31
45	97,98 \pm 0,59	0,60	100,31 \pm 1,20	1,19	97,30 \pm 1,28	1,32
60	97,90 \pm 0,61	0,63	100,01 \pm 1,50	1,50	97,60 \pm 1,10	1,13

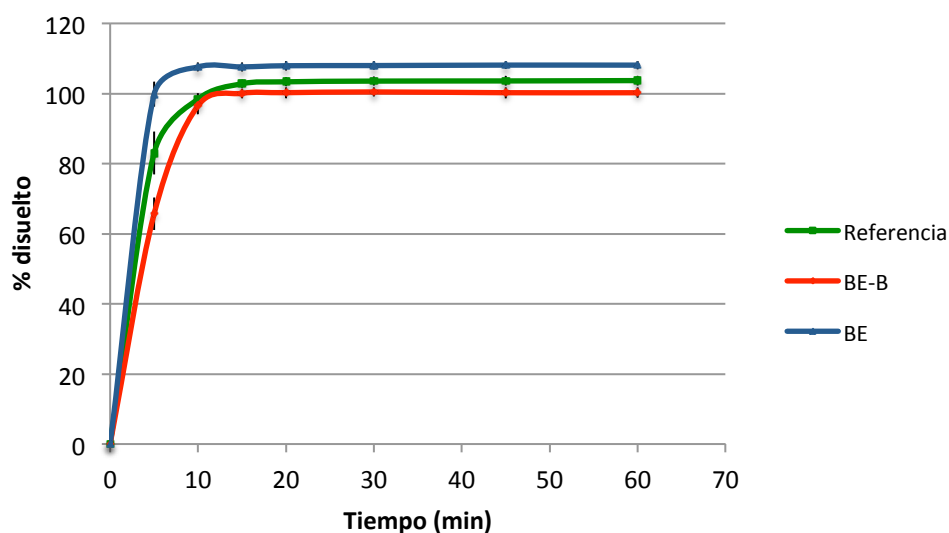
Tabla 4-14. Porcentajes disueltos de Zolpidem en función del tiempo en medio tampón pH 1,2; 50 mM de Cloruro de Sodio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-3. Perfil de disolución comparativo entre el producto de referencia y las formulaciones BE-B y BE de Zolpidem a pH 1,2; tampón 50 mM (Cloruro). (n=6).

pH 4,5. Tampón 36,5 mM-Acetato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-B		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	83,03 \pm 6,08	7,32	65,68 \pm 4,59	6,99	99,79 \pm 3,59	3,60
10	98,44 \pm 1,75	1,78	96,58 \pm 2,45	2,54	107,60 \pm 1,23	1,14
15	102,81 \pm 1,14	1,11	100,08 \pm 1,40	1,40	107,62 \pm 1,34	1,25
20	103,36 \pm 1,32	1,28	100,26 \pm 1,58	1,58	107,95 \pm 1,35	1,25
30	103,57 \pm 1,34	1,29	100,48 \pm 1,30	1,30	108,00 \pm 1,21	1,12
45	103,61 \pm 1,36	1,31	100,25 \pm 1,59	1,59	108,13 \pm 1,11	1,03
60	103,71 \pm 1,38	1,33	100,24 \pm 1,46	1,45	108,12 \pm 1,17	1,08

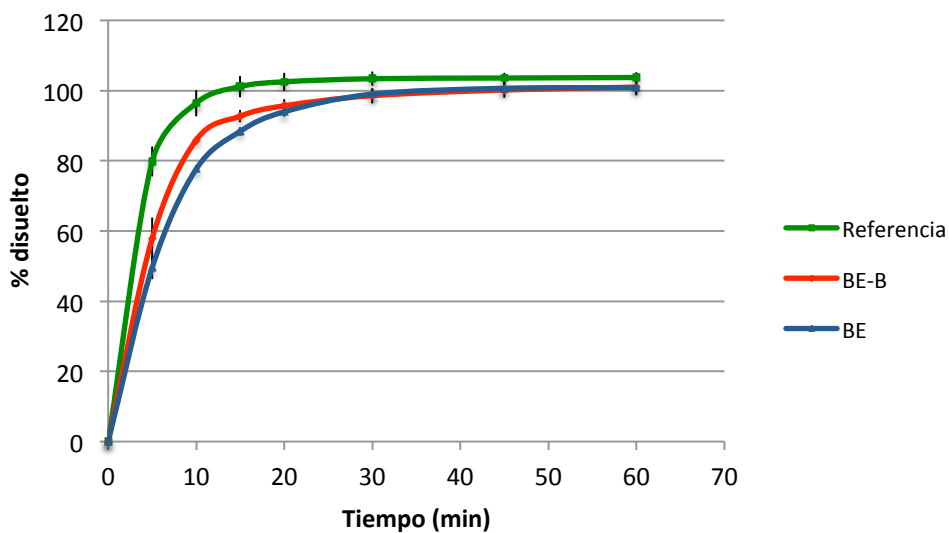
Tabla 4-15. Porcentajes disueltos de Zolpidem en función del tiempo en medio tampón pH 4,5; 36,5 mM de Acetato de Sodio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-4. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-B y BE de Zolpidem a pH 4,5; tampón 36,5 mM (Acetato). (n=6).

pH 6,8. Tampón 50 mM-Fosfato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-B		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	79,80 \pm 4,22	5,29	57,90 \pm 5,92	10,23	49,56 \pm 3,25	6,56
10	96,46 \pm 3,74	3,88	85,93 \pm 0,88	1,02	77,64 \pm 1,07	1,37
15	101,16 \pm 3,01	2,98	92,74 \pm 1,80	1,94	88,41 \pm 1,13	1,28
20	102,53 \pm 2,60	2,53	95,70 \pm 1,94	2,03	93,99 \pm 1,41	1,50
30	103,41 \pm 1,96	1,89	98,58 \pm 2,19	2,22	99,02 \pm 1,41	1,42
45	103,61 \pm 1,55	1,50	100,20 \pm 2,20	2,19	100,68 \pm 1,72	1,71
60	103,75 \pm 1,42	1,37	101,01 \pm 2,32	2,29	100,86 \pm 1,58	1,57

Tabla 4-16. Porcentajes disueltos de Zolpidem en función del tiempo en medio tampón pH 6,8; 50 mM de Fosfato de diácido de Potasio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).

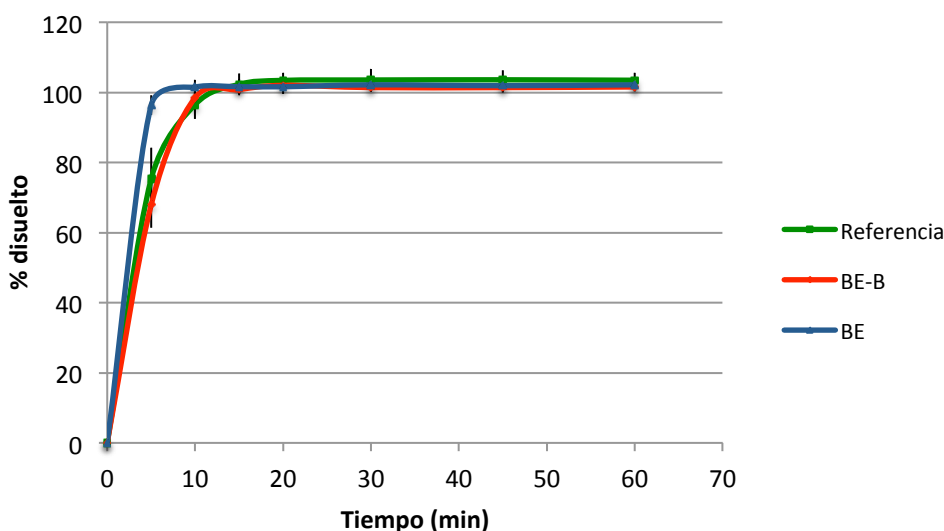


Gráfica 4-5. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-B y BE de Zolpidem a pH 6,8; tampón 50 mM (Fosfato). (n=6).

En las tablas 4-17 a 4-19 se presentan los resultados medios del porcentaje de Zolpidem disueltos desde las tres formulaciones ensayadas en medios a los pH 2,0; 6,0 y 6,5. Estos medios fueron preparados según lo descrito en la Ph.Eur.. Así mismo, se pueden observar las gráficas de porcentaje de disolución en función del tiempo en estos mismos medios en las gráficas 4-6, 4-7 y 4-8.

pH 2,0. Tampón 50 mM-Cloruro. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-B		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	75,31 \pm 8,87	11,77	67,94 \pm 6,62	9,74	96,41 \pm 2,78	2,88
10	96,55 \pm 4,13	4,27	98,52 \pm 1,56	1,58	101,53 \pm 2,04	2,01
15	102,30 \pm 3,12	3,05	100,81 \pm 1,31	1,30	101,64 \pm 2,11	2,07
20	103,44 \pm 2,11	2,04	102,03 \pm 0,74	0,72	101,62 \pm 2,08	2,05
30	103,56 \pm 3,12	3,01	101,38 \pm 0,86	0,85	102,17 \pm 2,00	1,95
45	103,61 \pm 2,77	2,68	101,38 \pm 0,73	0,72	101,93 \pm 1,95	1,92
60	103,49 \pm 2,07	2,00	101,57 \pm 0,88	0,87	102,17 \pm 1,90	1,86

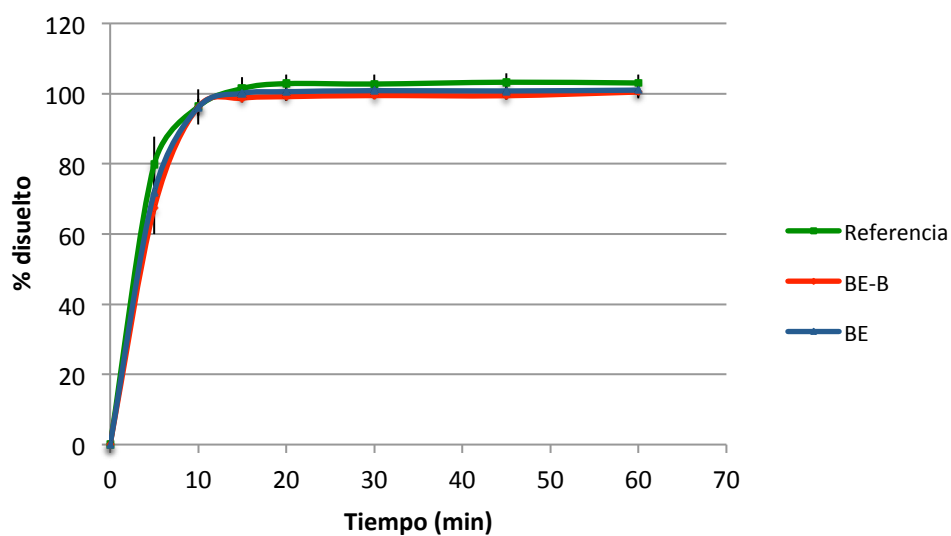
Tabla 4-17. Porcentajes disueltos de Zolpidem en función del tiempo en medio tampón pH 2,0; 50 mM de Cloruro de Sodio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-6. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-B y BE de Zolpidem a pH 2,0; tampón 50 mM (Cloruro). (n=6).

pH 6,0. Tampón 50 mM-Fosfato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-B		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	79,87 \pm 7,93	9,93	67,41 \pm 7,50	11,12	71,89 \pm 6,09	8,47
10	96,27 \pm 5,04	5,23	96,18 \pm 2,38	2,48	96,10 \pm 2,37	2,47
15	101,45 \pm 3,20	3,15	98,71 \pm 1,20	1,22	100,11 \pm 2,57	2,56
20	102,86 \pm 2,61	2,54	99,15 \pm 1,06	1,07	100,56 \pm 2,61	2,59
30	102,75 \pm 2,68	2,60	99,47 \pm 0,88	0,88	100,86 \pm 2,35	2,33
45	103,27 \pm 2,50	2,42	99,42 \pm 0,94	0,95	100,78 \pm 2,51	2,49
60	103,05 \pm 2,44	2,37	100,47 \pm 1,36	1,36	101,01 \pm 2,32	2,30

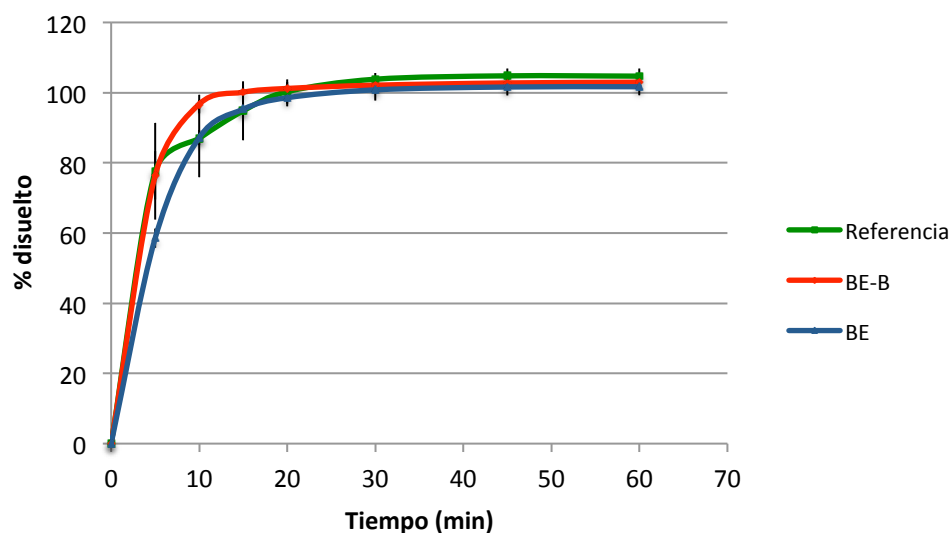
Tabla 4-18. Porcentajes disueltos de Zolpidem en función del tiempo en medio tampón pH 6,0; 50 mM de Fosfato diácido de Potasio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-7. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-B y BE de Zolpidem a pH 6,0; tampón 50 mM (Fosfato). (n=6).

pH 6,5. Tampón 50 mM-Fosfato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-B		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	77,59 \pm 13,73	17,70	76,42 \pm 6,85	8,96	58,54 \pm 2,76	4,71
10	86,99 \pm 11,06	12,71	96,74 \pm 2,62	2,71	87,21 \pm 2,13	2,45
15	94,84 \pm 8,45	8,91	100,16 \pm 2,18	2,18	95,32 \pm 2,36	2,48
20	100,31 \pm 3,46	3,45	101,22 \pm 1,89	1,86	98,58 \pm 2,51	2,55
30	103,85 \pm 1,82	1,75	102,15 \pm 1,88	1,84	100,82 \pm 3,07	3,05
45	104,81 \pm 2,11	2,01	102,79 \pm 1,68	1,64	101,63 \pm 2,41	2,37
60	104,73 \pm 2,08	1,99	103,00 \pm 1,81	1,76	101,70 \pm 2,42	2,38

Tabla 4-19. Porcentajes disueltos de Zolpidem en función del tiempo en medio tampón pH 6,5; 50 mM de Fosfato diácido de Potasio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).

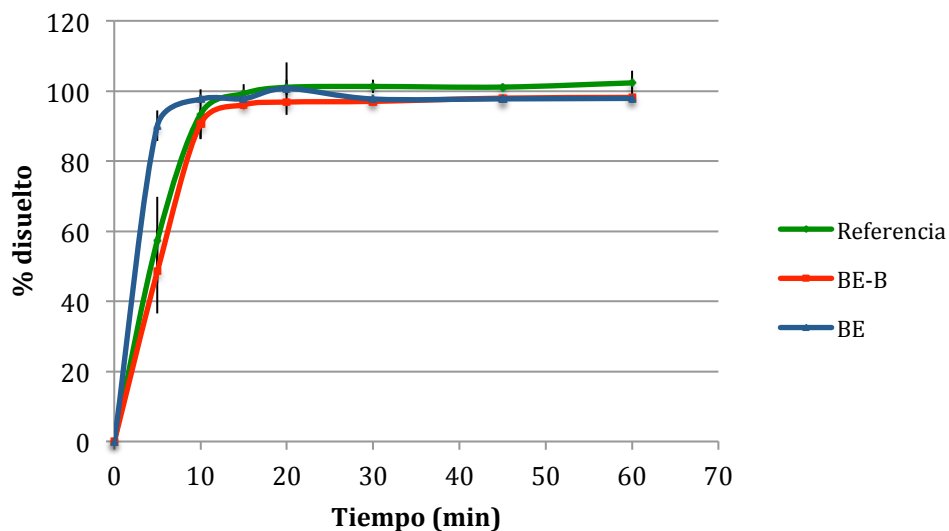


Gráfica 4-8. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-B y BE de Zolpidem a pH 6,5; tampón 50 mM (Fosfato). (n=6).

En las tablas 4-20 a 4-23 se presentan los resultados medios del porcentaje de Zolpidem disueltos desde las tres formulaciones ensayadas en medios a los pH 1,2; 6,0; 6,5 y 6,8 de menor concentración iónica que la establecida en la Ph.Eur.. La representación gráfica de estos resultados puede observarse en las gráficas 4-9 a 4-11, respectivamente.

pH 1,2. Tampón 5 mM-Cloruro. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-B		BE	
	Media ± DE	CV (%)	Media ± DE	CV (%)	Media ± DE	CV (%)
5	57,42 ± 12,30	21,41	48,59 ± 12,11	24,91	90,14 ± 4,39	4,87
10	93,38 ± 7,02	7,52	90,64 ± 4,35	4,80	97,66 ± 1,19	1,22
15	99,26 ± 2,67	2,69	96,06 ± 1,25	1,30	97,81 ± 1,06	1,08
20	101,07 ± 2,19	2,17	96,86 ± 0,81	0,83	100,70 ± 7,49	7,44
30	101,30 ± 1,84	1,82	97,05 ± 0,76	0,79	97,72 ± 1,01	1,04
45	101,12 ± 1,00	0,99	97,97 ± 0,78	0,80	97,76 ± 1,10	1,12
60	102,32 ± 3,38	3,30	98,19 ± 1,18	1,21	97,90 ± 1,19	1,22

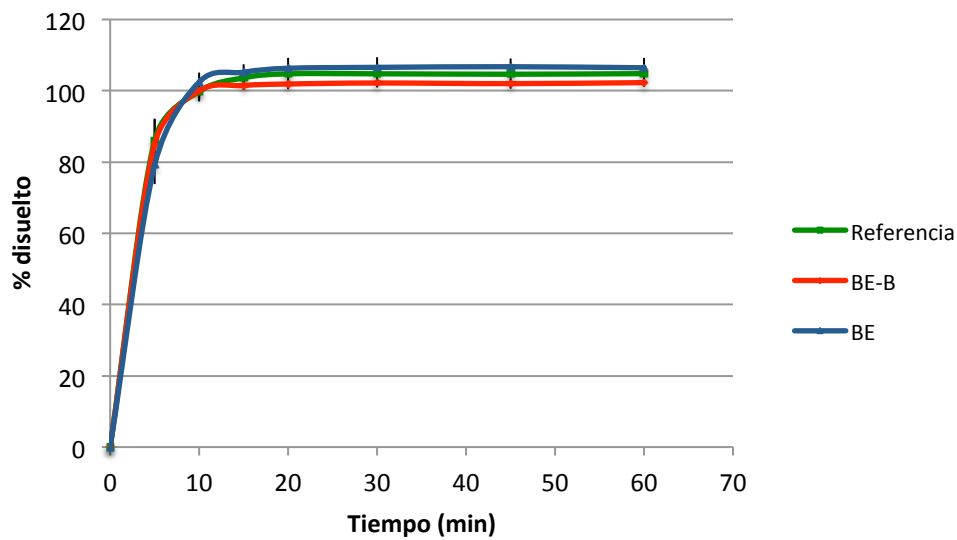
Tabla 4-20. Porcentajes disueltos de Zolpidem en función del tiempo en medio tampón pH 1,2; 5 mM de Cloruro de Sodio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-9. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-B y BE de Zolpidem a pH 1,2; tampón 5 mM (Cloruro). (n=6).

pH 6,0. Tampón 10 mM-Fosfato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-B		BE	
	Media + DE	CV (%)	Media + DE	CV (%)	Media + DE	CV (%)
5	86,15 ± 5,79	6,72	85,06 ± 7,18	8,44	79,17 ± 5,37	6,78
10	99,77 ± 2,73	2,74	100,02 ± 2,29	2,28	102,46 ± 2,58	2,52
15	103,66 ± 1,46	1,41	101,51 ± 1,21	1,19	105,22 ± 2,26	2,14
20	104,77 ± 1,41	1,34	101,92 ± 1,46	1,43	106,34 ± 2,85	2,68
30	104,79 ± 1,33	1,27	102,20 ± 1,25	1,22	106,59 ± 2,79	2,61
45	104,67 ± 1,17	1,12	102,03 ± 1,48	1,45	106,78 ± 2,26	2,12
60	104,83 ± 1,49	1,42	102,30 ± 1,23	1,21	106,48 ± 2,78	2,61

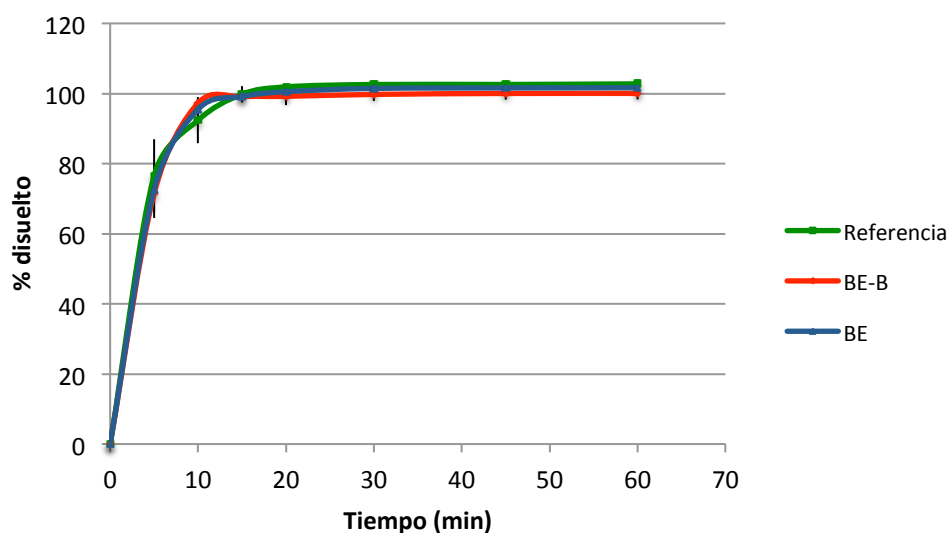
Tabla 4-21. Porcentajes disueltos de Zolpidem en función del tiempo en medio tampón pH 6,0; 10 mM de Fosfato diácido de Potasio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-10. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-B y BE de Zolpidem a pH 6,0; tampón 10 mM (Fosfato). (n=6).

pH 6,5. Tampón 10 mM-Fosfato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-B		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	76,59 \pm 10,34	13,50	71,50 \pm 6,97	9,75	72,66 \pm 3,43	4,72
10	92,38 \pm 6,58	7,12	97,27 \pm 1,07	1,10	95,54 \pm 1,35	1,41
15	99,82 \pm 2,31	2,31	99,07 \pm 1,56	1,58	99,16 \pm 1,39	1,40
20	101,91 \pm 0,52	0,51	99,22 \pm 2,48	2,50	100,53 \pm 1,64	1,63
30	102,59 \pm 1,23	1,20	99,77 \pm 1,86	1,86	101,47 \pm 1,51	1,49
45	102,60 \pm 1,16	1,13	100,04 \pm 1,74	1,74	101,61 \pm 1,38	1,36
60	102,77 \pm 1,20	1,16	100,05 \pm 1,70	1,70	101,66 \pm 1,50	1,47

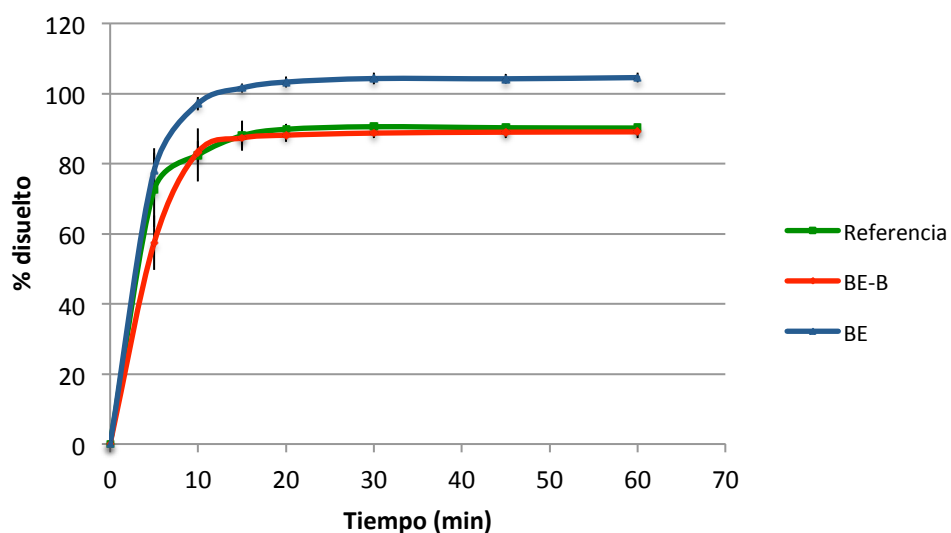
Tabla 4-22. Porcentajes disueltos de Zolpidem en función del tiempo en medio tampón pH 6,5; 10 mM de Fosfato diácido de Potasio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-11. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-B y BE de Zolpidem a pH 6,5; tampón 10 mM (Fosfato). (n=6).

pH 6,8. Tampón 10 mM-Fosfato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-B		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	72,55 \pm 10,56	14,56	57,43 \pm 7,79	13,57	78,07 \pm 6,35	8,13
10	82,49 \pm 7,54	9,14	83,38 \pm 3,04	3,64	97,12 \pm 1,88	1,94
15	87,98 \pm 4,27	4,85	87,33 \pm 1,96	2,25	101,60 \pm 1,33	1,31
20	89,81 \pm 1,60	1,78	88,14 \pm 1,91	2,17	103,29 \pm 1,54	1,49
30	90,55 \pm 0,72	0,79	88,73 \pm 1,44	1,62	104,30 \pm 1,66	1,60
45	90,25 \pm 0,74	0,82	88,99 \pm 1,69	1,90	104,23 \pm 1,40	1,35
60	90,18 \pm 0,86	0,95	89,08 \pm 1,80	2,02	104,57 \pm 1,40	1,34

Tabla 4-23. Porcentajes disueltos de Zolpidem en función del tiempo en medio tampón pH 6,8; 10 mM de Fosfato diácido de potasio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).

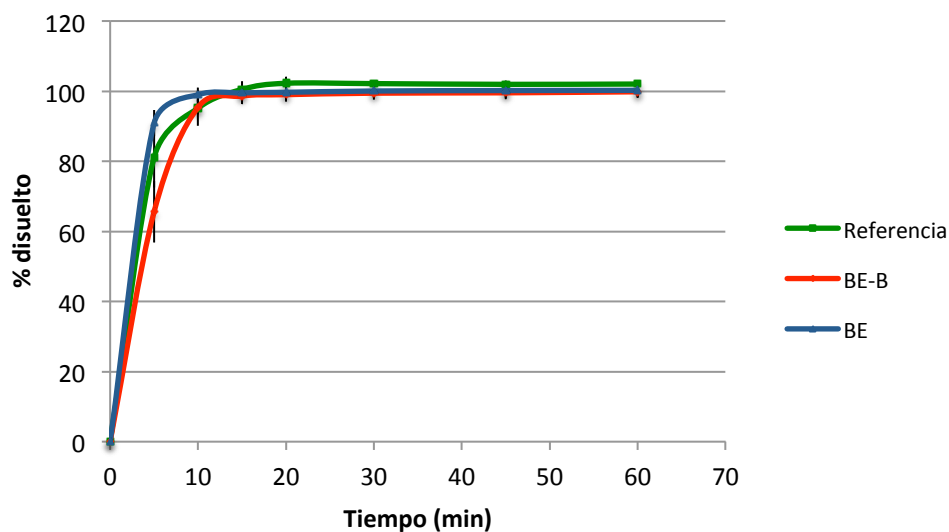


Gráfica 4-12. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-B y BE de Zolpidem a pH 6,8; tampón 10 mM (Fosfato). (n=6).

En la tabla 4-24 se muestran los porcentajes disueltos de Zolpidem desde las diferentes formulaciones estudiadas en un medio a pH 4,5 que fue preparado a una concentración de 10 mM de fosfato diácido de potasio. La representación gráfica de estos resultados se puede observar en la gráfica 4-13.

pH 4,5. Tampón 10 mM-Fosfato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-B		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	81,13 \pm 8,64	10,65	65,62 \pm 8,78	13,38	90,90 \pm 3,81	4,19
10	95,17 \pm 5,03	5,29	95,44 \pm 2,06	2,15	98,99 \pm 2,06	2,08
15	100,52 \pm 2,30	2,29	98,62 \pm 2,28	2,31	99,53 \pm 1,90	1,91
20	102,27 \pm 1,95	1,91	99,02 \pm 1,98	2,00	99,69 \pm 2,07	2,07
30	102,17 \pm 0,89	0,87	99,44 \pm 1,84	1,85	100,06 \pm 2,00	2,00
45	101,96 \pm 1,11	1,09	99,55 \pm 1,83	1,84	100,20 \pm 2,08	2,08
60	102,05 \pm 1,02	1,00	99,83 \pm 1,75	1,75	100,25 \pm 2,00	1,99

Tabla 4-24. Porcentajes disueltos de Zolpidem en función del tiempo en medio tampón pH 4,5; 10 mM de Fosfato diácido de Potasio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-13. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-B y BE de Zolpidem a pH 4,5; tampón 10 mM (Fosfato). (n=6).

6. Ensayos *in vitro* en células Caco-2 para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de Zolpidem

A continuación se presentan las tablas que muestran las concentraciones experimentales obtenidas en el compartimiento receptor, de los estudios de soluciones de Zolpidem preparadas a partir de los productos estudiados (Referencia, BE-B y BE). Para la estimación de la permeabilidad se ha utilizado en todos los casos la aproximación no lineal (ecuación 3-5).

Zolpidem 52 μM (Referencia)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	5,22	4,56	3,11
30	11,54	7,84	8,27
60	15,94	14,78	14,73
90	17,95	17,25	16,47
Pe _{ff} (cm/s)	$7,16 \cdot 10^{-05}$	$7,10 \cdot 10^{-05}$	$6,89 \cdot 10^{-05}$
Pe _{ff+DE} (cm/s)	$7,05 \cdot 10^{-05} \pm 1,44 \cdot 10^{-06}$		

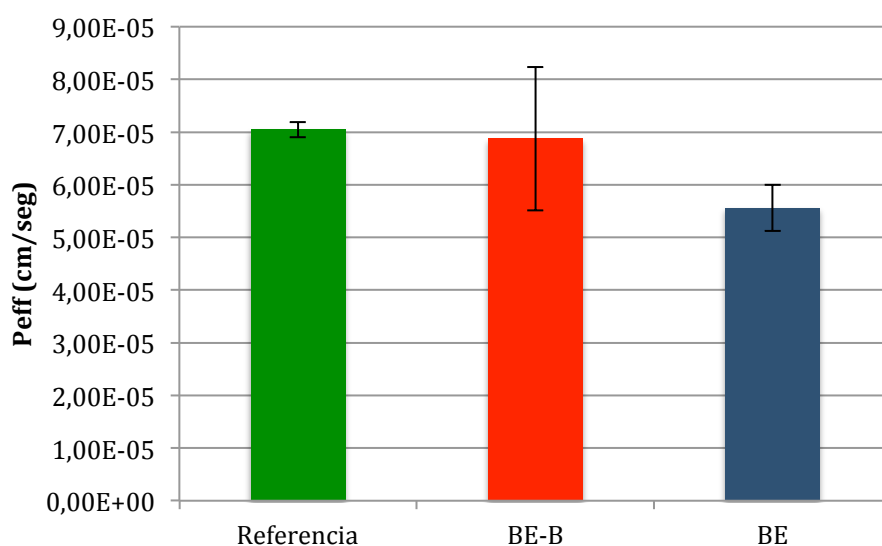
Tabla 4-25. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Zolpidem 52 μM preparada a partir del producto Referencia en la línea celular Caco-2.

Zolpidem 52 μM (BE-B)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	3,85	4,20	5,26
30	5,14	0,33	8,79
60	13,09	14,16	15,77
90	14,18	15,78	19,11
Pe _{ff} (cm/s)	$5,53 \cdot 10^{-05}$	$6,85 \cdot 10^{-05}$	$8,25 \cdot 10^{-05}$
Pe _{ff+DE} (cm/s)	$6,88 \cdot 10^{-05} \pm 1,36 \cdot 10^{-05}$		

Tabla 4-26. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Zolpidem 52 μM preparada a partir de la formulación BE-B en la línea celular Caco-2.

Zolpidem 52 μM (BE)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	3,77	3,00	9,54
30	9,08	8,15	8,04
60	13,86	11,96	14,20
90	14,71	15,71	16,34
Peff (cm/s)	$5,50 \cdot 10^{-05}$	$6,03 \cdot 10^{-05}$	$5,16 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$5,56 \cdot 10^{-05} + 4,42 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-27. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Zolpidem 52 μM preparada a partir de la formulación BE en la línea celular Caco-2.



Gráfica 4-14. Representación gráfica de la permeabilidad de las distintas formulaciones de Zolpidem estudiadas.

En la tabla 4-28 se muestran los análisis estadísticos de comparación de las permeabilidades obtenidas para cada inserto en las distintas formulaciones ensayadas.

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	2,48	0,16	NS
ANOVA		0,13	NS

Tabla 4-28. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades apical-basolateral de las distintas formulaciones de Zolpidem y del fármaco (μM)

7. Ensayos *in situ* para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de Zolpidem

En las tablas que se muestran a continuación, se presentan los resultados de los experimentos individuales realizados *in situ* con soluciones preparadas a partir de los tres productos de Zolpidem estudiados.

Concentración remanente de Zolpidem en lumen intestinal								
Concentración inicial perfundida: 40 µg/mL (Referencia)								
Volumen inicial perfundido: 10 mL								
Tiempo (minutos)	Animales						Promedio	± DE
	1	2	3	4	5	6		
5	27,22	28,73	23,67	28,38	19,85	22,60	25,07	3,59
10	22,74	22,48	20,18	23,73	14,86	17,20	20,20	3,51
15	19,12	18,72	15,65	18,56	10,01	12,91	15,83	3,72
20	16,71	15,27	13,49	14,88	7,32	8,98	12,78	3,76
25	14,16	13,38	11,36	12,54	4,41	6,99	10,47	3,90
30	11,88	9,86	9,19	10,26	2,97	4,98	8,19	3,44
Vr (mL)	5,6	4,3	4,4	6,4	6,5	6,0	5,53	0,97
Ajuste no lineal								
Kap (h ⁻¹)	2,78	3,67	3,44	3,09	4,77	3,73	3,58	0,68
Ao (µg/mL)	32,31	35,79	29,49	35,42	28,84	30,71	32,09	2,97

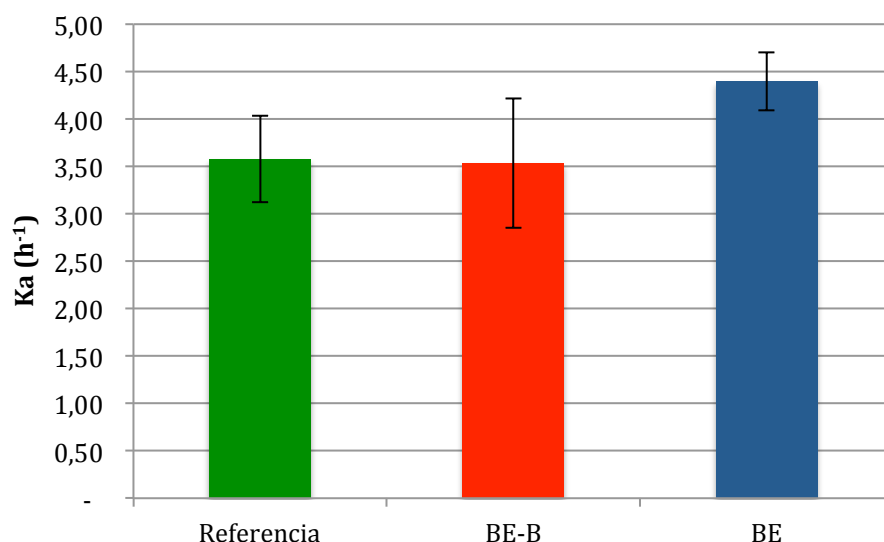
Tabla 4-29. Concentración de Zolpidem remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Zolpidem a una concentración de 40 µg/mL (52 µM) preparada a partir del producto Referencia.

Concentración remanente de Zolpidem en lumen intestinal								
Concentración inicial perfundida: 40 µg/mL (BE-B)								
Volumen inicial perfundido: 10 mL								
Tiempo (minutos)	Animales						Promedio	± DE
	1	2	3	4	5	6		
5	32,81	31,59	34,66	35,13	21,06	21,25	29,42	6,53
10	24,26	23,14	27,96	28,09	17,28	17,08	22,97	4,90
15	20,07	19,39	18,25	20,85	13,39	12,95	17,48	3,45
20	15,58	15,46	13,81	17,26	10,23	9,66	13,67	3,09
25	14,36	13,67	12,18	14,15	8,39	8,15	11,82	2,85
30	9,95	11,92	8,65	11,42	5,29	5,95	8,86	2,77
Vr (mL)	5,20	5,90	6,20	6,30	7,10	7,40	6,35	0,80
Ajuste no lineal								
Kap (h ⁻¹)	3,70	3,30	4,09	3,42	3,36	3,36	3,54	0,30
Ao (µg/mL)	41,14	38,25	47,12	44,57	27,52	27,63	37,71	8,40

Tabla 4-30. Concentración de Zolpidem remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Zolpidem a una concentración de 40 µg/mL (52 µM) preparada a partir de la formulación BE-B.

Concentración remanente de Zolpidem en lumen intestinal								
Concentración inicial perfundida: 40 µg/mL (BE)								
Volumen inicial perfundido: 10 mL								
Tiempo (minutos)	Animales						Promedio	± DE
	1	2	3	4	5	6		
5	27,82	22,66	20,39	24,11	21,78	23,44	23,37	2,54
10	22,15	18,17	15,13	20,40	13,26	17,98	17,85	3,27
15	16,51	13,08	12,48	12,14	9,69	13,52	12,90	2,21
20	13,18	9,67	8,94	9,18	5,92	9,66	9,42	2,32
25	9,92	6,49	8,35	6,12	5,28	7,34	7,25	1,68
30	7,17	3,80	5,45	5,23	3,49	4,88	5,00	1,32
Vr (mL)	6,10	5,80	4,40	4,90	6,00	5,90	5,70	0,93
Ajuste no lineal								
Kap (h ⁻¹)	3,55	4,35	4,17	4,83	5,51	3,96	4,40	0,69
Ao (µg/mL)	36,54	31,74	26,52	34,90	32,14	31,92	32,29	3,42

Tabla 4-31. Concentración de Zolpidem remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Zolpidem a una concentración de 40 µg/mL (52 µM) preparada a partir de la formulación BE.



Gráfica 4-15. Representación gráfica comparativa de las constantes de absorción de Zolpidem de las distintas formulaciones estudiadas y de la solución del fármaco en el modelo in situ.

En la tabla 4-32 se muestran los análisis estadísticos de comparación de las constantes de absorción obtenidas con las distintas formulaciones ensayadas.

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	1,06	0,37	NS
ANOVA		0,07	NS

Tabla 4-32. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las constantes de absorción en el modelo in situ de las distintas formulaciones de Zolpidem (µM).

8. Ensayos *in vitro* en células Caco-2 para determinar el efecto de excipientes sobre la permeabilidad de Zolpidem

A continuación se muestran las tablas con el resumen de las concentraciones experimentales obtenidas en el compartimiento receptor, del estudio de la solución de Zolpidem y de soluciones de Zolpidem con distintos excipientes que podrían estar modificando la permeabilidad del fármaco. Para la estimación de la permeabilidad se ha utilizado en todos los casos la aproximación no lineal (ecuación 3-5).

Zolpidem 52 μM -PEG 400 (1,5 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	2,64	1,89	2,14
30	4,28	4,54	4,01
60	7,99	8,06	7,30
90	12,20	11,13	11,30
Peff (cm/s)	$5,70 \cdot 10^{-05}$	$5,18 \cdot 10^{-05}$	$5,16 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$5,35 \cdot 10^{-05} \pm 3,07 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-33. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Zolpidem 52 μM con PEG-400 (1,5 mg/mL) en la línea celular Caco-2.

Zolpidem 52 μM -PEG 6000 (1 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	2,36	0,97	2,79
30	2,73	1,75	3,87
60	3,40	5,92	5,96
90	9,25	9,36	10,01
Peff (cm/s)	$3,44 \cdot 10^{-05}$	$4,42 \cdot 10^{-05}$	$3,97 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$3,94 \cdot 10^{-05} \pm 4,90 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-34. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Zolpidem 52 μM con PEG-6000 (1 mg/mL) en la línea celular Caco-2.

Zolpidem 52 μM -TiO ₂ (5 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	1,22	1,96	1,45
30	4,97	4,19	4,47
60	6,67	5,97	8,77
90	9,55	10,13	9,64
Peff (cm/s)	$4,09 \cdot 10^{-05}$	$4,24 \cdot 10^{-05}$	$4,52 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$4,28 \cdot 10^{-05} \pm 2,14 \cdot 10^{-06}$		

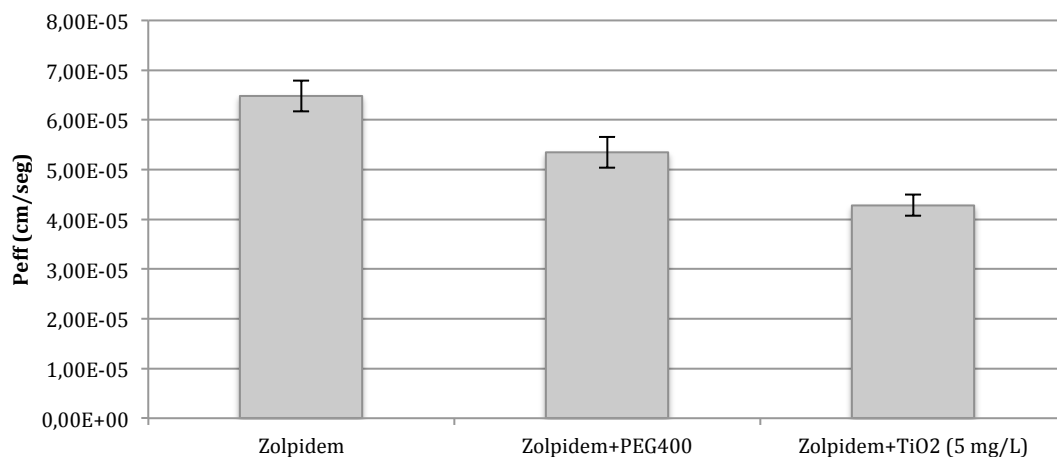
Tabla 4-35. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Zolpidem 52 μM con TiO₂ (5 mg/mL) en la línea celular Caco-2.

Zolpidem 52 μM -TiO ₂ (9 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	2,80	3,20	3,10
30	5,35	5,48	5,25
60	8,14	7,06	8,31
90	10,57	10,75	10,54
Peff (cm/s)	$4,45 \cdot 10^{-05}$	$4,23 \cdot 10^{-05}$	$4,38 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$4,35 \cdot 10^{-05} \pm 1,12 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-36. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Zolpidem 52 μM con TiO₂ (9 mg/mL) en la línea celular Caco-2.

Zolpidem 52 μM -Talco (6 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	1,89	2,87	2,12
30	3,89	4,84	4,66
60	6,56	7,37	7,46
90	9,24	10,22	9,87
Peff (cm/s)	$3,88 \cdot 10^{-05}$	$4,16 \cdot 10^{-05}$	$4,21 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$4,08 \cdot 10^{-05} \pm 1,76 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-37. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Zolpidem 52 μM con Talco (6 mg/mL) en la línea celular Caco-2.



Gráfica 4-16. Representación gráfica de la permeabilidad de Zolpidem y de Zolpidem más PEG400 y TiO₂ (excipientes presentes en el producto de Referencia).

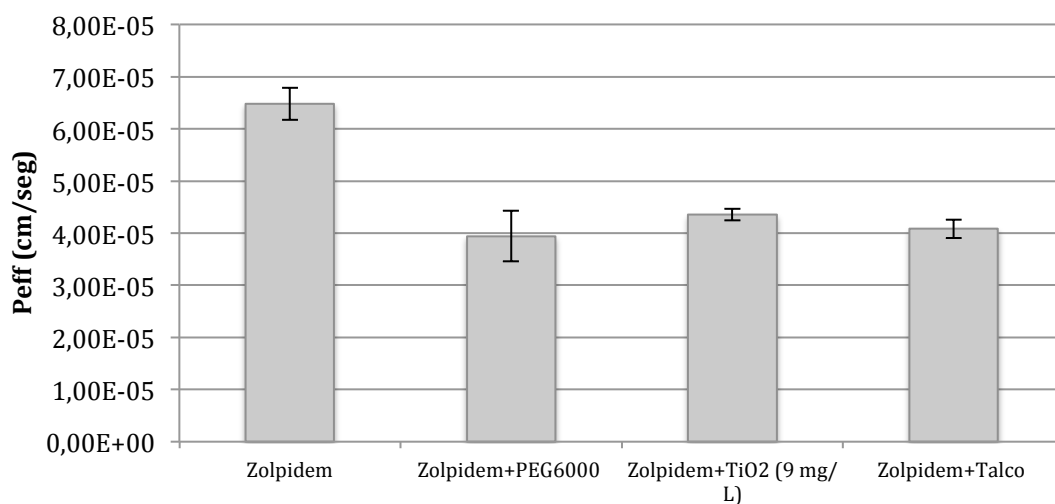
En la tabla 4-38 se muestra el análisis de varianza de las permeabilidades obtenidas con solución de Zolpidem y el fármaco más los excipientes estudiados del producto de Referencia. En la tabla 4-39 se puede observar la prueba de comparación múltiple de Scheffe a fin de determinar si hay diferencias significativas entre grupos.

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	0,48	0,64	NS
ANOVA		0,00	S

Tabla 4-38. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades de Zolpidem, Zolpidem+PEG400 y Zolpidem+TiO₂ (5 mg/L).

Prueba de comparación múltiple de Scheffé		
	Zolpidem	Zolpidem+PEG400
Zolpidem	-	-
Zolpidem+PEG400	S	-
Zolpidem+TiO ₂ (5 mg/L)	S	S

Tabla 4-39. Resultado de la comparación múltiple de permeabilidades de Zolpidem, Zolpidem+PEG400 y Zolpidem+TiO₂ (5 mg/L).



Gráfica 4-17. Representación gráfica de la permeabilidad de Zolpidem y de Zolpidem más PEG6000, TiO₂ y Talco (excipientes presentes en la formulación BE-B).

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	1,60	0,36	NS
ANOVA		0,00	S

Tabla 4-40. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades de Zolpidem, Zolpidem+PEG6000, Zolpidem+TiO₂ (9 mg/L) y Zolpidem+Talco.

Prueba de comparación múltiple de Scheffé			
	Zolpidem	Zolpidem+PEG6000	Zolpidem+TiO ₂ (9 mg/L)
Zolpidem	-	-	-
Zolpidem+PEG6000	S	-	-
Zolpidem+TiO ₂ (9 mg/L)	S	NS	-
Zolpidem+Talco	S	NS	NS

Tabla 4-41. Resultado de la comparación múltiple de permeabilidades de Zolpidem, Zolpidem+PEG6000, Zolpidem+TiO₂ (9 mg/L) y Zolpidem+Talco.

9. Ensayos *in situ* para determinar el efecto de excipientes sobre la permeabilidad de Zolpidem

En las tablas que se muestran a continuación, se presentan los resultados de los experimentos realizados en el modelo *in situ* con solución de Zolpidem y soluciones del fármaco con los diferentes excipientes estudiados.

Concentración remanente de Zolpidem en lumen intestinal							
Concentración inicial perfundida: 40 µg/mL							
Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	22,24	23,35	22,29	22,05	27,57	23,50	2,33
10	15,93	16,90	17,65	17,69	20,87	17,81	1,86
15	11,34	12,54	13,46	12,16	15,08	12,92	1,43
20	7,28	8,35	8,62	7,55	10,66	8,49	1,33
25	4,39	7,04	6,51	3,45	5,34	5,35	1,48
30	3,79	4,33	3,69	3,35	4,99	4,03	0,64
Vr (mL)	5,5	6,3	6,0	5,8	4,3	5,58	0,77
Ajuste no lineal							
Kap (h ⁻¹)	5,18	4,23	4,35	5,00	5,15	4,78	0,46
Ao (µg/mL)	32,66	32,34	31,34	33,07	39,90	33,86	3,44

Tabla 4-42. Concentración de Zolpidem remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Zolpidem a una concentración de 40 µg/mL (52 µM).

Concentración remanente de Zolpidem en lumen intestinal							
Concentración inicial perfundida: Zolpidem (40 µg/mL)+PEG400 (1,5 mg/L)							
Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales				Promedio	± DE	
	1	2	3	4			
5	26,18	21,37	27,97	27,07	25,65	2,94	
10	21,61	17,88	21,21	21,13	20,46	1,73	
15	15,35	13,12	17,33	17,75	15,89	2,12	
20	10,43	9,63	13,28	14,19	11,88	2,20	
25	7,08	7,51	11,07	12,25	9,48	2,57	
30	4,56	5,66	7,79	9,16	6,79	2,07	
Vr (mL)	7,2	7,3	5,4	5,0	6,23	1,20	
Ajuste no lineal							
Kap (h ⁻¹)	4,12	3,51	3,78	3,49	3,73	0,29	
Ao (µg/mL)	37,28	28,57	35,88	33,62	33,84	3,82	

Tabla 4-43. Concentración de Zolpidem remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Zolpidem a una concentración de 40 µg/mL (52 µM) en presencia de PEG400 a concentración de 1,5 mg/L.

Concentración remanente de Zolpidem en lumen intestinal							
Concentración inicial perfundida: Zolpidem (40 µg/mL)+PEG6000 (1 mg/L)							
Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	27,09	21,12	23,82	24,51	19,77	23,26	2,89
10	20,24	16,71	19,93	19,93	15,26	18,41	2,28
15	17,49	12,49	16,51	15,82	11,68	14,80	2,56
20	13,61	8,72	12,99	11,90	9,98	11,44	2,05
25	10,11	7,58	10,75	10,04	7,78	9,25	1,46
30	7,58	5,44	8,96	7,31	6,20	7,10	1,35
Vr (mL)	6,0	6,6	7,5	6,9	6,1	6,62	0,61
Ajuste no lineal							
Kap (h ⁻¹)	3,30	3,34	2,69	3,26	3,49	3,22	0,31
Ao (µg/mL)	30,91	28,01	29,32	31,38	24,95	28,91	2,59

Tabla 4-44. Concentración de Zolpidem remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Zolpidem a una concentración de 40 µg/mL (52 µM) en presencia de PEG6000 a concentración de 1 mg/L.

Concentración remanente de Zolpidem en lumen intestinal							
Concentración inicial perfundida: Zolpidem (40 µg/mL)+TiO ₂ (5 mg/L)							
Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	27,92	25,48	26,81	28,51	27,60	27,26	1,17
10	23,95	21,27	23,05	23,46	21,43	22,63	1,21
15	18,64	17,49	18,91	18,42	17,29	18,15	0,72
20	15,77	14,50	15,45	13,72	12,89	14,47	1,19
25	13,12	12,85	14,06	11,76	11,32	12,62	1,10
30	10,96	10,20	11,31	8,85	8,59	9,98	1,22
Vr (mL)	5,5	4,6	5,6	4,5	4,4	4,92	0,58
Ajuste no lineal							
Kap (h ⁻¹)	3,13	3,28	2,88	3,88	3,99	3,43	0,48
Ao (µg/mL)	34,54	31,20	32,43	37,06	35,59	34,16	2,36

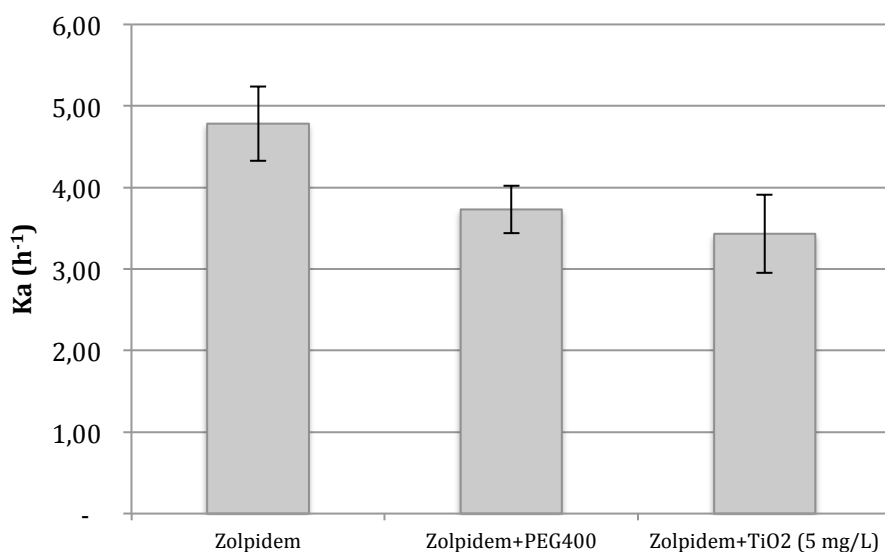
Tabla 4-45. Concentración de Zolpidem remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Zolpidem a una concentración de 40 µg/mL (52 µM) en presencia de TiO₂ a concentración de 5 mg/L.

Concentración remanente de Zolpidem en lumen intestinal							
Concentración inicial perfundida: Zolpidem (40 µg/mL)+TiO ₂ (9 mg/L)							
Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	27,93	27,45	29,36	28,94	31,50	29,04	1,58
10	21,83	21,69	21,62	24,18	23,82	22,63	1,26
15	15,55	16,80	17,86	20,73	17,29	17,65	1,92
20	11,72	13,32	14,11	17,54	12,45	13,83	2,26
25	9,47	10,23	11,33	15,60	10,31	11,39	2,45
30	6,30	7,64	8,72	13,13	6,48	8,45	2,79
Vr (mL)	6,0	5,9	5,0	4,2	5,8	5,38	0,77
Ajuste no lineal							
Kap (h ⁻¹)	4,11	3,68	3,88	3,16	4,13	3,79	0,40
Ao (µg/mL)	37,80	35,64	37,44	34,69	42,94	37,70	3,20

Tabla 4-46. Concentración de Zolpidem remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Zolpidem a una concentración de 40 µg/mL (52 µM) en presencia de TiO₂ a concentración de 9 mg/L.

Concentración remanente de Zolpidem en lumen intestinal							
Concentración inicial perfundida: Zolpidem (40 µg/mL)+Talco (6 mg/L)							
Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	26,57	25,41	23,60	24,89	19,56	24,01	2,70
10	21,10	20,06	17,41	18,83	14,91	18,46	2,42
15	16,65	15,87	15,18	16,51	13,10	15,46	1,44
20	11,81	12,14	12,43	10,97	7,67	11,00	1,94
25	10,32	10,21	10,06	9,69	7,28	9,51	1,27
30	6,19	7,78	6,88	6,93	3,74	6,30	1,54
Vr (mL)	6,0	6,3	6,9	7,3	6,8	6,66	0,51
Ajuste no lineal							
Kap (h ⁻¹)	3,79	3,45	3,13	3,31	3,78	3,49	0,29
Ao (µg/mL)	35,12	32,40	29,04	31,86	26,23	30,93	3,40

Tabla 4-47. Concentración de Zolpidem remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Zolpidem a una concentración de 40 µg/mL (52 µM) en presencia de Talco a concentración de 6 mg/L.



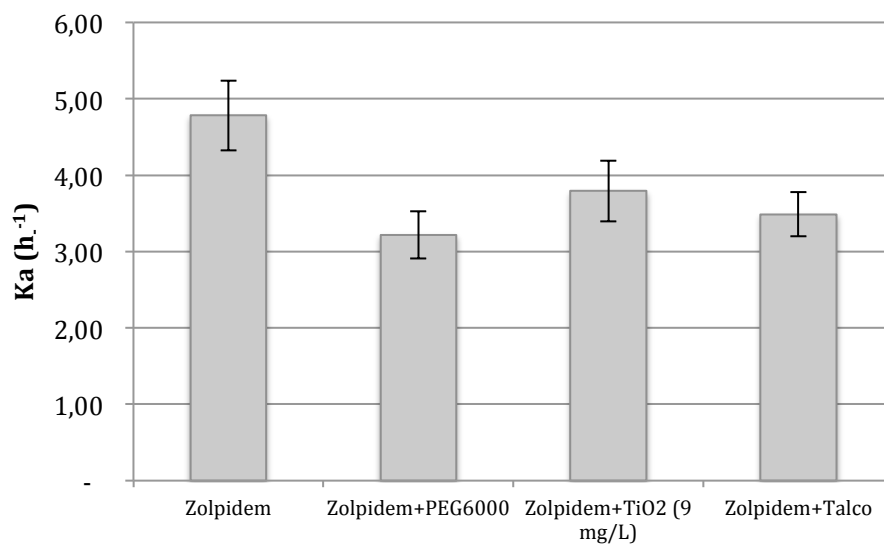
Gráfica 4-18. Representación gráfica comparativa de las constantes de absorción de Zolpidem y de Zolpidem más PEG400 y TiO₂ (excipientes presentes en el producto de Referencia).

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	0,01	0,99	NS
ANOVA		3·10 ⁻³	S

Tabla 4-48. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las constantes de absorción en el modelo in situ de Zolpidem, Zolpidem+PEG400 y Zolpidem+TiO₂ (5 mg/L).

Prueba de comparación múltiple de Scheffé		
	Zolpidem	Zolpidem+PEG400
Zolpidem	-	-
Zolpidem+PEG400	NS	-
Zolpidem+TiO ₂ (5 mg/L)	S	NS

Tabla 4-49. Resultado de la comparación múltiple de las constantes de absorción en el modelo in situ de Zolpidem, Zolpidem+PEG400 y Zolpidem+TiO₂ (5 mg/L).



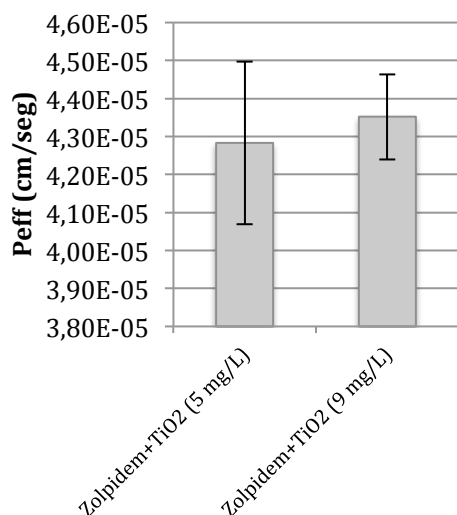
Gráfica 4-19. Representación gráfica comparativa de las constantes de absorción de Zolpidem y de Zolpidem más PEG6000, TiO₂ y Talco (excipientes presentes en la formulación BE-B).

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	1,60	0,36	NS
ANOVA		0,00	S

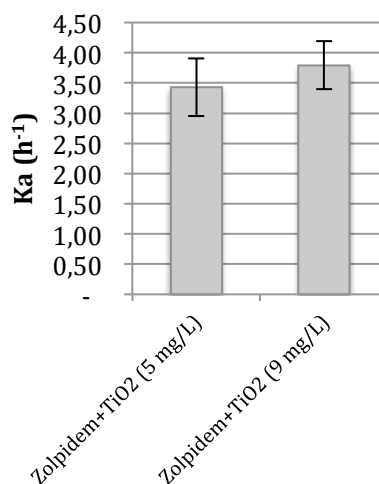
Tabla 4-50. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las constantes de absorción en el modelo in situ de Zolpidem, Zolpidem+PEG6000, Zolpidem+TiO₂ (9 mg/L) y Zolpidem+Talco.

Prueba de comparación múltiple de Scheffé			
	Zolpidem	Zolpidem+PEG6000	Zolpidem+TiO ₂ (9 mg/L)
Zolpidem	-	-	-
Zolpidem+PEG6000	S	-	-
Zolpidem+TiO ₂ (9 mg/L)	S	NS	-
Zolpidem+Talco	S	NS	NS

Tabla 4-51. Resultado de la comparación múltiple de las constantes de absorción en el modelo in situ de Zolpidem, Zolpidem+PEG6000, Zolpidem+TiO₂ (9 mg/L) y Zolpidem+Talco.



Gráfica 4-20. Representación gráfica comparativa de la permeabilidad de Zolpidem con dos concentraciones de TiO_2 .



Gráfica 4-21. Representación gráfica comparativa de la constante de absorción de Zolpidem con dos concentraciones de TiO_2 .

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	1,340	0,31	NS
ANOVA		0,65	NS

Tabla 4-52. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades de Zolpidem+ TiO_2 (5 mg/L) y Zolpidem+ TiO_2 (9 mg/L).

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	0,70	0,43	NS
ANOVA		0,23	NS

Tabla 4-53. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las constantes de absorción en el modelo *in situ* de Zolpidem+ TiO_2 (5 mg/L) y Zolpidem+ TiO_2 (9 mg/L).

Las tablas que se muestran a continuación resumen los resultados de los experimentos realizados en el modelo *in situ*, con soluciones de Metoprolol que contenían los excipientes estudiados de las formulaciones de Zolpidem.

Concentración remanente de Metoprolol en lumen intestinal						
Concentración inicial perfundida: 6,8 µg/mL+TiO ₂ (9 mg/L)						
Volumen inicial perfundido: 10 mL						
Tiempo (minutos)	Animales				Promedio	± DE
	1	2	3	4		
5	5,22	4,24	5,52	4,51	4,87	0,60
10	4,60	4,69	5,18	4,36	4,71	0,34
15	4,07	3,57	4,74	3,86	4,06	0,50
20	3,97	3,86	4,04	3,81	3,92	0,11
25	3,58	3,70	3,67	3,21	3,54	0,23
30	3,57	3,38	3,38	3,20	3,38	0,15
Vr (mL)	5,5	5,5	4,2	4,2	4,85	0,75
Ajuste no lineal						
Kap (h ⁻¹)	1,96	1,75	2,41	2,16	2,07	0,28
Ao (µg/mL)	5,72	5,24	6,36	5,09	5,60	0,57

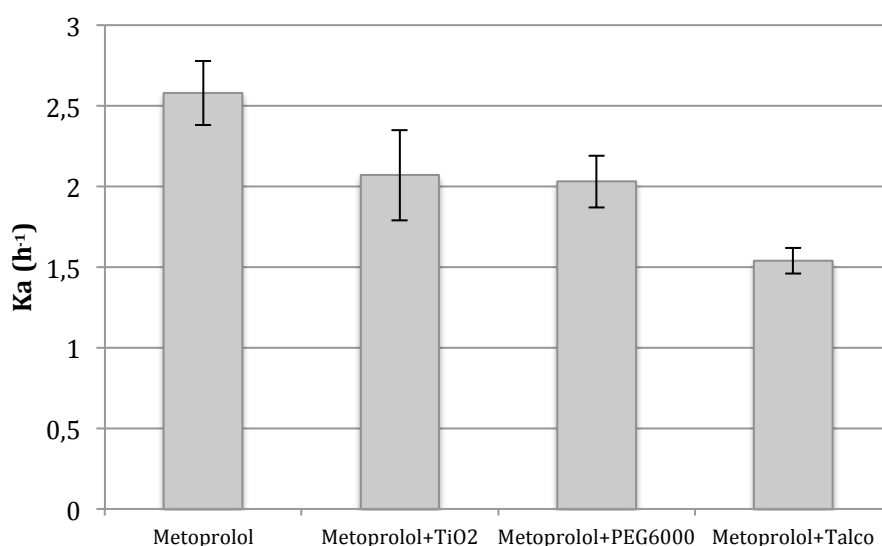
Tabla 4-54. Concentración de Metoprolol remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Metoprolol a una concentración de 6,8 µg/mL (100 µM) en presencia de TiO₂ a concentración de 9 mg/L.

Concentración remanente de Metoprolol en lumen intestinal						
Concentración inicial perfundida: 6,8 µg/mL+PEG6000 (1 mg/L)						
Volumen inicial perfundido: 10 mL						
Tiempo (minutos)	Animales				Promedio	± DE
	1	2	3	4		
5	4,73	5,17	5,57	5,36	5,21	0,36
10	5,02	5,19	4,98	5,07	5,07	0,09
15	4,47	4,12	4,55	4,55	4,42	0,21
20	3,94	4,76	4,66	4,75	4,53	0,39
25	3,39	3,45	3,67	3,77	3,57	0,18
30	3,39	4,53	3,92	3,88	3,93	0,47
Vr (mL)	4,0	4,4	5,0	4,3	3,63	0,84
Ajuste no lineal						
Kap (h ⁻¹)	2,24	1,88	1,94	2,06	2,03	0,16
Ao (µg/mL)	5,59	5,66	6,07	5,95	5,82	0,23

Tabla 4-55. Concentración de Metoprolol remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Metoprolol a una concentración de 6,8 µg/mL (100 µM) en presencia de PEG6000 a concentración de 1 mg/L.

Concentración remanente de Metoprolol en lumen intestinal						
Concentración inicial perfundida: 6,8 µg/mL+Talco (6 mg/L)						
Volumen inicial perfundido: 10 mL						
Tiempo (minutos)	Animales				Promedio	± DE
	1	2	3	4		
5	5,39	4,84	5,24	5,66	5,28	0,34
10	5,51	4,82	5,19	5,30	5,21	0,29
15	4,56	4,31	4,63	5,24	4,69	0,39
20	5,25	4,03	4,34	4,78	4,60	0,53
25	3,85	3,91	4,41	4,42	4,15	0,31
30	4,18	3,87	4,23	4,58	4,22	0,29
Vr (mL)	5,4	5,5	5,5	5,0	5,35	0,24
Ajuste no lineal						
Kap (h ⁻¹)	1,59	1,50	1,44	1,61	1,54	0,08
Ao (µg/mL)	5,98	5,26	5,63	6,07	5,74	0,37

Tabla 4-56. Concentración de Metoprolol remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Metoprolol a una concentración de 6,8 µg/mL (100 µM) en presencia de Talco a concentración de 6 mg/L.



Gráfica 4-22. Representación gráfica comparativa de las constantes de absorción de Metoprolol y de Metoprolol más TiO₂, PEG6000 y Talco (excipientes presentes en la formulación BE-B).

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	3,38	0,054	NS
ANOVA		0,002	S

Tabla 4-57. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las constantes de absorción en el modelo in situ de Metoprolol, Zolpidem+PEG6000, Metoprolol+TiO₂ (9 mg/L) y Metoprolol+Talco.

Prueba de comparación múltiple de Scheffé			
	Metoprolol	Metoprolol+PEG6000	Metoprolol+TiO ₂ (9 mg/L)
Metoprolol	-	-	-
Metoprolol+PEG6000	NS	-	-
Metoprolol+TiO ₂ (9 mg/L)	NS	NS	-
Metoprolol+Talco	S	NS	NS

Tabla 4-58. Resultado de la comparación múltiple de permeabilidades de las constantes de absorción en el modelo in situ de Metoprolol, Zolpidem+PEG6000, Metoprolol+TiO₂ (9 mg/L) y Metoprolol+Talco.

B. Pravastatina

1. Validación de los métodos analíticos

1.1. Método cromatográfico

Se realizaron estudios de linealidad a las curvas de calibración utilizadas para valorar las muestras de Pravastatina. En la tabla 4-59 se muestra el coeficiente de determinación “r²” de las curvas de calibración, que siempre fue superior a 0,990. En la tabla también se detallan los errores estándar (EE) de la ordenada en el origen y de la pendiente de la recta.

Pravastatina (µM)	Ordenada en el origen	EE	Pendiente	EE	r ²
0,1-10	-519,08	715,01	21249,90	137,48	0,9997
1-100	-14947,72	7866,08	22448,21	151,24	0,9997
10-1000	90073,30	98476,97	21173,35	189,34	0,9995

Tabla 4-59. Ensayo de linealidad de las curvas de calibración empleados para la valoración de las muestras por HPLC a las distintas concentraciones de Pravastatina ensayadas.

En la tabla 4-60 se detallan los resultados de los ensayos de precisión y exactitud realizados sobre patrones de concentración conocida a través del error absoluto (Ea) y error relativo (Er %). En la tabla 4-61 se presentan los límites de detección y cuantificación.

Recta	0,1-10	1-100	10-1000
Patrón 5%			
C _{Teórica}	0,5	5,00	50,00
C _{Experimental}	0,49	5,19	45,54
CV (%)	3,84	0,82	0,29
Ea	-1,24·10 ⁻²	0,19	-4,46
Er (%)	-2,47	3,88	-8,92
Patrón 10%			
C _{Teórica}	1,00	10,00	100,00
C _{Experimental}	1,06	10,33	101,17
CV (%)	2,66	0,45	1,53
Ea	5,93·10 ⁻²	0,33	1,17
Er (%)	5,93	3,30	1,17
Patrón 70%			
C _{Teórica}	7,00	70,00	700,00
C _{Experimental}	7,00	69,45	712,31
CV (%)	1,24	0,86	0,42
Ea	-3,84·10 ⁻³	-0,55	12,31
Er (%)	-0,05	-0,79	1,76

Tabla 4-60. Ensayo de exactitud y precisión de las curvas de calibración empleadas para la valoración de las muestras a distintas concentraciones de Pravastatina ensayadas.

Pravastatina (μM)	Límite de detección (μM)	Límite de cuantificación (μM)
0,1-10	0,11	0,34
1-100	1,16	3,50
10-1000	15,35	46,51

Tabla 4-61. Límites de detección y cuantificación en de la técnica de valoración empleada para determinar la concentración de Pravastatina en las muestras.

1.2. Método espectrofotométrico

Se validaron las concentraciones obtenidas durante el proceso de valoración de las muestras obtenidas en los perfiles de disolución. Para ello se estudió la linealidad de las curvas de calibración utilizadas para valorar las muestras a los pH 1,2; 4,5 y 6,8 cuyo rango de concentración fue entre $8,85 \cdot 10^{-4}$ y $1,77 \cdot 10^{-2}$ mg/mL. En la tabla 4-62 se pueden observar el coeficiente de determinación "r²" de las curvas de calibración, que siempre fue superior a 0,990. En la tabla también se detallan los errores estándar (EE) de la ordenada en el origen y de la pendiente de la recta.

pH	Ordenada en el origen	EE	Pendiente	EE	r ²
1,2	$1,10 \cdot 10^{-2}$	$3,10 \cdot 10^{-3}$	35,65	0,28	0,9998
4,5	$-4,88 \cdot 10^{-3}$	$5,89 \cdot 10^{-3}$	45,78	0,55	0,9991
6,8	$4,92 \cdot 10^{-4}$	$3,38 \cdot 10^{-3}$	47,19	0,29	0,9998

Tabla 4-62. Ensayo de linealidad de las curvas de calibración empleados para la valoración de las muestras de perfiles de disolución de Pravastatina por espectrofotometría a los distintos pH estudiados.

En la tabla 4-63 se detallan los resultados de los ensayos de precisión y exactitud realizados sobre patrones de concentración conocida a través del error absoluto (Ea) y error relativo (Er %).

Recta	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
Patrón 10%			
C _{Teórica}	$1,80 \cdot 10^{-3}$	$1,80 \cdot 10^{-3}$	$1,80 \cdot 10^{-3}$
C _{Experimental}	$1,87 \cdot 10^{-3}$	$1,72 \cdot 10^{-3}$	$1,75 \cdot 10^{-3}$
CV (%)	1,58	0,40	0,81
Ea	$3,89 \cdot 10^{-2}$	$-7,69 \cdot 10^{-5}$	$-5,17 \cdot 10^{-5}$
Er (%)	3,89	-4,27	-2,87
Patrón 50%			
C _{Teórica}	$8,90 \cdot 10^{-3}$	$8,90 \cdot 10^{-3}$	$8,90 \cdot 10^{-3}$
C _{Experimental}	$8,58 \cdot 10^{-3}$	$8,95 \cdot 10^{-3}$	$8,78 \cdot 10^{-3}$
CV (%)	0,76	0,34	0,89
Ea	$-3,16 \cdot 10^{-4}$	$5,38 \cdot 10^{-5}$	$-1,17 \cdot 10^{-4}$
Er (%)	-3,55	0,60	-1,31
Patrón 80%			
C _{Teórica}	$1,42 \cdot 10^{-2}$	$1,42 \cdot 10^{-2}$	$1,42 \cdot 10^{-2}$
C _{Experimental}	$1,43 \cdot 10^{-2}$	$1,42 \cdot 10^{-2}$	$1,41 \cdot 10^{-2}$
CV (%)	0,64	0,17	0,83
Ea	$1,07 \cdot 10^{-4}$	$-3,35 \cdot 10^{-6}$	$-1,41 \cdot 10^{-4}$
Er (%)	0,75	-0,02	-0,99

Tabla 4-63. Ensayo de exactitud y precisión de las curvas de calibración empleadas para la valoración de las muestras de perfiles de disolución de Pravastatina a distintos pH.

2. Concentración de saturación

En las tablas 4-64, 4-65 y 4-66 se pueden observar las concentraciones en condición de saturación de Pravastatina sódica, obtenidas en forma experimental a los pH 1,2; 4,5 y 6,8; respectivamente. Los datos se muestran en forma individual y en promedio. En la gráfica 4-23 se muestra el perfil de solubilidad-pH.

Tiempo (h)	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
4	545,85	546,03	0,26	0,05	$3,20 \cdot 10^{-04}$
	546,21				
8	572,77	571,32	22,17	3,88	
	548,53				
	592,82				
18	474,14	457,64	14,38	3,14	
	451,02				
	447,77				
24	432,67	439,80	17,42	3,96	
	427,08				
	459,66				
		499,86	61,46	12,30	

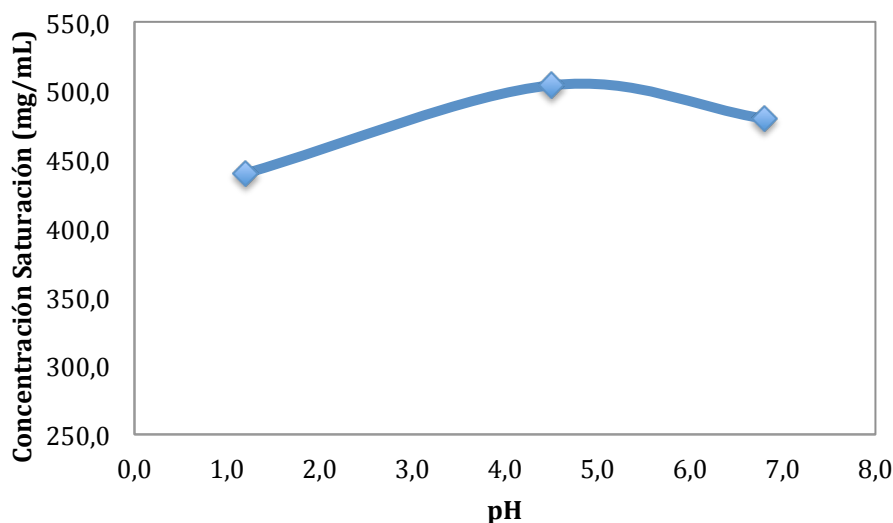
Tabla 4-64. Concentración de saturación de Pravastatina a pH 1,2.

t (h)	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
4	429,91	425,96	9,12	2,14	$3,21 \cdot 10^{-04}$
	415,53				
	432,44				
8	571,17	572,54	1,94	0,34	
	573,92				
18	494,13	513,37	19,15	3,73	
	532,42				
	513,57				
24	477,37	503,87	24,20	4,80	
	509,46				
	524,78				
		497,70	54,38	10,93	

Tabla 4-65. Concentración de saturación de Pravastatina a pH 4,5.

Tiempo (h)	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
4	480,07	443,87	57,68	13,00	$3,24 \cdot 10^{-04}$
	377,35				
	474,17				
8	590,88	590,88			
18	528,10	525,65	3,71	0,71	
	521,38				
	527,48				
24	489,34	479,58	17,39	3,63	
	489,90				
	459,50				
		493,82	55,62	11,26	

Tabla 4-66. Concentración de saturación de Pravastatina a pH 6,8.



Gráfica 4-23. Perfil de solubilidad en función del pH de Pravastatina a 37 °C.

3. Coeficiente de reparto

En la tabla 4-67 se especifican los valores individuales y promedios de reparto ($D_{6,8}$) de Pravastatina sódica en n-octanol y solución acuosa tamponada a pH 6,8.

Tiempo (h)	D solución 0,45 mg/mL	D solución 0,16 mg/mL	Promedio	Desviación estándar	CV(%)	Log $D_{6,8}$
1	0,75	0,64				
1	0,73	0,61				
2	0,76	0,63				
4	0,73	0,64	0,70	0,07	9,79	-0,16
4	0,78	0,63				
24	0,79	0,64				
24	0,78	0,65				

Tabla 4-67. Coeficientes de reparto ($D_{6,8}$) en n-octanol de Pravastatina a partir de dos concentraciones de solución acuosa.

4. Ensayos *in vitro* en células Caco-2 para determinar la permeabilidad de Pravastatina

A continuación se muestran las tablas con las concentraciones experimentales obtenidas en el compartimiento receptor, de los estudios de soluciones de Pravastatina a diferentes concentraciones. Para la estimación de la

permeabilidad se ha utilizado en todos los casos la aproximación no lineal (ecuación 3-5).

Pravastatina 1000 μM			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,28	0,27	0,27
30	0,26	0,29	0,28
60	0,25	0,33	0,37
90	0,32	0,36	0,38
Pe _{ff} (cm/s)	$3,02 \cdot 10^{-07}$	$4,83 \cdot 10^{-07}$	$5,70 \cdot 10^{-07}$
Pe _{ff+DE} (cm/s)	$4,51 \cdot 10^{-07} + 1,37 \cdot 10^{-07}$		

Tabla 4-68. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 1000 μM en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 500 μM			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,12	0,11	0,13
30	0,17	0,16	0,19
60	0,24	0,22	0,26
90	0,28	0,28	0,29
Pe _{ff} (cm/s)	$3,12 \cdot 10^{-07}$	$3,06 \cdot 10^{-07}$	$3,17 \cdot 10^{-07}$
Pe _{ff+DE} (cm/s)	$3,12 \cdot 10^{-07} + 5,59 \cdot 10^{-09}$		

Tabla 4-69. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 500 μM en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 358 μM			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,77	0,79	0,80
30	0,90	0,81	1,07
60	0,99	1,09	1,35
90	1,13	1,23	1,41
Pe _{ff} (cm/s)	$1,62 \cdot 10^{-07}$	$2,07 \cdot 10^{-07}$	$2,56 \cdot 10^{-07}$
Pe _{ff+DE} (cm/s)	$2,08 \cdot 10^{-07} + 4,71 \cdot 10^{-08}$		

Tabla 4-70. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 358 μM en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 100 μM			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,76	0,81	0,83
30	0,92	0,81	1,05
60	0,98	1,09	1,31
90	1,12	1,20	1,40
Peff (cm/s)	$1,57 \cdot 10^{-07}$	$1,94 \cdot 10^{-07}$	$2,45 \cdot 10^{-07}$
Peff+DE (cm/s)	$1,99 \cdot 10^{-07} + 4,39 \cdot 10^{-08}$		

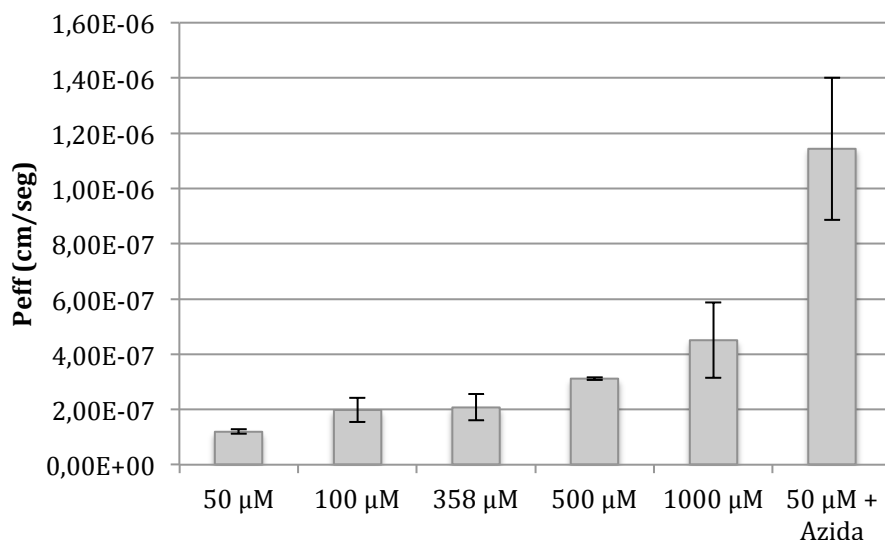
Tabla 4-71. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 100 μM en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 50 μM			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,56	0,64	0,58
30	0,87	0,84	0,77
60	0,98	1,13	0,94
90	1,22	1,30	1,17
Peff (cm/s)	$1,18 \cdot 10^{-07}$	$1,30 \cdot 10^{-07}$	$1,13 \cdot 10^{-07}$
Peff+DE (cm/s)	$1,20 \cdot 10^{-07} + 9,03 \cdot 10^{-09}$		

Tabla 4-72. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 50 μM en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 50 μM Azida 1 mM			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0	0	0
30	0,29	0,38	0,19
60	0,29	0,38	0,20
90	0,39	0,31	0,47
Peff (cm/s)	$1,14 \cdot 10^{-06}$	$8,90 \cdot 10^{-07}$	$1,41 \cdot 10^{-06}$
Peff+DE (cm/s)	$1,14 \cdot 10^{-06} + 2,58 \cdot 10^{-07}$		

Tabla 4-73. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 50 μM en presencia de Azida sódica 1 mM en la línea celular Caco-2.



Gráfica 4-24. Representación gráfica de las permeabilidades de las distintas concentraciones de Pravastatina y de Pravastatina en presencia de Azida Sódica.

A continuación se detallan los análisis estadísticos de comparación de las permeabilidades obtenidas para las situaciones ensayadas.

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
		3,119	0,07
ANOVA		0,00	S

Tabla 4-74. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades apical-basolateral de las distintas concentraciones de Pravastatina (μM).

Prueba de comparación múltiple de Scheffé					
Pravastatina	1000 μM	500 μM	358 μM	100 μM	50 μM
1000 μM	-	-	-	-	-
500 μM	NS	-	-	-	-
358 μM	S	NS	-	-	-
100 μM	S	NS	NS	-	-
50 μM	S	S	S	S	-
50 μM + Azida	S	S	S	S	S

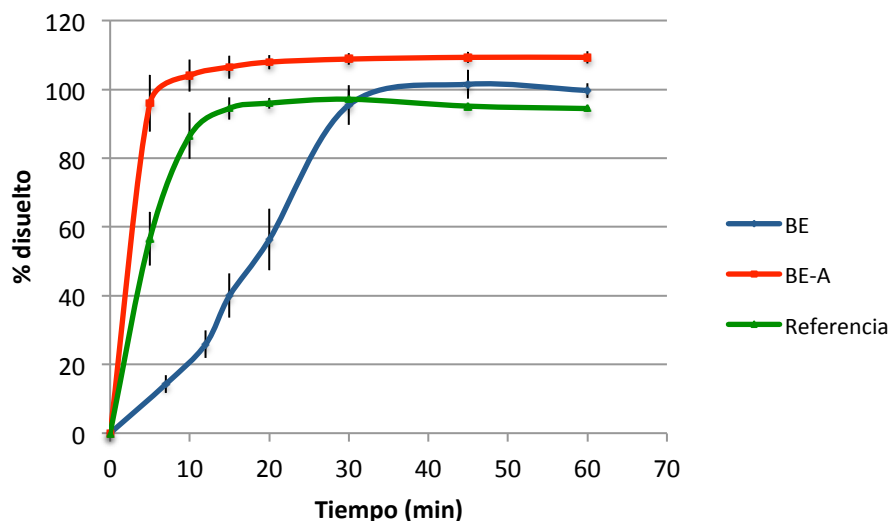
Tabla 4-75. Resultado de la comparación múltiple de permeabilidades apical-basolateral de Pravastatina a las distintas concentraciones (μM) ensayadas.

5. Perfiles de disolución

En las tablas 4-76, 4-77 y 4-78 se resumen los valores promedio de porcentaje disuelto de Pravastatina en función del tiempo desde el producto de referencia y las formulaciones BE-A y BE en los medios recomendados por la guía de bioexenciones de la EMA. Estos medios fueron preparados según lo establecido en la Ph.Eur.. Los perfiles de disolución se pueden observar en las gráficas 4-25; 4-26 y 4-27.

pH 1,2. Tampón 50 mM-Cloruro. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-A		BE	
	Media + DE	CV (%)	Media + DE	CV (%)	Media + DE	CV (%)
5	56,59 ± 7,83	13,84	95,95 ± 8,23	8,58	14,26 ± 2,55	17,88
10	86,47 ± 6,70	7,74	104,02 ± 4,67	4,49	25,85 ± 3,98	15,38
15	94,50 ± 3,28	3,47	106,50 ± 3,37	3,17	39,99 ± 6,39	15,98
20	95,98 ± 1,58	1,65	107,94 ± 2,09	1,94	56,30 ± 8,92	15,85
30	97,15 ± 2,85	2,93	108,82 ± 1,69	1,56	95,44 ± 5,75	6,02
45	95,13 ± 0,80	0,84	109,32 ± 1,63	1,49	101,49 ± 4,22	4,16
60	94,43 ± 0,93	1,02	109,32 ± 1,77	1,62	99,67 ± 2,13	2,14

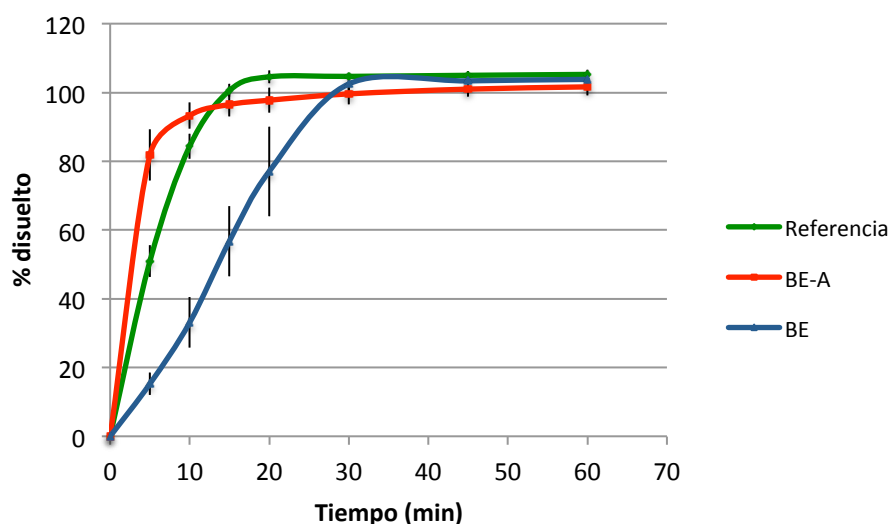
Tabla 4-76. Porcentajes disueltos de Pravastatina en función del tiempo en medio tampón pH 1,2; 50 mM de Cloruro de Sodio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-25. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-A y BE de Pravastatina a pH 1,2; tampón 50 mM (Cloruro). (n=6).

pH 4,5. Tampón 36,5 mM-Acetato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-A		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	50,94 \pm 4,60	9,02	81,84 \pm 7,47	9,13	15,29 \pm 3,25	21,28
10	84,39 \pm 3,66	4,33	93,31 \pm 3,84	4,12	33,10 \pm 7,37	22,28
15	100,59 \pm 1,85	1,84	96,51 \pm 3,45	3,58	56,79 \pm 10,24	18,03
20	104,57 \pm 1,88	1,80	97,76 \pm 3,65	3,73	77,06 \pm 13,03	16,91
30	104,69 \pm 1,08	1,04	99,60 \pm 3,07	3,08	102,50 \pm 2,22	2,17
45	105,01 \pm 1,25	1,19	100,99 \pm 2,26	2,23	103,39 \pm 2,13	2,06
60	105,27 \pm 1,41	1,34	101,64 \pm 2,53	2,49	103,82 \pm 1,57	1,51

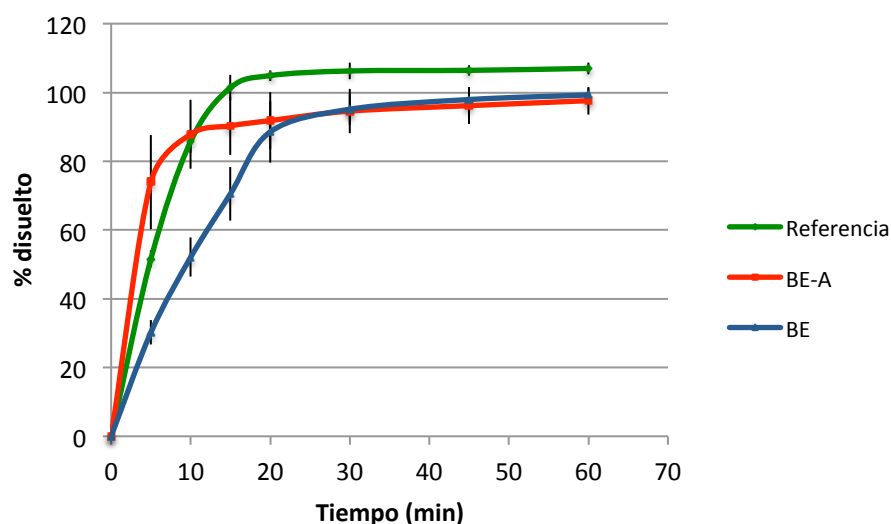
Tabla 4-77. Porcentajes disueltos de Pravastatina en función del tiempo en medio tampón pH 4,5; 36,5 mM de Acetato de Sodio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-26. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-A y BE de Pravastatina a pH 4,5; tampón 36,5 mM (Acetato). (n=6).

pH 6,8. Tampón 50 mM-Fosfato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-A		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	51,59 \pm 2,43	4,71	73,97 \pm 13,71	18,53	30,22 \pm 3,51	11,62
10	85,80 \pm 3,31	3,86	87,86 \pm 10,01	11,39	52,08 \pm 5,69	10,93
15	101,41 \pm 3,70	3,65	90,32 \pm 8,51	9,42	70,54 \pm 7,78	11,04
20	104,93 \pm 1,56	1,49	91,84 \pm 8,28	9,01	88,55 \pm 8,92	10,07
30	106,27 \pm 2,37	2,23	94,59 \pm 6,44	6,81	95,14 \pm 4,60	4,83
45	106,45 \pm 1,56	1,47	96,18 \pm 5,33	5,54	97,96 \pm 2,82	2,88
60	107,01 \pm 1,72	1,60	97,63 \pm 4,05	4,15	99,29 \pm 1,96	1,97

Tabla 4-78. Porcentajes disueltos de Pravastatina en función del tiempo en medio tampón pH 6,8; 50 mM de Fosfato de diácido de Potasio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).

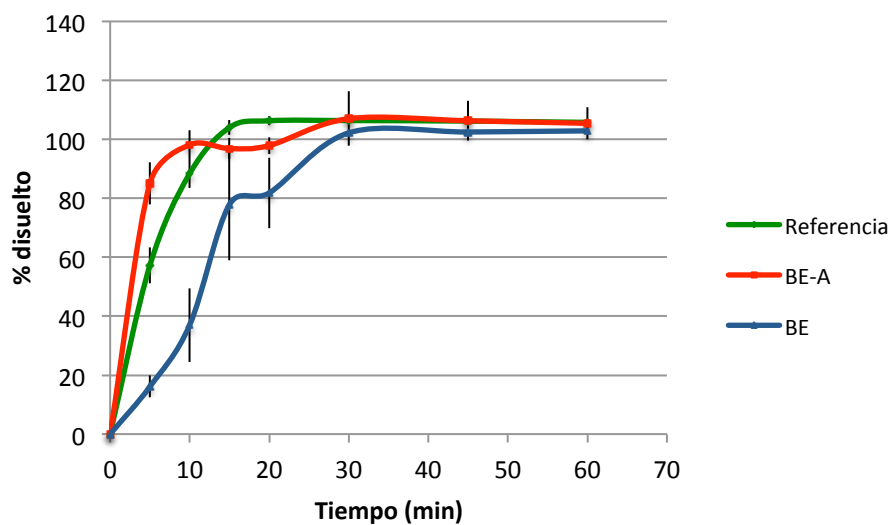


Gráfica 4-27. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-A y BE de Pravastatina a pH 6,8; tampón 50 mM (Fosfato). (n=6).

En las tablas 4-79 a 4-81 se presentan los resultados medios del porcentaje de Pravastatina disueltos desde las tres formulaciones ensayadas en medios a los pH 2,0; 6,0 y 6,5. Estos medios fueron preparados según lo descrito en la Ph.Eur.. Las gráficas 4-28; 4-29 y 4-30 muestran el porcentaje disuelto en función del tiempo correspondiente a los medios antes mencionados.

pH 2,0. Tampón 50 mM-Cloruro. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-A		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	57,26 \pm 6,10	10,66	85,08 \pm 7,12	8,37	16,11 \pm 3,70	22,94
10	88,43 \pm 4,90	5,53	98,17 \pm 4,91	5,01	37,00 \pm 12,53	33,85
15	104,03 \pm 2,45	2,36	96,90 \pm 3,62	3,73	77,89 \pm 18,92	24,29
20	106,34 \pm 1,57	1,47	97,92 \pm 2,85	2,91	81,85 \pm 11,96	14,61
30	106,40 \pm 1,09	1,02	107,04 \pm 9,23	8,62	102,24 \pm 0,98	0,96
45	106,21 \pm 0,94	0,88	106,33 \pm 6,74	6,33	102,51 \pm 1,08	1,05
60	105,79 \pm 1,03	0,97	105,46 \pm 5,39	5,11	102,90 \pm 1,31	1,27

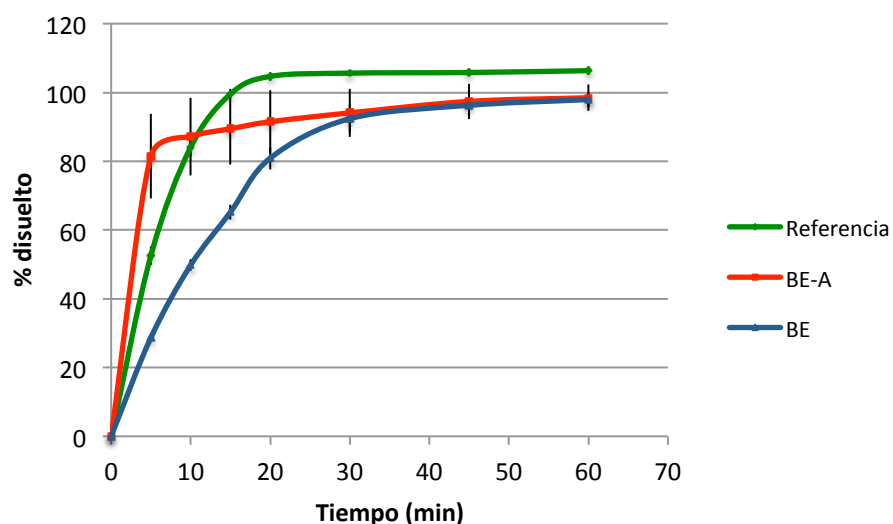
Tabla 4-79. Porcentajes disueltos de Pravastatina en función del tiempo en medio tampón pH 2,0; 50 mM de Cloruro de Sodio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-28. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-A y BE de Pravastatina a pH 2,0; tampón 50 mM (Cloruro). (n=6).

pH 6,0. Tampón 50 mM-Fosfato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-A		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	52,57 \pm 2,73	5,18	81,52 \pm 12,29	15,08	28,71 \pm 0,79	2,77
10	84,11 \pm 2,79	3,32	87,20 \pm 11,32	12,98	49,80 \pm 1,74	3,49
15	99,54 \pm 1,41	1,41	89,45 \pm 10,39	11,61	65,21 \pm 2,13	3,27
20	104,70 \pm 1,24	1,19	91,50 \pm 9,08	9,92	80,92 \pm 3,26	4,03
30	105,63 \pm 0,79	0,75	94,07 \pm 6,97	7,40	92,39 \pm 4,76	4,51
45	105,82 \pm 1,10	1,04	97,41 \pm 5,11	5,25	96,28 \pm 3,10	3,23
60	106,36 \pm 1,26	1,19	98,47 \pm 3,81	3,87	97,89 \pm 2,21	2,26

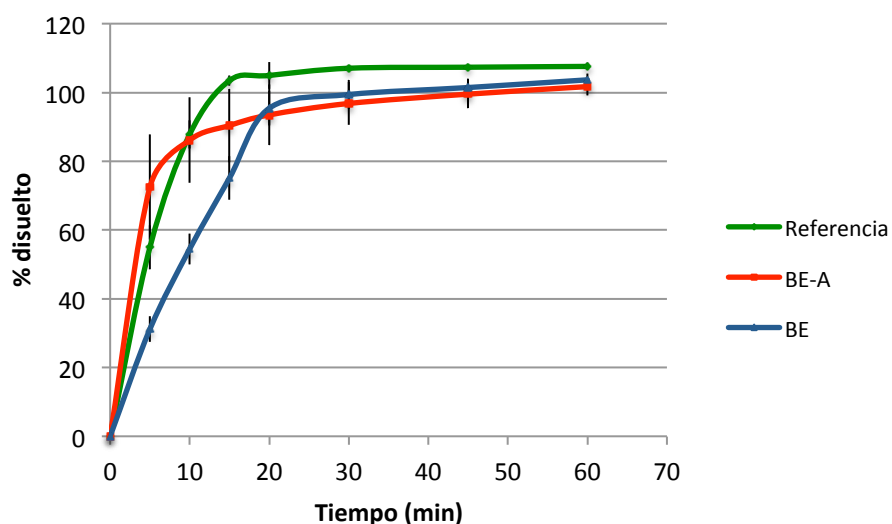
Tabla 4-80. Porcentajes disueltos de Pravastatina en función del tiempo en medio tampón pH 6,0; 50 mM de Fosfato diácido de Potasio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-29. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-A y BE de Pravastatina a pH 6,0; tampón 50 mM (Fosfato). (n=6).

pH 6,5. Tampón 50 mM-Fosfato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-A		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	54,98 \pm 6,39	11,61	72,51 \pm 15,23	21,01	31,17 \pm 3,78	12,12
10	87,84 \pm 4,12	4,69	86,16 \pm 12,41	14,40	54,50 \pm 4,51	8,28
15	103,47 \pm 1,48	1,43	90,41 \pm 10,70	11,83	75,10 \pm 6,34	8,45
20	104,96 \pm 3,88	3,69	93,49 \pm 8,76	9,37	95,43 \pm 5,01	5,25
30	107,06 \pm 0,94	0,88	96,82 \pm 6,21	6,41	99,41 \pm 4,16	4,19
45	107,36 \pm 0,92	0,86	99,53 \pm 4,06	4,08	101,45 \pm 2,63	2,59
60	107,60 \pm 1,03	0,96	101,71 \pm 2,57	2,53	103,58 \pm 1,73	1,68

Tabla 4-81. Porcentajes disueltos de Pravastatina en función del tiempo en medio tampón pH 6,5; 50 mM de Fosfato diácido de Potasio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).

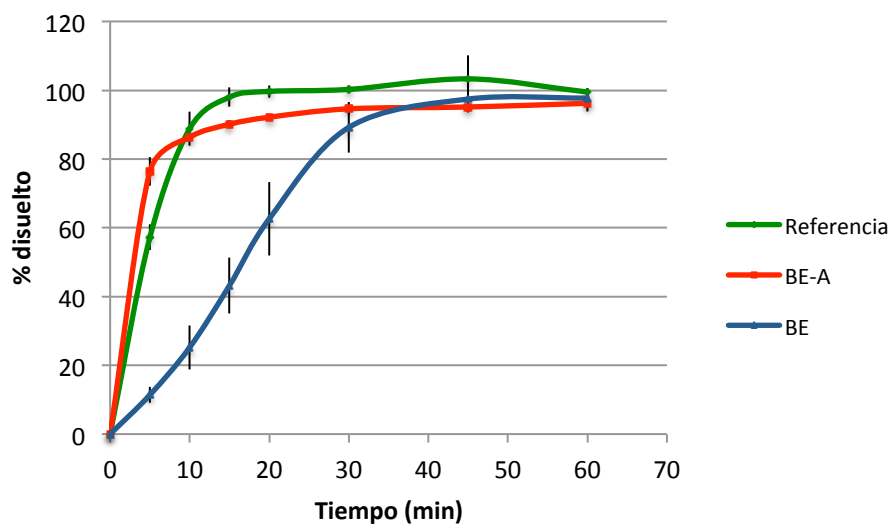


Gráfica 4-30. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-A y BE de Pravastatina a pH 6,5; tampón 50 mM (Fosfato). (n=6).

En las tablas 4-82 a 4-86 se presentan los resultados medios del porcentaje de Pravastatina disueltos de las tres formulaciones ensayadas en medios de disolución a los pH 1,2; 3,0; 6,0; 6,5 y 6,8 de menor concentración iónica que la establecida en la Ph.Eur.. La representación gráfica de estos resultados se muestra en las gráficas 4-31 a 4-35.

pH 1,2. Tampón 5 mM-Cloruro. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-A		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	57,24 \pm 3,73	6,51	76,40 \pm 4,14	5,41	11,41 \pm 2,29	20,07
10	88,83 \pm 4,96	5,58	86,34 \pm 0,65	0,76	25,21 \pm 6,40	25,40
15	98,00 \pm 2,80	2,86	90,12 \pm 1,14	1,27	43,19 \pm 8,11	18,78
20	99,68 \pm 1,80	1,81	92,17 \pm 0,93	1,01	62,60 \pm 10,64	16,99
30	100,26 \pm 1,18	1,17	94,62 \pm 1,60	1,69	89,20 \pm 7,31	8,20
45	103,32 \pm 6,84	6,62	95,14 \pm 1,61	1,69	97,45 \pm 0,70	0,72
60	99,49 \pm 1,22	1,23	96,21 \pm 2,35	2,45	97,74 \pm 0,77	0,79

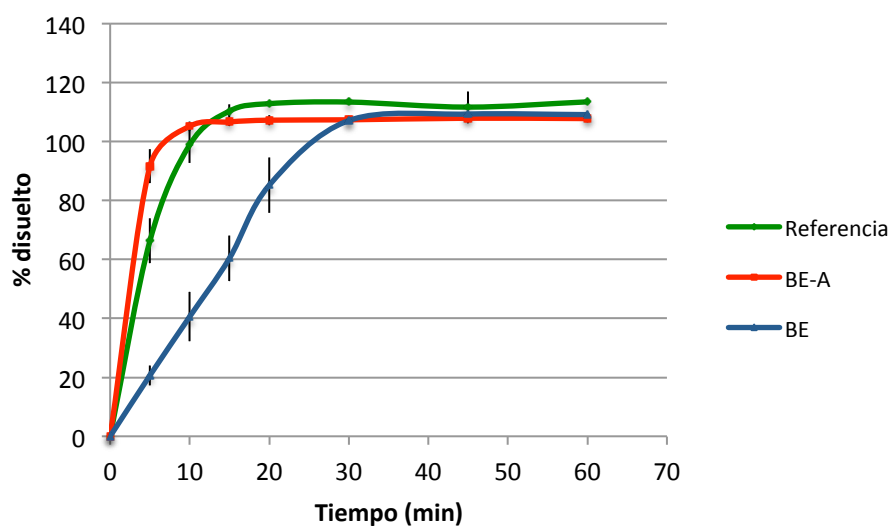
Tabla 4-82. Porcentajes disueltos de Pravastatina en función del tiempo en medio tampón pH 1,2; 5 mM de Cloruro de Sodio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-31. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-A y BE de Pravastatina a pH 1,2; tampón 5 mM (Cloruro). (n=6).

pH 3,0. Tampón 5 mM-Cloruro. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-A		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	66,33 \pm 7,62	11,49	91,62 \pm 5,79	6,32	20,67 \pm 3,45	16,68
10	98,93 \pm 6,16	6,22	105,22 \pm 1,65	1,57	40,60 \pm 8,36	20,58
15	110,36 \pm 2,30	2,09	106,70 \pm 1,39	1,31	60,41 \pm 7,82	12,94
20	112,89 \pm 0,83	0,74	107,29 \pm 1,71	1,59	85,22 \pm 9,38	11,01
30	113,43 \pm 0,62	0,55	107,40 \pm 1,37	1,28	107,16 \pm 0,99	0,92
45	111,71 \pm 5,21	4,66	107,94 \pm 1,70	1,58	109,35 \pm 1,13	1,03
60	113,50 \pm 0,71	0,63	107,82 \pm 1,28	1,18	109,16 \pm 1,04	0,95

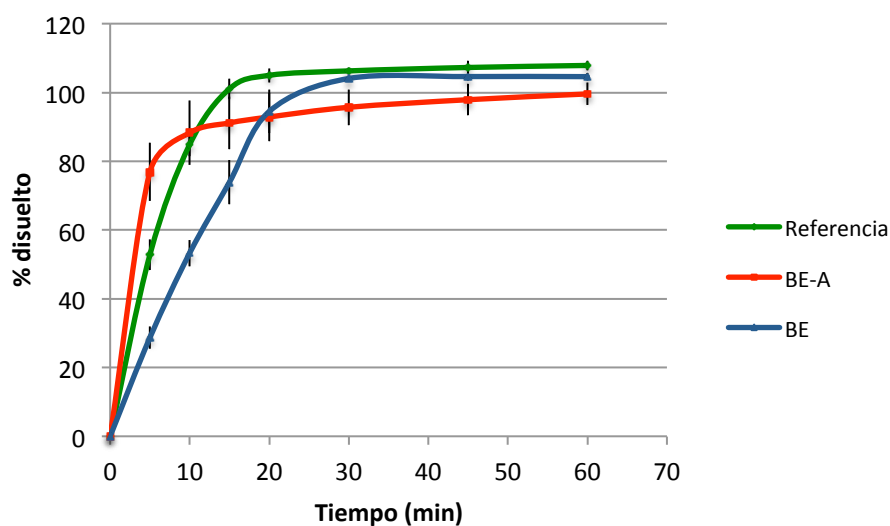
Tabla 4-83. Porcentajes disueltos de Pravastatina en función del tiempo en medio tampón pH 3,0; 5 mM de Cloruro de Sodio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-32. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-A y BE de Pravastatina a pH 3,0; tampón 5 mM (Cloruro). (n=6).

pH 6,0. Tampón 10 mM-Fosfato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-A		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	52,83 \pm 4,45	8,43	76,90 \pm 8,43	10,96	28,70 \pm 3,23	11,24
10	84,91 \pm 3,52	4,14	88,28 \pm 9,33	10,57	53,31 \pm 3,86	7,24
15	101,08 \pm 3,02	2,99	91,16 \pm 7,70	8,45	73,91 \pm 6,47	8,75
20	105,00 \pm 2,08	1,98	92,89 \pm 7,03	7,57	94,50 \pm 6,28	6,65
30	106,29 \pm 0,98	0,92	95,71 \pm 5,20	5,43	104,09 \pm 0,75	0,72
45	107,29 \pm 1,87	1,75	97,91 \pm 4,54	4,63	104,64 \pm 1,13	1,08
60	107,88 \pm 1,42	1,32	99,59 \pm 3,22	3,23	104,62 \pm 1,08	1,04

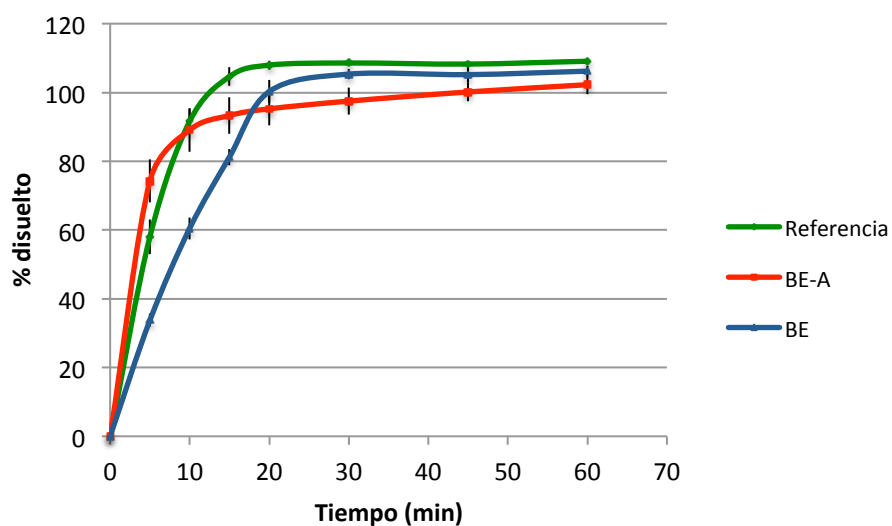
Tabla 4-84. Porcentajes disueltos de Zolpidem en función del tiempo en medio tampón pH 6,0; 10 mM de Fosfato diácido de Potasio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-33. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-A y BE de Pravastatina a pH 6,0; tampón 10 mM (Fosfato). (n=6).

pH 6,5. Tampón 10 mM-Fosfato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-A		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	58,03 \pm 5,04	8,68	74,28 \pm 6,26	8,43	33,75 \pm 1,84	5,44
10	91,64 \pm 3,59	3,91	89,09 \pm 6,38	7,16	60,49 \pm 3,20	5,28
15	104,63 \pm 2,69	2,57	93,32 \pm 5,38	5,77	81,22 \pm 2,40	2,96
20	107,97 \pm 1,26	1,17	95,26 \pm 4,78	5,02	100,28 \pm 3,30	3,29
30	108,59 \pm 0,56	0,52	97,50 \pm 3,90	4,00	105,36 \pm 1,44	1,37
45	108,27 \pm 0,20	0,18	100,16 \pm 2,72	2,72	105,20 \pm 2,31	2,20
60	109,10 \pm 0,85	0,78	102,27 \pm 2,76	2,70	106,22 \pm 1,60	1,51

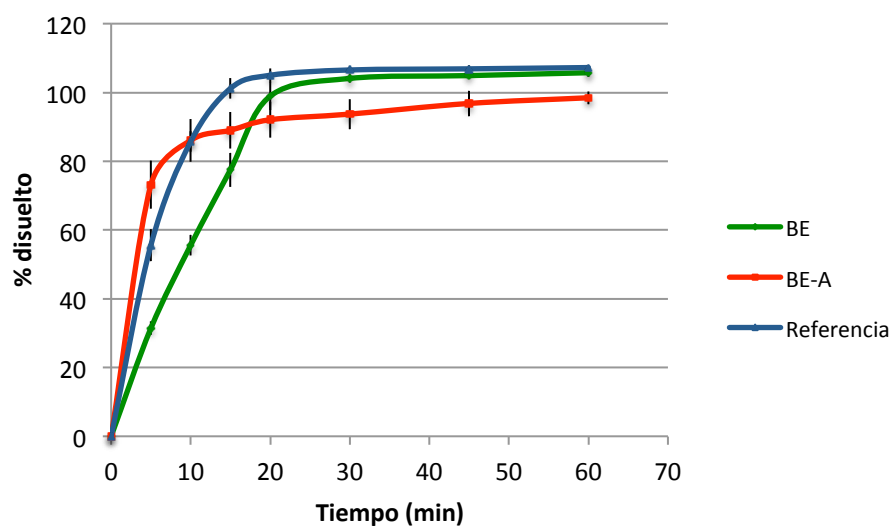
Tabla 4-85. Porcentajes disueltos de Pravastatina en función del tiempo en medio tampón pH 6,5; 10 mM de Fosfato diácido de Potasio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-34. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-A y BE de Pravastatina a pH 6,5; tampón 10 mM (Fosfato). (n=6).

pH 6,8. Tampón 10 mM-Fosfato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-A		BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	55,63 \pm 4,66	8,38	73,17 \pm 7,00	9,57	31,46 \pm 1,98	6,29
10	85,74 \pm 3,03	3,53	86,09 \pm 6,22	7,23	55,58 \pm 2,98	5,37
15	101,19 \pm 2,98	2,94	89,02 \pm 5,35	6,01	77,53 \pm 4,98	6,42
20	105,02 \pm 2,05	1,95	92,09 \pm 5,21	5,66	98,95 \pm 4,11	4,16
30	106,56 \pm 0,99	0,93	93,72 \pm 4,37	4,67	104,10 \pm 1,20	1,16
45	106,89 \pm 1,07	0,99	96,82 \pm 3,71	3,83	104,92 \pm 0,96	0,91
60	107,26 \pm 0,73	0,68	98,47 \pm 1,87	1,90	105,75 \pm 1,20	1,14

Tabla 4-86. Porcentajes disueltos de Pravastatina en función del tiempo en medio tampón pH 6,5; 10 mM de Fosfato diácido de Potasio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).

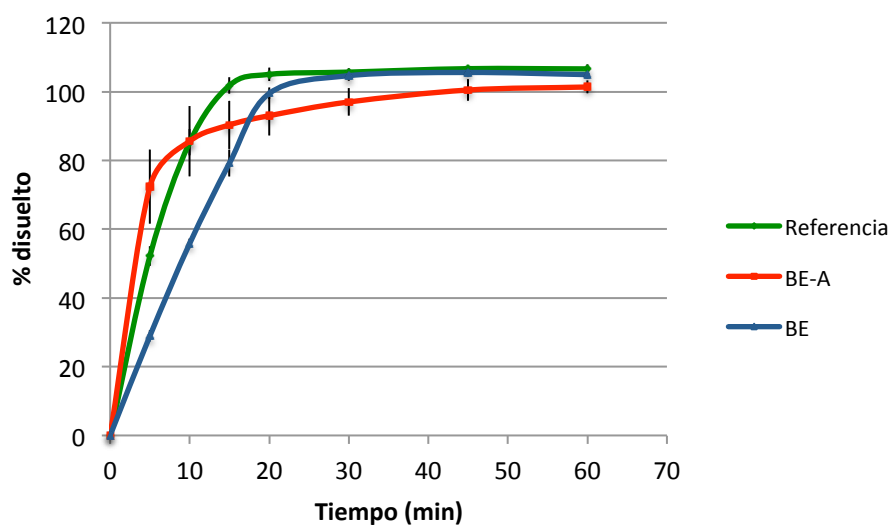


Gráfica 4-35. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-A y BE de Pravastatina a pH 6,8; tampón 10 mM (Fosfato). (n=6).

En la tabla 4-87 se resumen los porcentajes disueltos de Pravastatina de las tres formulaciones estudiadas, usando un medio de disolución a pH 4,5 preparado con fosfato diácido de potasio con concentración 10 mM. La representación gráfica de estos resultados se muestra en la gráfica 4-36.

pH 4,5. Tampón 10 mM-Fosfato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE-A		BE	
	Media ± DE	CV (%)	Media ± DE	CV (%)	Media ± DE	CV (%)
5	52,19 ± 2,86	5,47	72,36 ± 10,76	14,87	28,97 ± 1,63	5,64
10	85,29 ± 3,90	4,57	85,60 ± 10,23	11,95	55,84 ± 1,44	2,57
15	101,80 ± 2,38	2,34	90,31 ± 7,03	7,79	79,21 ± 3,91	4,94
20	105,03 ± 1,93	1,84	93,01 ± 5,83	6,27	99,48 ± 1,66	1,67
30	105,68 ± 1,06	1,00	97,00 ± 4,02	4,14	104,66 ± 1,49	1,43
45	106,70 ± 0,69	0,64	100,48 ± 3,12	3,10	105,58 ± 1,21	1,15
60	106,63 ± 1,33	1,25	101,36 ± 1,86	1,83	104,96 ± 1,23	1,17

Tabla 4-87. Porcentajes disueltos de Pravastatina en función del tiempo en medio tampón pH 4,5; 10 mM de Fosfato diácido de Potasio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-36. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE-A y BE de Pravastatina a pH 4,5; tampón 10 mM (Fosfato). (n=6).

En la tabla 4-88 se muestra el factor de similitud calculado entre el perfil de disolución del producto de referencia y la formulación BE.

Medio de disolución	f ₂	Medio de disolución	f ₂
pH 1,2 (5 mM)	12,69	pH 6,0 (10 mM)	29,43
pH 1,2 (50 mM)	14,01	pH 6,0 (50 mM)	26,60
pH 2,0 (50 mM)	20,62	pH 6,5 (10 mM)	30,70
pH 3,0 (5 mM)	16,79	pH 6,5 (50 mM)	28,63
pH 4,5 (10 mM)	31,24	pH 6,8 (10 mM)	30,62
pH 4,5 (36,5 mM)	18,91	pH 6,8 (50 mM)	28,23

Tabla 4-88. Factor de similitud de los perfiles de la formulación BE de Pravastatina en los diferentes medios ensayados.

6. Ensayos *in vitro* en células Caco-2 para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de Pravastatina

Las tablas que se presentan a continuación muestran las concentraciones experimentales obtenidas en el compartimiento receptor, de los estudios de soluciones de Pravastatina preparadas a partir de los productos estudiados (Referencia, BE-A y BE). Para la estimación de la permeabilidad se utilizó en todos los casos la aproximación no lineal (ecuación 3-5).

Pravastatina 358 µM (Referencia)			
Tiempo (min)	Concentraciones (µM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,22	0,53	0,25
30	0,47	0,38	0,53
60	1,15	0,74	1,83
90	1,34	0,95	2,32
Pe _{ff} (cm/s)	$5,75 \cdot 10^{-07}$	$2,75 \cdot 10^{-07}$	$1,06 \cdot 10^{-06}$
Pe _{ff} +DE (cm/s)	$6,37 \cdot 10^{-07} \pm 3,97 \cdot 10^{-07}$		

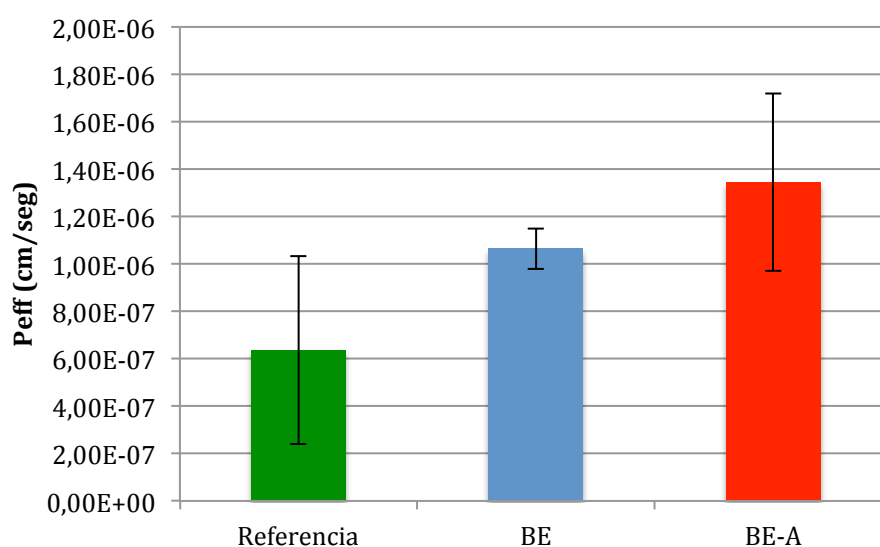
Tabla 4-89. Concentraciones (µM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 358 µM preparada a partir del producto Referencia en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 358 µM (BE)			
Tiempo (min)	Concentraciones (µM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0	1,10	1,16
30	1,19	1,21	1,45
60	2,32	2,69	2,50
90	2,43	2,89	2,94
Pe _{ff} (cm/s)	$1,16 \cdot 10^{-06}$	$1,05 \cdot 10^{-06}$	$9,87 \cdot 10^{-07}$
Pe _{ff} +DE (cm/s)	$1,06 \cdot 10^{-06} \pm 8,52 \cdot 10^{-08}$		

Tabla 4-90. Concentraciones (µM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 358 µM preparada a partir de la formulación bioequivalente en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 358 μM (BE-A)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0	1,94	2,02
30	2,06	2,07	2,39
60	3,52	3,62	3,43
90	3,67	4,26	3,56
Peff (cm/s)	$1,71 \cdot 10^{-06}$	$1,36 \cdot 10^{-06}$	$9,63 \cdot 10^{-07}$
Peff+DE (cm/s)	$1,35 \cdot 10^{-06} + 3,75 \cdot 10^{-07}$		

Tabla 4-91. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 358 μM preparada a partir de la formulación BE-A en la línea celular Caco-2.



Gráfica 4-37. Representación gráfica de la permeabilidad de las soluciones de Pravastatina preparadas desde las formulaciones estudiadas.

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	2,29	0,16	NS
ANOVA		0,03	S

Tabla 4-92. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades apical-basolateral de las distintas formulaciones de Pravastatina y del fármaco (μM).

Prueba de comparación múltiple de Scheffé		
	Referencia	BE
Referencia	-	-
BE	NS	-
BE-A	S	NS

Tabla 4-93. Resultado de la comparación múltiple de permeabilidades apical-basolateral de Pravastatina desde las distintas formulaciones ensayadas (μM).

7. Ensayos *in situ* para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de Pravastatina

En las tablas que se muestran a continuación, se presentan los resultados de los experimentos individuales realizados *in situ* con soluciones preparadas a partir del producto de referencia y las dos formulaciones en estudio.

Concentración remanente de Pravastatina en lumen intestinal							
Concentración inicial perfundida: 160 µg/mL (Referencia)							
Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	122,82	106,77	105,80	107,86	111,25	110,90	12,81
10	122,95	120,93	112,83	116,58	109,11	116,48	10,06
15	127,17	116,59	110,97	91,96	111,65	111,67	15,05
20	122,37	124,23	111,65	120,63	109,40	117,66	10,04
25	129,00	125,75	113,78	126,78	113,46	121,75	9,98
30	118,05	131,65	107,53	128,35	121,12	121,34	11,12
Vr (mL)	5,50	5,50	6,00	4,20	6,00	5,44	1,04
Ajuste no lineal							
Kap (h ⁻¹)	0,86	0,44	0,65	0,88	0,55	0,68	0,20
Ao (µg/mL)	126,37	108,87	109,99	106,08	108,95	112,05	8,13

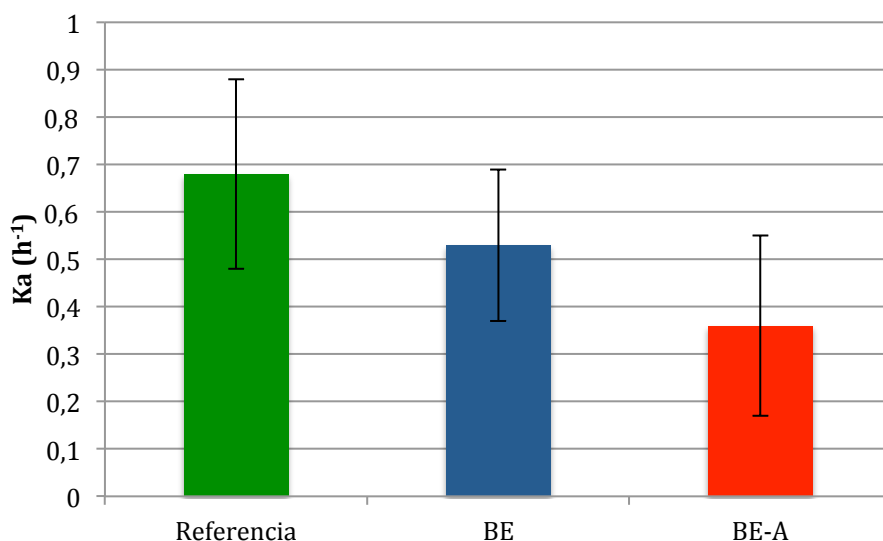
Tabla 4-94. Concentración de Pravastatina remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Pravastatina a una concentración de 160 µg/mL (358 µM), preparada a partir del producto Referencia.

Concentración remanente de Pravastatina en lumen intestinal							
Concentración inicial perfundida: 160 µg/mL (BE-A)							
Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	116,99	114,92	104,55	136,72	127,64	120,16	12,36
10	122,73	116,26	109,37	138,56	136,14	124,61	12,58
15	128,50	118,99	108,62	137,45	131,26	124,96	11,30
20	129,55	120,07	110,84	134,19	140,05	126,94	11,59
25	131,79	119,43	113,44	133,75	139,71	127,62	10,83
30	142,07	120,94	116,74	133,09	143,46	131,26	12,11
Vr (mL)	5,40	7,50	5,70	7,40	7,30	6,66	1,02
Ajuste no lineal							
Kap (h ⁻¹)	0,48	0,20	0,57	0,43	0,13	0,36	0,19
Ao (µg/mL)	116,43	114,71	105,09	139,59	127,67	120,70	13,26

Tabla 4-95. Concentración de Pravastatina remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Pravastatina a una concentración de 160 µg/mL (358 µM), preparada a partir de la formulación BE-A.

Concentración remanente de Pravastatina en lumen intestinal							
Concentración inicial perfundida: 160 µg/mL (BE)							
Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	131,15	119,09	119,23	114,17	119,88	120,70	6,27
10	123,31	111,44	127,74	116,99	133,38	122,57	8,65
15	112,38	113,13	121,77	117,11	118,32	116,54	3,87
20	107,47	104,01	119,68	120,36	123,16	114,94	8,58
25	104,50	104,21	133,13	123,34	128,16	118,67	13,52
30	93,89	98,39	130,03	125,24	132,84	116,08	18,47
Vr (mL)	5,50	5,50	5,80	6,50	5,80	5,82	0,41
Ajuste no lineal							
Kap (h ⁻¹)	0,76	0,43	0,59	0,35	0,64	0,53	0,16
Ao (µg/mL)	139,15	122,47	120,75	113,07	123,04	123,70	9,52

Tabla 4-96. Concentración de Pravastatina remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Pravastatina a una concentración de 160 µg/mL (358 µM), preparada a partir de la formulación bioequivalente.



Gráfica 4-38. Representación gráfica comparativa de las constantes de absorción de Pravastatina de las distintas formulaciones estudiadas en el modelo in situ.

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	0,05	0,95	NS
ANOVA		0,09	NS

Tabla 4-97. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las constantes de absorción en el modelo in situ de las distintas formulaciones de Pravastatina (µM).

8. Ensayos *in vitro* en células Caco-2 para determinar el efecto de excipientes sobre la permeabilidad de Pravastatina

En las tablas que se presentan a continuación se muestran las concentraciones experimentales obtenidas en el compartimiento receptor, del estudio de la solución de Pravastatina y de diferentes soluciones de dicho fármaco con diferentes excipientes que podrían estar modificando la permeabilidad de Pravastatina. Para la estimación de la permeabilidad se utilizó en todos los casos la aproximación no lineal (ecuación 3-5).

Pravastatina 358 μM -Estearato de magnesio (8 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,23	0,24	0
30	0,30	0,27	0,22
60	0,36	0,38	0,28
90	0,49	0,47	0,36
Pe _{ff} (cm/s)	$1,62 \cdot 10^{-07}$	$1,58 \cdot 10^{-07}$	$1,90 \cdot 10^{-07}$
Pe _{ff+DE} (cm/s)	$1,70 \cdot 10^{-07} \pm 1,73 \cdot 10^{-08}$		

Tabla 4-98. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 358 μM en presencia de Estearato de magnesio (8 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 358 μM -Estearato de magnesio (12 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0	0	0
30	0,16	0,20	0,14
60	0,28	0,34	0,29
90	0,36	0,47	0,37
Pe _{ff} (cm/s)	$2,02 \cdot 10^{-07}$	$2,60 \cdot 10^{-07}$	$2,09 \cdot 10^{-07}$
Pe _{ff+DE} (cm/s)	$2,24 \cdot 10^{-07} \pm 3,20 \cdot 10^{-08}$		

Tabla 4-99. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 358 μM en presencia de Estearato de magnesio (12 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 358 μM -Estearato de magnesio (16 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,24	0,24	0
30	0,31	0,35	0,30
60	0,53	0,50	0,40
90	0,71	0,61	0,49
Pe _{eff} (cm/s)	$2,94 \cdot 10^{-07}$	$2,29 \cdot 10^{-07}$	$2,58 \cdot 10^{-07}$
Pe _{eff} +DE (cm/s)	$2,60 \cdot 10^{-07} + 3,26 \cdot 10^{-08}$		

Tabla 4-100. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 358 μM en presencia de Estearato de magnesio (16 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 358 μM -Celulosa microcristalina (15 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,17	0,15	0,16
30	0,20	0,20	0,19
60	0,35	0,32	0,34
90	0,47	0,40	0,48
Pe _{eff} (cm/s)	$1,92 \cdot 10^{-07}$	$1,59 \cdot 10^{-07}$	$2,03 \cdot 10^{-07}$
Pe _{eff} +DE (cm/s)	$1,85 \cdot 10^{-07} + 2,25 \cdot 10^{-08}$		

Tabla 4-101. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 358 μM en presencia de Celulosa microcristalina (15 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 358 μM -Celulosa microcristalina (250 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,09	0,10	0,09
30	0,16	0,22	0,15
60	0,30	0,39	0,29
90	0,38	0,48	0,37
Pe _{eff} (cm/s)	$1,79 \cdot 10^{-07}$	$2,28 \cdot 10^{-07}$	$1,73 \cdot 10^{-07}$
Pe _{eff} +DE (cm/s)	$1,93 \cdot 10^{-07} + 3,01 \cdot 10^{-08}$		

Tabla 4-102. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 358 μM en presencia de Celulosa microcristalina (250 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 358 μ M-Celulosa microcristalina (550 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μ M). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,10	0	0,15
30	0,27	0,32	0,19
60	0,32	0,39	0,35
90	0,39	0,45	0,47
Peff (cm/s)	$1,60 \cdot 10^{-07}$	$2,32 \cdot 10^{-07}$	$2,02 \cdot 10^{-07}$
Peff+DE (cm/s)	$1,81 \cdot 10^{-07} + 3,60 \cdot 10^{-08}$		

Tabla 4-103. Concentraciones (μ M) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 358 μ M en presencia de Celulosa microcristalina (550 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 358 μ M-Croscarmelosa sódica (60 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μ M). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0	0,30	0
30	0,44	0,54	0,52
60	0,60	0,82	0,61
90	0,78	0,95	0,82
Peff (cm/s)	$4,13 \cdot 10^{-07}$	$4,01 \cdot 10^{-07}$	$4,21 \cdot 10^{-07}$
Peff+DE (cm/s)	$4,12 \cdot 10^{-07} + 1,02 \cdot 10^{-08}$		

Tabla 4-104. Concentraciones (μ M) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 358 μ M en presencia de Croscarmelosa sódica (60 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 358 μ M-Óxido de magnesio (50 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μ M). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,31	0,22	0,27
30	0,38	0,30	0,32
60	0,53	0,57	0,58
90	0,62	0,68	0,67
Peff (cm/s)	$2,04 \cdot 10^{-07}$	$2,99 \cdot 10^{-07}$	$2,69 \cdot 10^{-07}$
Peff+DE (cm/s)	$2,57 \cdot 10^{-07} + 4,84 \cdot 10^{-08}$		

Tabla 4-105. Concentraciones (μ M) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 358 μ M en presencia de Óxido de magnesio (50 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 358 μ M-Sílice coloidal (8 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μ M). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,23	0,25	0,22
30	0,26	0,27	0,23
60	0,39	0,48	0,34
90	0,48	0,67	0,41
Peff (cm/s)	$1,72 \cdot 10^{-07}$	$2,70 \cdot 10^{-07}$	$1,37 \cdot 10^{-07}$
Peff+DE (cm/s)	$1,93 \cdot 10^{-07} + 6,90 \cdot 10^{-08}$		

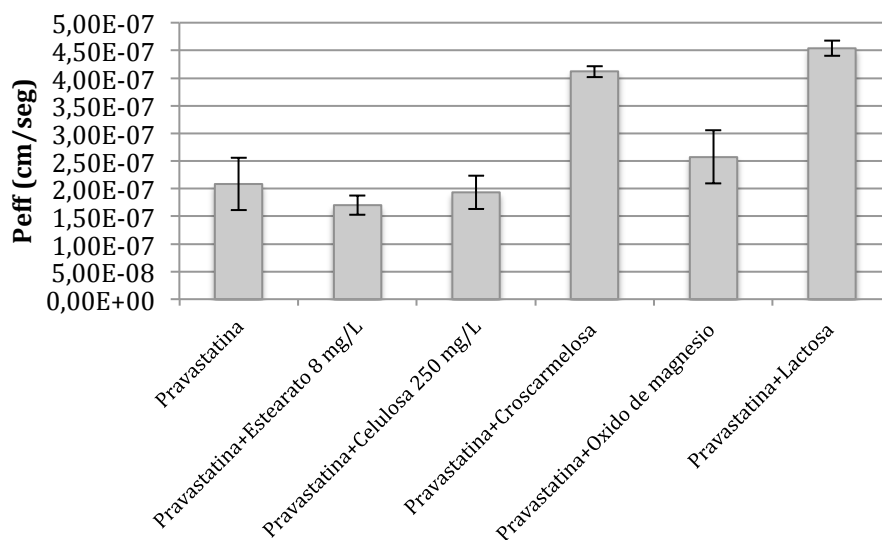
Tabla 4-106. Concentraciones (μ M) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 358 μ M en presencia de Sílice coloidal (8 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 358 μ M-Carbonato de magnesio (120 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μ M). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,29	0,23	0,19
30	0,25	0,25	0,24
60	0,50	0,45	0,41
90	0,66	0,62	0,52
Peff (cm/s)	$2,58 \cdot 10^{-07}$	$2,54 \cdot 10^{-07}$	$2,15 \cdot 10^{-07}$
Peff+DE (cm/s)	$2,42 \cdot 10^{-07} + 2,38 \cdot 10^{-08}$		

Tabla 4-107. Concentraciones (μ M) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 358 μ M en presencia de Carbonato de magnesio (120 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Pravastatina 358 μ M-Lactosa (1000 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μ M). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,21	0,21	0,21
30	0,49	0,37	0,44
60	0,76	0,74	0,74
90	1,02	0,92	0,98
Peff (cm/s)	$4,68 \cdot 10^{-07}$	$4,40 \cdot 10^{-07}$	$4,56 \cdot 10^{-07}$
Peff+DE (cm/s)	$4,54 \cdot 10^{-07} + 1,40 \cdot 10^{-08}$		

Tabla 4-108. Concentraciones (μ M) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Pravastatina 358 μ M en presencia de Lactosa (1000 mg/L) en la línea celular Caco-2.



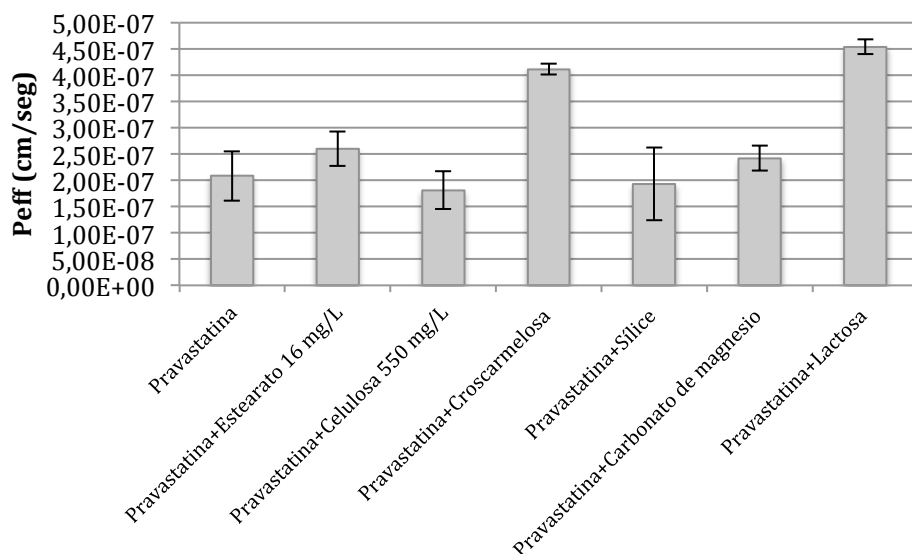
Gráfica 4-39. Representación gráfica de la permeabilidad de Pravastatina y de Pravastatina más Estearato de magnesio, Celulosa microcristalina, Croscarmelosa, Óxido de magnesio y Lactosa (excipientes presentes en el producto de Referencia).

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	3,01	0,06	NS
ANOVA		0,03	S

Tabla 4-109. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades de Pravastatina en presencia de los excipientes estudiados del producto Referencia.

Prueba de comparación múltiple de Scheffé					
	Pravastatina	Pravastatina+ Estearato	Pravastatina+ Celulosa	Pravastatina+ Croscarmelosa	Pravastatina+ Óxido magnesio
Pravastatina	-	-	-	-	-
Pravastatina +Estearato	NS	-	-	-	-
Pravastatina +Celulosa	NS	NS	-	-	-
Pravastatina +Croscarmelosa	S	S	S	-	-
Pravastatina +Óxido magnesio	NS	NS	NS	S	-
Pravastatina +Lactosa	S	S	S	NS	S

Tabla 4-110. Resultado de la comparación múltiple de permeabilidades de Pravastatina en presencia de los excipientes estudiados del producto Referencia.



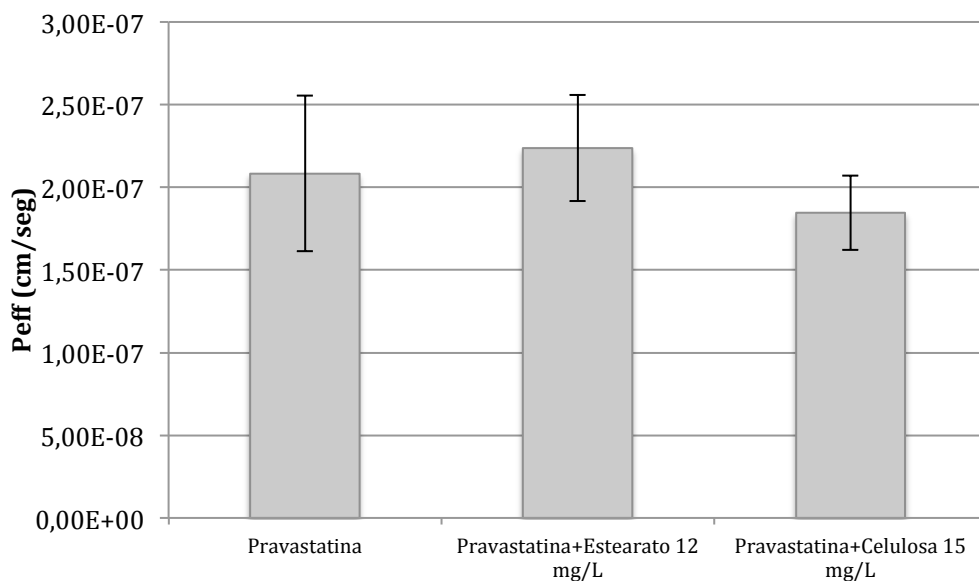
Gráfica 4-40. Representación gráfica de la permeabilidad de Pravastatina y de Pravastatina más Estearato de magnesio, Celulosa microcristalina, Croscarmelosa, Sílice, Carbonato de magnesio y Lactosa (excipientes presentes en la formulación BE-A).

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
		2,81	0,052
ANOVA		0,01	S

Tabla 4-111. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades de Pravastatina en presencia de los excipientes estudiados del producto BE-A.

Prueba de comparación múltiple de Scheffé						
	Pravastatina	Pravastatina +Estearato	Pravastatina +Celulosa	Pravastatina +Croscarmelosa	Pravastatina +Sílice	Pravastatina +Carbonato
Pravastatina	-	-	-	-	-	-
Pravastatina +Estearato	NS	-	-	-	-	-
Pravastatina +Celulosa	NS	S	-	-	-	-
Pravastatina +Croscarmelosa	S	S	S	-	-	-
Pravastatina +Sílice	NS	NS	NS	S	-	-
Pravastatina +Carbonato	NS	NS	NS	S	NS	-
Pravastatina +Lactosa	S	S	S	NS	S	NS

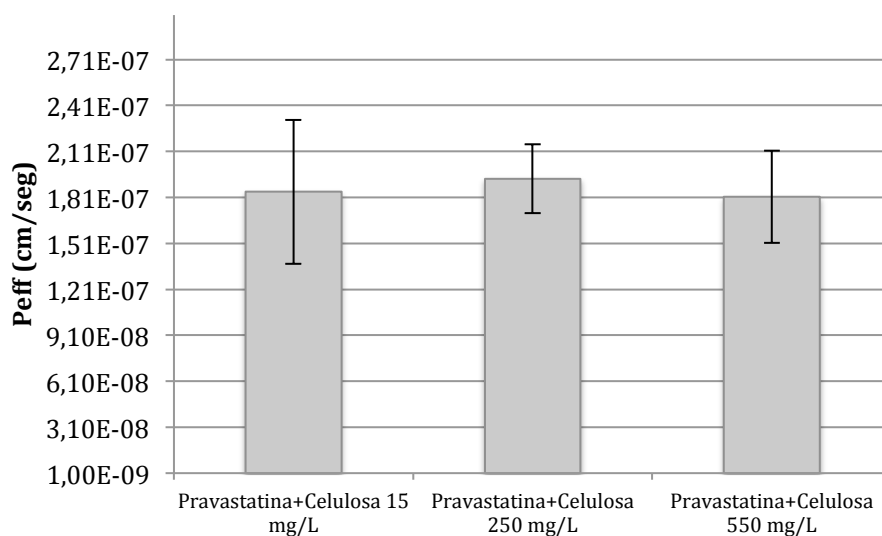
Tabla 4-112. Resultado de la comparación múltiple de permeabilidades de Pravastatina en presencia de los excipientes estudiados del producto BE-A.



Gráfica 4-41. Representación gráfica de la permeabilidad de Pravastatina y de Pravastatina más Estearato de magnesio y Celulosa microcristalina (excipientes presentes en el producto BE).

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	2,55	0,16	NS
ANOVA		0,06	NS

Tabla 4-113. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades de Pravastatina en presencia de los excipientes estudiados del producto BE.



Gráfica 4-42. Representación gráfica comparativa de la permeabilidad de Pravastatina en presencia de diferentes concentraciones de Celulosa microcristalina.

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
		0,83	0,48
ANOVA		0,64	NS

Tabla 4-114. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades de Pravastatina en presencia de diferentes concentraciones de Celulosa microcristalina.

En las tablas que se presentan a continuación se muestran las concentraciones experimentales obtenidas en el compartimento receptor, en el estudio en células Caco-2 empleando soluciones de Metoprolol con los diferentes excipientes estudiados previamente. Para la estimación de la permeabilidad se utilizó en todos los casos la aproximación más adecuada (ecuación 3-3).

Metoprolol 100 μ M-Estearato de magnesio (8 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μ M). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	5,52	2,52	4,38
30	8,52	8,03	8,27
60	6,12	4,89	8,42
90	12,24	12,04	10,62
Pe _{eff} (cm/s)	$1,51 \cdot 10^{-05}$	$1,87 \cdot 10^{-05}$	$1,48 \cdot 10^{-05}$
Pe _{eff} +DE (cm/s)	$1,62 \cdot 10^{-05} \pm 2,19 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-115. Concentraciones (μ M) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Metoprolol 100 μ M en presencia de Estearato de magnesio (8 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Metoprolol 100 μ M-Estearato de magnesio (12 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μ M). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	1,75	2,16	2,72
30	4,46	6,05	7,10
60	6,09	6,03	10,91
90	13,58	13,79	14,67
Pe _{eff} (cm/s)	$2,74 \cdot 10^{-05}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$	$3,04 \cdot 10^{-05}$
Pe _{eff} +DE (cm/s)	$2,80 \cdot 10^{-05} \pm 2,21 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-116. Concentraciones (μ M) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Metoprolol 100 μ M en presencia de Estearato de magnesio (12 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Metoprolol 100 μ M-Estearato de magnesio (16 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μ M). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	3,65	2,27	2,93
30	7,14	6,06	9,16
60	7,31	10,48	10,82
90	17,33	15,76	17,23
Peff (cm/s)	$3,35 \cdot 10^{-05}$	$3,45 \cdot 10^{-05}$	$3,54 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$3,45 \cdot 10^{-05} \pm 9,52 \cdot 10^{-07}$		

Tabla 4-117. Concentraciones (μ M) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Metoprolol 100 μ M en presencia de Estearato de magnesio (16 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Metoprolol 100 μ M-Celulosa microcristalina (15 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μ M). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	2,12	3,68	3,44
30	7,18	8,23	7,30
60	9,32	9,66	10,35
90	18,85	15,55	16,28
Peff (cm/s)	$4,18 \cdot 10^{-05}$	$2,95 \cdot 10^{-05}$	$3,32 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$3,48 \cdot 10^{-05} \pm 6,31 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-118. Concentraciones (μ M) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Metoprolol μ M en presencia de Celulosa microcristalina (15 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Metoprolol 100 μ M-Croscarmelosa sódica (60 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μ M). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	4,03	3,28	2,14
30	7,50	7,53	7,24
60	9,65	9,95	10,36
90	15,98	15,10	14,74
Peff (cm/s)	$3,07 \cdot 10^{-05}$	$2,97 \cdot 10^{-05}$	$3,09 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$3,04 \cdot 10^{-05} \pm 6,78 \cdot 10^{-07}$		

Tabla 4-119. Concentraciones (μ M) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Metoprolol 100 μ M en presencia de Croscarmelosa sódica (60 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Metoprolol 100 μM -Óxido de magnesio (50 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	3,64	2,56	4,75
30	7,26	5,51	9,38
60	8,73	10,94	8,78
90	16,00	15,70	14,65
Peff (cm/s)	$3,08 \cdot 10^{-05}$	$3,47 \cdot 10^{-05}$	$2,37 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$2,98 \cdot 10^{-05} \pm 5,57 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-120. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Metoprolol 100 μM en presencia de Óxido de magnesio (50 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Metoprolol 100 μM -Sílice coloidal (8 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	1,44	3,22	0,91
30	5,76	6,82	5,70
60	9,30	16,52	11,39
90	19,14	20,79	19,80
Peff (cm/s)	$4,47 \cdot 10^{-05}$	$5,27 \cdot 10^{-05}$	$4,92 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$4,89 \cdot 10^{-05} \pm 3,99 \cdot 10^{-06}$		

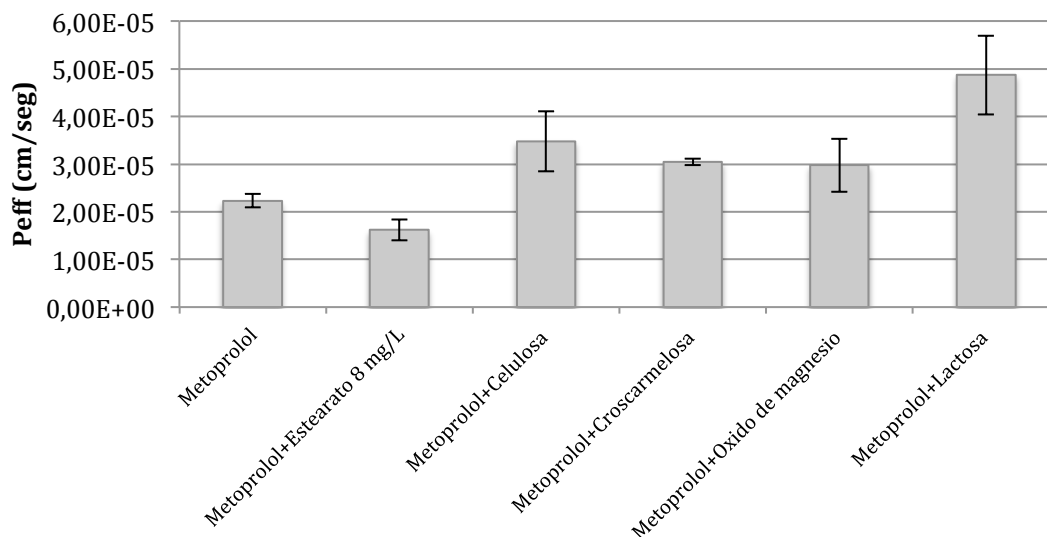
Tabla 4-121. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Metoprolol 100 μM en presencia de Sílice coloidal (8 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Metoprolol 100 μM -Carbonato de magnesio (120 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	3,63	3,98	1,54
30	6,86	7,08	5,43
60	10,74	8,03	7,84
90	18,19	14,02	13,84
Peff (cm/s)	$3,90 \cdot 10^{-05}$	$2,46 \cdot 10^{-05}$	$2,89 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$3,09 \cdot 10^{-05} \pm 7,39 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-122. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Metoprolol 100 μM en presencia de Carbonato de magnesio (120 mg/L) en la línea celular Caco-2.

Metoprolol 100 μ M-Lactosa (1000 mg/L)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μ M). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,21	0,21	0,24
30	0,49	0,37	0,28
60	0,76	0,74	0,48
90	1,02	0,92	0,63
Peff (cm/s)	$3,93 \cdot 10^{-05}$	$5,18 \cdot 10^{-05}$	$5,50 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$4,87 \cdot 10^{-05} \pm 8,29 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-123. Concentraciones (μ M) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Metoprolol 100 μ M en presencia de Lactosa (1000 mg/L) en la línea celular Caco-2.



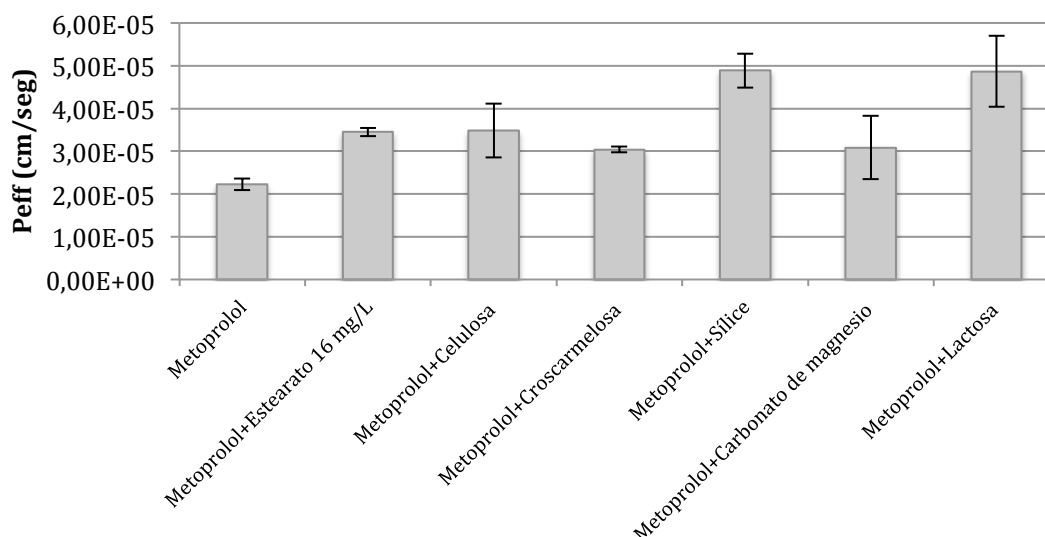
Gráfica 4-43. Representación gráfica de la permeabilidad de Metoprolol y de Metoprolol más Estearato de magnesio, Celulosa microcristalina, Croscarmelosa, Óxido de magnesio y Lactosa (excipientes presentes en el producto de Referencia).

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	3,86	0,07	NS
ANOVA		0,00	S

Tabla 4-124. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades de Metoprolol en presencia de los excipientes estudiados del producto Referencia de Pravastatina.

Prueba de comparación múltiple de Scheffé					
	Metoprolol	Metoprolol +Estearato	Metoprolol +Celulosa	Metoprolol +Croscarmelosa	Metoprolol+ Oxido de magnesio
Metoprolol	-	-	-	-	-
Metoprolol +Estearato	NS	-	-	-	-
Metoprolol +Celulosa	NS	S	-	-	-
Metoprolol +Croscarmelosa	S	S	NS	-	-
Metoprolol+ Oxido de magnesio	NS	S	NS	NS	-
Metoprolol +Lactosa	S	S	NS	NS	NS

Tabla 4-125. Resultado de la comparación múltiple de permeabilidades de Metoprolol en presencia de los excipientes estudiados del producto Referencia de Pravastatina.



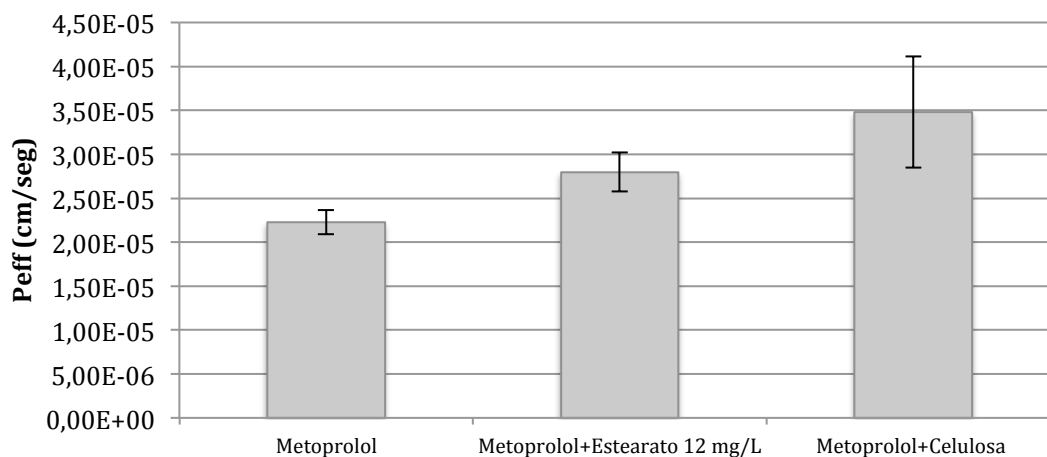
Gráfica 4-44. Representación gráfica de la permeabilidad de Pravastatina y de Pravastatina más Estearato de magnesio, Celulosa microcristalina, Croscarmelosa, Sílice, Carbonato de magnesio y Lactosa (excipientes presentes en la formulación BE-A).

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	5,13	0,08	NS
ANOVA		0,00	S

Tabla 4-126. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades de Metoprolol en presencia de los excipientes estudiados del producto BE-A de Pravastatina.

Prueba de comparación múltiple de Scheffé						
	Metoprolol	Metoprolol +Estearato	Metoprolol +Celulosa	Metoprolol +Croscarmelosa	Metoprolol +Sílice	Metoprolol +Carbonato
Metoprolol	-	-	-	-	-	-
Metoprolol +Estearato	S	-	-	-	-	-
Metoprolol +Celulosa	NS	NS	-	-	-	-
Metoprolol +Croscarmelosa	S	NS	NS	-	-	-
Metoprolol +Sílice	S	S	S	S	-	-
Metoprolol +Carbonato	NS	NS	NS	NS	S	-
Metoprolol +Lactosa	S	S	S	S	NS	NS

Tabla 4-127. Resultado de la comparación múltiple de permeabilidades de Metoprolol en presencia de los excipientes estudiados del producto BE-A de Pravastatina.



Gráfica 4-45. Representación gráfica de la permeabilidad de Metoprolol y de Metoprolol más Estearato de magnesio y Celulosa microcristalina (excipientes presentes en el producto BE).

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	4,10	0,08	NS
ANOVA		0,02	S

Tabla 4-128. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades de Metoprolol en presencia de los excipientes estudiados del producto BE-A de Pravastatina.

Prueba de comparación múltiple de Scheffé		
	Metoprolol	Metoprolol +Estearato
Metoprolol	-	-
Metoprolol +Estearato	NS	-
Metoprolol+Celulosa	S	NS

Tabla 4-129. Resultado de la comparación múltiple de permeabilidades de Metoprolol en presencia de los excipientes estudiados del producto BE de Pravastatina.

C. Cloperastina

1. Validación del método analítico

Se realizaron estudios de linealidad de las curvas de calibración utilizadas para valorar las muestras. En la tabla 4-130 se muestra el coeficiente de determinación “r²” de las curvas de calibración, que siempre fue superior a 0,990. En la tabla también se detallan los errores estándar (EE) de la ordenada en el origen y de la pendiente de la recta.

Cloperastina (μM)	Ordenada en el origen	EE	Pendiente	EE	r ²
0,2-20	-12364,34	5989,94	30941,78	575,85	0,9979
1-100	-41104,46	18777,07	35520,47	361,03	0,9994
2-200	-54549,98	26665,54	34875,66	256,35	0,9997

Tabla 4-130. Ensayo de linealidad de las curvas de calibración empleados para la valoración de las muestras por HPLC a las distintas concentraciones de Cloperastina ensayadas.

En la tabla 4-131 se detallan los resultados de los ensayos de precisión y exactitud realizados sobre patrones de concentración conocida a través del error absoluto (Ea) y error relativo (Er %). En la tabla 4-132 se presentan los límites de detección y cuantificación.

Recta	0,2-20	1-100	2-200
Patrón 5%			
C _{Teórica}	1,00	5,00	10,00
C _{Experimental}	0,95	5,26	10,13
CV (%)	3,70	0,39	0,50
Ea	-4,72·10 ⁻⁰²	0,26	0,13
Er (%)	-4,72	5,18	1,27
Patrón 10%			
C _{Teórica}	2,00	10,00	20,00
C _{Experimental}	1,82	10,07	19,60
CV (%)	1,99	0,14	0,59
Ea	-0,09	0,07	-0,40
Er (%)	-9,00	0,70	-2,01
Patrón 70%			
C _{Teórica}	14,00	70,00	140,00
C _{Experimental}	14,18	67,98	139,44
CV (%)	0,95	0,73	0,55
Ea	0,18	-2,02	-0,56
Er (%)	1,26	-2,89	-0,40

Tabla 4-131. Ensayo de exactitud y precisión de las curvas de calibración empleadas para la valoración de las muestras a distintas concentraciones de Cloperastina ensayadas.

Cloperastina (μM)	Límite de detección (μM)	Límite de cuantificación (μM)
0,2-20	0,64	1,94
1-100	1,74	5,29
2-200	2,52	7,65

Tabla 4-132. Límites de detección y cuantificación en de la técnica de valoración empleada para determinar la concentración de Cloperastina en las muestras.

2. Concentración de saturación

En las tablas 4-133, 4-134 y 4-135 se detallan los resultados de las concentraciones en condición de saturación de Cloperastina a partir de la sal Cloperastina Fendizoato, obtenidas experimentalmente en forma individual y promedio a pH 1,2; 4,5 y 6,8, respectivamente. En la gráfica 4-46 se muestra el perfil solubilidad-pH.

Tiempo (h)	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
4	8,17	7,60	0,53	6,90	$1,70 \cdot 10^{-02}$
	7,14				
	7,50				
8	7,99	7,87	0,41	5,26	
	7,41				
	8,21				
18	9,85	9,74	0,28	2,87	
	9,42				
	9,94				
24	9,77	9,99	0,24	2,40	
	9,96				
	10,24				
		8,80	1,17	13,24	

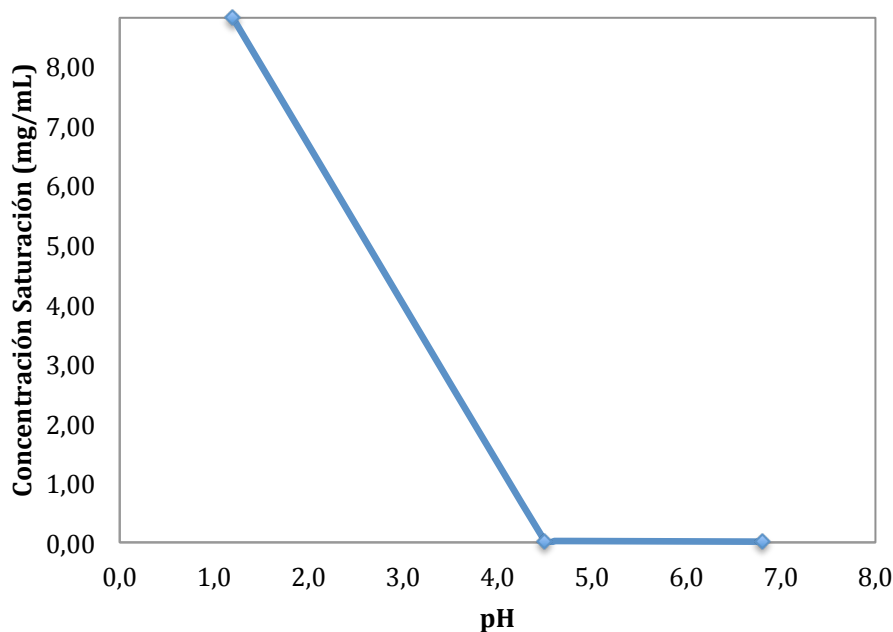
Tabla 4-133. Concentración de saturación de Cloperastina a pH 1,2.

Tiempo (h)	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
4	$3,05 \cdot 10^{-02}$	$2,53 \cdot 10^{-02}$	$4,50 \cdot 10^{-03}$	17,79	6,85
	$22,8 \cdot 10^{-02}$				
	$22,6 \cdot 10^{-02}$				
8	$1,89 \cdot 10^{-02}$	$2,29 \cdot 10^{-02}$	$4,00 \cdot 10^{-03}$	17,31	
	$2,68 \cdot 10^{-02}$				
	$2,31 \cdot 10^{-02}$				
18	$1,63 \cdot 10^{-02}$	$2,09 \cdot 10^{-02}$	$4,20 \cdot 10^{-03}$	20,29	
	$2,17 \cdot 10^{-02}$				
	$2,47 \cdot 10^{-02}$				
24	$1,68 \cdot 10^{-02}$	$1,85 \cdot 10^{-02}$	$4,80 \cdot 10^{-03}$	26,10	
	$1,47 \cdot 10^{-02}$				
	$2,39 \cdot 10^{-02}$				
		$2,19 \cdot 10^{-02}$	$4,60 \cdot 10^{-03}$	20,88	

Tabla 4-134. Concentración de saturación de Cloperastina a pH 4,5.

Tiempo (h)	Concentración (mg/mL)	Promedio	Desviación estándar	CV (%)	Do
4	$1,39 \cdot 10^{-02}$	$1,30 \cdot 10^{-02}$	$0,90 \cdot 10^{-03}$	6,68	12,10
	$1,21 \cdot 10^{-02}$				
	$1,30 \cdot 10^{-02}$				
8	$1,34 \cdot 10^{-02}$	$1,23 \cdot 10^{-02}$	$1,20 \cdot 10^{-03}$	9,40	
	$1,11 \cdot 10^{-02}$				
	$1,25 \cdot 10^{-02}$				
18	$1,28 \cdot 10^{-02}$	$1,22 \cdot 10^{-02}$	$0,80 \cdot 10^{-03}$	6,73	
	$1,24 \cdot 10^{-02}$				
	$1,13 \cdot 10^{-02}$				
24	$1,23 \cdot 10^{-02}$	$1,21 \cdot 10^{-02}$	$0,60 \cdot 10^{-03}$	5,15	
	$1,14 \cdot 10^{-02}$				
	$1,25 \cdot 10^{-02}$				
		$1,24 \cdot 10^{-02}$	$0,80 \cdot 10^{-03}$	6,80	

Tabla 4-135. Concentración de saturación de Cloperastina a pH 6,8.



Gráfica 4-46. Perfil de solubilidad en función del pH de Cloperastina a 37 °C.

3. Coeficiente de reparto

En la tabla 4-136 se muestran los valores individuales y promedios de reparto en n-octanol y solución acuosa tamponada a pH 6,8, ($D_{6,8}$)

Tiempo (h)	D solución mg/mL	Promedio	Desviación estándar	CV(%)	Log $D_{6,8}$
1	700,69				
2	874,87				
2	812,61				
4	855,60	842,75	93,49	11,09	2,93
4	824,75				
24	987,99				

Tabla 4-136. Coeficiente de reparto ($D_{6,8}$) en n-octanol de Cloperastina a partir de una solución acuosa.

4. Ensayos *in vitro* en células Caco-2 para determinar la permeabilidad de Cloperastina

En las tablas que se presentan a continuación, se muestran las concentraciones experimentales obtenidas en el compartimento receptor, de los estudios de soluciones de Cloperastina a diferentes concentraciones. Para la estimación de la permeabilidad se utilizó, en todos los casos, la aproximación no lineal (ecuación 3-5).

Cloperastina 200 μM			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	7,21	8,51	8,36
30	17,87	14,26	16,37
60	29,88	30,77	31,06
90	34,27	37,83	35,40
Peff (cm/s)	$2,91 \cdot 10^{-05}$	$3,35 \cdot 10^{-05}$	$3,05 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$3,10 \cdot 10^{-05} \pm 2,22 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-137. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Cloperastina 200 μM en la línea celular Caco-2.

Cloperastina 100 μM			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	3,74	2,05	3,37
30	7,61	5,03	6,89
60	15,15	9,10	13,70
90	14,73	13,65	15,31
Peff (cm/s)	$2,51 \cdot 10^{-05}$	$2,27 \cdot 10^{-05}$	$2,61 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$2,46 \cdot 10^{-05} \pm 1,78 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-138. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Cloperastina 100 μM en la línea celular Caco-2.

Cloperastina 50 μM			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	1,25	1,48	2,09
30	2,90	2,74	2,55
60	5,64	5,18	4,19
90	6,02	6,07	5,99
Peff (cm/s)	$1,99 \cdot 10^{-05}$	$1,93 \cdot 10^{-05}$	$1,66 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$1,86 \cdot 10^{-05} \pm 1,80 \cdot 10^{-06}$		

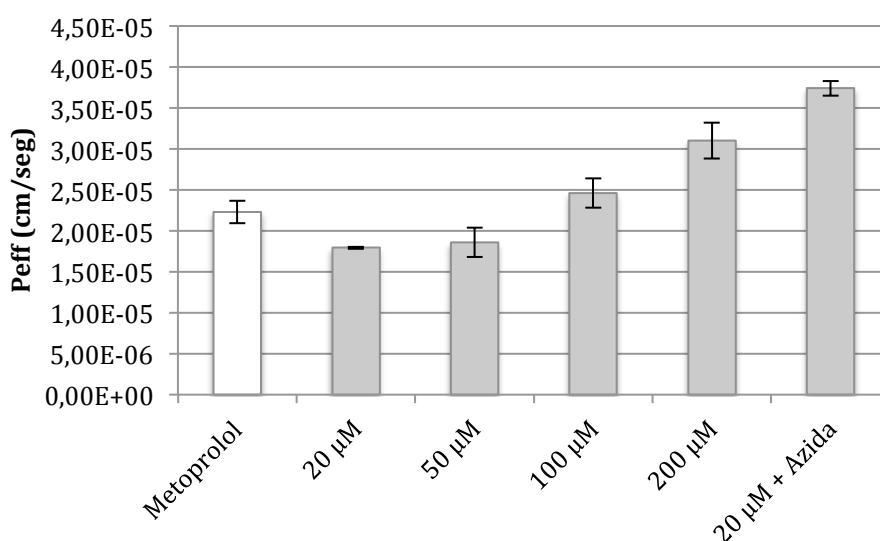
Tabla 4-139. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Cloperastina 50 μM en la línea celular Caco-2.

Cloperastina 20 μM			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,56	0,70	0,73
30	1,11	1,20	0,98
60	1,89	2,19	2,03
90	2,31	2,35	2,36
Peff (cm/s)	$1,78 \cdot 10^{-05}$	$1,79 \cdot 10^{-05}$	$1,81 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$1,79 \cdot 10^{-05} + 1,42 \cdot 10^{-07}$		

Tabla 4-140. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Cloperastina 20 μM en la línea celular Caco-2.

Cloperastina 20 μM Azida 1 mM			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,50	0,52	0,52
30	1,80	1,75	1,85
60	2,83	2,83	2,86
90	4,10	4,07	4,24
Peff (cm/s)	$3,70 \cdot 10^{-05}$	$3,67 \cdot 10^{-05}$	$3,84 \cdot 10^{-05}$
Peff+DE (cm/s)	$3,74 \cdot 10^{-05} + 8,92 \cdot 10^{-07}$		

Tabla 4-141. Concentraciones (μM) en el compartimento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Cloperastina 20 μM en presencia de Azida sódica 1 mM en la línea celular Caco-2.



Gráfica 4-47. Representación gráfica de las permeabilidades de las distintas concentraciones de Cloperastina y de la solución de Cloperastina en presencia de Azida Sódica.

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene		Sig.
		2,67	0,09
ANOVA		0,00	S

Tabla 4-142. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades apical-basolateral de las distintas concentraciones de Cloperastina (μM).

Prueba de comparación múltiple de Scheffé				
Cloperastina	200 μM	100 μM	50 μM	20 μM
200 μM	-	-	-	-
100 μM	S	-	-	-
50 μM	S	S	-	-
20 μM	S	S	NS	-
20 μM + Azida	S	S	S	S

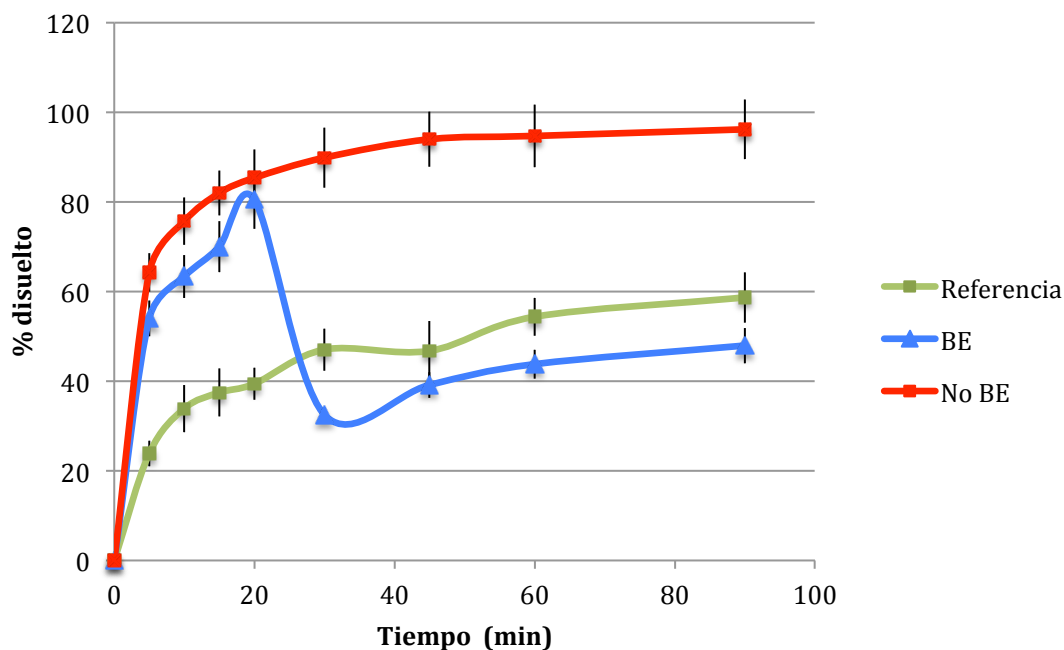
Tabla 4-143. Resultado de la comparación múltiple de permeabilidades apical-basolateral de Cloperastina a las distintas concentraciones (μM) ensayadas.

5. Perfiles de disolución

En las tablas 4-144, 4-145 y 4-146 se presentan los porcentajes disueltos promedio de Cloperastina en función del tiempo del producto de referencia, y las formulaciones BE y No BE en los medios pH 1,2; 4,5 y 6,8 descritos en la Ph.Eur.. Los perfiles de disolución correspondientes, se muestran en las gráficas 4-48, 4-49 y 4-50.

pH 1,2. Tampón 50 mM-Cloruro. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE		No BE	
	Media + DE	CV (%)	Media + DE	CV (%)	Media + DE	CV (%)
5	23,91 ± 2,88	12,03	54,03 ± 3,98	7,37	64,30 ± 4,35	6,77
10	33,92 ± 5,28	15,55	63,37 ± 4,84	7,64	75,71 ± 5,33	7,04
15	37,48 ± 5,35	14,27	70,04 ± 5,68	8,11	82,01 ± 5,06	6,17
20	39,43 ± 3,60	9,13	80,53 ± 6,53	8,11	85,39 ± 6,38	7,47
30	47,07 ± 4,72	10,04	32,51 ± 1,35	4,14	89,90 ± 6,70	7,46
45	46,78 ± 6,59	14,10	39,18 ± 2,89	7,38	94,01 ± 6,19	6,58
60	54,39 ± 4,25	7,82	43,82 ± 3,25	7,43	94,75 ± 6,96	7,35
90	58,69 ± 5,62	9,57	47,96 ± 3,96	8,26	96,22 ± 6,67	6,93

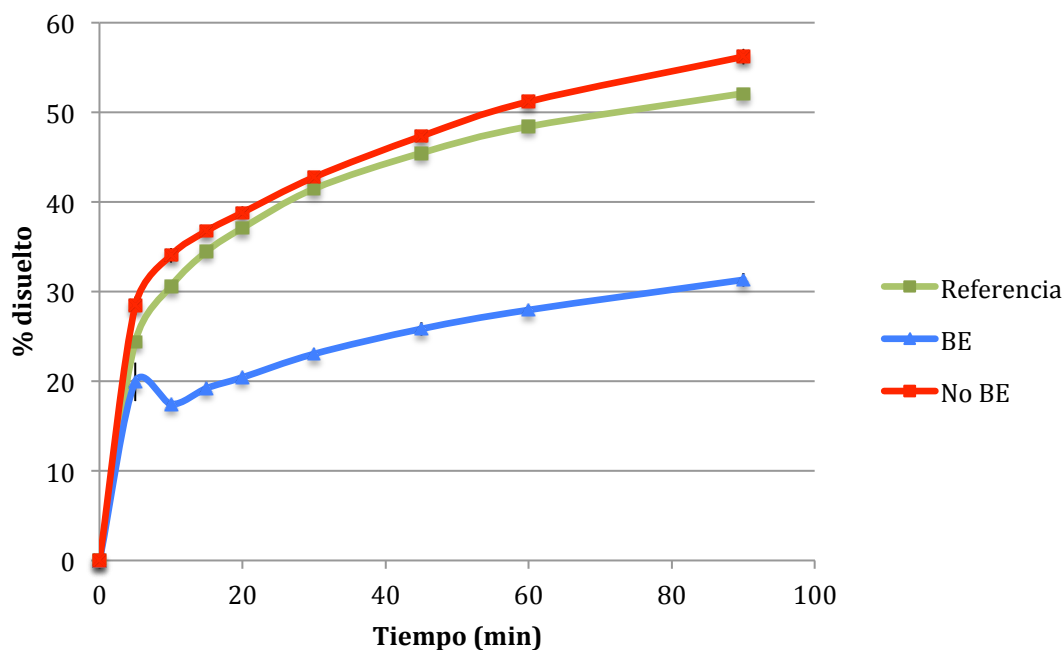
Tabla 4-144. Porcentajes disueltos de Cloperastina en función del tiempo en medio tampón pH 1,2; 50 mM de Cloruro de Sodio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-48. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE y No BE de Cloperastina a pH 1,2; tampón 50 mM (Cloruro). (n=6).

pH 4,5. Tampón 36,5 mM-Acetato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE		No BE	
	Media + DE	CV (%)	Media ± DE	CV (%)	Media + DE	CV (%)
5	24,40 ± 0,84	3,45	19,91 ± 2,15	10,81	28,41 ± 1,02	3,58
10	30,61 ± 0,46	1,52	17,44 ± 0,57	3,28	34,04 ± 0,80	2,34
15	34,50 ± 0,44	1,27	19,23 ± 0,66	3,42	36,78 ± 0,53	1,45
20	37,10 ± 0,50	1,35	20,43 ± 0,60	2,92	38,82 ± 0,68	1,74
30	41,48 ± 0,33	0,80	23,05 ± 0,58	2,50	42,77 ± 0,51	1,19
45	45,47 ± 0,46	1,01	25,84 ± 0,73	2,84	47,35 ± 0,49	1,03
60	48,43 ± 0,30	0,62	27,96 ± 0,53	1,88	51,21 ± 0,68	1,33
90	52,12 ± 0,51	0,98	31,32 ± 0,74	2,37	56,21 ± 0,86	1,52

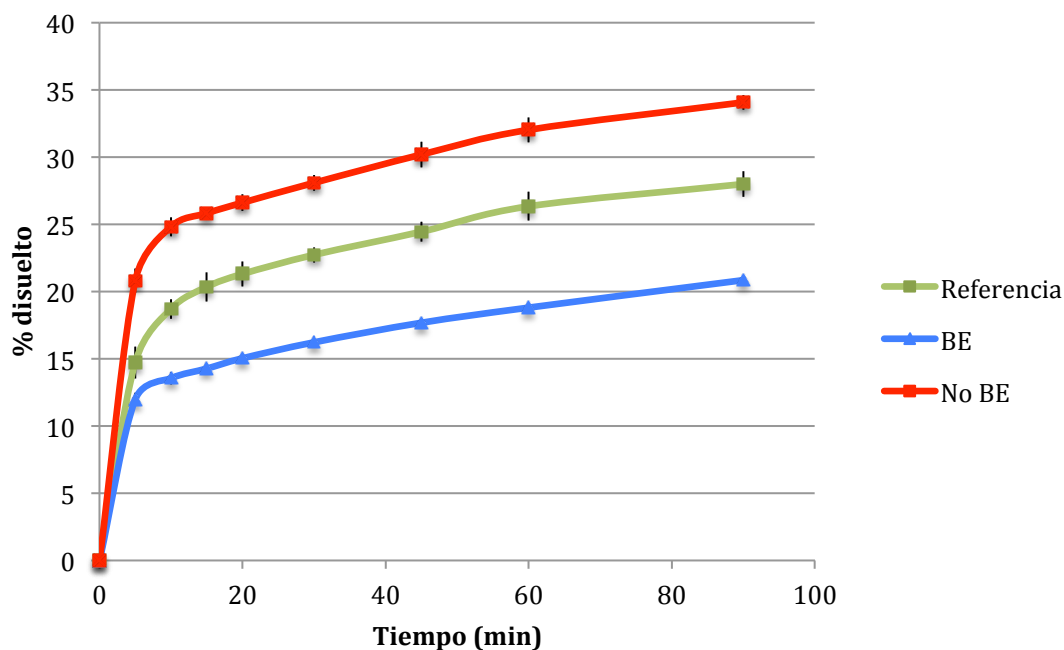
Tabla 4-145. Porcentajes disueltos de Cloperastina en función del tiempo en medio tampón pH 4,5; 36,5 mM de Acetato de Sodio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-49. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE y No BE de Cloperastina a pH 4,5; tampón 36,5 mM (Acetato). (n=6).

pH 6,8. Tampón 50 mM-Fosfato. Aparato II. 50 r.p.m.						
Tiempo (min)	Porcentaje disuelto					
	Referencia		BE		No BE	
	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)	Media \pm DE	CV (%)
5	14,72 \pm 1,18	8,04	11,98 \pm 0,49	4,08	20,81 \pm 0,90	4,31
10	18,72 \pm 0,74	3,94	13,56 \pm 0,47	3,48	24,83 \pm 0,71	2,86
15	20,35 \pm 1,09	5,34	14,27 \pm 0,33	2,35	25,83 \pm 0,43	1,66
20	21,32 \pm 0,94	4,41	15,04 \pm 0,12	0,77	26,62 \pm 0,62	2,31
30	22,74 \pm 0,57	2,53	16,23 \pm 0,23	1,41	28,10 \pm 0,59	2,11
45	24,46 \pm 0,74	3,01	17,68 \pm 0,20	1,13	30,20 \pm 0,96	3,17
60	26,35 \pm 1,06	4,04	18,81 \pm 0,28	1,47	32,04 \pm 0,93	2,90
90	28,00 \pm 0,97	3,46	20,85 \pm 0,28	1,34	34,08 \pm 0,55	1,61

Tabla 4-146. Porcentajes disueltos de Cloperastina en función del tiempo en medio tampón pH 6,8; 50 mM de Fosfato de potasio, empleando el aparato II a 50 r.p.m. (n=6).



Gráfica 4-50. Perfil de disolución comparativo producto de referencia y formulaciones BE y No BE de Cloperastina a pH 6,8; tampón 50 mM (Cloruro). (n=6).

En la tabla 4-147 se muestra el factor de similitud calculado entre el perfil de disolución del producto de referencia y los perfiles de las formulaciones BE y No BE en los tres medios estudiados.

f_2	pH 1,2	pH 4,5	pH 6,8
BE	20,90	26,41	34,33
No BE	17,86	65,91	38,84

Tabla 4-147. Factor de similitud de los perfiles de disolución de las formulaciones estudiadas de Cloperastina en los diferentes medios ensayados.

6. Ensayos *in vitro* en células Caco-2 para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de Cloperastina

Las tablas que se presentan a continuación muestran las concentraciones experimentales obtenidas en el compartimiento receptor, de los estudios de soluciones de Cloperastina preparadas a partir de los productos estudiados (Referencia, BE y No BE). Para la estimación de la permeabilidad se utilizó, en todos los casos, la aproximación no lineal (ecuación 3-5).

Cloperastina 15 μM (Referencia)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,27	0,21	0,20
30	0,42	0,42	0,51
60	0,71	0,69	1,06
90	0,81	1,10	1,04
Pe _{eff} (cm/s)	$9,29 \cdot 10^{-06}$	$1,37 \cdot 10^{-05}$	$1,43 \cdot 10^{-05}$
Pe _{eff} +DE (cm/s)	$1,25 \cdot 10^{-05} + 2,75 \cdot 10^{-06}$		

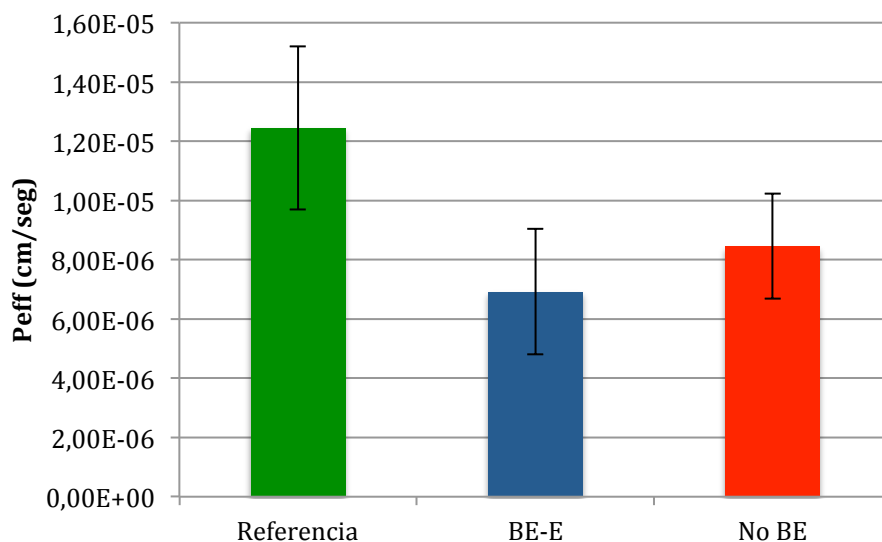
Tabla 4-148. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Cloperastina 15 μM preparada a partir del producto Referencia en la línea celular Caco-2.

Cloperastina 15 μM (BE)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,08	0,08	0,08
30	0,26	0,41	0,52
60	0,45	0,53	0,72
90	0,57	0,65	0,96
Pe _{eff} (cm/s)	$5,46 \cdot 10^{-06}$	$5,95 \cdot 10^{-06}$	$9,35 \cdot 10^{-06}$
Pe _{eff} +DE (cm/s)	$6,92 \cdot 10^{-06} + 2,12 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-149. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Cloperastina 15 μM preparada a partir de la formulación BE en la línea celular Caco-2.

Cloperastina 15 μM (No BE)			
Tiempo (min)	Concentraciones (μM). Transporte apical-basal		
	1	2	3
15	0,13	0,18	1,75
30	0,22	0,33	1,97
60	0,66	0,73	2,19
90	0,85	0,93	1,84
Pe _{eff} (cm/s)	$9,33 \cdot 10^{-06}$	$9,62 \cdot 10^{-06}$	$6,42 \cdot 10^{-06}$
Pe _{eff} +DE (cm/s)	$8,45 \cdot 10^{-06} + 1,77 \cdot 10^{-06}$		

Tabla 4-150. Concentraciones (μM) en el compartimiento receptor a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas con una solución de Cloperastina 15 μM preparada a partir de la formulación No BE en la línea celular Caco-2.



Gráfica 4-51. Representación gráfica comparativa de la permeabilidad de las distintas formulaciones de Cloperastina.

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	0,98	0,45	NS
ANOVA		0,07	NS

Tabla 4-151. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las permeabilidades apical-basolateral de las distintas formulaciones de Cloperastina (μM).

7. Ensayo *in situ* para determinar el efecto de la formulación sobre la permeabilidad de Cloperastina

En las tablas presentadas a continuación se pueden observar los resultados experimentales individuales realizados en el modelo *in situ* con soluciones preparadas a partir de los tres productos de Cloperastina estudiados.

Concentración remanente de Cloperastina en lumen intestinal							
Concentración inicial perfundida: 9 µg/mL (Referencia)							
Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	3,13	3,05	4,58	3,54	3,79	3,62	0,62
10	2,34	2,26	3,44	2,77	3,08	2,78	0,50
15	1,79	1,60	2,60	2,06	2,41	2,09	0,42
20	1,73	0,88	0,77	1,92	2,08	1,48	0,61
25	0,76	0,66	0,41	0,77	1,90	0,90	0,58
30	0,83	0,63	0,51	0,85	1,98	0,96	0,59
Vr (mL)	6,70	5,80	7,80	6,40	6,00	6,54	0,79
Ajuste no lineal							
Kap (h ⁻¹)	2,78	5,07	5,48	3,94	2,67	3,99	1,28
Ao (µg/mL)	3,33	4,42	7,45	4,79	4,32	4,86	1,54

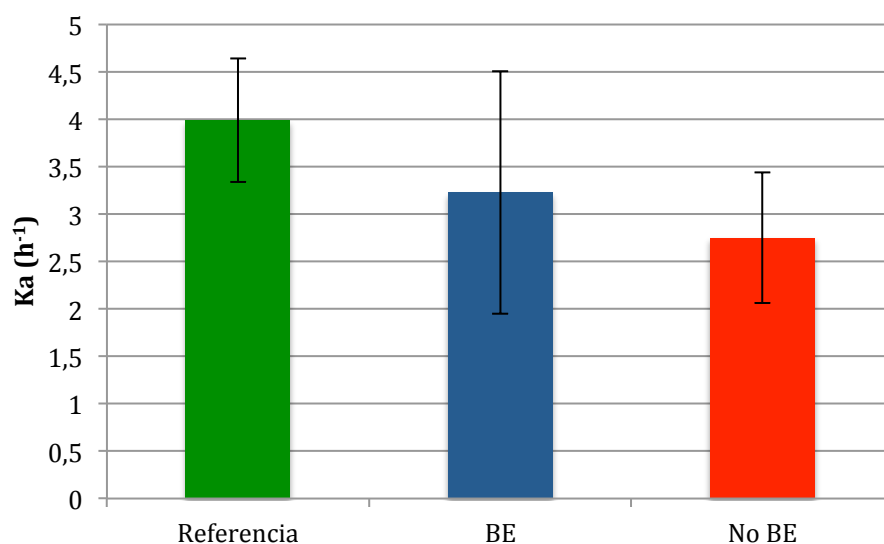
Tabla 4-152. Concentración de Cloperastina remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Cloperastina a una concentración de 9 µg/mL preparada a partir del producto de Referencia.

Concentración remanente de Cloperastina en lumen intestinal							
Concentración inicial perfundida: 10 µg/mL (BE)							
Volumen inicial perfundido: 10 mL							
Tiempo (minutos)	Animales					Promedio	± DE
	1	2	3	4	5		
5	3,43	5,18	4,73	5,41	4,29	4,61	0,79
10	4,48	4,21	3,42	3,87	3,17	3,83	0,54
15	3,24	3,30	2,76	2,49	2,40	2,84	0,42
20	2,46	2,74	2,22	2,30	2,26	2,40	0,21
25	2,22	2,24	1,80	1,78	1,69	1,95	0,26
30	2,41	1,98	1,68	1,68	1,78	1,91	0,31
Vr (mL)	5,80	6,90	6,70	6,90	5,10	6,28	0,80
Ajuste no lineal							
Kap (h ⁻¹)	2,18	2,93	3,66	3,88	3,53	3,23	0,69
Ao (µg/mL)	4,55	6,35	6,21	7,01	5,13	5,85	0,99

Tabla 4-153. Concentración de Cloperastina remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Cloperastina a una concentración de 10 µg/mL preparada a partir de la formulación BE.

Concentración remanente de Cloperastina en lumen intestinal								
Concentración inicial perfundida: 9 µg/mL (No BE)								
Volumen inicial perfundido: 10 mL								
Tiempo (minutos)	Animales						Promedio	± DE
	1	2	3	4	5	6		
5	5,65	4,85	4,45	4,33	5,18	3,45	4,65	0,76
10	4,12	4,03	3,50	4,33	4,17	3,13	3,88	0,46
15	3,12	3,38	3,06	2,65	3,50	2,37	3,01	0,43
20	3,31	3,04	2,80	2,88	3,22	2,12	2,90	0,43
25	2,60	2,62	2,54	0,94	2,66	1,67	2,17	0,71
30	2,69	2,66	2,50	2,46	2,69	1,59	2,43	0,42
Vr (mL)	5,00	5,20	6,00	5,00	6,90	6,20	5,72	0,78
Ajuste no lineal								
Kap (h ⁻¹)	3,28	2,72	2,36	3,12	2,34	2,68	2,75	0,39
Ao (µg/mL)	6,57	5,61	4,97	5,38	5,95	4,16	5,44	0,83

Tabla 4-154. Concentración de Cloperastina remanente (µg/mL) en el lumen intestinal a distintos tiempos de muestreo, obtenidos tras la perfusión de una solución de Cloperastina a una concentración de 9 µg/mL preparada a partir de la formulación No BE.



Gráfica 4-52. Representación gráfica comparativa de las constantes de absorción de Cloperastina de las distintas formulaciones estudiadas y de la solución del fármaco en el modelo in situ.

Pruebas estadísticas			
Prueba de homogeneidad de varianzas	Estadístico de Levene	p-valor	Sig.
	1,11	0,37	NS
ANOVA		0,42	NS

Tabla 4-155. Prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondiente a las constantes de absorción en el modelo in situ de las distintas formulaciones de Cloperastina (µM).

5. Discusión

A. Compuestos ensayados

El desarrollo de genéricos es esencial para la obtención de medicamentos menos costosos pero con las mismas garantías de calidad y efectividad.

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, publicado por Gordon Amidon y cols. en 1995, se basa en un sólido fundamento científico para clasificar un fármaco considerando los parámetros de solubilidad y permeabilidad, factores estrechamente relacionados con el proceso de absorción, y plantea como objetivo, la selección de la metodología adecuada para establecer la bioequivalencia y determinar cuando es posible sustituir los ensayos realizados en humanos por ensayos de disolución *in vitro*, de acuerdo con la clasificación obtenida para el fármaco. Actualmente la aplicación regulatoria del SCB está enfocada a los estudios de bioequivalencia para demostrar intercambiabilidad de medicamentos, presentados en formas sólidas orales de liberación inmediata, y al aseguramiento de que los cambios realizados durante el escalado industrial o los cambios post-registro en las formulaciones o en el proceso de fabricación una vez aprobados, no tengan incidencia en su comportamiento *in vivo*.

Este trabajo de investigación forma parte de un proyecto cuyo objetivo final consiste en dar respuesta *in vitro* a los ensayos de bioequivalencia que resultaron ser un éxito o un fracaso. El objetivo es encontrar modelos *in vitro* o *in situ* que permitan predecir el comportamiento en los estudios con voluntarios sanos. Para ello se necesita la optimización de metodologías que permitan predecir la absorción oral de fármacos.

Por sugerencia de la Agencia Española de Medicamentos se inicia el estudio de formulaciones de Zolpidem hemitartrato, Pravastatina sódica y Cloperastina fendizoato. Los fármacos fueron seleccionados por pertenecer cada uno de ellos a una clase distinta según el SCB y disponer de los datos del estudio de Bioequivalencia en humanos, así como la cooperación de las empresas de genéricos involucradas en el proyecto para aportar sus formulaciones estudiadas.

B. Diseño de estudios

De los compuestos seleccionados se disponía de información previa, no sólo de sus características fisicoquímicas, sino también de su capacidad de absorción o de su fracción oral absorbida.

1. Diseño de estudios para cálculo de la solubilidad del fármaco

El estudio de solubilidad se realizó para calcular el número de dosis que permitió confirmar la clasificación de alta o baja solubilidad de cada fármaco estudiado.

2. Diseño de estudio para el cálculo de la lipofilia del fármaco

El coeficiente de reparto se ha determinado mediante un método *in vitro* que puede predecir el proceso de reparto *in vivo* en la membrana biológica, ya que este último no es accesible a la determinación experimental. Puesto que el proceso de absorción se inicia con la difusión en una membrana de carácter lipófilo, es fácil comprender que esta característica físico-química ha de tener gran importancia en este proceso.

Se ha determinado el coeficiente de reparto en n-octanol como disolvente, obteniéndose así un índice clásico de lipofilia. Dicho sistema está ampliamente validado por su capacidad de reproducir el reparto en las membranas biológicas.

Gracias a que se disponía previamente de correlaciones entre absorción y lipofilia en modelos animales y modelos celulares *in vitro* así como de correlaciones entre los parámetros de absorción de estos modelos y la fracción oral absorbida, ha sido posible realizar una clasificación provisional de la permeabilidad de los fármacos ensayados en base únicamente a este parámetro fisicoquímico al compararlo con otras sustancias de lipofilia conocida y fracción oral absorbida conocida.

3. Diseño de estudios de disolución

Los estudios de disolución se realizaron en el aparato II (Ph.Eur.), que es el habitualmente usado en la industria farmacéutica. El objetivo en este sentido fue ensayar diferentes medios de disolución a fin de encontrar uno que predijera los parámetros farmacocinéticos obtenidos en los estudios de bioequivalencia. Se emplearon los medios recomendados por la guía de bioequivalencia de la EMA y que están descritos en la Ph.Eur.. Se estudiaron además medios a diferentes valores de pH (dentro del ámbito fisiológico del tracto gastrointestinal) usando las sales y concentraciones establecidas en la Ph.Eur.. También se realizaron ensayos utilizando alguno de los medios biopredictivos (medios de baja concentración iónica) descritos en el capítulo de Materiales y Métodos de esta Tesis Doctoral.

4. Estudio de permeabilidad

El estudio de la permeabilidad y la comparación entre una técnica *in situ* en rata y un sistema *in vitro*, es más sencillo y por tanto adecuado para el cribado rápido, pero con las limitaciones derivadas de estar más alejado de la realidad fisiológica.

4.1. Técnica *in vitro*

El desarrollo de técnicas *in vitro* para el estudio de la permeabilidad intestinal ha constituido uno de los grandes avances de la Biofarmacia en los últimos años. Las monocapas de células de carcinoma de colon humano presentan la ventaja de crecer de forma polarizada formando una monocapa de características muy similares a la barrera intestinal. Estas células expresan además muchos de los portadores intestinales incluidos los portadores de secreción como la Glicoproteína P y MRP2 y, por lo tanto, constituye un buen modelo para caracterizar procesos de absorción y secreción activa.

Este modelo *in vitro* presenta la ventaja de ser más adecuado para el análisis simultáneo de un número elevado de moléculas (high-throughput screening), pero como todos los métodos *in vitro* pierde algunas de las

características propias de la realidad fisiológica que concurren en el animal completo, como puede ser la capa de mucus, la presencia de los movimientos peristálticos o de las secreciones intestinales. Tal y como se representa en la Figura 5-1 la simplificación de un sistema experimental conlleva ventajas pero también inconvenientes frente al uso de animales.

Aproximaciones experimentales en el estudio de la absorción intestinal

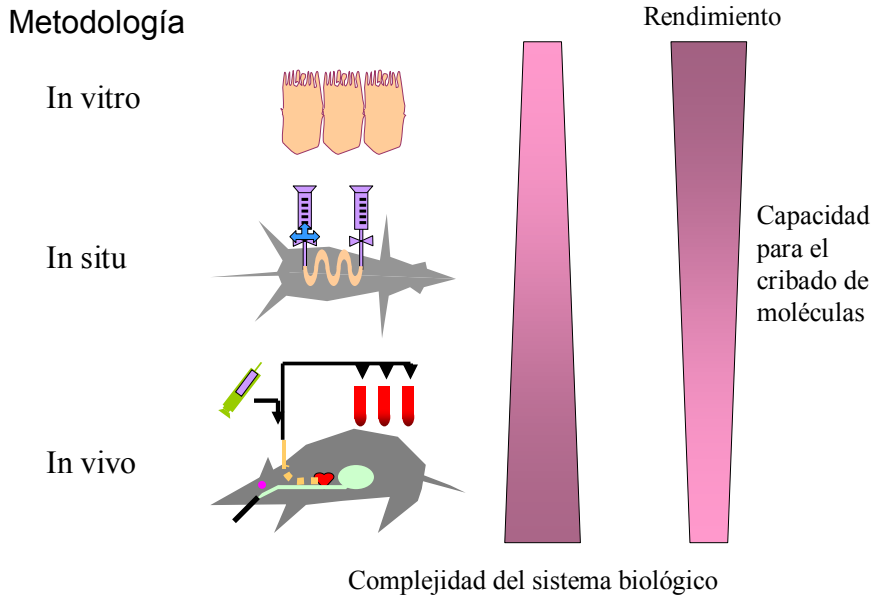


Figura 5-1. Esquema de ventajas e inconvenientes de los distintos sistemas experimentales

Otra razón para usar el modelo *in vitro*, es la necesidad de disminuir el uso de animales de experimentación, en aquellos casos en que un modelo alternativo permita obtener resultados fiables y representativos del fenómeno estudiado *in vivo*. En el año 1959, Russell y Burch describieron en su tratado “Principios de Técnicas de Experimentación Humanitaria” el famoso lema de las tres R: reducción, refinamiento y reemplazo.

- Reemplazo: Implica la sustitución de los animales por otros métodos alternativos de investigación (178).
- Reducción: El concepto de reducir no es más que minimizar el número de animales utilizados obteniendo la misma información con menos animales o más información usando el mismo número menor de animales. Esta reducción se consigue a través de un diseño experimental y análisis estadístico adecuado.

- Refinamiento: El refinamiento consiste en conseguir que los métodos y técnicas utilizadas produzcan al animal el menor sufrimiento posible. También consiste en utilizar técnicas más refinadas que nos permitan obtener datos más exactos y mayor número de información, de esta forma necesitaremos menor número de experimentos para nuestro objetivo científico.

De todos los posibles modelos establecidos para el estudio de la permeabilidad intestinal se seleccionó el modelo Caco-2 por ser el más ampliamente validado para la caracterización de la permeabilidad por difusión pasiva. A pesar de su tasa de crecimiento más lenta frente a otras células como las MDCK (21 frente a 4 días para alcanzar la confluencia), su capacidad de expresión de los sistemas transportadores es más elevada así como su similitud con el intestino de la rata que es el modelo animal de contraste, en concreto, respecto a valores de permeabilidad paracelular.

El protocolo de trabajo utilizado mantiene el mismo pH en la cámara dadora y en la receptora, tanto en un sentido de transporte como en el otro. Determinados autores utilizan un pH en la cámara apical de 6,20 ya que consideran que ese valor se aproxima más al valor fisiológico en duodeno y yeyuno que son los lugares de absorción mayoritarios. No obstante se ha considerado que dado que los experimentos realizados en rata *in situ* se realizaran a pH 7,00 era más adecuado mantener las mismas condiciones de ionización del compuesto ensayado para no incorporar más causas de variabilidad entre los dos sistemas que dificultaran la comparación de resultados. Tampoco se han añadido proteínas (albúmina) en la cara basolateral porque el objetivo del trabajo no es determinar si existe unión del fármaco a proteínas plasmática.

Todas las soluciones usadas en los ensayos tenían una osmolaridad promedio de 300 ± 10 miliosmoles (datos no mostrados), por lo que se consideran isotónicas.

Por otra parte los balances finales de masas realizados siempre dieron resultados satisfactorios sin que se haya producido una adsorción considerable del compuesto a los componentes plásticos del sistema.

4.2. Técnica *in situ*

Como parámetro representativo del proceso de absorción se ha utilizado la constante aparente de velocidad de absorción (k_{ap}), ya que es un índice de la velocidad de absorción intrínseca del soluto ($k_{ap} = (dA/dt)/A$). Esta constante aparente ha sido determinada *in situ* por el método de Doluisio y colaboradores. Este método se lleva a cabo sin recirculación, lo que evita la desorganización de la capa acuosa de difusión adyacente a la membrana. En el caso de que se produjese

este hecho, se alterarían las condiciones fisiológicas, que son imprescindibles para obtener la información más exacta posible a partir del ensayo.

Por otra parte se ha elegido este método porque se considera que, en general, los procedimientos *in situ* reproducen con más fiabilidad los procesos de absorción que tienen lugar *in vivo*. El volumen perfundido permanece todo el tiempo de ensayo (30 minutos) en contacto con la mucosa intestinal, por lo que el rendimiento de la absorción es mayor que el obtenido por otras técnicas, en las cuales el contacto fluido-mucosa es intermitente. Puesto que se realiza *in situ* permite un muestreo cómodo y reproducible. Además se mantienen condiciones de flujo sanguíneo e integridad tisular similares a las que prevalecen *in vivo*.

Al igual que en el estudio de permeabilidad *in vitro*, las soluciones usadas en los ensayos *in situ* fueron isotónicas, con una osmolaridad de 300 ± 10 miliosmoles (datos no mostrados).

El método de trabajo empleado hace posible la obtención de constantes aparentes de velocidad de absorción sin que éstas estén limitadas por la disolución ni por otros factores físico-químicos o biológicos (como ocurre *in vivo* con el vaciado gástrico para compuestos de elevada velocidad de absorción). A su vez es posible transformar las constantes aparentes de velocidad de absorción de primer orden en valores de permeabilidad intestinal efectiva con el fin de posibilitar la comparación con los valores obtenidos utilizando técnicas *in vitro* y con los valores habituales referenciados en la bibliografía. La transformación de constantes en permeabilidades se realiza tomando como referencia la longitud intestinal media y el volumen perfundido de disolución.

La constante obtenida así como el valor de permeabilidad permite cuantificar el proceso de absorción en cada una de las situaciones analizadas (diferentes formulaciones).

Paralelamente al proceso de absorción del fármaco, en el tracto gastrointestinal se produce un proceso de reabsorción de agua. Este proceso sigue una cinética de orden cero (177). Es necesaria su cuantificación, ya que el volumen de agua reabsorbido falsea por exceso las concentraciones del fármaco en lumen intestinal, sobre todo en las últimas muestras del ensayo, lo que origina constante de velocidad de absorción falseada por defecto. Este problema se ha solucionado corrigiendo individualmente la concentración de cada una de las muestras, en función del volumen de líquido remanente.

C. Métodos analíticos

La valoración de los fármacos se ha realizado por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), excepto en los perfiles de disolución de Zolpidem y Pravastatina en los que se usó el método espectrofotométrico. Los métodos analíticos fueron validados previamente en nuestro laboratorio.

La detección se ha realizado mediante un detector Ultravioleta-Visible gracias a la capacidad que presenta los compuestos en estudio (Zolpidem, Pravastatina y Cloperastina) de absorber a longitudes de onda de 245, 238 y 227 nm, respectivamente. Estas longitudes de onda se eligieron mediante barrido previo en el espectrofotómetro para seleccionar la longitud de máxima absorción. Esto dota de gran selectividad a la técnica, que ya reduce al mínimo la posible interferencia de compuestos endógenos presentes en las muestras biológicas que no poseen capacidad de absorción a estas longitudes de onda.

Los ensayos con Metoprolol se valoraron mediante detector de fluorescencia con unas longitudes de onda de excitación 231 nm y de emisión 307 nm, validado previamente por el grupo de trabajo de la Universidad Miguel Hernández (177).

Los resultados de la validación del método analítico se detallan en las tablas 4-1 a 4-3 para Zolpidem, en las tablas 4-59 a 4-61 para Pravastatina y en las tablas 4-130 a 4-132 para Cloperastina cuando las muestras se analizaron por HPLC y en las tablas 4-4 y 4-5 para Zolpidem y 4-62 y 4-63 para Pravastatina cuando las muestras se analizaron por espectrofotometría. Las concentraciones ensayadas se encontraron en todo momento por encima del límite de detección del método y dentro del ámbito de las rectas de calibración. Por otro lado la precisión y exactitud de los métodos analíticos se mantuvieron dentro de los límites recomendados.

D. Interpretación de resultados

1. Zolpidem

1.1. Concentración de saturación

El perfil solubilidad-pH que se muestra en la gráfica 4-1, presenta una mayor solubilidad a pH ácido que va disminuyendo conforme aumenta el pH, como se preveía para una base débil ionizable como es el Zolpidem. El número de dosis al pH de menor solubilidad es menor que 1, por lo que el fármaco se clasifica como fármaco de alta solubilidad.

1.2. Coeficiente de reparto

Se ha determinado el coeficiente de reparto para obtener el valor de lipofilia del fármaco. Dicho valor se utilizó para predecir la capacidad de absorción de Zolpidem a partir de las correlaciones absorción-lipofilia previamente establecidas en nuestro departamento.

Los valores se obtuvieron con una relación de volúmenes de fase acuosa-fase orgánica 65:35 para Zolpidem. En todos los casos los valores fueron similares lo que indica que no se produjo ningún fenómeno de saturación que falseara los resultados (Tabla 4-7).

El valor obtenido de Log $D_{6,8}$ para el Zolpidem ha sido de 2,34 que es mayor que el aportado para el Metoprolol (Log $D_{7,0} = -0,62$) (179). Ello permite clasificar provisionalmente al Zolpidem como una sustancia de alta permeabilidad.

1.3. Perfiles de disolución

Con los valores de cantidades disueltas frente al tiempo obtenidos tras realizar los ensayos de disolución de las diferentes formulaciones estudiadas de Zolpidem se debería calcular el valor f_2 . Dicho tratamiento estadístico no se ha realizado para ninguno de los ensayos de disolución llevado a cabo con las formulaciones de Zolpidem ya que en todos los casos y para todas las formulaciones el porcentaje disuelto fue mayor al 85% antes de los 20 minutos, como se puede observar en las tablas 4-14 a 4-24. Los perfiles de disolución correspondientes (gráficas 4-3 a 4-13) permiten observar que los perfiles prácticamente se superponen y por tanto, ninguno de los medios estudiados permite predecir el comportamiento de baja $C_{máx}$ que se observó en pacientes con la formulación BE-B en comparación con el producto de Referencia. La formulación bioequivalente (BE), también presentó perfiles similares a los del producto de Referencia.

En este caso, tanto los medios recomendados en el anexo sobre bioexenciones de la guía de bioequivalencia de la EMA de alta concentración iónica como los medios a diferentes pH descritos en la Ph.Eur. y los de baja concentración iónica, no fueron capaces de predecir las sutiles diferencias que presenta la formulación BE-B con respecto al producto de Referencia, que aún siendo una formulación bioequivalente en AUC, el valor de $C_{máx}$ es ligeramente inferior al obtenido tras la administración del producto de referencia en voluntarios sanos.

1.4. Ensayo de permeabilidad

a) Ensayos in vitro

En la primera fase de este trabajo de investigación se han perfundido en monocapas celulares Caco-2 cuatro concentraciones distintas de Zolpidem, con el fin de corroborar la clasificación del fármaco como Clase 1 y determinar el tipo de transporte implicado en el paso de Zolpidem a través de la membrana intestinal.

Las concentraciones de fármaco ensayadas se seleccionaron a partir de la dosis utilizada en clínica (52 μM). La concentración de 120 μM corresponde a la máxima concentración que se pudo disolver. A partir de estas concentraciones se

seleccionaron concentraciones inferiores con un orden de magnitud de diferencia, teniendo en cuenta los límites de detección de la técnica analítica empleada.

Además de poner de manifiesto la presencia de linealidad o no en la absorción de Zolpidem en el ámbito de concentraciones estudiado, se decidió investigar acerca de las características del posible transportador implicado y su perfil cinético-dinámico. Para ello se seleccionó Azida Sódica como inhibidor inespecífico de cualquier transporte activo. La Azida Sódica es un inhibidor metabólico que actúa a nivel mitocondrial produciendo una inhibición en la síntesis de ATP. Si el portador implicado en el transporte intestinal del compuesto es dependiente de energía, la Azida Sódica inhibiría este transporte al bloquear la fuente de energía responsable del mismo. En el caso de que este portador funcione como consecuencia de un gradiente o intercambio iónico producido por otro transporte dependiente de energía, igualmente y de forma indirecta la Azida Sódica inhibirá el transporte del compuesto.

Se ensayó una concentración de Azida Sódica (1mM) en presencia de la concentración de 12 μ M de Zolpidem con el fin de anular los transportadores implicados porque ya se demostró previamente por nuestro grupo de trabajo que esa concentración de inhibidor era capaz de depleccionar completamente el ATP (180). Las permeabilidades obtenidas en presencia y en ausencia de Azida sódica se detallan en las tablas 4-8 a 4-12.

El análisis de varianza de una vía realizado sobre las permeabilidades obtenidas a las cuatro concentraciones de Zolpidem ensayadas y una de ellas en presencia de Azida Sódica no mostró diferencias significativas (ver tabla 4-13). Estos resultados concuerdan con los publicados previamente por otro grupo de trabajo y permiten concluir que en el ámbito de concentraciones ensayadas la cinética de absorción del Zolpidem es de primer orden por lo que su absorción es pasiva (181).

Una vez obtenida la evidencia experimental de la existencia de un proceso lineal en la cinética de absorción del compuesto, se realizaron comparaciones entre los el producto de Referencia de Zolpidem y las dos formulaciones estudiadas.

Los resultados de las permeabilidades obtenidas con los ensayos de los medicamentos Referencia y genéricos se muestran en las tablas 4-25 a 4-27 y en la gráfica 4-14. La prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor mostraron que no existían diferencias significativas entre las formulaciones ensayadas (tabla 4-28). Las sutiles diferencias apreciadas *in vivo* donde las formulaciones son BE pero una de ellas tiene los valores de Cmax ligeramente inferiores no se aprecian en este ensayo.

b) Ensayos in situ

La constante de velocidad de absorción se ha obtenido mediante la técnica de perfusión *in situ* descrita por Doluisio y colaboradores, detallada con

anterioridad. Este método mantiene la funcionalidad de la capa acuosa de difusión y por tanto reproduce las condiciones fisiológicas.

Con el fin de obtener las constantes aparentes en cada una de las condiciones de ensayo se ha asumido una cinética de primer orden aparente en cada caso. Por tanto, se ha ajustado una ecuación monoexponencial a los datos de concentración remanente en lumen frente al tiempo. La concentración inicial no se introduce en la regresión para evitar la interferencia del proceso de dilución y de adsorción a la membrana intestinal. Los datos de concentración remanente en lumen se corrigieron para el proceso de reabsorción de agua, que según se ha demostrado en trabajos anteriores sigue una cinética de orden cero. Es necesario este proceso de reabsorción ya que si no falsearíamos por defecto los datos de k_a obtenidos (177).

Los coeficientes de correlación de las regresiones no lineales de concentración frente a tiempo son excelentes para todas las formulaciones perfundidas obteniéndose valores de k_a superiores a $3,5 \text{ h}^{-1}$ (tablas 4-29, 4-30 y 4-31).

Las pruebas estadísticas (tabla 4-32) demostraron que no existen diferencias significativas entre los valores de k_a obtenidos para las formulaciones ensayadas aunque como se aprecia en la grafica 4-15, el genérico BE-B presenta una menor permeabilidad.

c) Estudios del efecto de los excipientes

En general, los estudios sobre biodisponibilidad asumen que la mayoría de los excipientes son inertes y no se tiene en cuenta cómo pueden afectar al rendimiento del fármaco. Para la mayoría de los excipientes, su ausencia de efecto en la absorción no ha sido comprobada científicamente; de hecho, algunos estudios ponen en evidencia cambios en la absorción de fármacos debidos a excipientes. En estudios realizados en el modelo *in vitro* Caco-2 se ha observado que los excipientes modifican la permeabilidad de los fármacos (98, 182-184). En otros modelos se ha demostrado que la ruta paracelular de absorción se ve afectada por la presencia de algunos excipientes (99). Otros excipientes inhiben la actividad de secreción de la glicoproteína P (provocando un aumento de la permeabilidad de fármacos sustrato de esta enzima) (110), así como afectan la secreción provocada por el transportador MRP-2 (95).

Para esclarecer si los excipientes afectaban al proceso de absorción de Zolpidem se realizaron ensayos de Zolpidem (fármaco) en presencia de los distintos excipientes por separado. Los resultados se detallan en las tablas 4-33 a 4-37 donde se muestran las permeabilidades de Zolpidem en presencia de PEG 400, PEG 6000, TiO_2 y Talco respectivamente.

Con el fin de comprobar si las diferencias son estadísticamente significativas se realizaron análisis de varianza de una vía (ANOVA, previa comprobación de la homogeneidad de varianzas) que se presentan en las tablas 4-

38 y 4-40, y su posterior comparación múltiple mediante el test de Scheffé (tablas 4-39 y 4-41). Las pruebas estadísticas muestran que sí existen diferencias significativas entre las permeabilidades obtenidas con Zolpidem sólo y las obtenidas cuando se administra con cualquiera de los excipientes estudiados (menor valor de Peff). Esto estaría de acuerdo con la hipótesis previa de que la presencia de dichos excipientes disminuyen el valor de Cmax obtenido tras la administración oral en los ensayos *in vivo* (gráficas 4-16 y 4-17).

Cuando se realizan los estudios mediante la técnica de Doluisio en intestino de rata Wistar (método más fisiológico) se obtuvieron resultados similares (tablas 4-42 a 4-47 y gráficas 4-18 y 4-19).

En ambas técnicas se pone de manifiesto que la presencia de TiO₂ disminuye la permeabilidad del Zolpidem tanto a una concentración de 5 mg/L como de 9 mg /L de concentración (gráficas 4-20 y 4-21) sin apreciarse diferencias significativas entre ambas (tablas 4-52 y 4-53).

La siguiente pregunta que surge, una vez observado este comportamiento, es si los excipientes afectan solo al Zolpidem o afectaría también la permeabilidad de un fármaco patrón de permeabilidad pasiva como Metoprolol.

Para ello se realizaron ensayos de permeabilidad de Metoprolol en presencia y ausencia de los distintos excipientes. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 4-54, 4-55 y 4-56 y el análisis muestra estadístico que sí existen diferencias significativas entre los grupos (tabla 4-57).

La comparación múltiple mediante el test de Scheffe (tabla 4-58) mostró que estas diferencias eran significativas solo en presencia de Talco. La naturaleza hidrofóbica de este agente lubricante podría dificultar, incluso a la baja concentración ensayada, el acceso del fármaco a la membrana intestinal y disminuir su velocidad de difusión hacia la membrana.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que hay un cambio en la permeabilidad del Zolpidem debido a la presencia de determinados excipientes como el Talco pero dado que en los ensayos realizados con las formulaciones completas no se detectan diferencias entre ellas, no podemos concluir que este excipiente es el causante del valor ligeramente menor de Cmax en la formulación BE-B. En proyectos futuros se podrían diseñar los experimentos de cómo se afecta el vaciado gástrico en presencia de los excipientes por separado o evaluados en conjunto.

2. Pravastatina

2.1. Concentración de saturación

El perfil de solubilidad-pH que se muestra en la gráfica 4-23 permite observar una curva que corresponde a los compuestos tipo ácido débil ionizables como la Pravastatina, donde la mínima solubilidad se observa a pH ácido. La dosis

máxima usada de Pravastatina es de 40 mg y el número de dosis, incluso en el pH de mínima solubilidad, es menor que uno, por lo que Pravastatina se puede considerar un fármaco de alta solubilidad (tablas 4-64 a 4-66).

2.2. Coeficiente de reparto

Como hemos nombrado anteriormente, el coeficiente de reparto ($D_{6,8}$) se ha determinado como método *in vitro* que haga posible predecir el proceso de reparto *in vivo* en la membrana biológica.

Los valores se obtuvieron con una relación de volumen de fase acuosa-fase orgánica (65:35). Los ensayos se realizaron a dos concentraciones de Pravastatina (Dosis máxima/250 y dosis máxima ensayada en cultivos celulares de monocapas Caco-2). En todos los casos los valores fueron similares lo que indica que no se produjo ningún fenómeno de saturación que falseara los resultados (tabla 4-67).

El valor obtenido de Log $D_{6,8}$ para la Pravastatina ha sido de -0,16 que es mayor que el reportado para Metoprolol ($D_{7,0} = -0,62$) (179). Por ello no se puede clasificar provisionalmente a la Pravastatina como una sustancia de baja permeabilidad. Esta discrepancia respecto al resultado obtenido en los ensayos *in vitro* e *in situ* puede deberse a que la Pravastatina es sustrato de transportadores de secreción (185) lo que disminuye su permeabilidad en el sistema biológico frente a la que tendría en ausencia de este proceso gracias a su lipofilia. Esta circunstancia corrobora que la lipofilia es un parámetro fisicoquímico de utilidad para el cribado provisional de fármacos que se absorben por difusión pasiva pero puede dar resultados erróneos si en el proceso de absorción están implicados mecanismos mediados por portadores.

2.3. Ensayo de disolución

En los estudios de disolución de comprimidos de Pravastatina, como se puede observar en las tablas de 4-67 a 4-87, la formulación BE-A se disuelve más del 85% a los 10 minutos, por lo que no es necesario calcular el factor de similitud f_2 en ninguno de los medios estudiados. Las gráficas 4-25 a 4-36 muestran que los perfiles de disolución del producto de Referencia y de la formulación BE-A tienen curvas muy similares por lo que los medios estudiados con diferentes condiciones (pH, fuerza iónica) no explican el pequeño aumento del valor de $C_{máx}$ observado en el ensayo de bioequivalencia cuando se administra la formulación BE-A.

Los perfiles de disolución de la formulación BE (gráficas 4-25 a 4-36), presentan curvas que difieren de las obtenidas para el producto de Referencia en todos los medios estudiados. Tal y como se observa en la tabla 4-88, el factor de similitud (f_2) en todos los medios, muestra que las curvas del producto Referencia y la formulación BE son distintas, situación contraria a lo observado en el estudio *in vivo*. Sin embargo, también se puede observar que en todos los medios, la

formulación BE se disolvía 85% o más en 30 minutos. La Pravastatina es un fármaco poco permeable, por lo que cabe la posibilidad que aunque el producto BE no se disuelve a la misma velocidad que el producto de referencia, la cantidad disuelta que llega al intestino una vez realizado el vaciado gástrico está disponible para su absorción y la baja disolución en la fase inicial del perfil no se ve reflejada en el perfil farmacocinético. Tal como ocurre con todos los fármacos de alta solubilidad, no existe correlación entre la velocidad de disolución *in vitro* e *in vivo* y la única inferencia posible es que si no hay diferencias *in vitro* no las habrá *in vivo*, pero si hay diferencia *in vitro* no se puede extraer ninguna conclusión sobre lo que ocurrirá *in vivo*.

2.4. Ensayos de permeabilidad

a) Ensayos *in vitro*

En la primera fase del estudio de permeabilidad de Pravastatina se han perfundido, en monocapas celulares Caco-2, cuatro concentraciones distintas del fármaco, con el fin de poner de manifiesto la clasificación del fármaco como Clase III según el SCB y determinar el tipo de transporte implicado en el paso de Pravastatina a través de la membrana intestinal.

Las concentraciones de fármaco ensayadas se seleccionaron a partir de la dosis utilizada en clínica (358 μM). La concentración de 1000 μM corresponde a la máxima concentración que se podía disolver y 50 μM la mínima que se podía determinar teniendo en cuenta los límites de detección de la técnica analítica. A partir de la concentración clínica, la máxima y la mínima se intentaron seleccionar concentraciones que difirieran en un orden de magnitud para poder concluir si la absorción del fármaco a través de la membrana intestinal era o no concentración dependiente.

En las tablas 4-68 a 4-72 se detallan las concentraciones experimentales obtenidas en el compartimento receptor a cada tiempo de muestreo tras administrar distintas concentraciones de Pravastatina (fármaco). Los valores de permeabilidad disminuyen cuando la concentración de Pravastatina disminuye (grafica 4-24). Las permeabilidades apical-basal presentan diferencias significativas cuando se analizan mediante un análisis de varianza de una vía.

Todo ello responde a la existencia de un proceso de secreción que se saturaría al aumentar la concentración de Pravastatina. Como en el sentido apical basal el portador actúa en contra del proceso de transporte su saturación conduce a un incremento de la permeabilidad efectiva o aparente. Esto es, por lo tanto, el perfil típico de un fármaco sustrato de un transportador de secreción. Datos bibliográficos aportan que Pravastatina no es sustrato de P-gp y que posiblemente el transportador o transportadores implicados sean MRP2 y BCRP (185).

A continuación se ensayó la concentración más baja de Pravastatina en presencia de Azida Sódica que ya hemos explicado previamente que inhibe la

formación de ATP y, por lo tanto, los transportadores activos, tanto de secreción como de absorción, quedarían anulados (tabla 4-73).

En la tabla 4-74 se indican los resultados de la prueba ANOVA de un factor, correspondiente a los datos de permeabilidad apical-basolateral encontrándose diferencias significativas entre las condiciones ensayadas. Es por ello que se realizó a continuación la prueba de comparación múltiple de Scheffé (tabla 4-75) y se concluyó que en presencia de Azida sí existen diferencias significativas entre los datos de permeabilidad obtenidos. Por lo tanto, el o los transportadores implicados son activos.

Una vez obtenida la evidencia experimental de la existencia de un proceso no lineal en la cinética de absorción del compuesto, se realizaron comparaciones entre los comprimidos de Pravastatina comercial y los dos genéricos disponibles.

Los resultados de las permeabilidades obtenidas tras la administración de los medicamentos referencia y genéricos se muestran en las tablas 4-89, 4-90 y 4-91 y en la gráfica 4-37. Ambos genéricos eran bioequivalentes *in vivo* pero con unos valores de Cmax ligeramente superiores en el caso del genérico BE-A. Como se puede observar los modelos de monocapas celulares Caco-2 son capaces de reproducir esas ligeras diferencias en Cmax apreciadas *in vivo*, cuando se trata de fármacos de baja permeabilidad. La prueba de homogeneidad de varianzas y ANOVA de un factor correspondientes a la permeabilidad del fármaco de las distintas formulaciones mostraron que sí existían diferencias significativas entre las formulaciones (tabla 4-92). La prueba de comparación múltiple de Scheffé (tabla 4-93) determinó que estas diferencias significativas existían cuando se comparan los resultados obtenidos tras la administración de la formulación de referencia y la formulación BE-A (formulación bioequivalente pero con valores de Cmax superiores a los obtenidos tras la administración de la formulación de Referencia), lo que indica que ese ligero incremento de Cmax puede deberse a algún componente de la formulación que incrementa su permeabilidad.

b) Ensayos in situ

Este mismo estudio se realizó en el modelo animal de rata Wistar y como parámetro representativo del proceso de absorción se ha utilizado la constante aparente de velocidad de absorción (*kap*).

Los resultados obtenidos se resumen en las tablas 4-94, 4-95 y 4-96 y, como se muestra en la gráfica 4-38, la variabilidad de los resultados obtenidos es elevada.

Estos resultados son previsibles cuando el fármaco que se administra es de muy baja permeabilidad ya que las concentraciones valoradas prácticamente no varían a lo largo del tiempo.

Las pruebas estadísticas confirman que no se detectan diferencias significativas entre las permeabilidades de las formulaciones ensayadas (tabla 4-97).

c) Estudios del efecto de los excipientes

Para poder evaluar el efecto de los excipientes sobre el proceso de absorción del fármaco a través de lumen intestinal se seleccionó el modelo *in vitro* por dos motivos: el primero, explica el perfil de bioequivalencia *in vivo* obtenido tras la administración de las formulaciones a los voluntarios sanos y, el segundo, está en concordancia con la postura de la comunidad científica hacia la experimentación animal: “el principio de las 3R”: remplazar, reducir y refinar”

El estudio del efecto de los excipientes se realizó, por lo tanto, utilizando los modelos de monocapas celulares Caco-2 y los resultados se detallan en las tablas 4-98 a 4-108. Los excipientes ensayados fueron estearato de magnesio y celulosa microcristalina a diferentes concentraciones, y croscarmelosa sódica, óxido de magnesio, sílice coloidal, carbonato magnésico y lactosa. Las pruebas ANOVA de un factor y las pruebas de comparación múltiple de Scheffé se pueden observar en las tablas 4-109, 4-110, 4-111, 4-112, 4-113 y 4-114.

La prueba de estadística ANOVA de un factor (tabla 4-114, gráfica 4-42) no mostró diferencias estadísticamente significativas cuando se comparan las permeabilidades obtenidas tras la administración de Pravastatina en presencia de concentraciones crecientes de celulosa microcristalina.

Además de establecer comparaciones entre las distintas formulaciones ensayadas se pretendía profundizar en el comportamiento de los excipientes en la absorción de fármacos y por eso se compararon las permeabilidades obtenidas de Pravastatina en presencia de cada uno de ellos y Pravastatina sola. Como muestran las gráficas 4-39 y 4-40 Croscarmelosa y Lactosa aumentan significativamente la permeabilidad de Pravastatina con lo que se podría concluir que la Croscarmelosa y Lactosa afectan al mismo transportador activo de secreción que utiliza la Pravastatina. Este hecho fue corroborado estadísticamente por la prueba ANOVA de un factor y posteriormente la prueba de comparación múltiple de Scheffé (tablas 4-109 a 4-112). A la vista de los resultados se puede concluir que la concentración de Croscarmelosa y Lactosa utilizadas pueden aumentar la permeabilidad de Pravastatina alcanzándose hasta valores dobles.

Para poder dilucidar si el mecanismo por el que se produce este aumento de permeabilidad de Pravastatina en presencia de algunos excipientes, se realizó el mismo ensayo pero utilizando Metoprolol como fármaco control. Metoprolol es un conocido patrón de permeabilidad pasiva, aunque de alta permeabilidad.

Los resultados de los valores de permeabilidad obtenidos al administrar Metoprolol en presencia de los distintos excipientes se muestran en las tablas 4-115 a 4-123.

Analizando los resultados obtenidos se puede concluir que en presencia de concentraciones crecientes de estearato de magnesio la permeabilidad de Metoprolol se incrementa.

La presencia de Croscarmelosa en la solución de Metoprolol modifica la permeabilidad del patrón con lo que se podría concluir que la Croscarmelosa fluidifica la membrana. También los valores de permeabilidad obtenidos tras la administración con Lactosa o Celulosa son mas elevados que los obtenidos tras la administración de Metoprolol solo. La Lactosa parece fluidificar la membrana intestinal y, por lo tanto, favorecer el paso de sustancias a través de la misma. El mismo efecto se observa en presencia de sílice coloidal.

3. Cloperastina

3.1. Concentración de saturación

El perfil de solubilidad frente al pH mostrado en la gráfica 4-46 permite observar el comportamiento típico de una base débil ionizable, que a pH ácido presenta su máxima solubilidad, como se espera para Cloperastina.

La Cloperastina se prescribe en dosis máxima de 37,5 mg. De los números de dosis calculados a los pH 1,2; 4,5 y 6,8 (tablas de 4-133 a 4-135), se puede concluir que el fármaco es de alta solubilidad a pH 1,2 y de baja solubilidad a pH 4,5 y 6,8, por lo que no cumple con el criterio establecido por la EMA de alta solubilidad y en consecuencia se considera un fármaco de baja solubilidad.

3.2. Coeficiente de reparto

El ensayo de determinación del coeficiente de reparto en n-octanol como disolvente, para obtener la lipofilia de Cloperastina se realizó a una sola concentración de la fase acuosa por la poca solubilidad que presenta el fármaco.

El ensayo se realizó con 4 puntos de muestreo con un tiempo final de 24 horas. Los valores se obtuvieron con una relación de volúmenes de fase acuosa-fase orgánica 99:1. En todos los casos los valores fueron similares lo que indica que no se produjo ningún fenómeno de saturación que falsea los resultados (tabla 4-136).

Para la Cloperastina se obtuvo un valor de $\text{Log } D_{6,8}$ de 2,93 que es mayor que el reportado para Metoprolol (-0,62) (179). En base a esto, se puede clasificar provisionalmente a la Cloperastina como una sustancia de alta permeabilidad.

3.3. Ensayo de disolución

El ensayo de disolución no está establecido en las farmacopeas para las formas farmacéuticas líquidas, sin embargo, en el caso de suspensiones puede ser una herramienta importante para su formulación y desarrollo. En las

suspensiones de Cloperastina estudiadas, los perfiles de disolución a pH 1,2 y 6,8 con concentración iónica de 50 mM (gráficas 4-48 y 4-50, respectivamente) mostraron claramente que el producto No BE presentaba una velocidad de disolución superior que la formulación de referencia lo que se correlaciona con los datos obtenidos en el estudio de bioequivalencia en el que este producto presentó valores de $C_{máx}$ y AUC por encima de las obtenidas con el producto de referencia. Esta formulación puede presentar un mayor porcentaje disuelto, probablemente, por una mayor micronización de la sustancia activa, lo que aumenta la superficie de contacto del sólido con el solvente y se podría aumentar la solubilidad del fármaco.

A pH 4,5 y concentración iónica de 36,5 mM, los perfiles de la formulación No BE y el producto de referencia resultan similares con un $f_2 > 50$ (tabla 4-147); por lo que este medio no resulta útil para predecir las diferencias que fueron observadas en el estudio de bioequivalencia.

3.4. Ensayo de permeabilidad

a) Ensayo in vitro

Como en el estudio de los otros fármacos, en la primera fase de evaluación de la absorción de Cloperastina, se han perfundido en monocapas celulares Caco-2 distintas concentraciones del fármaco, con el fin de poner de manifiesto la clasificación del fármaco como Clase II según el SCB y determinar el tipo de transporte implicado en el paso del fármaco a través de la membrana intestinal.

El primer problema fue que la dosis utilizada en clínica (15 μ M) era la concentración mas pequeña que se pudo ensayar, según el método analítico seleccionado. Por eso motivo se ensayaron 4 concentraciones de fármaco superiores a la concentración clínica. La concentración 200 μ M corresponde a la máxima concentración que se pudo disolver.

Las tablas 4-137 a 4-140, donde se detallan las concentraciones experimentales obtenidas en el compartimento receptor tras administrar distintas concentraciones de Cloperastina (fármaco), muestran un perfil de permeabilidad concentración dependiente. La permeabilidad disminuye cuando la concentración de Cloperastina disminuye (grafica 4-47). Las pruebas estadísticas pusieron de manifiesto que existen diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas (tablas 4-142 y 4-143).

Una vez obtenida la evidencia experimental de la presencia de un proceso no lineal, se administró Cloperastina con Azida Sódica para determinar la naturaleza de los transportadores implicados (tabla 4-141). Existen diferencias significativas entre los valores de permeabilidad obtenidos para el fármaco en presencia y ausencia de Azida Sódica. Ambos resultados son consistentes con la participación de un transportador de secreción. Si bien incluso a concentraciones

pequeñas cuando el transportador no se encuentra saturado la permeabilidad de la Cloperastina es suficientemente elevada gracias a su valor de lipofilia.

Posteriormente se realizaron los estudios de cálculo de la permeabilidad intestinal *in vitro* de las distintas formulaciones (referencia y genéricos) disponibles.

Como se muestra en la grafica 4-51 los valores de permeabilidad obtenidos para todos los genéricos fueron menores que el obtenido para la referencia y no representan la realidad obtenida en los estudios en humanos.

Por este motivo se realizaron los ensayos utilizando la técnica de Doluisio, perfusión *in situ* sin recirculación en intestino delgado de rata Wistar.

b) Ensayo in situ

Los ensayos *in situ* mantienen la tendencia en permeabilidad de los obtenidos *in vitro* y no reflejan los cambios de Cmax observados en el ensayo en voluntarios humanos, por lo que no se puede concluir que el valor mayor de Cmax sea atribuible a cambios en permeabilidad debidos a los excipientes.

6. Conclusiones

1. De acuerdo con los estudios de solubilidad y permeabilidad realizados en esta memoria, Zolpidem es un fármaco de alta solubilidad y alta permeabilidad y se confirma su clasificación como tipo 1 del SCB. Pravastatina es una sustancia de alta solubilidad y baja permeabilidad que lo definen como clase 3, y Cloperastina presenta baja solubilidad y alta permeabilidad por lo que es un fármaco de la clase 2.
2. El Zolpidem, la Pravastatina y la Cloperastina presentan valores de coeficientes de reparto experimental ($\log D_{6,8}$) de 2,34, -0,16 y 2,93, respectivamente, siendo todos ellos superiores al reportado del Metoprolol ($\log D_{7,0} = -0,62$). Por tanto, este parámetro fisicoquímico de lipofilia ($\log D_{6,8}$) no permite clasificar a todos los compuestos ensayados de forma correcta en el SCB. La Pravastatina clasificada en la clase 3 con baja permeabilidad tiene un valor de lipofilia superior al del Metoprolol que lo clasificaría en la clase 1. La discrepancia puede deberse al mecanismo de secreción del que es sustrato Pravastatina mientras que para los fármacos que se absorben por difusión pasiva la lipofilia puede ser un buen índice de cribado provisional.
3. Los medios de disolución empleados para Zolpidem no han reflejado el comportamiento *in vivo* de este principio activo. Estos medios no han

detectado diferencias significativas entre las formulaciones que, aunque cumpliendo el estándar de bioequivalencia, presentan diferentes valores de C_{max}.

4. Para la Pravastatina se da el fenómeno inverso y los medios ensayados son en exceso discriminativos cuando todas las formulaciones *in vivo* han resultado bioequivalentes. Esto confirma que para los fármacos de alta solubilidad, en realidad no existe correlación entre la velocidad de disolución *in vitro* e *in vivo* y la única inferencia posible es que si no hay diferencias *in vitro* no las habrá *in vivo*, pero si hay diferencia *in vitro* no se puede extraer ninguna conclusión sobre lo que ocurrirá *in vivo*.
5. En el caso de la Cloperastina, si ha sido posible encontrar unas condiciones de disolución que reproducen la secuencia observada *in vivo*. Los medios de disolución a pH 1,2 y 6,8 en el aparato tipo 2 o de paletas a 50 rpm reflejan la misma secuencia que la observada *in vivo* en voluntarios sanos. Sin embargo, a pH 4,5 estas diferencias no se detectan debido, posiblemente, a la menor solubilidad a este pH.
6. El Zolpidem presenta *in vitro* e *in situ* un mecanismo de absorción pasiva. La Cloperastina y la Pravastatina se comportan *in vitro* e *in situ* como sustratos de un transportador de secreción.
7. El proceso de absorción de las formulaciones solo presenta diferencias significativas *in vitro* para la Pravastatina mientras que *in situ* no se observa debido a la alta variabilidad encontrada en estos ensayos. Ello demuestra que el modelo *in vitro* es más sensible al efecto de los excipientes detectando cambios que no se observan, necesariamente, en el modelo animal más complejo. El incremento en permeabilidad de la formulación de Pravastatina denominada BE-A indica que este ligero incremento en C_{max} puede deberse a algún componente de la formulación que aumenta la permeabilidad.

7. Referencias bibliográficas

1. X. Páez. Fisiología del aparato digestivo. <https://http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/32942/7/p9.pdf> (accessed Marzo, 13 2014).
2. G. Thews, E. Mutschler, and P. Vaupel. Tracto Gastrointestinal y digestión. Anatomía, Fisiología y Patología del hombre, Reverté, Barcelona, 1983, pp. 358-360.
3. J. Plá-Delfina and A. Martín Villodre. Absorción gastrointestinal. In J.M.L. José Doménech Berrozpe, José María Plá-Delfina (ed.), Biofarmacia y Farmacocinética, Vol. II, 1998.
4. S. Ballard, J. Hunter, and A. Taylor. Regulation of tight-junction permeability during nutrient absorption across the intestinal epithelium. *Annu Rev Nutr.* 15:35-55 (1995).
5. M. Mayerson. Principles of drug absorption. In C.R. GS Banker, eds (ed.), *Modern Pharmaceutics*, Marcel Dekker, Nueva York, 1995, pp. 21-74.
6. M. Jackson. Drug transport across gastrointestinal epithelia. *Physiology of the gastrointestinal tract*, Raven Press, New York, 1987, pp. 1597-1621.
7. P. Artursson and J. Karlsson. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal

- epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 175:880-885 (1991).
8. I. González-Álvarez. Estudio *in situ* e *in vitro* de los mecanismos de absorción y secreción intestinal del 3' metilciprofloxacino, *D134-Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica*, Universitat de València, Burjasot, 2003.
 9. A. Sanchez-Pico, J.E. Peris-Ribera, C. Toledano, F. Torres-Molina, V.G. Casabo, A. Martin-Villodre, and J.M. Pla-Delfina. Non-linear intestinal absorption kinetics of cefadroxil in the rat. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 41:179-185 (1989).
 10. J. Plá Delfina, J. Pérez Buendía, V. Casabó, and A. Martín Villodre. Absorption-partition relationships for true homologous series of compounds as a possible approach to study mechanisms of surfactants in absorption I. *Int J Pharm*. 37:49-64 (1987).
 11. E. Cormet-Boyaka, J. Huneau, and A. Mondrelle. Secretion of parfloxacin from the human intestinal Caco-2 cell line is altered by P-glycoprotein inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 42:2607-2611 (1988).
 12. I. Carlstedt, J.K. Sheehan, A.P. Corfield, and J.T. Gallagher. Mucous glycoproteins: a gel of a problem. *Essays in biochemistry*. 20:40-76 (1985).
 13. Y.F. Shiau, P. Fernandez, M.J. Jackson, and S. McMonagle. Mechanisms maintaining a low-pH microclimate in the intestine. *The American journal of physiology*. 248:608-617 (1985).
 14. S. Singer and G. Nicolson. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175:720-731 (1972).
 15. La membrana plasmática.
http://www.wikillerato.org/La_membrana_plasm%C3%A1tica.html
(accessed Marzo, 17 2014).
 16. F. Sjostrand. The ultrastructure of the plasma membrane of columnar epithelium cells of the mouse intestine. *J Ultrastruct Res*. 8:517-543 (1963).
 17. T.A. Brasitus and D. Schachter. Lipid dynamics and lipid-protein interactions in rat enterocyte basolateral and microvillus membranes. *Biochemistry*. 19:2763-2769 (1980).
 18. W.L. Hayton. Rate-limiting barriers to intestinal drug absorption: a review. *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics*. 8:321-334 (1980).
 19. D.M. Bradshaw and R.J. Arceci. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 16:3674-3690 (1998).
 20. A. Krishan, C.M. Fitz, and I. Andritsch. Drug retention, efflux, and resistance in tumor cells. *Cytometry*. 29:279-285 (1997).
 21. W.O. Berndt. The role of transport in chemical nephrotoxicity. *Toxicologic pathology*. 26:52-57 (1998).
 22. M.J. Owens and C.B. Nemeroff. The serotonin transporter and depression. *Depression and anxiety*. 8 Suppl 1:5-12 (1998).
 23. M.E. Reith, C. Xu, and N.H. Chen. Pharmacology and regulation of the neuronal dopamine transporter. *European journal of pharmacology*. 324:1-10 (1997).
 24. D.L. Baly and R. Horuk. The biology and biochemistry of the glucose transporter. *Biochimica et biophysica acta*. 947:571-590 (1988).

25. R.Y. Stainer, J.L. Ingraham, M.L. Wheelis, and P.R. Painter. Entrada de nutrientes en la célula. *Microbiología*, Reverté, Barcelona, pp. 211-215.
26. A.C. Guyton and J.E. Hall. Transporte de iones y moléculas a través de la membrana celular. *Tratado de Fisiología Médica*, Mc Graw-Hill Interamericana, Madrid, 1999, pp. 45-60.
27. P.W. Swaan, S. Oie, and J.F.C. Szoka. Carrier-mediated oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 20:1-4 (1996).
28. L. He, K. Vasiliou, and D. Nebert. Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. *Human genomics.* 3:195-206 (2009).
29. T. Terao, E. Hisanaga, Y. Sai, I. Tamai, and A. Tsuji. Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier. *The Journal of pharmacy and pharmacology.* 48:1083-1089 (1996).
30. M. Piquette-Miller, A. Pak, H. Kim, R. Anari, and A. Shahzamani. Decreased expression and activity of P-glycoprotein in rat liver during acute inflammation. *Pharmaceutical research.* 15:706-711 (1998).
31. L.Z. Benet, T. Izumi, Y. Zhang, J.A. Silverman, and V.J. Wachter. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society.* 62:25-31 (1999).
32. A.H. Schinkel, E. Wagenaar, C.A. Mol, and L. van Deemter. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *The Journal of clinical investigation.* 97:2517-2524 (1996).
33. L.M. Chan, S. Lowes, and B.H. Hirst. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences.* 21:25-51 (2004).
34. P.G. Debenham, N. Kartner, L. Siminovitch, J.R. Riordan, and V. Ling. DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression. *Molecular and cellular biology.* 2:881-889 (1982).
35. B. Sarkadi, L. Homolya, G. Szakacs, and A. Varadi. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinmunity defense system. *Physiological reviews.* 86:1179-1236 (2006).
36. J.J. Smit, A.H. Schinkel, R.P. Oude Elferink, A.K. Groen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C.A. Mol, R. Ottenhoff, N.M. van der Lugt, M.A. van Roon, and et al. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell.* 75:451-462 (1993).
37. J. Fellay, C. Marzolini, E.R. Meaden, D.J. Back, T. Buclin, J.P. Chave, L.A. Decosterd, H. Furrer, M. Opravil, G. Pantaleo, D. Retelska, L. Ruiz, A.H. Schinkel, P. Vernazza, C.B. Eap, and A. Telenti. Response to antiretroviral treatment in HIV-1-infected individuals with allelic variants of the multidrug resistance transporter 1: a pharmacogenetics study. *Lancet.* 359:30-36 (2002).
38. R.B. Kim, B.F. Leake, E.F. Choo, G.K. Dresser, S.V. Kubba, U.I. Schwarz, A. Taylor, H.G. Xie, J. McKinsey, S. Zhou, L.B. Lan, J.D. Schuetz, E.G. Schuetz, and G.R. Wilkinson. Identification of functionally variant MDR1 alleles among

- European Americans and African Americans. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 70:189-199 (2001).
39. S. Hoffmeyer, O. Burk, O. von Richter, H.P. Arnold, J. Brockmoller, A. Johne, I. Cascorbi, T. Gerloff, I. Roots, M. Eichelbaum, and U. Brinkmann. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:3473-3478 (2000).
 40. K. Ueda, Y. Taguchi, and M. Morishima. How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Seminars in cancer biology*. 8:151-159 (1997).
 41. S.V. Ambudkar, S. Dey, C.A. Hrycyna, M. Ramachandra, I. Pastan, and M.M. Gottesman. Biochemical, cellular, and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 39:361-398 (1999).
 42. T. Litman, T.E. Druley, W.D. Stein, and S.E. Bates. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 58:931-959 (2001).
 43. J. Sun, Z.G. He, G. Cheng, S.J. Wang, X.H. Hao, and M.J. Zou. Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 10:RA5-14 (2004).
 44. S. Dallas, D.S. Miller, and R. Bendayan. Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacological reviews*. 58:140-161 (2006).
 45. L. Couture, J. Nash, and J. Turgeon. The ATP-binding cassette transporters and their implication in drug disposition: a special look at the heart. *Pharmacological reviews*. 58:244-258 (2006).
 46. R. Deeley, C. Westlake, and S. Cole. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiological reviews*. 86:849-899 (2006).
 47. E. Bakos, R. Evers, G. Szakacs, G.E. Tusnady, E. Welker, K. Szabo, M. de Haas, L. van Deemter, P. Borst, A. Varadi, and B. Sarkadi. Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *The Journal of biological chemistry*. 273:32167-32175 (1998).
 48. Nutrition MaGGWUTN. Human ABC transporters, 2002.
 49. R. Lobenberg and G.L. Amidon. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. *New scientific approaches to international regulatory standards. European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 50:3-12 (2000).
 50. G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, and J.R. Crison. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical research*. 12:413-420 (1995).
 51. L.X. Yu, G.L. Amidon, J.E. Polli, H. Zhao, M.U. Mehta, D.P. Conner, V.P. Shah, L.J. Lesko, M.L. Chen, V.H. Lee, and A.S. Hussain. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharmaceutical research*. 19:921-925 (2002).

52. K.S. Amidon, P. Langguth, H. Lennernas, L. Yu, and G.L. Amidon. Bioequivalence of oral products and the biopharmaceutics classification system: science, regulation, and public policy. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 90:467-470 (2011).
53. US FDA, US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms, 1997.
54. US FDA, US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products-General Considerations, 2003.
55. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), European Medicines Agency (EMA). Guideline on the Investigation of Bioequivalence, London, 20-1-2010.
56. WHO. Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability, *WHO Technical Report Series*, Vol. No. 937, 2006, pp. 347-390.
57. Y. Tsume, D.M. Mudie, P. Langguth, G.E. Amidon, and G.L. Amidon. The Biopharmaceutics Classification System: Subclasses for in vivo predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* (2014).
58. US FDA, US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System, 2000.
59. T. Incecayir, Y. Tsume, and G.L. Amidon. Comparison of the permeability of metoprolol and labetalol in rat, mouse, and Caco-2 cells: use as a reference standard for BCS classification. *Molecular pharmaceutics*. 10:958-966 (2013).
60. H.P. Gschwind, U. Glaenzel, F. Waldmeier, B. Wirz, H.D. Sabia, F. Picard, H.M. Weiss, L. Choi, P.J. Swart, A. Vasudevan, and M. Azria. Metabolism and disposition of the oral absorption enhancer ¹⁴C-radiolabeled 8-(N-2-hydroxy-5-chlorobenzoyl)-amino-caprylic acid (5-CNAC) in healthy postmenopausal women and supplementary investigations in vitro. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 47:44-55 (2012).
61. S. Winiwarter, N.M. Bonham, F. Ax, A. Hallberg, H. Lennernas, and A. Karlen. Correlation of human jejunal permeability (in vivo) of drugs with experimentally and theoretically derived parameters. A multivariate data analysis approach. *Journal of medicinal chemistry*. 41:4939-4949 (1998).
62. H. Lennernas, L. Knutson, T. Knutson, A. Hussain, L. Lesko, T. Salmonson, and G.L. Amidon. The effect of amiloride on the in vivo effective permeability of amoxicillin in human jejunum: experience from a regional perfusion technique. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 15:271-277 (2002).

63. S. Ganta, P. Sharma, and S. Garg. Permeability Assessment. In S. Cox Gad (ed.), *Preclinical Development Handbook*, John Wiley & Sons, Inc, United States of America, 2008.
64. M. Kansy, F. Senner, and K. Gubernator. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *Journal of medicinal chemistry*. 41:1007-1010 (1998).
65. K. Sugano, Y. Nabuchi, M. Machida, and Y. Aso. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. *International journal of pharmaceutics*. 257:245-251 (2003).
66. M. Bermejo, A. Avdeef, A. Ruiz, R. Nalda, J.A. Ruell, O. Tsinman, I. Gonzalez, C. Fernandez, G. Sanchez, T.M. Garrigues, and V. Merino. PAMPA--a drug absorption in vitro model 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 21:429-441 (2004).
67. F. Delie and W. Rubas. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 14:221-286 (1997).
68. P. Artursson. Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 8:305-330 (1991).
69. K.M. Hillgren, A. Kato, and R.T. Borchardt. In vitro systems for studying intestinal drug absorption. *Medicinal research reviews*. 15:83-109 (1995).
70. J. Fogh, W.C. Wright, and J.D. Loveless. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *Journal of the National Cancer Institute*. 58:209-214 (1977).
71. M. Rousset. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*. 68:1035-1040 (1986).
72. A. Zweibaum, M. Laburthe and Louvard D. Use of culture cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. *Handbook of physiology The gastrointestinal system*, American Physiology Society, Bethesda, MD, 1991, pp. 223-255.
73. T. Prueksaritanont, L.M. Gorham, J.H. Hochman, L.O. Tran, and K.P. Vyas. Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines, and in Caco-2 cells. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*. 24:634-642 (1996).
74. M. Mehran, E. Levy, M. Bendayan, and E. Seidman. Lipid, apolipoprotein, and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells. *In vitro cellular & developmental biology Animal*. 33:118-128 (1997).
75. E.H. Van Beers, R.H. Al, E.H. Rings, A.W. Einerhand, J. Dekker, and H.A. Buller. Lactase and sucrase-isomaltase gene expression during Caco-2 cell differentiation. *The Biochemical journal*. 308 (Pt 3):769-775 (1995).
76. P. Artursson, K. Palm, and K. Luthman. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev*. 46:27-43 (2001).

77. B.H. Stewart, O.H. Chan, R.H. Lu, E.L. Reyner, H.L. Schmid, H.W. Hamilton, B.A. Steinbaugh, and M.D. Taylor. Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models: relationship to absorption in humans. *Pharmaceutical research*. 12:693-699 (1995).
78. A. Pagliara, M. Reist, S. Geinoz, P.A. Carrupt, and B. Testa. Evaluation and prediction of drug permeation. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 51:1339-1357 (1999).
79. A. Diez-Sampedro, M. Perez, M.T. Cobo, J.A. Martinez, and A. Barber. Effect of different beta-adrenergic agonists on the intestinal absorption of galactose and phenylalanine. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 50:907-911 (1998).
80. B.H. Stewart, G.L. Amidon, and R.K. Brabec. Uptake of prodrugs by rat intestinal mucosal cells: mechanism and pharmaceutical implications. *Journal of pharmaceutical sciences*. 75:940-945 (1986).
81. D. Fleisher. Peptide-based drug design. *Gastrointestinal transport of peptides*, A.C.S. books, American Chemical Society, Washington D.C., 1995, pp. 500-523.
82. J.T. Doluisio, N.F. Billups, L.W. Dittert, E.T. Sugita, and J.V. Swintosky. Drug absorption. I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *Journal of pharmaceutical sciences*. 58:1196-1200 (1969).
83. L.S. Schanker, D.J. Tocco, B.B. Brodie, and C.A. Hogben. Absorption of drugs from the rat small intestine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 123:81-88 (1958).
84. K. Kelly, B. O'Mahony, B. Lindsay, T. Jones, T.J. Grattan, A. Rostami-Hodjegan, H.N. Stevens, and C.G. Wilson. Comparison of the rates of disintegration, gastric emptying, and drug absorption following administration of a new and a conventional paracetamol formulation, using gamma scintigraphy. *Pharmaceutical research*. 20:1668-1673 (2003).
85. R. Kato, A. Takanaka, K. Onoda, and Y. Omori. Effect of syrup on the absorption of drugs from gastrointestinal tract. *Japanese journal of pharmacology*. 19:331-342 (1969).
86. S. Pestel, H.J. Martin, G.M. Maier, and B. Guth. Effect of commonly used vehicles on gastrointestinal, renal, and liver function in rats. *Journal of pharmacological and toxicological methods*. 54:200-214 (2006).
87. K.H. Yuen. The transit of dosage forms through the small intestine. *International journal of pharmaceutics*. 395:9-16 (2010).
88. D.A. Adkin, S.S. Davis, R.A. Sparrow, P.D. Huckle, A.J. Phillips, and I.R. Wilding. The effects of pharmaceutical excipients on small intestinal transit. *British journal of clinical pharmacology*. 39:381-387 (1995).
89. D.A. Adkin, S.S. Davis, R.A. Sparrow, P.D. Huckle, A.J. Phillips, and I.R. Wilding. The effect of different concentrations of mannitol in solution on small intestinal transit: implications for drug absorption. *Pharmaceutical research*. 12:393-396 (1995).
90. R. Panakanti and A. Narang. Impact of excipient interactions on drug bioavailability from solid dosage forms. *Pharmaceutical research*. 29:2639-2659 (2012).
91. M.L. Chen, A.B. Straughn, N. Sadrieh, M. Meyer, P.J. Faustino, A.B. Ciavarella, B. Meibohm, C.R. Yates, and A.S. Hussain. A modern view of excipient effects

- on bioequivalence: case study of sorbitol. *Pharmaceutical research*. 24:73-80 (2007).
92. A.W. Basit, J.M. Newton, M.D. Short, W.A. Waddington, P.J. Ell, and L.F. Lacey. The effect of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit: implications for the formulation of poorly-water soluble drugs. *Pharmaceutical research*. 18:1146-1150 (2001).
 93. A.W. Basit, F. Podczeck, J.M. Newton, W.A. Waddington, P.J. Ell, and L.F. Lacey. Influence of polyethylene glycol 400 on the gastrointestinal absorption of ranitidine. *Pharmaceutical research*. 19:1368-1374 (2002).
 94. J.D. Schulze, W.A. Waddington, P.J. Eli, G.E. Parsons, M.D. Coffin, and A.W. Basit. Concentration-dependent effects of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit and drug absorption. *Pharmaceutical research*. 20:1984-1988 (2003).
 95. J. Goole, D.J. Lindley, W. Roth, S.M. Carl, K. Amighi, J.M. Kauffmann, and G.T. Knipp. The effects of excipients on transporter mediated absorption. *International journal of pharmaceutics*. 393:17-31 (2010).
 96. G. Martin, C. Marriott, and I. Kellaway. Direct effect of bile salts and phospholipids on the physical properties of mucus. *Gut*. 19:103-107 (1978).
 97. M. Tomita, M. Hayashi, T. Horie, T. Ishizawa, and S. Awazu. Enhancement of colonic drug absorption by the transcellular permeation route. *Pharmaceutical research*. 5:786-789 (1988).
 98. B.D. Rege, L.X. Yu, A.S. Hussain, and J.E. Polli. Effect of common excipients on Caco-2 transport of low-permeability drugs. *Journal of pharmaceutical sciences*. 90:1776-1786 (2001).
 99. Y. Takizawa, H. Kishimoto, M. Nakagawa, N. Sakamoto, Y. Tobe, T. Furuya, M. Tomita, and M. Hayashi. Effects of pharmaceutical excipients on membrane permeability in rat small intestine. *International journal of pharmaceutics*. 453:363-370 (2013).
 100. G. Larocque, A.A. Arnold, E. Chartrand, Y. Mouget, and I. Marcotte. Effect of sodium bicarbonate as a pharmaceutical formulation excipient on the interaction of fluvastatin with membrane phospholipids. *European biophysics journal : EBJ*. 39:1637-1647 (2010).
 101. Y.H. Li, M. Zhang, J.C. Wang, S. Zhang, J.R. Liu, and Q. Zhang. [Effects of absorption enhancers on intestinal absorption of lumbrokinase]. *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica*. 41:939-944 (2006).
 102. N.A. Peppas and N.J. Kavimandan. Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 29:183-197 (2006).
 103. J. Ferte. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *European journal of biochemistry / FEBS*. 267:277-294 (2000).
 104. H. Zhang, M. Yao, R.A. Morrison, and S. Chong. Commonly used surfactant, Tween 80, improves absorption of P-glycoprotein substrate, digoxin, in rats. *Archives of pharmacal research*. 26:768-772 (2003).
 105. L. Bromberg and V. Alakhov. Effects of polyether-modified poly(acrylic acid) microgels on doxorubicin transport in human intestinal epithelial Caco-2

- cell layers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 88:11-22 (2003).
106. J.M. Dintaman and J.A. Silverman. Inhibition of P-glycoprotein by D-alpha-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate (TPGS). *Pharmaceutical research*. 16:1550-1556 (1999).
 107. H.Z. Zhao, E.C. Tan, and L.Y. Yung. Potential use of cholecalciferol polyethylene glycol succinate as a novel pharmaceutical additive. *Journal of biomedical materials research Part A*. 84:954-964 (2008).
 108. Y. Tayrouz, R. Ding, J. Burhenne, K.D. Riedel, J. Weiss, T. Hoppe-Tichy, W.E. Haefeli, and G. Mikus. Pharmacokinetic and pharmaceutic interaction between digoxin and Cremophor RH40. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 73:397-405 (2003).
 109. E.V. Batrakova, S. Li, Y. Li, V.Y. Alakhov, and A.V. Kabanov. Effect of pluronic P85 on ATPase activity of drug efflux transporters. *Pharmaceutical research*. 21:2226-2233 (2004).
 110. Q. Shen, Y. Lin, T. Handa, M. Doi, M. Sugie, K. Wakayama, N. Okada, T. Fujita, and A. Yamamoto. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by polyethylene glycols and their derivatives by in vitro transport and in situ absorption studies. *International journal of pharmaceutics*. 313:49-56 (2006).
 111. H. Arima, K. Yunomae, T. Morikawa, F. Hirayama, and K. Uekama. Contribution of cholesterol and phospholipids to inhibitory effect of dimethyl-beta-cyclodextrin on efflux function of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 in vinblastine-resistant Caco-2 cell monolayers. *Pharmaceutical research*. 21:625-634 (2004).
 112. H. Arima, K. Yunomae, F. Hirayama, and K. Uekama. Contribution of P-glycoprotein to the enhancing effects of dimethyl-beta-cyclodextrin on oral bioavailability of tacrolimus. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 297:547-555 (2001).
 113. K. Yunomae, H. Arima, F. Hirayama, and K. Uekama. Involvement of cholesterol in the inhibitory effect of dimethyl-beta-cyclodextrin on P-glycoprotein and MRP2 function in Caco-2 cells. *FEBS letters*. 536:225-231 (2003).
 114. T.-N. Krisztina. Solubility-pH profile of drugs. Experiences and surprises in logS measurements, *PhysChem FORUM 9*, Barcelona, 2010.
 115. A.T. Serajuddin. Salt formation to improve drug solubility. *Adv Drug Deliv Rev*. 59:603-616 (2007).
 116. M. Veiga O, M. Gil A, and J. Torrado D. Preformulación. In J. Vila Jato (ed.), *Tecnología Farmacéutica, Vol. I: Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas, Síntesis*, 1997.
 117. A. Avdeef. Solubility of sparingly-soluble ionizable drugs. *Adv Drug Deliv Rev*. 59:568-590 (2007).
 118. K. Sugano, A. Okazaki, S. Sugimoto, S. Tavornvipas, A. Omura, and T. Mano. Solubility and dissolution profile assessment in drug discovery. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 22:225-254 (2007).
 119. A. Glomme, J. Marz, and J.B. Dressman. Comparison of a miniaturized shake-flask solubility method with automated potentiometric acid/base titrations and calculated solubilities. *Journal of pharmaceutical sciences*. 94:1-16 (2005).

120. K. Sugano, T. Kato, K. Suzuki, K. Keiko, T. Sujaku, and T. Mano. High throughput solubility measurement with automated polarized light microscopy analysis. *Journal of pharmaceutical sciences*. 95:2115-2122 (2006).
121. S. Azarmi, W. Roa, and R. Lobenberg. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. *International journal of pharmaceutics*. 328:12-21 (2007).
122. A. Dokoumetzidis and P. Macheras. A century of dissolution research: from Noyes and Whitney to the biopharmaceutics classification system. *International journal of pharmaceutics*. 321:1-11 (2006).
123. E.S. Kostewicz, B. Abrahamsson, M. Brewster, J. Brouwers, J. Butler, S. Carlert, P.A. Dickinson, J. Dressman, R. Holm, S. Klein, J. Mann, M. McAllister, M. Minekus, U. Muenster, A. Mullertz, M. Verwei, M. Vertzoni, W. Weitschies, and P. Augustijns. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* (2013).
124. V. Gray, G. Kelly, M. Xia, C. Butler, S. Thomas, and S. Mayock. The science of USP 1 and 2 dissolution: present challenges and future relevance. *Pharmaceutical research*. 26:1289-1302 (2009).
125. Farmacopea de los Estados Unidos de América. USP 35 NF 30, United States Pharmacopoeial Convention Inc., Rockville, MD (2012).
126. European Pharmacopoeia. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care of the Council of Europe (2007).
127. C. Tong, S.S. D'Souza, J.E. Parker, and T. Mirza. Commentary on AAPS Workshop: dissolution testing for the twenty-first century: linking critical quality attributes and critical process parameters to clinically relevant dissolution. *Pharmaceutical research*. 24:1603-1607 (2007).
128. S. Klein. The use of biorelevant dissolution media to forecast the in vivo performance of a drug. *The AAPS journal*. 12:397-406 (2010).
129. L.G. McCarthy, G. Bradley, J.C. Sexton, O.I. Corrigan, and A.M. Healy. Computational fluid dynamics modeling of the paddle dissolution apparatus: agitation rate, mixing patterns, and fluid velocities. *AAPS PharmSciTech*. 5:e31 (2004).
130. S.A. Qureshi and J. Shabnam. Cause of high variability in drug dissolution testing and its impact on setting tolerances. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 12:271-276 (2001).
131. C. Collins and R. Nair. Comparative evaluation of mixing dynamics in USP Apparatus 2 using standard USP vessels and PEAK vessels. *Dissolution Technol*. 5: (1998).
132. T.J. Mirza, Y.; Liu, Q. and Vivilecchia, R. Evaluation of dissolution hydrodynamics in the USP, Peak and flat-bottom vessels using different solubility drugs. *Dissolution Technol*. 12:11-16 (2005).
133. Z.M. Gao, T.; Smith, A.; Doub, W. and Westenberger, B. Studies of Variability in Dissolution Testing with USP Apparatus 2. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 96:1794-1801 (2007).
134. S. Klein and V.P. Shah. A standardized mini paddle apparatus as an alternative to the standard paddle. *AAPS PharmSciTech*. 9:1179-1184 (2008).

135. Z.M. Gao, T.; Doub, W.; Westenberger, L. and Buhse, L. Effects of Deaeration Methods on Dissolution Testing in Aqueous Media: A Study Using a Total Dissolved Gas Pressure Meter. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 95:1606-1613 (2006).
136. Z.M. Gao, T. and Doub, W. Vibration Effects on Dissolution Tests with USP Apparatuses 1 and 2. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 97:3335-3343 (2008).
137. C.K. Brown, L. Buhse, H.D. Friedel, S. Keitel, J. Kraemer, J.M. Morris, M. Stickelmeyer, C. Yomota, and V.P. Shah. FIP position paper on qualification of paddle and basket dissolution apparatus. *AAPS PharmSciTech*. 10:924-927 (2009).
138. D.M. Mudie, G.L. Amidon, and G.E. Amidon. Physiological parameters for oral delivery and in vitro testing. *Molecular pharmaceutics*. 7:1388-1405 (2010).
139. L. Kalantzi, K. Goumas, V. Kalioras, B. Abrahamsson, J.B. Dressman, and C. Reppas. Characterization of the human upper gastrointestinal contents under conditions simulating bioavailability/bioequivalence studies. *Pharmaceutical research*. 23:165-176 (2006).
140. A. Guyton and J. Hall. *Fisiología gastrointestinal*. *Fisiología Médica*, Elsevier Saunders, España, 2006, pp. 791-807.
141. J.M. Sheng, D. and Amidon, G. Toward an In Vivo Dissolution Methodology: A Comparison of Phosphate and Bicarbonate Buffers. *Molecular Pharmaceutics*. 6:29-39 (2008).
142. E. Jantratid, N. Janssen, C. Reppas, and J.B. Dressman. Dissolution media simulating conditions in the proximal human gastrointestinal tract: an update. *Pharmaceutical research*. 25:1663-1676 (2008).
143. M. Vertzoni, J. Dressman, J. Butler, J. Hempenstall, and C. Reppas. Simulation of fasting gastric conditions and its importance for the in vivo dissolution of lipophilic compounds. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 60:413-417 (2005).
144. E. Jantratid and J. Dressman. Biorelevant Dissolution Media Simulating the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update. *Dissolution Technol*:21-25 (2009).
145. E. Galia, E. Nicolaidis, D. Horter, R. Lobenberg, C. Reppas, and J.B. Dressman. Evaluation of various dissolution media for predicting in vivo performance of class I and II drugs. *Pharmaceutical research*. 15:698-705 (1998).
146. Zoeller, T and Klein, S. Simplified Biorelevant Media for Screening Dissolution Performance of Poorly Soluble Drugs. *Dissolution Technol*:8-13 (2007).
147. Taupitz, T. and Klein, S. Can Biorelevant Media be Simplified by using SLS and Tween 80 to Replace Bile Compounds? *The Open Drug Delivery Journal*. 4:30-37 (2010).
148. S. Cvijic, J. Parojcic, and P. Langguth. Viscosity-mediated negative food effect on oral absorption of poorly-permeable drugs with an absorption window in the proximal intestine: In vitro experimental simulation and computational verification. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* (2014).

149. J. Parojcic, D. Vasiljevic, S. Ibric, and Z. Djuric. Tablet disintegration and drug dissolution in viscous media: paracetamol IR tablets. *International journal of pharmaceutics*. 355:93-99 (2008).
150. A. Radwan, G.L. Amidon, and P. Langguth. Mechanistic investigation of food effect on disintegration and dissolution of BCS class III compound solid formulations: the importance of viscosity. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 33:403-416 (2012).
151. F. Liu, H.A. Merchant, R.P. Kulkarni, M. Alkademi, and A.W. Basit. Evolution of a physiological pH 6.8 bicarbonate buffer system: application to the dissolution testing of enteric coated products. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV*. 78:151-157 (2011).
152. G. Garbacz, B. Kolodziej, M. Koziolok, W. Weitschies, and S. Klein. An automated system for monitoring and regulating the pH of bicarbonate buffers. *AAPS PharmSciTech*. 14:517-522 (2013).
153. D.P. McNamara, K.M. Whitney, and S.L. Goss. Use of a physiologic bicarbonate buffer system for dissolution characterization of ionizable drugs. *Pharmaceutical research*. 20:1641-1646 (2003).
154. Y. Tsume, P. Langguth, A. Garcia-Arieta, and G.L. Amidon. In silico prediction of drug dissolution and absorption with variation in intestinal pH for BCS class II weak acid drugs: ibuprofen and ketoprofen. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 33:366-377 (2012).
155. Chowdhury, A. and Islam, S. In vitro-in vivo correlation as a surrogate for bioequivalence testing: the current state of play. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 6:176-190 (2011).
156. US FDA, US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Dissolution testing for immediate release solid oral dosage forms, (1997).
157. S. Hayes, A. Dunne, T. Smart, and J. Davis. Interpretation and optimization of the dissolution specifications for a modified release product with an in vivo-in vitro correlation (IVIVC). *Journal of pharmaceutical sciences*. 93:571-581 (2004).
158. J. Emami. In vitro - in vivo correlation: from theory to applications. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*. 9:169-189 (2006).
159. US FDA, US Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research, Guidance for Industry: Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations, (1997).
160. E. Weinling, S. McDougall, F. Andre, G. Bianchetti, and C. Dubruc. Pharmacokinetic profile of a new modified release formulation of zolpidem designed to improve sleep maintenance. *Fundamental & clinical pharmacology*. 20:397-403 (2006).
161. J.O. Olubodun, H.R. Ochs, L.L. von Moltke, R. Roubenoff, L.M. Hesse, J.S. Harmatz, R.I. Shader, and D.J. Greenblatt. Pharmacokinetic properties of zolpidem in elderly and young adults: possible modulation by testosterone in men. *British journal of clinical pharmacology*. 56:297-304 (2003).

162. K.J. Holm and K.L. Goa. Zolpidem: an update of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability in the treatment of insomnia. *Drugs*. 59:865-889 (2000).
163. ChemAxon. Properties Viewer Zolpidem. [http://www.chemicalize.org/structure/ - !mol=zolpidem&source=fp](http://www.chemicalize.org/structure/?mol=zolpidem&source=fp) (accessed Marzo, 9 2014).
164. The Merck Index, Merck & CO., Inc, Rahway, U.S.A., 1989.
165. AEMPS. Ficha técnica o resumen de las características del producto (Stilnox). http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/58470/FT_58470.pdf (accessed Marzo, 08 2014).
166. D.J. Greenblatt, E. Legangneux, J.S. Harmatz, E. Weinling, J. Freeman, K. Rice, and G.K. Zammit. Dynamics and kinetics of a modified-release formulation of zolpidem: comparison with immediate-release standard zolpidem and placebo. *Journal of clinical pharmacology*. 46:1469-1480 (2006).
167. AEMPS. Centro de Información online de Medicamentos de la AEMPS-CIMA. <http://www.aemps.gob.es/cima/pestanias.do?metodo=accesoAplicacion> (accessed Marzo, 9 2014).
168. ChemAxon. Properties Viewer Pravastatin. [http://www.chemicalize.org/structure/ - !mol=pravastatin&source=fp](http://www.chemicalize.org/structure/?mol=pravastatin&source=fp) (accessed 09 2014).
169. T. Hatanaka. Clinical pharmacokinetics of pravastatin: mechanisms of pharmacokinetic events. *Clinical pharmacokinetics*. 39:397-412 (2000).
170. AEMPS. Ficha técnica Lipemol. http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/62376/FT_62376.pdf (accessed Marzo 10 2014).
171. M.A. Catania and S. Cuzzocrea. Pharmacological and clinical overview of cloperastine in treatment of cough. *Therapeutics and clinical risk management*. 7:83-92 (2011).
172. ChemAxon. Properties Viewer Cloperastine. [http://www.chemicalize.org/structure/ - !mol=Cloperastine&source=fp](http://www.chemicalize.org/structure/?mol=Cloperastine&source=fp) (accessed Marzo, 10 2014).
173. Martindale The Extra Pharmacopoeia, Royal Pharmaceutical Society, London, 1996.
174. AEMPS. Ficha técnica (Flutox). http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/57849/FT_57849.pdf (accessed Marzo, 10 2014).
175. V. Mangas-Sanjuan, I. Gonzalez-Alvarez, M. Gonzalez-Alvarez, V.G. Casabo, and M. Bermejo. Modified nonsink equation for permeability estimation in cell monolayers: comparison with standard methods. *Molecular pharmaceutics*. 11:1403-1414 (2014).
176. I. Gonzalez-Alvarez, C. Fernandez-Teruel, V.G. Casabo-Alos, T.M. Garrigues, J.E. Polli, A. Ruiz-Garcia, and M. Bermejo. In situ kinetic modelling of intestinal efflux in rats: functional characterization of segmental differences and correlation with in vitro results. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 28:229-239 (2007).
177. F. Tugcu-Demiröz, I. Gonzalez-Alvarez, M. Gonzalez-Alvarez, and M. Bermejo. Validation of Phenol red Method for Water Reabsorption Process in Doluisio's Absorption Technique. *Eur J Pharm Sci* (2014).

178. E. Commission. European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing. http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam (accessed Mayo, 16 2014).
179. M. Zur, M. Gasparini, O. Wolk, G.L. Amidon, and A. Dahan. The Low/High BCS Permeability Class Boundary: Physicochemical Comparison of Metoprolol and Labetalol. *Molecular pharmaceutics*. 11:1707-1714 (2014).
180. C. Fernandez-Teruel, I. Gonzalez-Alvarez, V.G. Casabo, A. Ruiz-Garcia, and M. Bermejo. Kinetic modelling of the intestinal transport of sarafloxacin. Studies in situ in rat and in vitro in Caco-2 cells. *Journal of drug targeting*. 13:199-212 (2005).
181. L.L. Von Moltke, J.L. Weemhoff, M.D. Perloff, L.M. Hesse, J.S. Harmatz, B.F. Roth-Schechter, and D.J. Greenblatt. Effect of zolpidem on human cytochrome P450 activity, and on transport mediated by P-glycoprotein. *Biopharmaceutics & drug disposition*. 23:361-367 (2002).
182. E. Gundogdu, I.G. Alvarez, and E. Karasulu. Improvement of effect of water-in-oil microemulsion as an oral delivery system for fexofenadine: in vitro and in vivo studies. *International journal of nanomedicine*. 6:1631-1640 (2011).
183. E. Gundogdu, I. Gonzalez Alvarez, M. Bermejo Sanz, and E. Karasulu. Assessment of fexofenadine hydrochloride permeability and dissolution with an anionic surfactant using Caco-2 cells. *Die Pharmazie*. 66:747-753 (2011).
184. E. Gundogdu, V. Mangas-Sanjuan, I. Gonzalez-Alvarez, M. Bermejo, and E. Karasulu. In vitro-in situ permeability and dissolution of fexofenadine with kinetic modeling in the presence of sodium dodecyl sulfate. *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics*. 37:65-75 (2012).
185. K.T. Kivisto and M. Niemi. Influence of drug transporter polymorphisms on pravastatin pharmacokinetics in humans. *Pharmaceutical research*. 24:239-247 (2007).