

31
24

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Disolución Comparativa de Dos Formulaciones
Carisoprodol en Cápsulas y su Correlación con
Niveles Sanguíneos**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :

IVONNE DE LOURDES MARTELL MORALES

Director de la Tesis: Q. F. M. Alfredo Garzón Serra

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx.

1980



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Pag.
I. INTRODUCCION	1
II. OBJETIVO	2
III. GENERALIDADES	
1. Relajantes musculares.....	3
A. Antecedentes	3
B. Farmacología	6
2. Carisoprodo1	9
3. Cápsulas	13
A. Elaboración de cápsulas.....	14
B. Formulación de cápsulas	16
4. Disolución	18
A. Bases teóricas de la disolución.....	18
B. Factores que afectan la velocidad de disolución in vitro	22
C. Metodología empleada en la disolución	25
5. Absorción de Medicamentos	28
A. Mecanismos de absorción	28
B. Biodisponibilidad	31
6. Correlación in vivo-in vitro	34
A. Variables correlacionables	34
B. Tipos de Correlación	35

7. Cromatografía	38
A. Fundamento teórico de la cromatografía	38
B. Cromatografía de Gases	40
C. Aplicaciones de la cromatografía de gases	45
8. Validación de un método analítico	50
A. Exactitud	50
B. Linearidad	52
C. Precisión	55
D. Sensibilidad	58

IV. PARTE EXPERIMENTAL

1. Preparación de las dos formulaciones de cápsulas de - carisoprodo l a comparar	59
2. Disolución de las cápsulas de carisoprodo l	61
A. Desarrollo del método de cuantificación de cariso- prodo l	61
B. Elección del medio de disolución	64
C. Validación del método de disolución	65
D. Comparación de la disolución de las dos formulacio- nes.....	66
3. Pruebas in vitro a través de membrana intestinal, uti- lizando el método de intestino invertido	69
A. Prueba de intestino invertido para carisoprodo l ma teria prima	69

B. Prueba de intestino invertido para la formulación A	73
C. Prueba de intestino invertido para la formulación B	73
4. Biodisponibilidad de las dos formulaciones de cápsulas de carisoprodol	74
A. Protocolo de administración a pacientes voluntarios de las dos formulaciones de carisoprodol	74
B. Desarrollo de un método para cuantificar los niveles sanguíneos de carisoprodol	76
C. Validación del método de cuantificación de carisoprodol en plasma	81

V.. RESULTADOS Y DISCUSION

1. Disolución	82
A. Validación del método	82
a. Exactitud	83
b. Repetibilidad	85
c. Linearidad	87
d. Reproducibilidad	93
e. Sensibilidad	95
B. Disolución de las dos formulaciones	96
2. Prueba de intestino invertido	102
3. Biodisponibilidad	106

A. Validación del método para cuantificar el carisoprodol en plasma	106
a. Exactitud	106
b. Repetibilidad	109
c. Linearidad	111
d. Reproducibilidad	116
e. Sensibilidad	117
B. Biodisponibilidad de las dos formulaciones	118
VI. CONCLUSIONES	124
VII. BIBLIOGRAFIA	126

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION.

El carisoprodol es un derivado isopropilo del meprobamato; ambos - compuestos, bloquean las vías polisinápticas y tienen efectos sedantes a nivel central.

Cuando el carisoprodol se administra por vía oral, se absorbe rápidamente y se obtiene un efecto más prolongado que cuando se administra por vía intramuscular. Esta es la premisa a utilizar para el desarrollo de la formulación de carisoprodol. Así pues, se sabe que la presentación será una forma farmacéutica de dosificación oral y se optó por las cápsulas, debido a la protección del medio externo que brindan a la formulación, además de la elegancia de su presentación.

Una vez desarrollada la formulación, es necesario corroborar la disponibilidad in vivo e in vitro del principio activo a partir de la forma farmacéutica. Para evaluar la disponibilidad in vitro, se hace uso de la disolución, que surge como una necesidad para evaluar los patrones de liberación del fármaco de su forma dosificada. De aquí la importancia de desarrollar métodos de disolución confiables, los cuales se pueden establecer posteriormente como parámetros de control de calidad para la forma farmacéutica.

Al realizar una disolución, se hace necesario cuidar diversos detalles, que están íntimamente ligados a la metodología de la disolución; éstos incluyen la elección del medio de disolución, el sistema de agitación a emplear y la metodología analítica adecuada para cuantificar el fármaco.

Una vez cuantificada la disolución del carisoprodol, la interrogante se encamina a comprobar el paso del fármaco al torrente sanguíneo, liberado a partir de la formulación. El estudio del que se hace mano --

entonces, es la Biodisponibilidad, cuantificando el fármaco presente en la sangre a diferentes intervalos de tiempo. La Biofarmacia surge así, como una disciplina que se ocupa del estudio de las relaciones entre -- las propiedades fisicoquímicas de los fármacos y las formas farmacéuticas, con la respuesta farmacológica observada después de la administración.

Existe además, un paso intermedio entre la disolución del fármaco y el paso del mismo al torrente sanguíneo, que es el paso a través de la membrana intestinal y para cuantificar este mecanismo, se emplea el método de intestino invertido el cual es de gran utilidad cuando se realiza un estudio de biodisponibilidad, ya que puede ayudar a localizar el paso limitante en un proceso de absorción.

En los últimos años, ha tomado gran importancia el hecho de poder predecir los niveles de absorción de un fármaco, liberado de una forma farmacéutica, con una prueba efectuada in vitro, esto es debido a que al realizar pruebas de estabilidad y control de calidad que deben cumplir las presentaciones farmacéuticas, se está asegurando el contenido químico y la presentación física, y se busca el poder también asegurar que el fármaco contenido en la forma farmacéutica, alcance el nivel sanguíneo adecuado para lograr el efecto terapéutico requerido.

II. OBJETIVO

Correlacionar la prueba de disolución in vitro, con la absorción in vivo de carisoprodol en cápsulas.

GENERALIDADES

III. GENERALIDADES.

1. RELAJANTES MUSCULARES.

Se da el nombre de relajantes musculares a todos aquellos compuestos que disminuyen el tono y los movimientos involuntarios del esqueleto muscular, debido a su acción sobre el sistema nervioso central. (15)

El primer relajante conocido fue el curare, que es el nombre genérico que se da al veneno que empleaban en las puntas de sus flechas los indios sudamericanos. (20)

Los relajantes musculares actúan sobre el sistema nervioso central y se usan para proporcionar alivio en el espasmo muscular, espasticidad músculo-esquelética y alteraciones musculares. (15)

A. Antecedentes. (15)

Debido a que los relajantes musculares actúan sobre el sistema nervioso central, es menester hablar un poco acerca de este sistema.

El sistema nervioso es la entidad anatómica y funcional que pone en relación al individuo con los procesos del mundo exterior e interior. Comprende dos partes fundamentales que son:

1) El sistema nervioso somático, cuya función principal es el ajuste del organismo con el medio exterior.

2) El sistema nervioso autónomo, que comprende o corresponde a la innervación visceral y cuya función es el ajuste del organismo con el medio interno.

Las partes anatómicas que comprenden al sistema nervioso central, son:

a) La médula espinal, es un centro reflejo y además posee una serie de vías que conducen los impulsos nerviosos hacia el cerebro.

b) Tallo cerebral, que incluye el bulbo raquídeo, protuberancia y mesencéfalo. Aquí también se encuentran los núcleos de los nervios craneales, vías ascendentes y centros vitales como es el respiratorio, vasomotor, cardioestimulador, cardioinhibidor. A este nivel existen centros que controlan el tono muscular y la postura.

c) Formación reticular, que es una red de fibras nerviosas que encierra numerosos núcleos y que se extiende por todo el tallo cerebral. Posee centros y vías facilitadoras e inhibitoras del tono muscular especialmente.

d) Cerebelo, que interviene en la postura y en los movimientos voluntarios.

e) Hipotálamo, centro de integración en las funciones viscerales.

f) Tálamo óptico, relevo de las vías sensitivas y centro de integración de algunas sensaciones.

g) Corteza cerebral, que constituye el más alto de los centros nerviosos.

h) Ganglios ó núcleos de la base, forman parte del llamado sistema extrapiramidal y se relacionan con las funciones motoras automáticas.

El tono muscular es un estado de contracción constante, de mecanis

mo reflejo, que está relacionado con el mantenimiento de la postura. La contracción se debe a una descarga de impulsos asincrónicos de baja frecuencia que vienen las grandes motoneuronas espinales.

El tono muscular se mantiene por el reflejo miostático o de estiramiento, propioceptivo espinal, que nace en el mismo músculo.

Existen diferentes acciones depresoras centrales, a saber:

1. Anestesia General: Pérdida de la sensibilidad, de la conciencia y la motilidad en forma reversible, los fármacos que la producen se denominan anestésicos generales.

2. Hipnosis: Estado de sueño, producido por fármacos denominados hipnóticos.

3. Sedación: Es la atenuación de la hiperexcitabilidad nerviosa, los fármacos que la producen se denominan sedantes.

4. Los tranquilizantes poseen una acción calmante de la hiperexcitabilidad psíquica con poca o ninguna tendencia al sueño y sin oscurecimiento de la conciencia. Los tranquilizantes pertenecen al grupo de los fármacos psicotrópicos, cuya principal acción se ejerce sobre los procesos mentales o emocionales.

5. Analgesia: Es el alivio del dolor y los fármacos que la producen se denominan analgésicos.

6. La depresión de las funciones motoras, puede manifestarse suprimiendo las convulsiones, en cuyo caso los fármacos empleados para este fin, se denominan anticonvulsivantes.

7. La depresión motora central puede traducirse como relajación muscular, y los principios activos que producen esta acción, se denominan relajantes musculares centrales.

Por lo anterior, los relajantes musculares quedan catalogados como depresores centrales selectivos.

B. Farmacología.

Con el nombre de relajantes musculares centrales, se han designado a los fármacos que actuando sobre los centros nerviosos, deprimen la actividad del músculo esquelético, disminuyendo el tono y los movimientos involuntarios. Existen dos clases de fármacos que se incluyen en la definición anterior, y son:

- a. Agentes antiparkinsonianos
- b. Depresores de la médula espinal

En particular, se estudiarán un poco más a fondo los depresores de la médula espinal, por ser el grupo en el cual se incluye al carisoprodol. Esto es, el estudio de las sustancias que producen relajación muscular actuando sobre todo a nivel de las neuronas internunciales para inhibir los impulsos que llegan a la motoneurona, sin excluir una acción a niveles superiores del sistema nervioso, incluida la formación reticular; estos fármacos se emplean para atenuar los espasmos del músculo estriado. (20)

A saber, los depresores espinales, son de origen sintético. Según su estructura, se clasifican en cinco grupos que son:

1. Derivados del propanodiol: Como principal compuesto de este grupo, está el metocarbamol, que por poseer un grupo carbámico que bloquea uno de los grupos hidroxilo del propanodiol, se hace estable en el organismo. También pertenecen a este grupo el meprobamato y el carisoprodol.
2. Derivados de la etanolamina: Aquí se incluye a la orfenadrina, que también posee características antiparkinsonianas.
3. Derivados del benzoxazol: El compuesto característico de este grupo es la clorxazona, con escasa acción tranquilizante.

4. Derivados de la metatiazanona: El compuesto característico de este grupo es la cloromezanona, que a diferencia de los anteriores fármacos, posee acción tranquilizante.

5. Derivados del ácido gamma-aminobutírico: Son compuestos que se sintetizaron pensando que este aminoácido posee acción inhibitoria, sin embargo, no puede llegar al sistema nervioso como tal, así que se creó un derivado liposoluble, como en el caso del baclofeno. (15)

La acción farmacológica de los depresores de la médula espinal puede ser enfocada desde dos puntos de vista; uno es la acción relajante muscular, y el otro es la acción tranquilizante. (7)

En el hombre, el metocarbamol, la orfenadrina, la clorzoxazona y la cloromezanona, son capaces de disminuir el tono muscular anormalmente exagerado por afecciones nerviosas, así como también son mejorados algunas veces los movimientos involuntarios, pero dicha mejoría es transitoria y los efectos no son intensos. (7)

Tanto meprobamato como cloromezanona, poseen acción tranquilizante similar en el hombre, reducen los estados de ansiedad y tensión, observándose efecto sedante. (7)

Modo de acción de los relajantes musculares:

En el animal espinal, se ha observado que tanto metocarbamol como cloromezanona y clorzoxazona, inhiben los reflejos multisinápticos (formados por varias neuronas), mientras que los reflejos monosinápticos -- (el arco está formado por dos neuronas), no son afectados. (15)

Farmacocinética:

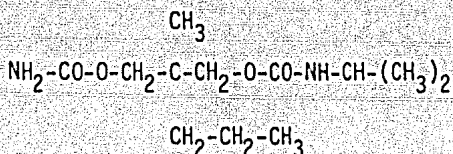
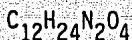
Los relajantes musculares son fármacos que se absorben con facilidad por vía bucal y parenteral. A pesar de no existir estudios que corroboren la rápida metabolización de estos fármacos, se ha detectado -- que su metabolismo es rápido, al igual que su excreción. (7,15)

En cuanto se refiere a la intoxicación con estos depresores espinales, se puede decir que no es muy severa, advirtiéndose además que cuando llega a manifestarse alguna reacción adversa, consiste en manifestaciones nerviosas (astenia, somnolencia, diplopía, visión borrosa, mareos y a veces ataxia); trastornos cutáneos (prurito y erupción papulosa) y -- trastornos gastrointestinales (sequedad de la boca, anorexia, molestias epigástricas, náuseas, vómitos y diarrea). (7,15)

2. CARISOPRODOL

Nombres químicos y sinónimos:

Dicarbamato de n-isopropil-2-metil-2-propil-1,3-propanodiol; 2-carbamoil oximetil-2-isopropil carbamoil oxipentano; n-isopropil meprobamato; isomeprobamato. (19)

Fórmula desarrollada:Fórmula condensada:Peso molecular:

260.33

Descripción:

Polvo cristalino, blanco, inodoro, sabor ligeramente amargo.

Propiedades:

Estable en álcalis y ácidos débiles, se hidroliza en ácidos y álcalis fuertes. No se altera por los jugos gástricos e intestinales artificiales a una temperatura de 37°C. (28)

Solubilidad:

Muy ligeramente soluble en agua: 30mg/ml a 25°C y 140 mg/ml a 50°C. Soluble en acetona y etanol; insoluble en aceites vegetales, fácilmente soluble en cloroformo y metanol. (19)

Temperatura de Fusión:

92 - 94°C

Infrarrojo:

Utilizando como fase una pastilla de bromuro de potasio (KBr), se observan los siguientes máximos: 1560 cm^{-1} amida monosustituída; 1590 cm^{-1} , carbonilo correspondiente a la amida primaria y secundaria; 3380 cm^{-1} , amida monosustituída y 3460 cm^{-1} , amida disustituída (28)

Ensayos de identidad:

Una solución de carisoprodol al 3% en cloroformo, con una solución de p-dimetaminobenzaldehído en ácido clorhídrico concentrado y tricloruro de antimonio en cloroformo, da un color amarillo fugaz. (28)

2. Cromatografía en capa fina:

- Aplicar por duplicado 10 μl (microlitros) de las soluciones estándar y problema a una concentración de 1.0 mg/ml en metanol, en una placa de sílica gel. Desarrollar el cromatograma utilizando un sistema hexano:cloroformo:acetona, en proporción de 40:35:25. Rocíar la placa ya seca con una solución de vainillina al 5% en ácido sulfúrico concentrado. Aparecerá una mancha fugaz a un R_f de ± 0.22 .

- Aplicar por duplicado 10 μl (microlitros) de las soluciones estándar y problema a una concentración de 100 mg/ml en cloroformo en una placa de sílica gel. Desarrollar el cromatograma utilizando un sistema benceno:acetona, 100:50. Rocíar la placa ya seca con una solución saturada de cloruro de antimonio en cloroformo y después con una solución de furfural al 2% en cloroformo y calentar la placa a 60°C durante 15 minutos. Aparecerá una mancha violeta oscuro a un R_f de ± 0.65 . (28)

Ensayos de Pureza:

- pH : En suspensión acuosa, debe ser de 7.0
- Pérdida al secado: Secado a 60°C, durante 4 horas, no debe perder más del 0.5% de su peso.

- Residuo de ignición: A un gramo de carisoprodol pesado exactamente, agregarle una o dos gotas de ácido sulfúrico concentrado y calcinarlo hasta peso constante, máximo, 0.1%.

- Sustancias insolubles: Una solución al 10% de carisoprodol en acetona, aparece como una solución incolora sin partículas extrañas. Si la solución presenta una opalescencia, filtrar y llevar el residuo de filtración a peso constante a 105°C, éste no deberá representar más del 0.05% del peso de la muestra.

- Cloruros: Pesar 1.0 g de carisoprodol y adicionarle 10 ml de agua, hervir, enfriar y filtrar. Adicionar al filtrado 1 ml de nitrato de plata. Después de 5 minutos, la solución no debe ser más turbia que una solución preparada de la siguiente manera: A un ml de una solución de cloruro de sodio conteniendo 0.04 mg Cl/ml, agregar 9 ml de agua, 1 ml de ácido nítrico diluido y 1 ml de nitrato de plata. Máximo, 40 ppm.

- Metales Pesados: Calculados como plomo. Máximo 10 ppm. (28)

Prueba de Eliminación:

Tomar 20 a 50 ml de orina y alcalinizarlos con solución de hidróxido de amonio, extraer con dos volúmenes de cloroformo. Lavar y secar los extractos recolectados con sulfato de sodio anhidro y evaporar a sequedad, Disolver el residuo en 1 ml de éter, aplicar una gota en papel filtro y rociarla con una solución de furfural en etanol al 10%. (28)

Secar el papel filtro a la temperatura del cuarto y después colocarlo en contacto con los vapores de ácido clorhídrico. En presencia de carisoprodol, la mancha se tornará de azul a negro. (28)

Toxicología:

La toxicidad del carisoprodol es baja. No tiene efectos adversos sobre la respiración, sangre, hígado, riñón o funciones endócrinas. Se han reportado casos de somnolencia, vértigo, vahído, erupción cutánea y urticaria, además de sensibilización cruzada con meprobamato.

La DL_{50} en ratones y ratas por vía intraperitoneal, es 980 y 450 - mg/kg y por vía oral es de 2,340 y 1,320 mg/kg. (28)

Farmacodinamia:

Cuando el carisoprodol se administra por vía oral, se absorbe rápidamente y se obtiene un efecto más prolongado que cuando se administra por vía intramuscular.

Lo más indicado es administrar este fármaco después de las comidas. En el perro, el carisoprodol es grandemente excretado en la orina como hidroxycarisoprodol; pequeñas cantidades de hidroximeprobamato y meprobamato se encuentran presentes, así como trazas del mismo carisoprodol.

En la sangre, después de una inyección intravenosa, el principal carbamato circulando es el fármaco inalterado, sin embargo, el hidroxycarisoprodol y el hidroximeprobamato también están presentes.

Usos:

El carisoprodol se usa al igual que la mefenesina como relajante muscular así como para disminuir el tono y los movimientos involuntarios del esqueleto muscular. Debido a estas propiedades, es empleado en el tratamiento de tétanos y artritis. (15,28)

Dosis:

Adultos, 350 mg cuatro veces al día

Niños, de 125 a 250 mg tres o cuatro veces al día. (15,28)

3. CAPSULAS.

Las cápsulas son definidas como una forma de dosificación sólida - en la cual, el fármaco se introduce en un contenedor soluble duro o suave de gelatina. En las cápsulas de gelatina se encuentra la expresión - más evolucionada del fraccionamiento de polvos a dosis determinadas. -- Farmacéuticamente, se puede colocar a estos microrrecipientes en un punto medio entre las soluciones y los comprimidos. La cubierta proteica - de las cápsulas, protege al contenido de tal forma, que permite solventar algunos de los problemas de estabilidad. (10)

Podemos encontrar en las cápsulas, una serie de ventajas, tales -- como:

- a) Protección del fármaco: Debido a que el medicamento se ingiere junto con su recipiente, resulta una múltiple protección de principio a - fin para el fármaco, poniéndolo al cubierto del medio externo, excepto de la humedad del medio ambiente.
- b) Excelentes caracteres organolépticos: Una cápsula se hace agradable a la vista no solo por la elegancia de su terminación, sino porque - es posible hacer una selección de colores para su confección. Permiten además la administración de fármacos de sabor desagradable en -- cápsulas insípidas o se pueden aromatizar las cápsulas para hacerlas de más fácil aceptación. Son cómodas de ingerir, pues en contacto -- con la saliva, se tornan resbaladizas, lo que agiliza su deglución.
- c) Rápida identificación: Con una selección adecuada de colores, se puede identificar inequívocamente de acuerdo a códigos propios de cada laboratorio farmacéutico, las características físicas y químicas del medicamento.
- d) Facilidad de composición: El contenido de las cápsulas queda reduci-

do a un número muy reducido de sustancias coadyuvantes, lo que permite el control de las posibles incompatibilidades.

- e) Tolerancia: Son numerosas las medicaciones que son mejor toleradas - por la mucosa gástrica cuando se administran en cápsulas, que cuando se administran en comprimidos.
- f) Biodisponibilidad: La rápida disgregación de las cápsulas, genera un polvo fino con una gran superficie de desplazamiento y por tanto, con gran facilidad para la solubilización del fármaco. (10)

Con todas las ventajas anteriormente mencionadas, cabe señalar que también presentan desventajas, tales como:

- a) Almacenamiento: Son sensibles a las variaciones térmicas y sobre todo a la variación de la humedad relativa del ambiente, por lo que requieren precauciones especiales para su almacenamiento, estén vacías o llenas.
- b) Limitación de aplicaciones: Las cápsulas no se prestan para uso pediátrico, geriátrico y en algunas ocasiones, en tratamientos de enfermedades mentales.
- c) Limitación de composición: No todos los fármacos pueden prepararse - por este medio. Existen líquidos capaces de reaccionar con la gelatina de la cubierta, de disolverla, volverla permeable o difundir a través de ella. (10)

A. Elaboración de cápsulas. (10)

Aunque tanto las cápsulas blandas como las rígidas se confeccionan con gelatina, existen diferencias en la composición. Las rígidas no llevan plastificante adicional.

En la fabricación de cápsulas rígidas, se debe tener en cuenta que la gelatina tenga buen poder gelificante, buena viscosidad, pH adecuado, cenizas bajas, ausencia de arsénico y metales pesados, así como escaso color y olor aceptable. Estos datos de la gelatina revelan no solo el origen y la calidad de la proteína empleada, sino que permiten conocer su historia previa y la índole de su manufactura. La práctica común es alcanzar los valores impuestos por las normas por medio de cortes de -- distintos lotes de gelatina, manteniendo así una calidad uniforme. La gelatina de hueso proporciona una película firme y resistente pero con tendencia a volverse turbia y astillable, mientras que la de recortes - de cuero de porcino confiere a aquella claridad y plasticidad.

Además de los conservadores, las cápsulas rígidas incluyen en su composición agentes dispersantes que aceleran la humectación y desintegración estomacal, opacificantes y colorantes autorizados.

Las cápsulas de gelatina rígida se almacenan en recipientes herméticos hasta el momento de ser llenadas. Deben protegerse de la contaminación microbiana, polvo, luz, excesos de temperatura, etc. La exposición prolongada a los ambientes húmedos, producirá una captación de agua, tornando a las cápsulas pegajosas y la exposición a ambientes muy secos, provoca cápsulas quebradizas por pérdida de agua. Las condiciones ideales de almacenamiento, se consideran de 20 a 25°C y un 40% de humedad relativa.

Las cápsulas se suministran en una variedad de tamaños que se distinguen por numeración arbitraria y tradicional, que van desde la número 5 que es la más pequeña, hasta la número 000, que es la más grande - que se puede ingerir sin dificultades. En medicina veterinaria, suelen utilizarse tamaños aún mayores, destinados a uso bucal e intrauterino y van desde el número 7, hasta el número 13. Para dar una idea de la capa cidad de las cápsulas de acuerdo con su numeración, se tiene el siguien te cuadro:

Cápsula no.	Capacidad en mg de aspirina
000	1,100
00	770
0	550
1	330
2	250
3	200
4	150
5	100

B. Formulación de cápsulas. (10)

Se entiende que en la formulación de cápsulas se tiene una forma farmacéutica no fraccionable y cada cápsula representa una dosis. La norma a considerar será la de utilizar la cápsula más pequeña posible que sea compatible con las exigencias del producto. Se debe considerar si el polvo con el que se va a llenar es uniforme y mantiene su porosidad y su densidad aparente sin sufrir ningún cambio durante toda la operación y saber si es capaz de fluir a través de orificios sin tropiezos. Lo anterior, impone una selección cuidadosa del tamaño de las cápsulas, de los diluentes y la incorporación de coadyuvantes destinados a dar a los polvos propiedades que no tienen, por ejemplo y flujo uniforme y fácil.

Para diluir y corregir, se emplean varias sustancias; se acude a menudo a la lactosa, que presenta una conducta reológica predecible y con la que están familiarizados la mayoría de los técnicos.

Pueden añadirse otros diluentes como sacarosa en polvo, almidón de maíz, manitol, fosfatos de calcio, inositol, urea, cloruro de sodio, caolín, etc.

Como lubricantes, utilizados para mejorar el deslizamiento, se acude a estearatos alcalinotérreos o de aluminio, talco, polioxietilenglicoles 4000 y 6000, aerosil, etc.

Si aparece una sustancia hidrófoba en la formulación, se añades humectantes adecuados para no perjudicar la calidad de las cápsulas de rápida desintegración.

Invariablemente, la idea antes de formular debe ser, optando por la sencillez de una formulación y evitar las incompatibilidades en la misma.

En algunas ocasiones, para llegar al peso de llenado, se ha propuesto densificar el polvo y se recurre para tal fin a una granulación, aunque se trata de evitar este camino porque daña la disolución del contenido de la cápsula.

Las incompatibilidades que se pueden presentar en esta forma posológica, son mínimas. En el caso de incompatibilidades intrínsecas a la formulación, suele usarse dilución con agentes inertes.

4. DISOLUCION.

La disolución surge como una necesidad para evaluar los patrones de liberación del fármaco de su forma dosificada. (2)

En 1961, Levy demostró que la disolución de aspirina en el tracto gastrointestinal era un factor que limitaba su absorción, así, se desarrollaron aparatos que pudieran predecir in vitro, la absorción de un fármaco. (16)

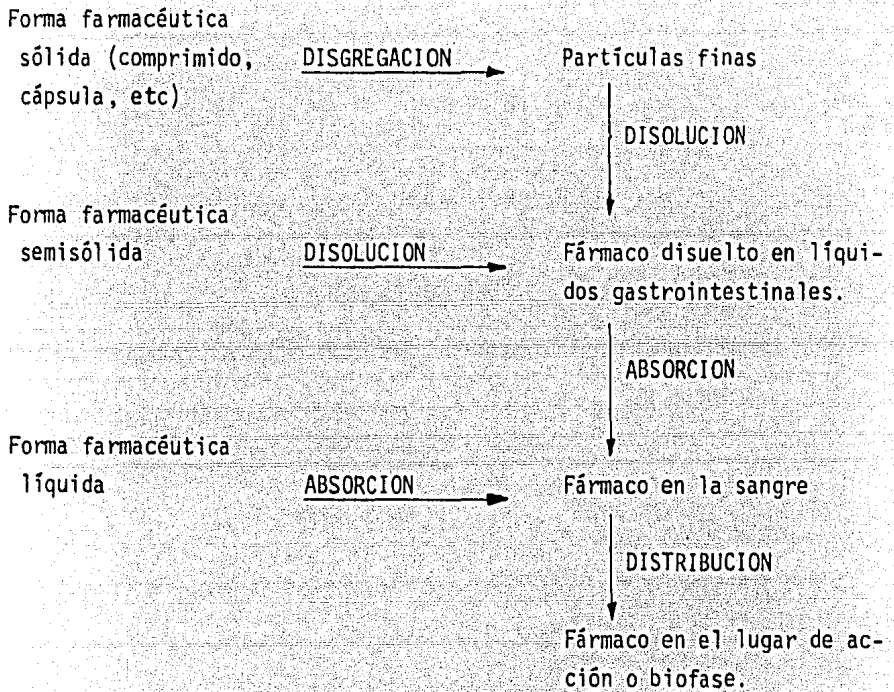
Años atrás, se consideró la prueba de desintegración como la única forma de predecir la biodisponibilidad de las formas sólidas de dosificación oral. Se afirmaba que si una tableta se desintegraba, sería consecuencia lógica su disponibilidad biológica. (2)

Se detectaron grandes variaciones entre medicamentos aparentemente equivalentes y la incapacidad de algunos métodos de prueba para distinguir entre diferentes velocidades de liberación y fue a partir de datos experimentales que se concluyó que la prueba de desintegración, no estaba asociada con la biodisponibilidad de dichos fármacos. (16)

A. Bases teóricas de la disolución.

Se puede considerar a la disolución de un sólido como el proceso inverso al de cristalización, ya que desorganiza la estructura bajo la acción del disolvente. Las partículas penetran en la fase líquida y difunden desde la superficie del sólido, hasta el seno de la solución. (2)

A continuación, se presenta el esquema número 1, donde se muestra al proceso de disolución como una parte importante para alcanzar el efecto terapéutico adecuado.



ESQUEMA No. 1 En el cuadro se aprecia, que si el proceso de di
 DISOLUCION solución se encuentra bloqueado, la absorción del fármaco no tiene lugar, originando fallas terapéuticas. Se asocia a la disolución con tres diferentes formas farmacéuticas. (2)

Las partículas se distribuyen en la fase solvente mediante el proceso de difusión, llegando a ocupar todo el seno de la solución. (2)

Noyes y Whitney, fueron los primeros en estudiar las velocidades de disolución de un sólido de manera cuantitativa, expresándola como sigue:

$$\frac{dC}{dt} = kS (C_s - C)$$

donde:

- dC/dt = Velocidad de disolución de la sustancia
 C = Concentración del sólido en la solución al tiempo t
 C_s = Solubilidad del sólido en el disolvente
 k = Constante de velocidad de disolución
 S = Superficie del sólido

Esta ecuación, supone la disolución de partículas esféricas, con la existencia de un flujo laminar que permite suponer la presencia de una superficie adsorbida de espesor uniforme alrededor de cada partícula. (2)

Se supone además, que las partículas se disuelven isotrópicamente y bajo condiciones en las cuales la concentración de sustancia disuelta aumenta a medida que se efectúa la disolución. (2)

Posteriormente, Nerst y Brunner, tratan de explicar la disolución, considerando que la superficie adsorbida sobre la partícula, constituye una "película líquida de solución saturada", implicando un gradiente de concentración, respecto al líquido total. Esta película líquida, recibe el nombre de "Capa de Difusión de Nerst". Cuando la difusión constituye un proceso lento, la concentración en la superficie del sólido es diferente a la concentración del seno de la solución. (2)

La teoría de difusión de Nerst y Brunner se considera aceptable para explicar el proceso de disolución. La hipótesis de la existencia de la capa de difusión, permite la correlación entre los datos experimentales y las propiedades físicas de las sustancias sólidas que se disuelven en un líquido no reactivo. El espesor de esta capa según Nerst, sería del orden de 10^{-3} a 10^{-2} cm de espesor. Supone además, que el proceso de disolución desde la superficie del sólido se realiza con mucho --

más rapidez que el proceso de transporte de las moléculas disueltas hacia el seno de la solución. En los casos en que este último es mayor, - la teoría no es aplicable. (2)

A partir del modelo de disolución considerado como el proceso desde una superficie plana en un líquido sin movimiento y en el cual el líquido en la interfase sólido-líquido, corresponde a una solución saturada, se puede obtener la siguiente expresión matemática:

$$M = 2 C_s A \frac{Dt}{\pi}$$

donde:

M = Cantidad de sólido disuelto al tiempo t

C_s = Solubilidad en el medio de disolución

A = Área superficial de la partícula

D = Difusividad de las moléculas disueltas en el medio líquido

La velocidad de disolución entonces, depende solamente del proceso de difusión, y éste disminuye con el tiempo porque a medida que el proceso de disolución avanza, el gradiente de concentración disminuye, así como también disminuye el área superficial del sólido expuesto al ataque del líquido de disolución.

Danckwerts, supone que el tiempo de exposición de la superficie sólida al líquido no es constante y que la capa de difusión alrededor de la película no es estática, sino que al existir una turbulencia en la interfase, la superficie líquida se reemplaza constantemente por líquido nuevo.

B. Factores que afectan la velocidad de disolución in vitro.

La velocidad de disolución puede verse afectada de diversas maneras de acuerdo con los componentes que tenga la formulación, o con los elementos involucrados en la disolución misma. Una clasificación general de los factores que afectan la velocidad de disolución, puede ser la siguiente:

- a. Factores que dependen del medio de disolución
- b. Factores que dependen de la forma farmacéutica
- c. Factores que dependen del principio activo a disolver

Dentro de los factores que dependen del medio de disolución, se tienen a la intensidad de agitación, temperatura y composición del medio, como más importantes. (2)

- Intensidad de la agitación:

Se puede acelerar la velocidad de disolución agitando con mayor intensidad. Nerst y Brunner aseguran que el espesor de la capa líquida que rodea a las partículas, es inversamente proporcional a la velocidad de agitación. (2,16)

- Influencia de la composición del medio de disolución:

Considerando el pH del medio, se ve que la velocidad de disolución de un ácido débil aumenta si se incrementa el pH y la velocidad de disolución de las bases débiles disminuye; además, las moléculas ionizadas son mucho más solubles en un medio ácido que en un medio alcalino. Las sustancias ácidas se disuelven más rápidamente en un medio alcalino.

Si se considera la viscosidad del medio de disolución, se tiene que el coeficiente de difusión es inversamente proporcional a la viscosidad.

b. Dentro de los factores que dependen de la forma farmacéutica, se tienen:

- Efecto de los diluentes:

Se ha sugerido que los diluentes sean digeribles, para no impedir o retrasar la liberación de los principios activos. Con este fin, se agregan algunos carbohidratos, aunque en ocasiones se usan también sustancias insolubles, obteniéndose comprimidos demasiado consistentes, como es el caso de la sacarosa y la lactosa, haciéndose lentas tanto la disgregación como la liberación de los fármacos. También se ha presentado efecto de adsorción y complejación de algunos fármacos con diluentes. El almidón empleado en formulaciones por doble compresión, ha demostrado aumentar la velocidad de disolución de los comprimidos. (2)

- Efecto de los desintegrantes:

Suele confundirse este efecto con el de los diluentes, ya que hay sustancias que tienen esta doble acción. La mayoría de los desintegrantes ejercen su efecto debido al aumento de volumen con el agua captada del medio líquido que rodea al comprimido. Los almidones poseen una excelente capacidad desintegradora, permitiendo obtener velocidades de disolución óptimas de los principios activos. Los coadyuvantes que aumentan la viscosidad, retardan la liberación de fármacos a causa de la disminución de la velocidad de difusión de las moléculas en el medio acuoso. (2, 16, 24)

- Influencia de los lubricantes:

Los lubricantes utilizados en la preparación de comprimidos, son a menudo productos hidrofóbicos, que en porcentajes elevados, impiden la humectación de las partículas y retardan su velocidad de disolución. Se han demostrado efectos de retraso en la velocidad de disolución del estearato de magnesio sobre la disolución de algunos comprimidos, a concentraciones mayores del 1%. (1, 2, 16)

- Influencia de la granulometría:

La influencia del tamaño de partícula del principio activo en una formulación, origina variaciones en la velocidad de disolución. Cuanto más pequeña es la partícula, más rápida es la velocidad de disolución. Se ha dicho también que la velocidad de disolución aumenta medida que el tamaño de partícula disminuye. (2)

- Influencia del método de granulación:

Con el método de granulación, pueden obtenerse comprimidos de diversa resistencia mecánica, lo que influye en la velocidad de disolución del principio activo. Así, una granulación húmeda, proporciona gránulos que presentan mayor dificultad para ceder el principio activo al medio de disolución, debido a que se forman gránulos demasiado grandes y aglomerados. Este efecto también se presenta cuando la humectación en una granulación es excesiva. (2)

c. Dentro de los principales factores que dependen del principio activo a disolver, se encuentran:

- La solubilidad:

La solubilidad es un parámetro termodinámico que representa la concentración de la solución de un fármaco en equilibrio con el soluto. Ha sido considerada muchas veces, como el factor más importante en la velocidad de disolución del principio activo. (2, 16)

Existen a su vez, varios factores que pueden modificar la solubilidad de una sustancia sólida, tales como:

La naturaleza química del sólido: Si solamente se emplea como disolvente el agua, ésta constituye un excelente medio en el cual los electrolitos se disocian fácilmente en iones, pero respecto a aquellas sustancias que contienen a la vez una parte polar y una no polar, su solubilidad en agua depende de la relación entre cada uno de estos grupos. (2)

Polimorfismo: El polimorfismo se define como la propiedad de algunas sustancias sólidas, de cristalizar en más de una estructura cristalina. Esta particularidad suele presentarse cuando las condiciones de preparación sufren alteraciones. Así, es posible obtener formas polimorfas por cambio de disolventes, variaciones en la temperatura de cristalización, etc. (2)

- Porosidad:

La influencia de la superficie creada por los poros en una masa -- cristalina, ha sido estudiada, siguiendo la velocidad de disolución de comprimidos de ácido benzoico en agua destilada a la que se ha agregado un detergente, y de comprimidos a los cuales se ha extraído el aire de los poros mediante la aplicación de vacío. Así, se ha podido demostrar que la velocidad de disolución de los comprimidos en los cuales se ha eliminado el aire de los poros, es más elevada que en aquellos no sometidos a este tratamiento, debido a un mejor contacto del líquido con la superficie porosa. Este mismo resultado se ha obtenido empleando soluciones de detergentes, en los cuales la pequeña tensión interfacial favorece el contacto con la superficie total de los poros, provocando un aumento en la velocidad de disolución. (2)

C. Metodología empleada en la disolución.

Para elegir un método de disolución, es necesario prestar atención a las propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas del principio activo, a la forma farmacéutica y el método de fabricación empleado y en general a todos los factores mencionados en el punto anterior.

El aparato que se seleccione, deberá ser sencillo en su manipulación y dar la menor variación en la toma de muestras. Se deben considerar entonces, los siguientes puntos:

- a. Medio de disolución: Si se considera que la desintegración de un comprimido o de una cápsula se realiza preferentemente en el estómago, el medio de disolución más adecuado para estos ensayos debiera ser el jugo gástrico, pero debido a que la cantidad que se necesita para hacer una prueba de esta índole es mucho muy grande, entonces se prepara jugo gástrico simulado, al cual se le adiciona una pequeña cantidad de agentes tensoactivos para lograr las características de tensión superficial del jugo gástrico. El medio de disolución depende en gran parte de la solubilidad del principio activo en el líquido seleccionado. (2)
- b. Recipiente de disolución: La elección del recipiente de disolución es importante. El tamaño puede ir desde unos mililitros, hasta varios litros según sea el método empleado. Se han detectado diferencias apreciables en la disolución, según sea la forma del vaso. Se ha propuesto el empleo de vasos con fondo redondo, en los cuales el comprimido ó cápsula, queda en posición central. (2, 16, 29)
- c. Temperatura: Este factor coincide como parámetro in vivo, reproducible en condiciones in vitro (37°C). La temperatura puede afectar de manera muy marcada la solubilidad de los fármacos, por lo que debe mantenerse dentro de límites muy estrechos. (2, 16)
- d. Sistema de agitación: Es muy importante en un estudio de cinética de disolución de medicamentos. El más empleado consiste en introducir una varilla agitadora provista de paletas y conectada con un motor que le imprime una velocidad de agitación regulada y adecuada mientras dura el estudio. (2)
- e. Velocidad de agitación: Este es un parámetro de no menor importancia que los anteriores y el cual debe estar sujeto a un valor constante durante la realización completa del estudio de disolución. Una velocidad de agitación acelerada, ocasiona una velocidad de disolución más rápida. (2)

El aparato de disolución que describe la USP, consta de cuatro partes, que son:

- a. Baño de temperatura regulada
- b. Recipientes para la disolución
- c. Varilla o flecha del motor
- d. Motor de velocidad variable

El aparato de disolución empleado en el presente trabajo, contiene las cuatro partes que señala la USP y específicamente, tiene seis vasos para la disolución, con fondo cóncavo, cada uno de los cuales tiene la boca bordeada y lleva una tapa con cuatro orificios, uno de los cuales está en el centro, que es donde se introduce la varilla o flecha del motor y los orificios restantes se utilizan para el termómetro, la toma de muestra y para reemplazar el medio de disolución. Cada una de las varillas del motor termina con una paleta de teflón, que imprime movimiento al medio de disolución contenido en el vaso. Dichas paletas pueden ser removidas y reemplazadas por canastillas de acero inoxidable malla número 40. El motor del aparato, puede ser ajustado a velocidad variable dentro del rango de 25 a 200 rpm. Esta velocidad se mantiene constante a lo largo de toda la prueba.

5. ABSORCIÓN DE MEDICAMENTOS.

Para que un medicamento ejerza su efecto terapéutico, el principio activo de éste debe ser transportado desde el lugar de aplicación, hasta el sitio de acción o biofase. La primera etapa en esta serie de procesos dentro del organismo, es la absorción. Cuando se trata de un fármaco administrado por vía oral, éste debe atravesar la barrera que separa al tubo gastrointestinal de la circulación general. Esta barrera es una estructura compleja y en su composición forman parte lípidos, proteínas, lipoproteínas y polisacáridos. Se comporta como una membrana semipermeable, que puede ser atravesada preferentemente por sustancias liposolubles. La membrana presenta además, poros que interrumpen su continuidad y permiten el paso de sustancias de pequeño tamaño. Los poros tienen un diámetro de más o menos 5 a 7 Å. Los fármacos en general, tienen tamaños moleculares mayores, por lo tanto ésta no representa una vía que contribuya en forma apreciable a la absorción de los principios activos.

A. Mecanismos de Absorción.

La mayor parte de los fármacos, se absorben por un proceso de transporte pasivo, o simple difusión, por lo que se inicia hablando sobre este transporte.

a. Difusión Pasiva.

En la difusión pasiva, la velocidad es proporcional al gradiente de concentración existente entre ambos lados de la membrana. La absorción se describe por la primera Ley de Fick, que se expresa como:

$$\frac{dQ}{dt} = - DA \frac{dC}{dx}$$

donde:

dC = Cambio de concentración

dx = Distancia

dQ/dt = Velocidad de absorción

dt = Intervalo de tiempo

dQ = Cantidad de sustancia

D = Coeficiente de difusión

A = Area de la membrana

es decir, que la velocidad de absorción ó cantidad de sustancia que difunde en un determinado tiempo a través de la membrana, es directamente proporcional al cambio de concentración en una determinada distancia. - El coeficiente de difusión, corresponde a la cantidad de sustancia que difunde por unidad de tiempo a través de una unidad de área, cuando el gradiente de concentración es igual a la unidad. El signo negativo indica que el proceso se desarrolla en la dirección de la menor concentración. (10)

Incluyendo los términos D y A en una constante, denominada ka, y expresando la transferencia en términos de la disminución de la concentración de fármaco en el tubo gastrointestinal, se tendrá:

$$\frac{dC}{dt} = ka (C_1 - C_2)$$

en donde C₁ y C₂ representan la concentración de uno y otro lado de la membrana.

En el transporte pasivo, la cantidad de fármaco que pasa al torrente sanguíneo depende en forma directa de la dosis administrada, de manera que aumentando ésta, se debería incrementar proporcionalmente la concentración en sangre. (10)

La absorción de un fármaco por difusión, se caracteriza por:

- 1) La velocidad es proporcional al gradiente de concentración a través de la membrana.
- 2) La membrana actúa como membrana semipermeable que permite el paso en los dos sentidos de sustancias que son solubles en lípidos.
- 3) La membrana desempeña un papel pasivo en el sentido de que no hay --gasto de energía durante el proceso.
- 4) La absorción se lleva a cabo únicamente por sustancias solubles en lípidos. (8, 10)

b. Transporte activo.

Generalmente el término transporte activo involucra el movimiento de iones o moléculas en contra de un gradiente de concentración ó potencial electroquímico. Para que este flujo en contra de un gradiente pueda producirse, se requiere que el organismo disponga o proporcione algún tipo de energía. La transferencia de una sustancia de uno a otro lado de la membrana, se produce por mediación de una sustancia, que se encuentra en la membrana y que actúa como mediador, portador o acarreador y que se une al fármaco en un lado de la membrana transportándolo hacia el otro sector, es decir, de la parte exterior o mucosa a la parte interna o serosa. (8, 10)

El acarreador o portador, suele ser una enzima u otra sustancia capaz de combinarse en forma específica con la molécula de soluto que ---transporta. Existe una cantidad limitada en los diferentes tejidos, de tal manera, que es susceptible de saturarse cuando el soluto supera una cierta concentración. (10)

Las diferencias más importantes entre transporte activo y difusión pasiva, han sido puntualizadas por Schancker, como:

- a) Transporte del soluto a favor de un gradiente de concentración, es decir, que la transferencia puede producirse desde la solución de más baja concentración a otra de mayor concentración, o si el soluto es un ión, puede moverse en contra de un potencial electroquímico.
- b) Saturación del mecanismo de transporte, cuando el soluto alcanza una concentración suficientemente alta.
- c) Especificidad del proceso para una cierta estructura molecular.
- d) Competencia entre solutos que emplean el mismo mecanismo de la transferencia.
- e) Inhibición del proceso de transporte por sustancias que interfieren con el metabolismo celular, tales como los fluoruros o el dinitrofenol.
- f) El sistema requiere de energía.

El transporte activo, desempeña un papel fundamentalmente importante en el tubo gastrointestinal en la absorción de algunos elementos nutritivos.

Existen otros mecanismos de absorción que no son importantes para principios activos, como son: apareamiento iónico, transporte facilitado, pinocitosis, conducción, etc. (8, 10)

B. Biodisponibilidad

Se ha hecho evidente que la acción farmacológica y/o terapéutica de los medicamentos, no es solo función de la actividad farmacológica intrínseca del principio activo, sino que están condicionados de manera importante a las características física y fisicoquímicas del farmaco y de la forma farmacéutica en que se administra. (8)

Para que un fármaco ejerza su efecto terapéutico, es necesario que llegue al sitio de acción o biofase y alcance la concentración apropiada. (8)

La forma farmacéutica se considera como un sistema fisicoquímico que entrega fármaco al organismo, por lo que sus propiedades y características pueden afectar la liberación del fármaco y la entrega de éste al organismo. (8)

De lo anterior, surge la Biofarmacia, como una disciplina que se ocupa del estudio de las relaciones entre las propiedades fisicoquímicas de los fármacos y de las formas farmacéuticas que los contienen y la respuesta farmacológica observada después de la administración. (8,10)

Paralelo al desarrollo de la Biofarmacia, se encuentra el estudio de los procesos de absorción, metabolismo y excreción de los principios activos. El estudio de estos procesos en términos de constantes de velocidad, es el objetivo principal de la Farmacocinética. (8, 10)

La farmacocinética trata de obtener un panorama completo del destino del fármaco en el organismo, para lo cual emplea datos de concentración del fármaco o sus metabolitos en la sangre y otros fluidos biológicos, en relación al tiempo, trabajados en forma de modelos matemáticos.

Farmacocinética, queda definida como el estudio de la cinética de absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos en animales y en el hombre. (10)

Biodisponibilidad o Disponibilidad Biológica, se define como una medida de la cantidad relativa de la dosis administrada que llega a la circulación general y de la velocidad a la cual esto ocurre. (13)

Farmacocinéticamente, el organismo es considerado un conjunto de compartimentos interconectados. La transferencia de un fármaco de un compartimento a otro, se efectúa generalmente por simple difusión, mediante un proceso que obedece a una cinética de primer orden, es decir, es proporcional a la concentración del fármaco. (13)

Se entiende por distribución a la transferencia de un fármaco, desde la sangre a otros tejidos y líquidos biológicos, por lo que luego de transcurrido un cierto tiempo después de la administración de un medicamento, se establece un equilibrio entre la concentración de fármaco en la sangre o plasma y la existente en los demás tejidos. (8, 13)

El metabolismo y la excreción, se llevan a cabo en forma paralela o simultánea a la distribución. El metabolismo o biotransformación, se refiere a la modificación del fármaco por efecto de enzimas y su transformación en una entidad química diferente. En el hígado, se produce la mayor parte de la actividad de biotransformación, sin embargo, puede -- también ocurrir en otros órganos o tejidos tales como los riñones, pulmón, epitelio gastrointestinal, etc. La excreción de los medicamentos - se produce principalmente a través del riñón, aún cuando también existe excreción por otras vías como la respiratoria, a través de la piel o en la bilis. En algunas circunstancias, existe la denominada circulación - enterohepática, en donde el fármaco es excretado en la bilis y luego re absorbido; en este caso, no existe excreción ó pérdida neta del fármaco y corresponde por lo tanto a una forma de distribución. (8,10,13)

Tanto el metabolismo como la excreción, son irreversibles y ambos eliminan el fármaco del organismo. Se pueden considerar normalmente como procesos cinéticos de primer orden; es decir, que la velocidad a la que se realizan, es proporcional a la concentración del fármaco. Sin embargo, en ocasiones la biotransformación y algunas formas de excreción, como la secreción tubular, son procesos que tienen una capacidad limitada. La excreción y el metabolismo, son procesos de eliminación - de fármaco del organismo y en farmacocinética a menudo se consideran en forma conjunta, caracterizándose por una sola constante de velocidad de eliminación que incluye las constantes de velocidad de los dos procesos. (8)

6. CORRELACION IN VIVO-IN VITRO. (21)

En los últimos años, ha tomado gran importancia el hecho de poder predecir los niveles de absorción de un fármaco, liberado a partir de una forma farmacéutica, con una prueba efectuada in vitro.

Al realizar pruebas de estabilidad y control de calidad que deben cumplir los medicamentos, se está asegurando el contenido químico y la presentación física y se busca el poder asegurar también que el fármaco contenido en la forma farmacéutica alcance el sitio de acción para lograr el efecto terapéutico.

Cuando se lleva a cabo una correlación in vivo-in vitro, se persiguen diferentes objetivos, tales como:

- a) Establecer una similitud de como se realizan estos procesos in vivo:
- b) Evaluar una forma farmacéutica, es decir, se evalúan patrones de liberación del principio activo a partir de la forma farmacéutica e inclusive se puede comparar una formulación con otra o conocer las variaciones de lote a lote de la misma formulación.
- c) Asegurar el efecto terapéutico del medicamento.

A. Variables correlacionables.

Variables in vivo más importantes:

- a. Concentración en sangre a un tiempo dado
- b. Máxima concentración de fármaco en sangre
- c. Cantidad de fármaco excretado en orina a un tiempo dado

- d. Cantidad total excretada en orina.
- e. Constante de velocidad de excreción ó absorción
- f. Areas bajo las curvas de concentración sanguínea contra tiempo

Correlacionables con las variables in vitro:

- a. Cantidad de fármaco en solución a un tiempo dado
- b. Porcentaje disuelto a uno o varios tiempos
- c. Velocidad de disolución
- d. Eficiencia de disolución

B. Tipos de Correlación.

Se tienen correlaciones de dos tipos:

- a. Correlaciones graduales
- b. Correlaciones cuantitativas

a. Una correlación es gradual cuando los valores in vivo llevan una relación secuencial o gradual con las variables in vitro (x aumenta, y disminuye o viceversa).

Para el tratamiento estadístico se hace que el primer valor de x - tenga el mismo valor que el primero de y, siendo ambos de 1.

La significancia de una correlación gradual se determina por el método de Spearman:

$$r_{\text{grad}} = \frac{1 - 6D^2}{N(N^2 - 1)}$$

donde:

r = Coeficiente de correlación gradual

D = Diferencias entre los valores correspondientes x , y .

N = Número de pares de valores x , y .

El valor de $100 r^2$ gradual, proporciona el grado de significancia de correlación gradual, sin embargo, aún cuando sea mayor de 90, los resultados *in vitro* no los podemos considerar como una predicción de los resultados *in vivo* y solo nos servirá para darnos una idea de la posible biodisponibilidad de fármacos que se encuentran en formulaciones -- donde la disolución sea muy cercana a los valores encontrados.

b. En una correlación cuantitativa, lo primero es hacer la correlación de las variables *in vitro*, con las variables *in vivo* colocando las variables *in vitro* en el eje de las abscisas. La línea que relaciona estos puntos, se representa por la ecuación de la recta pendiente-ordenada al origen:

$$y = mx + b$$

Para conocer que tan significativa es la correlación, se hace uso del coeficiente de Pearson:

$$r = \frac{\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{N}}{\left[\left(\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{N} \right) \left(\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{N} \right) \right]^{1/2}}$$

donde:

x_i = Valor de la variable *in vitro* de la formulación i

y_i = Valor de la variable *in vivo* de la formulación i

N = Número de pares de valores x , y

En la práctica, r es calculada a partir de un conjunto de valores y la r obtenida podrá compararse con la de tablas para un determinado nivel de significancia, pudiéndose obtener altos niveles de significancia, buenas condiciones y aún así, no ser útiles para predecir valores in vivo a partir de datos in vitro. En estos casos, Wagner sugiere utilizar el parámetro $100r^2$ definido como el por ciento de valores que pueden considerarse con respecto de los valores x por medio de una regresión lineal.

Si $100r^2$ es menor de 90, los límites de confianza para una y predicha a partir de un valor x , serán grandes, y por lo tanto, no se tendrá confiabilidad en la predicción.

Debido a la frecuente variabilidad de los resultados in vitro, es difícil encontrar valores tan altos de $100r^2$ y es entonces cuando debemos hacer tantos ajustes como sea necesario de las variables in vitro, hasta que se encuentre una correlación aceptable.

7. CROMATOGRAFIA

La solución de numerosos problemas de química, se relaciona con -- el aislamiento e identificación de las especies existentes en la mezcla problema. (6)

En los últimos años, han adquirido gran auge los métodos fisicoquímicos de identificación, como la espectrofotometría, polarimetría, etc., aunque el mayor inconveniente de estas técnicas, estriba en el alto grado de pureza que deben tener las sustancias por examinar. (6)

Los procedimientos clásicos de separación, tales como destilación, cristalización, etc., pueden conducir tras laboriosas operaciones, a -- productos en alto estado de pureza, que en general, proporcionan poca -- información acerca de la naturaleza de tales sustancias. Estos procedimientos han sido desplazados en gran parte por los distintos tipos de cromatografía, más simples y rápidas en su realización práctica y en general, de más alto poder de resolución. (6,23)

A. Fundamento teórico de la cromatografía.

El principio común a todas las técnicas cromatográficas, es el siguiente: un fluido, que es la fase móvil, circula a través de una fase estacionaria que puede ser sólida ó líquida. Cuando una mezcla de sustancias se introduce en el sistema, se produce una serie de equilibrios de distribución entre las dos fases, desplazándose cada componente con diferente velocidad a lo largo del sistema. (23)

Las sustancias deben ser solubles en la fase móvil y según sea el tipo de interacción con la fase estacionaria, se puede clasificar el proceso de la siguiente manera:

a) Adsorción: Cuando la fase estacionaria es un sólido adsorbente. Los adsorbentes más utilizados son: sílica, alúmina, carbón activado o tierra de diatomeas.

b) Intercambio iónico: La fase estacionaria es un sólido reticulado con iones en sus nodos, los cuales se intercambian con los componentes de la mezcla.

c) Filtración sobre geles porosos: La fase estacionaria es un sólido reticulado con un tamaño de intersticios característico que permite o impide la entrada de la o las sustancias, de acuerdo con el peso molecular de las mismas.

d) Cuando la fase estacionaria es líquida, la técnica suele recibir el nombre relacionado con la forma en que se dispone la fase estacionaria, por ejemplo en columna, en papel, en capa fina, etc. (6,23)

De acuerdo con el proceso involucrado en la separación, la cromatografía se puede clasificar de la siguiente manera:

1. Cromatografía de Adsorción

- a. Cromatografía en capa delgada
- b. Cromatografía líquido-sólido
- c. Cromatografía gas-sólido

2. Cromatografía de partición

- a. Cromatografía líquido-líquido
- b. Cromatografía gas-líquido
- c. Cromatografía en papel

3. Cromatografía de exclusión

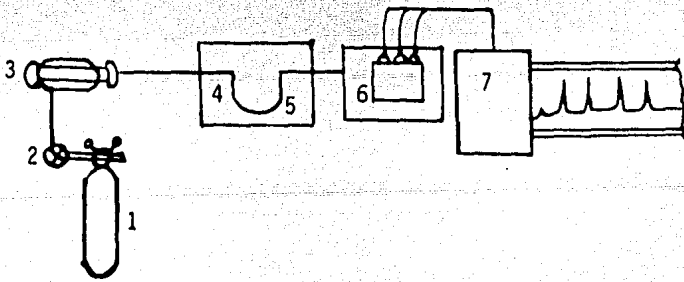
- a. Gel de permeación

B. Cromatografía de gases.

La base de la separación por cromatografía de gases, es la distribución de una muestra entre dos fases. Una de estas fases es una cama estacionaria de gran área superficial y la otra es un gas, el cual circula a través de la cama estacionaria. (23)

Si la fase estacionaria es un sólido, se habla de cromatografía gas-sólido, y si es un líquido, se habla de cromatografía gas-líquido. La base de la separación en la cromatografía gas-líquido es la partición de la muestra dentro y fuera de la película líquida. (23)

El esquema básico de un cromatógrafo de gases, es el siguiente:



ESQUEMA No. 2 Esquema básico de un cromatógrafo de gases, mostrando los principales componentes del mismo. (23)

De acuerdo con la numeración del esquema número 2, se tiene:

1. Fuente de gas comprimido: proporciona la fase móvil o gas portador. Como gases más utilizados, se tienen el hidrógeno, helio, nitrógeno y argón.

2. Regulador de presión o flujo del gas portador.

3. Inyector: Dispositivo que permite la inyección o introducción de la muestra en la corriente del gas portador. Se trata de una cámara situada a la entrada de la columna y calentada independientemente de ésta, a una temperatura generalmente superior al punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra; tiene una membrana de caucho o teflón a través de la cual, se introduce la muestra con la ayuda de una microjeringa hipodérmica. El volumen interior del inyector, debe ser lo más reducido posible.

4. Columna cromatográfica: Se le considera el corazón del cromatógrafo, ya que en ella se realiza la separación de la mezcla. Es un tubo de vidrio o metal como acero inoxidable, cobre, etc., de longitud que oscila entre 1 y 200 m, con diámetro interior de 0.1 a 50 mm, según sea el tipo de columna.

5. Horno: En su interior se sitúa la columna, debe poseer un eficiente sistema de regulación de la temperatura.

6. Detector: Dispositivo que permite medir de manera continua una propiedad física del gas portador, que se modifica con la presencia de muy pequeñas cantidades de la sustancia por analizar. Está situado a la salida de la columna. El detector de flama es el más utilizado, debido a sus características, tales como:

- Es sensible a casi todos los compuestos orgánicos.
- No responde a las impurezas comunes del gas acarreador.
- Es insensible a la mayoría de los compuestos inorgánicos.
- Es sumamente sensible y con gran margen de respuesta lineal.

7. Sistema graficador o registrador. (23)

Como ventajas de la cromatografía de gases, se pueden mencionar:

- Velocidad:

El análisis completo se realiza en poco tiempo. El uso de un gas inerte como fase móvil, tiene la ventaja de un rápido equilibrio entre las fases móvil y estacionaria y permite emplear altas velocidades del gas acarreador.

- Magnífica resolución:

En cromatografía de gases, se hace posible la separación de compuestos que por otras técnicas es extremadamente difícil ó imposible. El uso de solventes selectivos, permite obtener resoluciones imposibles de realizar por destilación u otras técnicas.

- Aplicación en análisis cualitativo:

El tiempo de retención, es el tiempo transcurrido desde la inyección, hasta el máximo del pico. Esta propiedad, es característica de la muestra en la fase líquida a una temperatura dada. Con un flujo adecuado, y control de la temperatura, se puede reproducir el pico e identificarse. Varios compuestos pueden tener tiempos de retención cercanos, pero cada compuesto tiene un solo tiempo de retención, a su vez, este tiempo no está influenciado por la presencia de otros compuestos.

- Aplicación en análisis cuantitativo:

El área de cada pico, es proporcional a la concentración de la sustancia que produce ese pico. Esto puede ser usado para determinar la concentración exacta de cada componente. Con técnicas apropiadas, la integración de resultados llevada a cabo con integradores electrónicos digitales o computadoras, pueden proporcionar mejores resultados.

- Sensitividad:

Las formas más simples de celdas de conductividad térmica, pueden

determinar no menos de 0.01% , mientras que el detector de flama, fácilmente registra partes por millón. Una ventaja adicional de esta sensibilidad extrema, es el tamaño de muestra tan pequeño que se requiere para el análisis.

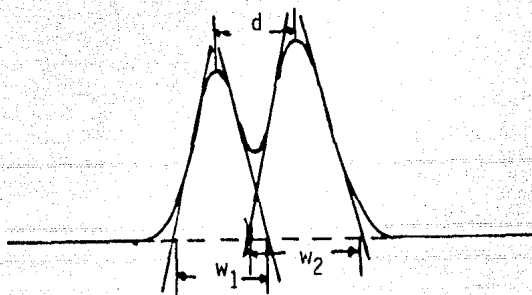
- Sencillez:

Los cromatógrafos de gases son simples de operar y entender. La interpretación de datos es usualmente rápida. El costo de los cromatógrafos de gases, es bajo en relación a los datos obtenidos a partir de éstos. (23)

Al realizar análisis de una mezcla por cromatografía de gases, se obtienen en el cromatograma picos que representan a cada una de las sustancias en cuestión. La interpretación de estos picos, involucra diversos conceptos, como resolución, eficiencia, etc., los cuales se mencionan a continuación:

Resolución: Se define como la capacidad que posee una columna cromatográfica para la separación de mezclas. Esto es, cuando dos sustancias se introducen en la columna, cada una de ellas se desplazará hacia la salida con una velocidad característica. La separación de dos picos consecutivos, está representado por:

$$R = \frac{2d}{w_1 + w_2}$$



Eficiencia: Es la longitud de la columna en la que se produce un equilibrio de reparto del soluto entre las dos fases. Su interés práctico es servir como método para determinar la calidad de las columnas. (23)

La resolución de los picos cromatográficos, está relacionada a dos factores: Eficiencia del solvente y eficiencia de la columna.

La eficiencia del solvente o retención relativa, se determina por los coeficientes de distribución respectivos de los solutos en el solvente a la temperatura de trabajo. (23)

La eficiencia de la columna, está medida por el número de platos teóricos. Para comparar eficiencias de las columnas, se debe especificar el solvente, soluto, temperatura, velocidad de flujo y tamaño de muestra. (23)

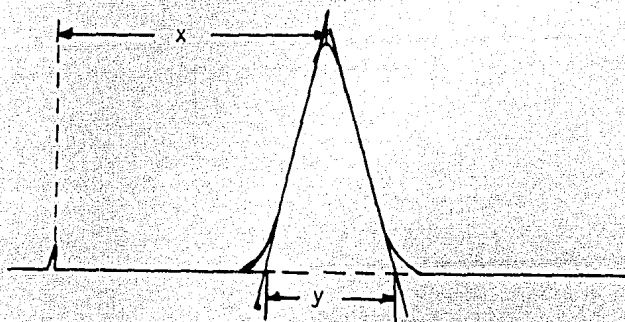
Los platos teóricos pueden ser fácilmente medidos a partir del cromatograma. Se dibujan tangentes al pico en los puntos de inflexión. El número de platos teóricos, N, está dado por:

$$N = 16 (x/y)^2$$

donde:

x = distancia desde la inyección al pico máximo

y = longitud de la base cortada por las dos tangentes.



La altura equivalente al plato teórico, se puede calcular a partir de N:

$$AEPT = \frac{L}{N}$$

donde:

AEPT = Altura equivalente al plato teórico

L = Longitud de la columna cromatográfica en cm.

N = Número de platos teóricos

C. Aplicaciones de la cromatografía de gases. (23)

La aplicación primaria de la cromatografía de gases, es en el análisis cuantitativo.

Se puede comenzar por establecer cuales son las posibles fuentes de error en un análisis cuantitativo:

- Técnica de muestreo:

Hay dos fuentes de error en el muestreo; el primer problema, es tomar exactamente la muestra que se desea analizar, es recomendable muestrear un exceso de la muestra por analizar, el segundo problema, es asegurarse que la muestra que se está tomando, penetre al cromatógrafo de gases.

- Funcionamiento del detector:

Cada detector responde diferente a los distintos compuestos y conforme cambian las condiciones de operación, la respuesta del detector - también cambia. Para un análisis reproducible, se debe mantener constante la pureza del gas de acarreo, la velocidad de flujo de éste, la resistencia del filamento y la presión dentro del detector. Si cambia alguna de estas condiciones, también lo hará la respuesta del detector.

- Funcionamiento del registrador:

El registrador es un aparato eléctrico, y como otros, sujeto a error. Para obtener resultados cuantitativos, se debe comprobar la linealidad, rango, velocidad de la pluma, velocidad de la carta y el cero eléctrico, ya que pueden afectar los resultados.

- Técnica de integración:

Probablemente el paso más crítico es la conversión del pico cromatográfico a números relacionados con la composición de la muestra. Este paso es la conversión del pico análogo a la forma digital.

Se puede pasar ahora a analizar las diferentes formas de hacer los cálculos para la cuantificación de las sustancias, usando la cromatografía de gases.

- Calibración absoluta:

Se inyectan diferentes cantidades exactas de la muestra pura. Se grafican los valores de las áreas de los picos contra la cantidad inyectada. Esta es la curva de calibración y debe ser lineal y pasar por el origen.

Se inyecta una cantidad exacta de la muestra desconocida. El área del pico se mide y a partir de la curva de calibración, se calcula la cantidad de la muestra presente.

- Estandarización interna:

Este método es conocido como calibración relativa o indirecta. Se adiciona una cantidad conocida del estándar interno a la muestra desconocida y esta mezcla se cromatografía. Se miden las relaciones de áreas y a partir de la cantidad de estándar añadida, se calcula la cantidad del compuesto desconocido presente en la muestra.

Las ventajas de este método de calibración, son que las cantidades inyectadas no necesitan ser añadidas cuidadosamente y no necesita ser conocida la respuesta del detector o permanecer constante, mientras cualquier cambio en la respuesta no altere la relación de áreas.

La principal desventaja de este método de calibración, es la dificultad de hallar un estándar interno que no interfiera con el compuesto en la muestra. Los requerimientos para un estándar interno, son:

- a. Debe tener una buena resolución, en relación a otros picos.
- b. Debe eluir cerca de los picos de interés.
- c. Debe ser de concentración aproximada a la del compuesto por valorar.
- d. Debe ser de estructura similar al compuesto por valorar.

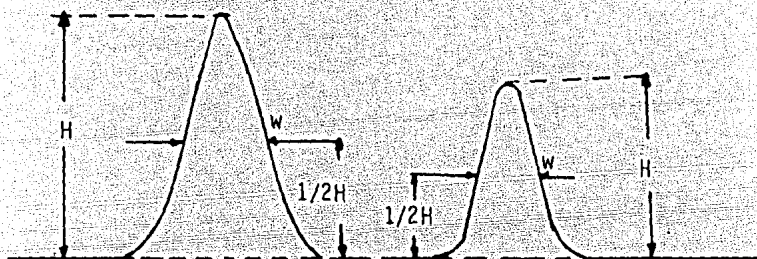
Después de cromatografiada la sustancia, se procede a su cuantificación, la cual se puede realizar por diversos métodos:

- Altura por el ancho a la mitad de la altura:

Esto se hace, debido a que los picos suelen aproximarse a un triángulo. No se considera la base del pico, debido a las grandes desviaciones que se han observado, por la adsorción de sustancias. Esta técnica

es rápida y simple. Los resultados son muy buenos con picos de razonable anchura.

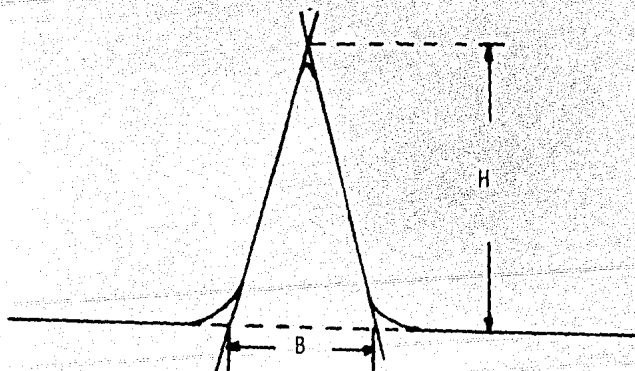
$$A = H \cdot w$$



- Triangulación:

La altura se mide a partir de la línea base, a la intersección de dos tangentes con la línea base. El área se calcula por la fórmula del triángulo.

$$A = \frac{1}{2} B \cdot H$$



- Integrador digital electrónico:

La señal cromatográfica, se asocia con el voltaje mediante frecuencia del pulso generado y es así como hay una respuesta proporcional al área del pico.

Algunos integradores incluyen en su sistema el registro de tiempos de retención de los diferentes picos del cromatograma.

La señal cromatográfica es conectada directamente al integrador electrónico.

El integrador atenuador controla la señas de salida al registrador. El sistema permite el registro de picos, cálculo de áreas y tiempo de retención simultáneamente.

8. VALIDACION DE UN METODO ANALITICO. (9)

Cuando se desarrolla un nuevo método analítico, es necesario llevar a cabo ciertas determinaciones para conocer exactamente la confiabilidad que puede proporcionar. Para tal fin, se realiza la validación, - que incluye las determinaciones de exactitud, precisión y sensibilidad.

A. Exactitud.

Se entiende por exactitud, la concordancia existente entre un valor determinado experimentalmente y su valor real. Experimentalmente, se adicionan cantidades conocidas del compuesto de interés a placebos de la forma farmacéutica y se cuantifica. Para evaluar la exactitud en función de datos experimentales, se hacen inferencias estadísticas, empleando - pruebas de hipótesis e intervalos de confianza.

a) Pruebas de hipótesis:

El procedimiento se basa en verificar si los datos experimentales pertenecen a una distribución teórica cuyo parámetro es el valor real. Una estadística de prueba, permite determinar lo anterior a partir de - los datos muestrales y es el estadígrafo "t", expresado por:

$$t = \frac{\text{Valor promedio de los datos} - \text{Valor real}}{\text{Error experimental}}$$

dado que contempla en los datos experimentales el uso de porcentajes de recobro, la prueba t queda:

$$t_{\text{calculado}} = \frac{\bar{x} - \mu}{s/\sqrt{n}}$$

donde:

\bar{x} = Promedio de porcentajes de recobro de n muestras independientes.

μ = Parámetro que representa el valor real del porcentaje de recobro.

s/\sqrt{n} = Error estándar, que es una medida del error experimental.

s = Desviación estándar

n = Número de muestras.

Se establece un contraste de hipótesis de $H_0: \mu = \mu_0$, contra la alternativa de $H_1: \mu \neq \mu_0$, para determinar que la técnica sea exacta ó no, considerando que:

- El valor real del porcentaje de recobro es 100%
- Dado que el criterio de probabilidad para determinar la exactitud del método es del 95%, se establece una región tanto de aceptación, como de rechazo para evaluar la hipótesis con un error de tomar una decisión equivocada de $\alpha = 0.05$.

b) Intervalo de confianza:

Permite obtener los intervalos dentro de los cuales se localiza el valor verdadero del parámetro (valor real), en donde:

$$\text{Intervalo de Confianza} = \bar{x} \pm t_{0.975} \cdot s/\sqrt{n}$$

donde:

\bar{x} = Valor promedio de los porcentajes de recobro

$t_{0.975}$ = Valor teórico del estadígrafo de contraste que dará una confianza de 95% para el intervalo.

B. Linearidad.

Mide el grado en que la respuesta del método se aproxima a una función lineal del tipo $y = mx + b$ (donde $b \neq 0$ y $m \neq 1$) al trabajar a diferentes concentraciones. En la práctica, se grafican los datos experimentales, de tal manera que la cantidad recobrada esté en función de la cantidad adicionada para observar el grado en que los resultados se comportan como una función lineal. Para conocer numéricamente lo anterior, se determina la regresión y la correlación de los datos.

a) Regresión:

Se conoce como la relación existente entre variables, representada por la ecuación:

$$Y_{ij} = A + BX_i + E_j(i)$$

donde:

A = ordenada al origen

B = coeficiente de regresión o pendiente de la recta, que indica la relación entre las dos variables.

X_i = cantidad adicionada de la concentración i ésima

Y_i = cantidad recobrada de la concentración i ésima en la j ésima repetición

$E_j(i)$ = error experimental

Para determinar numéricamente lo anterior, se utilizan las siguientes expresiones:

Método de mínimos cuadrados:

$$A = \frac{(\sum Y)(\sum X^2) - (\sum X)(\sum XY)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

$$E_j(i) = (Y_i - \hat{Y})$$

donde:

Y = Valor estimado por la recta de regresión para Y_i

$$B = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

Se determina la dispersión alrededor de la recta de regresión con el error típico de estimación modificado ($\hat{S}_{y/x}$) y la sensibilidad del método (δ) mediante las siguientes expresiones:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{(\sum Y^2) - A(\sum Y) - B(\sum XY)}{n}}$$

$$\hat{S}_{y/x} = \sqrt{\frac{n}{n-2}} \cdot S_{y/x}$$

$$\delta = \frac{B}{\hat{S}_{y/x}}$$

Basados en que: $S_{y/x}$ es constante para todas las x , la regresión es lineal y la distribución de Y para cualquier valor de x dado, es una distribución normal. Es posible dar mediante intervalos de confianza, de A y B , por las siguientes expresiones:

- Inferencias acerca de A (ordenada al origen):

La distribución muestral de:

$$t_{A_0} = \frac{a - A_0}{\hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2}}}$$

es una distribución t con $n-2$ grados de libertad; contrastando la hipótesis $H_0: A \neq A_0$, contra la alternativa $H_1: A = A_0$ y estimando A para un 95% de confianza por:

$$a - t_{\frac{\alpha}{2}} S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}} < A_0 < a + t_{1-\frac{\alpha}{2}} S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum X_i^2}{n \sum (X_i - \bar{X})^2}}$$

- Inferencias acerca de B (pendiente):

La distribución muestral de:

$$t_{B_0} = \frac{(b - B_0) S_x \sqrt{n-1}}{\hat{S}_{y/x}}$$

es una distribución t con $n-2$ grados de libertad; contrastando la hipótesis $H_0: B \neq B_0$, contra la hipótesis alternativa $H_1: B = B_0$ y estimando B para una confianza del 95% como sigue:

$$b - t_{\frac{\alpha}{2}} \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}} < B_0 < b + t_{1-\frac{\alpha}{2}} \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}$$

donde;

a = valor de la ordenada al origen determinada con los datos experimentales

\bar{x} = valor promedio de las cantidades adicionadas

A_0 = valor del parámetro (ordenada al origen = 0)

n = número de observaciones de muestras independientes

$\hat{S}_{y/x}$ = error típico de estimación modificada

S_x = desviación estándar de las cantidades adicionadas

- X_i = cantidad adicionada de la concentración iésima.
 b = valor de la pendiente por la ecuación de la recta de regresión
 B_0 = Valor del parámetro (pendiente = 1)

b) Correlación:

La correlación significa el grado de asociación entre dos variables, representado por un número llamado coeficiente de correlación r , obtenido del coeficiente de determinación r^2 , el cual indica la variabilidad explicada por la recta de regresión. Su estimación de manera puntual es:

$$r = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}}$$

C. Precisión

Se refiere a una medida de la concordancia de un conjunto de valores experimentales respecto a un valor central. La precisión se clasifica en reproducibilidad y repetibilidad, donde la primera es la concordancia respecto a un valor real en un método, pero bajo condiciones diferentes y la segunda es la concordancia respecto al valor central entre resultados sucesivos, obtenidos en un método sobre iguales condiciones de trabajo.

La repetibilidad se puede evaluar mediante el cálculo de la desviación estándar del conjunto de datos, mientras que la reproducibilidad, será el cuadrado medio del error de varianza.

a) Evaluación de repetibilidad:

Para inferir la variabilidad a partir de los datos muestrales, se emplea un estadístico de prueba, llamado ji-cuadrado (χ^2), el cual se expresa por:

$$\chi^2_{\text{calculado}} = \frac{(n - 1) \cdot (s^2)}{\sigma_0^2}$$

donde:

n = número de observaciones de muestras independientes

s^2 = varianza muestral

σ_0^2 = es el parámetro, que nos representa la variabilidad del método, de nominada varianza poblacional.

Debido a que la variación debe ser menor al 3%, se establece una hipótesis $H_0 : \sigma_0^2 > 0.03$ y una alternativa $H_1 : \sigma_0^2 = 0.03$ y en función de ésto, una zona de rechazo y una de aceptación de H_0 con un riesgo de tomar una decisión equivocada de $\alpha = 0.05\%$. Se determina el intervalo de confianza del 95% para la estimación de σ_0 , con el objeto de evaluar dentro de que intervalos se localiza el verdadero valor del parámetro, mediante la expresión:

$$\sqrt{\frac{(n - 1)s^2}{\chi^2_{1 - \frac{\alpha}{2}}}} < \sigma_0 < \sqrt{\frac{(n - 1)s^2}{\chi^2_{\frac{\alpha}{2}}}}$$

donde:

n = número de muestras independientes

s^2 = varianza de los datos de porcentaje de recobro

χ^2 = valor teórico del estadígrafo, que tiene asociada una confianza del 95%

σ_0 = desviación estándar poblacional

α = nivel de significancia

b) Evaluación de reproducibilidad.

Este diseño contempla diferentes analistas y diferentes días, y para conocer su variabilidad, se contempla la prueba estadística de análisis de varianzas, que consiste en desglosar las diversas fuentes que contribuyen a la variabilidad del fenómeno, probando la significación de cada fuente contra el error experimental y valorando su importancia relativa, cuyo criterio de prueba es el cociente del estadígrafo de prueba F de dos varianzas, donde el modelo estadístico lineal del diseño experimental es:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + D_j + AD_{ij} + E_{(ij)k}$$

donde:

- Y_{ijk} = porcentaje cuantificado con el i ésimo analista el j ésimo día de la k ésima repetición
- A_i = efecto del analista i en el porcentaje cuantificado
- D_j = efecto del j ésimo día en el porcentaje cuantificado
- AD_{ij} = interacción Analista-Día
- $E_{(ij)k}$ = error experimental, el cual es una medida de la reproducibilidad.
- μ = parámetro que representa el valor real del porcentaje de recobro donde no hay efecto por día o analista

D. Sensibilidad.

Es la menor cantidad detectable de la sustancia en análisis, empleando el método en cuestión. Se determina analizando diferentes muestras, en las que cada vez se vaya disminuyendo la concentración, hasta el punto que deje de ser confiable el método.

La menor cantidad detectable del compuesto en análisis, puede medirse con respecto a la señal provocada por el ruido cuando este sea el caso.

No es necesario seguir siempre el criterio de ir disminuyendo la concentración de la sustancia en cuestión. Se puede partir de una cantidad pequeña, por ejemplo 1% e ir aumentando la concentración a intervalos pequeños hasta llegar a un porcentaje donde se tenga la certeza de que se va a determinar tanto en precisión como en exactitud. Dicha cantidad puede ser 0, 1, 3, 5, 10, 15, 20 ó 25% de la cantidad etiquetada cuando se trate de análisis de productos farmacéuticos. Cuando se trabaja con fluidos biológicos, la cantidad esperada deberá establecerse experimentalmente.

P A R T E
E X P E R I M E N T A L

IV. PARTE EXPERIMENTAL

1. PREPARACION DE LAS DOS FORMULACIONES DE CAPSULAS DE CARISOPRODOL A - COMPARAR.

Se prepararon dos formulaciones de cápsulas de carisoprodol, donde la diferencia fue la cantidad adicionada de estearato de magnesio, que se empleó como lubricante.

Con el fin de diferenciar una formulación de otra, se denominaron por formulación A, aquella que tiene el estearato de magnesio en menor cantidad y la formulación B, aquella que tiene el estearato de magnesio en exceso.

A continuación, se describen las formulaciones preparadas.

Formulación A

Componente	mg	%
1. Antirreumático no esteroide	250.0	52.083
2. Carisoprodol	200.0	41.667
3. Excipientes no estearatos	25.2	2.250
4. Estearato de magnesio	4.8	1.000
Total	480.0	100.000

Formulación B

Componente	mg	%
1. Antirreumático no esteroide	250.0	52.083
2. Carisoprodol	200.0	41.667
3. Excipientes no estearatos	15.6	3.250
4. Estearato de magnesio	14.4	3.000
Total	480.0	100.000

Con el fin de mantener un control de llenado de acuerdo a concentraciones de principios activos dentro de rangos reportados en la bibliografía, se estableció un margen de tolerancia para el peso de las cápsulas, que fue de 480 mg \pm 3%

Las cápsulas que estuvieron dentro de límites de llenado, se limpian con un paño suave y silicón, a modo de quitar todo el remanente de polvo en el exterior de la cápsula, guardándolas después en recipientes perfectamente cerrados e identificados.

2. DISOLUCION DE LAS CAPSULAS DE CARISOPRODOL

Para llevar a cabo las pruebas de disolución, se empleó el aparato de disolución USP número 2, descrito en la sección de generalidades de este mismo trabajo.

A. Desarrollo del método de cuantificación de carisoprodol.

Para el desarrollo de este método, se contó con varias premisas:

- a. El método a desarrollar emplearía la cromatografía de gases, por la cantidad de ventajas de ésta sobre otras técnicas y porque ya se había demostrado que funcionaba para el carisoprodol.
- b. El carisoprodol es altamente soluble en cloroformo y difícilmente soluble en agua, por lo que la extracción se haría sin duda con cloroformo.
- c. La columna sería Apiezon 10% sobre Gas Chrom Q, la cual había demostrado tener buena resolución para el carisoprodol.
- d. En el método se usaría estandarización interna, empleando como estándar a la fenacetina, que eluye cerca del carisoprodol, sin llegar a interferir con éste y sin descomponerse en la columna de Apiezon.

Con todo lo anterior, se procedió a encontrar las condiciones apropiadas de operación en el cromatógrafo de gases, para lo cual se emplearon soluciones de carisoprodol y fenacetina en cloroformo y se inyectaron en el cromatógrafo de gases, con diferentes condiciones de operación.

Se variaron las temperaturas del horno, inyector y detector (manteniendo siempre con la misma temperatura el inyector y detector, de 30 a 40°C por encima de la temperatura del horno), inyectando una misma muestra en cada ocasión, para apreciar el efecto producido por la variación de la temperatura.

Las condiciones que se encontraron como más adecuadas para trabajar el carisoprodol por cromatografía de gases, fueron las siguientes:

Temperatura del Horno	190°C
Temperatura del Inyector	230°C
Temperatura del Detector	230°C

Con estas temperaturas se obtienen tiempos de retención (t.r.) bastante aceptables, además de muy buena resolución de los picos de fenacetina y carisoprodol, como se muestra en la figura no. 1

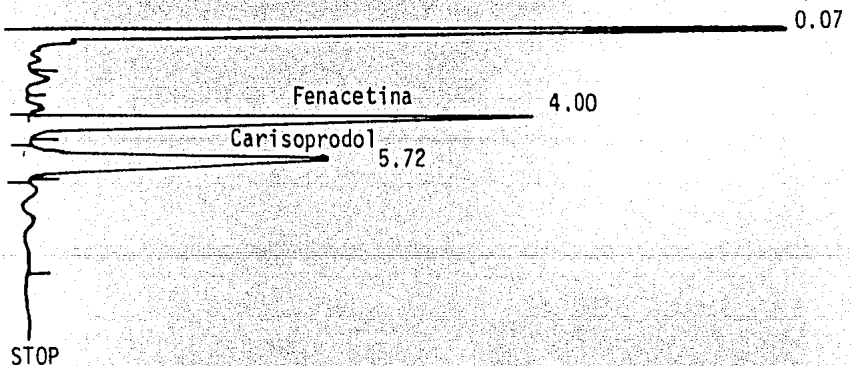


FIGURA No. 1 El cromatograma muestra la resolución que se obtiene para la fenacetina y carisoprodol en la columna Apiezon 10% sobre Gas Chrom Q. t.r. fenacetina:4.0 min. t.r. carisoprodol 5.72 min. Cromatograma obtenido a partir de un procesador de datos HP3380A

Una vez que se tuvieron las condiciones de operación, fue necesario investigar las concentraciones a las que se podía trabajar, para obtener picos de área aceptable, con tiempos de retención pequeños.

Con lo anterior, se propuso el siguiente método de cuantificación:

- Preparación de la solución de carisoprodol:

Preparar una solución de 4.44 mg/ml de carisoprodol en cloroformo (el equivalente a la cantidad de carisoprodol disuelta en los 900 ml de medio de disolución, si se disolviera el 100% de la cantidad de carisoprodol adicionada en la cápsula).

- Preparación de la solución estándar interno de fenacetina:

Preparar una solución de 2 mg/ml de fenacetina en cloroformo

- Preparación del estándar:

Tomar 2 ml de agua destilada en un tubo de ensayo y adicionarle -- 100 mc1 del estándar interno y 100 mc1 de la solución de carisoprodol. Agregar 3 ml de cloroformo y agitar durante 1 minuto en un agitador automático. Centrifugar durante 10 minutos a 2,500 rpm, extraer y desechar la fase acuosa y evaporar la fase orgánica a sequedad. Reconstituir con 0.5 ml de cloroformo justo antes de inyectar en el cromatógrafo de gases. Inyectar 10 mc1 de la solución estándar con las siguientes condiciones de operación:

Temperatura del Horno	190°C
Temperatura del Detector	230°C
Temperatura del Inyector	230°C
Atenuación	256

B. Elección del medio de disolución

La elección del medio de disolución, se hizo en dos pasos:

- a. Disolución cualitativa
- b. Disolución cuantitativa

En el primer paso, o disolución cualitativa, se procedió a realizar disoluciones del mismo lote de cápsulas en diferentes medios y observando el desarrollo de la disolución en cada uno de éstos, hasta un tiempo determinado. Después de realizado este paso, solo quedaron dos medios a probar: Buffer de fosfatos de pH 7.4 y ácido clorhídrico 0.01% ambos con 0.1% de tween 20.

El segundo paso, involucró la realización de la disolución y la cuantificación de carisoprodol de las dos formulaciones en los dos medios de disolución seleccionados, siguiendo el método descrito en la sección anterior (punto A.).

Concluido lo anterior, se seleccionó el medio de disolución, que fue el buffer de fosfatos de pH 7.4 con 0.1% de tween 20. Así, el método de disolución quedó de manera similar a como se estableció en un principio, variando el tratamiento de las muestras como sigue:

- Tratamiento de las muestras:

Tomar 2 ml de la muestra y adicionar 100 mcl de estándar interno. Proseguir con el tratamiento señalado para el estándar a excepción de la adición de solución de carisoprodol.

Injectar 10 mcl en el cromatógrafo de gases, de cada muestra, con las condiciones ya especificadas.

C. Validación del método de disolución.

Para realizar la validación del método, se probaron exactitud, linealidad, precisión y sensibilidad; incluyendo en la precisión las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad.

Para evaluar la exactitud, se prepararon 20 muestras con el método que se señala a continuación:

La solución de estándar interno y la de carisoprodol se prepararon de la misma manera descrita anteriormente.

- Preparación de las muestras.

Tomar 2 ml de medio de disolución en un tubo de ensayo, adicionarle 100 µl de la solución de estándar interno y 100 µl de la solución de carisoprodol; agregar 3 ml de cloroformo y agitar durante 1 minuto - en agitador automático. Centrifugar durante 10 minutos a 2,500 rpm. Extraer y desechar la fase acuosa y evaporar la fase orgánica a sequedad. Reconstituir la muestra con 0.5 ml de cloroformo, justo antes de inyectar en el cromatógrafo de gases. Inyectar 10 µl de cada muestra en el cromatógrafo de gases, con las condiciones establecidas

- Para evaluar la linealidad, se prepararon 30 muestras, 5 muestras de cada una de las 6 diferentes concentraciones de acuerdo con el método establecido.

- Preparación de las soluciones de carisoprodol.

Preparar soluciones de carisoprodol en cloroformo, a las siguientes concentraciones: 1.776, 2.664, 3.552, 3.996, 4.440 y 5.106 mg/ml, que son equivalentes al 40, 60, 80, 90, 100 y 115% de la cantidad teórica de carisoprodol a disolver.

El estándar se prepara de la misma manera que en el método que se está validando.

- Preparación de las muestras:

Tomar 2 ml de medio de disolución y adicionarle 100 mcI de solución de estándar interno y 100 mcI de solución de carisoprodol, preparando 5 muestras de cada concentración de carisoprodol. Agregar 3 ml de cloroformo a cada muestra y continuar con el tratamiento como se establece para el estándar. Inyectar 10 mcI de cada muestra y del estándar en el cromatógrafo de gases, con las condiciones establecidas para el método.

Para la evaluación de repetibilidad, se emplean los mismos resultados que se obtienen para la evaluación de exactitud.

Para realizar la prueba de reproducibilidad, se prepararon 12 muestras, con la concentración teórica del 100%, 6 de las cuales fueron preparadas por un Analista 1 y las otras por un Analista 2, inyectando cada uno 3 de sus 6 muestras en un Día 1 y las otras 3 en un Día 2.

En la preparación de las muestras, se siguió el mismo método que ya se ha mencionado, empleando solamente la solución de carisoprodol de concentración 4.44 mg/ml.

Para evaluar la sensibilidad, es necesario detectar la mínima cantidad que es posible cuantificar con el método que se está validando, - sin que sufra alteraciones la linealidad del mismo.

D. Comparación de la disolución de las dos formulaciones.

Tanto para la formulación A, como para la formulación B, se realiza la disolución en forma similar, como se describe a continuación:

- Preparación del medio de disolución:

Preparar una solución 0.082M de fosfato dibásico de sodio y 0.022M de fosfato monobásico de sodio. Adicionar 0.1% de tween 20. Tomar el pH que debe ser 7.4.

- Disolución:

Medir 900 ml de medio de disolución (buffer de pH 7.4) en cada vaso de disolución y esperar a que la temperatura alcance 37°C. Ajustar a 50 rpm la velocidad de agitación.

Una vez que se tiene la temperatura y las rpm, dejar caer una cápsula en cada vaso, con diferencia de un minuto entre un vaso y otro. Tomar muestras a los 20, 40, 60, 80, 90 y 100 minutos de transcurrida la disolución. En cada toma de muestra utilizar una jeringa de plástico, a la cual se le coloca un portafiltro y un papel filtro, por medio del cual se filtra la muestra y recibirla en un tubo de ensayo.

Para el tratamiento de las muestras, tomar 2 ml del filtrado y proceder como se indicó en la sección de elección del medio de disolución.

Una vez inyectadas todas las muestras en el cromatógrafo de gases, cuantificarlas de acuerdo con sus áreas y utilizando para tal fin, las siguientes fórmulas:

$$\frac{ASE}{ASI} = ARSE$$

$$\frac{AP}{ASI} = ARP$$

$$\frac{ARP}{ARSE} \times CSE \times 100 = \% \text{ obtenido}$$

donde:

ASE = Area del estándar externo

ASI = Area del estándar interno

AP = Area del problema

ARSE = Area relativa del estándar externo

CSE = Concentración del estándar externo

ARP = Area relativa del problema

3. PRUEBAS IN VITRO A TRAVES DE MEMBRANA INTESTINAL, UTILIZANDO EL METODO DE INTESTINO INVERTIDO.

La prueba de intestino invertido se utilizó para poder conocer la cantidad de carisoprodo1 que pasa a través de la membrana intestinal.

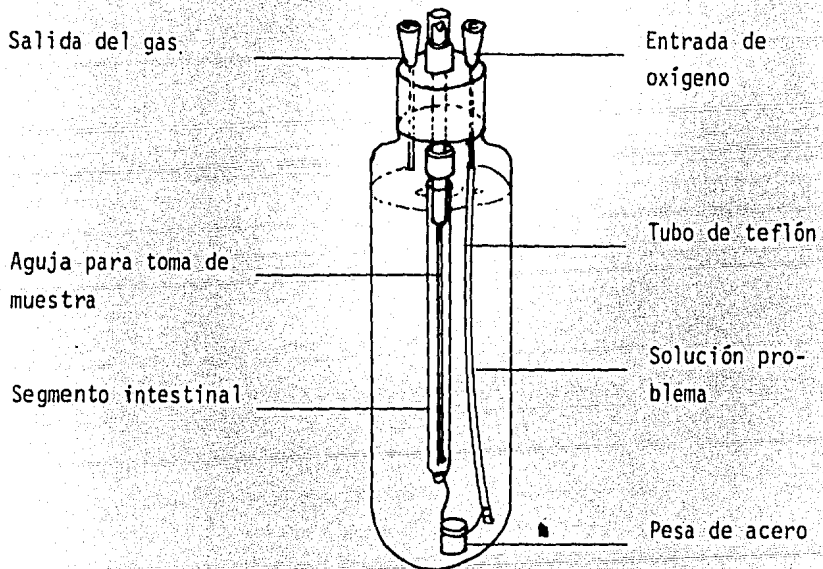
En el presente trabajo, se utilizó carisoprodo1 materia prima como estándar para medir el paso a través de la membrana intestinal comparando con las dos formulaciones de cápsulas. De este modo, es posible apreciar el efecto de cada una de las dos formulaciones, sobre la cantidad de carisoprodo1 que pasa a través de la membrana. A partir de esta consideración, es posible también hacer predicciones acerca de la absorción del carisoprodo1 liberado a partir de una y otra formulación.

A. Prueba de intestino invertido para carisoprodo1 materia prima.

Antes de describir el método empleado en esta prueba, se harán las siguientes consideraciones:

- a. Como medio de disolución, se utilizó buffer de fosfatos de pH 7.4 -- con 0.1% de tween 20 para tener similitud con la prueba de disolución.
- b. La capacidad del tubo empleado para intestino invertido es de 80 ml y de acuerdo con este volumen, se buscó tener similitud con la disolución de carisoprodo1 en cuanto a concentración de carisoprodo1 en el buffer.

El aparato empleado para realizar esta prueba, se muestra en el esquema número 3.



ESQUEMA No. 3 Aparato empleado en el estudio de paso a través de membrana utilizando el método de intestino invertido. (3,12)

El método con el cual se trabajó, se describe a continuación:

- Preparación del estándar interno:

Preparar una solución de 2 mg/ml de fenacetina en cloroformo.

- Preparación de la solución estándar de carisoprodol:

Preparar una solución de 5 mg/ml de carisoprodol en cloroformo.

- Preparación del buffer de pH 7.4

Preparar una solución 0.082M de fosfato dibásico de sodio y 0.022M de fosfato monobásico de sodio en agua destilada.

- Preparación de la solución salina fisiológica:

Preparar una solución 0.9% de cloruro de sodio en agua destilada.

- Preparación de la muestra:

Pesar 40 mg de carisoprodol y 0.08 g de tween 20 y formar una pasta con ambos. Adicionar la pasta preparada al tubo de experimentación, que contiene 80 ml de buffer pH 7.4, enjuagando con la misma solución.

- Preparación del saco invertido. (3,12)

- * Seleccionar una rata de aproximadamente 250 g de peso
- * Mantener al animal en ayuno durante 20 horas
- * Sacrificar al animal usando cloroformo
- * Hacer una incisión a mitad del abdomen
- * Remover el intestino, cortando abajo del píloro para prevenir la entrada de bilis, y a la altura de la unión ileocecal
- * Introducir el intestino completo en aproximadamente 20-30 ml de solución salina fisiológica.
- * Atar un extremo del intestino a una varilla de vidrio o de acero -- inoxidable con hilo
- * Enrollar el intestino sobre sí mismo, hasta que quede invertido en su totalidad.
- * Cortar pedazos de intestino de 10 cm de longitud

- * Atar un extremo del segmento, al adaptador
- * Amarrar el otro extremo y colgarle una pesa de acero de $8 \text{ g} \pm 0.2\text{g}$
- * Colocar en el tubo, los 80 ml de solución buffer con el carisopro--
dol.
- * Mantener el sistema a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ en el baño de agua
- * Introducir 2 ml de solución buffer sin fármaco en el intestino in--
vertido.
- * Colocar el saco intestinal en el tubo de trabajo y comenzar a bom--
bear oxígeno lentamente. A partir de este momento, se comienza a --
contar el tiempo.

- Procedimiento:

Tomar muestras de 2 ml del saco a los 3, 6, 12, 15, 30, 45, 60 y -
75 minutos, reemplazando el volumen en cada caso.

- Preparación del estándar:

Pipetear 2 ml de solución buffer y adicionar 100 mcI de la solu--
ción de estándar interno y 100 mcI de la solución de carisoprodol. Adi--
cionar 3 ml de cloroformo y agitar durante 1 minuto en agitador automá--
tico, después del cual, se centrifuga durante 10 minutos a 2,500 rpm.
Se extrae y desecha la fase acuosa y la fase orgánica se evapora a se--
quedad.

- Tratamiento de las muestras:

Agregar a cada tubo 100 mcI de la solución de estándar interno y
proseguir como se indica en el tratamiento del estándar, a partir de la
adición de los 3 ml de cloroformo.

Reconstituir estándar y muestras con 0.5 ml de cloroformo antes de
inyectar en el cromatógrafo de gases, a las mismas condiciones emplea--
das en la cuantificación de la disolución.

B. Prueba de intestino invertido para la formulación A.

En forma general, se realiza de manera similar a la prueba de intestino invertido, realizada para carisoprodo^l materia prima. Tiene algunas variaciones con respecto al experimento anterior, que se citan a continuación:

- Vaciar el contenido de 10 cápsulas
- Mezclar todo el polvo
- Pesar el equivalente a 40 mg de carisoprodo^l
- Con este polvo y el tween 20, se forma una pasta, la cual se agrega a los 80 ml de buffer en el tubo.

C. Prueba de intestino invertido para la formulación B.

Se procede de la misma manera que como se indica en el tratamiento de la formulación A.

4. BIODISPONIBILIDAD DE LAS DOS FORMULACIONES DE CARISOPRODOL

Para llevar a cabo un estudio de biodisponibilidad, se emplean voluntarios sanos, a los cuales se les administra el fármaco a probar. La elección de éstos sujetos, no es un hecho aleatorio, sino que requiere el establecimiento de las condiciones que deben reunir estos voluntarios con la finalidad de controlar variables y hacer lo más homogéneo posible el experimento.

En el protocolo, se contemplan las condiciones para la selección de los voluntarios y las condiciones generales de trabajo.

A. Protocolo de administración a pacientes voluntarios, de las dos formulaciones de carisoprodol.

Introducción:

El propósito de este estudio, es correlacionar los resultados de las pruebas in vivo-in vitro de dos formulaciones de cápsulas de la combinación de un antirreumático no esteroide en una concentración de 250 mg/cápsula y carisoprodol 200 mg/cápsula, siendo este último el fármaco involucrado en el estudio.

Se compararán los niveles sanguíneos obtenidos a partir de las dos formulaciones, con objeto de ver si algunos parámetros de la formulación afectan la biodisponibilidad.

Estudio:

Seis voluntarios sanos, entre 20 y 40 años de edad, serán incluidos en el estudio, bajo el siguiente criterio.

Criterio de Admisión:

- a) Los pacientes deberán firmar carta de consentimiento.
- b) No deberán estar tomando medicamentos como analgésicos, antiinflamatorios y/o relajantes musculares.
- c) Deberán tener un peso de acuerdo con su estatura y edad.
- d) 12 horas de ayuno antes de comenzar el estudio.

Criterio de Exclusión:

- a) Pacientes menores de 20 años y mayores de 40 años.
- b) Pacientes con antecedentes de hipersensibilidad a alguno de los componentes de la formulación, ácido acetil salicílico u otro analgésico
- c) Pacientes que hayan ingerido alcohol o alguna droga antes de 72 horas del inicio del estudio.
- d) Pacientes con insuficiencia renal, enfermedades gástrica, hematológica, hepática o neoplasias.
- e) Fumadores.
- f) Pacientes que hayan tomado hipnóticos, sedantes, antihistamínicos u otro fármaco que induzca la formación de enzimas antes de 15 días de comenzar el estudio.

F O R M U L A C I O N		
Paciente No.	1a. Semana	2a. Semana
1	A	B
2	B	A
3	A	B
4	B	A
5	B	A
6	A	B

TABLA No. 1 Tabla de Randomización. Elección aleatoria de la formulación por administrar a cada paciente en las semanas 1 y 2.

La duración del estudio será de dos semanas en total. Se tomarán muestras de sangre (aproximadamente 10 ml) al inicio del estudio antes de la administración del medicamento y posteriormente las muestras de sangre se tomarán con el siguiente horario: 30, 60, 120, 180, 240, 360 y 480 minutos de transcurrida la administración de la formulación. Este esquema se repetirá la siguiente semana.

B. Desarrollo de un método para cuantificar los niveles sanguíneos de carisoprodol.

Para poder desarrollar el método en cuestión, se tomaron ciertas consideraciones, que orientaran el camino a seguir. A continuación, se enuncian algunas de las condiciones previas al desarrollo del método:

- a) Se emplearía nuevamente la cromatografía de gases, por haberse comprobado que el carisoprodol se cuantifica de una manera satisfactoria con esta técnica.
- b) La columna sería Apiezon 10% y se variarían ligeramente las condiciones de operación, en lo que se refiere a la atenuación.
- c) Para la extracción de carisoprodol, se considerará su solubilidad en solventes orgánicos, de preferencia cloroformo.
- d) El tratamiento de las muestras se haría a partir de plasma y no de sangre completa

Para poder llegar al método de análisis, se probaron primeramente diversos agentes de precipitación, para poder trabajar con las muestras de plasma en el cromatógrafo de gases, ya que a la temperatura de trabajo, se presenta una serie de descomposiciones de las proteínas, que se detectan y enmascaran los picos tanto del carisoprodol como de la fenacetina, impidiendo su cuantificación.

La figura no. 2 muestra la interferencia de las impurezas arrastradas en la muestra, impidiendo la detección de carisoprodol y fenacetina y evitando por consiguiente su cuantificación. El cromatograma se obtuvo después de tratar las muestras con ácido clorhídrico como agente precipitante.

La figura no. 3 es el cromatograma de la inyección de una muestra tratada por otro método alternativo donde nuevamente hay interferencia de impurezas y enmascaramiento del carisoprodol y la fenacetina. Se aprecia también que el tiempo de retención para estas impurezas es muy grande, ya que transcurre más de treinta minutos desde la inyección, -- sin lograr que se restablezca la línea base para poder seguir inyectando las muestras.

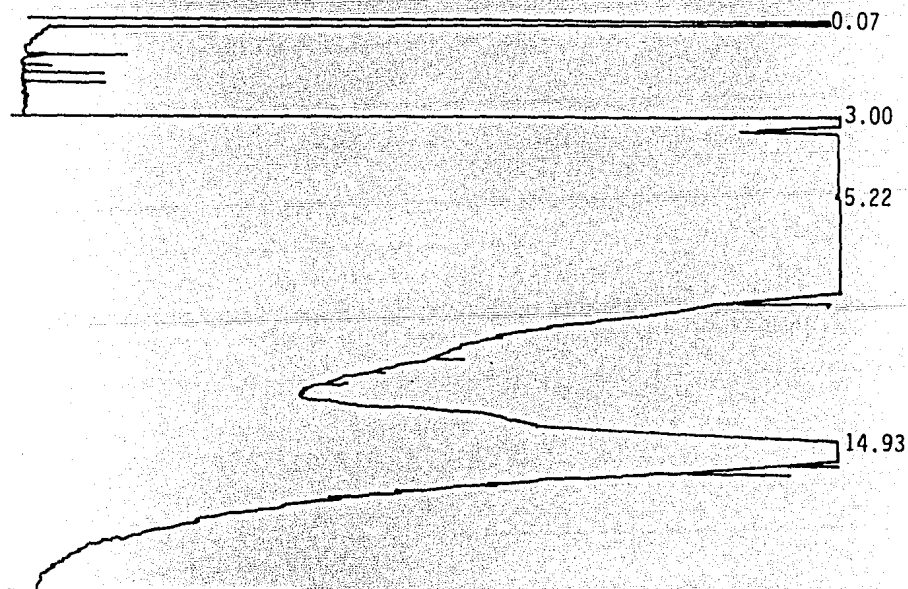


FIGURA No. 2 Cromatograma obtenido a partir de un procesador de datos HP 3380A

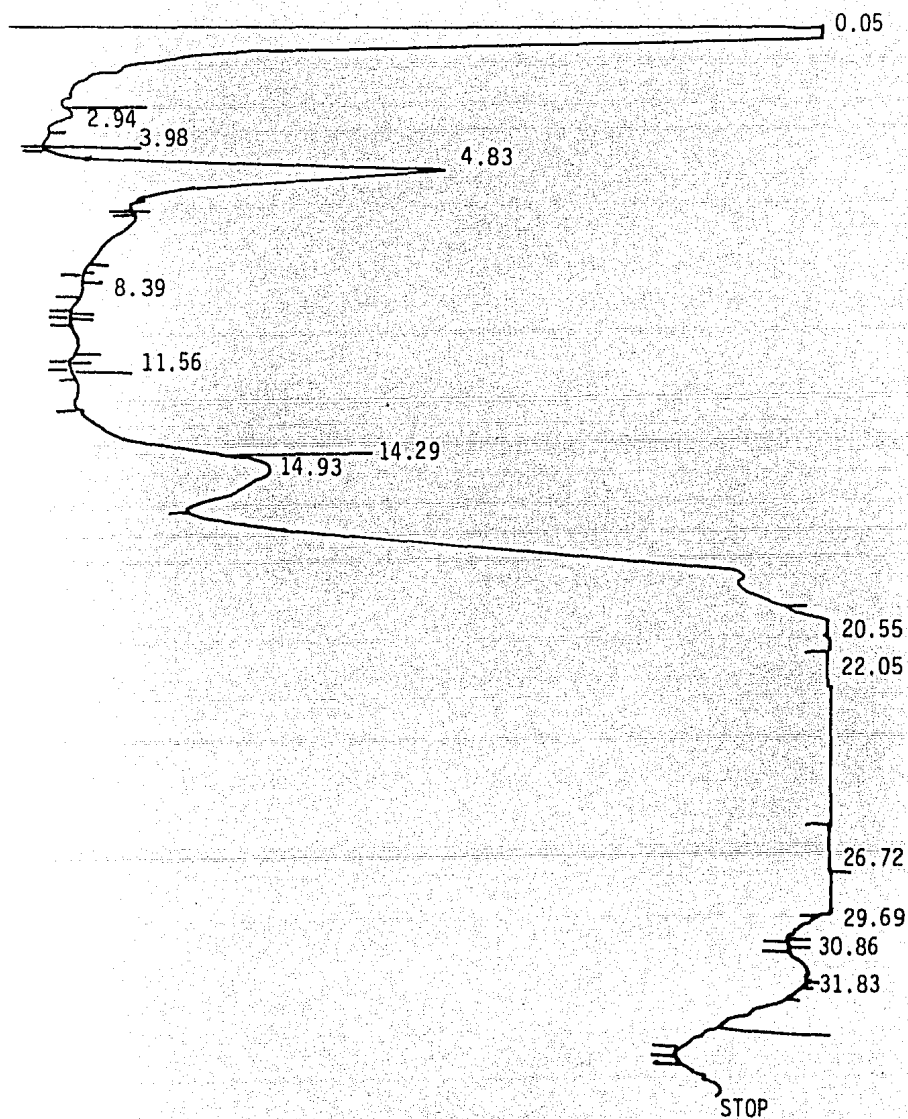


FIGURA No. 3 Cromatograma obtenido a partir de un procesador de datos HP 3380A

Se probó entonces un reactivo, el ácido sulfosalicílico, que precipitó las proteínas contenidas en el plasma y se propuso y probó el siguiente método:

- Preparación del estándar interno de fenacetina:

Preparar una solución 0.25 mg/ml de fenacetina en metanol.

- Preparación de la solución de carisoprodol:

Preparar una solución 0.60 mg/ml de carisoprodol en metanol.

- Preparación del reactivo de Bernhard:

Preparar una solución al 10% de ácido sulfosalicílico en una mezcla de metanol:agua 1:1. Mantener esta solución en lugar fresco y al abrigo de la luz.

- Preparación del estándar con plasma:

- * Transferir 1 ml de plasma limpio a un tubo de ensaye
- * Adicionar 100 μ l (microlitros) de la solución de estándar interno y 100 μ l de la solución de carisoprodol.
- * Agregar 2 ml de reactivo de Bernhard y agitar
- * Centrifugar durante 10 minutos a 2,500 rpm
- * Extraer el sobrenadante y transferirlo a otro tubo de ensayo
- * Desechar el precipitado
- * Adicionar a la fase acuosa 5 ml de cloroformo
- * Agitar durante 1 minuto en agitador automático
- * Centrifugar durante 10 minutos a 2,500 rpm
- * Extraer la fase acuosa y desecharla
- * Transferir a otro tubo la fase orgánica
- * Evaporar a sequedad
- * Reconstituir con 300 μ l de cloroformo
- * Inyectar 10 μ l en el cromatógrafo de gases con las siguientes condiciones:

Temperatura del Horno	190°C
Temperatura del Detector	230°C
Temperatura del Inyector	230°C
Atenuación	64

- Tratamiento de las muestras:

Tomar 1 ml de plasma y adicionarle 100 µl de estándar interno, y continuar con el tratamiento como se señala para el estándar con plasma (se omite la adición de carisoprodo).).

Se prepara además un blanco, tomando 1 ml de plasma limpio y excluyendo la adición de estándar interno y de carisoprodo, el tratamiento es igual que para las muestras.

Al tratar las muestras con este método se observó lo siguiente:

a) El blanco tratado con este método no produjo picos en el cromatograma, por lo que se supone que el reactivo empleado cumplió con el fin que se perseguía. Además, por medio del blanco, podemos inferir que los picos que se registran en las muestras, pertenecen a los compuestos de interés y no a impurezas de la muestra. (Figura no. 4)

b) Las muestras se pudieron inyectar consecutivamente, sin que hubiera interferencias de una inyección a otra. Esto hizo más rápido el análisis de las muestras. (Figura no. 5)

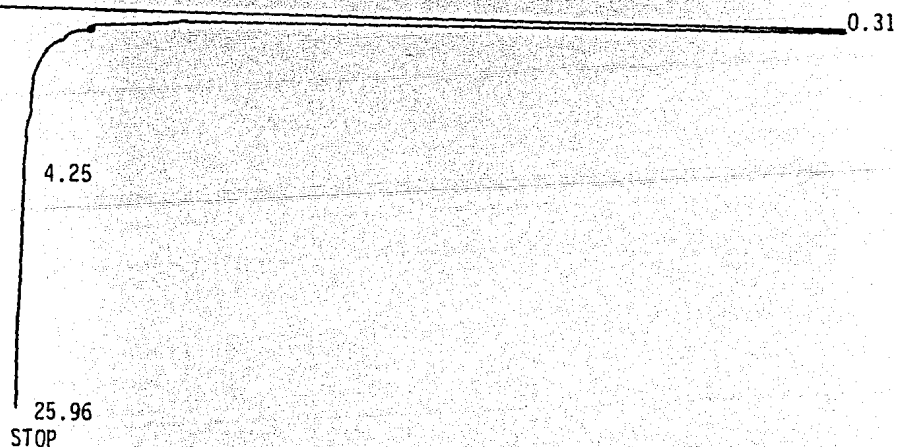


FIGURA No. 4 Inyección del blanco. Cromatograma obtenido a partir de un procesador de datos HP 3380A

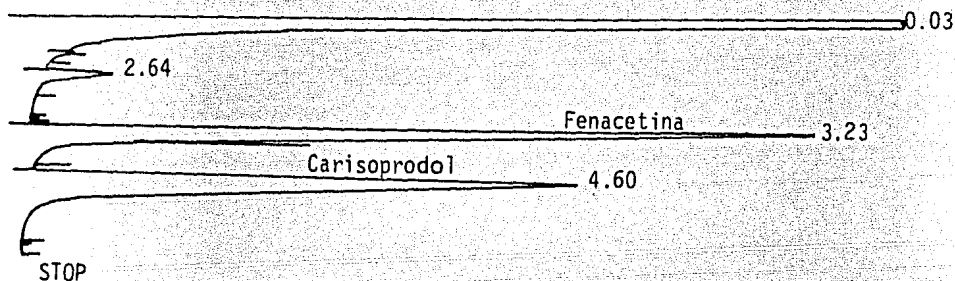


FIGURA No. 5 Inyección de una muestra problema de plasma. Cromatograma obtenido a partir de un procesador de datos HP 3380A

C. Validación del método de cuantificación de carisoprodol en plasma.

Se sabe que para la validación de un método analítico, es necesario probar su exactitud, linealidad, precisión y sensibilidad. Para llevar a cabo experimentalmente estas pruebas se preparan ciertas muestras siguiendo el método a validar.

Se recuerda que dentro de la precisión, existen dos pruebas que son la reproducibilidad y la repetibilidad.

La validación del método se llevó a cabo de la misma manera que la validación del método para la determinación del carisoprodol en el medio de disolución.

RESULTADOS
Y
DISCUSION

V. RESULTADOS Y DISCUSION.

1. DISOLUCION.

Del método de disolución, se puede decir que:

a. Las condiciones de operación son adecuadas. Esto es, al trabajar la fenacetina y el carisoprodol en la cromatografía de gases, se obtiene una resolución bastante aceptable de estos dos compuestos, lo que permite que la fenacetina ejerza las funciones de estándar interno, para lo que fue colocada en las muestras. Además, los tiempos de retención son pequeños relativamente, lo que permite realizar el análisis de las muestras en tiempos cortos.

b. Empleando cloroformo, se realiza una buena extracción de carisoprodol del medio acuoso. Este hecho se comprobó fácilmente, analizando las muestras de fase acuosa antes de desecharlas tratando de encontrar carisoprodol en éstas, siendo negativo el resultado de esta prueba.

c. Las concentraciones de trabajo son adecuadas. Esto se deduce por que el tamaño de los picos permite su cuantificación con relativa facilidad y más aún si se está empleando un procesador de datos que realiza el cálculo de áreas. Las concentraciones que se emplean en este método, son fácilmente detectables, ya que no es necesario aumentar la sensibilidad del detector para poder cuantificar los picos obtenidos.

A. Validación del método.

Los datos de las diferentes pruebas para la validación del método se presentan a continuación, con sus análisis estadísticos respectivos.

mcg adicionados	mcg recuperados	% recuperado
8.880	9.192	103.51
8.880	8.830	99.44
8.880	8.893	100.15
8.880	8.829	99.42
8.880	8.803	99.13
8.880	9.198	103.58
8.880	8.788	98.96
8.880	8.971	101.03
8.880	8.801	99.11
8.880	8.958	100.88
8.880	9.056	101.98
8.880	9.058	102.12
8.880	8.909	100.33
8.880	8.802	100.01
8.880	9.185	103.44
8.880	8.959	100.89
8.880	8.990	101.24
8.880	8.815	99.26
8.880	8.731	98.33
8.880	8.873	99.93

TABLA NO. 2 Recobros del 100% para evaluar exactitud y repetibilidad del método de disolución,

a. Exactitud

$$\bar{x} = 100,64$$

$$n = 20$$

$$N = n - 1 = 19$$

$$s = 1,5925$$

$$s/n = 0,3561$$

$$t_{0,975} = 2,09$$

Hipótesis contrastada:

$$H_0: \mu \neq \mu_0 \quad H_1: \mu = \mu_0$$

donde $\mu_0 = 100$

Nivel de significancia:

$$\alpha = 0.05$$

Estadígrafo de contraste:

$$t = \frac{100.64 - 100}{0.3561} = 1.7972$$

$$2.09 > 1.7972 > -2.09$$

LA TECNICA ES EXACTA

Intervalo de confianza del 95%:

$$100.64 \pm 0.7442$$

$$\text{Límite superior} = 101.38$$

$$\text{Límite inferior} = 99.90$$

b. Repetibilidad.

$$s = 1.5925$$

$$s^2 = 2.5361$$

$$n = 20$$

$$\chi^2_{0.95, n-1} = 30.14$$

$$\chi^2_{0.025, n-1} = 8.91$$

$$\chi^2_{0.975, n-1} = 32.85$$

Hipótesis contrastada:

$$H_0 : \sigma^2 \neq \sigma_0^2 \quad H_1 : \sigma^2 = \sigma_0^2$$

$$\text{donde: } \sigma_0^2 = (3)^2 = 9$$

Nivel de significancia:

$$\alpha = 0.05$$

Estadístico de contraste:

$$\begin{aligned} \chi^2 &= \frac{(n-1)(s^2)}{\sigma_0^2} \\ &= \frac{(19)(2.5361)}{9} = 5.3540 \end{aligned}$$

Región crítica a nivel α unilateral superior.

$$\chi^2 \leq \chi^2_{1-\frac{\alpha}{2}}$$

$$\chi^2_{\text{calculada}} < 30.14$$

$$5.3540 < 30.14$$

Se rechaza H_0

Se acepta H_1

EL METODO ES REPETIBLE

Intervalo de confianza del 95% para $\sigma = 3$

$$\text{Lim. inf.} = \frac{(n-1) s^2}{\chi^2_{1-\frac{\alpha}{2}}} = \frac{(19)(2.5361)}{32.85} = 1.2111$$

$$\text{Lim. sup.} = \frac{(n-1) s^2}{\chi^2_{\frac{\alpha}{2}}} = \frac{(19)(2.5361)}{8.91} = 2.3255$$

$$1.2111 < \sigma < 2.3255$$

EL METODO ES REPETIBLE

C. Linearidad.

mcg adicionados	mcg recuperados	% recuperado
3.552	3.457	93.32
3.552	3.667	103.24
3.552	3.558	101.01
3.952	3.762	105.91
3.552	3.712	104.50
5.338	5.418	101.69
5.338	5.339	100.17
5.338	5.434	101.99
5.338	5.424	101.80
5.338	5.381	100.99
7.104	6.922	97.44
7.104	7.209	101.48
7.104	7.091	99.82
7.104	7.054	99.44
7.104	7.257	102.15
7.992	8.402	105.13
7.992	7.660	95.85
7.992	8.135	101.79
7.992	7.998	100.07
7.992	8.117	101.56
8.880	8.788	98.96
8.880	8.652	97.43
8.880	8.972	101.04
8.880	8.801	96.11
8.880	8.959	100.89
10.212	10.352	101.37
10.212	9.623	94.23
10.212	10.018	98.10
10.212	10.050	98.41
10.212	9.965	97.58

TABLA NO. 3 Evaluación de Linearidad para el método de disolución, empleando concentraciones del 40, 60, 80, 90, 100 y 115%

$$\begin{aligned}
 n &= 30 \\
 \Sigma x &= 21.5340 \\
 \Sigma y &= 21.5205 \\
 \Sigma x^2 &= 16.9241 \\
 \Sigma y^2 &= 16.8056 \\
 \bar{x} &= 7.1780 \\
 \bar{y} &= 7.1735 \\
 S_x &= 0.2249 \\
 S_y &= 0.2171 \\
 \Sigma xy &= 16.8602 \\
 \Sigma (xy)^2 &= 12.1469 \\
 N &= n - 2
 \end{aligned}$$

Ordenada al origen:

$$a = 0.0265$$

Pendiente:

$$b = 1.0110$$

Error típico de estimación modificada:

$$\begin{aligned}
 S_{y/x} &= \sqrt{\frac{(\Sigma y^2) - a(\Sigma y) - b(\Sigma xy)}{n}} \\
 &= 0.0895
 \end{aligned}$$

$$\hat{S}_{y/x} = \sqrt{\frac{n}{n-2}} \cdot S_{y/x} = 0.0927$$

$$\delta = \frac{b}{\hat{S}_{y/x}} = 10.9104$$

$$E_{j(i)} = \Sigma (y_i - \hat{y}) = 0.0027$$

Inferencias acerca de a:

Hipótesis contrastada:

$$H_0 : a \neq A_0$$

$$H_1 : a = A_0$$

$$\text{donde } A_0 = 0$$

Nivel de significancia:

$$\alpha = 0.05$$

Estadígrafo de contraste:

$$t_{A_0} = \frac{a - A_0}{\hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\Sigma x^2}{n \Sigma (x_i - \bar{x})^2}}} = 0.2065$$

Región crítica bilateral con nivel de significancia α :

$$0.2065 < t_{\frac{\alpha}{2}, n-2}$$

$$0.2065 > t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2}$$

$$2.05 > t_{A_0} > -2.05$$

H_0 se rechaza, lo que es evidencia suficiente para aceptar el valor de la ordenada al origen.

Intervalo de confianza del 95% para A_0 :

$$a - t_{\frac{\alpha}{2}, n-2} \cdot \hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\Sigma x^2}{n \Sigma (x_i - \bar{x})^2}} < A_0 < a + t_{1-\frac{\alpha}{2}, n-2} \cdot \hat{S}_{y/x} \sqrt{\frac{\Sigma x^2}{n \Sigma (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$0.2065 \pm 2.05 \quad (0.1281)$$

$$\text{Lím. superior} = 0.2891$$

$$\text{Lím. inferior} = -0.2361$$

Inferencias acerca de b :

Hipótesis contrastada:

$$H_0 : b \neq B_0$$

$$H_1 : b = B_0$$

$$\text{donde } B_0 = 1$$

Nivel de significancia:

$$\alpha = 0.05$$

Estadígrafo de contraste:

$$t_{B_0} = \frac{(b - B_0) S_x \sqrt{n-1}}{\hat{S}_{y/x}}$$

$$= 0.1487$$

Región crítica bilateral con nivel de significancia α :

$$t_{B_0} < t_{\frac{\alpha}{2}, n-2} \quad \text{y} \quad t_{B_0} < t_{1 - \frac{\alpha}{2}, n-2}$$

$$2.05 > 0.1487 > -2.05$$

Se rechaza H_0 , lo que implica que se acepta el valor de la pendiente.

Intervalo de confianza del 95% para B_0 :

$$b - t_{\frac{\alpha}{2}} \cdot \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}} < B_0 < b + t_{1 - \frac{\alpha}{2}} \cdot \frac{\hat{S}_{y/x}}{S_x \sqrt{n-1}}$$

$$1.01099 \pm 0.1515$$

$$\text{Lím. Sup.} = 1.1625$$

$$\text{Lím. Inf.} = 0.8595$$

Ecuación de la recta ajustada:

$$\hat{y} = 0.0265 + 1.0110 x$$

con la ecuación, y toma los siguientes valores:

x	\hat{y}
3.552	3.683
5.328	5.393
7.104	7.102
7.992	7.957
8.880	8.812
10.212	10.094

Coefficiente de correlación:

$$r = 0.9996$$

$$r^2 = 0.9992$$

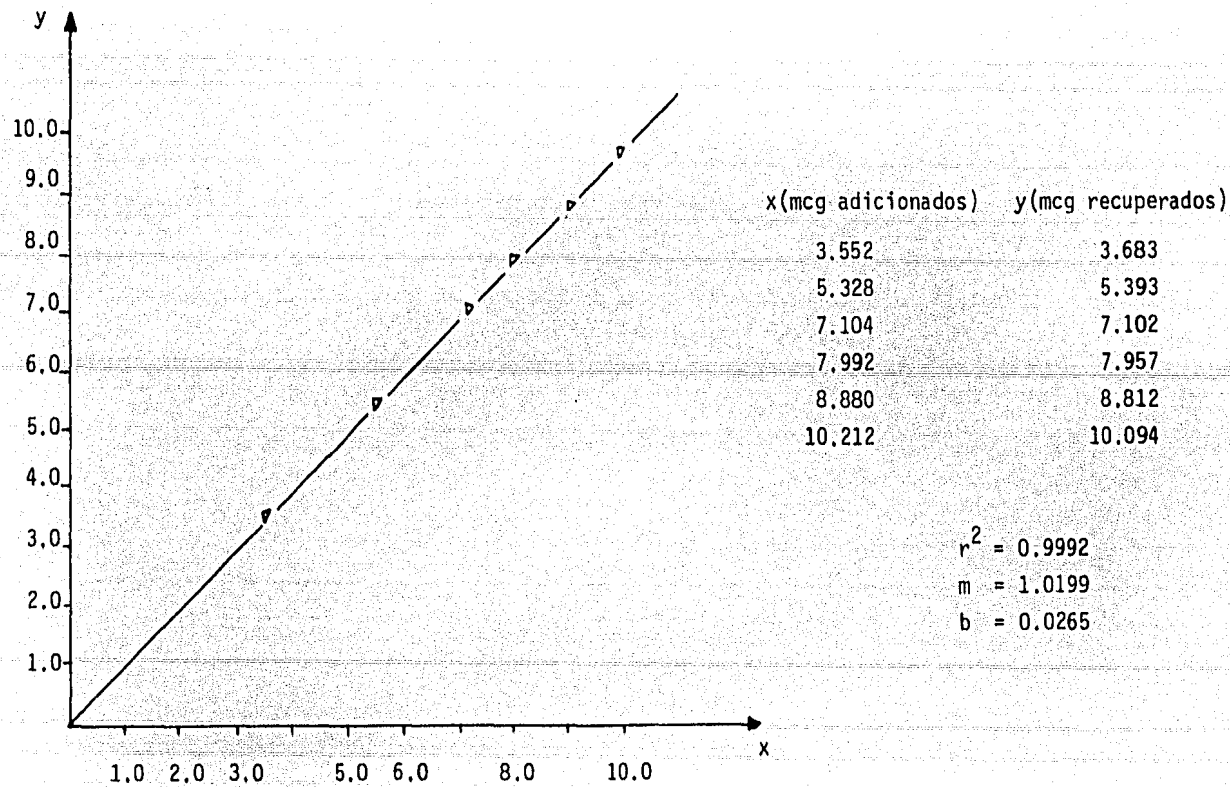
$$1 - r^2 = 0.0008$$

0.0008% de la variación, no se puede explicar con este modelo.

EL METODO SIGUE UN COMPORTAMIENTO LINEAR DENTRO DEL RANGO DE CONCENTRACIONES PROBADAS A LAS CONDICIONES DE TRABAJO ESTABLECIDAS

METODO DE DISOLUCION PARA CAPSULAS DE CARISOPRODOL

LINEARIDAD



GRAFICA NO. 1 Evaluación de linealidad para el método de disolución

d. Reproducibilidad.

	Analista 1	Analista 2
Día 1	101.025%	100.000
	99.110	103.510
	100.878	99.438
Día 2	98.964	100.149
	101.982	99.422
	100.327	99.133

TABLA NO. 4. Recobros del 100% para dos analistas diferentes trabajando dos días diferentes empleando el mismo método de disolución.

<u>F.V.</u>	<u>G.L.</u>	<u>S.C.</u>
A_i	$i - 1$	$\frac{\sum y_{i \dots}^2}{jk} - \frac{y_{\dots}^2}{ijk}$
D_j	$j - 1$	$\frac{\sum y_{.j.}^2}{ik} - \frac{y_{\dots}^2}{ijk}$
AD_{ij}	$ij - j - i + 1$	$\frac{\sum \sum y_{ij.}^2}{k} - \frac{\sum y_{.j.}^2}{ik} - \frac{\sum y_{i..}^2}{jk} + \frac{y_{\dots}^2}{ijk}$
$E_{k(ij)}$	$ijk - ij$	$\sum \sum \sum y_{ijk}^2 - \frac{\sum \sum y_{ij.}^2}{k}$

TABLA NO. 5 TABLA DE ANOVA. 1a. Parte.

F.V. (Factor de variación), G.L. (Grados de libertad)

S.C. (Suma de cuadrados)

<u>C.M.</u>	<u>F calc.</u>	<u>F* 0.05</u>
$SC_A / i-1$	CM_A / CM_{AD}	161.45
$SC_D / j-1$	CM_D / CM_{AD}	161.45
$SC_{AD} / (ij)(j-1)$	CM_{AD} / CM_E	5.3177
$SC_E / ij(k-1)$		

TABLA NO. 5 TABLA DE ANOVA. 2a. Parte

C.M. (Cuadrado medio), $F_{calc.}$ (valor experimental de F), $F_{*0.05}$ (valor teórico de F, obtenido de tablas).

$$A_i = 120788.93 - 120790.22 = 0.04$$

$$D_j = 120790.22 - 120788.89 = 1.33$$

$$AD_{ij} = 120791.94 - 120790.22 - 120788.93 + 120788.89 = 1.72$$

$$E_{k(ij)} = 120809.07 - 120791.94 = 17.13$$

CUADRADO MEDIO:

$$CM_A = 0.04$$

$$CM_D = 1.33$$

$$CM_E = 2.14$$

F calculada.

$$CM_A / CM_{AD} = 0.02325 < 161.45$$

$$CM_D / CM_{AD} = 0.77325 < 161.45$$

$$CM_{AD} / CM_E = 0.80773 < 5.3177$$

NO HAY INTERACCION DE NINGUNO DE LOS FACTORES QUE SE ESTAN PROBANDO.

e. Sensibilidad

Se localizó la sensibilidad del método en el valor de 3,552 mcg de carisoprodo1. Este es el mínimo valor que se preparó para evaluar la linealidad del método.

De acuerdo al comportamiento lineal del método, se supone que esta concentración se detecta de manera confiable y se establece por esta razón el criterio de sensibilidad en dicha concentración.

B. DISOLUCION DE LAS DOS FORMULACIONES.

Previo a la disolución, se hizo el análisis químico a las dos formulaciones para asegurar que cumplen las especificaciones marcadas por la norma de calidad. Los resultados se muestran a continuación:

LOTE: 16308

FORMULACION A

Cantidad manufacturada: 600 cápsulas

DETERMINACION	RESULTADOS	LIMITES
Apariencia	Cápsulas de color azul #0 sin fracturas en 100%	
% Humedad	0.516%	
Desintegración	4 minutos	
Peso individual	470.8	
Variación de Peso	+ 1.28%	3.0%
	- 1.28	3.0%
Ensayo	196.58 mg Carisoprodol	200 mg/cap.
	97.99%	95-105%

LOTE: 16325

FORMULACION B

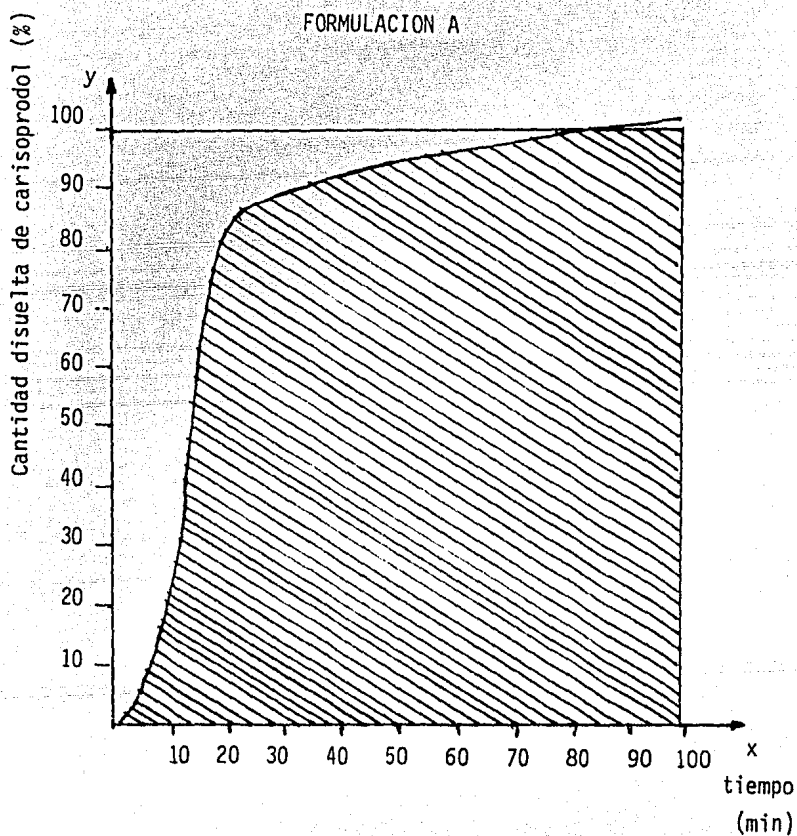
Cantidad manufacturada: 600 cápsulas

Apariencia	Cápsulas tapa amarilla y cuerpo gris #0. Sin fracturas en 100%	
% Humedad	0.315%	
Desintegración	12 minutos	
Peso individual	472.0	
Variación de Peso	+ 1.59 %	3.0%
	- 2.44%	3.0%
Ensayo	199.12mg Carisoprodo1	200.0mg
	99.56%	95-105%

B. DISOLUCION DE LAS DOS FORMULACIONES

Tiempo (min)	Formulación A (% disuelto)	Formulación B (% disuelto)
20	83.97	38.66
40	89.59	58.63
60	96.22	74.03
80	98.63	80.34
90	100.58	83.51
100	100.70	84.51

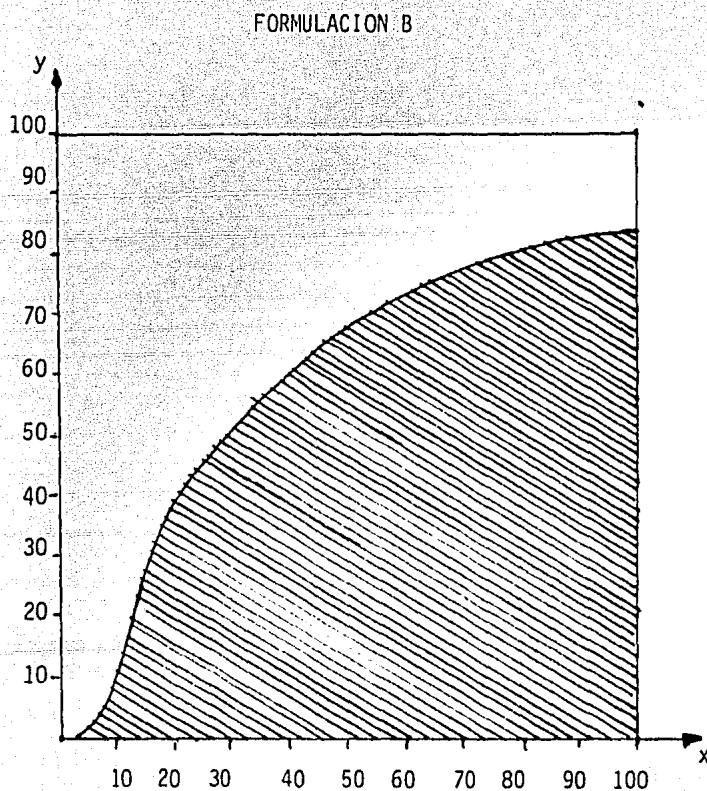
TABLA No. 6 Tabla comparativa de los porcentajes disueltos de carisoprodol cuantificado para las formulaciones A y B.



$$ED = 86.85\%$$

$$k_{dis} = -1.0023$$

GRAFICA NO. 2 Disolución de la Formulación A. A partir de la disolución, se obtienen dos datos muy importantes, que son la Eficiencia de disolución (ED%) y la constante de disolución (k_{dis}).



$$ED = 59.32\%$$

$$k_{dis} = -1.0093$$

GRAFICA NO. 3 Disolución de la Formulación B. A partir de la disolución, se obtienen datos muy importantes, que son la Eficiencia de Disolución (ED%) y la Constante de Disolución (k_{dis}).

Una vez que se tuvo el método de disolución, el cual se había aceptado como adecuado para cuantificar la disolución de carisoprodol, se procedió a validarlo para conocer su confiabilidad con datos estadísticos como base.

La validación del método, arrojó como resultado lo siguiente:

a) El método empleado es exacto, sigue un comportamiento lineal, es además reproducible y repetible (cumple con el requisito de precisión), y se encontró para éste, una sensibilidad de 3,552 mcg de carisoprodol.

b) El rango de linealidad probado para este método es de 40 a 115% lo que implica que se puede trabajar con seguridad en este rango de concentraciones.

c) Debido a que se encontró que es reproducible, se puede asegurar que no importa el día que se haga el análisis, ni la persona que lo efectúe, ya que el resultado será el mismo en cualquier caso, trabajando a las condiciones establecidas por el método validado.

Ya con el método validado, se realizó la disolución de las dos formulaciones de carisoprodol, en donde se obtuvieron los resultados esperados, debido a que se presentó un retraso en la liberación del carisoprodol a partir de la formulación B, con respecto a la formulación A, hecho que se había pronosticado, por la adición de un exceso de estearato de magnesio a dicha formulación.

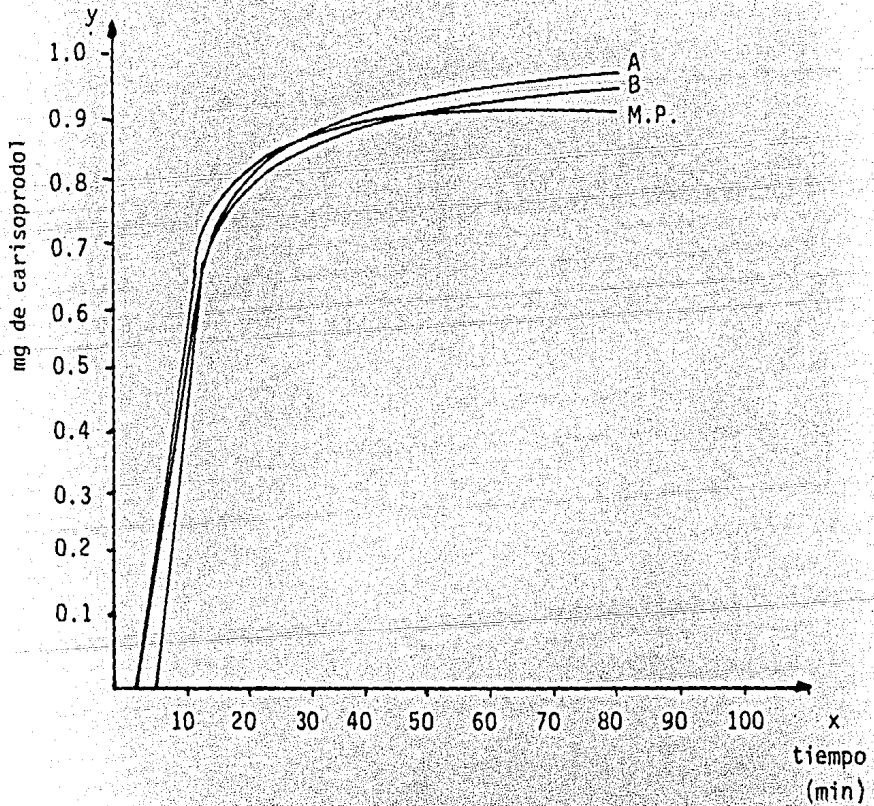
Al graficar el porcentaje disuelto de carisoprodol con respecto al tiempo, se obtuvo una gráfica representativa de una cinética de primer orden. Así, se prosiguió el tratamiento de una cinética de primer orden y se calculó la constante de disolución (k_{dis}) para las dos formulaciones. Se calculó además la eficiencia de disolución (ED%) que como era de esperarse, fue mayor para la formulación A que para la formulación B.

2. PRUEBA DE INTESTINO INVERTIDO

TIEMPO	MATERIA PRIMA	FORMULACION A	FORMULACION B
(min)	(mg)	(mg)	(mg)
3	0.00	0.00	0.00
6	0.224	0.1746	0.00
9	0.2820	0.3271	0.2558
12	0.5793	0.6140	0.2830
15	0.8161	0.7834	0.7776
30	0.8994	0.8928	0.7858
45	0.8766	0.8957	0.9406
60	0.9338	1.0049	0.9442
75	0.9646	0.9937	1.0372

TABLA No. 7 Tabla comparativa de mg de carisoprodol que pasan a través de la membrana intestinal como materia prima y liberado a partir de las Formulaciones A y B con respecto al tiempo.

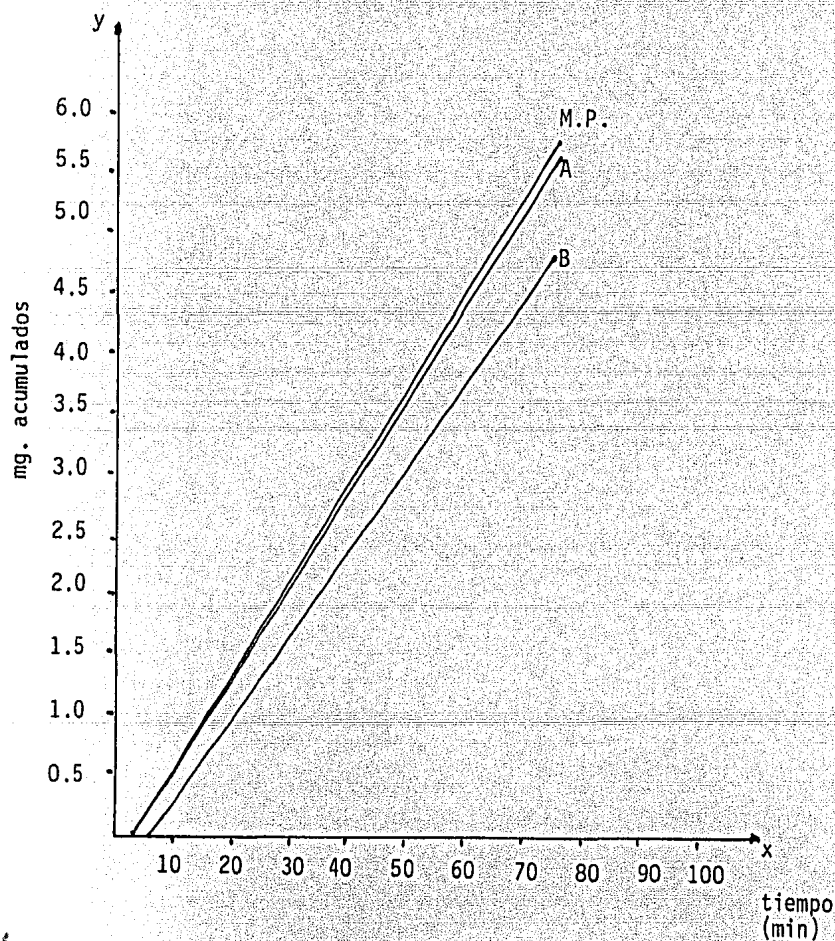
PRUEBA DE INTESTINO INVERTIDO PARA CARISOPRODOL



GRAFICA No. 4

Comparación del paso a través de membrana entre le carisoprodo1 materia prima y liberado a partir de las formulaciones A y B

	M.P.	Form.A	Form. B
T_{lag}	3 min	3 min	6 min
k_{abs}	0.109	0.110	0.085



GRAFICA NO. 5 PRUEBA DE INTESTINO INVERTIDO PARA CARISOPRODOL QUE ATRAVIESA LA MEMBRANA INTESTINAL COMO MATERIA PRIMA Y LIBERADO A PARTIR DE LAS FORMULACIONES A Y B.

Los datos que se presentan en la tabla no. 7 demuestran el efecto que tienen ambas formulaciones sobre la liberación del carisoprodol. -- Mientras que la Formulación A contribuye a que el carisoprodol atraviese la membrana, liberándolo y facilitando su disolución, la Formulación B retrasa la liberación y por tanto el paso a través de la membrana. Es te hecho se hace evidente al cuantificar a tiempos similares el paso a través de membrana de las dos formulaciones y el carisoprodol como materia prima.

Si se grafican los mg de carisoprodol que atraviesan la membrana - contra el tiempo, se obtiene una gráfica, que sugiere un comportamiento del tipo de Transporte Activo. (gráfica no. 4)

Aumenta la concentración de carisoprodol, hasta un punto donde ya no no aumenta más y se forma una meseta, que indica que ya no pasa más carisoprodol a través de la membrana y hace inferir que hay saturación del acarreador que realiza el transporte del carisoprodol.

Si ahora se grafican los mg acumulados de carisoprodol contra el tiempo, como se muestra en la gráfica no. 5, se obtendrán rectas, cuya pendiente representa la constante de absorción (K_{abs})

Como era de esperarse, la k_{abs} para carisoprodol materia prima y para la formulación A, son muy similares, y es menor para la formulación B.

3. BIODISPONIBILIDAD.

Se procedió a administrar las dos formulaciones de carisoprodol a los seis pacientes voluntarios, de acuerdo con el protocolo anteriormente establecido.

La principal reacción perceptible, es la somnolencia y se observa más acentuada dentro de los 30 a 60 minutos posteriores a la administración de las cápsulas.

Ningún paciente reportó alguna reacción secundaria o adversa, posterior a la administración del medicamento, a no ser la somnolencia.

A. Validación del método para cuantificar el carisoprodol en plasma

Al igual que en la validación del método de disolución, se llevaron a cabo las diferentes pruebas de la validación del método para la determinación del carisoprodol en plasma, inyectando y cuantificando las muestras adicionadas de cantidades conocidas del principio activo, los resultados y los análisis estadísticos respectivos, se presentan a continuación:

a. Exactitud.

mcg adicionados	mcg recuperados	% recuperado
2.0	1.9828	99.14
2.0	2.0253	101.26
2.0	1.9673	98.36
2.0	2.0474	102.37
2.0	1.9693	98.46
2.0	2.0073	100.36
2.0	2.0473	102.37
2.0	1.9975	99.88
2.0	1.9967	99.83
2.0	1.9679	98.39
2.0	1.9939	99.70
2.0	1.9695	98.48
2.0	1.9879	99.40
2.0	2.0279	101.40
2.0	2.0199	100.99
2.0	2.0024	100.12
2.0	2.0267	101.33
2.0	2.0468	102.34
2.0	2.0688	103.44
2.0	2.0067	100.34

TABLA NO. 8 Recobros del 100% para evaluar exactitud y repetibilidad del método de cuantificación de carisoprodol en plasma.

$$\begin{aligned} \bar{x} &= 100.40 \\ n &= 20 \\ t_{0.975} &= 2.09 \\ n &= n - 1 = 19 \\ s &= 1.5066 \\ s/\sqrt{n} &= 0.3369 \end{aligned}$$

Hipótesis contrastada:

$$H_0 : \mu \neq \mu_0 \quad H_1 : \mu = \mu_0$$

donde $\mu_0 = 100$

Nivel de significancia:

$$\alpha = 0.05$$

Estadístico de contraste:

$$t = \frac{100.40 - 100}{0.3369} = 1.1873$$

$$2.09 > 1.1873 > -2.09$$

Se rechaza H_0

Se acepta H_1

EL METODO ES EXACTO

Intervalo de confianza del 95% para μ :

$$\bar{x} \pm t_{0.975} s/\sqrt{n}$$

$$100.40 \pm 0.7041$$

$$\text{Lím inf: } 99.70$$

$$\text{Lím sup: } 101.10$$

b. Repetibilidad.

$$s = 1.5066$$

$$s^2 = 2.2698$$

$$n = 20$$

$$\chi_{0.95, n-1}^2 = 30.14$$

$$\chi_{0.025, n-1}^2 = 8.91$$

$$\chi_{0.075, n-1}^2 = 32.85$$

Hipótesis contrastada:

$$H_0 : \sigma^2 \neq \sigma_0^2 \quad H_1 : \sigma^2 = \sigma_0^2$$

$$\text{donde: } \sigma_0^2 = (3)^2 = 9$$

Nivel de significancia:

$$\alpha = 0.05$$

Estadígrafo de contraste:

$$\begin{aligned} \chi^2 &= \frac{(n-1)(s^2)}{\sigma_0^2} \\ &= \frac{19(2.2698)}{9} = 4.7918 \end{aligned}$$

Región crítica nivel unilateral superior:

$$\chi^2 \leq \chi_{1 - \frac{\alpha}{2}}^2$$

$$\chi^2_{\text{calculada}} < \chi_{0.95, n-1}^2$$

$$4.7918 < 30.14$$

Se rechaza H_0 .

Se acepta H_1 .

EL METODO ES REPETIBLE

Intervalo de confianza para $\sigma = 3$

$$\text{Lím inf.} = \sqrt{\frac{(19)(2.2698)}{32.85}} = 1.1458$$

$$\text{Lím. sup.} = \sqrt{\frac{(19)(2.2698)}{8.91}} = 2.2000$$

$$2.2000 < \sigma > 1.1458$$

EL METODO ES REPETIBLE

c. Linearidad.

mcg adicionados	mcg recuperados	% recuperado
0.3	0.2636	87.87
0.3	0.2909	96.97
0.3	0.2263	75.43
0.3	0.2712	90.40
0.3	0.2468	82.27
0.6	0.5795	96.53
0.6	0.6160	102.67
0.6	0.5419	90.32
0.6	0.6059	100.98
0.6	0.5955	99.25
1.0	0.9747	97.47
1.0	1.0511	105.11
1.0	0.9849	98.48
1.0	1.0710	107.10
1.0	0.9374	93.74
3.0	2.8043	93.48
3.0	2.9471	98.23
3.0	3.2044	106.81
3.0	3.0088	100.29
3.0	3.0196	100.65
4.0	4.0122	100.30
4.0	3.8474	96.18
4.0	3.9142	97.85
4.0	3.6621	91.52
4.0	3.9361	98.40
6.0	5.8203	97.00
6.0	6.0184	100.31
6.0	5.9030	98.38
6.0	6.1087	101.81
6.0	5.8119	96.86

TABLA NO. 9 Evaluación de linealidad para el método de cuantificación de carisoprodol en plasma.

$$\begin{aligned}
 n &= 30 \\
 \Sigma x &= 74.5 \\
 \Sigma y &= 73.2752 \\
 \Sigma x^2 &= 312.25 \\
 \Sigma y^2 &= 303.2149 \\
 \bar{x} &= 2.4833 \\
 \bar{y} &= 2.4425 \\
 S_x &= 2.0947 \\
 S_y &= 2.0703 \\
 N &= n - 2 = 28 \\
 \Sigma xy &= 309.5960 \\
 \Sigma (xy)^2 &= 7943.9281 \\
 t_{0.975} &= 2.05
 \end{aligned}$$

Ordenada al origen:

$$a = 0.0031$$

Pendiente:

$$b = 0.9801$$

Error típico de estimación modificada:

$$S_{y/x} = 0.1234$$

$$\hat{S}_{y/x} = 0.1278$$

$$= 7.6709$$

$$E_{j(i)} = 0.2639$$

Inferencias acerca de a:

Hipótesis contrastada:

$$H_0: a \neq A_0$$

$$H_1: a = A_0$$

$$\text{donde: } A_0 = 0$$

Nivel de significancia:

$$\alpha = 0.05$$

Estadígrafo de contraste:

$$t_{A_0} = 0.03831$$

Región crítica bilateral con nivel de significancia α ;

$$0.03831 \leq t_{\frac{\alpha}{2}, (n-2)}$$

$$0.03831 \geq t_{1 - \frac{\alpha}{2}, (n-2)}$$

$$2.05 > t_{A_0} > -2.05$$

$$2.05 > 0.03831 > -2.05$$

H_0 se rechaza

H_1 se acepta, lo que es evidencia suficiente para aceptar el valor de la ordenada al origen.

Intervalo de confianza del 95% para A_0 :

$$0.0031 \pm 2.05(0.08171)$$

$$\text{Lím sup.} = 0.1706$$

$$\text{Lím inf.} = -0.1644$$

Inferencias acerca de b:

Hipótesis contrastada:

$$H_0: b \neq B_0 \quad H_1: b = B_0$$

$$\text{donde: } B_0 = 1$$

Nivel de significancia:

$$\alpha = 0.05$$

Estadígrafo de contraste:

$$t_{B_0} = -1.7546$$

Región crítica bilateral a nivel de significancia α :

$$2.05 > -1.7546 > -2.05$$

Se rechaza H_0

Se acepta H_1

Se acepta el valor de la pendiente.

Intervalo de confianza del 95% para B_0 :

$$0.9801 \pm 0.02322$$

$$\text{Lím sup.} = 1.0033$$

$$\text{Lím inf.} = 0.9569$$

Ecuación de la recta ajustada:

$$\hat{y} = 0.0031 + 0.9801 x$$

Con la ecuación, y toma los siguientes valores:

x	\hat{y}
0.1	0.0984
0.3	0.2947
0.6	0.5917
1.0	0.9842
2.0	1.9652
3.0	2.9462
4.0	3.9272
6.0	5.8893

Coefficiente de Correlación:

$$r = 0.9999$$

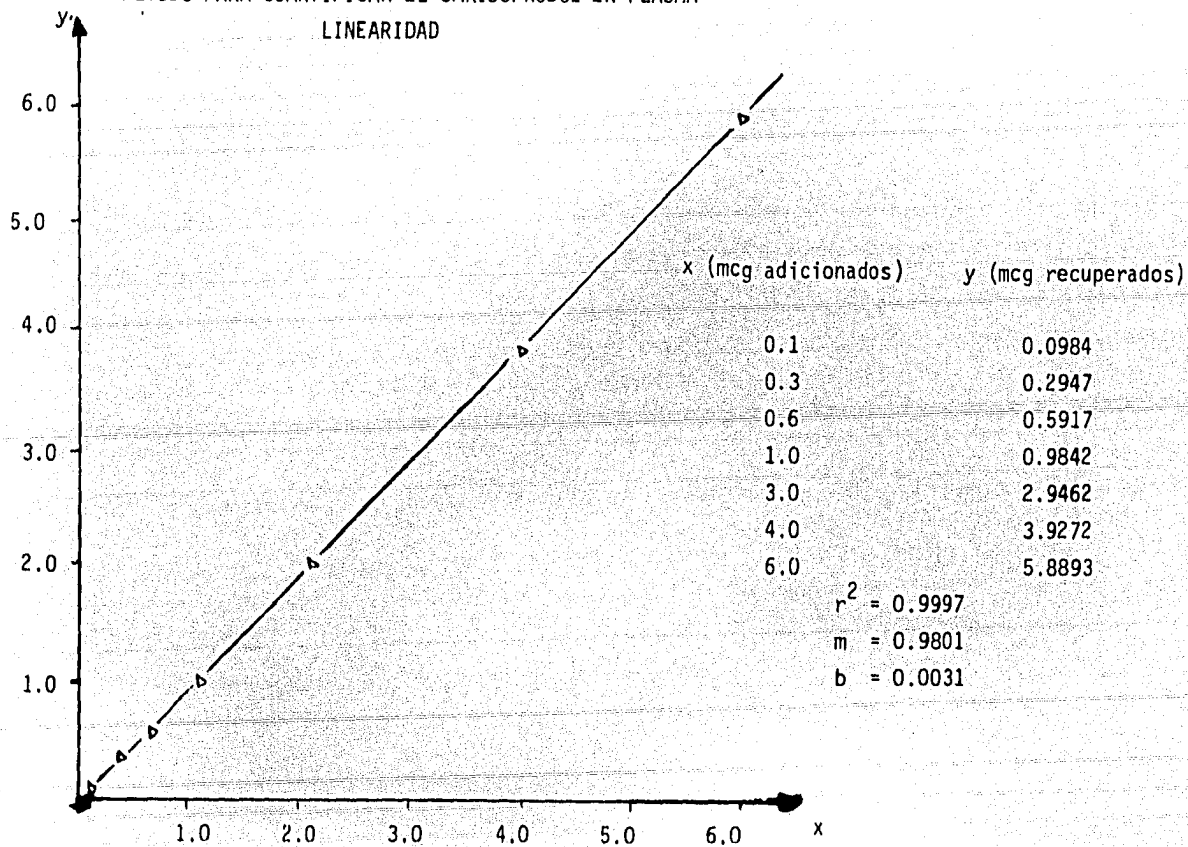
Coefficiente de Determinación:

$$r^2 = 0.9997$$

$1 - r^2 = 0.0003$ % de la variación no se explica con este modelo.

EL METODO ES LINEAR

METODO PARA CUANTIFICAR EL CARISOPRODOL EN PLASMA
LINEARIDAD



GRAFICA No. 6 Evaluación de linealidad para el método de cuantificación de carisoprodol en plasma

d. Reproducibilidad

	Analista 1	Analista 2
Día 1	101.030	99.201
	100.006	101.065
	99.982	100.156
Día 2	100.250	99.084
	101.094	99.741
	94.499	102.779

TABLA NO. 10 Recobros del 100% para dos analistas diferentes - trabajando dos días diferentes empleando el mismo método para plasma.

$$A_i = 120760.61 - 120760.60 = 0.01$$

$$D_j = 120760.70 - 120760.60 = 0.10$$

$$AD_{ij} = 120760.84 - 20760.70 - 120760.61 + 120760.60 = 0.13$$

$$E_{k(ij)} = 120783.21 - 120760.84 = 22.37$$

$$CM_A = 0.01/2 - 1 = 0.01$$

$$CM_D = 0.1/2 - 1 = 0.1$$

$$CM_{AD} = 0.13/1 = 0.13$$

$$CM_E = 22.37/8 = 2.796$$

$$F_A = 0.01/0.13 = 0.0769 < 161.45$$

$$F_D = 0.1/0.13 = 0.7692 < 161.45$$

$$F_{AD} = 0.13/2.796 = 0.0405 < 5.3177$$

NO HAY INTERACCION DE NINGUNO DE LOS FACTORES QUE SE ESTAN PROBANDO

EL METODO ES REPRODUCIBLE

e. Sensibilidad.

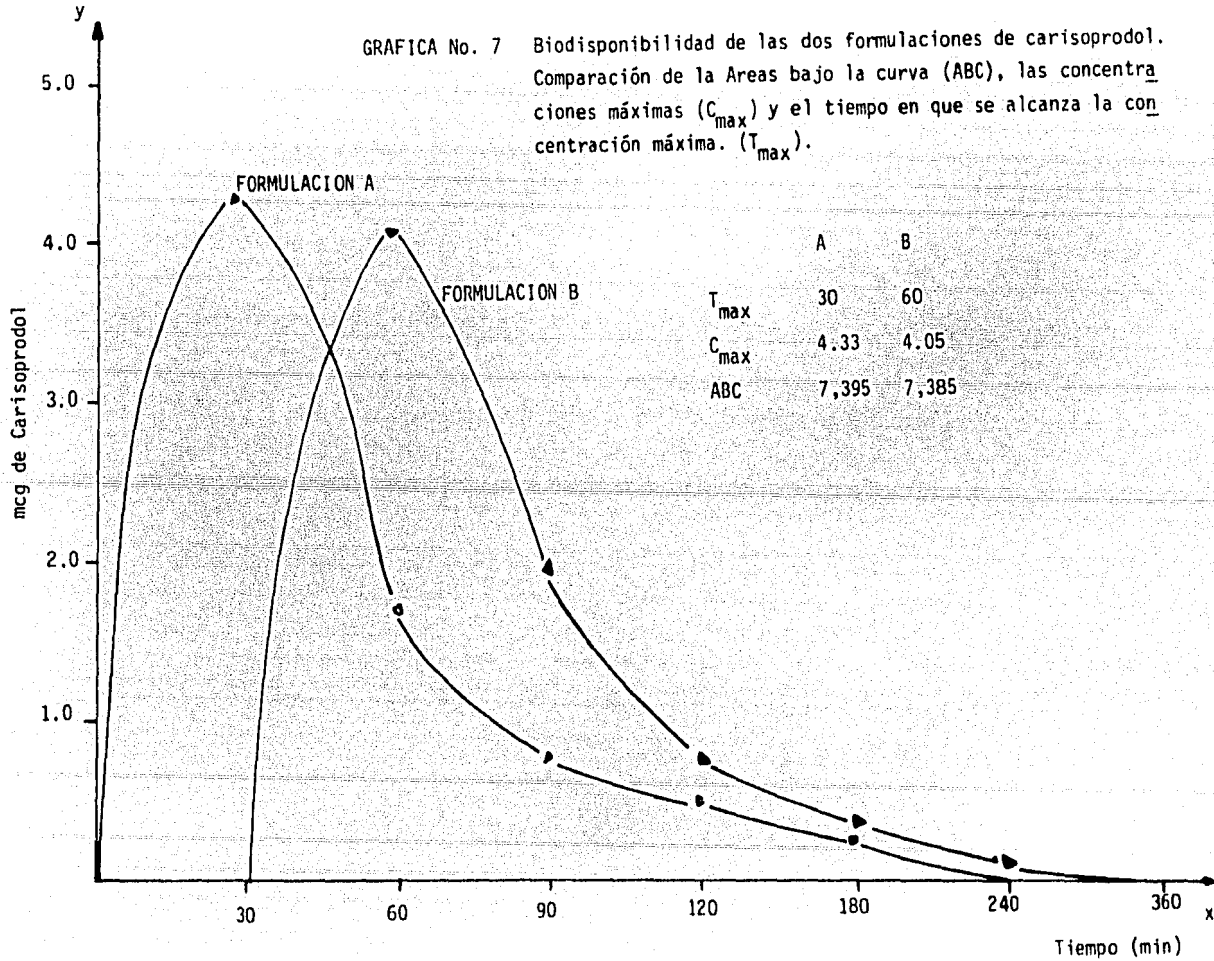
La mínima concentración que se empleó en la validación del método para cuantificar el carisoprodol en plasma, fue de 0.3 mcg, sin embargo, al realizar el tratamiento estadístico para evaluar la linealidad, se encontró que la mínima concentración, o la mínima cantidad detectable por el método, es aún lineal y no varía su exactitud ni su precisión.

B. Biodisponibilidad de las dos formulaciones.

TIEMPO (min)	FORMULACION A (mg)	FORMULACION B(mg)
0	0.00	0.00
30	4.33	0.00
60	1.72	4.05
90	0.70	1.94
120	0.36	0.69
180	0.16	0.23
240	0.00	0.02
360	0.00	0.00
480	0.00	0.00

TABLA NO 11. TABLA COMPARATIVA DE LOS mcg DE CARISOPRODOL CUANTIFICADOS EN PLASMA, LIBERADOS A PARTIR DE LA FORMULACIONES A Y B.

GRAFICA No. 7 Biodisponibilidad de las dos formulaciones de carisoprodol. Comparación de la Areas bajo la curva (ABC), las concentra- ciones máximas (C_{max}) y el tiempo en que se alcanza la con- centración máxima. (T_{max}).



En la siguiente tabla, se presentan los datos resumidos para las dos formulaciones en las tres diferentes pruebas llevadas a cabo: disolución, paso a través de membrana y biodisponibilidad.

	FORMULACION A	FORMULACION B
<u>DISOLUCION</u>		
% Dis. a 40 min	89.59%	58.63%
% Dis. a 60 min	96.22%	74.03%
Eficiencia de diso- lución	86.85%	59.32%
K_{dis}	1.0093 min^{-1}	1.0023 min^{-1}
<u>PASO A TRAVES DE MEMBRANA</u>		
Tiempo en atravesar la membrana intestinal	3 min	6 min
Cantidad a 60 min.	1.0049 mg	0.9442 mg
K_{abs}	0.11 min^{-1}	0.08 min^{-1}
<u>BIODISPONIBILIDAD</u>		
ABC	7,395	7,385
Tmax.	30 min	60 min
C max.	4.35 mcg	4.05 mcg
K_{el}	0.01 min^{-1}	0.01 min^{-1}

TABLA No. 12 Constantes y resultados importantes obtenidos a partir de la experimentación.

En la tabla no. 11, se aprecia nuevamente el efecto de retraso de la liberación del carisoprodol a partir de la formulación B, ya que -- mientras se detecta carisoprodol a los 30 minutos de transcurrida la ad ministración de la Formulación A, en la Formulación B se detecta hasta los 60 minutos. Este resultado se explica por el hecho de que la formu lación B viene arrastrando un retraso en la liberación del fármaco y re traso en el paso a través de la membrana, lo que se refleja inevitable mente en un retraso en la absorción del fármaco.

A pesar de la liberación retardada del carisoprodol de la formula ción B, se aprecia que las concentraciones alcanzadas por ambas formula ciones, es similar.

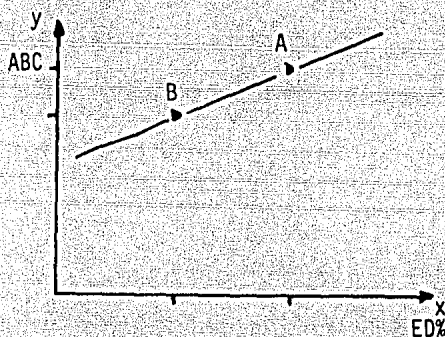
Si ahora se grafican los mcg de carisoprodol en plasma vs tiempo - transcurrido desde la administración del fármaco, se obtiene la gráfi ca no. 7, de donde se calculan los datos de concentración y tiempo máxi mos, el área bajo la curva y las constantes de absorción (k_{abs}) y elimi nación (k_{el}).

Mediante el gráfico, se hace evidente la similitud de concentra--- ción de carisoprodol en plasma, liberado a partir de ambas formulacio--- nes.

El área bajo la curva puede ser considerada como representativa de la cantidad de fármaco absorbido después de la administración de una do sis única del fármaco. El área bajo la curva tiene valor similar para - una y otra formulación, (7,395 y 7,385 mcg/ml h, respectivamente), lo - que indica que ambas formulaciones liberan más o menos la misma canti--- dad de fármaco al organismo. Sin embargo, se considera más adecuada la formulación A, debido a su rapidez de disolución, paso a través de mem- brana y absorción.

Empleando los valores obtenidos a partir de la experimentación, - contenidos en la tabla no. 12, se coloca en el eje de las abscisas el parámetro in vitro y en el eje de las ordenadas el parámetro in vivo, -- para tratar de establecer una correlación.

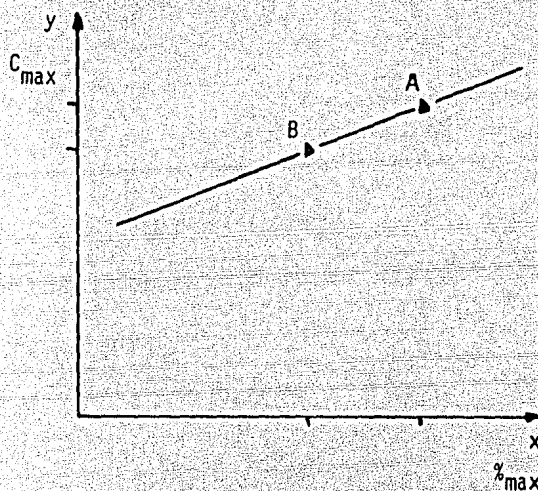
Se grafica primero el área bajo la curva de las dos formulaciones contra la eficiencia de disolución de las mismas y se obtiene una gráfica del tipo:



GRAFICA No. 8 Correlación entre el área bajo la curva (ABC) y la eficiencia de disolución (ED%) para las formulaciones A y B.

De acuerdo con la gráfica, se observa que al aumentar la eficiencia de disolución, aumenta también el área bajo la curva, sin embargo, no se puede aplicar una correlación cuantitativa debido a que son solo -- dos formulaciones y en todas las correlaciones que se hagan, se va a -- obtener una línea recta. La correlación que se aplica entonces, es la correlación gradual, donde se aprecia que si el parámetro in vitro aumenta, también aumenta el parámetro in vivo.

Si se grafica ahora la concentración máxima en sangre, contra el % máximo disuelto, se obtiene:



GRAFICA No, 9 Correlación entre la concentración máxima en sangre (C_{max}) y el % máximo disuelto para las dos formulaciones.

En la gráfica, nuevamente se aprecia la correlación entre el parámetro in vivo y el parámetro in vitro, por medio de una línea recta que pone de manifiesto la correlación. Nuevamente si aumenta el parámetro in vitro, aumenta también el parámetro in vivo.

C O N C L U S I O N E S

VI. CONCLUSIONES.

Gracias al presente estudio, se hizo posible concluir que el carisoprodol dosificado en cápsulas, presenta una absorción rápida, corroborando así lo encontrado en la bibliografía y estableciendo, por consiguiente un estudio experimental que establezca las bases en las cuales poder fundamentar la formulación y biodisponibilidad del carisoprodol.

El estudio de disolución comparativa de las dos formulaciones, permitió observar el retraso en la liberación de carisoprodol a partir de la formulación B, que era lo que se perseguía con la adición de un exceso de estearato de magnesio. A partir de este momento, era consecuencia lógica pensar en el retraso de carisoprodol para atravesar la membrana intestinal y en consecuencia en la absorción de éste, debido a que se observó tal efecto en la disolución y al tardar más tiempo en disolverse, es lógico pensar que debe tardar más tiempo en atravesar la membrana intestinal y su absorción comenzará después que la absorción del carisoprodol liberado a partir de la formulación A. Así pues, concluida la experimentación, se corroboró lo esperado, de donde se concluye que el estearato de magnesio ejerce un efecto de retraso en la liberación del fármaco sin que afecte significativamente la velocidad de absorción

El estudio de intestino invertido permitió detectar la rapidez con la que se lleva a cabo el paso de carisoprodol a través de la membrana intestinal, ya que desde el primer muestreo, que se realiza a los 3 minutos de tener al carisoprodol en contacto con la membrana, se detecta el paso del carisoprodol.

Como ya se discutió, se supone que el transporte del carisoprodol a través de la membrana intestinal, se realiza mediante algún acarreador (Transporte Activo), que de acuerdo a las condiciones en que se trabajó, llegó a saturarse.

El estudio de biodisponibilidad, arrojó como resultado el cálculo de una serie de constantes importantes para delimitar matemáticamente el comportamiento del carisoprodol, como por ejemplo, la constante de absorción, la constante de eliminación, el área bajo la curva, etc.

Una vez que se tuvieron los resultados tanto de la experimentación in vitro, como in vivo, se procedió a graficarlos, observándose efectivamente una correlación de comportamientos, sin embargo, no se procedió a realizar un estudio cuantitativo, debido a la comparación de solamente dos formulaciones, que al ser correlacionadas, originarían una línea recta invariablemente, lo que ya se demostró. Sin embargo, es posible establecer a la prueba de disolución como un medio para proporcionar una idea de que tan bien se va a realizar la absorción del carisoprodol ya formulado, funcionando así, como un parámetro de control de calidad.

BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Billany, M.R. & Richards, J.H. Batch Variatiton of Magnesium Stearate and its Effect on the Dissolution Rate of Salicylic Acid from - Solid Dosage Forms. Drug Development and Industrial Pharmacy. Vol 8 No. 4, 1982. p. 497-511
2. Cid, Cárcamo Edison. Cinética de Disolución de Medicamentos. Secretaría General de la O.E.A. Primera edición. Washington D.C. Capítulos 1, 2, 4, 6 y 7
3. Chowhan J.T. & Amaro A.A. Everted Rat Intestinal Sacs as In Vitro for Assesing Absorptivity of New Drugs, Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol 66, no. 9, September 1977, p. 1249-1253
4. Chowhan J.T. & Amaro A.A. Tablet to Tablet Dissolution Variability and its Relationship to the Homogeneity of a Water Soluble Drug. Drug Development and Industrial Pharmacy. Vol 8 No. 2, 1982 p. 355-369.
5. Cochetto, David. Methods for Vascular Access and Collection of Body Fluids from the Laboratory Rat. Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol 72, No. 5, May 1983, p. 465-486
6. Dabrio, M.V. Cromatografía de Gases. Ed Alhambra. Primera Edición. España 1979. Caps. 1, 3 y 6.
7. Drill, R.S. Farmacología Médica. Ed. La Prensa Médica Mexicana. Segunda Edición. México, 1971. p. 677-686

8. Garzón, Alfredo. Aspectos Prácticos de Biofarmacia. Farmetrix. México, 1977. Caps. 1 y 7
9. García, Araceli. Estudio comparativo de dos métodos analíticos para la determinación cuantitativa de Hidrocortisona en una formulación de Hidrocortisona 1% + Vioformo 3% en crema. Tesis Profesional. U.N.A.M. México, 1983, p. 42-62
10. Hellman, José. Farmacotecnia teórica y Práctica. Ed C.E.C.S.A. Primera Edición. México, 1982. Tomo VI p. 1663-1678, Tomo VIII p. 2509-2530
11. Honigberg, I.L. & Stewart, J.T. Liquid Chromatography in Pharmaceutical Analysis IX: Determination of Muscle Relaxant-Analgesic Mixtures Using Normal Phase Chromatography. Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol 67, No. 5. May 1978. p. 675-679
12. Kaplan, Stanley. Use of Cannulated Everted Intestinal Sac for Serial Sampling as a Drug Absorbability (Permeability Screen). Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol 61, No. 9, September 1972 p. 1361-1365.
13. Karger, James. Principles and Perspectives in Drug Bioavailability Ed. Blanchard. U.S.A. 1979. p. 4, 5, 20-48
14. Kreyzig, Erwin. Estadística matemática. Ed. Limusa. México, 1978 - Apéndice J.
15. Litter, Manuel. Farmacología Experimental y Clínica. Ed. El Ateneo. Sexta Edición. Argentina 1980. p. 197, 201, 204-207, 378-381.

16. Martínez, Elizabeth. Factores que Afectan la Velocidad de Disolución de Prednisona en tabletas. Tesis Profesional. Universidad Autónoma de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco, 1979. p.10-17
17. Martis, Leo. Determination of Meprobamate in Dissolution Studies -- Shortcomings of Direct GLC and Development of a New Assay. Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol 61, No. 8, August 1972. p. 1341-1343.
18. Martis, Leo. Determination of Meprobamate in Water, Plasma and Urine. Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 63, No. 6, June 1974 p. 834-837.
19. Merck Index, The. An Encyclopedia of Chemicals and Drugs. Edited - by Martha Windholdz. U.S.A. Ninth Edition. Published by Merck and Co. Inc., 1976
20. Meyers, F., Jawetz, E. Manual de Farmacología Clínica. Ed. El Manual Moderno. Cuarta Edición. México, 1980, p.248-256
21. Molina, Martha. Correlación In vivo-In vitro de Productos Comerciales de Nitrofurantoína. Tesis Profesional. U.N.A.M. México, 1982. p. 1, 2, 49-51.
22. Regis, Leo. A User's Guide to Chromatography. Ed. Karger. 1st Edition. U.S.A. 1979. p. 4,5, 20-48
23. Rogers, Edward. Cromatografía. Ed. Interamericana. México, 1978. -- Caps. I, VII.

24. Rudnic, E.M. & Rhodes, C.T. Evaluations of the Mechanism of Disintegrant Action. Drug Development and Industrial Pharmacy. Vol. 8. No. 1, 1982. p. 87-109
25. Sheikh, Mutaz. The Influence of Magnesium Stearate on Time Dependent Strength Changes in Tablets. Drug Development and Industrial Pharmacy. Vol 7. No. 6, 1981. p 669-674
26. Simons, Keith. Dissolution and Bioavailability Studies of Whole and Halved Sustained-Release Theophylline Tablets. Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol 71, No. 5, May 1982. p. 505-511.
27. Sullivan, T.J., Stoll, R.G., Sakmar, E., Blair, D.C. & Wagner J.G.- In vitro and In vivo Availability of Some Commercial Prednisolone Tablets. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics. Vol 2, No. 1, 1974, p. 29-41.
28. Trujeque, Francisca de Asis. Comparación de Tres Métodos Analíticos para la Determinación Cuantitativa de Carisoprodo1. Tesis Profesional. Universidad de Yucatán. Yucatán. Octubre, 1979. p. 13-24, -- 32-38.
29. United States Pharmacopeia. Mack Publishing Co. 20th Edition.