

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

IDiBE

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular



Tesis Doctoral

Influencia de los excipientes en la biodisponibilidad oral

Alejandro Ruiz Picazo

Directora:

Dra. María del Val Bermejo Sanz

Codirectora:

Dra. María Isabel González Álvarez

Alicante, 2019

Esta tesis se presenta como compendio de trabajos previamente publicados que se citan a continuación:

Título: Comparison of segmental-dependent permeability in human and *in situ* perfusion model in rat.

Revista: European Journal of Pharmaceutical Sciences 107

Índice de impacto: 3.756 Q1

Año de Publicación: 2017

Posición: Primer Autor

Título: Determination of intestinal permeability using *in situ* perfusion model in rats: Challenges and advantages to BCS classification applied to Digoxin.

Revista: International Journal of Pharmaceutics

Índice de impacto: 4.213 Q1

Año de Publicación: 2018

Posición: Primer Autor compartido

Título: *In Vitro* Dissolution as a Tool for Formulation Selection: Telmisartan Two-Step IVIVC.

Revista: Molecular Pharmaceutics

Índice de impacto: 4.556 Q1

Año de Publicación: 2018

Posición: Primer Autor

Empleados como indicio de calidad para la presentación de la tesis doctoral y cumpliendo así con la normativa del RD99/2011 y en la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández de Elche

Publicaciones científicas pendientes de publicación:

Effect of excipients on oral absorption process according to the different gastrointestinal segments

Autores: Alejandro Ruiz-Picazo, Isabel Lozoya-Agullo, Marta Gonzalez-Alvarez, Marival Bermejo, Isabel Gonzalez-Alvarez

Changes in biopharmaceutical properties of pediatric drug in presence of Milk “Hero baby 1 pediolac”

Autores: Alejandro Ruiz-Picazo, Isabel Gonzalez-Alvarez, Marival Bermejo, Marta Gonzalez-Alvarez

Effect of the thickener on the administration of oral solid pharmaceutical forms on bioavailability.

Autores: Alejandro Ruiz-Picazo, Sarin Colon-Useche, Isabel Gonzalez-Alvarez, Marta Gonzalez-Alvarez, Marival Bermejo, Peter Langguth

Effect of common excipients in intestinal drug absorption.

Autores: Alejandro Ruiz-Picazo, Marta Gonzalez-Alvarez, Marival Bermejo, Isabel Gonzalez-Alvarez



Autorización de la Directora y Codirectora

Dña. Marival Bermejo Sanz, Catedrática de la Universidad Miguel Hernández de Elche y Dña. Isabel González Álvarez, Profesora Titular en la Universidad Miguel Hernández de Elche

CERTIFICAN,

Que el trabajo presentado por el licenciado D. Alejandro Ruiz Picazo para optar al grado de Doctor, titulado: **“Influencia de los excipientes en la biodisponibilidad oral”**, ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de esta Tesis Doctoral para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Alicante, 2019.

Dra. Marival Bermejo Sanz

Dra. Isabel González Álvarez



Conformidad del coordinador de la Comisión Académica del Programa de Doctorado.

El Dr. Ricardo Mallavía Marín, Catedrático del Departamento de Química Inorgánica y coordinador del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH),

CERTIFICA,

Que el trabajo presentado por el licenciado D. Alejandro Ruiz Picazo para optar al grado de Doctor, titulado: **“Influencia de los excipientes en la biodisponibilidad oral”**, reúne los indicios de calidad mínimos exigidos por el programa.

Por lo que autorizo la presentación de esta Tesis Doctoral para que sea juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Alicante, 2019.

Dr. Ricardo Mallavía Marín

Agradecimientos



El motivo de escribir este apartado es para poder agradecer a todos aquellos que me han acompañado durante estos años de Tesis. La realización de este documento ha supuesto para mí mucho esfuerzo y constancia, pero también muchas alegrías, risas y sobretodo me ha permitido conocer a gente maravillosa que espero, siga formando parte de mi vida.

Esta es la historia de una Tesis, la tienes en las manos, ya sabes que tiene un final feliz, pero como en las grandes historias, a veces lo más importante no es el final, si no el camino recorrido y aquí es donde esta historia cobra sentido.

Ha sido una aventura, con todas sus letras, hemos tenido desde retos experimentales, batallas Excelianas hasta traiciones cromatográficas. Aunque sea mi nombre el que ves en la portada soy solo uno de los muchos personajes que forjaron esta hazaña.

Todo empezó mucho antes de lo que os podéis imaginar. Corría el año 2011 y un servidor era un estudiante despreocupado en cuarto de la Licenciatura de Farmacia (sí Marival, soy de Licenciatura). Una llamada a mi teléfono lo cambió todo, una llamada que era una invitación, la invitación a formar parte de una familia unida por la ciencia y lo que es más importante, por la amistad.

La llamada era de Isabel. Aquí he de hacer un punto y aparte. ¿Sabéis de esas historias en las que el protagonista es un don nadie y solo al ser instruido por un todopoderoso y sabio maestro es como llega a ser quien debe ser en realidad? Pues aquí yo tuve mucha suerte ya que no tuve un maestro sino tres.

¿Qué es lo que necesita toda buena historia? En mi experiencia como lector empedernido solo necesitan tres cosas, espíritu, lógica y corazón. Marta es mi maestra del espíritu, agobiando cuando tiene que agobiar y dándote palabras de ánimo cuando las necesitas y pase lo que pase, siempre con una sonrisa en la cara. La maestra de la lógica está claro que es Marival, tanto es así que no recuerdo ni una sola sesión de trabajo con ella, ya sea modelando alguna cosa sencillita o batallando con ejércitos de datos, en todas y cada una de las sesiones terminaba con el cristalino pensamiento de

haber aprendido infinidad de cosas. Es de esas escasas maestras que mientras miras a lo desconocido sin comprender nada de lo que ves, te susurran al oído y de repente todo cobra sentido. Ciertamente es que otras veces sigue sin cobrar sentido ninguno y no es hasta que te pones a currar que ves el cuadro entero, pero esto no hace más que realzar la inteligencia y sabiduría que concentra esta Maestra de la Lógica (y del Glamour, pero eso ya es otra historia). Tener un Espíritu fuerte ayuda en las tareas titánicas, una Lógica brillante hará que puedas exprimir cada experiencia al máximo, pero sin poner el Corazón en aquello que haces, todo dejaría de tener sentido, simplemente no funcionaría. Como ya habréis adivinado mi Maestra del Corazón es Isabel. De ella recibí esa llamada hace ya algunos años y compartiendo con ella los días de trabajo en el laboratorio, viendo la alegría que transmite, lo duro que trabaja y como se implica con todos los de su alrededor es imposible no acabar embelesado por esa vida de aventura, siempre buscando lo desconocido mientras se disfruta del duro trabajo en buena compañía. Dicho esto, aquí queda constancia de lo afortunado que soy de contar con tan excelentes maestras, Espíritu, Lógica y Corazón se combinan en un coctel perfecto que no es otro que el de ... una familia.

Isabel fue, es y sigue siendo la piedra angular de mis motivaciones para con la ciencia y la enseñanza. Ella me proporcionó la chispa que aviva el fuego de científico que a mi parecer ahora me define. Por eso, si mi nombre está en la portada es más que nada gracias a ella.

Volviendo a nuestra historia, después de aquella llamada entre en un mundo que me era por completo desconocido, se me permitió conocer un poco más de cerca a mis Maestras y a su valiente grupo de pupilos.

Al primero que conocí fue a Víctor, Doctorando mayor por excelencia. Chico trabajador en extremo, extrovertido y de carácter que me hizo espabilar con alguna que otra regañina. Pronto descubriría que era casi una tradición, nadie entra realmente a formar parte del grupo si Víctor no te ha soltado un par de gritos antes. El siguiente paso era que te invitara a entrar en el selecto grupo de póker que, aunque nos reunimos pocas veces, siempre fueron tardes divertidas. Gracias por tus consejos.

Otro fiel compañero de batalla, incluso antes de mi entrada en el “laboratorio”, es Nacho. Él fue primero compañero de clase, luego de laboratorio, de fiestas varias, de póker y por encima de todo un buen amigo. Jamás querría que me corrigiera un examen. Puede que sea por su otra batalla, la del gluten, pero creo que sería más estricto que nuestras Maestras. Por esos momentos inolvidables, por aquella pregunta que casi nos roba tu matrícula en PKPD, por el susto que nos diste con tu rodilla en el PAGE, por las gráficas en R, pero sobre todo por tu amistad ¡Brindemos!

Estos individuos que os he presentado eran los que trabajaban en el despacho, batallando con datos y más datos, gráficas, modelos... Pero la primera línea de batalla estaba unos pisos más abajo. En el LABORATORIO.

Hay que descender por una ruta llena de escalones y trampas en forma de tentador ascensor, esquivar la parte del pasillo que está recién fregada si no quieres que nuestras muy honorables señoras de la limpieza te peguen un ladrido y ya estás ahí, en la primera línea, el LABORATORIO.

Allí lo primero que encuentras son dos sonrisas y esas sonrisas se llaman Sarín y Mayte. Llave o nieve, haya ratas o este pitando el HPLC, siempre tienen una sonrisa con la que levantan el ánimo.

Sarín es una científica de una tierra lejana, entregada madre y audaz profesora. Jamás podré agradecerle la cantidad de horas que estuvo ayudándome con mis primeras ratas (siempre las más difíciles) y cuando su tierra la reclamó dejó un vacío en nuestros corazones. Intento seguir tu ejemplo, y no han sido pocas las veces que durante esta aventura me he preguntado, ¿Qué haría Sarín?

Que decir de Mayte, una de las más valientes científicas que he conocido, lo mismo te sintetiza un hidrogel para un conejo que te liofiliza mil muestras. Su tesis sí que fue una historia digna de canciones, quizá algún día. Tus consejos y tu amistad irán conmigo donde me lleve el viento.

Si bien es cierto que las dos sonrisas eran lo primero que veías al entrar, si mirabas un poco mejor también podías ver una coleta y una barba chilenas, Andrés el trotamundos. ¡Con él hice mis

primeros intentos por calibrar el aparato de disolución (tranquilos todos que se ha calibrado más veces) y como olvidar al pirata más auténtico de toda la bucanera fiesta del PAGE! También te reclamó tu tierra, pero no olvides que tienes una tesis que leer y algún bulto sospechoso que recoger del despacho.

Por esta trinchera de la ciencia también hubo algunos visitantes ocasionales, pero no por ello menos importantes. Las grandes historias a menudo están compuestas de pequeños retazos que combinan a la perfección. Los apoyos momentáneos que necesitamos para salir de la rutina y enriquecer la experiencia. En mi caso tuve el placer de coincidir con Nasim, Moran, Kennia, Tamires y Nati. Todas ellas excelentes profesionales y todas ellas han aportado su granito de arena a mi Tesis... corrijo, mi vida. (En este punto es difícil marcar el punto donde empieza una cosa o la otra).

Mención especial para Migue, El capitán cubano que navega ida y vuelta surcando el océano una y otra vez. Todavía tiene mucho que enseñarme y no solo de ciencia, ya sabemos todos que parece que lo de bailar va a necesitar de otra tesis para mí. ¡Espero que sigas navegando y que nos sigamos cruzando por el camino!

Avanzando en la historia, toco el momento de hacer el master, fuera obligatorio o no, nunca lo tuvimos claro, pero me dio la oportunidad de conocer otro laboratorio con otra fauna igual de interesante. Isa L, la doctoranda alicantina en tierras valencianas me acogió como a uno más. Fiel compañera todo ese año y los que siguieron. Siempre a un mensaje de distancia dispuesta a ayudar, ¡no cambies nunca!

Vuelta a nuestro querido Alicante, ya con el master terminado, me encontré que en nada ya era doctorando mayor, así de rápido pasa el tiempo. Estela como compañera de batallas, aunque luego la vida te llevara por otro camino siempre formarás parte del “Dream Team”. Nuestro nuevo técnico del universo Emilio, siempre optimista, aunque haya que cargar agua, balas de CO₂ o lo que se tercié. Los pequeños TFG Ramón, Miguel, Alejandra, Jon, Jessi, Blanca, Elena... un largo etc., todos demostrando que de los alumnos siempre se puede aprender mucho.

Los compañeros finalizando su periodo de Tesis en manada y el laboratorio cada vez más vacío, y es en este punto de la historia se incorporó Bárbara. Una chica extraordinaria en todos los sentidos con la que he compartido la última etapa de esta aventura. Fiel compañera de modelado, hemos hecho frente a todo tipo de problemas con el maligno HPLC y vimos nacer nuestro querido laboratorio de células. Nos hemos cruzado demasiado en nuestras aventuras europeas este último año, pero no se me olvida que tenemos algunas clases magistrales de ajedrez pendientes.

Toco el momento de mi aventura en el extranjero, y fui a parar en el mejor sitio posible. El laboratorio del profesor Langguth en Mainz es un lugar especial para mí. Desde que llegué Herr Langguth me arropó como a uno más y sus doctorandos y colaboradores hicieron lo propio. De Alemania me llevo la idea de que me gusta la ciencia, sea donde sea, unos colegas de profesión enormes y sobretodo, Lukas, Jonas, Johannes, Christian, Anna, Klak, Michael, Moritz y Mauricio, me llevo vuestra amistad. Espero veros lo más a menudo posible y brindemos por el Klak's Coffe.

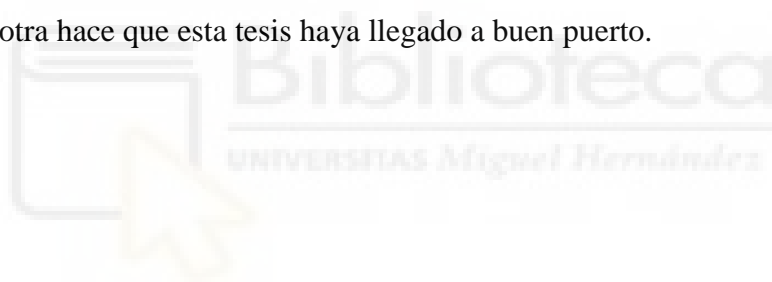
Los años de tesis pasaban y a parte de mi familia científica ha habido otra constante, mi FAMILIA en mayúsculas. Mis padres que han financiado este estudio con la Beca "Dora y Nano", la única de la que cumplía todos los requisitos. Mis hermanos que a pesar de no entender ni papa, siempre me animaban a hablar de mis progresos solo por verme apasionado con algo. A María, la cuñada molona con la que es imposible aburrirse o pasárselo mal, siempre con la puerta de su casa abierta para su cuñado pesado. A Víctor, ese cuñado que todos querrían tener, siempre dispuesto a hablar de la vida y compartir su sabiduría casi ancestral. Mis sobrinos, Paula y Bruno, que empiezan en esto de la vida, pero son el foco de nuestra familia en su totalidad.

Y, por otro lado, la familia que se elige, empezando por mi querida Peña "Els Descarrilats", Alba, Ana, Andrea, Carlos, Esther, Gema, Jenny, María, Marieta, Merino, Nuria, Paqui, Paqui L, Quico, Rocío, y Yaiza. A mi compañero de fatigas Juan Carlos y a mis compis de la universidad, Juanlu, Rubens, Borja y Carlos.

No me gustaría terminar sin agradecer de todo corazón a los animales de experimentación. Espero que esta tesis sirva para avanzar hacia un futuro en el que su uso no sea necesario. Mientras tanto son auténticos héroes.

El final de una etapa siempre es difícil, cuando la gente me pregunta que voy a hacer después de la tesis siempre contesto con sinceridad. Cuando miro al futuro veo una nebulosa en forma de Excel, gráficas y pruebas f, de transportadores intestinales de ratas Wistar y de modelos matemáticos. Esa nebulosa hace difícil mirar más allá, pero también marca un camino, mis mentoras, colegas y amigos me han ayudado de una u otra manera a definirme a mí mismo y sé que quiero seguir esa gruta, por muy tortuosa que sea, me lleve a donde me lleve, da igual la ciudad o el puesto de trabajo siempre que siga el camino de la ciencia.

Gracias a todos por ser ese pedacito de mi vida que en su conjunto me hace ser quien soy y que de una forma u otra hace que esta tesis haya llegado a buen puerto.



*No hablar sobre ciencia me parece perverso,
cuando uno se enamora se lo quiere gritar al mundo.*

Carl Sagan

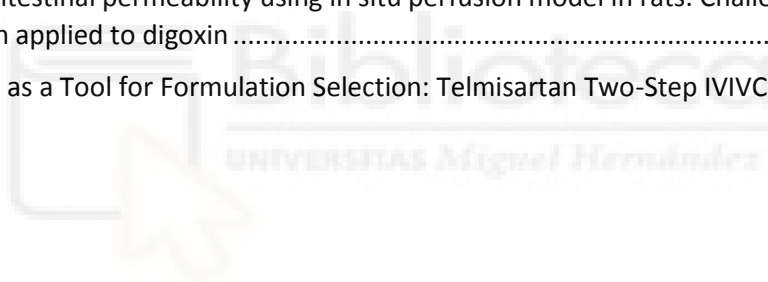


Índice

1. Introducción.....	1
1.1. LADME.....	3
1.2. Aparato Digestivo.....	7
1.2.1. Digestión.....	8
1.2.2. Estómago	12
1.2.3. Intestino Delgado.....	13
1.2.4. Intestino Grueso.....	16
1.2.5. Poblaciones Especiales:.....	18
1.3. Absorción Intestinal.....	23
1.3.1. Lugares de Absorción.....	23
1.3.2. Mecanismos de Absorción.....	23
1.3.3. Parámetros de Absorción.....	31
1.4. BCS.....	35
1.4.1. Orígenes del BCS	35
1.4.2. Bases del BCS	36
1.4.3. Aplicaciones del BCS.....	41
1.5. Excipientes	45
1.5.1. Concepto.....	45
1.5.2. Tipos de Excipientes.....	46
1.5.3. Efectos sobre la Biodisponibilidad	51
1.5.3.1. Efecto sobre la Disgregación.....	53
1.5.3.2. Efecto sobre la Solubilidad.....	56
1.5.3.3. Efecto sobre la Permeabilidad	59
1.6. Modelos Experimentales para Estudiar la Disgregación	65
1.6.1. Modelo de Disgregación USP	75
1.6.2. Modelo de Disgregación Modificado	77
1.7. Modelos Experimentales para Estudiar el Proceso de Disolución	81
1.7.1. Métodos <i>in vitro</i> de la USP.....	86
1.7.2. Modelos <i>in vitro</i> Simulando el Tracto Gastrointestinal.....	88
1.7.2.1. Modelos Estáticos Monocompartimentales	92
1.7.2.2. Modelos Monocompartimentales Dinámicos.....	93
1.7.2.3. Modelos Dinámicos Bi y Multicompartimentales.....	118
1.7.3. Modelos <i>in silico</i>	140
1.7.4. Limitaciones y Desafíos	141

1.7.5.	Correlación <i>In vitro-In vivo</i>	144
1.8.	Modelos Experimentales para Determinar la Permeabilidad Intestinal.....	149
1.8.1.	<i>In silico</i>	149
1.8.2.	<i>In vitro</i>	150
1.8.3.	<i>In situ</i>	155
1.8.4.	<i>In vivo</i>	157
1.8.5.	Determinación de la Permeabilidad en Humanos.....	158
2.	 Materiales y métodos.....	161
2.1.	Compuestos	163
2.2.	Pruebas de Disgregación.	171
2.2.1.	El Aparato de Disgregación Convencional de la USP.....	171
2.2.2.	Aparato de Disgregación Modificado.....	171
2.3.	Ensayos de Disolución.....	173
2.3.1.	Aparato USP II.	173
2.3.2.	Aparato USP IV	176
2.4.	Comparación Matemática de Perfiles de Disolución.....	177
2.5.	Correlación <i>In Vitro-in Vivo</i>	179
2.6.	Ensayos de Permeabilidad <i>In situ</i>	181
2.6.1.	Animales	181
2.6.2.	Método Doluisio	181
2.7.	Caracterización Reológica.....	187
2.8.	Análisis de las Muestras	189
2.9.	Análisis Estadístico	191
2.	 Materials and methods.	193
2.1.	Compounds.....	195
2.2.	USP Disgregation Test.....	201
2.2.1.	The Conventional Disintegration Test in the USP Device.	201
2.2.2.	Modified Disintegration Apparatus	201
2.3.	Dissolution Assays.	203
2.3.1.	USP II Apparatus.....	203
2.3.2.	USP IV Apparatus	205
2.4.	Mathematical Comparison of Dissolution Profiles.....	207
2.5.	<i>In Vitro-in Vivo Correlation</i>	209
2.6.	<i>In situ</i> Permeability Test.....	211
2.6.1.	Animals.....	211
2.6.2.	Doluisio Method	211
2.7.	Rheological characterization	217

2.8. Sample Analysis	219
2.9. Statistical Analysis	221
3. Objetivos.....	223
3. Objectives.	227
4. Resultados y Discusión.....	231
4.1. Desarrollar métodos <i>in vitro</i> para detectar inequivalencia <i>in vivo</i> basándonos en el BCS.....	233
4.2. Evaluar un método <i>in situ</i> para la determinación del efecto de excipientes sobre la permeabilidad intestinal de fármacos	251
4.3. Determinar el efecto de excipientes específicos en la permeabilidad	259
4.4. Pacientes pediátricos: Efecto de la leche en el proceso de disolución y absorción	263
4.5. Pacientes Geriátricos: Disfagia y Espesantes	271
5. Conclusiones.....	283
5. Conclusions.....	287
6. Bibliografía.....	291
7. Anexo	357
Comparison of segmental-dependent permeability in human and in situ perfusion model in rat	361
Determination of intestinal permeability using in situ perfusion model in rats: Challenges and advantages to BCS classification applied to digoxin	379
In Vitro Dissolution as a Tool for Formulation Selection: Telmisartan Two-Step IVIVC.....	415



Abreviaturas y Acrónimos.

Δt	Tiempo de Disgregación del comprimido
$^{\circ} C$	Grados Centígrados
ABC	ATP-binding cassette (ABC) transporter
AIC	Criterio de Akaike
An	Número de absorción
API	Ingrediente Farmacéutico Activo
ATP	Adenosín Trifosfato
AUC	Area Bajo la Curva
BCRP	Breast Cancer Resistant Protein
BCS	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
BCSE	Bases de la Clasificación biofarmacéutica de excipientes
BE	Bioequivalente
CCS	Carboximetilcelulosa Sódica Reticulada
CHMP	Comité de Medicamentos de Uso Humano
C_{max}	Concentración Máxima
Cs	Solubilidad
Css	Concentración Inicial para los Estudios de Sobresaturación
DE	Desviación Estándar
DGM	El modelo gástrico dinámico
DMSO	Dimetilsulfoxido
Dn	Número de Disolución
Do	Dosis
Do	Número de dosis
dt dinámica	Tiempo de Disgregación Dinámica
dt estático	Tiempos de Disgregación Estática
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EMA	Agencia Europea del Medicamento
f1	Factor de Diferencia
f2	Factor de Similitud

Fa o F_{abs}	La fracción oral absorbida
FaSSGF.....	Fluido Gástrico Simulado en Estado de Ayuno
FaSSIF.....	Fluido Intestinal Simulado en Estado de Ayuno
FDA.....	Food and Drug Administration
FeSSIF.....	Fluido Intestinal Simulado en Estado Alimentado
GI.....	Gastrointestinal
GIS.....	Gastrointestinal Simulator
GIT.....	Tracto Gastrointestinal
HGS.....	simulador gástrico humano
HPLC.....	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HPMC.....	Hidroxipropilmetilcelulosa
HPMCAS.....	Acetato de hipromelosa succinato
HR.....	Humedad Relativa
i.o.	Imagen Original
IVIVC.....	Correlación <i>in vitro-in vivo</i>
K w/o.....	Coefficiente de partición agua/lípido
LADME.....	Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción
LSS.....	Lauril Sulfato Sódico
MINDISS.....	Disolución Intrínseca Miniaturizada
MRP.....	Proteína MRP
N-BE.....	No Bioequivalente
OMS.....	Organización Mundial de la Salud
PAMPA.....	Permeabilidad de la Membrana Artificial Paralela
PBMCs.....	Células Mononucleares de Sangre Periférica
PBPK.....	Farmacocinética de Base Fisiológica
Peff.....	Coefficiente de Permeabilidad
PEG.....	Polietilenglicol
P-gp	Glicoproteína-P
PhEur.....	Farmacopea Europea
PK.....	Farmacocinético
PVP.....	Polivinilpirrolidona
QbD.....	Calidad por Diseño

QSAR.....	Relación Cuantitativa Estructura-Actividad
RAE.....	Real Academia de la lengua Española
Rc.....	Radio capilar
Rh.....	Radio hidrodinámico
SEDDS/SMEDDS ..	Sistemas Administración de Fármacos Autoemulsionantes/Microemulsificantes
SGF.....	Fluido Gástrico Simulado
SHIME.....	Simulador de Ecosistema Microbiano Intestinal Humano
Sistema AML.....	Sistema de Inserción de Membrana Artificial
SSD.....	Simulación de Duodeno Estomacal
SSG.....	Glicolato de Almidón Sódico
SSPM.....	Método Estandarizado de Sobresaturación y Precipitación a pequeña escala
SSR.....	Suma de cuadrados residuales
Tab _s	tiempo de absorción
T _{diss}	tiempo de disolución
TEA.....	Estómago Artificial Duodenal
T _g	temperatura de transición vítrea
THz-TDS.....	Terahertz time-domain spectroscopy
TIM-1	Modelo gastrointestinal TNO 1
TPGS.....	d-alfa tocoferil polietilenglicol 1000 succinato
T _{res}	tiempo de residencia
UPLC.....	Cromatografía Líquida Ultra Rendimiento
USP.....	Farmacopea de los Estados Unidos
UV.....	Ultravioleta
v.....	velocidad lineal del fluido
γ.....	tensión superficial
Δβ.....	distribución del tamaño de los poros
η o μ.....	viscosidad
θ.....	ángulo de contacto
ρ.....	densidad
τ.....	tortuosidad

Resumen



Todas las formas de dosificación comercializadas hoy en día son sistemas complejos que contienen diversos componentes junto con el API. Estos compuestos denominados “Excipientes” se agregan junto con los ingredientes farmacéuticos activos para cumplir alguna función específica que facilite el procesado, transporte, manufactura o incluso que ayude a mejorar la seguridad de la formulación. Los excipientes de acuerdo con el consejo internacional de excipientes farmacéuticos se definen como "cualquier sustancia distinta del fármaco activo o profármaco que se incluye en el proceso de fabricación o está contenida en formas farmacéuticas terminadas" (1).

Según la Real Academia de la lengua Española (RAE) se puede definir excipiente como: Sustancia inerte que se mezcla con los medicamentos para darles consistencia, forma, sabor u otras cualidades que faciliten su dosificación y uso. Esta definición representa la forma tradicional en la que se entienden los excipientes, pero hoy en día se está comprobando que la mayoría de excipientes no pueden clasificarse como “inertes”. En los últimos años y gracias a la proliferación de los medicamentos genéricos, se han referenciado multitud de casos en los que la biodisponibilidad de fármacos se ve afectada de alguna manera por los excipientes.

Por ello este proyecto aborda un estudio de evaluación de la influencia de excipientes farmacéuticos de uso habitual, en los procesos de permeación, disgregación y disolución y su repercusión clínica en la biodisponibilidad del fármaco, lo que permitirá establecer un listado seguro de excipientes inertes y un listado de excipientes con actividad “biofarmacéutica”. Según la normativa vigente los fármacos clasificados como clase I y III según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, que contengan excipientes que comprometan la permeabilidad o alteren el tránsito intestinal no pueden optar a la bioexención o requieren cambios en su formulación para utilizar esta vía. Por otra parte, la selección adecuada de excipientes con propiedades biofarmacéuticas mejoradas y/o

bien caracterizadas puede ayudar a mejorar la biodisponibilidad de fármacos clase II y IV y a la evaluación de sus formulaciones *in vitro* y también puede ayudar a seleccionar excipientes que no incrementen el riesgo de no equivalencia en la fase de desarrollo de formulaciones genéricas.

Estas herramientas supondrán un beneficio directo a la industria farmacéutica que dispondrá de métodos de evaluación durante su desarrollo y de análisis de riesgos previos a la demostración *in vivo* de la bioequivalencia. El ahorro en tiempo y dinero asociado a menor número de fallos en fases clínicas y mejor diseño de formulaciones repercute asimismo en que el paciente pueda disponer con mayor rapidez de medicamentos seguros, eficaces y más económicos (ya sean innovadores o genéricos).



Abstract



All dosage forms formulated today are complex systems that contain many other components together with the API. These compounds called “Excipients” are mixed with the active pharmaceutical ingredients to do a specific function that facilitates processing, transportation, manufacturing or even helping to improve the safety of the formulation. Excipients and according to the International Pharmaceutical Excipients Council are defined as "any substance other than the active drug or prodrug that is included in the manufacturing process or is contained in finished pharmaceutical forms" (1).

According to the Royal Academy of the Spanish Language (RAE), the excipient can be defined as: Inert substance that is mixed with medications to give them consistency, form, taste or other qualities that facilitate their dosage and use. This definition represents the traditional way in which excipients are understood, but today it is being proven that most excipients cannot be classified as “inert”. Recently, thanks to the proliferation of generic drugs, there have been referenced many cases in which the bioavailability of drugs is affected in some way by the excipients.

Therefore, this project aims to evaluate the influence of pharmaceutical excipients commonly used in the processes of disintegration, dissolution and permeation, and their clinical impact on the bioavailability of the drug, which will allow establishing a safe list of inert excipients and a list of excipients with "biopharmaceutical" activity. Nowadays, according with the current regulatory guidances drugs classified as class I and III according to the Biopharmaceutical Classification System, which contain excipients that compromise permeability or intestinal transit may not qualify for *biowaivers* or require changes in their formulation. On the other hand, proper selection of excipients with improved or well characterized biopharmaceutical properties can help to improve the bioavailability of class II and IV drugs and to the evaluation of their *in vitro* formulations

as well as reducing the risk of non equivalence during the development of generic formulations.

These tools will have a direct benefit to the pharmaceutical industry that will have evaluation and risk analysis methods during their development prior to the *in vivo* demonstration of bioequivalence. The savings in time and money associated with fewer failures in clinical phases and better design of formulations also have an impact on the patient being able to have safe, effective and cheaper medicines (whether innovative or generic).



1.Introducción.





1.1.LADME

La biofarmacia estudia la influencia de la formulación y la técnica de elaboración de un medicamento sobre su actividad terapéutica. Se consideran los efectos de la forma de dosificación sobre la respuesta biológica y los factores que pueden afectar al principio activo y a la forma farmacéutica que lo incluye. La farmacocinética explica la permanencia del fármaco en el organismo cuantificando todos los procesos cinéticos durante el tránsito de la sustancia activa.

El interés básico del estudio de estas materias se basa en determinar la dosis más adecuada y el intervalo de administración en formas farmacéuticas de biodisponibilidad óptima y en predecir y calcular la concentración de los fármacos en diferentes órganos, con el fin de instaurar un régimen terapéutico óptimo.

El conjunto de procesos que caracterizan la evolución temporal de un medicamento, tras ser administrado a un organismo, en determinadas condiciones y bajo una vía de administración específica, se denomina LADME (siglas de Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) (2).

- Liberación: Constituye la “salida” del fármaco de la forma farmacéutica que lo transporta. Por lo general implica la disgregación y disolución del fármaco en algún medio corporal. Los factores que influyen en la velocidad de liberación son:
 - Tamaño de partícula del fármaco
 - Solubilidad del fármaco
 - Formulación del medicamento
 - Técnica de elaboración

Introducción

- Tipo de forma farmacéutica utilizada
- Absorción: Es la verdadera entrada del fármaco en el organismo. Si un medicamento se administra directamente en un vaso sanguíneo, no se producen ni liberación ni absorción. Implica el paso de las moléculas del fármaco a través de una o más membranas biológicas, antes de llegar a la circulación sistémica. El paso de los fármacos a través de estas membranas puede efectuarse siguiendo diferentes vías:
 - Difusión pasiva
 - Ruta transcelular
 - Ruta paracelular
 - Mecanismos especializados de transporte:
 - Difusión facilitada
 - Transporte activo
- Distribución: Después de acceder a la circulación general, el fármaco se reparte por todo el organismo transportado por la sangre. Su comportamiento siempre es el mismo, con independencia de la vía por la que se administre. Una vez en el espacio vascular, los fármacos pueden unirse a proteínas plasmáticas en un determinado porcentaje o penetrar en eritrocitos u otras células sanguíneas. La unión de los fármacos con las proteínas plasmáticas se efectúa a través de enlaces reversibles, encontrándose en equilibrio la fracción libre y la unión a proteínas. Las proteínas mayoritarias que intervienen son: albumina, alfa-1 glicoproteína ácida, globulinas y lipoproteínas.

- **Metabolismo:** El metabolismo, también llamado biotransformación, es el proceso por el que se produce una modificación en la estructura química del fármaco debido a la actuación de los sistemas enzimáticos del organismo. Como consecuencia de ello, se obtienen productos de transformación, metabolitos, por regla general más hidrosolubles y menos activos que los productos originales de partida. Las reacciones de biotransformación se clasifican en cuatro grupos: reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis y conjugación. La mayoría de los fármacos son metabolizados por el hígado, pero los riñones, tracto gastrointestinal, pulmones y muchos otros tejidos poseen enzimas susceptibles de participar en el metabolismo de ciertos fármacos.
- **Excreción:** El proceso por el que se elimina el fármaco sin sufrir modificaciones. Inicialmente, se puede afirmar que todas las vías de eliminación de líquidos del organismo pueden ser válidas para producir la excreción de los fármacos. Así, se podrían citar la orina, saliva, bilis, sudor y leche materna; los fármacos que sean volátiles también pueden excretarse por vía pulmonar. De todas las posibilidades, la más usual es la excreción renal.

Por lo tanto, el posible efecto de los excipientes sobre estos procesos solo se dará en los pasos previos al acceso del fármaco a circulación sistémica, es decir, sobre la liberación y la absorción.



1.2. Aparato Digestivo

El aparato digestivo es un conjunto de órganos que tienen como misión fundamental la digestión y absorción de nutrientes. Para lograrlo, es necesario que se sucedan una serie de fenómenos a lo largo de las diferentes partes que lo constituyen. Debemos distinguir entre el tubo digestivo en sí mismo y las llamadas glándulas anejas.

El tubo digestivo está formado por la boca, la faringe, el esófago, el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso o colon. En cada una de estas partes del tubo digestivo tienen lugar los diversos eventos que permitirán la digestión y la absorción de los alimentos y fármacos (3).

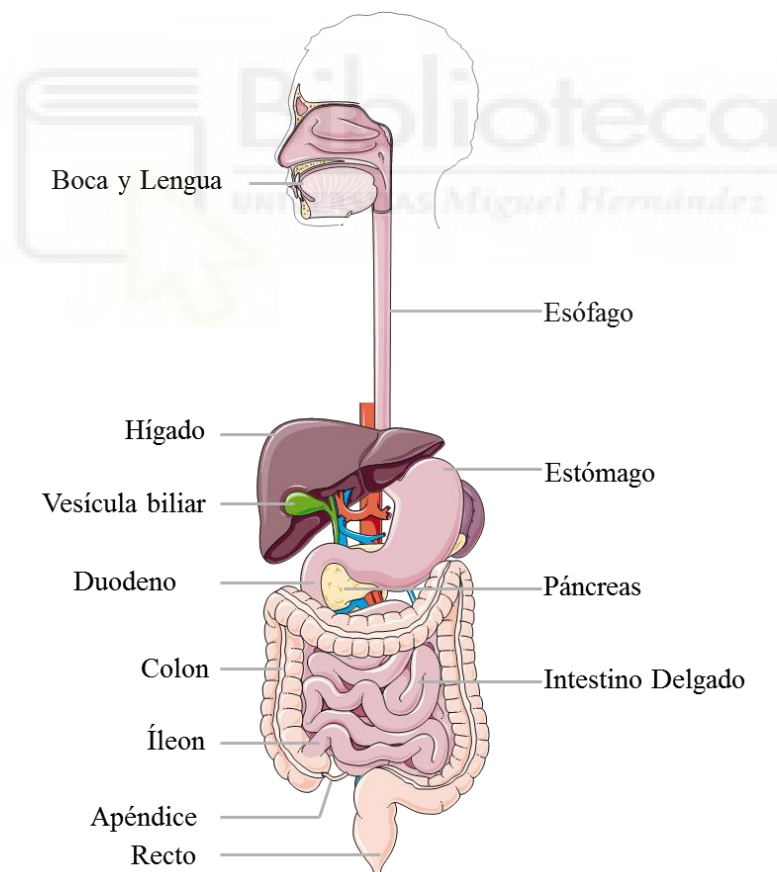


Figura 1. Esquema del aparato digestivo. Imagen adaptada de Servier Medical ART

(4).

Introducción

1.2.1. Digestión

La digestión humana es un proceso complejo esencial para la salud en donde la comida ingerida se descompone en nutrientes que pueden ser utilizados por el cuerpo para el crecimiento, el mantenimiento de las células o para ser utilizado como combustible. Durante la digestión humana, dos procesos principales ocurren simultáneamente:

- Transformaciones mecánicas que reducen el tamaño de las partículas de alimentos;
- Transformaciones enzimáticas donde las macromoléculas se hidrolizan en constituyentes más pequeños que se absorben en el torrente sanguíneo.

Disgregación de los alimentos ocurre principalmente en la boca y el estómago, mientras que la digestión enzimática y la absorción de nutrientes y agua tienen lugar principalmente en el intestino delgado y grueso. El sistema digestivo es fundamental para numerosas preguntas planteadas por investigadores e industriales en diversos campos, como nutrición, toxicología, farmacología y microbiología (5–7). Desafortunadamente, estudiar el complejo proceso de múltiples etapas de la digestión humana es técnicamente difícil, costoso y está limitado por restricciones éticas cuando están implicadas sustancias potencialmente dañinas (como xenobióticos o microorganismos patógenos). En consecuencia, existe una necesidad real de modelos *in vitro* que imiten de cerca los procesos fisiológicos que ocurren durante la digestión humana. Estos modelos deben ser flexibles, precisos y reproducibles.

La digestión comienza con la masticación de alimentos en la boca (Figura 2). La masticación es un paso corto pero importante con una influencia significativa en el proceso digestivo general y en particular en la tasa de vaciamiento gástrico (8). El bolo

alimenticio resultante de las degradaciones mecánicas y enzimáticas en la boca se transporta a través del esófago hasta el estómago por el mecanismo de la peristalsis.

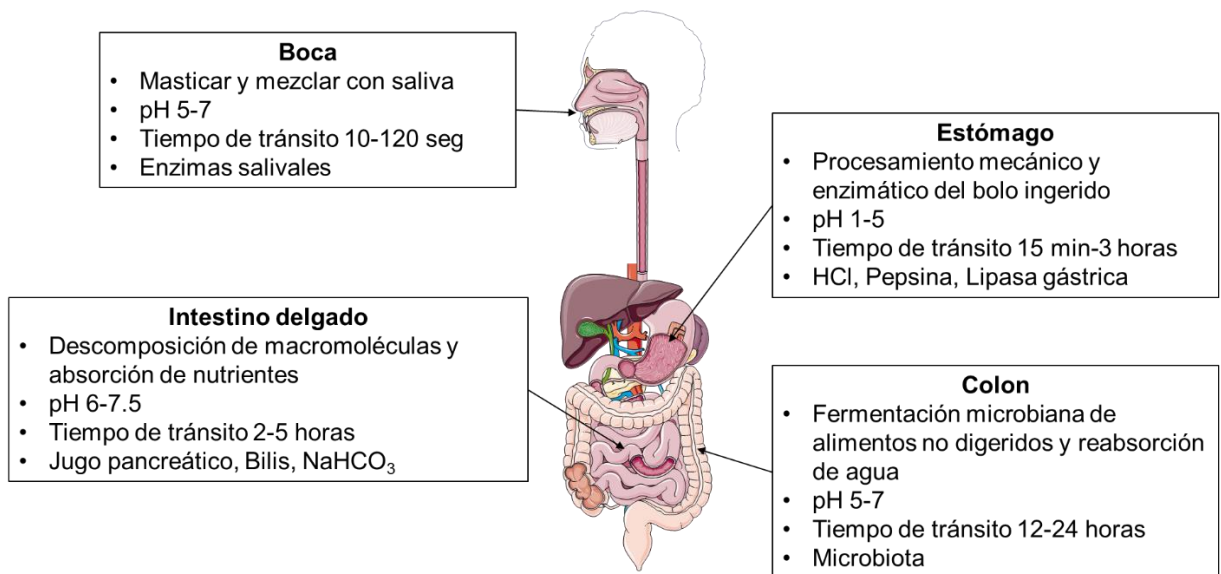


Figura 2. Esquema de los puntos de interés en la digestión (9). Imagen adaptada de

Servier Medical ART (4).

La digestión gástrica es un paso dinámico regionalizado (10). En la parte proximal del estómago, el fondo y el cuerpo actúan como un reservorio para la comida e inician el contacto entre el bolo y el jugo gástrico. Este último está compuesto principalmente por enzimas de pepsina y lipasa responsables de la digestión de proteínas y lípidos, ácido clorhídrico (HCl) que conduce a una caída regular del pH gástrico (aproximadamente de pH 6-5 a 1.5), promoviendo la hidrólisis de proteínas y moco que protege las superficies mucosas. En la parte distal, las ondas peristálticas en el antro ayudan a descomponer las partículas grandes al moler y mezclar el contenido gástrico. El estómago termina en el píloro, que actúa como un tamiz y una bomba para el vaciado selectivo de pequeñas partículas (quimo) al duodeno, mientras que las más grandes se mantienen en el estómago, por un mecanismo de retropulsión, para degradarse aún más. El vaciamiento gástrico es

Introducción

un parámetro crucial de la digestión influenciado por muchos factores, como la composición o estructura de los alimentos y los factores biológicos (11–13).

El quimo ácido del estómago pasa al intestino delgado. Este compartimento está dividido en tres partes: una sección corta que recibe secreciones digestivas del páncreas y el hígado, el duodeno y dos más largas, el yeyuno y el íleon (10). La morfología del intestino delgado está altamente adaptada a sus dos funciones principales en la digestión, es decir, la descomposición de las macromoléculas y la absorción de agua y nutrientes. Después de ingresar al duodeno, el quimo ácido se neutraliza con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) para dar un pH apropiado para las actividades enzimáticas. Las enzimas pancreáticas (una mezcla compleja de proteasas, amilasas y lipasas) y otras enzimas digestivas producidas por la pared interna del intestino delgado actúan juntas en la descomposición de los constituyentes de los alimentos. La bilis (producida por el hígado) desempeña un papel específico en la digestión de lípidos al emulsionar las grasas de la dieta en pequeñas gotas que promueven la actividad de la lipasa pancreática. La mayoría de las sales biliares se reabsorben activamente en el íleon y se reutilizan en la bilis a través del ciclo enterohepático. La compleja topología del revestimiento interno del intestino delgado le confiere una gran superficie de absorción. El agua y los nutrientes son absorbidos por los enterocitos vellosos mediante difusión simple, difusión facilitada o transporte activo. Esto evita la acumulación de productos de la digestión en la luz del intestino delgado, lo que podría inhibir las actividades de las enzimas.

La digestión mecánica incluye movimientos de segmentación, que permiten que el quimo se mezcle con las enzimas digestivas, y la actividad de peristalsis, que impulsa el bolo a través del intestino delgado (10). Las pequeñas regiones intestinales albergan distintas poblaciones microbianas que pueden desempeñar un papel en la salud humana y las enfermedades. Nuestro conocimiento sobre la microbiota ileal ha aumentado

considerablemente durante la última década con el surgimiento de tecnologías de alto rendimiento (14,15).

El material no absorbido viaja hacia el intestino grueso. Las funciones principales del colon son la absorción de agua y electrolitos, la fermentación de polisacáridos y proteínas por microbiota colónica, la reabsorción de sales biliares y la formación, almacenamiento y eliminación de heces.

Los principales procesos digestivos, como el vaciamiento gástrico, el tránsito intestinal, la secreción de fluidos digestivos y el moco, y la motilidad están estrechamente controlados por los mecanismos de regulación hormonal (16) y neural (17). Las hormonas digestivas pueden aumentar o inhibir la actividad secretora de los órganos glandulares y las contracciones de los músculos lisos. Tanto el sistema nervioso autónomo como el entérico están involucrados en la regulación de los procesos de digestión. Aproximadamente el 70% de las células inmunitarias residen en el tracto digestivo, desempeñando un papel importante en el sistema inmunitario (defensa de la mucosa) (18).

Al hablar específicamente de fármacos, la absorción oral de los mismos es un proceso complejo que puede verse afectado por una serie de parámetros relacionados con el fármaco, la formulación y la fisiología subyacente del tracto gastrointestinal. El tamaño molecular, el grado de ionización, la disolución, la precipitación, los tiempos de tránsito gastrointestinal, la viscosidad luminal, el pH, la sal biliar y las concentraciones de fosfolípidos, la permeación celular y el transporte y el metabolismo de los medicamentos intestinales son algunos ejemplos de los factores que pueden afectar la absorción de un medicamento. y, por tanto, su biodisponibilidad.

Introducción

1.2.2. Estómago

El estómago es una dilatación en forma de J del tubo digestivo, que se comunica con el esófago a través del cardias, y con el duodeno a través del píloro. Ambos, cardias y píloro, funcionan como una válvula que regula el paso del alimento. El estómago funciona, principalmente, como un reservorio para almacenar grandes cantidades de comida recién ingerida, permitiendo así ingestiones intermitentes. El paso del contenido gástrico al duodeno, que tiene una capacidad volumétrica muy inferior, se produce de forma controlada por el efecto del píloro.

En el estómago se encuentran diferentes tipos de células que participan en la secreción del jugo gástrico. El jugo gástrico contiene ácido clorhídrico y pepsina, responsables de la digestión gástrica del bolo alimenticio. Además, el estómago facilita la trituración de los alimentos y su mezcla con el jugo gástrico, debido a los movimientos de contracción de sus paredes. Posteriormente, se produce el vaciamiento hacia el duodeno.

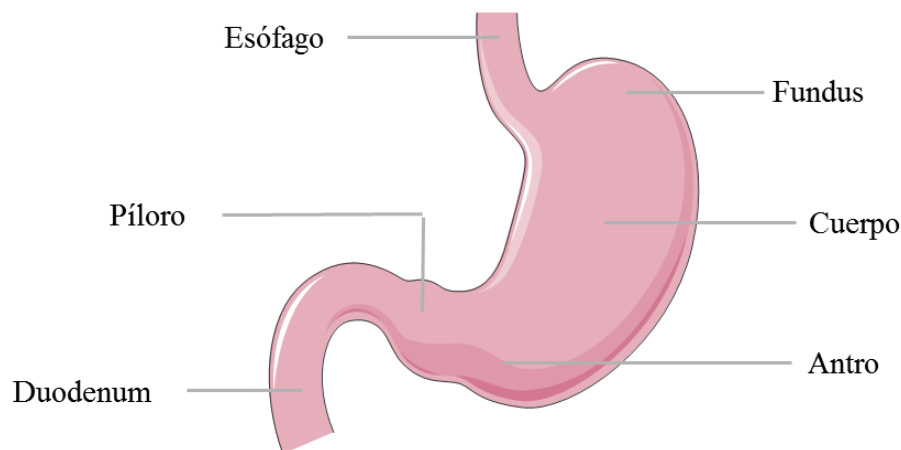


Figura 3. Esquema de las diferentes partes del Estómago. Imagen adaptada de Servier

Medical ART (4).

La primera porción del estómago recibe el nombre de cardias, y conecta directamente con la desembocadura del esófago, es la parte encargada de impedir el reflujo del contenido gástrico.

El fundus es la parte superior del estómago, está pegada al diafragma y en su membrana mucosa se expresa gran parte de las glándulas secretoras de ácido.

El cuerpo es la porción central y de mayor tamaño del estómago y la parte responsable de la peristalsis gástrica.

La parte baja del estómago se denomina antro y es la parte más expuesta a la acidez por lo que la capa de mucosa protectora es mayor en esta área.

El píloro es la parte del estómago que conecta con el intestino delgado y es por tanto la parte que haciendo uso del ensanchamiento de las fibras musculares se encarga de controlar el vaciamiento gástrico (19).

1.2.3. Intestino Delgado

El intestino delgado es el órgano especializado en el proceso de absorción de nutrientes fármacos y xenobióticos. Es un tubo que se sitúa justo después del estómago y que está dividido en tres partes diferenciadas, duodeno, yeyuno e íleon.

Introducción

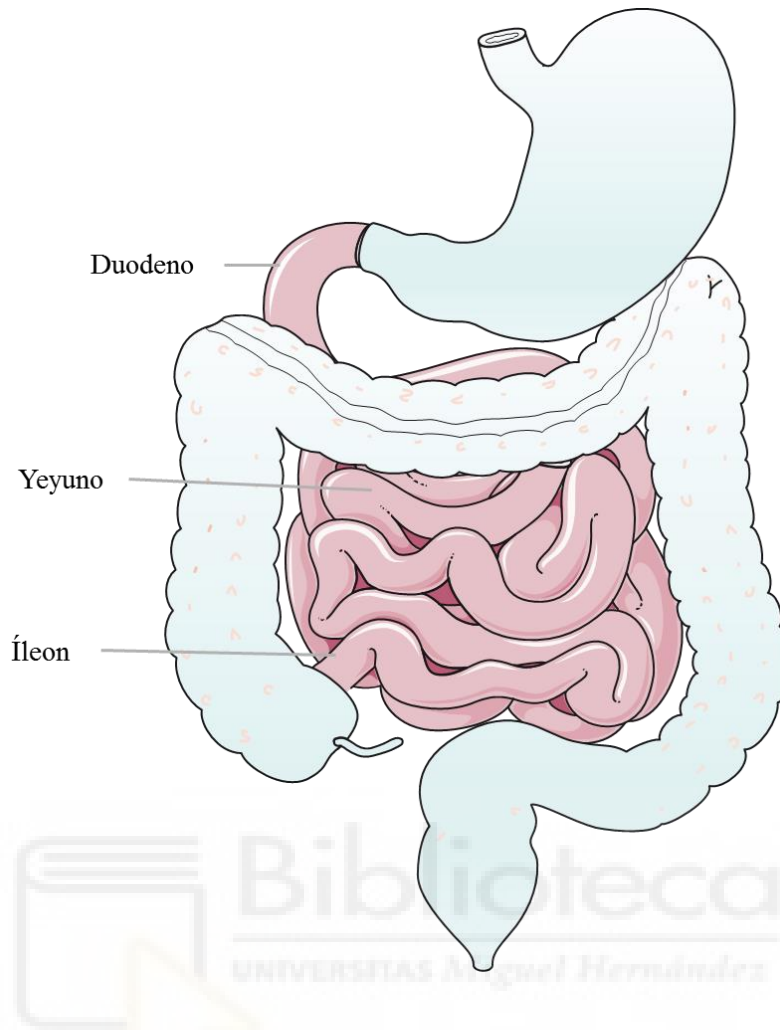


Figura 4. Esquema Intestino Delgado (9). Imagen adaptada de Servier Medical ART (4).

La mucosa y la submucosa del intestino delgado están dispuestas en forma de pliegues circulares que se extienden sobre toda su superficie interna y se proyectan a la luz intestinal. Son más pronunciadas en el duodeno y el yeyuno en donde sobresalen hasta 8 mm en la luz o hueco del tubo. Estos pliegues circulares, a su vez, están cubiertos totalmente de minúsculas proyecciones de la mucosa, en forma de dedo, con una longitud de 0.5 a 1 mm, llamadas vellosidades intestinales o villi. La superficie de estos villi está formada por un epitelio columnar simple con las células unidas fuertemente entre sí, cada una de las cuales presenta en su superficie apical un borde en cepillo formado por unas 600 prolongaciones citoplasmáticas de aproximadamente 1 micra de largo, llamadas microvellosidades.

Tracto Gastrointestinal

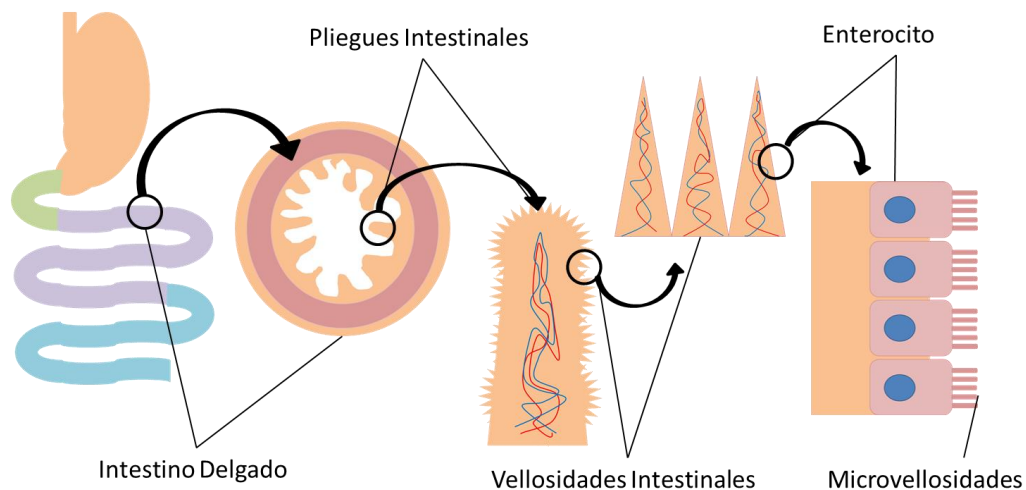


Figura 5. Esquema de las modificaciones morfológicas del intestino ^{i.o.}.

Las vellosidades o villi tienen un aspecto diferente en las distintas partes del intestino delgado. Son anchas en el duodeno, más delgadas en el yeyuno y más cortas en el íleon. En el interior de cada vellosidad se encuentra un capilar linfático o quilífero, músculo liso que le permite modificar su longitud, tejido conjuntivo y una red capilar. Esta disposición es ventajosa para la absorción de líquidos y sustancias disueltas hacia la sangre de la vena porta, así como hacia el sistema linfático.

Entre una vellosidad y otra, en la parte basal, se sitúan glándulas tubulares simples llamadas criptas de Lieberkühn cuya secreción líquida recubre a las vellosidades, proporcionando un medio acuoso para la absorción de sustancias desde el quimo cuando entra en contacto con las vellosidades. Además de las criptas, en el duodeno existen las glándulas de Brunner que segregan un líquido alcalino rico en mucina para proteger la mucosa duodenal.

Introducción

En las paredes del yeyuno-íleon se encuentran acumulaciones de tejido linfoide llamadas placas de Peyer que forman parte de la colección de tejido linfoide asociado a mucosa que se encuentra a nivel de los tubos digestivo y respiratorio.

La combinación de las válvulas conniventes más las vellosidades más las microvellosidades aumenta unas 600 veces el área de absorción de la mucosa intestinal originando una extraordinaria superficie total de unos 250 metros cuadrados para todo el intestino delgado.

En los seres humanos el epitelio del intestino delgado se renueva en un plazo de una semana, aproximadamente. Las células epiteliales se forman por proliferación de células madre indiferenciadas situadas en el interior de las criptas, que migran hacia el extremo distal de la vellosidad desde donde se desprenden a la luz intestinal y son expulsadas al exterior. A medida que las células migran y abandonan las criptas, maduran y desarrollan el borde en cepillo. La inanición prolongada puede provocar atrofia de estas células y reducción de su proliferación y recambio (20).

1.2.4. Intestino Grueso

En el intestino grueso en humanos se pueden diferenciar cuatro partes: colon ascendente, colon transverso, colon descendente y colon sigmoide (Figura 6). El colon es más corto (aproximadamente 1,5 metros) y su lumen es más amplio que el del intestino delgado (21,22).

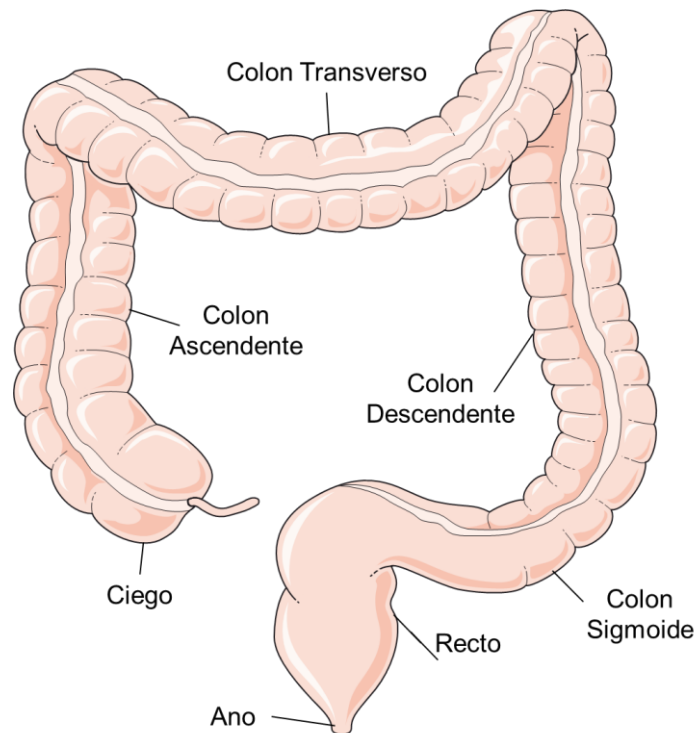


Figura 6. Esquema del Intestino Grueso. Imagen adaptada de Servier Medical ART (4).

A diferencia del intestino delgado, la mucosa del colon está formada por una superficie plana de epitelio que presenta criptas invaginadas. La característica más destacable es la ausencia de villi. La composición celular es similar a la del intestino delgado, aunque con mayor proporción de células caliciformes (secretoras de moco); además, las células absorbentes del colon o colonocitos, al igual que los enterocitos del intestino delgado, también poseen microvellosidades. El colon está especializado en mantener el balance de electrolitos y agua, es el principal responsable de la absorción de Na^+ , Cl^- y H_2O , y de la secreción de HCO_3^- y K^+ (23).

La capacidad de absorción del colon de los distintos compuestos y nutrientes es marcadamente reducida en comparación con la del intestino delgado. La diferencia más importante es la falta de villi en el colon. Por todo ello, los compuestos se absorben principalmente durante su paso a través del intestino delgado, con lo que el colon juega un papel secundario en la absorción sistémica.

Introducción

1.2.5. Poblaciones Especiales:

El sistema gastrointestinal puede sufrir alteraciones a lo largo de la vida del ser humano. Es de especial relevancia las características del sistema tanto en neonatos como en pacientes geriátricos.

- Pacientes pediátricos/neonatos:

El momento del nacimiento implica en el individuo un cambio profundo y rápido. Pasa de un medio "acuático" dentro del útero, donde muchas de las funciones orgánicas del feto como respiración, provisión de nutrientes, metabolismo, excreción y defensas contra la infección son realizadas en gran medida por la placenta y la madre, a otro medio aéreo en el que se independiza.

Este cambio obliga a una serie de cambios en el funcionamiento de órganos y sistemas. Desde el punto de vista nutricional, el nacimiento representa el paso de una forma continua y regulada de sustratos nutricionales, a la alimentación enteral, fraccionada e intermitente.

El sistema digestivo debe adaptarse a este cambio que implica en el recién nacido una respuesta conjunta del tracto gastrointestinal. Comprende, succión y deglución adecuadas, vaciamiento gástrico y motilidad intestinal eficaces; regulación de la secreción salivar, gástrica, pancreática y hepatobiliar, y capacidad de sintetizar y liberar enzimas para conseguir una efectiva secreción, absorción y protección de la mucosa intestinal. Es preciso, además, el desarrollo de la función inmunitaria del intestino. El tracto gastrointestinal constituye la puerta de entrada de muchos antígenos potenciales, y por ello la función inmunológica de su mucosa es esencial para controlar las respuestas frente a las infecciones (24).

Otra característica de los primeros meses es la menor longitud del intestino delgado y un tránsito intestinal más rápido en el recién nacido que en el adulto, de unas 8h, que evoluciona a 15-18h en etapas posteriores de la vida (25).

Al nacer el lactante tiene bien desarrollado el reflejo de succión-deglución. No existe masticación: hasta los 5 meses de vida no se inician los movimientos de mascar y no aparece la masticación verdadera hasta los 7-9 meses. En el recién nacido, los sólidos son rechazados por movimientos de extrusión de la lengua, por lo que los fármacos se administraran en forma de jarabe o suspensión.

Las primeras deposiciones en los 3 o 4 primeros días están constituidas por el meconio y debe producirse en las primeras 24-48 horas de vida, sino aparecen se deberá sospechar algún problema orgánico. Una vez eliminado el meconio, las heces del niño con lactancia materna tienen un color amarillo, son de consistencia blanda-líquida y despiden un olor aromático no desagradable. Pueden ser emitidas al mismo tiempo que toma el pecho o cada 4-5 días. Con lactancia artificial, las heces son de color algo más pálido, de consistencia más dura y de olor más fétido, con una frecuencia de una a dos cada día (24).

- **Pacientes Geriátricos:**

Dado que el aparato digestivo dispone de sus propias reservas, el envejecimiento ejerce sobre su funcionamiento un efecto menor del que ejerce sobre otros sistemas orgánicos. Sin embargo, el envejecimiento es un factor asociado a varios trastornos digestivos. En especial, las personas de edad avanzada tienen mayor probabilidad de desarrollar diverticulosis y de sufrir trastornos del aparato digestivo como efecto secundario producido por determinados medicamentos (26).

Introducción

Los pacientes geriátricos podrían sufrir disfagia. La disfagia se refiere a la dificultad que una persona puede tener con las fases iniciales de una deglución (generalmente descrita como "disfagia orofaríngea") o a la sensación de que los alimentos y / o líquidos están siendo obstruidos de alguna manera en su paso de la boca al estómago (generalmente descrito como "disfagia esofágica"). La disfagia es, por lo tanto, la percepción de que existe un impedimento para el paso normal del material ingerido. En pacientes con esta patología se suelen administrar medicamentos en forma de comprimidos o comprimidos triturados con espesante (27).

Con la edad, la fuerza de las contracciones esofágicas y la tensión en el esfínter esofágico superior van disminuyendo progresivamente, pero los movimientos de los alimentos a través del conducto esofágico no se ven afectados por estos cambios. Sin embargo, muchas personas de edad avanzada pueden estar afectadas por enfermedades que afectan a las contracciones esofágicas.

Con el envejecimiento, disminuye la capacidad del revestimiento gástrico para resistir las agresiones, lo que se puede traducir en un incremento del riesgo de úlcera gastroduodenal, especialmente en personas que toman Aspirina y otros antiinflamatorios no esteroideos. También con la edad, el estómago no puede contener tanta comida (debido a la pérdida de elasticidad) y disminuye la velocidad de vaciamiento del estómago al intestino delgado. Sin embargo, estos cambios generalmente no causan ningún síntoma perceptible. El envejecimiento tiene poco efecto sobre la secreción de jugos gástricos como el ácido y la pepsina, pero algunos trastornos que disminuyen la secreción de ácido, como la gastritis atrófica, se hacen más frecuentes.

El envejecimiento solo tiene efectos menores en la estructura del intestino delgado, de manera que el movimiento del contenido intestinal por el intestino y la

absorción de la mayoría de los nutrientes no cambian mucho. Sin embargo, los niveles de lactasa disminuyen, ocasionando intolerancia a los productos lácteos en muchos adultos de edad avanzada. El crecimiento excesivo de algunas bacterias se hace más frecuente con la edad y puede producir dolor, hinchazón y pérdida de peso. La proliferación bacteriana puede también conducir a un descenso en la absorción de ciertos nutrientes, como la vitamina B12, el hierro y el calcio.

El intestino grueso no sufre muchos cambios con la edad. El recto se agranda un poco. El estreñimiento se hace más frecuente, como consecuencia de muchos factores (26):

- Un ligero enlentecimiento del movimiento de los contenidos a través del intestino grueso
- Una ligera disminución de las contracciones del recto cuando se llena de heces.
- Uso más frecuente de fármacos que pueden causar estreñimiento
- Hacer menos ejercicio o actividad física



1.3. Absorción Intestinal

1.3.1. Lugares de Absorción

Los fármacos pueden ser administrados por múltiples vías: Oral, Sublingual, Rectal, Respiratorio, Intravenosa, Intramuscular, Cutánea, Subcutánea.

En general, la vía de administración de elección es la vía oral dado que es la más cómoda, la más económica y la menos estresante para el paciente. Todo esto se traduce en una mejor adherencia al tratamiento. Por lo que la absorción tiene lugar en el tracto gastrointestinal, específicamente el órgano especializado en esta función es el intestino delgado.

Las sustancias absorbidas se transportan a través de los vasos sanguíneos a diferentes órganos del cuerpo. El material que permanece sin digerir y no absorbido pasa al intestino grueso (20).

1.3.2. Mecanismos de Absorción

Los mecanismos de absorción a través de la membrana de los enterocitos se pueden dividir en dos grandes grupos; Difusión pasiva y Mecanismo especializados de transporte.

Introducción

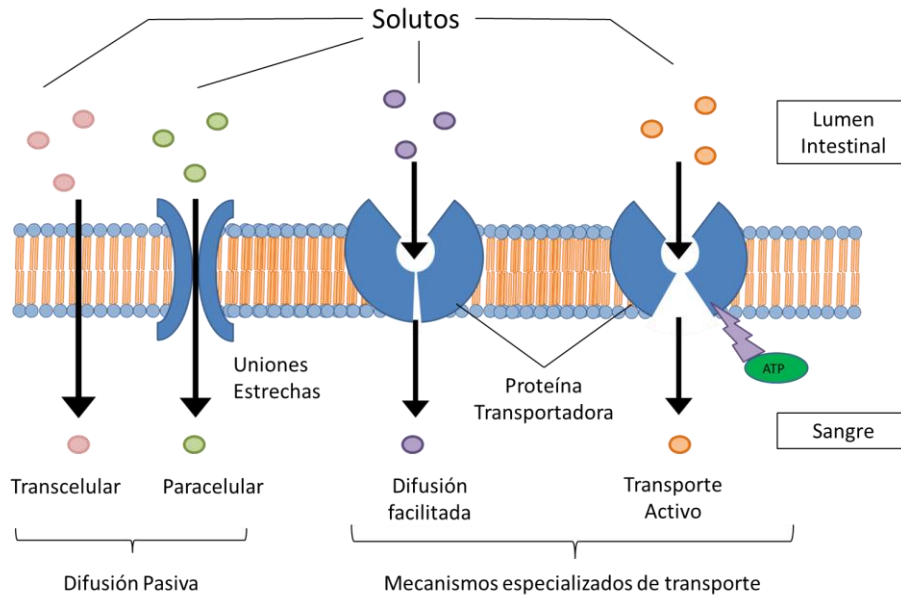


Figura 7. Esquema de los mecanismos de absorción ^{i.o.}.

Difusión Pasiva:

La difusión pasiva es la principal vía por la que se absorben las sustancias. Las principales características de esta vía son que no consume energía y que la absorción es a favor de gradiente de concentración (28).

Se diferencian dos rutas:

1. Ruta Paracelular: Paso a través de las uniones estrechas. Esta vía solo es accesible para solutos de bajo peso molecular (<200-250 Daltons) e hidrofilia elevada. En este caso la difusión es inversamente proporcional al tamaño de la molécula (29).
2. Ruta Transcelular: difusión a través de la membrana lipídica. Es la ruta principal de absorción.

Las sustancias liposolubles tienen mayor facilidad para atravesar las membranas celulares. Al ser a favor de gradiente el reparto continuará hasta que se alcance el equilibrio de concentración en los dos lados de la bicapa lipídica.

El transporte a través de las membranas dependerá en gran medida del grado de ionización y la lipofilia de las molecular. Por lo general se absorberá la fracción no ionizada, ya que es más lipófila.

Mecanismos Especializados de Transporte:

Existen estructuras, principalmente proteicas, que son capaces, mediante la translocación, de transportar sustancias de un lado a otro de la membrana. Estas estructuras son selectivas por lo que se unen de forma específica a los sustratos. Estas proteínas transportadoras tienen un papel fundamental en la absorción oral de ciertos fármacos, por tanto, en su biodisponibilidad (30), en la resistencia a los fármacos (31,32), toxicidad de los mismos (33) así como en las características farmacocinéticas y farmacodinámicas de algunos compuestos (34–36).

Los mecanismos especializados de transporte se pueden agrupar en dos grandes categorías:

- Difusión facilitada: no se produce gasto de energía.
- Transporte activo: Es necesario el aporte de energía para llevar a cabo el proceso.
- *Difusión Facilitada*

También conocida como difusión mediada por transportadores ya que a pesar de usar proteínas específicas de membrana no consume energía. Junto con la difusión pasiva

Introducción

forman el transporte pasivo ya que no hay gasto energético y el proceso ocurre a favor de gradiente.

Los solutos que por diversas razones no pueden atravesar la membrana plasmática tienen la posibilidad de hacerlo al ser sustrato de proteínas transmembrana específicas capaces de transportarlas de un lado a otro de la membrana. Se pueden clasificar las proteínas transportadoras en dos grandes grupos: las proteínas canal, que como su propio nombre indica forman pequeños poros que pueden ser atravesados por iones de tamaño definido y carga determinada mediante difusión libre; y las proteínas *carriers* que sufren un cambio estructural al unirse las moléculas específicas, este cambio producirá la apertura de unos canales por los que las moléculas podrán atravesar la membrana y ser liberadas al otro lado de la misma.

El proceso de difusión facilitada, al contrario que la difusión pasiva, es un proceso específico y saturable (37).

- *Transporte activo*

El transporte activo se caracteriza por necesitar una fuente de energía para transportar el soluto, ocurrir de forma unidireccional, darse en contra de gradiente electroquímico y de concentración y por lo tanto no puede producirse de forma espontánea. Es además un proceso saturable al ser una unión específica y existir un número limitado de proteínas transportadoras (38).

Los tipos de transporte activo se pueden clasificar según la energía requerida o el sentido en el que se vaya a transportar el soluto.

- Según la energía utilizada:

- Transporte activo directo o primario: La energía se obtiene con la hidrólisis directa de adenosín trifosfato (ATP).
- Transporte activo indirecto o secundario: la molécula es cotransportada gracias a un gradiente generado por un transporte activo primario de otra molécula diferente.

Según la dirección del transporte el transporte secundario se puede clasificar en:

- Unidireccional o simporte: Ambos solutos son transportados en la misma dirección.
 - De intercambio o antiporte: Los diferentes solutos se transportan en direcciones opuestas.
- Según la dirección del transporte en el lumen intestinal:
- Transporte de Absorción o influx: El transporte del soluto a través de la membrana se produce desde el lumen intestinal al hasta el flujo sanguíneo. Excepto la proteína MRP2, las proteínas de la familia MRP son transportadoras de absorción.
 - Transporte de secreción o efflux: Las proteínas implicadas en este tipo de transporte se encargan de impedir que moléculas o fármacos que han conseguido atravesar la membrana del enterocito alcancen el flujo sanguíneo. Consiguen esto interrumpiendo su paso y devolviéndolas al lumen intestinal. Como resultado la concentración en sangre será menos de lo

Introducción

esperado. Las proteínas de secreción más características son la Glicoproteína-P y la MRP2.

- Transportadores

Las proteínas que actúan como transportadoras de moléculas se presentan en numerosos epitelios, pero el epitelio intestinal destaca por la riqueza y variedad de los mismos. Las proteínas se encuentran en las membranas luminales y/o basales de los enterocitos y pueden facilitar el paso de sustancias a la zona citosólica o serosa. Debido a esto son una pieza clave en la absorción o la secreción de los sustratos.

Lo fármacos administrados por vía oral son especialmente susceptibles al efecto de estos transportadores y se tiene que tener en cuenta su efecto en la farmacocinética de los mismos. Existen multitud de transportadores identificados, pero solo unos pocos están implicados en la absorción intestinal.

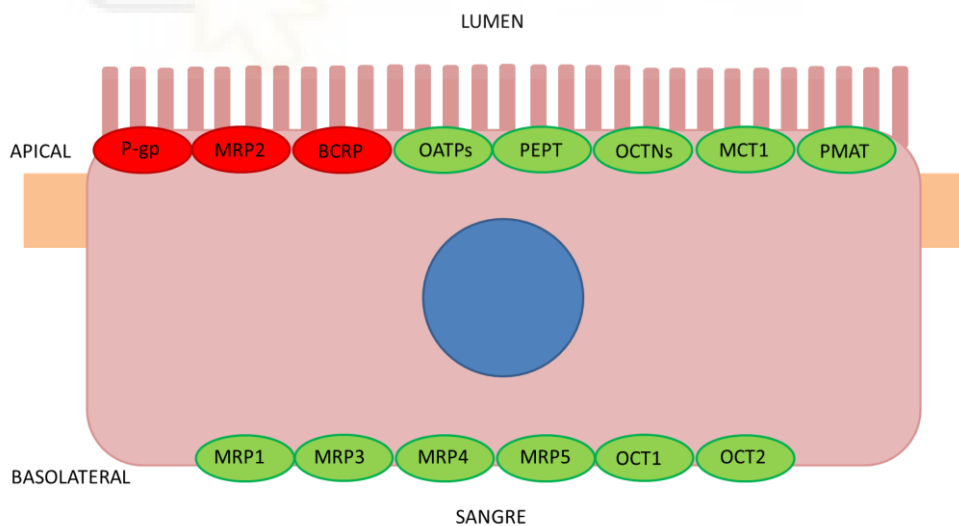


Figura 8. Esquema de las proteínas transportadoras en el epitelio intestinal.

Transportadores de secreción (rojo) Transportadores de absorción (verde) ^{1.º}.

En el intestino, las proteínas más investigadas son los transportadores de secreción pertenecientes a la familia ABC (ATP binding cassette transporters): Glicoproteína-P (P-gp), MRP2 y BCRP. Son ampliamente prolíficos en la membrana apical de los enterocitos por lo que son clave en por su capacidad de limitar la absorción de muchos fármacos importantes clínicamente. La Glicoproteína-P es la más relevante y la más estudiada hasta la fecha (39–42).

Los transportadores no son igual de abundantes en los diferentes tramos del intestino. Por lo general los transportadores se expresan en menor cantidad en el duodeno y en mayor medida en yeyuno e íleon. Por lo tanto, en los tramos distales del intestino la absorción estará más influenciada por mecanismos especializados de transporte (39–44).

- Glicoproteína-P

La Glicoproteína-P (P-gp) es un transportador de secreción o efflux, por lo que los fármacos que sean sustrato de esta proteína sufrirán una disminución en la biodisponibilidad por la secreción activa de los mismo hacia el lumen intestinal.

La P-gp fue detectada por primera vez en células tumorales. Estas células eran resistentes a los tratamientos farmacológicos debido a la secreción de los mismos por la P-gp. Este transportador se expresa en multitud de tejidos por todo el cuerpo como pueden ser; tracto gastrointestinal, hígado, riñón, células de los capilares del endotelio cerebral y células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), linfocitos CD4 y CD8, páncreas, pulmón, corazón, glándulas adrenales, testículos, útero, médula ósea, así como en otras células del sistema inmunitario: "Natural killer" y linfocitos B (45–48).

La Glicoproteína-P tiene un peso molecular de 170 kD (45–49) y su modelo tipológico se representa en la Figura 9.

Introducción

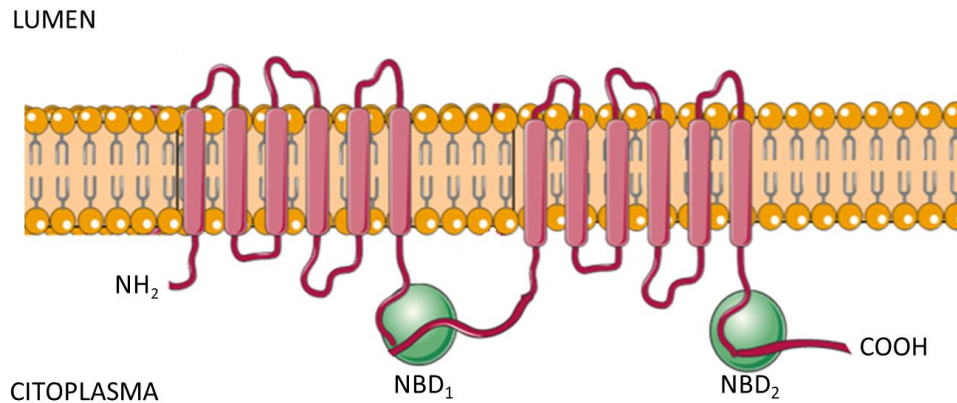


Figura 9. Esquema de P-gp ^{i.o.}.

Esta proteína está codificada en los genes pertenecientes al conocido sistema de multiresistencia a fármacos (MDR). En concreto el gen MDR1 es el encargado de traducirse en la P-gp, eso hace de este transportador activo tenga una gran capacidad detoxificadora frente a todo tipo de fármacos o xenobióticos. Por otro lado el gen MDR2 parece estar involucrado en el transporte hepático de fosfolípidos (50). Por todo esto se cree que la principal función biológica de este transportador es la de impedir la entrada de tóxicos al organismo, secretándolos al lumen se disminuye en gran medida su absorción y por otro lado ayuda a su eliminación al estar presente en los tejidos del hígado y riñón.

Los sustratos de P-gp suelen ser moléculas hidrofóbicas que contienen además dos anillos aromáticos y un átomo de nitrógeno. El rango de pesos moleculares de los sustratos está entre 300 y 2000 Daltons (51). Es muy complejo tratar de definir una estructura actividad de la P-gp ya que se han descrito hasta tres mecanismos diferentes (52) y el problema radica en que la metodología de trabajo varía mucho de unos autores a otros. Los mecanismos descritos son (41,53):

- Interacción directa con uno o más de los sitios de unión, actuando como inhibidor competitivo o no competitivo

-Interacción con el ATP, ya sea inhibiendo la unión de éste, su formación o su acoplamiento en la translocación del sustrato.

-Interacción con la membrana lipídica de las células, ya sea por modificación del entorno celular o por interacción de la unión fármaco-membrana.

Existen una amplia gama de agentes antineoplásicos que son sustrato de P-gp y que por lo tanto pueden ser secretados fuera de su lugar de acción por esta proteína causando un fallo clínico en el tratamiento quimioterápico de pacientes con cáncer. Esto hace que sea de vital importancia conocer tanto el mecanismo de acción de esta proteína como posibles inhibidores.

1.3.3. Parámetros de Absorción

El proceso de absorción puede medirse a partir de diferentes modelos, tanto celulares como animales, estos modelos se basan en establecer dos compartimentos (lumen, y sangre) separados por una membrana intestinal en los que, según donde se realice la medida, se cuantifica la aparición o desaparición del fármaco. Los parámetros más importantes que resultan de estos modelos son la constante de velocidad de absorción de primer orden y el coeficiente de permeabilidad para cuando se mide la desaparición en lumen y la fracción absorbida para cuando se mide la aparición de fármaco en sangre portal, esta última es una estimación más precisa del fenómeno de absorción, pero presenta mayor dificultad a la hora de metodología experimental.

Introducción

- Constante de Velocidad de Absorción

La constante de absorción o constante de velocidad de absorción intrínseca (k_a) es un parámetro que define la velocidad a la que el fármaco es absorbido en condiciones estandarizadas y reproducibles. Se suelen usar animales de experimentación en los que se aísla el lugar de absorción y donde se mide desaparición. Al medir la desaparición es muy importante que el soluto esté totalmente disuelto para evitar que esa desaparición se pueda deber a otro proceso, como la precipitación, diferente a la absorción.

Los factores que condicionan k_a son los siguientes:

-Factores característicos de la técnica experimental: Si la técnica experimental se ha estandarizado y validado estos factores pueden ser constantes. Son, por ejemplo, el área superficial de la membrana absorbente, el pH de la disolución ensayada, el grado de agitación, la temperatura de la zona de estudio y la viscosidad del medio.

- Factores característicos del fármaco: Son, por ejemplo, la lipofilia intrínseca (afinidad de la molécula hacia la membrana absorbente, el peso, volumen y área molecular, así como, la configuración espacial y electrónica; que determinan el coeficiente de difusión del compuesto tanto en el medio acuoso como en el lipídico. Además, esta última, condiciona su interacción con transportadores

Para calcular k_a se debe hacer un ajuste lineal de las concentraciones de fármaco remanentes en lumen, al asumir una cinética de primer orden el valor de k_a corresponde a la pendiente de la línea resultante de este ajuste.

- Coeficiente de Permeabilidad

El parámetro más utilizado para describir la permeabilidad intestinal es el coeficiente de permeabilidad (P_{eff}). Esta última se entiende como la velocidad de paso de cualquier compuesto a través de la membrana intestinal por lo que contribuye enormemente al rendimiento del proceso de absorción oral de fármacos (54).

El coeficiente de permeabilidad y la constante de velocidad de absorción se relacionan como ilustra la ecuación 1:

$$P_{eff} = k_a \cdot R/2$$

Ecuación 1

Donde R es el radio del segmento intestinal en el que se realiza el ensayo.

- Fracción oral absorbida

La fracción oral absorbida, F_a o F_{abs} , es la fracción de la dosis administrada por vía oral que atraviesa la membrana apical del enterocito, que coincidirá con la biodisponibilidad en caso de que el fármaco no sufra efecto de primer paso, intestinal o hepático. Dado que la vía oral es la vía de elección siempre que sea posible el cálculo de la F_{abs} y su predicción pasan a ser un punto clave en la etapa de desarrollo. El cálculo directo de F_{abs} es difícil en humanos por lo que se han desarrollado métodos indirectos para predecirla (55):

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

Introducción

- Modelos de predicción de la fracción oral absorbida tiempo-independientes o en estado estacionario, basados en establecer un balance de masas.
- Modelos de predicción de la fracción oral absorbida dinámicos que también permiten predecir la velocidad de absorción.



1.4.BCS

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica o BCS por sus siglas en inglés (Biopharmaceutic Classification System), es un sistema que clasifica los fármacos según sus valores de solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal, parámetros que son determinantes directos de la biodisponibilidad oral. Fue desarrollado por el Dr. Gordon Amidon y actualmente está ampliamente aceptado en el mundo farmacéutico, tanto en el ámbito académico como en el industrial y regulatorio.

El BCS se enfoca en la situación del fármaco en el lugar de absorción, es decir, en el lumen intestinal. El fármaco se libera antes o en el propio lumen intestinal, tiene que ser solubilizado en el medio intestinal para poder ser posteriormente absorbido por lo que queda claro que la solubilidad y la permeabilidad son determinantes de la velocidad y magnitud de la absorción oral y por tanto de la biodisponibilidad.

1.4.1. Orígenes del BCS

Las bases del BCS (56) se remontan a la investigación llevada a cabo por el Doctor Gordon Amidon sobre absorción y farmacocinética de fármacos durante los años 70 y 80. Pero no fue hasta que realizó una estancia en 1990 en la FDA (Food and Drug Administration), cuando la necesidad de establecer una clasificación de los fármacos se volvió aparente. El objetivo inicial fue desarrollar un sistema para simplificar los requerimientos normativos y regulatorios relacionados con la disolución de fármacos administrados por vía oral.

Durante 1990, Gordon Amidon desarrolló varios métodos para predecir la absorción en humanos utilizando la permeabilidad intestinal obtenida en yeyuno de animales. Estos métodos predictivos establecieron que la permeabilidad de la membrana

Introducción

intestinal, medida con el coeficiente de permeabilidad (P_{eff}), era una variable clave en la predicción de la absorción humana.

En 1995 se publicó finalmente el artículo científico del BCS, el impacto sobre la comunidad científica fue notable y ayudó a cambiar la forma en la que se desarrollaban nuevos medicamentos (57).

1.4.2. Bases del BCS

Aplicando la primera ley de Fick de difusión a la membrana intestinal se obtiene la siguiente ecuación 2:

$$J = \frac{1}{A} \cdot \frac{\partial M}{\partial t} = P_{eff} \cdot C_s$$

Ecuación 2

Estos dos parámetros resultantes del flujo, P_{eff} (Permeabilidad) y C_s (solubilidad) son los puntos de partida para el desarrollo de esta clasificación (57). En esta ecuación; J representa el transporte intestinal del fármaco, A es la superficie del intestino, M es la masa absorbida por unidad de tiempo (t), y como ya se ha dicho, P_{eff} es la permeabilidad efectiva del compuesto y C_s es concentración del fármaco en el lumen intestinal cuyo límite es la solubilidad. De acuerdo con esta ecuación, la permeabilidad y la solubilidad son los factores que determinan el transporte del fármaco a través de la membrana intestinal (58) y por tanto de la biodisponibilidad.

Por lo anteriormente expuesto se puede afirmar que dos formas farmacéuticas orales de liberación inmediata, con el mismo principio activo y los mismos perfiles de concentración en función del tiempo en el lumen intestinal, tendrán la misma velocidad y grado de absorción, por tanto, podrán considerarse bioequivalentes. Para poder aplicar

esta premisa ninguno de los componentes de las formulaciones puede afectar la permeabilidad de la membrana o el tiempo de tránsito intestinal y ambas formulaciones deben tener el mismo perfil de disolución en todas las condiciones luminales.

En su publicación de 1995 el Dr. Amidon determina tres números adimensionales para caracterizar un fármaco (57):

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

$$An = \frac{P_{eff}}{R} \cdot \langle T_{res} \rangle = \frac{\langle T_{res} \rangle}{\langle T_{abs} \rangle}$$

Ecuación 3

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

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

$$F_a = 1 - e^{-2An}$$

Ecuación 4

Introducción

- **Número de Dosis (Do):** Es la relación entre la concentración que tiene la dosis en el lumen intestinal y la solubilidad del fármaco. Esta relación se ilustra en la ecuación 5.

$$D_o = \frac{D/250}{C_s}$$

Ecuación 5

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

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

En fármacos cuya solubilidad y permeabilidad es alta, la velocidad de absorción está controlada por el vaciado gástrico.

- **Número de Disolución (Dn):** Es la relación entre el tiempo de residencia (T_{res}) y el tiempo de disolución (T_{diss}). El tiempo de disolución depende de la solubilidad (C_s), la difusividad (D), densidad (ρ) y radio inicial de las partículas (r). Esta relación se ilustra en la ecuación 6.

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

Ecuación 6

Una disolución rápida asegura que la disolución *in vivo* no es el factor limitante del proceso de absorción (58).

Teniendo en cuenta las definiciones dadas para los tres números adimensionales, se deduce que la permeabilidad y la solubilidad son los principales factores que determinan la absorción de fármacos por vía oral. Por lo que, según su grado de solubilidad y de permeabilidad, los fármacos pueden ser divididos en cuatro clases, como se muestra en la Figura 10.

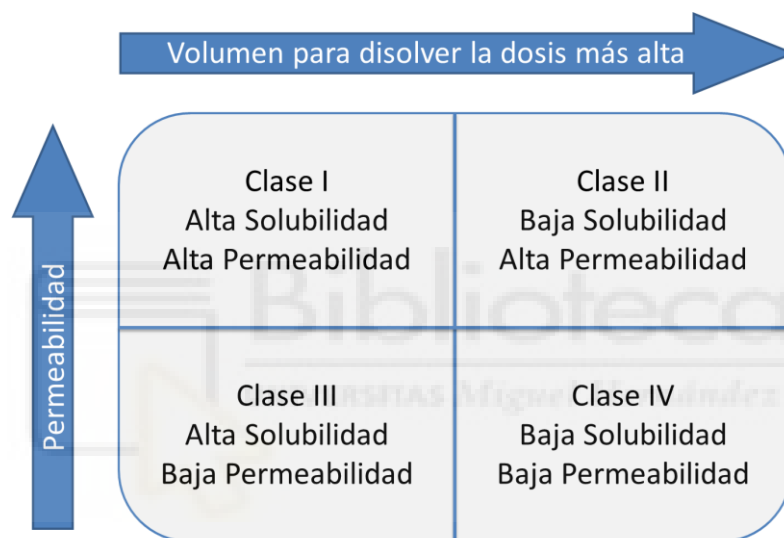


Figura 10. Clasificación basada en el BCS ^{i.o.}.

- Clase I: fármacos de alta solubilidad-alta permeabilidad: los compuestos pertenecientes a este grupo se absorben bien y el paso limitante de la velocidad de absorción es la disolución del fármaco o el vaciado gástrico si la disolución es muy rápida
- Clase II: fármacos de baja solubilidad-alta permeabilidad: el paso que controla la absorción del fármaco es su disolución *in vivo*, la absorción suele ser más lenta que en la clase I.

Introducción

- Clase III: fármacos de alta solubilidad-baja permeabilidad: la permeabilidad es el factor limitante en la absorción de los fármacos pertenecientes a este grupo.
- Clase IV: fármacos de baja solubilidad-baja permeabilidad: este tipo de compuestos presentan problemas significativos en su absorción oral.

Sin embargo, la disolución de los fármacos pertenecientes a las clases II y IV depende en gran medida de la naturaleza ácida o básica del fármaco y de las características del lumen intestinal. Por este motivo, Tsume y colaboradores (59) propusieron en 2014 una subclasificación para las clases II y IV del BCS (Tabla 1) teniendo en cuenta si el fármaco es ácido, básico o neutro y el rango de pH fisiológico ($\text{pH} < 7,5$).

Subclasificación	Solubilidad a pH	Solubilidad a pH	Permeabilidad
BCS	2 (estómago)	6.5 (intestino)	
I	Alta	Alta	Alta
IIa	Baja	Alta	Alta
IIb	Alta	Baja	Alta
IIc	Baja	Baja	Alta
III	Alta	Alta	Baja
IVa	Baja	Alta	Baja
IVb	Alta	Baja	Baja
IVc	Baja	Baja	Baja

Tabla 1. Subclasificación biofarmacéutica tomada de Tsume et al.(59).

En la clase IIa se engloban los ácidos débiles, con un pK_a inferior a 5. Este tipo de compuestos presenta mayor solubilidad a pH básico, por tanto, su porcentaje de absorción será mayor en los tramos distales del tracto gastrointestinal como el íleon y el colon. Dado el elevado tiempo de residencia que muestra cualquier molécula en el intestino grueso, los fármacos pertenecientes a la clase IIa tienen tiempo más que suficiente para una

disolución y absorción completas, por lo que su comportamiento es bastante similar a aquéllos clasificados en la clase I del BCS.

Dentro de la clase IIb se encuentran las bases débiles, con un pK_a mayor a 6. Su solubilidad se ve incrementada a pH ácido, lo que les confiere mayor absorción en los tramos proximales, como el duodeno. El pH más básico de las zonas distales del intestino delgado y del colon podría provocar su precipitación, por lo que el tiempo de residencia del que disponen estos fármacos para una absorción óptima es relativamente corto.

La clase IIc son compuestos neutros y su solubilidad no está afectada por los cambios de pH que se dan a lo largo del tracto gastrointestinal. Se absorben más lentamente, por lo tanto, presentan un alto grado de absorción en colon ya que más cantidad de fármaco alcanza esta zona distal. Esta característica los convierte en compuestos ideales para fórmulas de liberación controlada.

Se podría hacer una extrapolación similar para los fármacos de clase IV. Aunque, no hay que perder de vista que este grupo presenta más problemas debido a su baja permeabilidad.

1.4.3. Aplicaciones del BCS

Si combinamos los conceptos de solubilidad y permeabilidad del BCS con las características de disolución *in vitro* de un fármaco, tendremos los tres factores más importantes que gobiernan la absorción de un compuesto administrado en una forma farmacéutica oral sólida de liberación inmediata: solubilidad, permeabilidad intestinal y grado de disolución

Una sustancia es altamente soluble cuando la dosis más alta administrada se disuelve en 250 ml de agua, lo que equivale a un vaso de agua; y en un rango de pH de

Introducción

1,0-7,5. Será de alta permeabilidad cuando el grado de absorción intestinal, determinado experimentalmente, sea igual o superior al 90% (60).

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

Actualmente se utilizan en la aprobación de productos genéricos que contienen principios activos con ciertas características de solubilidad y permeabilidad, lo que supone una reducción de los estudios realizados *in vivo* y, como consecuencia, una disminución tanto en los gastos de investigación de los genéricos como en la repercusión ética que tienen los estudios en humanos.

El BCS ha proporcionado una sólida base científica para decidir cuándo los estudios de bioequivalencia *in vitro* son suficientes o incluso más discriminativos que los estudios *in vivo*. Amidon y colaboradores (61) defienden que para los fármacos clase I y III, los ensayos de disolución pueden aportar inclusive mayor evidencia de bioequivalencia que los estudios *in vivo*, ya que en estos últimos se pueden producir variaciones en los niveles plasmáticos del fármaco que pueden deberse a modificaciones en el tránsito intestinal y gástrico, impidiendo observar las diferencias entre las formulaciones a comparar.

Según el BCS en aquellas formulaciones sólidas de liberación inmediata que contengan fármacos de alta solubilidad (clase I y III), que disuelvan al menos el 85% de la sustancia activa en 15 minutos o menos, se puede asegurar que la biodisponibilidad del

fármaco no está limitada por la disolución; en esos casos, el paso limitante de la velocidad de absorción es el vaciado gástrico (62).





1.5.Excipientes

Muchas formas de dosificación formuladas hoy en día son sistemas complejos que contienen muchos otros componentes junto con el API; estos compuestos generalmente se agregan junto con los ingredientes farmacéuticos activos para (63):

- Proteger, apoyar o mejorar la estabilidad de la formulación.
- Reducir la pureza en caso de fármacos potentes para ayudar en la formulación de una forma de dosificación precisa.
- Mejorar la aceptación del paciente.
- Ayuda a mejorar la biodisponibilidad del fármaco activo.
- Mejorar la seguridad y la eficacia general de la formulación durante su almacenamiento y uso.

Estos componentes generalmente se denominan como excipientes y de acuerdo con el consejo internacional de excipientes farmacéuticos, los excipientes se definen como "cualquier sustancia distinta del fármaco activo o profármaco que se incluye en el proceso de fabricación o está contenida en formas farmacéuticas terminadas" (64).

1.5.1. Concepto

Según la Real Academia de la lengua Española (RAE) se puede definir excipiente como: Sustancia inerte que se mezcla con los medicamentos para darles consistencia, forma, sabor u otras cualidades que faciliten su dosificación y uso (65). Esta definición representa la forma tradicional en la que se entienden los excipientes, pero hoy en día se está comprobando que la mayoría de excipientes no pueden clasificarse como "inertes"(1)

Introducción

ya en los últimos años y gracias a la proliferación de los medicamentos genéricos, se han referenciado multitud de casos en los que la biodisponibilidad de fármacos se ve afectada de alguna manera por los excipientes (66).

1.5.2. Tipos de Excipientes

Los excipientes se pueden clasificar según diferentes factores:

- Excipiente según su origen (67):
 - Fuente animal: Lactosa, gelatina, ácido esteárico, cera de abejas, miel, almizcle, lanolina, etc.
 - Fuente vegetal: Almidón, menta, cúrcuma, goma guar, arginatos, acacia, etc.
 - Fuente mineral: Fosfato de calcio, sílice, talco, calamina, amianto, caolín, parafina, etc.
 - Sintético: Ácido bórico, sacarina, ácido láctico, polietilenglicoles, polisorbatos, povidona, etc.

- Excipientes según la forma farmacéutica y función:

Excipientes utilizados en formulaciones sólidas.		
Categoría del Excipiente	Función dentro de la Formulaión	Ejemplos
Diluyentes	Relleno	Lactosa, almidones directamente compresibles, dextrosa, sorbitol, celulosa microcristalina, Fosfato de calcio dibásico deshidratado
Ligantes y Adhesivos	Impartir cualidades cohesivas al material en polvo	Acacia, gelatina, pasta de almidón, polivinilpirrolidona, glucosa, carboximetilcelulosa, povidona
Lubricantes	Reducir la fricción entre partículas, evitar la adhesión del material de la tableta a la superficie de las matrices y los punzones, facilitando la expulsión fácil de la tableta desde la cavidad de la matriz y mejorar la velocidad de procesado	Talco, ácido esteárico, estearato de magnesio, estearato de calcio, polietilenglicol, surfactantes, aceite vegetal
Deslizantes	Mejorar las características de flujo de la mezcla de polvo	Dióxido de silicona coloidal (Carbosil), almidón sin amianto, almidón de maíz
Disgregantes	Facilitar la ruptura o desintegración después de la administración	Almidones, arcillas, celulosa, polímeros reticulados, almidones modificados
Superdisgregantes	Eficacia mejorada de los disintegrantes que resulta en una disminución de los niveles de uso en comparación con los disintegrantes tradicionales	Crosscarmalosa, povidona cruzada, almidón glicolato sódico
Agentes colorantes	Impartir el aspecto estético a la forma de dosificación, disfrazar fármacos de color, identificación del producto	Catalogados por industria con la letra E y un número de 3 cifras
Sabores	Limitado a comprimidos masticables / comprimidos destinados a disolverse en la boca	Spray de secado, siropes, etc
Edulcorantes	Impartir sabor dulce a la formulación; El uso está limitado a tabletas masticables.	Manitol, sacarina, etc
Sorbentes	A prueba de humedad	Gel de sílice, carbón activado, arcilla, etc
Materiales de revestimiento	Proteger los ingredientes de las tabletas contra la desintegración por la humedad, ayudar a tragar tabletas de sabor desagradable	Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polímeros sintéticos, Shellac, proteína de maíz, polisacáridos, Capsulas recubiertas por gelatina, povidona, etil celulosa
Plastificantes	Preparar cápsulas de gelatina blanda, supositorios a base de gelatina, comprimidos recubiertos con película, etc	Aceite de ricino, monoglicéridos diacetilados, polietilenglicol, polipropilenglicol, triacetina

Tabla 2. Excipientes usados en formulaciones Sólidas (68,69).

Excipientes utilizados en formulaciones líquidas.		
Categoría del Excipiente	Función dentro de la Formulación	Ejemplos
Disolventes	Soluto Disolvente / Ingrediente farmacéutico activo	Agua, alcohol, ácido acético, acetona, acetatos de etilo, jarabes, etc
Co solventes	Aumentar la solubilidad del soluto	Etanol, sorbitol, glicerina, propilenglicol, etc
Buffers	Mantener el pH de la formulación	Tampones de fosfato, tampones de acetato, tampones de fosfato de ácido cítrico, etc
Conservantes antimicrobianos	Prevenir el crecimiento microbiano en formulaciones	Alcohol bencílico, butilparabeno, fenol, tiomersal, etc
Antioxidantes	Control de oxidación	Ácido ascórbico, bisulfato de sodio, tiourea, butilhidroxi tolueno (BHT), tocoferoles, etc
Agentes humectantes	Ayuda a la humectación y dispersión de ingredientes farmacéuticos activos hidrófobos	Lauril Sulfato de Sodio (SLS), Tween 80, Spans, Lecithins, etc
Agentes antiespumantes	Desalentar la formación de espuma estable	Simeticona, fosfatos orgánicos, alcoholes, aceites de parafina, esteratos y glicoles
Agentes espesantes	Evitar la sedimentación, modificar la viscosidad	Metilcelulosa, Hidroxietilcelulosa, Microcristalina, Celulosa, etc
Humectantes	Evaporación retardada de vehículos acuosos a partir de formas de dosificación	Propilenglicoles, glicerol, polietilenglicol, etc
Agentes quelantes	Proteger el fármaco de los catalizadores que aceleran la reacción oxidativa	EDTA, dihidroxietilglicina, ácido cítrico y ácido tartárico
Agentes emulsionantes	Evitar la coalescencia de los glóbulos dispersos	Lauril sulfato de sodio, ceterimida, ésteres de macrogol, ésteres de sorbitán, etc
Agentes floculantes	Prevenir el apelmazamiento	Almidón, alginato de sodio, Carbomer, etc
Agentes edulcorantes	Hacer más dulce	Sacarosa, sorbitol, sacarina, aspartamo, sucralasa
Colores.	Dar color	Amaranto, Eritrosina, Eosina, Tartarazina, etc
Sabores	Dar sabor	Aguas aromáticas, jarabe etc

Tabla 3. Excipientes usados en formulaciones Líquidas (70).

Excipientes utilizados en formulaciones Semisólidas.		
Categoría del Excipiente	Función dentro de la Formulación	Ejemplos
Excipientes formadores de estructuras	Formar estructuras de gel	Alcohol cetosterly, sorbitol y otros surfactantes hidrofílicos, hidrocarburos fluidos como aceites minerales, etc
Conservantes	Conservar la formulación.	Alcohol bencílico, propil parabeno, metilparabeno, clorocresol, imidazolidinilurea, benzoato de sodio, etc
Antioxidantes	Prevenir la oxidación	Butil hidroxil tolueno, butil hidroxil anisol, ácido ascórbico, etc
Solubilizantes	Mejorar la solubilidad	Lanolina, colesterol o ésteres de colesterol
Agentes gelificantes	Formar geles	Carbomer934, pemulen®, carboxi metil celulosa, hidroxipropilcelulosa, goma xantana, etc
Emolientes	Modificar las características del vehículo para ayudar a la penetración del ingrediente activo a través de la piel	Glicerina, aceite mineral, vaselina, palmitato de isopropilo, etc
Bases de supositorios	Se utiliza para formar la base para disolver el ingrediente activo	Manteca de cacao, glicerina, aceite de coco, gelatina, aceite vegetal hidrogenado, polietilenglicol, etc

Tabla 4. Excipientes usados en formulaciones Semisólidas (71).

Algunos excipientes tienen valores terapéuticos:

- Anestésicos: cloroformo, etc.
 - Laxantes: bentonita, psyllium, goma xantana, etc.
 - Modificadores de pH: ácido cítrico.
 - Astringente: canela, alumbre, sulfato de zinc.
 - Carminativo: canela, agua de eneldo, agua de anís.
 - Fuentes de nutrientes: agar, lactosa, etc.
- Sistema de clasificación biofarmacéutico de los excipientes:

Introducción

Sarmento y colaboradores desarrollaron un sistema basado en el BCS para clasificar los excipientes en función de cómo puedan afectar a los transportadores de secreción y su impacto en el metabolismo (72).

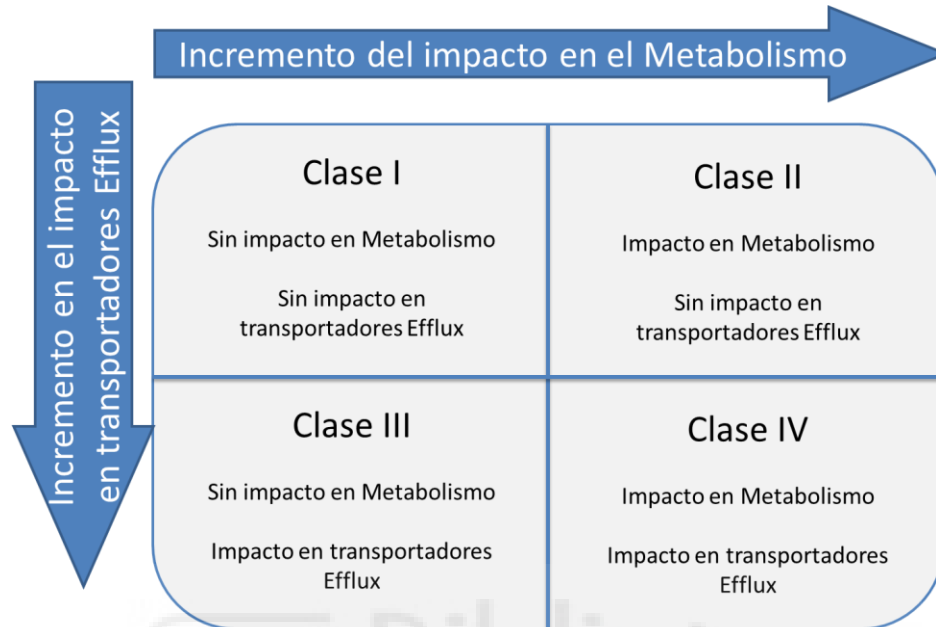


Figura 11. Bases de la Clasificación biofarmacéutica de excipientes. Adaptada de Sarmento et al.(72).

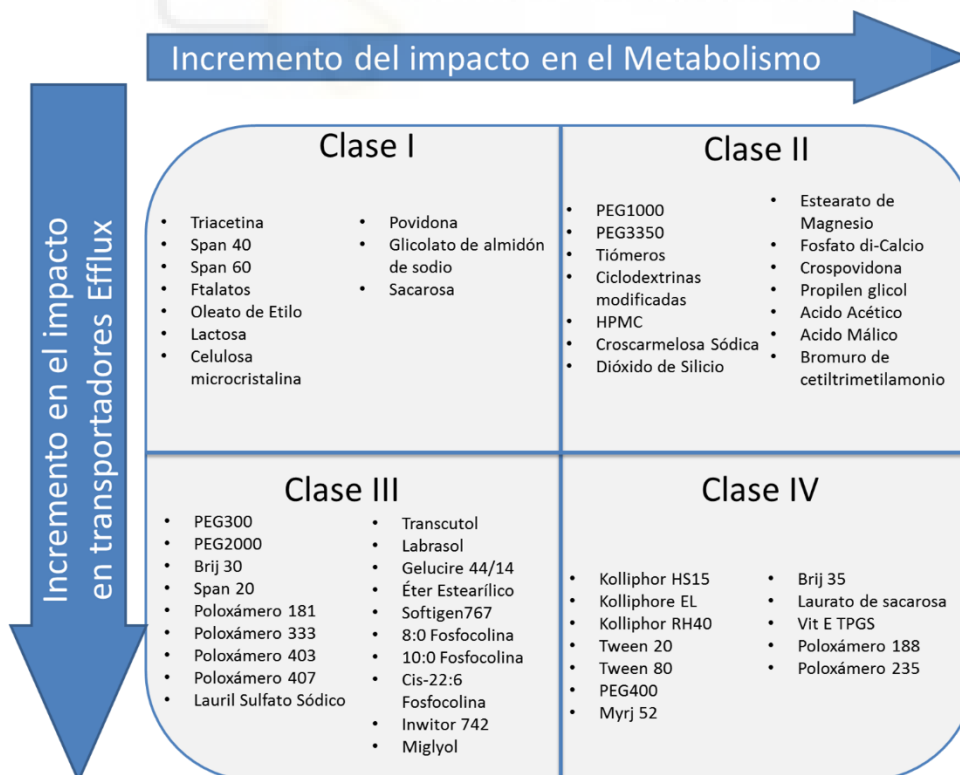


Figura 12. Resultado de los excipientes estudiados. Adaptada de Sarmento et al.(72).

Se requieren datos cada vez más fiables *in vitro* e *in vivo* para establecer firmemente el BCSE. Esta clasificación será una herramienta importante en el campo del desarrollo farmacéutico. Sin embargo, en este momento hay información muy limitada relacionada con estas propiedades de los excipientes. Además, los métodos *in vitro* actuales no son robustos y es difícil asegurarse de que un objetivo específico fue inhibido o interferido. Para que realmente sea útil en un futuro, se debe realizar un análisis de riesgo basado en la clasificación de BCSE y su asociación con medicamentos específicos o clases de medicamentos para fortalecer la aplicación de esta clasificación.

1.5.3. Efectos sobre la Biodisponibilidad

Como se ha dicho antes, en general se ha considerado que los excipientes son sustancias inertes y por tanto no afectan la biodisponibilidad de los fármacos, no obstante, en los últimos años se han llevado a cabo investigaciones que sustentan que ciertos excipientes pueden afectar la absorción. La absorción de fármacos por vía oral se ve afectada por multitud de procesos, entre ellos la solubilidad y la permeabilidad, procesos clave de la clasificación BCS, pero también pueden afectar otros procesos que no se tienen en cuenta en esta clasificación como son el vaciado gástrico y el tránsito intestinal.

Un cambio en la velocidad de vaciado gástrico supone un cambio en la biodisponibilidad, ya que al pasar más rápido al intestino delgado (órgano especializado en la absorción) se produce un aumento en la velocidad de absorción. El Paracetamol formulado con bicarbonato de sodio provoca un vaciamiento gástrico más rápido que otras formulaciones sin este excipiente traduciéndose en una mayor velocidad de absorción (73).

El vaciado gástrico ha sido ampliamente estudiado en ratas, así como el efecto de diferentes excipientes en el mismo. El vaciamiento gástrico se ve retrasado de forma

Introducción

pronunciada por soluciones de sacarosa 50%, por el contrario una solución al 1% de carboximetilcelulosa, lo acelera ligeramente (74). Pestel y colaboradores observaron que tras administrar PEG 400 con una concentración del 20% en el mismo modelo animal en el que emplearon una suspensión de sulfato de bario como “comida de ensayo”, se produjo una disminución significativa de la velocidad de vaciado gástrico. El vaciamiento gástrico se redujo ligeramente por hidroxietilcelulosa en concentración de 1% e hidroxipropil- γ - ciclodextrina al 20%. Sin embargo, la hidroxipropil- β - ciclodextrina al 20% y el polisorbato 80 al 0,5% no tuvieron ningún efecto sobre el vaciado gástrico (75).

El tiempo que pasa el fármaco en el lugar de absorción es clave para una correcta absorción, por lo que el aumento de la velocidad de tránsito intestinal puede disminuir de forma significativa la absorción de fármacos (76). Adkin y colaboradores observaron una reducción estadísticamente significativa en los valores de AUC y C_{max} de Cimetidina al administrarla con manitol causada por una disminución del tiempo de tránsito intestinal al compararla con una solución control de sacarosa (77). Un estudio posterior demostró que existía una relación dosis dependiente entre la concentración de manitol y la reducción del tiempo de tránsito intestinal; a mayor concentración de manitol, menor tiempo de tránsito intestinal (78). El efecto del manitol (azúcar no absorbible) sobre el tránsito intestinal podría deberse a su efecto osmótico; una presión osmótica alta en el lumen intestinal puede provocar aumento en el peristaltismo y retención de agua (79).

Chen y colaboradores investigaron el efecto del sorbitol sobre la bioequivalencia de formulaciones de Ranitidina. Al compararlas con formulaciones que contenían el mismo fármaco y sacarosa, descubrieron que la presencia de sorbitol disminuye de forma significativa la biodisponibilidad de Ranitidina. Los autores atribuyen la diferencia en la biodisponibilidad de Ranitidina entre la solución que contenía sorbitol y la que contenía

sacarosa, al incremento del volumen del tracto gastrointestinal por efecto osmótico del sorbitol y por el aumento de la motilidad intestinal que reduce el tiempo de contacto de la Ranitidina con la región proximal del intestino delgado (80).

El PEG 400 puede aumentar la motilidad intestinal y acelerar el tránsito por el intestino delgado (81). Un ejemplo del efecto de este excipiente sobre la absorción es la disminución de la biodisponibilidad de Ranitidina formulada en pellets, que se reduce 31% en presencia de PEG 400 debido a la disminución del tiempo de tránsito intestinal (82).

1.5.3.1. Efecto sobre la Disgregación

Los excipientes son un componente clave en el proceso de disgregación ya que algunos excipientes se añaden a la formulación con el fin de facilitarlos.

Los disgregantes se utilizan en formas de dosificación sólidas para contrarrestar la acción de los lubricantes. Estos agentes se hinchan en presencia de un solvente externo para liberar el contenido del comprimido formando una masa sólida blanda. Actúan por diferentes mecanismos, tales como hinchamiento, absorción, interrupción de los enlaces partícula-partícula, recuperación de tensión y calor de interacción. Los disgregantes de uso común son el almidón y sus versiones modificadas, a saber, carboximetilcelulosa reticulada, polacrilina sódica y ácido algínico (83).

El almidón se utiliza como disgregante en el rango de concentración de 5 a 10% p / p. El almidón parcialmente gelatinizado en agua fría pierde su propiedad de disgregación (84,85). La carboximetilcelulosa y la carboximetilcelulosa reticulada, también conocida como croscarmelosa sódica, se utilizan como disgregantes en el rango de concentración de 2 a 10% p / p y 2 a 5% p / p, respectivamente. Cuando la

Introducción

croscarmelosa sódica y la crospovidona se usan intragranularmente y se vuelven a comprimir en comprimidos, se encuentra que la tasa de disolución de ese comprimido está disminuida. Como la polacrilina potásica es de naturaleza higroscópica, el nivel óptimo de humedad debe mantenerse cuando se usa en una formulación, para evitar una disminución de su actividad disgregante (84). Se informa que la inflamación del ácido algínico se ve afectada por el almacenamiento a más de 30 ° C y 75% de HR durante más de un año (86).

El uso de croscarmelosa sódica como disgregante en una formulación de Oximorfona causa una interacción de unión que finalmente resulta en la disolución retardada del fármaco (87). Como la croscarmelosa sódica contiene partículas de tamaño pequeño, presenta un flujo deficiente, que afecta el llenado de mezclas de polvo en las cápsulas o el flujo de polvo durante la formación de comprimidos (88).

Los resultados de un estudio de comprimidos de liberación inmediata donde se analizó en detalle el impacto de los cambios en los parámetros del proceso en el desempeño de disgregación y disolución. Los comprimidos se produjeron mediante un proceso de granulación húmeda de alto cizallamiento, secado en lecho fluido y posterior compactación. La estructura de los poros de los comprimidos se analizó mediante THz-TDS. Dado que la formulación fue la misma para todos los lotes, las variaciones en la disgregación (el tiempo de disgregación varía de 280 a 900 s) y la disolución (el API disuelto después de 15 min varía de 35% a 85%) el rendimiento se originó únicamente en la microestructura de los comprimidos. En este estudio, el disgregante se incorporó en la matriz intra e inter granular. Es bien sabido que el modo de consolidación de los excipientes y el API, es decir, intra-, granular o en ambas fases, puede afectar el comportamiento de disgregación de un comprimido (89–96). Por lo tanto, la eficacia de

un excipiente y especialmente de un disgregante en diferentes modos de incorporación puede verse significativamente afectada por la técnica de granulación y su configuración.

Los superdisgregantes se utilizan en comprimidos orodispersables o de disolución bucal para la liberación inmediata del fármaco. Son sustancias hidrófilas que absorben el agua y se hinchan, lo que provoca la fuga del medicamento de la forma de dosificación sólida. Algunos de los superdisgregantes comúnmente usados son glicolato de almidón sódico (SSG), polivinil N-pirrolidona reticulada y carboximetilcelulosa sódica reticulada (CCS).

CCS es un compuesto aniónico que muestra la interacción fármaco-excipiente con fármacos catiónicos como la fenilpropanolamina (97). Los estudios de disolución realizados con agua como medio de disolución han demostrado que CCS causa un retraso en la liberación de fenilpropanolamina. CCS también interactúa con excipientes alcalinos como el carbonato de calcio y el óxido de magnesio. Bajo condiciones básicas de pH, los enlaces éster en CCS se hidrolizan dando como resultado la formación de un compuesto más soluble en agua (98). En presencia de humedad, CCS provoca la formación de capas en el comprimido, lo que en última instancia retrasa la liberación del fármaco.

SSG, que es la sal de sodio del carboximetil almidón (reticulado), se usa en concentraciones de 2 a 8%. Sirve como una matriz de liberación sostenida en altas concentraciones (5 a 12%) y causa un retraso en la disgregación al formar una capa de gel viscosa que crea una barrera para la penetración del medio de disgregación. En presencia de humedad, forma una capa de humedad en la superficie del comprimido como CCS.

La polivinil N-pirrolidona entrecruzada libera trazas de peróxido de hidrógeno, que se ha demostrado que mejora la formación de un producto de degradación de

Introducción

Raloxifeno (modulador del receptor de estrógeno) (88). Además, el empaque inadecuado durante el almacenamiento puede permitir que la humedad en la atmósfera circundante ingrese dentro del empaque, causando la hinchazón de la polivinilo N-pirrolidona reticulada (99). Se conoce también que el uso de SSG en los procesos de granulación húmeda para formular comprimidos de Acetaminofeno causa un aumento en la energía elástica de SSG dependiendo de las fuerzas de compactación, lo que afecta negativamente al proceso de compresibilidad (100). Cuando se usa SSG para formular hidrogeles aniónicos, se produce un intercambio iónico entre el superdisgregante y el hidrogel. Se ha observado la misma interacción de intercambio iónico entre la polivinil N-pirrolidona reticulada y los derivados de fármacos lipófilos de Paclitaxel (79).

Por otro lado, el calcio podría introducir un retraso adicional en la liberación del fármaco a partir de formas de dosificación con recubrimiento entérico (101). Es necesario trabajar para establecer sistemas de prueba de disolución y disgregación biopredictiva para formas de dosificación con recubrimiento entérico para poder hacer predicciones sobre el alcance de esta interacción *in vivo*, ya que las metodologías de disolución y disgregación disponibles actualmente son deficientes en ese sentido. Por último, estos hallazgos muestran que se deben desviar más esfuerzos para investigar las interacciones entre los nutrientes y los excipientes.

1.5.3.2. Efecto sobre la Solubilidad

La Organización Mundial de la Salud (OMS) dispone de un protocolo para proporcionar un enfoque armonizado al realizar estudios de solubilidad (102).

En general, la muestra de API debe disolverse / suspenderse en el tampón, luego separarse por métodos apropiados y la concentración de API solubilizada debe medirse utilizando un método analítico adecuado.

De acuerdo con la definición de la OMS un API se considera altamente soluble cuando la dosis terapéutica única más alta, es soluble en 250 ml o menos de medio acuoso en el rango de pH de 1.2 a 6.8. El perfil de solubilidad del pH del API debe determinarse a 37 ± 1 ° C en medios acuosos. Se recomienda un mínimo de tres determinaciones de solubilidad en cada condición de pH.

En general, deben emplearse experimentos de solubilidad en equilibrio. Sin embargo, en casos excepcionales, por ejemplo, cuando el API no está disponible en cantidades suficientes y / o es prohibitivamente caro, o cuando no es posible mantener el pH del medio con tampones de farmacopea, se puede considerar una cantidad proporcionalmente menor en un volumen proporcionalmente menor de tampón. Dado que estos son experimentos de solubilidad en equilibrio, pequeños volúmenes de medios de solubilidad pueden emplearse sin problemas si el aparato experimental disponible lo permite.

Acercándonos a condiciones más fisiológicas, es bien conocido que los compuestos poco básicos y poco solubles en agua que se solubilizan en el fluido gástrico, precipitan después de que la solución se vacíe del estómago al intestino delgado, lo que conduce a una baja biodisponibilidad oral.

Los impedimentos asociados con la obtención de una biodisponibilidad oral suficiente para fármacos poco solubles (103,104) han obligado a la comunidad científica a desarrollar formulaciones que permitan la absorción proporcionando una sobresaturación intestinal, es decir, concentraciones de fármaco que exceden la solubilidad de equilibrio en el ambiente intestinal.

La sobresaturación es un estado termodinámicamente meta estable que constituye la fuerza impulsora de la precipitación. La evaluación adecuada de la sobresaturación, la

Introducción

precipitación y, posiblemente, la inhibición de la precipitación es, por lo tanto, clave para el desarrollo y la optimización eficientes de nuevas formulaciones farmacéuticas.

Existen varios métodos para conseguir la sobresaturación de un compuesto *in vitro* como pueden ser, cambio de solvente (105), métodos potenciométricos (106) o cambio de pH. Mientras que los dos primeros tienen únicamente utilidad académica o de cribado, el cambio de pH es un proceso fisiológico que ocurre de manera natural en el tracto gastrointestinal por lo que producirá en los compuestos poco básicos y poco solubles una sobresaturación de forma natural. El papel de los excipientes será pues prolongar esta situación poco estable inhibiendo en la medida de lo posible la precipitación.

Yamashita y colaboradores comprobaron el poder para inhibir la precipitación de Poloxámero 407 y Estearato de polioxilo 40. Realizaron un estudio en de cribado en placa de 96 pocillos de una batería de excipientes y posteriormente para confirmar estos resultados, se realizaron estudios de sobresaturación según el método de disolución de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP). El resultado fue la confirmación de que ambos excipientes lograron sobresaturar la solución de un compuesto X tanto en la placa de 96 pocillos como en el aparato USP II (107).

También se comprobó que al formular Tacrolimus junto con HPMC en perros, la concentración máxima y el AUC aumentaban al compararlo con el estudio en el que únicamente se administraba el polvo cristalino (108).

El excipiente HPMC ha sido ampliamente investigado por diferentes grupos y diferentes fármacos como son; Tacrolimus, Paclitaxel (109), AMG 009 (110) o PNU-91325 (111), demostrando su gran poder para inhibir la precipitación y aumentar así la biodisponibilidad.

Li y colaboradores utilizaron un compuesto débilmente básico de Johnson and Johnson Pharmaceutical Research and Development como un compuesto modelo al que añadieron; vitamina E TPGS como agente solubilizante y Pluronic F127, HPMC o Eudragit L100-55 como inhibidores de la precipitación.

La combinación de Pluronic F127 con vitamina E TPGS dio como resultado un efecto sinérgico en la prolongación de la concentración del compuesto tras la dilución en fluido intestinal simulado. Además, se encontró que HPMC E5 y Eudragit L100-55 son inhibidores efectivos de la precipitación para los compuestos probados en fluido gástrico simulado.

La dosificación de la forma de dosificación sólida predisuelta en fluido gástrico simulado en perros dio como resultado un 52% de biodisponibilidad oral en comparación con un 26% para el control de la suspensión, un aumento estadísticamente significativo ($p = 0,002$). La biodisponibilidad oral aumentada del compuesto ensayado podría atribuirse a la generación y prolongación de una concentración de fármaco sobresaturado *in vivo* por los agentes solubilizantes e inhibidores de la precipitación (112).

1.5.3.3. Efecto sobre la Permeabilidad

Se ha observado que algunos excipientes pueden provocar cambios en la membrana intestinal y/o afectar de diferentes formas a los transportadores específicos del tracto gastrointestinal modificando de así la permeabilidad.

Algunos excipientes pueden alterar la membrana intestinal. Este efecto puede ser porque afecten las uniones intercelulares o por interacción con los lípidos de la membrana, lo que provoca cambios en sus propiedades físicas y funcionales (113). Tal es el caso de los surfactantes que reducen la viscosidad de la membrana e incrementan su

Introducción

elasticidad por lo que incrementan la absorción de compuestos por las vías paracelular y transcelular (114,115). El lauril sulfato de sodio incremento la permeabilidad de manitol y otros fármacos de baja permeabilidad en una investigación realizada en células Caco-2, por lo que los autores sugieren que este excipiente provoca la ruptura de la uniones intercelulares bajo las condiciones de estudio (116).

Concentraciones muy bajas de PEG 400 mejoran la absorción de Ranitidina, posiblemente por modulación de la permeabilidad intestinal (117).

Takizawa y colaboradores estudiaron el efecto de diferentes excipientes sobre la permeabilidad de la membrana intestinal, usando el método *in vitro* del saco invertido en yeyuno e íleon de rata, encontrando que metil- β - ciclodextrina, carboximetil almidón sódico, hidroxipropilcelulosa y croscarmelosa sódica incrementaron la permeabilidad de 5(6)-carboxifluoresceina (marcador de transporte paracelular) en yeyuno, pero sin cambios en la permeabilidad de dicho compuesto en el íleon. Por otro lado, estos autores confirmaron que hidroxipropilcelulosa en concentración de 0,02% (m/V) disminuía la permeabilidad en yeyuno e íleon de 5(6)-carboxifluoresceina, mientras que a una concentración de 0,20% (m/V) la permeabilidad se veía incrementada significativamente. De acuerdo a sus resultados, se puede deducir que algunos excipientes pueden modificar la permeabilidad de fármacos que se absorben por la vía paracelular, siendo más susceptible el yeyuno que el íleon a tal efecto (118).

El transporte del manitol se realiza principalmente por vía paracelular por lo que se usa como marcador de la integridad de las uniones intercelulares en ensayos con células Caco-2, por esta razón este excipiente puede competir con cualquier fármaco que se absorba por vía paracelular y puede detectar cambios en las uniones intercelulares (113).

El bicarbonato de sodio demostró ser capaz de modificar la interacción que ocurre entre la Fluvastatina sódica con los fosfolípidos de la membrana, lo que pone de manifiesto que este excipiente puede cambiar las interacciones entre el fármaco y los lípidos de la membrana, involucradas en el transporte pasivo de la Fluvastatina (119).

EDTA, que se emplea como conservador en algunas formulaciones puede acomplejar el calcio extracelular, que está implicado en la regulación de las uniones intercelulares, y por tanto aumentar la permeabilidad paracelular en el intestino de fármacos de pequeño tamaño (113,120,121).

Como se mencionó previamente, los transportadores son proteínas que median el flujo transcelular de xenobióticos y nutrientes. La interacción de un transportador con un compuesto depende de sus propiedades fisicoquímicas. Algunos excipientes pueden influir en la actividad de los transportadores y por tanto en la absorción de ciertos sustratos. Algunos excipientes pueden alterar el transporte activo de absorción o el de secreción que intervienen en la absorción de fármacos, tales como agentes anticancerosos, antibióticos y antivirales; lo que puede conllevar a fallos terapéuticos o a efectos secundarios tóxicos, especialmente en el caso de fármacos de estrecho margen terapéutico (113).

También se ha visto que los surfactantes, al alterar la fluidez de la membrana de los enterocitos intestinales, modifican también el microambiente de la célula y de ese modo dificultan la acción de los transportadores específicos. Esto se debe a que dificultan el reconocimiento de los sustratos por parte de las proteínas transportadoras y a que pueden dificultar actividad del ATP necesario para el transporte activo, ya sea absorción o secreción (122).

Introducción

El Polisorbato 80, como surfactante no iónico, actúa sobre la membrana celular apical. Este cambio demostró un incremento significativo de la Biodisponibilidad de Digoxina en ratas. El aumento tanto en el AUC como en el C_{max} fue atribuido a la inhibición de la P-gp (transportador de secreción) debido a la alteración de la membrana (123).

Los poliacrilatos (polímeros acrílicos) pueden actuar como tensoactivos o quelantes. Se ha demostrado que estos compuestos pueden acomplejar cationes bivalentes como son el zinc y el calcio. Este hecho hace que estos compuestos puedan prevenir o impedir la asociación de estos iones con las proteínas transportadoras y de este modo impedir la actividad de las mismas (124).

El D- α -tocoferil polietilenglicol succinato (125) y el colecalciferol polietilenglicol succinato (126) son derivados de la vitamina E que parecen ser capaces de inhibir la actividad secretora de la P-gp en células Caco-2, aumentando de esta forma la absorción de los sustratos de la misma como son, Doxorubicina, Vinblastina y Paclitaxel.

Al inhibir el proceso secretor el aumento de la biodisponibilidad puede ser muy elevado, como es el caso del aumento en la biodisponibilidad de Digoxina (sustrato de P-gp) al administrarla junto al aceite de ricino hidrogenado PEG-40 (CremophorTM RH40). El aumento en la biodisponibilidad es del 20% en comparación a la formulación sin este surfactante (127).

Al inhibir un transporte activo, los excipientes pueden influir en más de una forma al mismo tiempo. Ejemplo de esto son los copolímeros en bloque como Pluronic[®], surfactantes no iónicos capaces de inhibir el proceso secretor de P-gp y MRP. Estos compuestos no solo bloquean la actividad de la ATPasa de las proteínas transportadoras, sino que también producen una disminución del ATP intracelular disponible (128).

Otro excipiente que ha demostrado tener un efecto sobre el transportador P-gp es el PEG. La acción secretora de P-gp en presencia de su sustrato Rodamina 123 disminuye de forma significativa al administrarla en intestino de rata (cámara de difusión) en presencia de; PEG400, 2000 y 20000. El efecto observado es dependiente de la concentración, de 0,1 a 20% (m/V). Sin embargo, la disminución en el proceso secretor en ese modelo experimental solo se tradujo en un aumento de la absorción en un modelo *in situ* por el efecto de PEG20000 no viéndose afectado por el resto de polímeros (129).

Uekama y colaboradores demostraron que las ciclodextrinas inhiben la función de ciertos transportadores de secreción como son la P-gp y el transportador MRP2 en modelos celulares de Caco-2 (130). Además, demostraron que la 2,6-di-O-metil- β -ciclodextrina inhibe el transporte de secreción de las proteínas antes mencionadas en modelos animales de rata, aumentando la biodisponibilidad oral de Tacrolimus (131). El mecanismo que se atribuye a esta alteración es que la liberación de colesterol de la monocapa podría ser la responsable de la disminución de la actividad de estos transportadores en las caveolas de la membrana (130,132).



1.6. Modelos Experimentales para Estudiar la Disgregación

El proceso de disgregación es un paso integral para garantizar, y de hecho maximizar, la biodisponibilidad del principio activo de la mayoría de las formas de dosificación sólidas. En los comprimidos, la humectación y la posterior disgregación del polvo compacto es el primer paso hacia la liberación del API de la forma de dosificación. Sin disgregación, solo el API cerca de la superficie del comprimido podría disolverse y, por lo tanto, la disgregación reproducible y completa del comprimido tras la exposición al medio de disolución es de importancia crítica para lograr un rendimiento clínico confiable de la forma de dosificación.

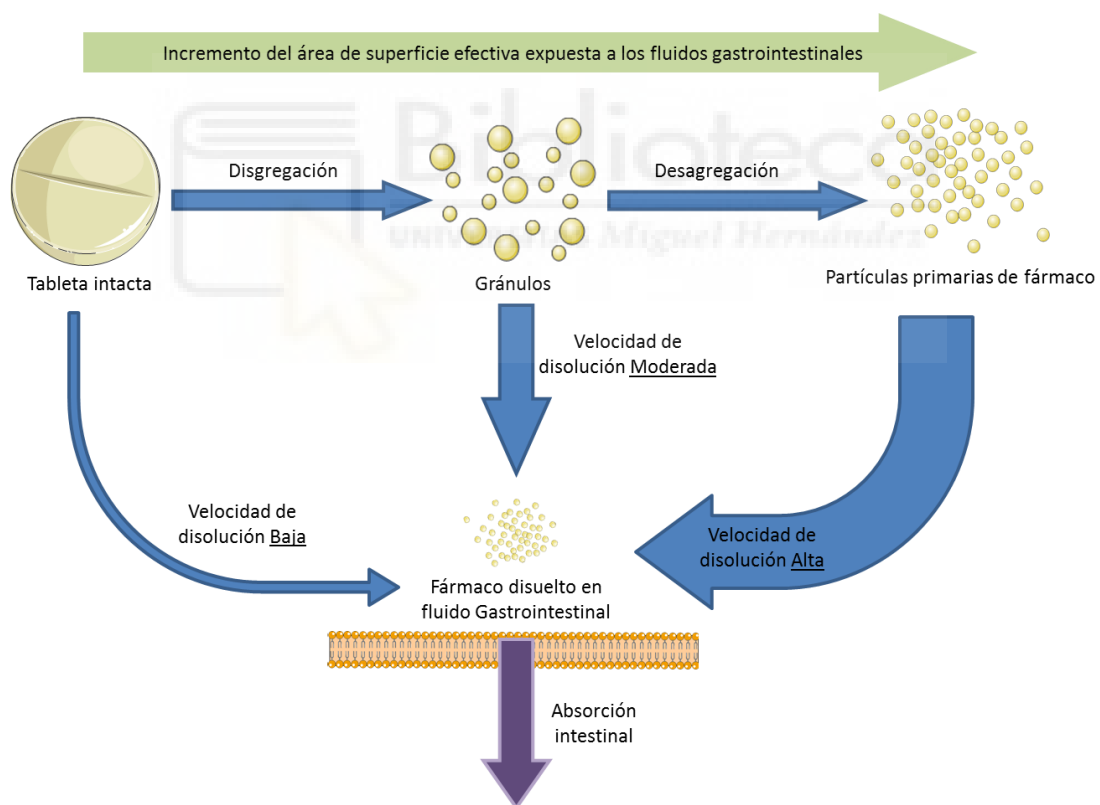


Figura 13. Esquema del proceso de liberación ^{i.o.}.

Introducción

En comparación con otras disciplinas científicas que se ocupan de procesos similares, la comprensión mecanicista de la disgregación farmacéutica plantea una serie de problemas importantes:

- Existe una enorme variedad de matrices de interés en disgregación. Esencialmente, cada formulación de comprimido es única desde un punto de vista químico dado el amplio rango de propiedades de los API y la amplia gama de excipientes que son de uso común.
- Algunas formulaciones contienen excipientes que se hinchan significativamente a lo largo del tiempo con la exposición al medio de disolución, dando como resultado una dependencia fuertemente lineal y no lineal del proceso de hinchamiento.
- La ruta del proceso de elaboración (compactación directa, granulación seca o húmeda, condiciones de compactación) tiene un impacto significativo en la microestructura del comprimido y los cambios en estos parámetros son comunes durante el proceso de desarrollo farmacéutico. En muchos casos, la microestructura final de la forma de dosificación solo se define por el desarrollo del proceso de escala de producción justo antes de que el producto se produzca comercialmente y donde ya no son posibles cambios significativos en la formulación dados los requisitos de presentación reglamentaria.
- Los cambios en las propiedades físicas del excipiente suministrado tradicionalmente no han sido tan estrictamente controlados en comparación con la calidad química y los perfiles de impurezas. Además, diferentes lotes de API pueden presentar cambios en el tamaño de partícula y la morfología.

- Antes de las iniciativas de calidad por diseño (QbD) los cambios en los parámetros del proceso durante la producción comercial de un producto comercializado eran extremadamente costosos y, por lo tanto, una mejor comprensión de la microestructura de la forma de dosificación no era una gran ventaja comercial para la industria y por tanto la disgregación fallida se descartaba.

La disgregación se refiere a la ruptura mecánica de un comprimido comprimida en pequeños gránulos durante la ingestión y, por lo tanto, se caracteriza por la ruptura de los enlaces interparticulares, que se forjaron durante la compactación del comprimido. Por lo tanto, es un buen punto de partida para reflexionar brevemente sobre los cambios físicos que tienen lugar durante el proceso de compactación:

- Reordenamiento de partículas,
- Deformación elástica,
- Deformación plástica
- Fragmentación de partículas
- La formación de enlaces interparticulares (133)

El primer y a menudo el paso determinante de la velocidad en la disgregación es la penetración de líquido en el compacto de polvo poroso. La penetración del líquido no aumenta directamente la presión que es necesaria para romper los enlaces partícula-partícula, pero es un requisito previo para iniciar otros mecanismos como el hinchamiento.

Introducción

El hinchamiento es la ampliación omnidireccional de las partículas, que aumenta la presión, separa las partículas adyacentes, provoca tensiones en los sistemas generales y finalmente disgrega el comprimido (86). El fluido de disolución en sí mismo ejerce una fuerza en los poros del comprimido, pero esta fuerza, en solitario, puede ser demasiado baja para ser efectiva, particularmente si los enlaces entre las partículas sólidas son fuertes. Sin embargo, en presencia de un disgregante, las fuerzas ejercidas por el fluido se vuelven lo suficientemente apreciables como para destruir el comprimido (134).

La tensión dentro del comprimido es la consecuencia de forzar macromoléculas en una configuración metaestable debido al entrelazado de las cadenas del polímero o como resultado de la cristalización espontánea durante la compactación de un comprimido. La hidratación del polímero da lugar a una movilidad suficiente para la recuperación de la entropía y, con eso, a la recuperación de la forma original de las moléculas del polímero (135,136). Por lo tanto, la recuperación de deformación puede considerarse como el proceso de deformación viscoelástico reversible (137). Es unidireccional y en la dirección opuesta a la fuerza de compresión aplicada.

La absorción del agua da como resultado una temperatura de transición vítrea (T_g) reducida del polímero, que puede afectar la cinética de hinchamiento o recuperación de la tensión. La cinética de hinchamiento cambia de primer orden a segundo, ya que la T_g se cruza durante la hinchazón y la hidratación y se alcanza un equilibrio cuando la presión de hinchamiento es igual a la recuperación elástica de la red hinchada (138,139). Los altos grados de cristalinidad de los polímeros de hinchamiento pueden por lo tanto frenar o incluso prevenir la disgregación. Además, se pueden disolver los excipientes de la corteza, aumentando la porosidad y por tanto la disgregación.

Por todas estas razones la viscosidad del medio y la estructura de los poros puede cambiar a lo largo del tiempo.

La disgregación se logra mediante la penetración del fluido fisiológico en el polvo compacto y la subsiguiente interrupción de los enlaces partícula-partícula que mantienen la integridad estructural de la forma de dosificación. Por lo tanto, la penetración de líquidos es uno de los pasos clave involucrados en el proceso de disgregación. La velocidad de penetración del líquido en una matriz porosa es impulsada por la interacción entre las fuerzas capilares que promueven el movimiento del fluido hacia el interior y las fuerzas viscosas que se oponen al movimiento del líquido. La retención y el flujo de líquido en medios porosos insaturados, donde los poros se llenan con líquido y aire, son así impulsados por el equilibrio entre la cohesión entre las moléculas líquidas y la adhesión entre las moléculas líquidas y las superficies de partículas (140).

Por lo tanto, se asume que el proceso de absorción en los comprimidos de liberación inmediata es impulsado por la acción capilar (141). La acción capilar es un fenómeno bien estudiado debido a sus numerosas aplicaciones, como en ingeniería petrolera, en hidrología (por ejemplo, movimiento de aguas subterráneas), en productos de consumo (por ejemplo, rotuladores, mechas de velas y esponjas) o en plantas (por ejemplo, transporte de agua desde las raíces hasta las hojas). Los modelos matemáticos han estado bien establecidos durante algún tiempo para describir el flujo volumétrico en un medio poroso. Al combinar las ecuaciones de Hagen-Poiseuille y Young-Laplace, dos de estas expresiones que son bien conocidas en dinámica de fluidos, la siguiente expresión para el flujo volumétrico q del fluido en función de la penetración la profundidad, L , se puede derivar (142):

Introducción

$$q = -\frac{1}{4} \cdot \frac{\gamma}{\eta} \cdot \cos\theta \cdot \frac{1}{\tau} \cdot \sum_{j=1}^M \Delta\beta_j \frac{R_{h,j}^2}{R_{c,j}} \cdot \frac{1}{L_j}$$

Ecuación 7

Las propiedades relevantes del fluido son la tensión superficial, γ y la viscosidad, η . El ángulo de contacto θ , (humectabilidad), es una propiedad del fluido / matriz y las propiedades relevantes de la matriz sólida son la distribución del tamaño de los poros, $\Delta\beta$, y la tortuosidad, τ . R_h es el radio hidrodinámico y R_c es el radio capilar, que es visto por el menisco líquido. La fuerza capilar permanece razonablemente constante, mientras que las fuerzas viscosas aumentan con la penetración causando una disminución en la tasa global de penetración a medida que avanza la saturación. Sin embargo, las fuerzas viscosas a lo largo del sistema de poros alterados pueden disminuir debido a una interrupción de las partículas y esto, a su vez, puede llevar a un aumento en la tasa de penetración. Al mismo tiempo, las fuerzas capilares pueden permanecer invariables, ya que la curvatura del menisco del frente del líquido que avanza está gobernada por el sistema de poros secos y sin interrupciones (143). En contraste, la fuerza capilar está influenciada por la hidrofilia (relacionada con el ángulo de contacto) de los excipientes, discutida por Guyot-Hermann y Ringard (144). Aquí se destacó la importancia de los excipientes hidrofílicos suficientemente bien distribuidos en un comprimido. Tales excipientes pueden transportar líquido desde la superficie hacia el centro para acelerar la disgregación. Aunque las propiedades físicas del fluido y la estructura de los poros influyen tanto en las fuerzas capilares como en las viscosas, una vez que se seleccionan los excipientes, los formuladores de comprimidos solo pueden controlar la estructura de los poros, ya que las propiedades físicas del líquido de disgregación generalmente no son variables libres (exhibirá una gama de viscosidades y comportamientos de humectación).

En la práctica farmacéutica, la estructura de poros a menudo solo se describe por la porosidad total, que es la fracción del volumen de huecos sobre el volumen total y, por lo tanto, es una medida del espacio vacío en el material. Se demostró que la porosidad del comprimido es uno de los contribuyentes más importantes para el rendimiento de disgregación (145) y que depende en gran medida de la fuerza de compactación y la velocidad de compresión (146–151). En general, los poros pequeños disminuyen la capacidad de un fluido para entrar en el polvo compacto, mientras que una alta porosidad, asociada a un gran espacio vacío, puede disminuir la fuerza inducida por la hinchazón de los excipientes. Por lo tanto, una menor fuerza de hinchamiento aumenta el tiempo para romper los enlaces entre partículas (152,153). Sin embargo, la compleja estructura de poros no puede representarse adecuadamente por un solo parámetro, como la porosidad total. Los medios porosos pueden describirse con mayor precisión mediante una combinación de parámetros tales como la longitud característica (radio de poro efectivo en el medio poroso), un factor de constricción (fluctuación en los radios hidrodinámicos locales), una tortuosidad (longitud efectiva de las líneas de flujo) y una porosidad efectiva (relación entre el volumen de los poros conductores y el volumen total). La longitud característica, la tortuosidad y el factor de constricción son descriptores dependientes de la dirección de la estructura de los poros, y un comportamiento de permeabilidad anisotrópica de los compactos de polvo no es infrecuente (154–157). En línea con tal comportamiento, se demostró en varios estudios que la densidad de las matrices de los comprimidos a menudo se distribuye de manera desigual (es decir, la densidad aumenta con el radio para los comprimidos biconvexos estándar) (158–160).

Ganderton y Fraser (143) estudiaron la interdependencia entre la permeabilidad de un comprimido y su estructura de poros, y por lo tanto la porosidad, para diferentes formulaciones que van desde Aspirina, lactosa, carbonato de magnesio, fosfato de calcio

Introducción

a Fenindiona y comprimidos de sacarosa. Destacaron el impacto de la presión de compactación del comprimido, el tamaño de las partículas y la granulación en la porosidad y la permeabilidad. En particular, informaron que se formaron estructuras casi impermeables a partir de partículas finas de Aspirina y Fenindiona que dieron como resultado la tasa de penetración de agua más baja. En contraste, las formulaciones que contienen lactosa dieron como resultado los comprimidos más permeables y produjeron la penetración más rápida de líquidos.

Como ya se mencionó anteriormente, la composición del fluido puede influir significativamente en la disgregación de los compactos en polvo (161). Los medios biorrelevantes difieren considerablemente en viscosidad, ángulo de contacto y tensión superficial y, por lo tanto, la cinética de penetración del líquido se ve afectada por la elección del medio (162). La mayoría de los estudios se centraron en usar agua como medio de disgregación y, por lo tanto, pueden carecer de relevancia fisiológica, ya que la mayoría de los comprimidos están diseñadas para disgregarse en el jugo gástrico y no en el agua. Esto ya fue destacado por Abbott y colaboradores en 1959 (163), donde los autores compararon la disgregación de comprimidos comerciales en jugo gástrico simulado con el mismo experimento realizado con jugo gástrico humano combinado. La disgregación *in vitro* se prolongó en el jugo gástrico humano y Abbott y colaboradores asumieron que esto se debió a un cambio en las propiedades del líquido: una mayor viscosidad del medio conduce a una disgregación más lenta y una menor tensión superficial del medio da como resultado, una disgregación más rápida (147,164). Un fluido más viscoso puede promover la adhesión entre partículas más grandes y, por lo tanto, contrarrestar el mecanismo de hinchamiento de los disgregantes. Además, dependiendo de la temperatura, se sabe que algunos disgregantes forman un gel cuando se hidratan (165–167). Cualquier fase de gel se forma *in situ* y llenará directamente los

macroporos de la matriz disgregadora y, por lo tanto, ralentizará la penetración del líquido.

Si bien el rendimiento de un comprimido está fuertemente influenciado por las propiedades de la materia prima (168), es importante resaltar el impacto significativo de la ruta de procesamiento y los parámetros de procesamiento en la dosificación de la microestructura, y a su vez el comportamiento de disgregación (169,170).

Tradicionalmente, el parámetro clave para evaluar el rendimiento de un medicamento es estudiar la cinética de disolución. La disolución puede ocurrir simultáneamente con la disgregación, aunque en la mayoría de los casos se refiere a la disolución después de la disgregación. Sin embargo, la disgregación y la disolución están interrelacionadas y ambos procesos deben considerarse cuando uno evalúa y desea mejorar el rendimiento del fármaco. La optimización del rendimiento del fármaco mediante la modificación de los procesos de disgregación es específicamente importante para el número creciente de candidatos de fármaco poco solubles, donde la disolución es principalmente el paso limitante de la velocidad en la absorción del fármaco (57,171).

Los cambios en los tiempos de disgregación pueden ser responsables de los diferentes perfiles de disolución observados en diferentes medios. Los cambios en la viscosidad de los medios pueden influir significativamente en los tiempos de disgregación de los comprimidos a través de cambios en las tasas de penetración de líquidos (172).

Se obtuvo una relación exponencial al trazar la diferencia en el tiempo de disgregación entre las condiciones estáticas y móviles en comparación con el número de Reynold:

Introducción

$$\Delta \text{Tiempo de desintegración } (\Delta dt) = dt_{\text{estatico}} - dt_{\text{dinámico}} = 153Re^{0.435}, R^2 = 0.91$$

Ecuación 8

$$dt_{\text{dinámico}} = dt_{\text{estatico}} - \Delta dt$$

Ecuación 9

Basándose en esta ecuación, se puede predecir el efecto de la hidrodinámica de los medios en el tiempo de disgregación del comprimido (Δdt). Sin embargo, no es posible predecir los tiempos de disgregación dinámica absoluta de las formas de dosificación sólidas como tales. Según la ecuación (9), la predicción del tiempo de disgregación dinámica ($dt_{\text{dinámico}}$) requiere el conocimiento del número de medios de Reynold y los tiempos de disgregación estática (dt_{estatico}). El número de Reynold se puede calcular teóricamente usando la ecuación. 10 (173).

$$Re = d \cdot v \cdot \rho / \mu$$

Ecuación 10

donde d es el diámetro del comprimido; v es la velocidad lineal del fluido; ρ es la densidad del fluido y μ es la viscosidad del fluido. Los valores de densidad ρ y viscosidad μ de los diferentes medios a 37 °C.

Sin embargo, es difícil predecir el tiempo de disgregación estática, ya que se ve afectado por factores cualitativos como la interacción en la superficie del comprimido y la composición del comprimido, cuyo efecto aún es difícil de predecir.

1.6.1. Modelo de Disgregación USP

La primera prueba oficial de disgregación se publicó en la farmacopea suiza en 1934 (174).

Un cono de 100 ml se llenaba con 50ml de agua y se agitaba periódicamente. El tiempo de disgregación tenía que ser 15min o menos.

Se han ido desarrollando nuevos métodos a lo largo de los años y se han cambiado las condiciones (cambiando los medios, las condiciones de agitación los propios tubos (175,176) o mallas (177) etc. Pero el experimento exigido por las guías (178–180) no difiere mucho del de 1934.

El comprimido se coloca dentro de un tubo de extremo abierto en una malla de alambre que se ajusta en uno de sus extremos. El tubo con el comprimido se monta entonces de manera que se puede subir y bajar periódicamente en un vaso de precipitados de 1 litro de agua, jugo gástrico simulado o fluido intestinal simulado a 37 ± 2 ° C durante un tiempo predeterminado. Después del período de exposición, se verifica la presencia de la muestra en el tubo. Si todavía hay un núcleo palpable, se considera que la prueba ha fallado.

Introducción

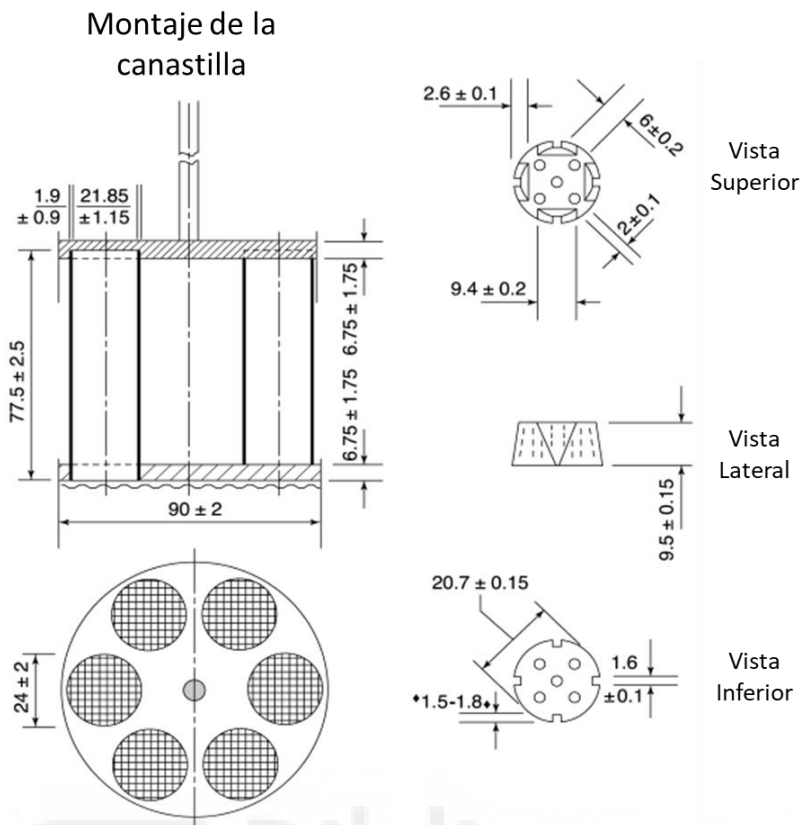


Figura 14. Esquema aparato de disgregación de la USP (distancias en mm). Imagen tomada de la USP (179).

Aunque la prueba es adecuada en general para establecer si un comprimido se disgrega completamente o no durante un período de exposición dado, o cuánto tiempo se requiere para disgregar un comprimido, dicha prueba de disgregación tradicional no proporciona ninguna idea del mecanismo de disgregación del comprimido.

Durante la digestión gástrica, fuerzas mecánicas nada despreciables actúan sobre objetos sólidos, partículas de alimentos o formas de dosificación, lo que provoca su disgregación. Los test y aparatos de las farmacopeas no son capaces de predecir la disgregación *in vivo*. Por lo tanto, todavía hay necesidad de pruebas nuevas y simples que proporcionen condiciones hidrodinámicas diferentes y controlables para permitir la prueba de disgregación biorrelevante, especialmente porque hay evidencia creciente de

la importancia de la caracterización de disgregación en el desarrollo de formas de dosificación sólidas y control de calidad.

En resumen, se puede concluir que el dispositivo actual para medir la disgregación de formas de dosificación sólidas no está diseñado de manera óptima para reproducir la situación *in vivo* en términos de presiones y fuerzas relativas (181). Con respecto a la comparación de las velocidades del fluido *in vitro* frente a *in vivo*, esto se ve obstaculizado por los pocos datos *in vivo* disponibles. Es necesario un sistema *in vitro* mejor diseñado para predecir las condiciones *in vivo*, incluida una relación sistemática entre las variables físicas, por ejemplo, flujo hidrodinámico y fuerzas destructivas y disgregación de formas de dosificación sólidas orales.

1.6.2. Modelo de Disgregación Modificado

El dispositivo de prueba de disgregación modificado representa un derivado mejorado del compendio de los aparatos PhEur / USP. Se pretende investigar el efecto de las condiciones hidrodinámicas en los tiempos de disgregación de la forma de dosificación sólida oral. Similar al dispositivo de la USP, el sistema modificado comprende la cámara de la sonda, un vaso de precipitados para acomodar el medio de prueba y un baño de agua termostático (Figura 15a). Este sistema se ha desarrollado en el Departamento de Tecnología Farmacéutica y Biofarmacia de la Universidad Johannes Gutenberg de Mainz bajo la dirección del Prof. Peter Langguth.

Introducción

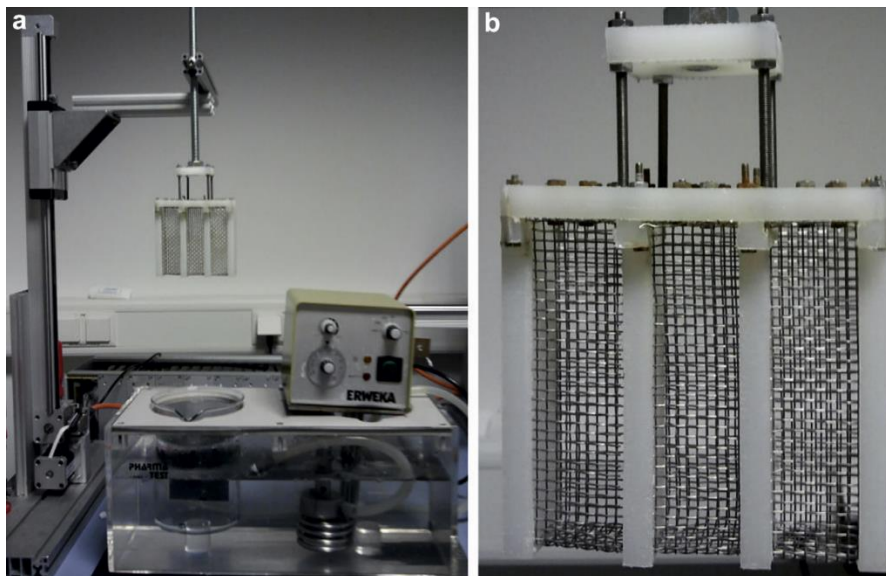


Figura 15. Dispositivo de disgregación modificado (182). Foto tomada en la Universidad Johannes Gutenberg de Mainz, cortesía del Prof. Peter Langguth.

Sin embargo, la cámara de la sonda fue modificada. El conjunto compendio de cestas y canastas descrito en las farmacopeas comprende 6 tubos de vidrio de extremo abierto dispuestos de forma circular, limitados por una malla de alambre en la parte inferior. Este diseño restringe el fluido a los tubos y no permite el flujo de fluido horizontal. El contenedor de sonda construido internamente del dispositivo modificado consta de 3 cámaras de sonda cuadráticas (dimensiones: 22 _ 25 mm, paredes sólidas hechas de polietileno). La parte inferior y la parte frontal y posterior están construidas con una malla de alambre (tamaño de malla: 2 mm; EKA, Bergisch Gladbach, Alemania) que permite el flujo de fluidos de 2 lados (Figura 15b).

Además de estas modificaciones se ha añadido un brazo robótico capaz de realizar movimientos programables en las tres dimensiones del espacio (Figura 16), lo que abre un amplio abanico de posibilidades a estudiar.

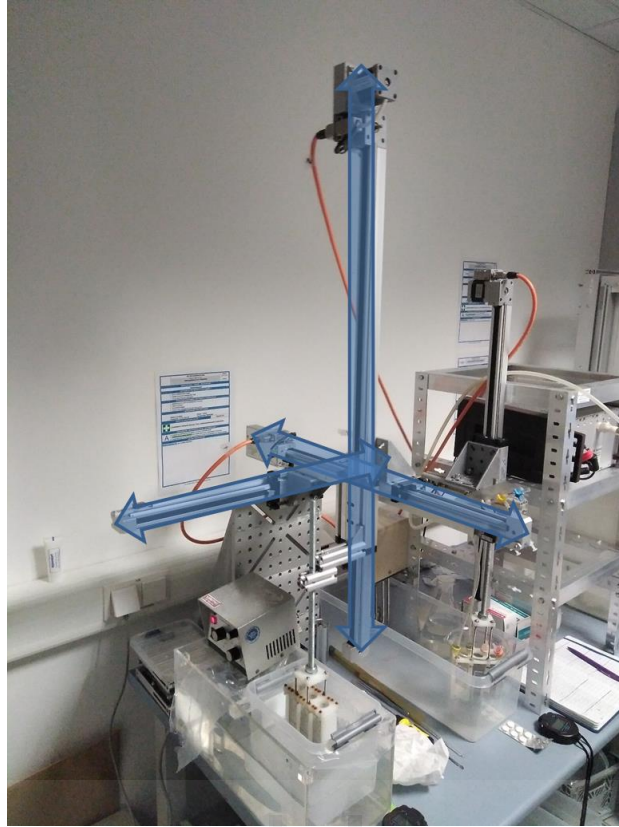


Figura 16. Aparato de disolución modificado 3D (182). Foto tomada en la Universidad Johannes Gutenberg de Mainz, cortesía del Prof. Peter Langguth.

En conclusión, el nuevo probador de disgregación permite pruebas de disgregación *in vitro* bajo condiciones hidrodinámicas ajustables y controlables (182).



1.7. Modelos Experimentales para Estudiar el Proceso de Disolución

La absorción de un fármaco desde una forma de dosificación sólida tras la administración oral depende de la liberación de la sustancia medicinal del producto, la disolución o solubilización del fármaco bajo condiciones fisiológicas y la permeabilidad por el sistema gastrointestinal. Debido a la naturaleza crítica de estos primeros dos pasos, la disolución *in vitro* es relevante para la predicción del rendimiento *in vivo*. En base a esta consideración general, se utilizan las pruebas de disolución *in vitro* para las formas de dosificación oral sólidas, como comprimidos y cápsulas (183).

La primera referencia sobre disolución consta de 1897 por parte de Noyes y Whitney (184). En este artículo fue la primera vez que se destacó la importancia del proceso de disolución y se presentó la ecuación Noyes Whitney 11:

$$dM/dt = -kA * (C_s - C)$$

Ecuación 11

donde dM/dt representa la velocidad de disolución, A es el área superficial del fármaco expuesto al medio de disolución, C_s es la concentración a saturación (solubilidad), C es la concentración del fármaco a tiempo t y k es la constante de disolución.

En 1904 Nernst y Brunner modifican la ecuación de Noyes-Whitney y aplican la “Ley de difusión de Fick”. Establecen la relación entre la constante de velocidad de disolución y el coeficiente de difusión.

$$dC/dt = \frac{D * A * K_{w/o} * (C_s - C_b)}{V * h}$$

Ecuación 12

Introducción

donde dC/dt es la velocidad de disolución, D es el coeficiente de difusión, A el área superficial del sólido, $K_{W/O}$ es el coeficiente de partición agua/lípido, V el volumen del medio, h es el espesor de la capa estancada y $C_s - C_b$ es el gradiente de concentración.

En 1931 Hixon y Crowell desarrollan la ley de difusión con raíz cúbica. La ecuación esta expresada en función del área superficial y de la concentración. La agitación es la misma en toda la superficie de la partícula y la forma es esférica a lo largo de todo el proceso de disolución.

$$M_o^{1/3} - M^{1/3} = K * t$$

Ecuación 13

donde M_o es la masa original de las partículas, M la masa a tiempo t y K es la constante de disolución.

Otro modelo bien conocido es el de la cinética de orden cero. Se puede observar en los casos donde se disuelve una pequeña cantidad de producto sólido en un gran volumen de disolvente, aquí la velocidad es constante con el tiempo e independiente de la concentración del soluto.

$$Q_t = Q_0 + K_0 * (t - t_0) \quad ; \quad \frac{dQ_t}{dt} = -K_0$$

Ecuación 14

donde Q_t es la cantidad de fármaco disuelta a tiempo t , Q_0 es la cantidad inicial de soluto en disolución (en la mayoría de los casos $Q_0=0$) y K_0 es la constante de orden 0. Se puede

utilizar para formas de dosificación que no disgreguen y bajo la hipótesis que la superficie permanece constante durante la liberación del fármaco

Por otro lado, está la cinética de primer orden. A medida que el fármaco en estado sólido va disminuyendo, la solución se va enriqueciendo con el soluto. Al ir aumentando la concentración en la solución, la velocidad está en función de la concentración del fármaco disuelto.

$$Q_t = Q_0 * (1 - e^{-Kd(t-t_0)}) \quad ; \quad \frac{dQ_t}{dt} = Q_0 * K_0 * e^{-Kd(t-t_0)}$$

Ecuación 15

La liberación del fármaco es proporcional a la cantidad de fármaco que permanece en la forma de dosificación. La velocidad de liberación disminuye con el tiempo.

Otro modelo algo más complejo es el modelo de Weibull. El modelo se aplica generalmente a la disolución o liberación de fármacos a partir de formas de dosificación farmacéutica. La fracción acumulada del fármaco M en solución en el momento t viene dada por la ecuación de Weibull.

$$Q_t = Q_0 * (1 - e^{-(t-t_0)^{b/a}}) \quad ; \quad \frac{dQ_t}{dt} = \frac{Q_0 * b * (t - t_0)^{b-t} (e^{-(t-t_0)^{b/a}})}{a}$$

Ecuación 16

donde (a) nos define el tiempo del proceso, y representa el tiempo necesario para disolverse el 63.2% del fármaco en la forma de dosificación y (b) es un parámetro de forma.

Introducción

A la hora de seleccionar el modelo que mejor represente nuestros datos existen varias pruebas estadísticas que nos ayudarán a tomar la decisión. La más conocida es el Criterio de Akaike que viene definido por la ecuación 17:

$$AIC = n * \ln(SSR) + 2p$$

Ecuación 17

donde n es el tamaño muestral, SSR es la suma de cuadrados residuales entre los datos experimentales y los predichos y p es el número de variables del sistema. A menor AIC mejor es el modelo.

Por otro lado, está la prueba F, que se expresa en la ecuación 18:

$$F_{cal} = \frac{SSR1 - SSR2 * \left(\frac{df2}{df1} - df2\right)}{SSR2}$$

Ecuación 18

donde SSR1 es la suma de cuadrados residuales del modelo 1, SSR2 es la suma de cuadrados residuales del modelo 2, df1 es la diferencia entre el número de puntos y el número de parámetros del modelo 1 y df2 es la diferencia entre el número de puntos y el número de parámetros del modelo 2. Si F_{cal} es superior a F tabulada se considera que el modelo más complejo es mejor, de lo contrario se elegirá el modelo más simple.

Por otro lado, aparte de elegir el mejor modelo de disolución también es necesaria una comparación de perfiles de disolución.

Entre los varios métodos investigados para la comparación de perfiles de disolución, f2 es el más simple. Moore y Flanner propusieron un modelo de enfoque

matemático independiente para comparar el perfil de disolución utilizando dos factores, f_1 y f_2 (185).

$$f_1 = \left\{ \frac{[\sum_{t=1}^n n|R_t - T_t|]}{[\sum_{t=1}^n nR_t]} \right\} * 100$$

Ecuación 19

$$f_2 = 50 * \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n n(R_t - T_t)^2 \right] - 0.5 * 100 \right\}$$

Ecuación 20

donde R_t y T_t son el porcentaje acumulado disuelto en cada uno de los n puntos de tiempo seleccionados del producto de referencia y de prueba, respectivamente. El factor f_2 mide la cercanía entre los dos perfiles. Debido a la naturaleza de la medición, f_1 se describió como factor de diferencia y f_2 como factor de similitud. En las comparaciones de perfiles de disolución, especialmente para asegurar la similitud en el rendimiento del producto, el interés regulador está en saber qué tan similares son las dos curvas, y tener una medida que sea más sensible a grandes diferencias en cualquier momento específico. Por esta razón, la comparación de f_2 ha sido el enfoque en las guías de las agencias (186).

Cuando los dos perfiles son idénticos, $f_2 = 100$. Una diferencia promedio del 10% en todos los puntos de tiempo medidos da como resultado un valor f_2 de 50. La FDA ha establecido un estándar público de valor f_2 entre 50-100 para indicar la similitud entre dos perfiles de disolución.

Introducción

Para una comparación de perfiles de disolución:

- Las mediciones de disolución de los dos productos deben realizarse bajo las mismas condiciones de prueba. Los puntos de tiempo de disolución para ambos perfiles deben ser los mismos, por ejemplo, para los productos de liberación inmediata 15, 30, 45 y 60 minutos, para los productos de liberación prolongada 1, 2, 3, 5 y 8 horas.
- Debido a que los valores f_2 son sensibles al número de puntos de tiempo de disolución, se debe indicar con anterioridad que criterio se va a aplicar y será el mismo para las dos formulaciones
- Para los productos que se disuelven rápidamente, es decir, más del 85% en 15 minutos o menos, no es necesaria una comparación de perfil.
- Un valor f_2 de 50 o mayor (50-100) garantiza la igualdad o equivalencia de las.

1.7.1. Métodos *in vitro* de la USP

El aparato de cesta (USP I) y paleta (USP II) se introdujo por primera vez en la Farmacopea de los Estados Unidos en la década de 1970 para evaluar las características de disolución de los medicamentos orales (171). Se han utilizado principalmente para cumplir una función de control de calidad para probar una variedad de formas de dosificación oral (187) y proporcionan un gran volumen para que una forma de dosificación se disuelva en un ambiente bien agitado (7). Las pruebas de disolución que utilizan el aparato USP I o USP II se llevan a cabo bajo diversos parámetros y condiciones, incluidas las variaciones en la hidrodinámica, el tipo y el volumen del medio de disolución (188). Típicamente, los volúmenes utilizados en el aparato de cesta / paleta varían de 500 a 1000 ml y estos grandes volúmenes a menudo son útiles para generar las

condiciones requeridas para lograr una disolución completa. Sin embargo, son muy superiores a los volúmenes en el estómago y el intestino humanos, que no suelen superar los 250 ml en el estómago en ayunas y los 30 a 100 ml en el intestino delgado superior en ayunas (189,190).

Los tampones acuosos utilizados normalmente en los métodos de la USP reflejan la composición de los contenidos del tracto GI en un grado limitado. Esto puede llevar a una mala interpretación del perfil de disolución *in vivo*, donde podría ocurrir sobresaturación, precipitación y redisolución. Además de los tampones de la farmacopea, se pueden usar diferentes niveles de medios biorrelevantes para simular la composición de los fluidos GI. Los medios Biorrelevantes han demostrado poseer ventajas sobre los medios compendiales al evaluar el comportamiento del fármaco *in vivo* (191–193). Wagner y colaboradores (192) realizaron un experimento que comparó el uso de medios compendiales y biorrelevantes con el aparato USP II para un fármaco básico BCS clase IV según BCS. Se encontró que tiene una solubilidad y una constante de velocidad de disolución mucho mayor en medios biorrelevantes que representan el intestino en ayunas, en comparación con medios simples con el mismo pH. El software STELLA se usó para modelar los perfiles plasmáticos predichos a partir de los datos de disolución y se observó una correlación más fuerte con los datos *in vivo* de los perfiles predichos a partir de los experimentos de disolución utilizando medios biorrelevantes.

El proceso de transferencia desde el estómago a través de diferentes partes del intestino no se tiene en cuenta cuando se utilizan los métodos de disolución compendial USP I y USP II. Este proceso es importante para las formulaciones de liberación inmediata de bases débiles, ya que el fármaco podría precipitarse cuando ingresa en el intestino delgado, y para las formulaciones de liberación modificada, que generalmente

Introducción

están diseñadas para administrar el fármaco en sitios distales y proximales del tracto gastrointestinal.

1.7.2. Modelos *in vitro* Simulando el Tracto Gastrointestinal

Los modelos gástricos y de intestino delgado se utilizan cada vez más como una alternativa a los ensayos *in vivo* para responder a muchas preguntas planteadas por la industria y los investigadores. Existe una amplia gama de sistemas *in vitro*, desde modelos estáticos monocompartimentales a dinámicos multicompartimentales. Sin embargo, estos modelos requieren un compromiso entre la complejidad tecnológica y la importancia biológica.

Los métodos estándar de USP se aplican habitualmente para estudios de disgregación, disolución y liberación de fármacos, pero implican un entorno estático y cerrado, alejado de la complejidad *in vivo* (7,194). Para investigar más a fondo algunos aspectos de la farmacocinética de medicamentos, este enfoque se mejoró al agregar fuerzas mecánicas (195) o al combinar modelos de disolución y absorción (196). Sin embargo, estos modelos no simulan los cambios continuos en las condiciones luminales que afectan ampliamente la biodisponibilidad del fármaco. Para predecir un mejor rendimiento *in vivo* de las formulaciones orales, se han utilizado modelos dinámicos *in vitro* para investigar el efecto de la forma de dosificación (197,198), el estado de alimentación (198–200), la interacción farmacológica (201) y el tiempo de tránsito (198) sobre la bioaccesibilidad API. Los modelos bicompartimentales son particularmente relevantes cuando se siguen las precipitaciones de fármacos en el intestino o cuando se evalúa el rendimiento de las formulaciones de liberación controlada (7,202).

Aunque los sistemas multicompartimentales siguen siendo más complejos de usar y más costosos que la disolución compendial establecida, generan mejores correlaciones

in vitro - *in vivo* (IVIVC) (203). Su potencial ha sido plenamente explotado en el desarrollo de sistemas innovadores de administración de fármacos basados en microorganismos diseñados genéticamente (204).

Se ha diseñado una amplia gama de sistemas gastrointestinales para estudiar el destino de las sustancias ingeridas por vía oral, desde biorreactores estáticos únicos hasta sistemas multicompartimentales y dinámicos. En comparación con los modelos estáticos, los modelos dinámicos incluyen procesos físico-químicos y mecánicos y cambios temporales en las condiciones lumbales que ocurren *in vivo*.

Posibles sobresaturación o precipitación son parámetros importantes a considerar, ya que pueden afectar significativamente la biodisponibilidad de un ingrediente farmacéutico activo (API). La evaluación de la posible sobresaturación y precipitación es crítica, especialmente en los casos en que el API es una base débil con baja solubilidad acuosa.

Muchos candidatos a fármacos exhiben propiedades fisicoquímicas desfavorables, especialmente en términos de solubilidad y permeabilidad (103,104). En consecuencia, diseñar formulaciones de nuevos candidatos a fármacos se ha vuelto más complicado para los científicos, que necesitan garantizar una biodisponibilidad adecuada del compuesto para lograr el efecto terapéutico deseado en el hombre(205–208). En particular, se entiende ampliamente que los fármacos poco solubles y débilmente básicos pueden precipitarse al llegar al intestino delgado, lo que reduce significativamente la cantidad de fármaco disponible para la absorción del fármaco a través del intestino (209,210). Después de pasar el medicamento débilmente básico disuelto del estómago ácido al duodeno, el medicamento puede volver a convertirse en un estado sólido de la base libre o posiblemente precipitar como una forma que no se haya identificado

Introducción

previamente (por ejemplo, amorfo o polimórfico) y que posee propiedades fisicoquímicas desconocidas(211,212). El conocimiento del que disponemos sobre el comportamiento de precipitación *in vivo* es muy limitado, especialmente se dificulta la predicción precisa del rendimiento *in vivo* en la administración de medicamentos débilmente básicos (213).

Debido a la variabilidad en los valores de pH a lo largo del tracto gastrointestinal humano, los fármacos débilmente básicos tienen una propensión a precipitar. En particular, para compuestos débilmente básicos, la sobresaturación puede ocurrir después de la transferencia del estómago al intestino delgado. Sin embargo, los estados supersaturados son termodinámicamente inestables y el grado de sobresaturación es la fuerza impulsora de la precipitación. La precipitación y la absorción del fármaco son procesos competitivos en el tracto gastrointestinal y los efectos de los excipientes pueden ser de importancia crítica. Desde 1981 hasta finales de 2006, el 38% de las API aprobadas en los Estados Unidos para administración oral fueron moléculas básicas (214) y, como las nuevas entidades farmacológicas tienden a ser moléculas algo más grandes (> 500 Dalton) y más lipófilas, es necesario desarrollar métodos *in vitro* fiables para simular la transferencia del fármaco a través del tracto gastrointestinal y predecir con precisión sus características y cinética de precipitación *in vivo*.

Por otro lado, las formulaciones con características de disolución deficientes han ganado una atención creciente en los últimos años (215). Un ejemplo es la incorporación de la sustancia farmacológica en varios vehículos lipídicos inertes, como los sistemas de administración de fármacos autoemulsionantes / microemulsificantes (SEDDS / SMEDDS), que han demostrado proporcionar una mejora significativa de la biodisponibilidad oral (92).

Para evitar problemas asociados con experimentos con animales, incluidos problemas éticos, incertidumbre sobre la extrapolación a los seres humanos y los costes y compromisos de tiempo asociados con modelos animales preclínicos, se ha establecido una demanda creciente de herramientas *in vitro* e *in silico* que puedan predecir el comportamiento farmacológico *in vivo*. Como resultado, el interés en configuraciones *in vitro* complejas, que consumen menos tiempo y que son capaces de predecir el rendimiento *in vivo*, aumenta.

El objetivo final de las formulaciones bio-habilitantes es mejorar la absorción intestinal. Para lograr esto, los científicos farmacéuticos a menudo desarrollan formulaciones que tienen como objetivo lograr y mantener la sobresaturación, lo que se conoce como el enfoque “de Spring” y el “parachute” (216,217). De esta manera, una mayor cantidad de API está en solución por más tiempo en la parte superior del intestino delgado y, por lo tanto, disponible para la absorción. Los métodos comunes para mejorar la disolución y lograr la sobresaturación incluyen dispersiones en fase sólida, formulaciones a base de lípidos y formulaciones con ciclodextrinas (218–220). A pesar del creciente interés en producir estas formulaciones, todavía hay una falta de comprensión mecánica sobre cómo lograr y mantener un estado sobresaturado intraluminalmente. Por lo tanto, el diseño de estas formulaciones sigue siendo un desafío (221).

En todos los casos, la precipitación de partículas de fármaco puede provocar una absorción deficiente de la API y una biodisponibilidad reducida. En consecuencia, puede poner en peligro tanto la eficacia terapéutica como la seguridad del fármaco. Las precipitaciones pueden contribuir aún más a la gran variabilidad intra e interindividual en la exposición al fármaco que a menudo se detecta durante el desarrollo de nuevos

Introducción

productos farmacológicos (222) y pueden afectar las posibilidades de probar la eficacia en los ensayos clínicos (223).

Actualmente, la supersaturación o precipitación aparente del fármaco *in vivo* se evalúa directamente en la luz humana o indirectamente utilizando perfiles de plasma (de humanos o animales), métodos *ex vivo* o métodos *in vitro*. Los estudios luminales en humanos proporcionan la mejor fuente de información con respecto a la sobresaturación o precipitación de diferentes compuestos (210,224–227). A pesar de la valiosa información obtenida de los métodos luminales e *in vivo* en humanos, así como de estudios *ex vivo*, (228) se considera que, son costosos, requieren mucho tiempo y pueden plantear problemas éticos. Los estudios farmacocinéticos en animales también son una fuente valiosa de información (229), pero las diferencias en las condiciones gastrointestinales entre los seres humanos y el modelo animal pueden ser una fuente importante de error al evaluar la sobresaturación o precipitación. Las metodologías para evaluar la sobresaturación o precipitación de medicamentos *in vitro* permiten comprender y predecir el comportamiento de una API / formulación y pueden facilitar el desarrollo de productos farmacológicos más eficaces y seguros para los pacientes. La evaluación de la sobresaturación y la cinética de precipitación de un compuesto es importante en las primeras etapas de desarrollo, antes de los estudios en humanos, así como en las últimas etapas de desarrollo de la formulación.

1.7.2.1. Modelos Estáticos Monocompartimentales

Los modelos estáticos son los sistemas digestivos más extendidos. La fase gástrica se reproduce por hidrólisis con pepsina de un alimento homogeneizado, a pH y temperatura fijos, durante un período de tiempo establecido (pH 1–2, 37°C, 1–3 h). Este paso puede seguirse, en el mismo biorreactor, por una fase intestinal que involucra

enzimas pancreáticas con o sin bilis (pH 6–7). La mayoría de estos modelos se han desarrollado para aplicaciones específicas y son herramientas económicas de alto rendimiento, especialmente relevantes para los grandes enfoques de preselección. Varios fueron diseñados para evaluar la digestión de las proteínas (230), el almidón (231) y la bioaccesibilidad de los carotenoides (232) y los contaminantes (233). El aparato de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) también proporciona un entorno estático y cerrado, ampliamente utilizado para evaluar la disgregación y disolución de formas de dosificación en un solo medio que reproduce las condiciones digestivas, tanto gástrica (líquido gástrico simulado) como intestinal (líquido intestinal simulado)(7). Sin embargo, en este enfoque, a menudo se despliegan grandes volúmenes de medios y las fuerzas mecánicas (agitación continua) no son representativas de movimientos peristálticos complejos (11). Otros modelos estáticos monocompartimentales incluyen parámetros adicionales como fuerzas mecánicas (234) o eliminación de productos finales de digestión (235).

Sin embargo, ninguno de estos modelos estáticos reproduce los procesos dinámicos que ocurren durante la digestión humana, como el vaciado gástrico o los cambios continuos en el pH y las tasas de flujo de secreción.

1.7.2.2. Modelos Monocompartimentales Dinámicos.

Para superar estas limitaciones, se han desarrollado varios modelos gástricos dinámicos. Un modelo reproduce, basándose en datos *in vivo*, la acidificación progresiva del contenido gástrico por adición de HCl, el curso temporal del flujo de pepsina y el vaciamiento gástrico (236). El modelo gástrico dinámico (DGM) se diseñó para tener en cuenta la especificidad regional del estómago (194,197). Se compone de dos compartimentos sucesivos: (i) el "cuerpo" donde las secreciones gástricas se mezclan con

Introducción

los alimentos; y (ii) el "antro" donde se reproducen las fuerzas de corte y el rechinar del estómago. El vaciamiento gástrico está regulado por una válvula que permite que las partículas más pequeñas salgan del estómago, mientras que las más grandes se someten a reflujos en la cámara superior para ser digeridas. A pesar de su complejidad, el DGM no reproduce con precisión las fuerzas peristálticas *in vivo*. El simulador gástrico humano (HGS), compuesto por una cámara de látex rodeada por un sistema de conducción mecánica, emula con mayor eficacia los movimientos peristálticos del estómago en amplitud, intensidad y frecuencia (237).

- Prueba de Dos Etapas

El término "prueba de dos etapas" describe una configuración de prueba *in vitro* de varios pasos, que consiste en dos niveles de prueba experimental consecutivos, para evaluar el comportamiento de las sustancias o formulaciones de medicamentos cuando están expuestas a un cambio en el ambiente de las condiciones gástricas a las intestinales. Como las formas de dosificación oral se someten a un proceso similar durante su paso por el tracto gastrointestinal superior, las pruebas en dos etapas ofrecen la oportunidad de evaluar el desempeño del fármaco en esta área del tracto gastrointestinal de manera fisiológicamente significativa. La implementación de medios biorrelevantes en la prueba de dos etapas facilita aún más la simulación fisiológica de eventos en el tracto GI superior (238).

Similar a la mayoría de los métodos de prueba *in vitro* más importantes, las pruebas de dos etapas tienen su origen en el control de calidad. Las pruebas de dos etapas para las pruebas de disolución de formas de dosificación entérica se han implementado en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) durante muchos años (239). Además, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en

inglés) proporciona una base de datos en línea recomendada por la 'División de Bioequivalencia, Oficina de Medicamentos Genéricos' con sugerencias de métodos de disolución para una gama de productos farmacéuticos de liberación retardada y extendida para los cuales no hay disolución. Método de prueba disponible en la USP (240).

Aunque la aplicación de pruebas de dos etapas para fines de control de calidad y regulatorios se utiliza para confirmar la falta de liberación del medicamento en la fase gástrica combinada con la liberación completa en la fase intestinal, una aplicación más reciente de la prueba de dos etapas es determinar si la disolución exitosa en condiciones gástricas se contrarrestará con la precipitación posterior en el intestino delgado. Como tal, esta aplicación de las pruebas en dos etapas parece ser una herramienta biofarmacéutica bastante prometedora en el desarrollo de fármacos.

- Prueba *in vitro* Biorrelevante de Dos Etapas en la Preformulación

Además, se ha propuesto una variedad de configuraciones de prueba a pequeña escala para investigar el comportamiento de sobresaturación y precipitación de nuevos compuestos farmacológicos para su uso en la etapa de preformulación del desarrollo del fármaco. Un ejemplo de los métodos a pequeña escala utilizados en la preformulación es el método de "cambio de solvente" (también conocido como "extinción de codisolvente"), que crea una sobresaturación de medicamentos poco solubles en agua. En el primer paso, el fármaco se disuelve en un disolvente con alta capacidad de solubilización (241–243). Posteriormente, el fármaco disuelto se combina con un medio acuoso que produce una sobresaturación. Otro enfoque es el "método de cambio de pH" (107,244). Según lo dado por la ecuación de Henderson-Hasselbalch, la solubilidad de los fármacos ionizables se ve afectada por la concentración ambiental de iones de hidrógeno. Los métodos de "cambio de pH" se pueden realizar disolviendo primero el medicamento en un medio

Introducción

ácido, seguido de la adición de un tampón básico. El aumento repentino en el pH da como resultado la sobresaturación inicial de un fármaco poco soluble y débilmente básico, pero esto puede ir seguido de precipitación (216). Como el tránsito de drogas *in vivo* de las formas de dosificación oral también está acompañado por un aumento repentino y significativo del pH, la dilución del fármaco y un cambio en la composición de los líquidos al entrar en el intestino delgado después del vaciado gástrico, una evaluación crítica del comportamiento de los candidatos a fármacos en estas condiciones se requiere incluso en la etapa de preformulación del desarrollo del fármaco. Varios autores han introducido medios biorrelevantes en sus enfoques de prueba de dos etapas a pequeña escala, en lugar de utilizar soluciones de búfer simples. Este cambio ha mejorado significativamente la evolución biológica de los experimentos y su potencial para predicciones *in vivo* (243,245,246).

En la etapa inicial del desarrollo de medicamentos, generalmente hay disponible una pequeña cantidad de la API candidata y, por lo tanto, son necesarias técnicas a pequeña escala.

Las configuraciones *in vitro* a pequeña escala facilitan el uso de pequeñas cantidades de API disponibles en las primeras etapas del desarrollo de fármacos. También pueden ser útiles para la evaluación de formulaciones de prototipos (247). Además, el uso de experimentos a pequeña escala permite reducir la cantidad de medios biorrelevantes necesarios, lo que ayuda a reducir los gastos.

Se han desarrollado versiones más pequeñas del aparato USP II (248,249). Los recipientes de mini paletas utilizan 250 ml, en lugar de al menos 500 ml utilizados en el aparato de tamaño completo. Se ha demostrado que algunos de estos aparatos de escala reducida producen resultados de disolución comparables al aparato estándar USP II (249).

Sin embargo, en la elaboración de perfiles farmacéuticos y el desarrollo temprano de formulaciones, una escala aún más pequeña puede ser beneficiosa.

En la etapa inicial del desarrollo del fármaco, la evaluación de la precipitación potencial del fármaco se puede inferir comparando la solubilidad en medios gástricos simulados con los intestinos. La información de solubilidad se puede obtener rápidamente usando pruebas de detección de solubilidad de 96 pocillos de alto rendimiento (213,250). Por ejemplo, la solubilidad del Ketoconazol, medida por la prueba PASS (detección de solubilidad parcialmente automatizada), en el nivel II en estado de ayuno simulando el fluido intestinal (FaSSIF) (193) (0.017 mg / ml) es mucho más bajo que en el fluido gástrico simulado (SGF) de nivel 0 (418.3 mg / ml) (250), lo que indica una posible precipitación en la transición del entorno gástrico al intestinal. Estudios posteriores *in vivo* han demostrado la precipitación de Ketoconazol en el intestino delgado superior hasta el 16% de la dosis administrada (210).

Muchas de las pruebas de solubilidad de alto rendimiento utilizan un procedimiento de fundición con solvente, lo que genera preocupación sobre los cambios potenciales de la cristalinidad del fármaco al eliminar el solvente en la matriz del excipiente (213).

En 2006, Overhoff y colaboradores realizaron uno de los primeros experimentos de dos etapas *in vitro* a pequeña escala en la Universidad de Texas en Austin, investigando la influencia de diferentes polímeros y parámetros de composición en el comportamiento de sobresaturación y precipitación de formulaciones entéricas de Itraconazol, una sustancia antimicótica básica débil (251). La llamada "prueba de disolución de sobresaturación" representa una modificación de bajo volumen del método de prueba entérica A de USP. Diferentes formulaciones de Itraconazol en una cantidad de 8,8 mg

Introducción

(que corresponde a 20 veces la cantidad que podría disolverse en el medio final) preparado previamente en 5 ml de una mezcla de 0.1 N HCl y polisorbato 20. Posteriormente, la mezcla se añadió a 70 ml de 0.1 N HCl, representando el compartimento gástrico. Después de 2 h de agitación constante, se agregaron 21 ml de solución de tampón Na₃PO₄ 0.2 M para imitar la transición del fármaco al duodeno de pH más alto.

Dos años después, el grupo de DiNunzio realizó un experimento muy similar en la Universidad de Texas con el objetivo de explorar las precipitaciones de Itraconazol (245). Al igual que en los experimentos de Overhoff, los métodos de prueba se basaron en el método A de USP para pruebas entéricas. Nuevamente, se estudió la sobresaturación *in vitro* y los efectos resultantes sobre la biodisponibilidad *in vivo* utilizando dispersiones sólidas que contienen diferentes concentraciones de los polímeros de mejora PVAP y CAP. El objetivo de los experimentos de DiNunzio fue, de hecho, investigar el efecto de diferentes concentraciones de los dos polímeros en el comportamiento de disolución / precipitación. Se preparó previamente una cantidad de dispersión correspondiente a 37,5 mg de Itraconazol en 15 ml de HCl 0,1 N y se añadió a un recipiente de disolución que contenía 735 ml de HCl 0,1 N. Después de dos horas, se agregaron 250 ml de solución de tampón Na₃PO₄ 0.2 M a la fase de prueba gástrica. Los resultados de ambos autores sugieren que las pruebas *in vitro* en dos etapas podían proporcionar una buena primera estimación del comportamiento *in vivo* de diferentes formulaciones de este fármaco débilmente básico.

Tiempo después, Yamashita propuso un experimento a escala mucho menor (243). Además, Yamashita introdujo el uso de medios biorrelevantes en las pruebas de dos etapas. En estos experimentos, se disolvieron 20 µg de Itraconazol en 4 µl de DMSO, que luego se pipetearon en 200 µl de FaSSIF como fluido intestinal artificial. En esta

configuración, se investigó la capacidad de diferentes inhibidores de precipitación, como HPMC y HPMCAS, para mejorar la sobresaturación del fármaco. Se concluyó que la combinación de pruebas de dos etapas con medios biorrelevantes es una herramienta prometedora para seleccionar inhibidores de precipitación.

Klein y colaboradores (246) publicaron el primer experimento de dos etapas que utiliza medios biorrelevantes en ambas etapas de prueba. De nuevo, se usó Itraconazol como un fármaco modelo. En estos estudios, se predisolvieron 75,5 μg de Itraconazol en vasos de placas de 96 pocillos en 30 μl de FaSSGF y posteriormente se pipetearon en una segunda placa de pocillo que contenía 170 μl de FaSSIF. Al igual que en los experimentos anteriores, se opinó que las pruebas de dos etapas combinadas con medios fisiológicos relevantes ofrecen una manera de obtener los primeros conocimientos valiosos sobre el comportamiento farmacológico *in vivo* utilizando un método que solo requería cantidades muy pequeñas de sustancia farmacéutica.

Chandran y colaboradores (252) propusieron un enfoque a pequeña escala utilizando un método de espectrofotometría turbidimétrica para evaluar rápidamente el potencial de precipitación de un medicamento. Con este método, se preparó una solución madre de fármaco utilizando polietilenglicol PEG 400 como vehículo y se agregaron inhibidores de precipitación. Se añadió solución madre de fármaco (100 μl) a una placa de 96 pocillos y se mezcló con un volumen igual de agua desionizada. Esta configuración midió la absorbancia a 500 nm, que está muy por encima del rango de absorbancia de cualquiera de las moléculas analizadas, pero proporciona una medida de la dispersión de la luz debido a la precipitación del fármaco, que conduce esencialmente a un punto final turbidimétrico. Los autores plantearon la hipótesis de que la precipitación inicial de partículas finas causó una fuerte dispersión de la luz, antes de que se produjera la aglomeración de partículas. El aumento resultante en el tamaño y la sedimentación de las

Introducción

partículas efectivas permite una mayor transmisión, lo que conduce a una disminución de la absorción. Los resultados cualitativos que utilizan este método se correlacionan bien con los métodos tradicionales cuando se examina la eficacia de diferentes inhibidores de precipitación, ya que ambos métodos encontraron que el 5% de d-alfa tocoferil polietilenglicol 1000 succinato (TPGS) en la formulación de PEG 400 es el más efectivo para prevenir la precipitación del alcanfor (252). Los beneficios de usar el espectrómetro UV incluyen el análisis simple y rápido de la precipitación del fármaco en múltiples puntos de tiempo, sin el requisito de una preparación adicional de la muestra o el desperdicio de la muestra. Esta prueba podría ser una herramienta útil para evaluar rápidamente la precipitación de medicamentos y el impacto de los excipientes en el desarrollo temprano de la formulación.

Palmelund propuso un método estandarizado de sobresaturación y precipitación a pequeña escala (SSPM) con la intención de proporcionar una metodología armonizada para evaluar el comportamiento crítico de sobresaturación. En particular, se investigó la importancia de la concentración inicial en el inicio y la tasa de precipitación. Se estudiaron varios compuestos modelo e inhibidores de la precipitación (253). Al principio, la concentración inicial para los estudios de sobresaturación C_{ss} , 100% se determinó para los seis compuestos modelo. Posteriormente, se prepararon cuatro soluciones madre en DMSO para cada compuesto, correspondientes al 50%, 75%, 87,5% y 100% de C_{ss} . Se añadieron 200 ml de cada stock a μ Diss ProfilerTM, que contenía 10 ml de FaSSIF-V2, y se controló la precipitación durante 60 min. Además, se determinó la sobresaturación y precipitación de Aprepitant y Tadalafil en presencia de HPMC y PVP para evaluar la efectividad de dos inhibidores de precipitación diferentes.

El sistema μ Diss (Pion Inc., Billerica, MA, EE. UU.) emplea fibra óptica UV para obtener información experimental en tiempo real sobre la solubilidad y disolución de los

medicamentos. La información sobre la sobresaturación del fármaco y la precipitación también se puede inferir utilizando el método de investigación permanente y se puede usar para estudiar la disolución de un polvo de fármaco o un disco miniaturizado (254,255). Se pueden realizar hasta ocho experimentos en paralelo usando volúmenes de medios que van de 1 a 10 ml. Este método se empleó para estudiar la disolución de una amplia variedad de compuestos, incluidos los fármacos poco solubles (254). Plum y colaboradores (256) investigaron la reproducibilidad entre laboratorios del método SSPM, las pruebas se llevaron a cabo en siete sitios diferentes. Los valores obtenidos para tres fármacos modelo (Aprepitant, Felodipino, Fenofibrato) para la supersaturación aparente del fármaco y el tiempo de inducción para la precipitación detectable se compararon entre los distintos laboratorios. Si bien no fue posible realizar una comparación directa de los valores de la supersaturación aparente y el tiempo de inducción entre los sitios, se encontró que el 80% de las parejas que presentaron un conjunto completo de datos encontraron el mismo orden de clasificación de los medicamentos (Aprepitant > Felodipino \approx Fenofibrato) al comparar los valores de β , que se definió como la pendiente de la gráfica \ln (el tiempo de inducción) vs \ln (la supersaturación aparente)⁻² (256).

Petrusevska y colaboradores (257) utilizaron DMSO para administrar el fármaco disuelto en una prueba de alto rendimiento. El tampón de McIlvaine (pH 6.8) con concentraciones de excipiente de 0.001%, 0.01% y 0.1% (p / v) se dispensó inicialmente en cada pocillo. Se añadió la solución madre concentrada de fármaco en DMSO y la placa se agitó durante 5 s para asegurar una mezcla adecuada. La placa se incubó y las muestras se retiraron en varios puntos de tiempo hasta 360 min. Se investigaron factores experimentales como la frecuencia de agitación, la temperatura de incubación y el efecto de varias concentraciones de DMSO en la configuración. Se encontró que una

Introducción

concentración de DMSO de $\leq 1\%$ (v/v) en el ensayo era aceptable. Se examinó la eficacia de 23 excipientes diferentes para prevenir la precipitación de dos fármacos neutros poco solubles, la Carbamazepina y el Fenofibrato. Se encontraron resultados distintos para los dos compuestos, destacando la naturaleza específica del caso de los efectos inhibidores de la precipitación. Los autores concluyeron que esta prueba de alto rendimiento proporcionaba un punto de partida razonable para seleccionar los excipientes apropiados para ayudar a prevenir la precipitación de medicamentos.

Petrusevska y colaboradores (258) llevaron a cabo un estudio de seguimiento que investigó el uso de la dispersión de la luz y la turbidez para evaluar la precipitación del fármaco y la eficacia de los inhibidores de la precipitación. La dispersión de la luz se midió utilizando un nefelómetro, mientras que la turbidez se midió utilizando un lector de placas UV a 500 nm. Las soluciones madre de Dipiridamol y Fenofibrato en DMSO se probaron usando condiciones similares a las descritas en el experimento anterior. Los resultados se compararon con los obtenidos utilizando métodos de cuantificación estándar, como UPLC, para evaluar la precipitación del fármaco. Los autores expresaron una preferencia por el uso del método de dispersión de la luz sobre la turbidez, ya que produjo menos positivos falsos (4 vs 5) y menos negativos falsos (0 vs 2) al examinar la eficacia de diferentes inhibidores de la precipitación.

Christfort y colaboradores (259) desarrollaron una herramienta video-microscópica para evaluar la precipitación de Tadalafil y la eficacia de los inhibidores de precipitación. Usando una microplaca de 96 pocillos, se agregaron 30 μl de una solución madre de Tadalafil DMSO a FaSSIF con concentraciones variables (0.0–5.0% p/v) de HPMC, actuando como un inhibidor de la precipitación. Las micrografías se obtuvieron utilizando el sistema oCelloScope systemTM (Philips Biocell A/S, Allerød, Dinamarca). El desarrollo de la precipitación se controló mediante análisis de partículas individuales

y múltiples. El análisis de una sola partícula determinó el tiempo de inducción para que ocurra la precipitación como el tiempo necesario para que la primera partícula bien definida aparezca. Usando el análisis de partículas individuales, se observó el efecto de diferentes concentraciones de HPMC en el tiempo de inducción para el crecimiento de cristales y el crecimiento en el área de un solo cristal a lo largo del tiempo. Como el análisis de partículas individuales solo se centra en el crecimiento de un solo cristal, puede no ser representativo de la población total de cristales. En contraste, el análisis de múltiples partículas permitió el análisis de la población total de partículas al examinar todas las áreas de crecimiento de cristales dentro del campo de visión. El crecimiento de los cristales se cuantificó determinando el porcentaje del área del campo de visión microscópico que está cubierto por las partículas y contando el número de partículas. Los resultados del análisis de partículas individuales y múltiples se correlacionaron entre sí, ya que ambos encontraron que se requería una concentración de HPMC del 0,01% (p / v) para observar la inhibición de la precipitación, con una inhibición máxima que se produce a una concentración del 0,1% (p / v). Este método visual para evaluar la precipitación tiene un potencial significativo para aumentar la comprensión de la cinética de precipitación en el intestino.

El instrumento Sirius T3 (Pion Inc.) es un sistema de titulación automatizado como se muestra en la Figura 17 (260). Gravestock y colaboradores (261) lo utilizaron para monitorizar la precipitación de una amplia gama de fármacos ácidos, básicos y neutros. Utiliza una sonda de inmersión UV de fibra óptica conectada a un espectrómetro UV de matriz de diodos para obtener una medición en tiempo real de la concentración del fármaco. Al examinar la disolución y la precipitación del fármaco, el análisis de muestras fuera de línea es susceptible de errores potenciales debido al envejecimiento de la muestra. La tecnología analítica en tiempo real, por el contrario, evita tales errores. La

Introducción

disolución del fármaco y la precipitación en 15 ml de KCl 0,15 M tamponado se midió a cuatro pH: 1,9, 3,8, 5,2 y 7,2. El pH fue inicialmente de 1.9 y aumentó cada 30 min. Se observó el efecto del pH sobre la disolución y precipitación de fármacos. Las velocidades de disolución de los compuestos ácidos aumentaron con el aumento del pH, mientras que los compuestos neutros tuvieron una velocidad de disolución relativamente constante en los cuatro pH. Algunos fármacos básicos, como Dipiridamol, Clorpromazina HCl y bisulfato de Clopidogrel, precipitaron a medida que aumentaba el pH. Otros fármacos básicos, como el Haloperidol, la Maprotilina y el Propranolol, no precipitaron a medida que aumentaba el pH.

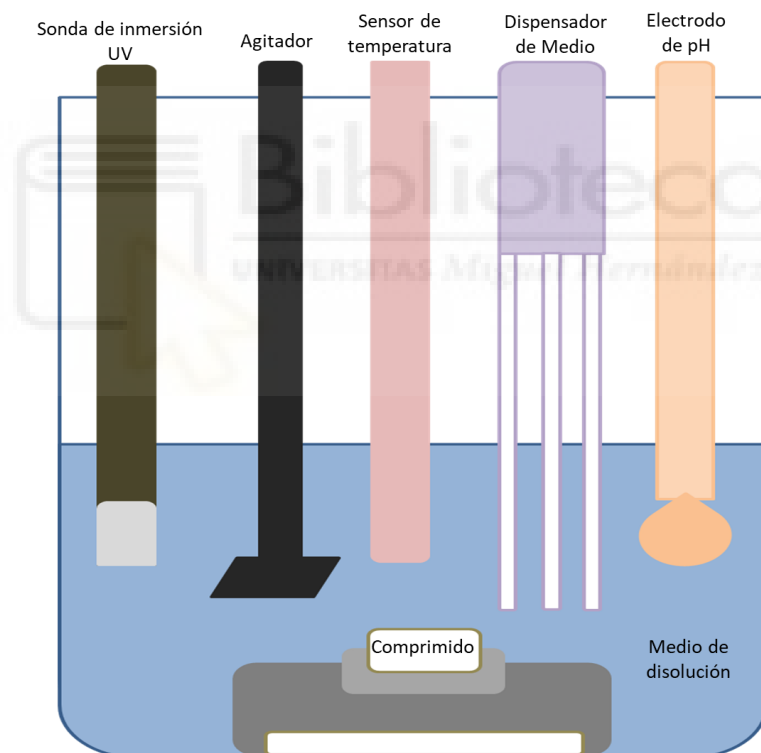


Figura 17. Esquema del Sirius T3. Imagen adaptada de Box et al.(260).

Jakubiak (223) usó los datos de disolución del T3 para desarrollar un modelo de disolución y precipitación. En sus estudios, las pruebas de disolución en el T3 se llevaron a cabo utilizando dos valores de pH diferentes (pH 2 y pH 6,5) para simular condiciones

gástricas e intestinales, respectivamente. El nivel II de FaSSIF se usó para simular las condiciones en el intestino delgado superior, mientras que un simple tampón de fosfato a pH 2 se usó para simular las condiciones en el estómago. Después de 10 minutos a pH 2, se añadió FaSSIF concentrado para simular la transferencia del ambiente gástrico al intestinal. Los perfiles plasmáticos del fármaco estimados utilizando su modelo para Dipiridamol y Erlotinib mostraron una fuerte correlación con el perfil plasmático humano *in vivo*, obtenido de estudios clínicos anteriores.

Mathias y colaboradores (262) desarrollaron una prueba de microdisolución para examinar el efecto del cambio de los medios y el pH en el comportamiento de disolución, sobresaturación y precipitación de los medicamentos en condiciones que buscan replicar el tránsito a través del tracto gastrointestinal, como se muestra en la Figura 18. El fármaco, ya sea como polvo o suspensión, se añadió inicialmente a 7 ml de SGF Nivel 0. Después de 20 minutos, se agregaron 14 ml de una solución FaSSIF de Nivel II concentrada 1,5 veces para simular los cambios en las condiciones debido a la transferencia del estómago al intestino. El pH de la solución de FaSSIF resultante fue de 6,5 y el fármaco se incubó durante 160 minutos más. Los fármacos débilmente básicos, Ketoconazol y Erlotinib, se encontraban entre los fármacos evaluados que utilizaron esta prueba. El Ketoconazol permaneció sobresaturado durante 55 minutos tras la transición de las condiciones gástricas a las intestinales, antes de precipitar lentamente durante los siguientes 75 minutos. Erlotinib precipitó rápidamente a su solubilidad cristalina de equilibrio tras la adición de FaSSIF de Nivel II.

Introducción

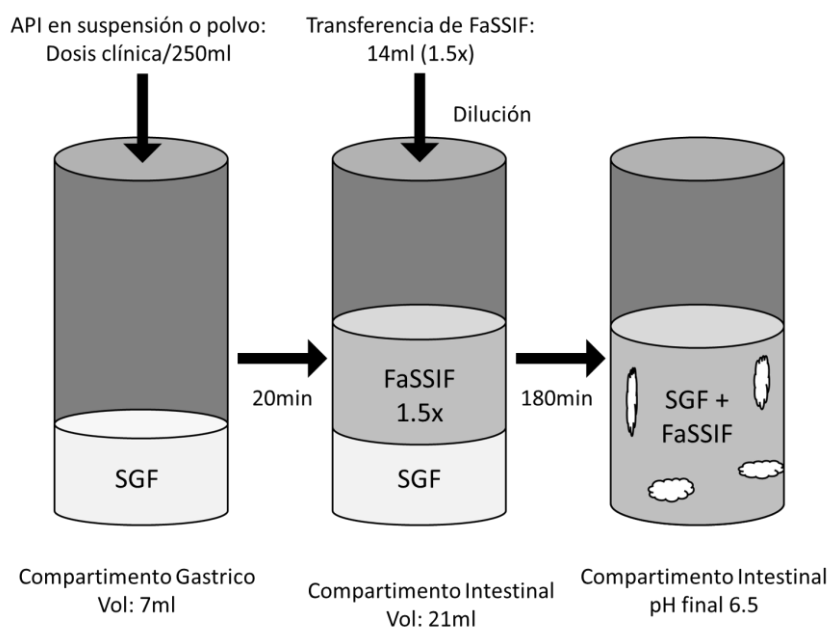


Figura 18. Esquema del experimento realizado por Mathias et al.(262).

Se hace patente la necesidad de estandarizar este tipo de modelos ya que los diferentes autores usan diferentes equipos, tiempos de muestreo, dosis iniciales, volúmenes, composición de medios, incluso en algunos casos la difieren en la dirección de la transferencia de los medios.

Sobre la base de todas estas publicaciones, parece que las pruebas de dos etapas a pequeña escala parecen ser una herramienta *in vitro* prometedora para evaluar la posible supersaturación y precipitación de los medicamentos, especialmente durante la preformulación, un período en el que típicamente solo se dispone de cantidades muy limitadas de sustancias farmacológicas. Sin embargo, las metodologías que se han utilizado hasta la fecha son bastante dispares.

Posiblemente, el elemento más ventajoso de las pruebas a pequeña escala es la cantidad significativamente menor de sustancia farmacéutica necesaria para recibir una primera impresión importante del comportamiento *in vivo* del fármaco con respecto a la

sobresaturación y la precipitación. En particular, en las primeras etapas del desarrollo de fármacos, los investigadores deben trabajar con cantidades mínimas de API debido a la escasa cantidad de compuesto de fármaco generalmente disponible. Al minimizar la cantidad de sustancia farmacológica requerida para las pruebas más importantes, se puede realizar un número mayor de experimentos esenciales. Esta consideración es especialmente importante cuando la síntesis del fármaco es difícil o costosa. Además, a esta escala, la selección de posibles excipientes que aumentan la solubilidad también requiere solo pequeñas cantidades de API y excipiente. Como consecuencia, se pueden investigar varios enfoques para optimizar el comportamiento *in vivo* de la API, ayudando con las decisiones sobre qué estrategias de formulación deben adoptarse. La configuración experimental es simple y eficiente y permite generar una gran cantidad de datos en poco tiempo. La implementación del análisis en tiempo real, como la cuantificación en línea con microfibras UV, reduciría aún más la duración experimental al eliminar el análisis posterior de HPLC. Alternativamente, el muestreo automático podría usarse junto con el análisis fuera de línea para agilizar el esfuerzo experimental.

Por otro lado, hasta que las pruebas a pequeña escala se ajusten correctamente a la fisiología gastrointestinal, la predicción del comportamiento *in vivo* seguirá siendo, en el mejor de los casos, cualitativa. Los volúmenes disponibles para la disolución *in vivo* se caracterizan por una variabilidad inter e intraindividual significativa y todavía no se comprenden completamente. En consecuencia, la posibilidad de llegar a predicciones cuantitativas *in vivo* basadas en las pruebas *in vitro* relativamente estáticas de dos etapas seguirá siendo limitada. Las pruebas en dos etapas deben considerarse más bien como una herramienta valiosa para la evaluación del riesgo crítico de las tendencias de precipitación de la sustancia farmacéutica.

Introducción

La aplicación directa de pruebas de dos etapas a pequeña escala a formulaciones de tamaño humano, como cápsulas y comprimidos, por supuesto, no es posible debido a los bajos volúmenes que se implementan. Para tales estudios, la escala mayor de la configuración de prueba de dos etapas de la formulación es mucho más apropiada. Otro problema práctico que ha sido identificado es la humectación de la sustancia farmacéutica. Además, las configuraciones de prueba de dos etapas que usan compartimentos con dimensiones de microlitro podrían sufrir una pérdida de sustancia debido a la adsorción en la pipeta utilizada para transferir medios de un compartimento a otro.

- Prueba *in vitro* Biorrelevante de dos etapas en la formulación

Si bien se han contemplado principalmente pruebas en dos etapas a pequeña escala para las pruebas de preformulación, el modelo de transferencia a gran escala representa una configuración experimental que está bien establecida en las instalaciones de investigación farmacéutica como una herramienta en el desarrollo de la formulación.

En las últimas etapas del desarrollo de la formulación, donde se dispone de mayores cantidades de API, se requieren métodos y configuraciones a gran escala para caracterizar con precisión y predecir el comportamiento de la formulación, después de la administración de dosis clínicamente relevantes. Estas técnicas a gran escala tienen como objetivo evaluar la sobresaturación o precipitación del producto farmacológico y ayudar a comprender el efecto de diferentes excipientes en su cinética. El objetivo principal es vincular la biodisponibilidad del producto farmacológico a la cantidad de fármaco que está en solución en el intestino delgado superior, donde se produce principalmente la absorción.

Introducción

En 1993, Kondo diseñó las primeras pruebas de dos etapas a mayor escala, en referencia al "método de cambio de pH", basado en el método de la pala JP (263). Usando este aparato, se investigó el comportamiento de sobresaturación de los coprecipitados entéricos de un agente anticancerígeno HO-221 con HPMC y ftalato disolviendo los coprecipitados en 500 ml de fluido gástrico simulado (HCl y NaCl, pH 1.2) durante 1 h, seguido de la adición de 10 ml de 2.5 M KH_2PO_4 para lograr un pH final de 6.5.

En 2015, Berlin y colaboradores desarrollaron una llamada prueba de "dumping" para identificar el comportamiento de precipitación y sobresaturación de los medicamentos débilmente básicos. En estos experimentos, la Cinarizina se disolvió previamente en 250 ml de FaSSGF y luego se vertió simplemente en 500 ml de FaSSIF (192). Los experimentos sirvieron como una prueba de detección previa al experimento del modelo de transferencia estándar, trabajando con cantidades y composiciones de medios biorrelevantes equivalentes a los de Kostewicz diseño (264). Poco después, Berlin y Ruff compararon los resultados de una versión refinada del experimento inicial de "dumping" con los resultados de una versión actualizada del modelo de transferencia, para medicamentos no supersaturados y supersaturados (265). En este trabajo, se redujo el volumen de la prueba intestinal del compartimento aceptor del modelo de transferencia y la prueba de "descarga", en línea con los últimos hallazgos relacionados con los volúmenes gastrointestinales. Sobre la base de sus resultados, los autores concluyeron que el modelo de transferencia no ofrecía más información que el método de "dumping" para los medicamentos que no presentan sobresaturación. De hecho, el método de "dumping" se propuso como una herramienta de detección alternativa, al menos para las investigaciones de formulación temprana.

Hansmann realizó una prueba de "descarga" similar al predisolver comprimidos de Ciprofloxacino durante 10 minutos en 250 ml de FaSSGF y luego verter suavemente

Introducción

la solución resultante en 350 ml de FaSSIF durante un período de 30 s (266). Los resultados tanto de la prueba de "descarga" como del experimento de transferencia correspondiente se combinaron con el modelado PBPK *in silico* utilizando SimCyp (Simcyp Ltd., Sheffield, Reino Unido). De manera similar a los hallazgos de Berlin y Ruff, se concluyó que para los medicamentos no supersaturados, la prueba de "dumping" fue tan predictiva como el modelo de transferencia cuando se combinó con el modelo *in silico* PBPK.

Kambayashi y colaboradores trabajaron con una modificación de la prueba de 'descarga', utilizando 50 ml de HCl para representar el fluido gástrico y combinándolo con 450 ml de FaSSIF concentrado para obtener una mezcla final equivalente a las concentraciones de taurocolato de sodio y lecitina que se encuentran en FaSSIF (267). Al igual que Hansmann Kambayashi incorporó los resultados de los experimentos de "descarga" en un modelo PBPK, en este caso utilizando STELLA (isee systems Inc., NH, EE. UU.). Los resultados combinados *in vitro-in silico* se compararon con los datos de la literatura *in vivo* para el comportamiento de las soluciones orales de Dipyridamol y Ketoconazol en el tracto gastrointestinal. Los resultados demostraron que el modelado *in silico*, junto con la prueba de "descarga" *in vitro* de evidencias biológicas, fue capaz de predecir el comportamiento duodenal, incluida la precipitación, de estos dos fármacos supersaturables poco solubles, débilmente básicos.

Por lo tanto, la configuración de la prueba de disolución de dos etapas representa un enfoque factible para detectar el comportamiento de las formulaciones orales de fármacos en las últimas fases clínicas y preclínicas del desarrollo del fármaco.

Todas las configuraciones de prueba de dos etapas descritas para el desarrollo de la formulación se realizaron utilizando el aparato USP II o el método de paleta JP para

pruebas de disolución, con al menos modificaciones menores. Las velocidades de paleta variaron de 50 a 100 rpm en diferentes experimentos. Como se describió recientemente en la literatura, los cambios en la velocidad de la paleta dentro del rango entre 50 y 100 rpm no suelen llevar a una diferencia pronunciada en los resultados (268). Sin embargo, sería útil establecer una velocidad de paleta uniforme entre los que trabajan en el área, para maximizar la comparabilidad de los resultados de las pruebas. La variación en el tamaño del vaso a través de las configuraciones de prueba puede ser más problemática con respecto a la comparabilidad de los resultados de la prueba, ya que los minivessels más pequeños, junto con sus paletas reducidas, pueden llevar a diferentes hidrodinámicas dentro del vaso de prueba en comparación con los vasos estándar. Mientras que algunos fabricantes buscan reducir todas las dimensiones para mantener una hidrodinámica comparable, (192,265,266) otros han adoptado diseños que se alejan de esta característica de escalado (269).

Otra variación entre las configuraciones es que mientras algunos experimentos se realizaron con mezcla constante durante el tiempo de predisolución de la API o el fármaco formulado en el compartimento gástrico, otros, por ejemplo, Kambayashi y colaboradores no definieron si la mezcla / agitación ocurrió antes de la combinación de la droga predisuelta con FaSSIF. Mientras que Mann aplicó agitación constante durante 30 minutos para disgregar los comprimidos de Brufen y Accolate en 250 ml de FaSSGF-V1 antes de agregar una cantidad igual de FaSSIF al recipiente. Ruff y Hansmann predisolvieron la droga en un simple vaso de precipitados sin un mecanismo de agitación bien definido. Al ser posible que se produzcan precipitaciones de fármacos en la etapa gástrica, parece muy recomendable la mezcla y el muestreo simultáneos antes de la transferencia de medios para los fármacos de ácido débil (270). Como la solubilidad de muchos fármacos débilmente básicos es suficiente para asegurar la disolución completa

Introducción

del fármaco en FaSSGF, la necesidad de mezclar y muestrear constantemente durante la disolución en el compartimento gástrico debería ser menos importante para estos. Aun así, se recomienda el muestreo durante la disolución en la etapa gástrica para confirmar el grado de disolución del fármaco antes de la combinación de los dos medios. Además, una velocidad de agitación más armonizada para ambas etapas de prueba mejoraría la reproducibilidad y comparabilidad de los experimentos.

Si bien la mayoría de los experimentos se han realizado transfiriendo la fase gástrica al compartimento intestinal, Kondo y Mann realizaron sus experimentos de manera inversa. Aunque la adición de fluidos de simulación intestinal en un volumen constante de medios gástricos parece menos fisiológica, esto se ve mitigado por el hecho de que todo el volumen de medios se transfiere "a la vez", es decir, en forma de bolo. Sin embargo, tanto la dirección como la tasa de transferencia de medios deben estar armonizadas. Mientras que Berlín y Ruff vertieron el medicamento predisoluto en el compartimento intestinal lentamente durante 30 s, otros diseños experimentales no describieron el protocolo para la adición del segundo medio de prueba. Como ya se sabe por el modelo de transferencia, un tránsito más lento de medicamentos básicos débiles poco solubles del ácido al compartimento básico puede llevar a un aumento de la precipitación del medicamento, de modo que incluso cambios menores en la velocidad de transferencia de medios entre las dos etapas más abruptas. Las pruebas pueden llevar a resultados diferentes.

También se deben considerar las ventajas de agregar una composición concentrada en lugar de la composición estándar de FaSSIF para lograr un medio representativo y reproducible de las condiciones intestinales. Mientras que Berlin, Ruff y Hansmann utilizaron FaSSIF en sus experimentos, Mann y Kambayashi usaron

soluciones concentradas del medio FaSSIF para alcanzar la composición FaSSIF objetivo después de la combinación de los medios gástricos e intestinales.

Las configuraciones experimentales que imitan la aplicación de una dosis única del medicamento formulado junto con un vaso de agua parecen ser un enfoque razonable para diseñar los volúmenes de los medios (190). Si bien el volumen de FaSSGF utilizado para la etapa de prueba gástrica fue el mismo en todas las configuraciones experimentales reportadas a 250 ml, los volúmenes de FaSSIF aplicados para la etapa intestinal variaron. Ruff y Berlin redujeron el volumen FaSSIF de los 500 ml originales a 350 ml para alinear el volumen con su modificación del modelo de transferencia. Mann disminuyó el volumen aún más a 250 ml, con la intención de lograr un volumen de prueba final de 500 ml.

Otro tema para la armonización de la configuración de dos etapas es el programa de muestreo. El muestreo antes de la transferencia de medios es apropiado para confirmar el grado de disolución en el medio gástrico, mientras que el muestreo más de 120 minutos después de la transferencia de medios parece poco probable que agregue información útil. Por un lado, la experiencia muestra que la mayoría de las precipitaciones tienen lugar dentro de este marco de tiempo y, por otro lado, las concentraciones habrán descendido en el intestino cuando la forma de dosificación / fármaco liberado alcance el intestino medio debido a la absorción del fármaco, por lo que la precipitación será menos probable.

Es importante destacar que establecer estándares similares para ambos formatos de prueba de dos fases, como la dirección de transferencia de medios, las proporciones de volúmenes gástricos a intestinales utilizados, el escalamiento adecuado de la dosificación a los volúmenes de prueba en las pruebas de preformulación y el uso de versiones idénticas de medios biorrelevantes permitirían una mejor correspondencia entre

Introducción

las dos escalas de prueba de dos etapas. De esta manera, habría más confianza en que los resultados de las pruebas de preformulación se relacionarían bien con los resultados de las pruebas de dos etapas utilizadas en la formulación y el desarrollo clínico.

El beneficio más importante de las pruebas de dos etapas para las etapas de selección de formulaciones es la configuración experimental mucho más simple en comparación con el modelo de transferencia. La eliminación de la necesidad de un mecanismo de bombeo para transferir material del medio gástrico al intestinal también reduce los costes de adquisición del equipo de prueba requerido. Como los resultados experimentales de las pruebas de dos etapas en combinación con PBPK en el modelado *in silico* pueden proporcionar predicciones *in vivo* similares a las del modelo de transferencia, las pruebas de dos etapas más simples parecen ser una alternativa prometedora al modelo de transferencia.

Por otro lado, las pruebas en dos etapas también muestran varias debilidades. Primero, el enfoque de vertido simple para combinar las dos etapas de prueba no simula con precisión la fisiología del vaciamiento gástrico *in vivo*. La posible influencia de las diferentes tasas de vaciamiento gástrico en la sobresaturación / precipitación no se aborda, por lo que la precipitación del fármaco *in vivo* podría no predecirse con precisión. Debido a la posible sensibilidad de la sustancia farmacológica a la variación en la velocidad de vertido, se debe establecer un enfoque armonizado para la transferencia de medios en pruebas simplificadas de dos etapas para permitir la reproducibilidad y comparabilidad experimentales. Además de esto, un mayor número de estudios *in vitro* de dos etapas que investigan el comportamiento del fármaco en presencia de alimento, como los propuestos por Vialpando y por Klein podría aumentar aún más la relevancia fisiológica de las pruebas en dos etapas (246,271).

Sin embargo, el principal inconveniente de usar la prueba de dos etapas en la evaluación de la formulación es la falta de datos *in vivo* correspondientes en la literatura. Sin la existencia de datos *in vivo* confiables, la previsibilidad de los modelos de dos etapas no se puede verificar. Una base de datos más grande de datos *in vivo* para comparar con los resultados de las pruebas de dos etapas permitiría la evolución de configuraciones de pruebas *in vitro* superiores y modelos *in silico*. Estos modelos podrían luego aplicarse para predecir el potencial comportamiento de los fármacos *in vivo* de nuevas sustancias en investigación con características fisicoquímicas similares a las de las API existentes. En este escenario, el comportamiento *in vivo* de nuevas formulaciones podría predecirse con mucha mayor confianza.

- Pruebas de disolución bifásica.

Un método para simular el paso de absorción en las pruebas de disolución es mediante el uso de una capa orgánica sobre la capa acuosa. La desventaja de los experimentos bifásicos es que la capa orgánica está en contacto directo con la capa acuosa; esto puede llevar a efectos que difieren de la absorción de fármacos *in vivo*. Por ejemplo, parte de la capa orgánica puede solubilizarse y, como resultado, podría producirse una emulsificación. Este problema puede ser especialmente pronunciado si los compuestos tensoactivos están presentes en los experimentos bifásicos, que es bastante.

El miBldi-pH (modelo de disolución bifásica miniescala con cambio de pH) es una prueba de disolución bifásica a pequeña escala que incorpora un cambio de pH para evaluar la liberación y precipitación del fármaco, como se muestra en la Figura 19 (272,273). La capa lipídica orgánica actúa como un sumidero absorbente como particiones de fármacos de la fase acuosa a la fase orgánica. El sistema consta de 50 ml de medio acuoso cubierto por una capa de octanol de 15 ml, que actúa como un sumidero

Introducción

de absorción, en un aparato USP II de disolución miniaturizado. La concentración del fármaco se determina mediante espectrometría UV en línea. Frank y colaboradores (272) investigaron la utilidad de este sistema para predecir los procesos de disolución *in vivo* de dos fármacos débilmente básicos: Dipiridamol y BIXX. Se observó precipitación para ambos fármacos al cambiar el pH de un ambiente gástrico ácido al ambiente intestinal neutro. La correlación con los datos *in vivo* para ambos fármacos se mejoró enormemente utilizando el modelo de disolución bifásica en comparación con los experimentos de disolución en una sola fase. Se estableció una IVIVC (correlación *in vitro-in vivo*) nivel A ($R^2 = 0,95$) entre la fracción absorbida *in vivo* y la fracción disuelta en octanol para las formulaciones de BIXX probadas, mientras que las pruebas de disolución de fase única no fueron predictivas de rendimiento *in vivo*.

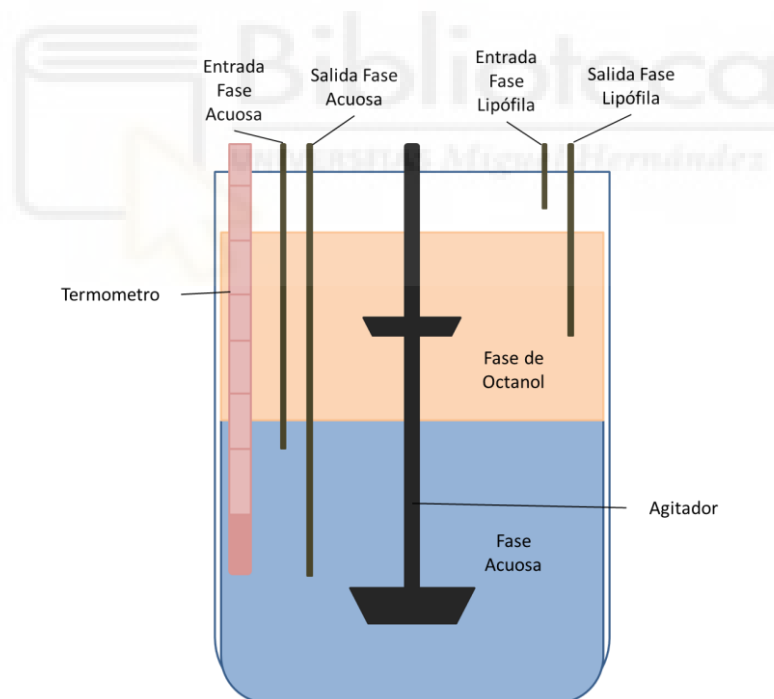


Figure 19. Esquema del aparato miBldi-pH. Imagen adaptada de Locher et al.(273).

La compañía Pion Inc. también ha propuesto un aparato propio de disolución bifásica (inForm) para estudiar la precipitación. La configuración de inForm emplea una sonda de inmersión UV de fibra óptica para medir la concentración del medicamento en

tiempo real, y utiliza una sonda de pH potenciométrica para controlar el pH de los medios en tiempo real para facilitar el control del pH *in situ*. Se han llevado a cabo experimentos bifásicos utilizando inForm en una gama de compuestos ácidos, básicos y neutros utilizando un proceso de cambio de solvente. Los medicamentos se disolvieron inicialmente usando DMSO para preparar una solución madre concentrada y las muestras se agregaron usando una aguja automática para el manejo de líquidos en la capa acuosa. La capa acuosa consistió en 40 ml de un tampón de acetato-fosfato a pH 6.5, mientras que la capa orgánica consistió en 30 ml de decanol. Se encontró que todos los fármacos neutros y básicos precipitan cuando se inyectan en la capa acuosa a un nivel de dosis de 10 mg. Se añadió Fenofibrato, un compuesto neutro, a dos niveles de dosis: 5 y 10 mg. La precipitación se observó a ambos niveles de dosificación y la cantidad de fármaco que se dividió en la capa lipídica fue la misma después de 1 h. Esto indicó que, en ambos casos, el Fenofibrato precipitó rápidamente a su solubilidad de equilibrio en la capa acuosa y solo el Fenofibrato disuelto fue capaz de dividirse a través de la capa acuosa en la capa lipídica. Los datos publicados con respecto a los experimentos de disolución bifásica que utilizan la configuración inForm con un cambio de pH son muy limitados.

Aunque estos sistemas son particularmente relevantes para los estudios de digestión gástrica (197,274), solo proporcionan una visión parcial de la digestión GI. *In vivo*, el estómago y el intestino delgado forman compartimentos separados dedicados a una función específica en la digestión, como la mezcla, la degradación de macromoléculas o la absorción de nutrientes. Para estudiar con precisión el destino de un compuesto digerido, es particularmente importante exponer la comida a cada paso de la digestión, con un tiempo de tránsito realista. En respuesta, se desarrollaron sistemas dinámicos bi y multicompartimentales.

Introducción

1.7.2.3. Modelos Dinámicos Bi y Multicompartimentales.

Los principales modelos bicompartimentales tienen como objetivo simular las condiciones lumbales del estómago y del intestino delgado proximal (275–277). Basados en datos *in vivo*, estos sistemas controlados por computadora reproducen la temperatura, los cambios de pH en los compartimentos gástricos y duodenales, el vaciado gástrico, la adición de pepsina, el jugo pancreático y/o la bilis y la diálisis de los productos finales de digestión (275). Estos sistemas se han estandarizado y validado en su mayoría para aplicaciones específicas, como el estudio de la actividad antiácida (201,276) o la supervivencia de los probióticos (277).

En 2004, Kostewicz introdujo una configuración *in vitro* de dos compartimentos llamada modelo de transferencia para caracterizar y evaluar la precipitación y sobresaturación *in vivo* de medicamentos básicos débiles poco solubles en diferentes condiciones fisiológicas (Figura 20). La versión original del modelo de transferencia simula el tránsito de drogas *in vivo* desde el estómago al intestino delgado con la ayuda de una bomba peristáltica. El fármaco disuelto se puede transferir desde un compartimento gástrico (fase donante) a un compartimento intestinal (fase receptora) en un patrón de vaciado predeterminado. Además, la velocidad de rotación de las paletas en ambos vasos se puede ajustar para evaluar la influencia de la hidrodinámica en la disgregación de la forma de dosificación y la sobresaturación del fármaco. Se utilizan a menudo medios biorrelevantes en este modelo para simular con mayor precisión las condiciones gástricas e intestinales. Con su diseño experimental único, el modelo de transferencia ha demostrado ser un método de prueba *in vitro* exitoso para examinar el nivel de sobresaturación (metaestable) por un lado, y la precipitación del fármaco por otro lado (264).

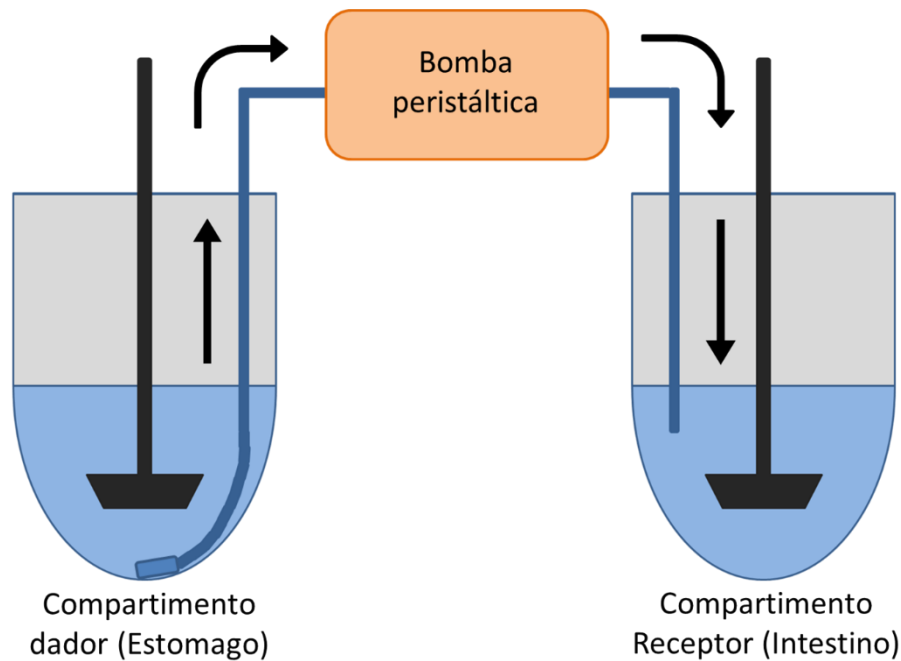


Figura 20. Diagrama de la configuración del modelo de transferencia. Imagen adaptada de Kostewicz et al.(264).

Después de más de 10 años de experiencia con el modelo de transferencia, los nuevos hallazgos en fisiología humana sugieren varias modificaciones. El diseño original del modelo de transferencia se ha actualizado en varios aspectos para mejorar la capacidad de predicción *in vivo*:

- Optimización de la composición de medios biorrelevantes para mejorar la relevancia fisiológica con respecto al pH y las concentraciones de sales biliares (278–280).
- Ajuste de los caudales de transferencia de la bomba peristáltica para capturar la cinética de vaciado gástrico de forma más fisiológica (268,281).
- Reducción en el volumen de prueba del compartimento del receptor de 500 a 350 ml para reflejar mejor los volúmenes en el intestino en ayunas (189,282).

Introducción

- Introducción de un tercer compartimento de reservorio adicional en la configuración para reponer el contenido del compartimento duodenal durante la transferencia (BioGIT) (283,284).
- Combinación de datos de transferencia *in vitro* relevantes con programas de simulación y modelado *in silico* basados fisiológicamente para predecir el perfil de concentración luminal (192,268,285).

Otro enfoque a pequeña escala fue desarrollado por Mathias utilizando el aparato de disolución en miniatura μ Diss Profiler™ (pION Inc., Billerica, MA). El IDiss Profiler™ consiste en recipientes miniaturizados estacionarios con micropaletas incorporadas y permite el análisis en tiempo real de cada muestra mediante sondas de fibra óptica UV sin la necesidad de un muestreo manual en diferentes puntos temporales. En esta configuración, un pequeño volumen (14 ml) de FaSSIF se transfiere desde un compartimento de donante a un compartimento aceptor que contiene 7 ml de FaSSGF y un API predisuelto (262). El objetivo del estudio de Mathias fue evaluar los efectos de diferentes afecciones gástricas, inducidas por agentes modificadores del pH, en varios fármacos. Las pruebas se realizaron en condiciones de pH alto y bajo, análogas a las condiciones gástricas fisiológicas promedio en estado de ayuno y sujetos tratados con agentes modificadores del pH. Los resultados se expresaron como relaciones de concentración entre pH alto y bajo, y estos se compararon posteriormente con las correspondientes proporciones clínicas de AUC y C_{max} de los sujetos. Además, estos datos *in vitro* se combinaron con el modelado PBPK *in silico*, utilizando dos programas de modelado de software PBPK estándar de la industria: Gastroplus_ (Simulations Plus, Inc., Lancaster, CA, EE. UU.) Y Biomodel, un código personalizado en MATLAB_ (Mathworks, Cía.). Usando este enfoque, se estima el efecto del pH clínico de diferentes agentes modificadores del pH en medicamentos básicos débiles.

Fue Kostewicz (264) quien introdujo por primera vez el llamado modelo de transferencia, que simula la transferencia de fármaco desde el estómago al intestino delgado superior. Esta configuración es un método de disolución compendial de dos compartimentos en el que los contenidos del vaso, en los que se evalúa el rendimiento de la forma de dosificación en condiciones gástricas simuladas (compartimento donante), se transfieren con una bomba a otro vaso, donde se simulan las condiciones en el intestino delgado (compartimento receptor) (Figura 20). En ese estudio, el compartimento del donante que contenía el fármaco disuelto en 125 ml de SGF se transfirió a una tasa constante entre 0,5 y 9,0 ml / min (valores dentro del rango fisiológico observado) en el compartimento aceptor de 500 ml de FaSSIF de Nivel II. Los resultados indicaron que una combinación de datos recopilados con el modelo de transferencia, los datos de solubilidad y los datos de disolución deberían conducir a una mejor predicción del comportamiento *in vivo* de bases débiles poco solubles. Además, quedó claro que las tasas de vaciamiento gástrico pueden desempeñar un papel importante en la cinética de la precipitación. Tales efectos de la tasa de transferencia se pueden considerar mediante modelos matemáticos, tal como se ha propuesto para la prueba de transferencia *in vitro* de Arnold (286). La prueba de transferencia clásica se usó aquí junto con un analizador de partículas en línea y espectroscopia Raman en línea para estudiar la cinética de la precipitación del fármaco. Se usó un modelo de nucleación y crecimiento a dos tasas de transferencia (4 y 9 ml / min) y los resultados experimentales para Dipiridamol estuvieron de acuerdo con el modelo.

Debido a las deficiencias del modelo de transferencia inicial, como la tasa de orden cero del bombeo del fármaco desde el compartimento del donante al compartimento aceptor, Ruff y colaboradores (268) intentaron optimizar las condiciones experimentales del modelo de transferencia propuesto originalmente, utilizando

Introducción

Ketoconazol como compuesto modelo. En este estudio, se tomaron en consideración las condiciones gastrointestinales fisiológicas "promedio", mientras que también se evaluó el impacto de condiciones extremas. Para reflejar el comportamiento del vaciamiento gástrico en ayunas *in vivo*, se utilizó una tasa de transferencia de primer orden con una vida media de 9 min. En general, el modelo de transferencia optimizado por Ruff tuvo éxito en simular el rendimiento de la forma de dosificación *in vivo*. No obstante, una desventaja de este modelo es que no toma en cuenta el proceso de absorción, lo que podría ser crucial para determinar si se produce precipitación o no, y por lo tanto también para determinar las concentraciones plasmáticas del fármaco. Se concluyó que este modelo *in vitro* predecía el comportamiento de precipitación del Ketoconazol. Para para los compuestos BCS Clase II, que tienen valores de permeabilidad altos o moderados, la precipitación *in vivo* puede reducirse debido a la continua absorción *in vivo* del fármaco a través de la mucosa intestinal. Es posible que esto no se aplique a los medicamentos BCS Clase IV con características de baja permeabilidad, donde la precipitación posible afecta seriamente la cantidad de medicamento disponible para la absorción.

El modelo de estómago artificial duodenal (TEA) tiene dos cámaras que representan el estómago y el duodeno. En la configuración estándar, las cámaras gástrica y duodenal tienen una capacidad máxima de 400 y 50 ml, respectivamente (287), con transferencia de fluido controlada por una serie de cinco bombas, que representan las secreciones de estómago y duodenal y el vaciado de la cámara. Los volúmenes iniciales en las cámaras, la velocidad de flujo de los medios frescos en las cámaras y la velocidad de vaciado de las cámaras pueden ajustarse para adaptarse a los requisitos experimentales (287–290). El HCl diluido y el FaSSIF de Nivel II se usan como líquido gástrico y duodenal, respectivamente. El modelo de TEA también se usó para verificar el efecto del pH gástrico en LY2157299, un fármaco BCS clase II débilmente básico, que mostró una

variabilidad de absorción en los primeros estudios realizados en perros(290). En comparación con los humanos, los perros tienen una mayor variabilidad de los pH gástricos basales, lo que puede ser una fuente de error al evaluar el rendimiento *in vivo* de los fármacos con una solubilidad dependiente del pH en los perros.

Takeuchi y colaboradores (291) evaluaron un modelo experimental de tres compartimentos (simulador gastrointestinal-GIS) para predecir la disolución y precipitación *in vivo*. Los tres compartimentos representan el estómago, el duodeno y el yeyuno, donde se utilizaron diferentes especies de búfer, volúmenes y valores de pH para imitar las condiciones *in vivo*. La velocidad de transferencia de fluido del compartimento gástrico al duodenal se estableció a una velocidad de primer orden con una vida media de entre 5 y 10 minutos. En esta configuración particular, las paletas se ajustaron para dar una ráfaga de alta velocidad en ciertos intervalos para simular las contracciones en el estómago y el duodeno. Se usó el software Gastroplus para determinar el tiempo de vaciado gástrico *in vitro*, que proporcionó el mejor ajuste a los datos *in vivo* para dos medicamentos BCS clase I, Propranolol y Metoprolol. En general, el método fue capaz de predecir el rendimiento *in vivo* de los compuestos investigados. La configuración también fue utilizada por Matsui (292) para investigar el impacto del pH gástrico elevado. Cuando se acopla con el modelado *in silico*, podría ser útil para evaluar la precipitación *in vivo* de los compuestos BCS clase II débilmente básico, pero la incorporación de la absorción, para imitar la eliminación continua del fármaco del intestino, podría ser beneficiosa para mejorar su capacidad de predecir el comportamiento *in vivo*.

Klein y colaboradores (246) crearon un sistema de modelo de transferencia miniaturizado para modelar la transición del ambiente gástrico al intestinal. Se probaron dos configuraciones experimentales diferentes: un modelo de placa de 96 pocillos y un modelo de aparato de mini paletas. En el experimento del modelo de 96 pocillos, el

Introducción

medicamento se disuelve inicialmente en el SGF Nivel 0 (fase donante) antes de que se pipeteen 30 µl de la fase donante en la fase receptora, que consiste en 170 µl de FaSSIF de Nivel II o FeSSIF de Nivel II. La concentración de fármaco se midió cada 2 minutos con un lector de microplacas UV. En la configuración de mini paletas, el medicamento se disuelve inicialmente en 10 ml de SGF Nivel 0 y se agrega a 40 ml de FeSSIF Nivel II o FaSSIF Nivel II. La concentración del medicamento se determinó mediante HPLC. Los complejos de hidroxibutenil-b-ciclodextrina de Tamoxifeno e Itraconazol se probaron utilizando ambas configuraciones y los resultados fueron consistentes entre las plataformas; no se encontró que el Tamoxifeno precipite en ninguna configuración, mientras que el Itraconazol precipitó en aproximadamente el 90% en ambos métodos.

La configuración del examen de disolución intrínseca miniaturizada (MINDISS) utiliza minidiscos de medicamento compactado, generalmente 2 a 5 mg, para administrar el medicamento en una placa de 96 pocillos (293). Los minidiscos se preparan en un soporte hecho a medida, lo que da como resultado un área de superficie del medicamento de 3 mm². Se añade medio de disolución (0,35 ml) a los pocillos y se agita. Los minidiscos se agregan a los pozos para que la droga se sumerja en los medios de disolución. Después de un período de tiempo establecido, los minidiscos se transfieren a un nuevo pozo. Esta transferencia a nuevos medios permite un cambio de pH, que puede ayudar a mejorar la biorrelevancia de la prueba al imitar el entorno cambiante a lo largo del GIT (247). Las concentraciones de fármaco se determinan mediante UPLC, mientras que la espectroscopia Raman se utiliza para analizar las características de estado sólido del disco. Las tasas de disolución intrínseca del disco calculadas a partir de la configuración de MINDISS se correlacionaron estrechamente ($R^2 = 0,9292$) con las pruebas de disolución de discos de fármaco a mayor escala.

Usando la configuración MINDISS, se encontró que las tasas de disolución intrínseca del disco de diclofenaco sódico y diclofenaco potásico en SGF, pH 1.2, son idénticas al ácido libre (293). Al probar ambas formas de sal en el SGF Nivel 0, se formó una capa de ácido diclofenaco libre en la superficie del disco que controlaba las tasas de disolución intrínseca. Se pensó que esta precipitación se debía a la conversión de las formas de sal del fármaco en el ácido libre menos soluble. Se esperaba que una base libre demostrara el comportamiento inverso que es disolverse rápidamente en condiciones gástricas ácidas y precipitar en el ambiente intestinal más neutral.

El TIM-1 (Modelo gastrointestinal TNO 1) es el único sistema caracterizado como "completo", es decir, que combina la multi-compartimentación y el dinamismo (294). Este modelo está compuesto por el estómago y las tres partes del intestino delgado, el duodeno, el yeyuno y el íleon. Integra parámetros clave de la digestión humana: temperatura, cinética del pH gástrico e intestinal, suministros gástricos e ileales, tiempo de tránsito, mezcla y transporte peristáltico, adición secuencial de secreciones digestivas y absorción pasiva de agua y moléculas pequeñas mediante un sistema de diálisis. El TIM-1 permite la simulación más cercana de eventos dinámicos *in vivo* que ocurren dentro del lumen gastrointestinal humano. Se ha aplicado en un gran número de estudios nutricionales (295,296), toxicológicos (297,298), farmacéuticos (199,299) y microbiológicos (198,300).

- Métodos Compartimentales que Utilizan Membranas Biomiméticas No Celulares.

Pion Inc. ha desarrollado un sistema de dos cámaras llamado iFlux (301). Las concentraciones de fármaco en las cámaras donante y receptora pueden medirse mediante sondas UV de fibra óptica. Una membrana biomimética cubierta con lípidos, que es una versión ampliada de la membrana del ensayo de permeabilidad de la membrana artificial

Introducción

paralela (PAMPA), separa las dos cámaras. El paso a través de la membrana hacia la cámara del receptor tiene como objetivo representar la absorción del fármaco *in vivo*. La incorporación de una etapa de absorción ayuda a mejorar la evolución biológica en comparación con los sistemas de cámara única. Zhu y colaboradores (302) utilizaron el aparato iFlux para estudiar el efecto de un aumento del pH gástrico en los perfiles cinéticos de muchos medicamentos, incluido el Ketoconazol y el Nilotinib. Inicialmente, se agregaron 400 µlitros de suspensión de medicamentos a 7 ml de SGF en la cámara donante. El pH de SGF fue a pH 2 o pH 6, simulando el pH gástrico típico y la supresión ácida, respectivamente. Después de 20 minutos, se agregaron 14 ml de solución FaSSIF de Nivel II concentrada 1,5 veces a la cámara del donante y las concentraciones en ambas cámaras se controlaron durante 160 minutos. La solución de FaSSIF resultante en la cámara del donante tenía un pH de 6.5. En el experimento que simula el pH gástrico normal, el Ketoconazol se mantuvo en estado supersaturado durante al menos 20 minutos después de la adición del FaSSIF concentrado y se dividió fácilmente a través de la membrana en el compartimento aceptor. En contraste, el Nilotinib solo estaba supersaturado transitoriamente después de la adición de la solución FaSSIF en el experimento que simulaba el pH gástrico normal y parecía precipitar rápidamente. El área de superficie más pequeña de la membrana biomimética en comparación con el intestino humano dificulta la transferencia del fármaco desde el donante a la cámara receptora. Por lo tanto, la precipitación puede ser sobreestimada en la cámara donante. Esta limitación debe considerarse al imitar la relación entre la absorción y la precipitación con el uso de iFlux.

Sironi y colaboradores (303) investigaron un sistema de disolución / permeación que utiliza una cámara Ussing con un Permeapad que actúa como una barrera intestinal entre el receptor y el lado del donante. Permeapad consiste en una capa delgada de

fosfatidilcolina de soja en una hoja de soporte hidrófila. Se ha logrado una buena correlación entre los coeficientes de permeabilidad encontrados usando Permeapad con los que usan células Caco-2 ($R^2 = 0.75$) (304) y la membrana PAMPA ($R^2 = 0.76$). El volumen de medio en los compartimentos de donante y aceptor fue de 7 y 6 ml, respectivamente. Se utilizó solución salina tamponada con fosfato (pH 7,35–7,45) como medio aceptor y donante. La variabilidad interlaboratorio de estas membranas biomiméticas debe investigarse más a fondo. La compatibilidad de la membrana Permeapad con surfactantes, co-solventes y medios biorrelevantes (305) y la capacidad de uso durante una larga duración, hasta 94.5 h en el experimento, son ventajas en comparación con las membranas celulares, como Caco-2. Para evaluar la utilidad de esta configuración en la evaluación de la precipitación del fármaco en el intestino delgado superior en ayunas, se deben realizar estudios adicionales que incorporen un cambio de pH de medios gástricos a intestinales.

- Métodos compartimentales mediante membranas celulares.

Ginski y colaboradores (306) propusieron un sistema de disolución / Caco-2 de "dos pasos" con el objetivo de simular la disolución y absorción simultáneas en el tracto gastrointestinal. Esto permitiría predecir la relación de disolución-absorción para diferentes compuestos y permitir una comparación con los resultados de los estudios clínicos. Este sistema continuo consistía en un aparato de disolución y una celda de difusión. El fármaco se disuelve en el compartimento de disolución y, después de una filtración con un filtro de 10 μ m, se transfiere con una bomba a un compartimento donante, que contiene la monocapa de Caco-2. En este estudio en particular, se probaron formulaciones de Piroxicam, tartrato de Metoprolol y clorhidrato de Ranitidina de disolución rápida y lenta. En general, esta configuración de dos pasos fue capaz de reflejar

Introducción

las relaciones cualitativas de disolución-absorción. Esta configuración puede considerarse como un primer intento de unir la disolución con la permeación a través de las líneas celulares Caco-2, aunque es obvio que se deberían considerar varios factores más. Por ejemplo, la falta de un adecuado vaciado gástrico de primer orden y el nivel de evolución biológica de los medios deben tenerse en cuenta para simular mejor la absorción del fármaco *in vivo* y predecir con precisión las concentraciones plasmáticas.

Kobayashi y colaboradores (307) propusieron un sistema para predecir la absorción del fármaco utilizando células Caco-2, que también implicara el cambio de pH del estómago al intestino. El medicamento se disolvió en un recipiente que simula el estómago (pH 1,0, volumen de medio 3 ml) y una bomba transfirió el medicamento disuelto a un recipiente (pH 6,0, volumen de medio 3 ml) para ajustar el pH. La solución con el pH ajustado se transfirió luego al compartimento que contiene la monocapa de Caco-2. La misma configuración también fue utilizada por Sugawara (308) donde además se evaluó el efecto del cambio de pH en el "vaso gástrico" (es decir, simulación de aclorhidria o pacientes administrados con inhibidores de la bomba de protones o antagonistas del receptor H₂). Se encontraron diferencias significativas en la permeación acumulativa de dos formulaciones de Albendazol, una a pH gástrico elevado y otra a pH normal. Estos resultados coincidieron cualitativamente con un estudio previo en conejos realizado con las mismas formulaciones de Albendazol (309). Sin embargo, el tiempo de cultivo requerido para las células Caco-2 limita la capacidad de rendimiento de este método. Los problemas relacionados con la poca reproducibilidad de los resultados y la incompatibilidad con algunos excipientes solubilizantes (por ejemplo, surfactantes) y algunos medios (por ejemplo, FeSSIF Nivel II) también limitan aún más el uso de monocapas de células Caco-2 como barreras intestinales en estudios que examinan la precipitación intestinal (305).

Kataoka y colaboradores (310) introdujeron un sistema de disolución / permeación, que consistía en un compartimento apical y basolateral montado con una monocapa de Caco-2. El volumen de los compartimentos apical y basolateral fue de 8 y 5,5 ml, respectivamente. Los agitadores magnéticos se colocaron en ambos compartimentos y la solución salina equilibrada de Hanks se emitió en ambos lados como medio de transporte. Kataoka (311) utilizó la misma técnica, pero mejoraron su evolución biológica utilizando una solución salina equilibrada de Hank modificada que contiene taurocolato de sodio (3 mM) y lecitina (0,75 mM) como medio de transferencia. En general, se propuso que el sistema disolución / permeación era una herramienta útil para la selección de la formulación durante el desarrollo del fármaco (312). No obstante, el sistema disolución / permeación está lejos de imitar adecuadamente las condiciones *in vivo*, como la hidrodinámica, los volúmenes de fluidos, la transferencia del tracto gastrointestinal etc.

- Métodos compartimentales que intentan tener en cuenta la absorción.

Aunque los modelos que no tienen en cuenta el proceso de absorción intestinal pueden ser útiles para predecir la sobresaturación o precipitación *in vivo* del fármaco, el rendimiento *in vivo* de un producto farmacológico depende en gran medida no solo de la transferencia gastrointestinal, sino también de otros parámetros importantes, como la permeabilidad intestinal. Para tener en cuenta la absorción de fármacos en el experimento *in vitro*, se han configurado varios modelos.

Estos métodos se han propuesto principalmente para evaluar productos de API altamente permeables. Psachoulis y colaboradores (283) introdujeron una configuración de tres compartimentos para la predicción de la precipitación intraluminal de Ketoconazol y Dipiridamol. Esta configuración consistía en un compartimento gástrico, un duodenal

Introducción

y un reservorio. El compartimento del reservorio contenía medio concentrado biorrelevante del Nivel II con el fin de mantener constantes las concentraciones de pH, lecitina y sal biliar en el compartimento duodenal, compensando así la dilución que se produce cuando el fluido gástrico simulador se bombea al compartimento duodenal. Durante cada experimento, el volumen del medio en el compartimento duodenal se mantuvo constante a 60 ml. Los caudales entre los compartimentos fueron regulados por una bomba peristáltica multicanal y se utilizó una tasa de vaciado gástrico de primer orden de 15 min. Los contenidos del compartimento duodenal se renovaron completamente con medio fresco cada 15 min. Al utilizar esta configuración experimental, las concentraciones del compartimento duodenal medidas *in vitro* estuvieron en línea con las concentraciones luminales medidas en voluntarios sanos en estudios clínicos realizados previamente (210,313). Se observó precipitación *in vitro* dependiente de la dosis para el Ketoconazol. Sin embargo, los estudios de XRPD indicaron diferencias en las características de estado sólido de los precipitados; *in vitro*, el precipitado de Ketoconazol fue cristalino, pero *in vivo* fue amorfo. A pesar de los buenos resultados presentados con esta metodología, el equipo no está disponible comercialmente, lo que restringe su aplicación en la industria farmacéutica.

Kourentas y colaboradores (284) introdujeron una nueva configuración (BioGIT) para simular la transferencia y evaluar las concentraciones duodenales, la sobresaturación de fármacos o la precipitación de API altamente permeables, utilizando equipos disponibles comercialmente. Esta configuración también consta de tres compartimentos: compartimento gástrico, duodenal y reservorio (Figura 21). La vida media de vaciado gástrico es de 15 min. El volumen del medio de disolución en el compartimento gástrico es de 250 ml (10 ml de volumen en reposo, más 240 ml para la administración con un vaso de agua) y el volumen del compartimento duodenal se fija en 40 ml. El líquido del

compartimento duodenal se retira con un caudal constante de 11,6 ml / min, de modo que el volumen en el compartimento duodenal se mantiene constante durante todo el experimento. Esta tasa de flujo y los valores volumétricos se estimaron a partir de datos luminales previamente recolectados de adultos sanos. En este estudio, se evaluó la capacidad del modelo BioGIT para predecir las concentraciones intraluminales de Dipiridamol, Ketoconazol y Posaconazol. Con la configuración de BioGIT, la fracción precipitada *in vivo* se pronosticó con éxito en todos los casos (314,315). Sin embargo, se debe tener en cuenta que BioGIT se ha diseñado para simular concentraciones intraluminales de fármacos altamente permeables, después de la administración en estado de ayuno. Por lo tanto, es posible que sea necesario ajustar los caudales para simular concentraciones de fármacos con diferentes características de permeabilidad (316). La evaluación de la reproducibilidad intra e interlaboratorio de los datos de BioGIT se encuentra actualmente en proceso (317).

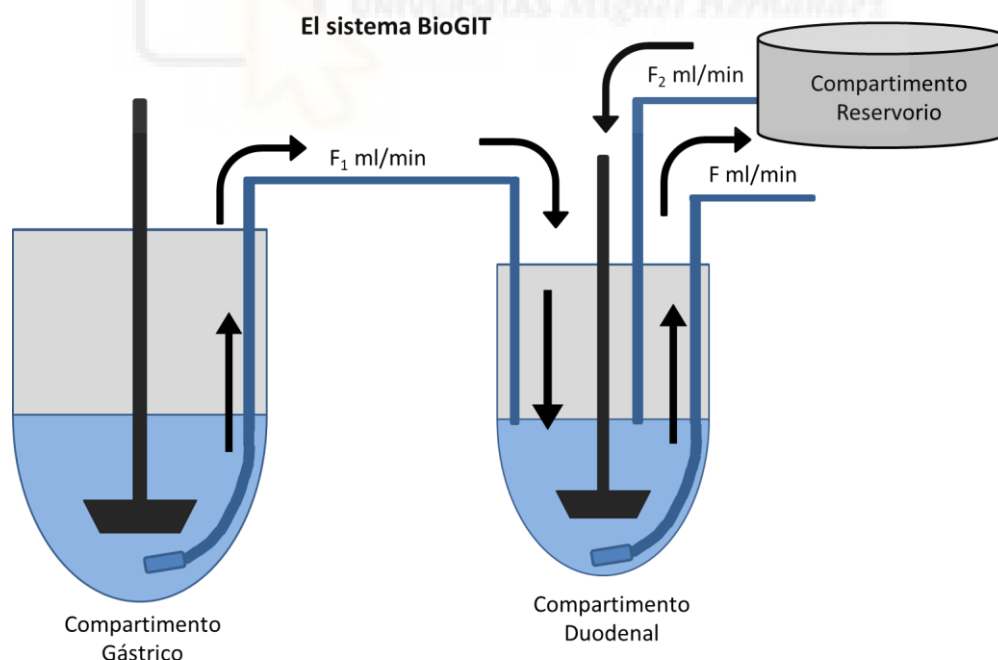


Figura 21. El sistema BioGIT propuesto por Kourentas, F_1 y F_2 son flujos de entrada y F de salida del compartimento intestinal ($F = F_1 + F_2$). Imagen adaptada de Kourentas et al.(284).

Introducción

Utilizando un enfoque similar, basado en el aparato USP II, Gu y colaboradores (318) describieron un modelo multicompartimental con cuatro compartimentos, que comprende un compartimento gástrico, intestinal, de absorción y reservorio, para mantener la composición en el compartimento intestinal. La novedad de esta configuración fue la adición del 'compartimento de absorción', para simular la captación de fármaco a través de la membrana intestinal. Todos los compartimentos se colocaron en un baño de agua a 37 ° C de temperatura y el pH en cada recipiente se mantuvo a un valor constante. El fármaco se transfirió con diferentes caudales entre los compartimentos, cuyos volúmenes se mantuvieron constantes y se controlaron mediante una bomba peristáltica. El recipiente 1 contenía 250 ml de medio de disolución para simular el volumen disponible de fluidos gástricos en el estómago en estado de ayuno. El recipiente 2 contenía 250 ml de medio de disolución, simulando la composición del intestino delgado superior, y después de la entrada del recipiente 1 durante 1 h, el volumen en el recipiente 2 aumentó a 500 ml. El recipiente 3 contenía 600 ml de etanol y 100 ml de solución de HCl 0,1 N para mantener las concentraciones del fármaco por debajo de sus valores de solubilidad a lo largo del experimento. La configuración de Gu simula el proceso de absorción en un aparato de disolución simple y no se necesitan adiciones / métodos complejos. Además, los caudales entre los compartimentos intestinal y de absorción se pueden ajustar para reflejar diferentes valores de permeabilidad, lo que facilita su uso en la investigación de la cinética de precipitación para API con diferentes propiedades de permeabilidad. Un problema puede ser el uso de un filtro durante la transferencia de contenidos del recipiente 1 al recipiente 2. Además, un desafío de esta configuración es que es difícil ajustar los caudales al compartimento de absorción para que se correlacionen con los valores de permeabilidad *in vivo*.

Mitra y colaboradores (319) propusieron otra configuración para simular el entorno dinámico del GIT; el modelo de "simulación de duodeno estomacal" (SSD) (Figura 22). El modelo SSD fue modelado según el sistema descrito por Carino (288) (Sección Sistemas abiertos) y es un modelo de cuatro compartimentos, donde también se tiene en cuenta la eliminación del fármaco del duodeno. En el modelo de SSD, se utilizaron los volúmenes basales en los compartimentos tanto gástricos como duodenales, en función de los volúmenes medios de líquidos informados previamente en estudios clínicos en adultos en ayunas. El volumen gástrico basal se fijó en 50 ml y el duodenal en 30 ml. El vaciamiento gástrico se simuló mediante un patrón de primer orden con una vida media de 15 minutos, hasta que se restableció el volumen gástrico basal. Posteriormente, el vaciamiento gástrico se mantuvo constante a 1,7 ml / min. El modelo de SSD proporcionó una buena correlación de la cantidad de fármaco en solución en el compartimento duodenal de la SSD con la biodisponibilidad de diferentes concentraciones de dosificación de Dipiridamol *in vivo*. Sin embargo, de nuevo, esta configuración no tiene en cuenta la aplicación de diferentes caudales para ajustar los valores de baja permeabilidad. Además, el modelo SSD no se basa en una configuración comercialmente disponible, como el aparato USP II, y la agitación se realiza con agitadores magnéticos a 200 rpm, lo que implica una hidrodinámica que es menos reproducible y no es fisiológicamente relevante. Para investigar su utilidad para predecir la precipitación de fármacos, se necesitan más estudios con diferentes compuestos.

Introducción

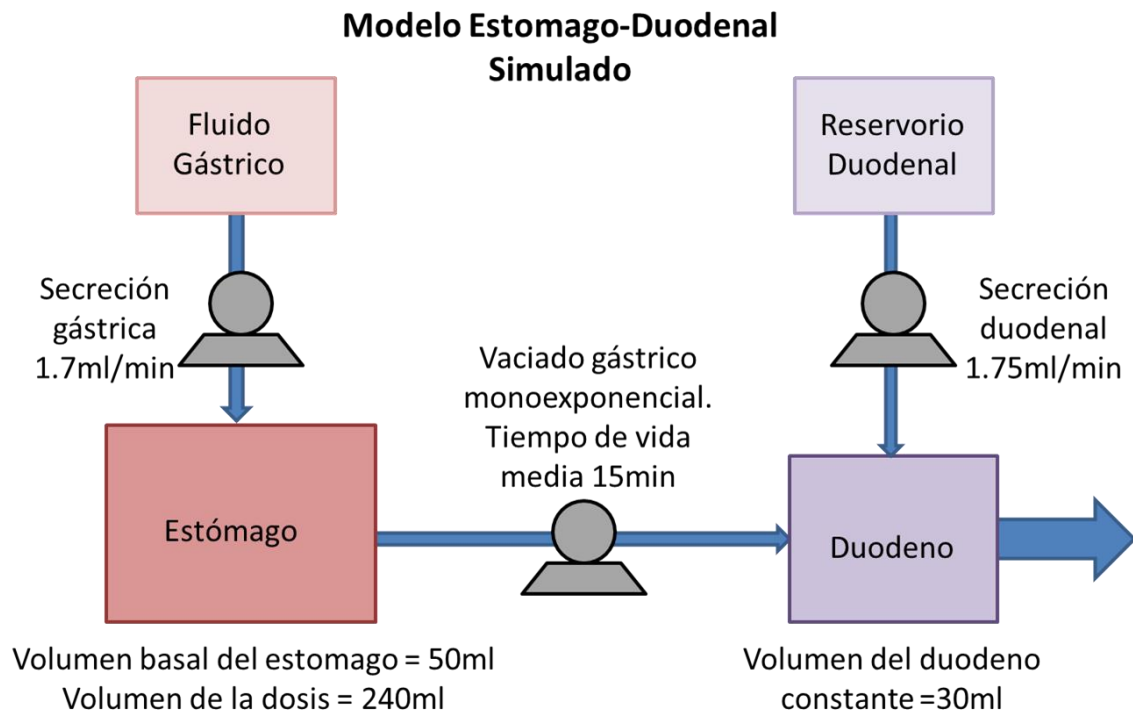


Figura 22. Esquema del Modelo Estomago-Duodenal Simulado (SSD). Imagen adaptada de Mitra y Fadda (319).

Selen y colaboradores (320) propusieron otro método de compartimento múltiple que incorpora una cámara que simula la circulación sistémica. El FloVidro™ (Dow Chemicals, Midland, MI, EE. UU.) Es un sistema de tres compartimentos con cámaras que simulan los compartimentos (células) gástricos, intestinales y sistémicos y los caudales entre las células. El volumen de líquido en las células varía según el compuesto probado; Por lo general, se utilizan 40 ml en la célula gástrica, 200 ml en la célula intestinal y 1–2 l en la célula sistémica. El uso principal de FloVidro™ ha sido predecir el perfil plasmático *in vivo* según el perfil que se logra en la célula sistémica utilizando una gran variedad de medicamentos, entre ellos Ibuprofeno, Furosemida, Paracetamol y clorhidrato de doxiciclina (320,321). El efecto de los estados, alimentados o en ayunas también se examinaron en los perfiles de disolución de Danazol y Furosemida (322). Sin

embargo, hasta la fecha no ha habido publicaciones que ilustren su aplicación a la precipitación de bases débiles poco solubles y será necesario realizar más estudios.

- Simulando la barrera epitelial intestinal.

Motz y colaboradores (323) introdujeron un sistema que consiste en el flujo a través del aparato de disolución (aparato USP IV) y un módulo de flujo a través de la permeación. Este último incluye un compartimento apical abierto y otro basolateral cerrado con una monocapa de Caco-2 entre ellos. Los caudales del medio de disolución que se transfirió de la USP IV al módulo de permeación tuvieron que ajustarse cuidadosamente, para asegurar la viabilidad y la integridad de la membrana celular Caco-2. De hecho, se sugiere el uso de un divisor de flujo disponible comercialmente, que permita la combinación del aparato USP compendial y con un compartimento de permeación / Caco-2. Aunque las monocapas de células Caco-2 son una técnica *in vitro* útil para evaluar la permeación del fármaco y permiten buenas predicciones de la permeabilidad del fármaco *in vivo*, (29,324,325) su implementación en métodos para evaluar la precipitación en el compartimento del donante puede no ser sencilla. Estas limitaciones incluyen diferentes cultivos de células Caco-2 que resultan en variabilidad de datos, dificultad para predecir el transporte paracelular como resultado de uniones más estrechas entre las células colónicas y un largo período de tiempo requerido para el cultivo celular (326). El área de superficie inferior para la línea celular Caco-2 en comparación con la membrana intestinal también es desventajosa cuando se examina la relación entre la precipitación y la absorción.

Una alternativa a las monocapas de celulares para simular la absorción del fármaco es mediante el uso de medios bifásicos (327–329). En este caso, el fármaco se disuelve en la fase acuosa y se divide en la fase orgánica. El perfil de concentración del

Introducción

fármaco que se adquiere de la fase orgánica podría ser un sustituto eficaz de la cantidad de fármaco disponible para la absorción. Vagani y colaboradores (330) desarrollaron un sistema al combinar medios bifásicos y una técnica de flujo continuo (USP IV). En particular, el aparato USP IV se combina con un aparato USP II. Las células del aparato USP IV se utilizan para contener las formulaciones y los recipientes de disolución del aparato USP II contienen los medios de disolución bifásicos, mantenidos a 37 ° C. Este sistema también ha sido utilizado por Shi (331), en general, este sistema estableció una buena IVIVC con las concentraciones de fármaco obtenidas en la fase orgánica y el rendimiento biofarmacéutico de las diferentes formulaciones fue bien discriminado.

Tsume y colaboradores (332) combinaron el simulador gastrointestinal (GIS) introducido por Takeuchi con medios bifásicos para investigar si la adición de la capa orgánica conduciría a mejores predicciones de las concentraciones plasmáticas de fármacos BCS clase II débilmente básicos (Raloxifeno y Ketoconazol). Los resultados del Ketoconazol mostraron una disminución más lenta de la concentración del fármaco en los compartimentos del intestino delgado con la presencia de la fase orgánica, en comparación con aquellos sin la adición del sistema bifásico, proporcionando así otra constante de velocidad de precipitación calculada. La incorporación de estos datos a los modelos farmacocinéticos de base fisiológica (PBPK) y la simulación con Gastroplus sugirieron una ligera mejoría en las predicciones *in vivo* de Ketoconazol. La combinación de GIS con una capa orgánica también proporcionó información sobre las características de partición de estos dos medicamentos a la fase orgánica.

Para explicar el proceso de absorción, Hate y colaboradores (333) desarrollaron un aparato acoplado con un área de membrana de alta superficie. El aparato consistía en un compartimento donante, donde tiene lugar la disolución del fármaco, un depósito de reserva y una cámara receptora, para recoger el fármaco después de la difusión a través

de la membrana (Figura 23). Se utilizó una membrana de fibra hueca para simular la absorción intestinal, debido a su alta área de superficie por unidad de volumen de fluido, lo que facilita una mayor transferencia de masa. Se usa una bomba para controlar la transferencia de fluido. Inicialmente, el medio en la cámara del donante era HCL 0.1 M. Después de 30 minutos, el pH se ajustó a pH 6,5 utilizando Na_2HPO_4 0,17 M y se conectó el sistema de absorción. Al evaluar el rendimiento de los comprimidos y el polvo de Nevirapina, se observó una rápida precipitación de la Nevirapina hasta su solubilidad de equilibrio en el compartimento del donante, tras la transición a pH 6.5. Cuando se usó un inhibidor de la precipitación (HPMC-AS), no se observó precipitación en la cámara del donante durante hasta 160 minutos, mientras que se observó un aumento en la concentración de fármaco en la cámara receptora. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en los perfiles de disolución, cuando se evaluó el rendimiento del comprimido de Nevirapina, con o sin la adición de la membrana de absorción. En general, el aparato podría ser una herramienta útil para la selección de la formulación y para evaluar la precipitación o supersaturación del fármaco. Sin embargo, se necesitan más datos para apoyar su aplicación posterior.

Introducción

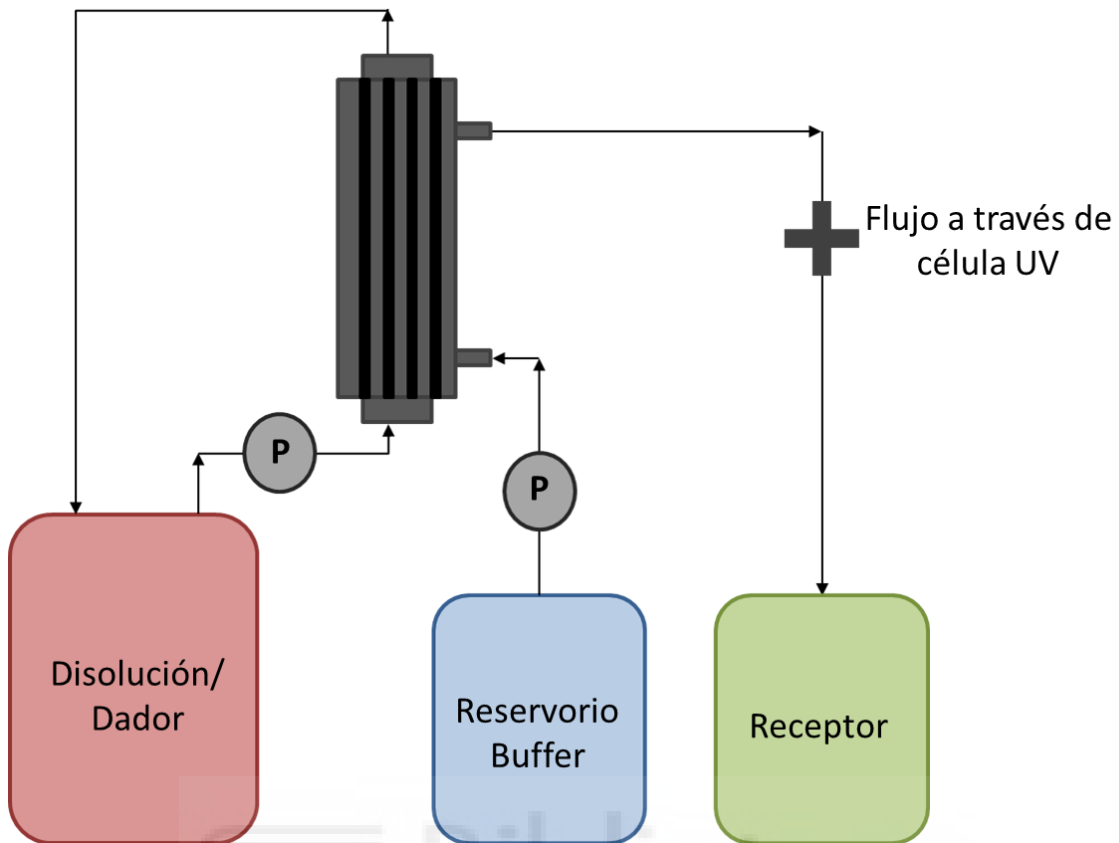


Figura 23. Esquema del aparato usado por Hate et al. La membrana de fibra hueca está representada por el tubo gris y negro. Imagen adaptada de Hate et al.(333).

El sistema de inserción de membrana artificial (sistema AMI) fue propuesto por Berben y colaboradores (334) como un método para simular la absorción pasiva de fármaco en el intestino sin el uso de sistemas basados en células, como Caco-2. El sistema AMI consiste en una membrana de celulosa regenerada montada entre dos anillos de plástico, como se muestra en la Figura 24 (334), y ha mostrado resultados comparables a las células Caco-2 al evaluar los coeficientes de permeabilidad de los fármacos poco solubles.

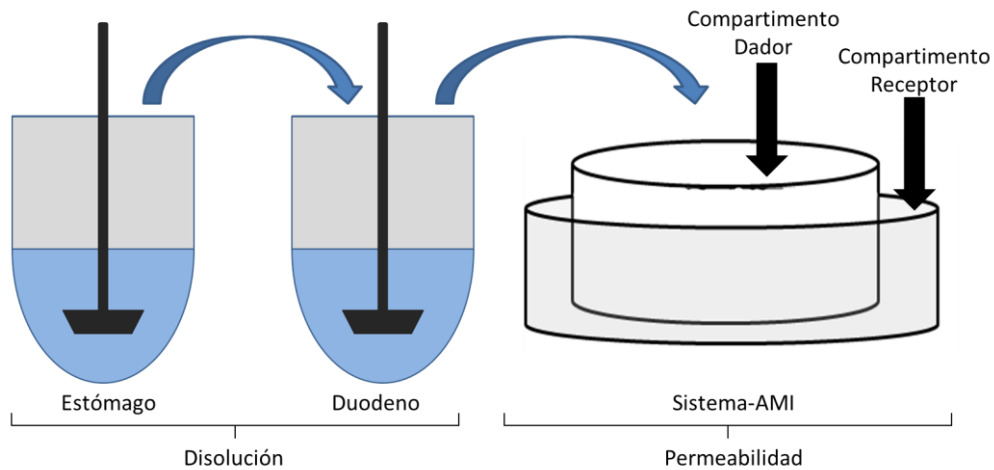


Figura 24. Esquema del Sistema-AMI propuesto por Berben et al. Imagen adaptada de Berben et al.(334).

Finalmente, y como ya se ha comentado antes, TIM-1 es un modelo multicompartimental más completo que también puede incluir el proceso de absorción. El sistema TIM-1 modela la absorción de moléculas pequeñas a través de su absorción de los sistemas de membrana de filtración o diálisis en las secciones ileal y yeyunal del sistema. De esta manera, se puede medir la cantidad de fármaco en solución que está disponible para la absorción (expresada como "bioaccesibilidad"). Sin embargo, algunos procesos activos como la absorción activa, el flujo de salida y el metabolismo intestinal no están modelados por este sistema. Se ha sugerido que el sistema TIM-1 puede combinarse con otros sistemas de absorción intestinal para facilitar el modelado de estos procesos, lo que permite una estimación de la biodisponibilidad oral de los compuestos (335). La mayoría de los estudios realizados con el TIM-1 se han centrado en la absorción de compuestos nutricionales y solo hay un número limitado de estudios publicados que se centran en la captación de compuestos farmacéuticos (336–339). El tiempo requerido para la configuración y el rendimiento limitado son limitaciones significativas al considerar su uso potencial como herramienta para predecir la precipitación *in vivo*.

Introducción

1.7.3. Modelos *in silico*.

El modelado farmacocinético con base fisiológica se ha utilizado ampliamente y se ha desarrollado rápidamente en los últimos años con muchas aplicaciones en el mundo académico y en la industria farmacéutica. Además, el modelado PBPK ha ganado aceptación en varias agencias reguladoras como parte del paquete de envío. En 2016, el Comité de Medicamentos de Uso Humano (CHMP) de EMA y FDA publicó un borrador de guía con respecto a la calificación del modelo PBPK, en relación con su uso para respaldar la autorización de comercialización (340,341), se incluirá en un informe de modelado de PBPK y qué elementos se necesitan para que una plataforma de PBPK sea calificada y evaluada para un propósito previsto. En general, el modelado PBPK se puede usar para la predicción de perfiles PK humanos a partir de datos preclínicos y es una herramienta útil para evaluar y optimizar el diseño de un ensayo clínico. También se puede utilizar para extrapolar el comportamiento farmacocinético del fármaco en voluntarios sanos a poblaciones de pacientes, donde es difícil realizar estudios clínicos. Para que un modelo de drogas exitoso se construya utilizando el enfoque "de abajo hacia arriba", la calidad de los datos de entrada es de gran importancia (342). Acoplar datos *in vitro* con métodos *in silico* puede ser muy importante para optimizar y validar modelos *in vitro* e *in silico*. El software disponible comercialmente, como Simcyp Simulator y Gastroplus, o las plataformas de modelado de código abierto e internas pueden incorporar datos *in vitro* de cinética de sobresaturación y precipitación. Esto puede conducir a una mejor comprensión de la importancia de la sobresaturación o precipitación *in vivo*. En muchos casos, la combinación de los métodos *in silico* e *in vitro* para evaluar la sobresaturación y la precipitación ha demostrado ser exitosa (267,343–345). El software Gastroplus maneja la precipitación incorporando un tiempo de precipitación promedio. Este parámetro es el tiempo medio para que las partículas precipiten de la solución,

cuando la concentración local excede la solubilidad del fármaco y es una función del pH luminal. El tiempo de precipitación predeterminado es de 900 s, que se determinó a partir del ajuste exponencial a los datos de transferencia de Dipiridamol, publicado por Kostewicz (264). Certara introdujo recientemente el 'Simcyp *In Vitro* Data Analysis Toolkit - SIVA', que está diseñado para modelar experimentos *in vitro* y estimar parámetros para el ingreso a simulaciones *in vivo* con el simulador de simulación de PBPK. Para modelar la sobresaturación y la precipitación, SIVA y Simcyp Simulator utilizan un enfoque empírico basado en la concentración de sobresaturación crítica y la constante de la tasa de precipitación obtenida en experimentos *in vitro* (343). Un problema con el software disponible es que dependen principalmente de la cinética de precipitación que, en el mejor de los casos, se han estimado con configuraciones *in vitro* no validadas. La validación de metodologías *in vitro* debería basarse idealmente en datos intraluminales en humanos. También debe señalarse que es difícil construir un modelo exitoso y validado que pueda predecir el comportamiento de un medicamento *in vivo*, especialmente para los medicamentos BCS II, III y IV (346). No obstante, el acoplamiento de los datos *in vitro* con los modelos *in silico* también puede ayudar a optimizar las técnicas *in vitro* que se están utilizando actualmente y comprender cuáles son los parámetros críticos para la sobresaturación de fármacos y la precipitación.

1.7.4. Limitaciones y Desafíos

A pesar de su potencial y amplia aplicabilidad, estos modelos se ven obstaculizados por su incapacidad para imitar completamente los procesos que ocurren *in vivo*, particularmente el control nervioso y hormonal, los mecanismos de retroalimentación, la actividad de las células mucosas, la complejidad de los movimientos peristálticos y la participación del sistema inmunitario local. Combinar todos estos parámetros en un solo enfoque *in vitro* es demasiado ambicioso, incluso sin la

Introducción

complejidad adicional de controlar el proceso de digestión en general. Sin embargo, la simulación de la complejidad del tracto gastrointestinal humano sigue siendo un desafío crucial y es necesario unir esfuerzos científicos y tecnológicos para lograr el mejoramiento y la validación de las herramientas digestivas *in vitro*.

Las contracciones fisiológicas son difíciles de simular debido a la alta complejidad en frecuencia y fuerza. En la mayoría de los modelos actuales, el quimo se mezcla simplemente con un impulsor, un agitador magnético o un baño de agitación, lo que no permite evaluar la importancia de las fuerzas mecánicas en la disgregación de alimentos o formas farmacéuticas (11). Por lo tanto, uno de los principales desafíos en la digestión *in vitro* es simular con la mayor precisión posible la peristalsis y la motilidad de los compartimentos. Los modelos también deberían reproducir las curvas de vaciado gástrico bifásicas observadas *in vivo* (347), donde el vaciado de los componentes sólidos presenta un patrón lineal que comienza después de una fase de retraso, mientras que el vaciado de líquidos comienza de manera exponencial.

Además, los modelos están actualmente desprovistos de microorganismos intestinales. Con el creciente interés en evaluar las interacciones entre los compuestos ingeridos y la microbiota residente y el gran potencial de las tecnologías "-omics" (348), otro avance importante sería inocular la microbiota residente en los pequeños compartimentos intestinales de los modelos.

Aunque se han desarrollado sistemas multicompartimentales, ninguno de ellos incluye todos los pasos desde la boca hasta el intestino grueso. El SHIME (simulador de ecosistema microbiano intestinal humano) integra todo el tracto gastrointestinal desde el estómago hasta el colon, pero ha sido diseñado específicamente para estudiar las interacciones de los componentes de los alimentos con la microbiota humana residente

(349,350). El procesamiento oral es particularmente difícil de simular, y la mayoría de los estudios *in vitro* carecen de este paso o utilizan un procedimiento de homogeneización simplificado (236). Como las propiedades del bolo impactan fuertemente la fase gástrica y los pasos subsiguientes en la digestión, es de vital importancia utilizar un bolo con propiedades fisicoquímicas y texturales relevantes durante las digestiones *in vitro*. Por lo tanto, en una visión más holística del proceso de digestión humana, los sistemas deben usarse en combinación con modelos que imitan la fase oral (8,351,352) y / o afecciones intestinales (353–357). Un enfoque final sería desarrollar un modelo que integre todas las etapas de la digestión

El potencial de los sistemas *in vitro* también debería extenderse para imitar situaciones fisiológicas y patológicas adicionales. Se deben simular cambios o alteraciones en la fisiología digestiva humana, como modificaciones en HCl, enzimas digestivas o tasas de secreción de sales biliares, cambios en el vaciado gástrico y el tiempo de tránsito, o cambios en la diversidad y abundancia de microbiota intestinal. Por ejemplo, deben diseñarse herramientas *in vitro* para estudiar los eventos que ocurren dentro del tracto gastrointestinal de poblaciones específicas, como los niños o las personas mayores (299). En particular, la industria farmacéutica necesita herramientas para realizar estudios farmacocinéticos en bebés y niños pequeños en condiciones más realistas (358). Los modelos *in vitro* también serán útiles cuando se investiguen afecciones particulares asociadas con aclorhidria o gastritis (201,299), insuficiencia pancreática, diarrea, malabsorción o enfermedades inflamatorias del intestino (359). Sin embargo, tales enfoques *in vitro* estarán limitados por la escasez de datos *in vivo*.

Una preocupación importante para los modelos *in vitro* es proporcionar una estimación precisa de la situación *in vivo*. Como resultado de la gran complejidad del tracto gastrointestinal humano, ninguno de ellos puede reemplazar realmente los

Introducción

experimentos *in vivo* y siempre se requiere una cuidadosa interpretación de los resultados. Las IVIVC, que asocian de manera confiable los datos *in vitro* e *in vivo*, siguen siendo una alta prioridad para validar los resultados *in vitro* (203). Además, la comparación entre sistemas *in vitro* es complicada (298,360) y es difícil determinar cuál de los modelos actuales proporciona los valores más precisos en términos de la situación humana. Por lo tanto, la selección del modelo más apropiado requiere una evaluación cuidadosa de los objetivos del estudio para evaluar las ventajas y limitaciones que ofrece cada tipo de sistema, y con frecuencia se debe hacer un compromiso entre complejidad técnica y relevancia fisiológica.

Se ha desarrollado y aplicado una amplia gama de modelos gastrointestinales en muchos estudios de nutrición y salud. Han proporcionado información científica valiosa sobre la evaluación de la bioaccesibilidad de nutrientes y contaminantes de los alimentos, el desarrollo y prueba de formulaciones de medicamentos y la comprensión del destino de los microorganismos en condiciones digestivas. Sin embargo, todavía es imposible imitar completamente los parámetros digestivos generales *in vivo* en un solo modelo *in vitro*, por sofisticado que sea. Es necesario realizar esfuerzos científicos y tecnológicos para mejorar aún más los sistemas digestivos artificiales, ampliar su potencial y abordar la situación humana *in vivo* aún más estrechamente.

1.7.5. Correlación *In vitro-In vivo*

El término correlación se define como una relación que existe entre diferentes variables. Una IVIVC se basa en la relación entre los parámetros de liberación/disolución obtenidos *in vitro* y parámetros de biodisponibilidad obtenidos a partir de datos *in vivo* (361). Normalmente se emplean la velocidad de disolución como parámetro *in vivo* y se relaciona con los datos de concentraciones plasmáticas *in vivo* (62).

Una IVIVC, una vez desarrollada y validada, serviría para establecer la prueba de disolución como sustituto de ensayos *in vivo*, lo que puede reducir el número de este tipo de estudios durante la etapa inicial de desarrollo y además se pueden permitir ciertos cambios posteriores a la aprobación, apoyados en los resultados de los perfiles de disolución (362).

Según la capacidad para reflejar la totalidad de la curva plasmática después de la administración de una formulación, se pueden diferenciar cuatro niveles de correlación:

- Nivel A: Este es el nivel más alto de correlación y representa una relación punto a punto entre la velocidad de disolución *in vitro* y la velocidad de absorción o disolución del fármaco en el organismo. En esta correlación los perfiles de disolución *in vitro* y la velocidad de absorción *in vivo* son directamente superponibles o se pueden hacer superponibles mediante el uso de una constante de corrección (363).
- Nivel B: Se correlacionan momentos estadísticos como el tiempo medio de disolución *in vitro* con el tiempo medio de residencia *in vivo*. En este nivel se utilizan todos los datos *in vivo* e *in vitro*, pero no se considera una correlación punto a punto porque no refleja la curva real de nivel plasmático *in vivo* (364).
- Nivel C: Es una correlación de un solo punto, en la que se relaciona un parámetro de la disolución con un parámetro farmacocinética (365).
- Nivel C múltiple: Es una correlación que implica uno o varios parámetros farmacocinéticos que se relacionan con el fármaco disuelto a distintos tiempos

Introducción

del ensayo *in vitro*. Debe basarse en, al menos, tres tiempos del ensayo de disolución para que estén representadas la fase inicial, media y final del perfil de disolución (62).

Para desarrollar la IVIVC se necesitan perfiles de concentraciones plasmáticas frente al tiempo de diferentes formulaciones de un mismo fármaco. Estos perfiles pueden provenir de un ensayo clínico diseñado y ejecutado al efecto de obtener la IVIVC, pero también pueden aprovecharse datos de estudios de Bioequivalencia.

En ocasiones, si se dispone de perfiles plasmáticos de diferentes ensayos de bioequivalencia para el uso combinado de los datos para construir una IVIVC (test frente a referencia) será necesario normalizarlos a partir de los datos plasmáticos de la formulación de referencia que se asumen bioequivalentes entre sí (366).

Una vez se tengan estos perfiles, en los que se observará una o varias bioequivalencias y bioinequivalencias, el objetivo será buscar un medio y aparato de disolución capaz de reproducir *in vitro* el comportamiento *in vivo*.

La construcción de la IVIVC en dos etapas requiere la obtención de las fracciones absorbidas a partir de las concentraciones plasmáticas y su correlación con las fracciones disueltas obtenidas con las mismas formulaciones. La obtención de las fracciones absorbidas frente a tiempo se realiza mediante técnicas de deconvolución. Una alternativa posible es el uso de aproximaciones compartimentales o modelo dependiente (367). Esto se hará mediante el método de Wagner-Nelson (368) si la cinética del fármaco es monocompartimental o mediante el método de Loo-Riegelman (369) si el fármaco sigue una cinética bicompartmental. El objetivo de esto es igualar las formas de las curvas a las de los ensayos de disolución facilitando así su comparación directa.

El siguiente problema a resolver es la diferencia en la escala temporal de los datos. Los ensayos *in vivo* se suelen alargar entre 48 y 72 horas mientras que los ensayos de disolución rara vez llegan a las 3 horas. Para solucionar esto se construye un diagrama de Levy. Un diagrama de Levy consiste en una relación entre el tiempo requerido *in vivo* e *in vitro* para la disolución / absorción de una fracción dada. Esto permite la comparación directa de los perfiles *in vivo* e *in vitro* pudiéndose de esta forma construir la correlación.

El establecimiento de la correlación tipo A en dos etapas implica la representación de las fracciones disueltas (X) y absorbidas (Y) a los mismos tiempos (reales o si es necesario escalados). La correlación debe ser única para todas las formulaciones y puede ser lineal o no. La función obtenida debe permitir a partir de fracciones disueltas calcular las fracciones absorbidas predichas que mediante convolución se transforman de nuevo en concentraciones plasmáticas. La validación de la bondad de la correlación se establece a partir de los errores de predicción de las variables cinéticas relevantes para la bioequivalencia, es decir C_{\max} y AUC.



1.8. Modelos Experimentales para Determinar la Permeabilidad

Intestinal

Según la FDA, cuando el grado de absorción en humanos es igual o superior al 90% de la dosis, el fármaco se considera de alta permeabilidad. Existen multitud de métodos para determinar la permeabilidad de un compuesto. Estos métodos deben desarrollarse y validarse usando varios fármacos modelo y de control negativo para demostrar que son adecuados para establecer la permeabilidad de fármacos. El Metoprolol se acepta como fármaco de referencia para establecer el punto de corte para clasificar los fármacos según su permeabilidad. Todos los compuestos con una permeabilidad igual o superior a la del Metoprolol serán considerados de alta permeabilidad y, por el contrario, todos aquellos con una permeabilidad inferior serán de baja permeabilidad (370).

1.8.1. *In silico*

Los métodos *in silico* son métodos computacionales con utilidad para el cribado inicial en el descubrimiento de nuevas moléculas con actividad terapéutica. La principal ventaja de estos métodos frente a los experimentales es que no necesitan que la molécula esté sintetizada para llevarlos a cabo, por otro lado, la principal desventaja es que se necesita personal con conocimientos y formación especializada en esta materia.

Los métodos *in silico* se basan en la estructura química de la molécula para predecir propiedades importantes de un compuesto relacionadas con su absorción, como la lipofilia, solubilidad, permeabilidad o metabolismo. Con estas estimaciones se puede reducir los posibles fallos en fases más avanzadas de la investigación.

Introducción

Dentro de los métodos *in silico* destacan aquellos que se basan en la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR) que relaciona los posibles cambios estructurales de la estructura química del fármaco con datos biológicos, por lo que se puede deducir como esos cambios afectarán a las propiedades biofarmacéuticas.

También existe la posibilidad, en etapas tempranas del descubrimiento y desarrollo de fármacos, de realizar una clasificación simple y rápida en los cuatro grupos del BCS a través de la obtención de los parámetros de interés mediante el uso de modelos *in silico*, utilizando propiedades físico-químicas derivadas solamente de descriptores moleculares (371).

1.8.2. *In vitro*

Membranas Artificiales

Las membranas artificiales PAMPA: *parallel artificial membrane permeation assay* son utilizadas para el cálculo de la permeabilidad, además de para clasificar, los compuestos que presentan una absorción pasiva, concretamente, aquellos que atraviesan las membranas permeables por difusión transcelular (372). En esta técnica se usa una membrana de permeación formada por lecitina y un disolvente orgánico inerte. Además, se utiliza una placa de microvaloración compuesta por numerosos insertos hidrofóbicos que actúan como soporte de la membrana (373).

La principal ventaja de este modelo es la posibilidad de realizar ensayos múltiples y determinar la permeabilidad de numerosos compuestos en un solo experimento. Por otro lado, solamente es útil para clasificar de forma sencilla los compuestos estudiados en baja, media y alta probabilidad de absorción intestinal.

En ensayos posteriores se han realizado variaciones en el método para incluir la difusión paracelular (374) y se han correlacionado los datos de permeabilidad de numerosos compuestos obtenidos en Caco-2 con los obtenidos mediante el uso de membranas artificiales (375).

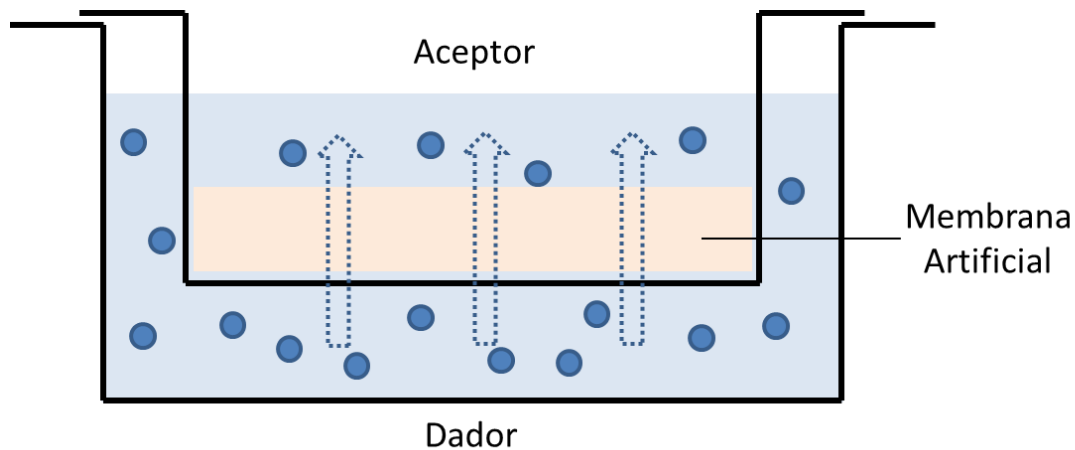


Figura 25. Representación esquemática de un modelo PAMPA. Imagen adaptada de Preclinical development handbook Toxicology.(372).

Cultivos Celulares: monocapas Caco-2

Las monocapas de células Caco-2 cultivadas en membranas permeables (membranas de policarbonato) se utilizan para la realización de estudios de transporte transepitelial de numerosas sustancias, tanto fármacos y nutrientes (376). Los ensayos en cultivos celulares se llevan a cabo en placas con un determinado número de pocillos. Cada uno de estos pocillos consta de un inserto, en el que crecerá la monocapa celular y que a su vez distingue entre dos compartimentos separados por dicha membrana, la cámara apical y la basolateral (Figura 26). Este tipo de ensayos permiten determinar si hay o no transporte activo e incluso localizar a la proteína transportadora más importante en el proceso (377,378).

Introducción

La línea celular Caco-2 fue aislada en 1977 por Fogh y colaboradores (379) a partir de carcinoma de colon humano. Es la única línea celular capaz de diferenciarse en células con gran similitud a los enterocitos de manera espontánea (380,381). Estas células, al igual que los enterocitos, presentan dos lados bien diferenciados (cara apical y basal) y uniones estrechas (*tight junctions*).

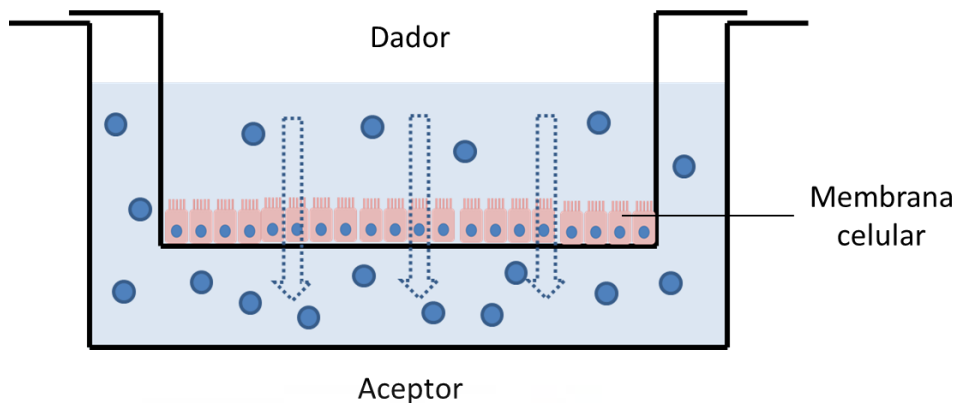


Figura 26. Representación esquemática de un pocillo donde se realizan los ensayos de cultivos celulares. Imagen adaptada de Delie y Rubas (376)

La línea celular Caco-2 dispone de una gran parte de las enzimas que se encuentran en el borde en cepillo del enterocito, además de otros sistemas de transporte especializado para aminoácidos, dipéptidos, vitaminas y citostáticos. Esto hace que esta línea sea de especial relevancia ya que todas estas características le confieren gran parecido con la membrana intestinal humana (382). La membrana basolateral también se relaciona con actividad ATP-asa dependiente de sodio-potasio y con receptores hormonales. Asimismo, aparecen enzimas intracelulares, de fase I (oxidación) y de fase II (conjugación) (383,384).

Los métodos *in vitro* con monocapas Caco-2 han demostrado ser un modelo igual de válido que otros modelos más complejos para los estudios de absorción intestinal de fármacos (385).

Los cultivos celulares presentan algunas ventajas frente a los modelos de absorción convencionales que cabe destacar:

- La reducción de la experimentación animal.
- La rápida determinación de la permeabilidad y del metabolismo de los fármacos.
- Posibilidad de estudiar los mecanismos de absorción bajo condiciones controladas.
- La rápida evaluación de métodos que mejoren la absorción de fármacos.
- La posibilidad de realizar estudios con líneas celulares humanas.

Sin embargo, también pueden presentar ciertas desventajas como es la existencia de diferencias entre los valores de permeabilidad de un mismo fármaco obtenidos en diferentes laboratorios. Este hecho se debe a la variabilidad en las condiciones experimentales y en las propias líneas celulares usadas en cada laboratorio (29).

Modelos Basados en Tejidos

En estos modelos se emplean segmentos intestinales, tanto de animales como humanos, para el estudio de la absorción de fármacos. En general el ensayo consiste en colocar una solución con el fármaco a estudiar en la zona mucosa del tejido y se determina la velocidad de absorción por la desaparición del fármaco de la solución o por la aparición de fármaco en la zona serosa. En estos modelos se conservan las características de las

Introducción

membranas biológicas y además son útiles en la determinación de la absorción gastrointestinal de diferentes segmentos del intestino (372).

Existen dos grandes tipos de sistemas experimentales que se basan en tejidos:

1) Cámaras de Difusión:

Estos modelos de absorción determinan el flujo transepitelial de los compuestos a través del tejido epitelial intacto. La técnica consiste en aislar y seccionar de forma correcta el segmento intestinal objeto de estudio para obtener capas planas de tejido. Las porciones de tejido se disponen posteriormente sobre las células de difusión estándar que se rellenan con un tampón adecuado para simular los fluidos extracelulares (386).

Una de las técnicas más conocidas dentro de las cámaras de difusión es la cámara Ussing. Esta técnica fue desarrollada en 1951 (387) y ha sido utilizada para determinar la permeabilidad con tejido intestinal animal. Pero en estudios más recientes también se ha utilizado con tejido aislado del tracto intestinal humano (388,389). Se puede evaluar tanto el transporte activo como el pasivo y ofrece la posibilidad de estudiar el transporte en distintas zonas del tracto gastrointestinal.

2) Sacos Evertidos:

Los sacos evertidos se utilizan en estudios de acumulación de fármacos en segmentos intestinales completos. Los segmentos intestinales deben ser invertidos y divididos en pequeñas porciones en forma de anillos. Para invertir el segmento se debe introducir un aplicador a través del mismo, anudar el extremo y tirar con suavidad hasta que el intestino se vuelva del revés como se

muestra en la Figura 27. A continuación, se incuban en tampones oxigenados donde se encuentra el fármaco objeto de estudio, bajo condiciones controladas de agitación y temperatura (390).

El sistema de sacos evertidos permite el estudio de la absorción intestinal la evaluación de la conversión de un profármaco en fármaco por la acción del tejido intestinal, y la discriminación de los mecanismos de absorción de fármacos en transporte pasivo o activo (390,391).

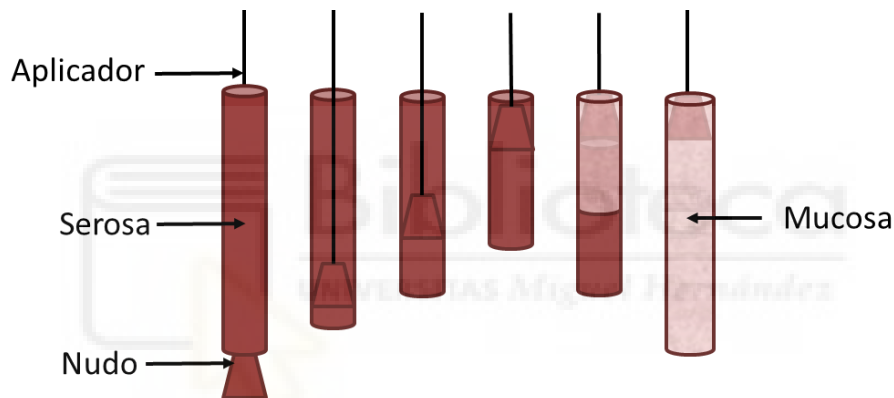


Figura 27. Procedimiento a seguir para obtener un saco evertido ^{i.o.}.

1.8.3. *In situ*

Las técnicas *in situ* se caracterizan por mantener intacto tanto el tejido neural, endocrino, sanguíneo y linfático de la zona en estudio y esto hace que la complejidad fisiológica sea superior a otros tipos de experimentos, por tanto, son sensibles a influencias farmacológicas y fisiológicas. Las técnicas *in situ* más representativas de perfusión intestinal son; el método de paso simple (single pass) y el método de Doluisio (closed loop).

Introducción

Método de Paso Simple (Single Pass)

En este método se selecciona el segmento de estudio y se abre una entrada y una salida del tramo intestinal y se perfunde a velocidad controlada una solución del fármaco de concentración conocida (Figura 28). Con esta técnica se puede controlar la concentración del fármaco, el pH, la osmolaridad, y la velocidad de entrada del mismo. El cálculo de la permeabilidad se realiza por medida de la desaparición del fármaco del lumen intestinal en estado estacionario (392–394).

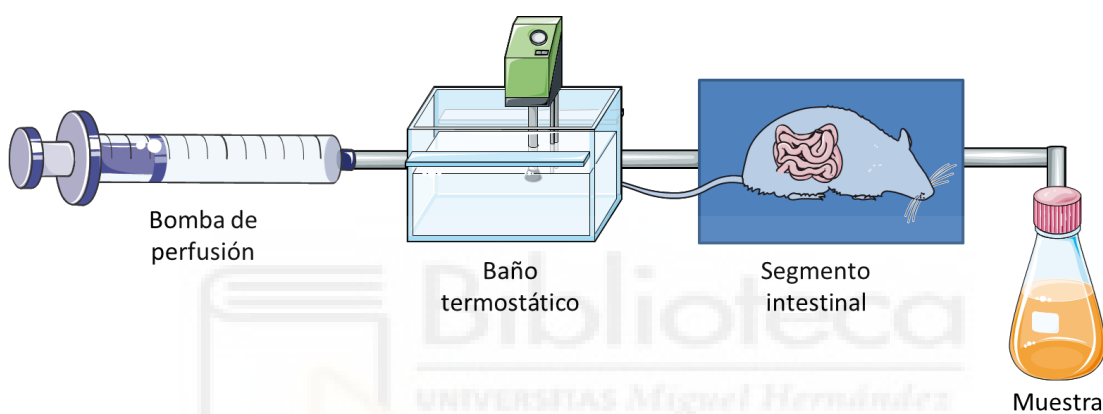


Figura 28. Esquema de la técnica de perfusión *in situ* de paso único^{i.o.}.

Método de Doluisio (Closed Loop)

Este método está basado en la técnica desarrollada por Doluisio y colaboradores (395) en 1969. En este caso el tramo intestinal a analizar se aísla canulando una entrada en la zona proximal del mismo y otra en la zona distal. Se perfunde al interior del intestino una solución de volumen y concentración conocidos, dicha solución se mantiene en el segmento intestinal durante todo el experimento. El segmento de interés queda aislado (Figura 29) dando lugar a un compartimento estanco de absorción del cual se toman muestras para observar la desaparición del fármaco del lumen.

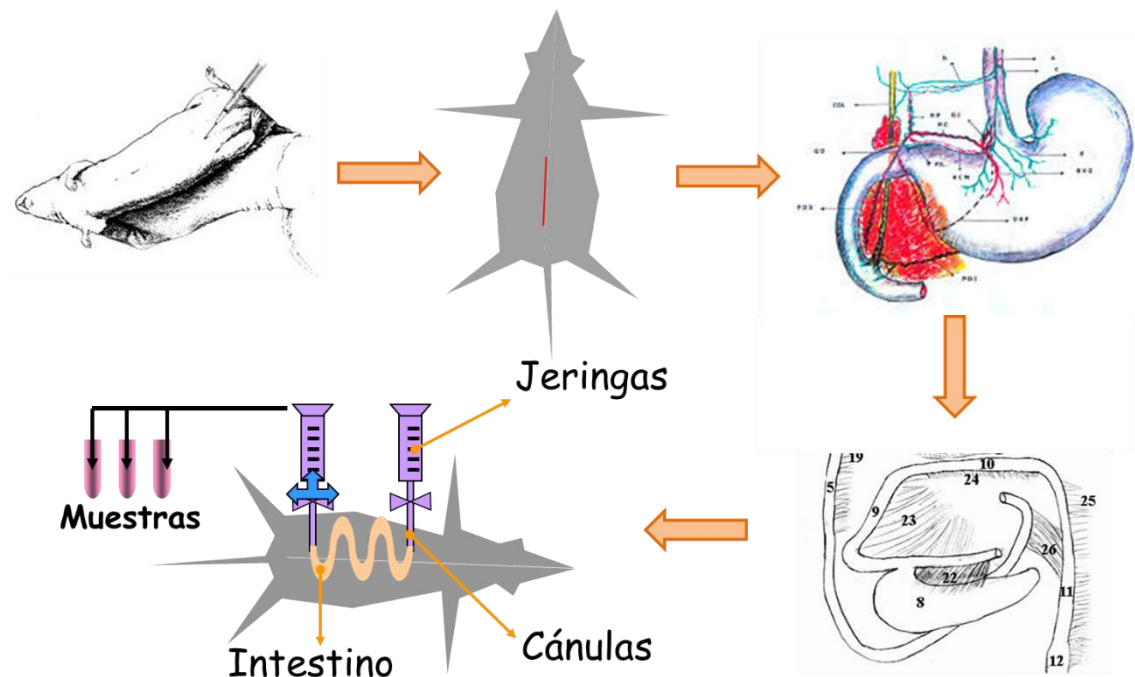


Figura 29. Representación esquemática de la técnica de perfusión *in situ* basada en el método de Doluisio. Imagen adaptada del Tratado general de biofarmacia y farmacocinética (396).

1.8.4. *In vivo*

La principal utilidad de los ensayos *in vivo* en rata es la realización de estudios de farmacocinética y de biodisponibilidad. Se entiende por biodisponibilidad la fracción o porcentaje de la dosis del fármaco administrado que accede de forma inalterada a la circulación sistémica y la velocidad a la que se produce dicho proceso.

Estos estudios hacen necesaria la toma de muestras de plasma sanguíneo. La extracción de la muestra variará en complejidad según la especie a estudiar, en el caso de la rata, se deberá someterse a una intervención en la que se le implantará un catéter de silicona en la vena yugular de forma permanente. La operación se realizará bajo condiciones de anestesia y analgesia adecuadas. Una vez el animal esté recuperado de la intervención, entre 24 a 48 horas, se pueden tomar muestras sanguíneas a través del

Introducción

catéter sin necesidad de anestesia y sin limitar su movilidad (Figura 30), lo que evita el estrés adicional para el animal (397). Esta técnica permite administrar un compuesto por cualquier vía de administración, en general por vía parenteral y por vía oral, y medir su aparición en sangre, de esta manera se puede realizar una predicción indirecta de la permeabilidad, ya que si el compuesto aparece en sangre implica que ha atravesado la membrana absorbente.

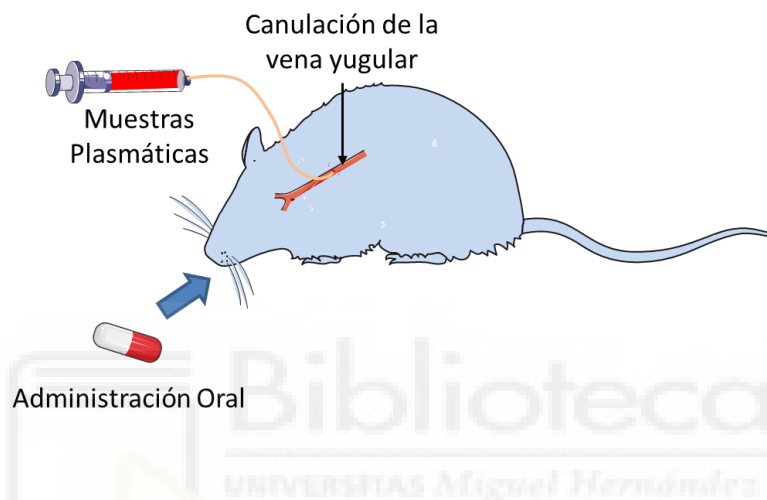


Figura 30. Representación esquemática del método de canulación de la vena yugular en rata ^{i.o.}.

1.8.5. Determinación de la Permeabilidad en Humanos

Métodos Indirectos

1) Estudio Farmacocinético de Balance de Masas:

En estos estudios se administra a voluntarios sanos una dosis conocida del fármaco a estudiar por vía oral. El fármaco debe de estar radiomarcado con el fin de ser fácilmente identificado. Posteriormente a la administración se recolectan muestras de sangre, orina y heces a fin de cuantificar el fármaco y sus metabolitos en cada muestra biológica obtenida. Al conocer la dosis inicial

y al compararla a las cantidades presentes en las diferentes muestras se puede desarrollar un estudio farmacocinético completo (398).

2) Estudio de Biodisponibilidad Absoluta:

En estos estudios se administra, en los mismos voluntarios sanos, el fármaco a estudiar tanto por vía oral como por vía intravenosa y posteriormente se comparan los resultados disponibles de ambas administraciones obteniéndose información útil sobre la distribución y eliminación del fármaco e indirectamente se determina la permeabilidad oral y la influencia de enzimas y transportadores presistémicos. El fármaco puede estudiarse en plasma sanguíneo o en orina y debe conocerse con exactitud los metabolitos que se pueden encontrar en la muestra biológica estudiada. El método analítico ha de ser adecuado para cuantificar tanto el fármaco como los metabolitos. La razón entre el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo obtenida tras la administración de la dosis oral y la dosis intravenosa, permite el cálculo de la biodisponibilidad absoluta del fármaco administrado por vía oral (399).

Métodos Directos

Las medidas directas de permeabilidad intestinal y secreción de fármacos en humanos son posibles gracias a técnicas de perfusión intestinal de la región de interés (400,401). Existen diferentes sistemas, según donde se sitúen los balones de oclusión; sin balones (Figura 31A) en la porción proximal (Figura 31B), o en ambos extremos del segmento a estudiar (Figura 31C) (402). En dicho segmento se perfundirá una solución de fármaco y al mismo tiempo se aspirarán muestras directamente del lumen intestinal. Se calcula la permeabilidad en función de la desaparición del fármaco en el lumen del

Introducción

segmento a estudiar, por lo que reflejará la velocidad de transporte a través de la membrana intestinal, expresada en centímetros por segundo (403).

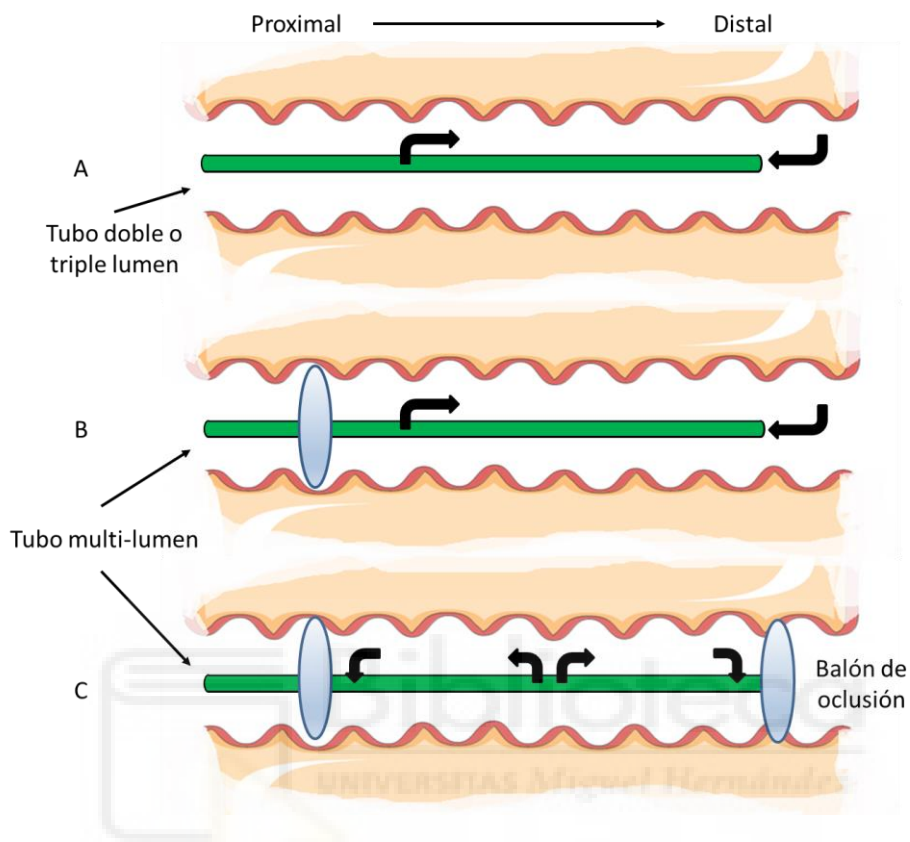


Figura 31. Esquema de los modelos de perfusión intestinal en humanos. Imagen adaptada de Lennernaäs (401).

2. Materiales y métodos.





2.1. Compuestos

Los API (Atenolol, Digoxina y Rodamina) fueron proporcionados por Sigma-Aldrich.

Las tres formulaciones de Pravastatina estudiadas (Referencia, NBE y BE) fueron facilitadas compañías farmacéuticas, así como el compuesto puro.

Lipemol (Bristol-Myers, Squibb, S.A.) 40mg de Pravastatina por comprimido se usó como producto de referencia. Sus excipientes son: croscarmelosa de sodio, estearato de magnesio, óxido de magnesio, celulosa microcristalina, óxido de hierro amarillo, lactosa anhidra y povidona K30.

Las formulaciones bioequivalentes de Pravastatina (BE) y no bioequivalentes (es decir, al no concluir BE en el estudio, NBE) fueron donadas por una compañía farmacéutica española. Los excipientes en la formulación de NBE son: croscarmelosa de sodio, estearato de magnesio, celulosa microcristalina, óxido de hierro amarillo, sílice coloidal, carbonato de magnesio y lactosa anhidra.

En la formulación BE, los excipientes son: estearato de magnesio, celulosa microcristalina, óxido de hierro amarillo, povidona K30, fosfato de calcio monobásico anhidro, almidón glicolato de sodio, trometamol y fosfato de sodio dibásico deshidratado.

Los resultados obtenidos en sus correspondientes estudios de BE en voluntarios sanos de diseño cruzado de 2x2 se presentan en la Tabla 5. La formulación no bioequivalente no mostró bioequivalencia en C_{max} .

Materiales y Métodos

Parámetro farmacocinético	Estimación e intervalo de confianza del 90% (%)	
	NBE	BE
C_{\max}	112.50 (100.20-126.30)	105.36 (95.66-116.04)
$AUC_{0-\infty}$	100.10 (92.50-107.50)	99.15 (92.90-105.82)

Tabla 5. Resultados de bioequivalencia *in vivo* de las formulaciones de Pravastatina. n=36 pacientes

Telmisartán (M = 514.64 g / mol; logP = 7.232) fue cedido por una compañía farmacéutica. Las formulaciones de prueba y el producto de referencia fueron proporcionadas por dos compañías farmacéuticas. Todas ellas consisten en formulaciones de Telmisartán de liberación inmediata con excipientes convencionales en cantidades habituales.

El estudio 1 de Telmisartán *in vivo* fue un estudio de BE cruzado, aleatorizado, de dos períodos, simple ciego, que usó 71 sujetos sanos. El estudio 2 fue un estudio abierto, equilibrado, aleatorizado, de dos tratamientos, tres períodos, tres secuencias, dosis única, replicado de referencia, cruzado, estudio de BE en 55 sujetos sanos. En cada estudio, los voluntarios recibieron dos formulaciones, una dosis de liberación inmediata de la formulación de prueba (X1 o X2, 80 mg) y una dosis de la formulación de referencia (Micardis, 80 mg) en una secuencia determinada por aleatorización. Se estableció un período de lavado de 14 y 10 días, respectivamente, entre períodos en cada estudio. Se tomaron muestras de sangre hasta 72 h. La concentración de Telmisartán en muestras de sangre se determinó mediante un método de HPLC validado en ambos estudios. C_{\max} y AUC se calcularon a partir de los perfiles de tiempo de concentración plasmática

promedio. Las AUC se estimaron individualmente por métodos no compartimentales a partir de las observaciones *in vivo*. Por otro lado, los datos públicos del intervalo de confianza del 90% como resultado de un tercer estudio BE estaban disponibles, así como la formulación empleada Y1, que también fue amablemente proporcionada por la compañía farmacéutica fabricante.

Los resultados obtenidos en todos los estudios cruzados de BE de Telmisartan se presentan en la Tabla 6. Las formulaciones no bioequivalentes X1 e Y1 (NBE) no fueron formulaciones bioequivalentes en C_{\max} , ya que su intervalo de confianza del 90% no estaba dentro de los límites de aceptación (0.8-1.25). Además, los intervalos de confianza del 90% del C_{\max} para X1 e Y1 no incluyeron el valor del 100%, lo que demuestra que hubo una diferencia estadísticamente significativa con los productos de referencia

Parámetro farmacocinético	Estimación e intervalo de confianza del 90% (%)		
	X1 (NBE)	X2 (BE)	Y1 (NBE)
C_{\max}	86.31 (71.11–95.37)	93.80 (82.77–106.33)	81.34 (72.31–91.51)
$AUC_{0-\infty}$	93.99 (89.27–98.97)	93.50 (89.30–97.94)	97.04 (92.43–101.97)

Tabla 6. Resultados de bioequivalencia *in vivo* de las formulaciones de Telmisartán

Se probaron tres formulaciones diferentes de Dexketoprofeno, el producto comercializado en España de referencia (Enantyum®, Laboratorios Menarini S.A., Barcelona, España) y dos medicamentos genéricos.

La Tabla 7 representa la composición cualitativa para cada formulación en términos de excipientes y material de recubrimiento.

Materiales y Métodos

Dexketoprofeno 25 mg (Dexketoprofeno Trometamol 36.9 mg) Comprimidos recubiertos con película	Composición Cualitativa de Excipientes
Medicamento de referencia comercializado (Enantyum®)	Núcleo: celulosa microcristalina, almidón de maíz, diestearato de glicerol, almidón glicolato de sodio Recubrimiento: hipromelosa, dióxido de titanio, polietilenglicol (PEG) 600 y propilenglicol
BE	Núcleo: celulosa microcristalina, almidón de maíz, diestearato de glicerol, almidón glicolato de sodio, estearato de magnesio y sílice coloidal Recubrimiento: hipromelosa, dióxido de titanio, polietilenglicol (PEG) 600, propilenglicol, macrogol 6000 y talco
NBE	Núcleo: celulosa microcristalina, almidón de maíz, diestearato de glicerol, almidón glicolato de sodio, estearato de magnesio, sílice coloidal y monohidrógeno fosfato de calcio Recubrimiento: hipromelosa, dióxido de titanio, polietilenglicol (PEG) 600 y propilenglicol, macrogol 6000 y talco

Tabla 7. Composición cualitativa del medicamento de referencia comercializado y los productos de prueba.

Los resultados obtenidos en sus correspondientes estudios de Dexketoprofeno se presentan en la Tabla 8. La formulación no bioequivalente no mostró bioequivalencia en C_{\max} .

Parámetro farmacocinético	Estimación del intervalo de confianza del 90% (%)	
	NBE	BE
C_{\max}	102.65 – 132.10 %	90.46 – 108.51%
$AUC_{0-\infty}$	98.78 – 104.02%	104.29 – 111.82%

Tabla 8. Resultados de bioequivalencia *in vivo* de las formulaciones de Dexketoprofeno.

Materiales y Métodos

Las soluciones pediátricas de Omeprazol, Levofloxacino e Hidrocortisona se formularon en diferentes servicios de farmacia de hospitales en el área de Valencia (España). La composición de las formulaciones se muestra en la Figura 32.

AAS (500mg Ratiopharm), Acenocoumarol (Sintrom 4mg MERUS LABS), Atenolol (100mg ALIUD PHARMA), Candesartán (32mg 1st Pharma), Ramipril (10mg AbZ Pharma) y Valsartán (320mg PUREN) fueron formulaciones comerciales proporcionadas por Johannes Gutenberg Universität (Mainz, Alemania)

El espesante utilizado fue Resource ThickenUp Clear, que se compone principalmente de; Maltodextrina (maíz, patata), espesante (goma xantana) y sal mineral (cloruro de potasio). Se utilizó para simular la administración de medicamentos en pacientes con disfagia.

En el caso de las pruebas con espesante (desintegración, disolución, permeabilidad o determinación del perfil reológico), el medio se realizó el día anterior al experimento. Se preparó el medio y se agregó una cucharada (2.7 g) de espesante por cada 250 ml de medio. Se dejó agitar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Se usó leche de fórmula (Hero Baby - Pedialac 1 UHT: 3.5% de grasa) para simular la alimentación del paciente pediátrico y, por lo tanto, evaluar cómo esto influye en la velocidad de disolución de las formulaciones pediátricas administradas. La composición comprende; Maltodextrinas, aceites vegetales, suero deslactosado, caseinato calcico, minerales, triglicéridos de cadena media, emulgente (lecitina de soja), aceites de hongos y algas, vitaminas (C, E, niacina, ácido pantoténico, B1, B6, A, B2, ácido fólico, K, biotina, D3 Y B12), 5'-monofosfato, adenosina 5'-monofosfato, guanosina 5'-monofosfato e inosina 5'- monofosfato) y L-carnitina.

Materiales y Métodos

<p>Hidrocortisona 1mg/ml SUSPENSION ORAL 1</p> <p>Composición para 200 ml:</p> <p>Hidrocortisona..... 200mg</p> <p>Syrspend © SF Liquid Cherry pH 4 csp.... 200ml</p> <p>AGITAR ANTES DE USAR</p> <p>Conservar en nevera</p>	<p>Hidrocortisona 2,5mg/ml SUSPENSION ORAL 2</p> <p>Composición para 200 ml:</p> <p>Hidrocortisona..... 500mg</p> <p>Glicerina..... 50ml</p> <p>Metilcelulosa 1%.....45ml</p> <p>Jarabe simple csp..... 200ml</p> <p>AGITAR ANTES DE USAR</p> <p>Conservar en nevera</p>
<p>Hidrocortisona 1 mg/ml SUSPENSION ORAL 3</p> <p>Composición para 200 ml:</p> <p>Hidrocortisona..... 200mg</p> <p>Glicerina..... 0,5ml</p> <p>Jarabe simple.....15ml</p> <p>Ácido cítrico..... 600mg</p> <p>Caramelosa Sódica 1% csp.....200ml</p> <p>AGITAR ANTES DE USAR</p> <p>Conservar en nevera</p>	
<p>Levofloxacino 50mg/ml SUSPENSION ORAL 1</p> <p>Composición para 100 ml:</p> <p>Levofloxacino..... 500mg</p> <p>Syrspend © SF Liquid Cherry pH 4 csp.... 100ml</p> <p>AGITAR ANTES DE USAR</p> <p>Conservar en nevera</p>	<p>Levofloxacino 50mg/ml SUSPENSION ORAL 2</p> <p>Composición para 100 ml:</p> <p>Levofloxacino..... 500mg</p> <p>Glicerina..... 5ml</p> <p>Metilcelulosa 1%.....50ml</p> <p>Jarabe simple csp..... 100ml</p> <p>AGITAR ANTES DE USAR</p> <p>Conservar en nevera</p>
<p>Omeprazol 2mg/ml SUSPENSION ORAL 1</p> <p>Composición para 100 ml:</p> <p>Omeprazol..... 200mg</p> <p>Syrspend © SF ALKA csp..... 100ml</p> <p>AGITAR ANTES DE USAR</p> <p>Conservar en nevera</p>	<p>Omeprazol 2mg/ml SUSPENSION ORAL 2</p> <p>Composición para 100 ml:</p> <p>Omeprazol..... 200mg</p> <p>Bicarbonato 1M solución csp..... 100ml</p> <p>AGITAR ANTES DE USAR</p> <p>Conservar en nevera</p>

Figura 32. Composición de las soluciones pediátricas de Hidrocortisona

Levofloxacino y Omeprazol.

Para la preparación de la leche de fórmula (Hero Baby - Pedialac 1), se siguieron las instrucciones y la tabla de dosificación que acompañaba al paquete. Por cada 30 ml de agua se añadió 1 taza de medir. Se agitó hasta obtener una mezcla completamente

Materiales y Métodos

homogénea sin grumos. Para crear el tampón con leche, se añadieron 200 ml de tampón estudiado y 100 ml de leche para tener un volumen final de 300 ml. En las pruebas de permeabilidad, se realizó el mismo proceso con el tampón a pH 6,8, se añadió la dosis correspondiente y se agitó en ultrasonido durante 30 minutos antes del experimento.

El metanol, el acetonitrilo y el agua fueron de grado HPLC. Todos los demás productos químicos fueron de grado analítico reactivo.





2.2. Pruebas de Disgregación.

En los experimentos de disgregación, se midió el tiempo que tardó el comprimido en disgregarse. Se comienza a medir el tiempo cuando se inicia el dispositivo y se detiene cuando no se percibe ningún residuo del comprimido dentro de la cesta del dispositivo.

2.2.1. El Aparato de Disgregación Convencional de la USP.

Se deposita un comprimido en cada uno de los seis tubos en la canasta, se agregaron los discos, se atempera el medio seleccionado a 37.0 ± 2.0 ° C y se inicia el movimiento vertical al mismo tiempo que se empieza a medir el tiempo. Se considerará que el comprimido se ha disgregado por completo cuando no se observan partículas sólidas dentro del tubo. El experimento se realizó seis veces. Se reportó la media de los valores y la desviación estándar.

2.2.2. Aparato de Disgregación Modificado

Este dispositivo es una modificación del aparato de disgregación de PhEur / USP. Las diferencias hacen que las condiciones hidrodinámicas sean más representativas del comportamiento *in vivo*.

El movimiento del contenedor se realiza mediante un control numérico computerizado (CNC). Esto permite ajustar la velocidad y la dirección del movimiento. Con estas variaciones, se pueden generar diferentes perfiles de velocidad en las 3 dimensiones.

Para esta tesis, se diseñaron movimientos circulares en las tres dimensiones del espacio (Figura 33) a seis velocidades de movimiento diferentes (20-120 mm / seg). La velocidad permanece lineal y constante durante el experimento.

Materiales y Métodos

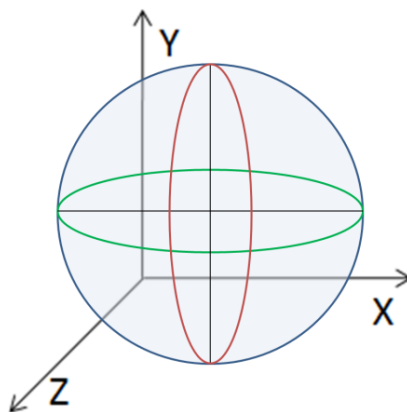


Figura 33: Movimiento tridimensional del Aparato de Disgregación ^{i.o.}.

Como el experimento convencional, el experimento se realizó seis veces y se reportaron la media y la desviación estándar de los valores del tiempo de disgregación para las diferentes velocidades y medios estudiados.



2.3. Ensayos de Disolución.

2.3.1. Aparato USP II.

Se usó un Aparato USP II (método de paleta) (Pharma-Test PT-DT70) con diferentes volúmenes de diferentes medios a $37 \pm 0,5$ ° C y 50 rpm para realizar los ensayos de disolución. Se tomaron muestras (5 ml) a diferentes tiempos y se centrifugaron a 8000 rpm durante 5 minutos. Se reemplazó el mismo volumen de tampón para mantener constante el volumen de prueba durante toda la prueba. Estos experimentos se realizaron en seis réplicas. Los resultados se mostrarán en gráficos como porcentaje de dosis disuelta frente al tiempo.

Los medios utilizados para los ensayos de disolución fueron los tampones estándar descritos en la Farmacopea Europea.

La Tabla 9 muestran las condiciones experimentales usadas en el Aparato USP II (modelo de paleta) según el fármaco estudiado.

	Medio de Disolución	Volumen (ml)	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempos de muestreo (min)
Telmisartán	Medios de Ph. Eur.			
	pH 1.2			
	pH 4.5			
	pH 6.8			
	Diferentes capacidades del buffer			
	pH 6.0, 10 mM	900	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60
	pH 6.5, 10 mM			
	pH 6.8, 10 mM			
	Medios de Ph. Eur. Con Surfactantes			
	pH 4.5 + Tween 80 (0.05%)			
	pH 6.8 + Tween 80 (0.05%)			
Medios Biorrelevantes				
FaSSIF				

Materiales y Métodos

Pravastatina	Medios de Ph. Eur.			
	pH 1.2			
	pH 4.5	300, 500, 900	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120
	pH 6.8			
Atenolol	Medios de Ph. Eur.			
	pH 1.2			
	pH 4.5			
	pH 6.8	900	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120
	Espesante			
	pH 1.2 + Espesante pH 4.5 + Espesante pH 6.8 + Espesante			
Candesartán	Medios de Ph. Eur.			
	pH 1.2			
	pH 4.5			
	pH 6.8	900	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120
	Espesante			
	pH 1.2 + Espesante pH 4.5 + Espesante pH 6.8 + Espesante			
Valsartán	Medios de Ph. Eur.			
	pH 1.2			
	pH 4.5			
	pH 6.8	900	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120
	Espesante			
	pH 1.2 + Espesante pH 4.5 + Espesante pH 6.8 + Espesante			
Hidricortisona	Medios de Ph. Eur.			
	pH 1.2			
	pH 4.5			
	pH 6.8	300	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120
	Leche			
	pH 1.2 + Leche pH 4.5 + Leche pH 6.8 + Leche			

Levofloxacin	Medios de Ph. Eur.			
	pH 1.2			
	pH 4.5			
	pH 6.8			
	Leche	300	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120
	pH 1.2 + Leche			
	pH 4.5 + Leche			
	pH 6.8 + Leche			
Omeprazol	Medios de Ph. Eur.			
	pH 1.2			
	pH 4.5			
	pH 6.8			
	Leche	300	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120
	pH 1.2 + Leche			
	pH 4.5 + Leche			
	pH 6.8 + Leche			
Dexketoprofeno	FaSSIF-v1 a pH 6.5			
	0.01 N HCl (pH 2)			
	0.01 N HCl + 34 mM NaCl	500	50	3, 6, 9, 15, 30, 45
	0.01 N HCl + 135 mM NaCl			

Tabla 9. Medios de disolución, volumen del medio, velocidad de rotación de la paleta y tiempos de muestreo utilizados para los estudios de disolución en el Aparato USP II (modelo de paletas).

Materiales y Métodos

2.3.2. Aparato USP IV

Los perfiles de disolución se analizaron también usando un Aparato USP IV. Estos perfiles de disolución se obtuvieron con un sistema de celdas de flujo automático, un Aparato USP IV (Erweka, Alemania) con celdas de 22,6 mm (i.d.) y una bomba de pistón (Erweka, Alemania).

Los experimentos con el Aparato USP IV (sin recirculación) se realizaron a $37,0 \pm 0,5$ ° C y con un caudal de 8 ml / min. Se tomaron muestras secuenciales utilizando membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m (Millipore) a diferentes intervalos de tiempo utilizando seis réplicas.

La Tabla 10 muestra las condiciones experimentales de Telmisartán, utilizando el Aparato USP IV (sistema celda de flujo automático).

Medios de Disolución	Velocidad del Flujo (ml/min)	Tiempos de muestreo (min)
Medios de Ph. Eur.		
pH 1.2 (durante 15 min)	8	5, 10, 15
pH 4.5 (durante 15 min)	8	20, 30
pH 6.8 (durante 90 min)	8	45, 60, 90, 120
Medios de Ph. Eur. Con Surfactantes		
pH 1.2 + Tween 80 (0.05%) (15')	8	5, 10, 15
pH 4.5 + Tween 80 (0.05%) (15')	8	20, 30
pH 6.8 + Tween 80 (0.05%) (15')	8	45, 60, 90, 120
Medios Biorrelevantes		
FaSSIF	8	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120

Tabla 10. Medios de disolución, velocidad de flujo y tiempos de muestreo utilizados para estudios de disolución de Telmisartán en Aparato USP IV.

2.4. Comparación Matemática de Perfiles de Disolución

Para comparar los perfiles de disolución de una formulación test y una formulación referencia en cada condición, se usó el factor de similitud f_2 . Los valores de f_2 mayores o iguales a 50 indican que los perfiles de disolución son similares. Cuando más del 85% del fármaco se disuelve en 15 minutos, los perfiles de disolución pueden aceptarse como similares sin una evaluación matemática adicional (404)(405). Se tomará el mismo número de puntos de ambos perfiles para su cálculo. Según la FDA, se deben tomar puntos hasta que ambos perfiles excedan el 85% de la dosis disuelta, mientras que, según la EMA, se deben tomar puntos hasta que solo una de las dos formulaciones exceda este valor. En este estudio, f_2 se calculó según los criterios de la FDA porque se consideró más restrictivo. El factor f_2 se calcula siguiendo la ecuación 20:

$$f_2 = 50 * \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n n(R_t - T_t)^2 \right] - 0.5 * 100 \right\}$$

Ecuación 20

donde R_t y T_t son el porcentaje acumulado disuelto en cada uno de los n puntos de tiempo seleccionados del producto de referencia y prueba, respectivamente.



2.5. Correlación *In Vitro*–*in Vivo*

Para el establecimiento de las correlaciones IVIV de este trabajo se utilizó en procedimiento en dos etapas. Los datos de concentraciones plasmáticas utilizados corresponden a las formulaciones de Dexketoprofeno Trometamol y Telmisartán provenientes de dos estudios de bioequivalencia uno que resultó en la conclusión de Bioequivalencia (Test BE) y otro en el que la misma no pudo demostrarse (Test NBE).

Se procedió a la normalización de los datos plasmáticos mediante la relación entre las concentraciones plasmáticas de las dos formulaciones de referencia. La normalización se realizó tiempo a tiempo.

La deconvolución a partir de los niveles plasmáticos para la obtención de las fracciones absorbidas, f_a , se realizó en Microsoft Excel (Redmond, WA) mediante el procedimiento de Loo-Riegelman (Ecuación 24) dadas las características bicompartimentales del Dexketoprofeno y el Telmisartán. Para la estimación de las micro y macro constantes que rigen estas cinéticas se realizó con el complemento PKsolver (406). La obtención de estas microconstantes requiere datos intravenosos que se obtuvieron de Valles y colaboradores (407) en el caso del Dexketoprofeno y de (408) Stangier y colaboradores en el caso de Telmisartán

$$P_t = k_{12} \cdot e^{-k_{12} \cdot t} \cdot \int_0^t C \cdot e^{-k_{12} \cdot t} \partial t$$

$$M = C \cdot e^{-k_{12} \cdot t}$$

$$N = \int_0^t C \cdot e^{-k_{12} \cdot t} \partial t = AUC_0^t$$

Ecuación 21

Materiales y Métodos

Estas ecuaciones rigen la cinética cuando el fármaco se distribuye a un compartimento periférico desde el compartimento central, es decir, es un fármaco que sigue una cinética bicompartimental.

Una vez establecida la correlación entre fracciones absorbidas y disueltas se procede a la validación interna. Para ello se predicen mediante la correlación las fracciones absorbidas a partir de las fracciones disueltas experimentales. Las fracciones absorbidas predichas se usan para estimar las concentraciones plasmáticas predichas mediante convolución (409). Este procedimiento también se implementó en Microsoft Excel.

La validación interna se realizó mediante la estimación del porcentaje de error de predicción (% PE) en los valores de $C_{\text{máx}}$ y AUC con las formulaciones utilizadas para desarrollar la correlación. La validación externa se realizó con las formulaciones no incluidas en el desarrollo de la IVIVC.

El %PE se estima mediante la siguiente ecuación.

$$RE\% = 100 \times \left(\frac{\text{valor experimental} - \text{valor predicho}}{\text{valor experimental}} \right)$$

Ecuación 22

2.6. Ensayos de Permeabilidad *In situ*

2.6.1. Animales

Se usaron ratas Wistar machos con un peso de 250–300 g ($n = 4-6$) para todos los estudios de permeabilidad *in situ*. Los experimentos con animales fueron aprobados por el Comité Científico de la Facultad de Farmacia, Universidad Miguel Hernández, y siguieron las pautas descritas en la Directiva CE 86/609, el Convenio del Consejo de Europa ETS 123 y las leyes nacionales españolas que rigen el uso de animales en la investigación.

2.6.2. Método Doluisio

Para determinar la permeabilidad, se realizaron pruebas *in situ* sin recirculación en el intestino de rata Wistar según el método desarrollado por Doluisio en 1969 (395). Las ratas se anestesiaron con inyección intraperitoneal de pentobarbital (40 mg / kg) y se dividieron en dos grupos. En el primer grupo, se realizó una incisión en la línea media abdominal y se identificó y canuló el intestino delgado completo (aproximadamente 100 cm) en ambos extremos utilizando cánulas de vidrio unidas a un tubo de silicona para la conexión con válvulas de paso y jeringas de vidrio. En el segundo grupo, se identificaron y canularon segmentos del duodeno (aproximadamente 10 cm), yeyuno (aproximadamente 45 cm) e íleon (aproximadamente 45 cm), en el mismo animal, en ambos extremos usando también cánulas de vidrio unidas con jeringas de vidrio. En ambos grupos, el conducto biliar se ligó para evitar la liberación de sales biliares en la luz intestinal.

Además, se recogió la solución de perfusión restante en el intestino para evaluar el grado de absorción de agua presentado por el animal. La reabsorción de agua se caracterizó como un proceso de orden cero y la constante de reabsorción de agua (k_0) se calculó como se describe en la ecuación 23:

$$k_0 = (V_0 - V_{end})/t_{end}$$

Ecuación 23

donde V_0 es el volumen de solución de perfusión introducida en el segmento intestinal al comienzo del experimento, V_{end} es el volumen de solución de perfusión medido al final del experimento, y t_{end} es el tiempo total del experimento (30 min). Se usó el valor k_0 para estimar el volumen de agua restante en cada punto de tiempo (V_t).

Por lo tanto, la concentración experimental (C_e) se corrigió en cada punto de tiempo utilizando la ecuación 24:

$$C_t = C_e(V_t/V_0)$$

Ecuación 24

donde C_t representa la concentración del fármaco en ausencia de reabsorción de agua en el tiempo t , y C_e representa el valor experimental correcto. Los valores de C_t se usaron para calcular los coeficientes de tasa de absorción real (410).

El coeficiente de velocidad de absorción (k_a) se determinó mediante análisis de regresión no lineal de las concentraciones remanentes en la luz del segmento intestinal (C_t) frente al tiempo como se muestra en la ecuación 25:

Materiales y Métodos

$$C_t = C_0 e^{-k_a t}$$

Ecuación 25

A partir del valor k_a es posible calcular la permeabilidad efectiva (P_{eff}) usando la ecuación 1:

$$P_{eff} = k_a r / 2$$

Ecuación 1

donde r es el radio del segmento intestinal. r se calculó considerando el segmento intestinal como un cilindro (Volumen = $\pi r^2 L$). La estimación se realizó utilizando el volumen de perfusión para cada segmento intestinal.

En la Tabla 11 se presenta un resumen de las condiciones para realizar el experimento de permeabilidad / luminal de los diferentes API y formulaciones utilizadas en este estudio y la Tabla 12 muestra la concentración de los diferentes excipientes usados en la parte referente al estudio de su efecto en el proceso de absorción.

Materiales y Métodos

Fármaco	Segmento intestinal	Concentración (mg/ml)	Medio de disolución	Forma Farmacéutica
Atenolol	Intestino Completo Duodeno, Yeyuno, Íleon Colon	0.026 (100µM) 0.4*(Espesante)	Buffer Fosfato pH 6.8 +Espesante +Excipientes	Solución
Candesartán	Intestino Completo	0.128*	Buffer Fosfato pH 6.8 +Espesante	Suspensión
Digoxina	Duodeno, Yeyuno, Íleon	0.001*	Buffer Fosfato pH 6.8	Solución
Hidrocortisona	Intestino Completo	0.02*	Buffer Fosfato pH 6.8 +Leche	Suspensión
Ketoprofeno	Intestino Completo Duodeno, Yeyuno, Íleon Colon	0.0258 (100µM)	Buffer Fosfato pH 6.8	Solución
Levofloxacinó	Intestino Completo	1*	Buffer Fosfato pH 6.8 +Leche	Suspensión
Metoprolol	Intestino Completo Duodeno, Yeyuno, Íleon Colon	0.267 (100µM)	Buffer Fosfato pH 6.8	Solución
Omeprazol	Intestino Completo	0.04*	Buffer Fosfato pH 6.8 +Leche	Suspensión
Rodamina	Duodeno, Yeyuno, Íleon	0.034 (100µM)	Buffer Fosfato pH 6.8 +Excipientes	Solución
Valsartán	Intestino Completo	1.28*	Buffer Fosfato pH 6.8 +Espesante	Solución
*Dosis /250ml				

Tabla 11. Condiciones de los ensayos de permeabilidad *in situ* en Rata Wistar basados en el método Doluisio.

Materiales y Métodos

Excipiente	Concentración (mg/ml)
Almidón	2.32
Celulosa Microcristalina	0.5
Cremophor	0.1
Croscarmelosa	2
Estearato de Mg	0.1
HPMC	0.2
Lactosa	0.05
LSS	0.1
MgCO ₃	0.12
MgO	0.06
PEG 400* (μl/ml)	0.2
PEG 6000* (μl/ml)	0.2
Propilenglicol* (μl/ml)	1.8
PVP	0.026
Sílice Coloidal	0.012
Sorbitol * (ml/ml)	0.05
Talco	0.02
TiO ₂	0.032
TWEEN 80* (ml/ml)	0.053

Tabla 12. Concentración de los excipientes usados en los ensayos *in situ*. Estas concentraciones son las comúnmente usadas en formas orales.

2.7. Caracterización Reológica

Las propiedades reológicas de los diferentes fluidos se caracterizaron en un reómetro rotacional RV 12 (HAAKE, Alemania). Este método se basa en el sistema placa-placa. Se determinará una cantidad de líquido en la placa inferior y la placa superior se baja a una distancia de 0,5 mm. Posteriormente se verifica que el medio a estudiar cubre la circunferencia entre las dos placas y se inicia el sistema. El dispositivo medirá la resistencia a la rotación de la placa superior de acuerdo con la velocidad de rotación como valores de esfuerzo cortante (Pa).

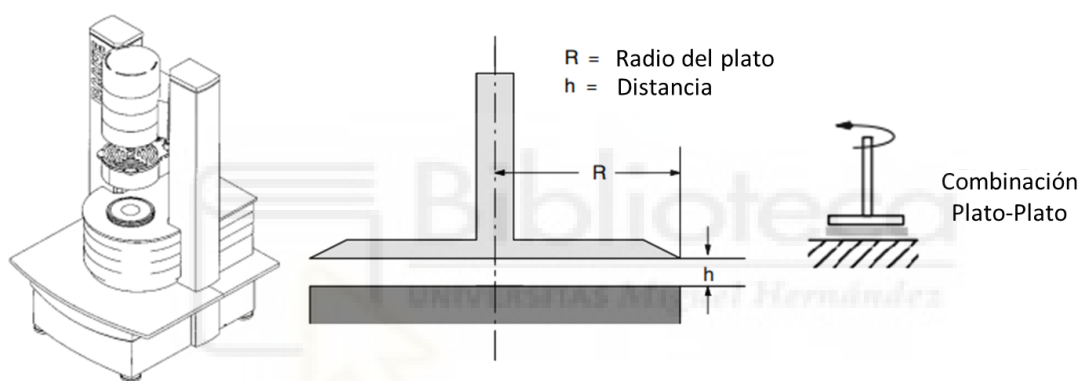


Figura 34. Esquema de un reómetro rotacional RV 12 (HAAKE, Alemania).

Se colocaron 600 μL de cada muestra en la placa inferior previamente ajustada a 37°C. La placa superior era un P35 Ti L, que se ajustó a una altura de 0,5 mm. Los valores de esfuerzo cortante se registraron cada 0.3 s en el rango de velocidades de corte de 3 a 600 s^{-1} .

La forma de representar los datos gráficamente era determinar las medianas de intervalos de tiempo más largos (3 segundos). La resistencia al movimiento está directamente relacionada con la viscosidad, por lo que los perfiles que logran una mayor resistencia también se considerarán de mayor viscosidad.



2.8. Análisis de las Muestras

Se utilizaron dos métodos para el análisis de las muestras de los diferentes fármacos utilizados: análisis de cromatografía líquida de alta resolución y análisis por espectrofotómetro.

PerkinElmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer	
Compuesto	nm
Atenolol	273.9
Hidrocortisona	245
Levofloxacino	245
Omeprazol	280
Valsartán	225.7

Tabla 13. Condiciones del espectrofotómetro de Atenolol, Hidrocortisona, Levofloxacino, Omeprazol y Valsartán.



Materiales y Métodos

HPLC					
Compuesto	nm	Fase Móvil	Flujo	Tiempo de Retención (min)	Volumen de Inyección
Atenolol	231 UV	5:90:5 (v/v) Metanol:Agua Ácida:Acetonitrilo	1 ml/min	3.5	40 µl
Candesartán	260 UV	80:2:18 (v/v/v) Metanol:Agua Ácida:Acetonitrilo	1 ml/min	1.2	50 µl
Dexketoprofeno*	262 UV	40:60 (v/v) Agua Ácida : Acetonitrilo	1 ml/min	3.95	75 µl
Digoxina	218 UV	72:28 (v/v) Agua Ácida : Acetonitrilo	1 ml/min	3	50 µl
Hidrocortisona	245 UV	70:30 (v/v) Agua Ácida : Acetonitrilo	1 ml/min	2.75	50 µl
Levofloxacino	285 UV	60:40 (v/v) Agua Ácida : Acetonitrilo	1 ml/min	1.2	50 µl
Omeprazol	280 UV	70:30 (v/v) Agua Ácida : Acetonitrilo	1 ml/min	1.6	50 µl
Pravastatina	238 UV	50:40:19 (v/v/v) Metanol:Agua Ácida:Acetonitrilo	1 ml/min	1.6	50 µl
Rodamina	485 ex: 546 em (Fluorescencia)	60:40 (v/v) Agua Ácida : Acetonitrilo	1 ml/min	2.3	20 µl
Telmisartán	305 UV	55:45 (v/v) Agua Ácida : Acetonitrilo	1 ml/min	1.85	5 µl
Valsartán	250 UV	55:45 (v/v) Agua Ácida : Acetonitrilo	1 ml/min	1.83	30 µl
Columna usada: Nova Pak® Waters (C18 3.9 ×150 mm; 4.0 µm) *C-18 Agilent Eclipse XDB (4.6 150 mm; 3.5 µm)					
Los métodos se validaron previamente con una linealidad, precisión y exactitud adecuadas (R> 0,99 y un coeficiente de variación <5%).					

Tabla 14. Condiciones cromatográficas.

2.9. Análisis Estadístico

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (DE). El análisis estadístico se realizó con SPSS (Versión 22). La prueba de Levene, la prueba de T-Student, el análisis de varianza (ANOVA) y las pruebas de Scheffe se utilizaron para las estadísticas. Un valor de $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.





2. Materials and methods.





2.1. Compounds

The APIs (Atenolol, Digoxin and Rhodamine) were purchased from Sigma-Aldrich.

The three different formulations of Pravastatina (Reference, NBE and BE) were facilitated by pharmaceutical companies. Pure Pravastatin were also provided by the same companies.

Lipemol (Bristol-Myers, Squibb,S.A.) 40mg each tablet was used as reference product. Its excipients are: croscarmellose sodium, magnesium stearate, magnesium oxide, microcrystalline cellulose, yellow iron oxide, anhydrous lactose and povidone K30.

Pravastatin bioequivalent (BE) and non-bioequivalent (i.e failing to conclude BE in the study, NBE) formulations were donated by a Spanish pharmaceutical company. The excipients in the NBE formulation are: croscarmellose sodium, magnesium stearate, microcrystalline cellulose, yellow iron oxide, colloidal silica, magnesium carbonate and anhydrous lactose.

In the BE formulation the excipients are: magnesium stearate, microcrystalline cellulose, yellow iron oxide, povidone K30, calcium phosphate monobasic anhydrous, sodium starch glycolate, trometamol and sodium phosphate dibasic dehydrate.

The results obtained in their corresponding 2x2 cross-over BE studies are reported in Table 5. The non-bioequivalent formulation failed to show bioequivalence in C_{max} .

Materials and methods

Pharmacokinetic parameter	Point estimate and 90% confidence interval (%)	
	Non-BE formulation (NBE)	BE formulation (BE)
C_{\max}	112.50 (100.20-126.30)	105.36 (95.66-116.04)
$AUC_{0-\infty}$	100.10 (92.50-107.50)	99.15 (92.90-105.82)

Table 5. *In vivo* bioequivalence results of the Pravastatin test formulations. n=36 patients

Telmisartan (MW = 514.64 g/ mol; logP= 7.232) was given by a pharmaceutical company. Test formulations and the reference product were kindly provided by two pharmaceutical companies. All of them consist of immediate release telmisartan formulations with conventional excipients in customary amounts.

The Telmisartan *in vivo* Study 1 was a single-blind, controlled, balanced, randomized, two-period crossover BE study using 71 healthy subjects. Study 2 was an open label, balanced, randomized, two-treatment, three-period, three sequence, single-dose, reference-replicated, crossover, BE study in 55 healthy subjects. In each study, the volunteers received two formulations, one immediate release (IR) dose of the test formulation (X1 or X2, 80 mg) and one dose of the reference formulation (Micardis, 80 mg) in a sequence determined by randomization. A washout period of 14 and 10 days, respectively, was set between periods in each study. Blood samples were taken up to 72 h. Telmisartan concentration in blood samples was determined by a validated HPLC method in both studies. C_{\max} and AUC were calculated from the average or individual plasma concentration time profiles. AUC were estimated individually by noncompartmental methods from the *in vivo* observations. On the other hand, public data from the 90% confidence interval as the outcome of a third BE study was available as

well as the employed formulation Y1, which was also kindly provided by the manufacturing pharmaceutical company.

The results obtained in all of the crossover BE studies are reported in Table 6. The nonbioequivalent formulations X1 and Y1 (NBE) were not bioequivalent formulation in C_{max} , as their 90% confidence interval was not inside the acceptance limits (0.8–1.25). In addition, the 90% confidence intervals of the X1 and Y1 C_{max} did not include the 100% value, showing that there was a statistical significant difference with the reference products at the significance level employed.

Pharmacokinetic parameter	Point estimate and 90% confidence interval (%)		
	X1 (NBE)	X2 (BE)	Y1 (NBE)
C_{max}	86.31 (71.11–95.37)	93.80 (82.77–106.33)	81.34 (72.31–91.51)
$AUC_{0-\infty}$	93.99 (89.27–98.97)	93.50 (89.30–97.94)	97.04 (92.43–101.97)

Table 6. *In vivo* bioequivalence results of the Telmisartan test formulations

Three different formulations of Dexketoprofen were tested, the reference Spanish marketed product (Enantyum®, Laboratorios Menarini S.A., Barcelona, Spain) and two generic drug products.

Table 7 represents the qualitative composition for each formulation in terms of excipients and coating material.

Materials and methods

Dexketoprofen 25 mg (as Dexketoprofen Trometamol 36.9 mg) Film-Coated tablets	Qualitative Composition of Excipients
Reference marketed drug product (Enantyum®)	Core: microcrystalline cellulose, maize starch, glycerol distearate, sodium starch glycolate Coating: hypromellose, titanium dioxide, polyethylene glycol (PEG) 600, and propylene glycol
Test product (bioequivalence (BE))	Core: microcrystalline cellulose, maize starch, glycerol distearate, sodium starch glycolate, magnesium stearate and colloidal silica * Coating: hypromellose, titanium dioxide, polyethylene glycol (PEG) 600, propylene glycol, macrogol 6000 and talc
Test product failing BE study (Non-BE)	Core: microcrystalline cellulose, maize starch, glycerol distearate, sodium starch glycolate, magnesium stearate, colloidal silica and calcium monohydrogen phosphate Coating: hypromellose, titanium dioxide, polyethylene glycol (PEG) 600, and propylene glycol, macrogol 6000 and talc

Table 7. Qualitative differential composition of the reference marketed drug product and the test products. The ingredients in bold are the added excipients to the core or the coating of the tablet for both test products, which was not presented in the reference marketed drug product.

The results obtained in their corresponding Dexketoprofen BE studies are reported in Table 8. The non-bioequivalent formulation failed to show bioequivalence in C_{max} .

Pharmacokinetic parameter	Point estimate and 90% confidence interval (%)	
	Non-BE formulation (NBE)	BE formulation (BE)
C_{max}	102.65 – 132.10 %	90.46 – 108.51%
$AUC_{0-\infty}$	98.78 – 104.02%	104.29 – 111.82%

Table 8. *In vivo* bioequivalence results of the Dexketoprofen test formulations

Materials and methods

The pediatric solutions of Omeprazole, Levofloxacin and Hydrocortisone were formulated in different pharmacy services of hospitals in the Valencian area (Spain). The formulations composition is shown in Figure 32.

ASS (500mg Ratiopharm), Acenocoumarol (sintrom 4mg MERUS LABS), Atenolol (100mg ALIUD PHARMA), Candesartan (32mg 1st Pharma), Ramipril (10mg AbZ Pharma) and Valsartan (320mg PUREN) were commercial formulations provided by the Johannes Gutenberg Universität (Mainz, Germany)

The thickener used was Resource ThickenUp Clear, which is mainly composed of; Maltodextrin (corn, potato), thickener (xanthan gum), mineral salt (potassium chloride). It was used to simulate the administration of medications in patients with dysphagia.

In case of thickener tests (disintegration, dissolution, permeability or determination of the rheological profile), the media was made the day before the experiment. The media was prepared and a spoonfull (2.7g) of thickener was added for every 250ml of media. It was allowed to stir at room temperature for 24 hours.

Formula milk (Hero Baby - Pedialac 1 UHT: 3.5% fat) was used to simulate the feeding of the pediatric patient and thus, to assess how this influences the dissolution rate of the pediatric formulations administered.

For the preparation of the formula milk (Hero Baby - Pedialac 1), the instructions and the dosage table that accompanied the package were followed. For each 30ml of water 1 measuring cup was added. Shake well until you get a completely homogeneous mixture without lumps. To create the buffer with milk, 200 ml of studied buffer and 100 ml of milk were added to have a final volume of 300 ml. In the Permeability tests the same

Materials and methods

process was performed with the buffer at pH 6.8, the corresponding dose was added and it was stirred in ultrasound for 30 min prior to the experiment.

Methanol, acetonitrile and water were HPLC grade. All other chemicals were of analytical reagent grade.

<p>Hydrocortisone 1mg/ml ORALSUSPENSION 1</p> <p>Composition to 200 ml:</p> <p>Hydrocortisone..... 200mg</p> <p>Syrspend® SF Liquid Cherry pH 4 csp.... 200ml</p> <p>SHAKE BEFORE USING</p> <p>Store in a refrigerator</p>	<p>Hydrocortisone 2,5mg/ml ORALSUSPENSION 2</p> <p>Composition to 200 ml :</p> <p>Hydrocortisone..... 500mg</p> <p>Glycerin..... 50ml</p> <p>Methylcellulose 1%.....45ml</p> <p>Syrup simple csp..... 200ml</p> <p>SHAKE BEFORE USING</p> <p>Store in a refrigerator</p>
<p>Hydrocortisone 1 mg/ml ORALSUSPENSION 3</p> <p>Composition to 200 ml :</p> <p>Hydrocortisone..... 200mg</p> <p>Glycerin 0,5ml</p> <p>Syrup simple.....15ml</p> <p>Citric acid..... 600mg</p> <p>Sodium Caramelosa 1% csp.....200ml</p> <p>SHAKE BEFORE USING</p> <p>Store in a refrigerator</p>	
<p>Levofloxacin 50mg/ml ORALSUSPENSION 1</p> <p>Composition to 100 ml :</p> <p>Levofloxacin..... 500mg</p> <p>Syrspend® SF Liquid Cherry pH 4 csp... 100ml</p> <p>SHAKE BEFORE USING</p> <p>Store in a refrigerator</p>	<p>Levofloxacin 50mg/ml ORALSUSPENSION 2</p> <p>Composition to 100 ml:</p> <p>Levofloxacin..... 500mg</p> <p>Glycerin..... 5ml</p> <p>Methylcellulose 1%.....50ml</p> <p>Syrup simple csp..... 100ml</p> <p>SHAKE BEFORE USING</p> <p>Store in a refrigerator</p>
<p>Omeprazole 2mg/ml ORALSUSPENSION 1</p> <p>Composición para 100 ml:</p> <p>Omeprazole..... 200mg</p> <p>Syrspend® SF ALKA csp..... 100ml</p> <p>SHAKE BEFORE USING</p> <p>Store in a refrigerator</p>	<p>Omeprazole 2mg/ml ORALSUSPENSION 2</p> <p>Composition to 100 ml:</p> <p>Omeprazole..... 200mg</p> <p>Bicarbonato 1M solution csp..... 100ml</p> <p>SHAKE BEFORE USING</p> <p>Store in a refrigerator</p>

Figure 32. Composition of the pediatric solutions of Omeprazole, Levofloxacin and Hydrocortisone.

2.2. USP Disgregation Test

In the disintegration experiments the time taken for the tablet to disintegrate was measured. The time is started to be measured when the device is started and stopped when no residue of the tablet is visually perceived inside the device basket.

2.2.1. The Conventional Disintegration Test in the USP Device.

Insert a tablet into each of the six tubes in the basket, add the Disks and start the vertical movement, use the selected medium at 37.0 ± 2.0 ° C and measure the time. It will be considered that the tablet has completely disintegrated when no solid particles are observed inside the tube. The experiment was done six times. Mean of values and standard deviation were reported.

2.2.2. Modified Disintegration Apparatus

This device is a modification of the disintegration apparatus of the PhEur / USP. The differences mean that the hydrodynamic conditions are better represented and how they affect the disintegration time of solid oral forms.

The movement of the container is carried out by means of a numerical computerized control (CNC). This allows you to adjust the speed and direction of the movement. With these variations, different velocity profiles can be generated in the 3 dimensions.

For this thesis, circular movements were designed in the three dimensions of the space (Figure 33) at six different speeds of movement (20-120mm/sec). The speed remains linear and constant during the experiment.

Materials and methods

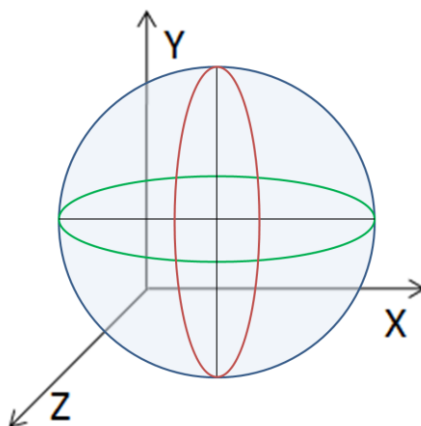


Figure 33: Three-dimensional movement ^{i.o.}.

As the conventional experiment, the experiment was performed six times and the mean and the standard deviation of disintegration time values for the different speeds and means studied were reported.



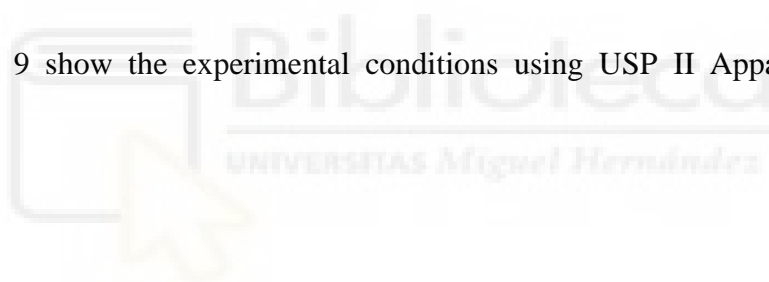
2.3. Dissolution Assays.

2.3.1. USP II Apparatus.

An USP II apparatus (paddle method) (Pharma-Test PT-DT70) with different volumes of different media at 37 ± 0.5 °C and 50 rpm was used to perform the dissolution assays. Samples (5 ml) at different times were taken and centrifuged at 8000rpm for 5 min. The same volume of buffer was replaced in order to keep the test volume constant throughout the entire test. These experiments were performed in six replicates. The results will be shown in graphs of % of dose dissolved vs. time.

The media used for dissolution assays were the standard buffers described in the European Pharmacopeia.

Tables 9 show the experimental conditions using USP II Apparatus (paddle model).



	Dissolution media	Volum (ml)	Rotation speed (rpm)	Sampling times (min)
Telmisartan	Ph. Eur. media			
	pH 1.2			
	pH 4.5			
	pH 6.8			
	different buffer capacity			
	pH 6.0, 10 mM			
	pH 6.5, 10 mM	900	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60
	pH 6.8, 10 mM			
	Ph. Eur. media with surfactant			
	pH 4.5 with Tween 80 (0.05%)			
	pH 6.8 with Tween 80 (0.05%)			
biorelevant media				
FaSSIF				

Materials and methods

Pravastatin	Ph. Eur. media			
	pH 1.2	300,		5, 10, 15, 20, 30, 45, 60,
	pH 4.5	500,	50	90, 120
	pH 6.8	900		
Atenolol	Ph. Eur. media			
	pH 1.2			
	pH 4.5			
	pH 6.8			5, 10, 15, 20, 30, 45, 60,
	Thickener	900	50	90, 120
	pH 1.2 + Thickener			
	pH 4.5 + Thickener			
pH 6.8 + Thickener				
Candesartan	Ph. Eur. media			
	pH 1.2			
	pH 4.5			
	pH 6.8			
	Thickener	900	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60,
	pH 1.2 + Thickener			90, 120
	pH 4.5 + Thickener			
	pH 6.8 + Thickener			
Valsartan	Ph. Eur. media			
	pH 1.2			
	pH 4.5			
	pH 6.8			
	Thickener	900	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60,
	pH 1.2 + Thickener			90, 120
	pH 4.5 + Thickener			
	pH 6.8 + Thickener			

Hydrocortisone	Ph. Eur. media			
	pH 1.2			
	pH 4.5			
	pH 6.8			5, 10, 15, 20, 30, 45, 60,
	Milk	300	50	90, 120
	pH 1.2 + Milk			
	pH 4.5 + Milk			
Levofloxacin	Ph. Eur. media			
	pH 1.2			
	pH 4.5			
	pH 6.8			5, 10, 15, 20, 30, 45, 60,
	Milk	300	50	90, 120
	pH 1.2 + Milk			
	pH 4.5 + Milk			
Omeprazol	Ph. Eur. media			
	pH 1.2			
	pH 4.5			
	pH 6.8			5, 10, 15, 20, 30, 45, 60,
	Milk	300	50	90, 120
	pH 1.2 + Milk			
	pH 4.5 + Milk			
Dexketoprofen	FaSSIF-v1 at pH 6.5			
	0.01 N HCl (pH 2)			
	0.01 N HCl + 34 mM NaCl	500	50	3, 6, 9, 15, 30, 45
	0.01 N HCl + 135 mM NaCl			

Table 9. Dissolution Media, Paddle Rotational Speed, and Sampling Times Used for Dissolution Studies in USP II Apparatus (Paddle Model)

2.3.2. USP IV Apparatus

Dissolution profiles were assayed also using a USP IV Apparatus. These dissolution profiles were obtained with an automated flow-through cell system, USP IV

Materials and methods

Apparatus (Erweka, Germany) with 22.6 mm cells (i.d.) and a piston pump (Erweka, Germany).

The experiments using USP IV Apparatus (without recycling) were performed at 37.0 ± 0.5 °C and with a flow rate of 8 ml/ min. Sequential sampling using 0.45 μ m nitrocellulose membranes (Millipore) were taken at different intervals of time using six replicates.

Tables 10 show, respectively, the experimental conditions to Telmisartan, using USP IV Apparatus (automated flow-through cell system).

Dissolution media	Flow rate (ml/min)	Sampling times (min)
Ph. Eur. media		
pH 1.2 (during 15 min)	8	5, 10, 15
pH 4.5 (during 15 min)	8	20, 30
pH 6.8 (during 90 min)	8	45, 60, 90, 120
Ph. Eur. media with surfactant		
pH 1.2 with Tween 80 (0.05%) (15')	8	5, 10, 15
pH 4.5 with Tween 80 (0.05%) (15')	8	20, 30
pH 6.8 with Tween 80 (0.05%) (15')	8	45, 60, 90, 120
Biorelevant media		
FaSSIF	8	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120

Table 10. Dissolution media, flow rate, and sampling times used for Telmisartan dissolution Studies in USP IV Apparatus.

2.4. Mathematical Comparison of Dissolution Profiles

To compare the dissolution profiles between test and reference formulations in each condition, the F2 similarity factor was used. F2 values greater than or equal to 50 indicates that the dissolution profiles are similar. When more than 85% of the drug is dissolved within 15 min, dissolution profiles may be accepted as similar without further mathematical evaluation (404)(405). This factor always compares a reference with a test formulation. The same number of points of both profiles will be taken for its calculation. According to the FDA, points should be taken until both profiles exceed 85% of the dissolved dose, while according to the EMA, points should be taken until only one of the two formulations exceeds this value. In this study F2 was calculated according to the FDA's criteria because it was considered more restrictive. The F2 factor is calculated following the equation 20:

$$f_2 = 50 * \log \left\{ \left[1 + \left(\frac{1}{n} \right) \sum_{t=1}^n n(R_t - T_t)^2 \right] - 0.5 * 100 \right\}$$

Equation 20

where R_t and T_t are the cumulative percentage dissolved in each of the n selected time points of the reference and test product, respectively.



2.5. In Vitro–in Vivo Correlation.

To establish IVIV correlations of this work, it was established in two-stage procedure. The data of plasma concentrations used correspond to the formulations of Desketoprofen Trometamol and Telmisartan from bioequivalence studies, one that resulted in the conclusion of Bioequivalence (BE Test) and another in which it could not be demonstrated (NBE Test).

The plasma data was normalized by means of the relationship between the plasma modifications of the two reference formulations. Normalization was done time to time.

The deconvolution from the plasma levels to obtain the absorbed fractions, f_a , was performed in Microsoft Excel (Redmond, WA) using the Loo-Riegelman (Equation 21) procedure given the bi-compartmental characteristics of Desketoprofen and Telmisartan. For the evolution of the micro and macro constants that govern these films, they were made with the PKsolver complement (406). Obtaining these microconstants requires intravenous data that were obtained from Valleys et al.(407) in the case of Desketoprofen and from Perico et al in the case of Telmisartan.

$$P_t = k_{12} \cdot e^{-k_{12} \cdot t} \cdot \int_0^t C \cdot e^{-k_{12} \cdot t} \partial t$$

$$M = C \cdot e^{-k_{12} \cdot t}$$

$$N = \int_0^t C \cdot e^{-k_{12} \cdot t} \partial t = AUC_0^t$$

Equation 21

These equations govern the kinetics when the drug is distributed in a peripheral compartment from the central compartment, it is a drug that follows a two-compartment kinetics.

Materials and methods

Once the correlation between absorbed and dissolved fractions is established, internal validation will proceed. For this, the fractions absorbed from the experimental dissolved fractions are predicted by correlation. Predicted absorbed fractions are used to estimate predicted plasma proteins by convolution (409). This procedure is also implemented in Microsoft Excel.

Internal validation was performed by estimating the percentage of prediction error (% PE) in the C_{\max} and AUC values with the formulations used to develop the correlation. External validation was performed by calculating the C_{\max} prediction error of the formulations not included in the IVIVC development.

The % PE is estimated by the following equation.

$$RE\% = 100 \times \left(\frac{\text{valor experimental} - \text{valor predicho}}{\text{valor experimental}} \right)$$

Equation 22

2.6. *In situ* Permeability Test

2.6.1. Animals

Male Wistar rats weighting 250–300 g (n = 4–6) were used for all *in situ* permeability studies. Animal experiments were approved by the Scientific Committee of the Faculty of Pharmacy, Miguel Hernandez University, and followed the guidelines described in the EC Directive 86/609, the Council of the Europe Convention ETS 123 and Spanish national laws governing the use of animals in research.

2.6.2. Doluisio Method

To determine the permeability, *in situ* tests were performed without recirculation in Wistar rat intestine based on the method developed by Doluisio in 1969 (395). Rats were anesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital (40 mg/kg) and divided into two groups. In the first group, an abdominal midline incision was made and the complete small intestine (approximately 100 cm) was identified and cannulated at both ends using glass cannulae attached to silicone tubing for connection with stopcock valves and glass syringes. In the second group, segments of duodenum (approximately 10 cm), jejunum (approximately 45 cm) and ileum (approximately 45 cm) were identified and cannulated, in the same animal, at both ends using also glass cannulae linked with glass syringes. In both groups, the bile duct was ligated to prevent the release of bile salts into the intestinal lumen.

Materials and methods

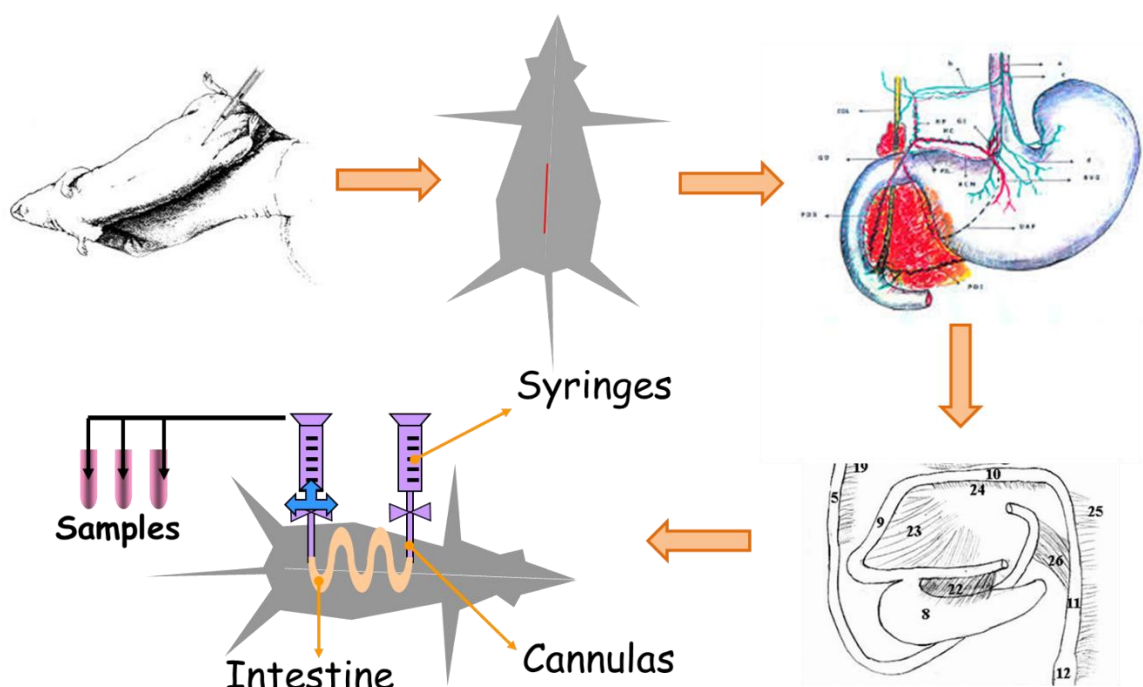


Figure 29. Schematic representation of the *in situ* perfusion technique based on the Doluisio method. Image adapted from Tratado general de biofarmacia y farmacocinética (396).

In order to remove all the intestinal contents, each segment was gently washed with perfusion solution free of drug. After complete removal of the intestinal contents, syringes with three-way stopcock valve were coupled to the cannulae and the perfusion solution containing the studied drug was introduced into the segment: 2ml for duodenum, 4 ml for jejunum and ileum, and 10 ml for complete small intestine.

200 μ l of the perfusion solution were collected every 5 min for 30 min, alternating the collection end, without replacement. The sample withdrawn volume was, later on, taken into account for water reabsorption estimation.

At the end of the experiment the animals were euthanized by cervical dislocation, the samples were centrifuged at 10000 rpm for 5 min and quantified by HPLC. In

addition, the remaining perfusion solution in the intestine was collected to evaluate the degree of water absorption presented by the animal. Water reabsorption was characterized as an apparent order zero process and the water reabsorption constant (k_0) was calculated as described in equation 23:

$$k_0 = (V_0 - V_{end})/t_{end}$$

Equation 23

where V_0 is the volume of perfusion solution introduced into the intestinal segment at the beginning of the experiment, V_{end} is the volume of perfusion solution measured at the end of the experiment, t_{end} is the total time of experiment (30 min). k_0 value was used to estimate the remaining water volume at each time point (V_t).

Thus, the experimental concentration (C_e) was corrected at each time point using the equation 24:

$$C_t = C_e(V_t/V_0)$$

Equation 24

where C_t represents the drug concentration in the absence of water reabsorption at time t , and C_e represents the correct experimental value. C_t values were used to calculate the real absorption rate coefficients (410).

The absorption rate coefficient (k_a) was determined by nonlinear regression analysis of the remaining concentrations in lumen of segment intestinal (C_t) versus time (Equation 25).

Materials and methods

$$C_t = C_0 e^{-k_a t}$$

Equation 25

From the k_a value is possible to calculate the effective permeability (P_{eff}) using equation 1:

$$P_{eff} = k_a R/2$$

Equation 1

where r is the radius of the intestinal segment. r was calculated considering the intestinal segment as a cylinder (Volume = $\pi r^2 L$). Estimation was done using the perfusion volume for each intestinal segment.

In the Table 11 a summary of the conditions to perform the permeability/luminal behavior of the different APIs and formulations used in this study is reported and Table 12 shows the concentration of the different excipients used in the part related to the study of their effect on the absorption process.

Drug	Intestinal Segment	Concentration (mg/ml)	Dissolution Media	Pharmaceutical form
Atenolol	Complete intestine, Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon	0.026 (100µM) 0.4*(Espesante)	Buffer Phosphate pH6.8 +Thickener +Excipients	Solution
Candesartan	Complete intestine	0.128*	Buffer Phosphate pH6.8 +Thickener	Suspension
Digoxin	Duodenum, Jejunum, Ileum	0.001*	Buffer Phosphate pH6.8	Solution
Hydrocortisone	Complete intestine	0.02*	Buffer Phosphate pH6.8 +Milk	Suspensión
Ketoprofen	Complete intestine, Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon	0.0258 (100µM)	Buffer Phosphate pH6.8	Solution
Levofloxacin	Complete intestine	1*	Buffer Phosphate pH6.8 +Milk	Suspensión
Metoprolol	Complete intestine, Duodenum, Jejunum, Ileum, Colon	0.267 (100µM)	Buffer Phosphate pH6.8	Solution
Omeprazole	Complete intestine	0.04*	Buffer Phosphate pH6.8 +Milk	Suspensión
Rhodamine	Duodenum, Jejunum, Ileum	0.034 (100µM)	Buffer Phosphate pH6.8 +Excipients	Solution
Valsartan	Complete intestine	1.28*	Buffer Phosphate pH6.8 +Thickener	Solution
*Dose /250ml				

Table 11. Conditions for *in situ* permeability experiments in Wistar Rat based on the Doluisio method.

Materials and methods

Excipient	Concentration (mg/ml)
Colloidal silica	0.012
Cremophor	0.1
Croscarmellose	2
HPMC	0.2
Lactose	0.05
LSS	0.1
Magnesium stearate	0.1
MgCO ₃	0.12
MgO	0.06
Microcrystalline cellulose	0.5
PEG 400* (µl/ml)	0.2
PEG 6000* (µl/ml)	0.2
Propilenglicol* (µl/ml)	1.8
PVP	0.026
Sorbitol * (ml/ml)	0.05
Starch	2.32
Talc	0.02
TiO ₂	0.032
TWEEN 80* (ml/ml)	0.053

Table 12. Concentration of excipients used in *in situ* tests. These concentrations are those commonly used in oral forms.

2.7. Rheological characterization

The rheological properties of the different fluids were characterized in a rotational rheometer RV 12 (HAAKE, Germany). This method is based on the plate-plate system. A quantity of liquid will be determined in the lower plate and the upper plate is lowered to a distance of 0.5mm. It is subsequently verified that the medium to be studied covers the circumference between the two plates and the system is started. The device will measure the resistance to rotation of the upper plate according to the speed of the rotation as shear stress values (Pa).

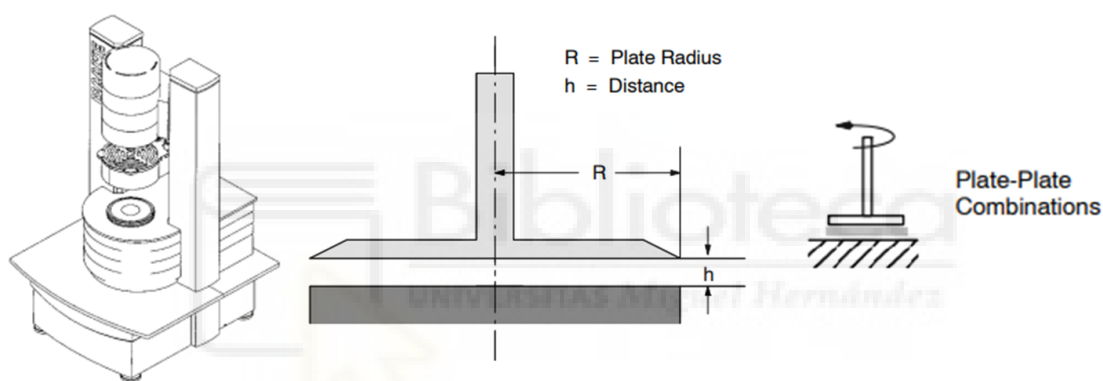


Figure 34. Scheme of a rotational Rheometer RV 12 (HAAKE, Germany).

600 μ L of each sample were placed on the bottom plate previously set at 37°C. The upper plate was a P35 Ti L, which was set to a height of 0.5 mm. Shear stress values were recorded every 0.3 s in the range of shear rates from 3 to 600 s⁻¹.

The way to represent the data graphically was to determine the medians of longer intervals of time (3 sec). The resistance to movement is directly related to viscosity, so that profiles that achieve greater resistance will also be considered higher viscosity.



2.8. Sample Analysis

Two methods were used for the analysis of the samples of the different drugs used: high performance liquid chromatography analysis and spectrophotometer analysis.

PerkinElmer Lambda 35 UV/VIS Spectrometer	
Compound	nm
Atenolol	273.9
Hydrocortisone	245
Levofloxacin	245
Omeprazol	280
Valsartan	225.7

Table 13. Spectrophotometer conditions of Atenolol, Hydrocortisone, Levofloxacin, Omeprazol and Valsartan



Materials and methods

High Performance Liquid Chromatography					
Compound	nm	Mobile phase	Flow	Retention Time (min)	Sample Volum
Atenolol	231 UV	5:90:5 (v/v) Metanol:Acidic Water:Acetonitrile	1 ml/min	3.5	40 µl
Candesartan	260 UV	80:2:18 (v/v/v) Metanol:Acidic Water:Acetonitrile	1 ml/min	1.2	50 µl
Desketoprofen*	262 UV	40:60 (v/v) Acidic Water : Acetonitrile	1 ml/min	3.95	75 µl
Digoxin	218 UV	72:28 (v/v) Acidic Water : Acetonitrile	1 ml/min	3	50 µl
Hydrocortisone	245 UV	70:30 (v/v) Acidic Water : Acetonitrile	1 ml/min	2.75	50 µl
Levofloxacin	285 UV	60:40 (v/v) Acidic Water : Acetonitrile	1 ml/min	1.2	50 µl
Omeprazol	280 UV	70:30 (v/v) Acidic Water : Acetonitrile	1 ml/min	1.6	50 µl
Pravastatin	238 UV	50:40:19 (v/v/v) Metanol:Acidic Water:Acetonitrile	1 ml/min	1.6	50 µl
Rhodamine	485 ex: 546 em (Fluorescence)	60:40 (v/v) Acidic Water:Acetonitrile	1 ml/min	2.3	20 µl
Telmisartan	305 UV	55:45 (v/v) Acidic Water:Acetonitrile	1 ml/min	1.85	5 µl
Valsartan	250 UV	55:45 (v/v) Acidic Water:Acetonitrile	1 ml/min	1.83	30 µl
Colum used: Nova Pak® Waters (C18 3.9 ×150 mm; 4.0 µm) *C-18 Agilent Eclipse XDB (4.6 150 mm; 3.5 m)					
The methods were previously validated with adequate linearity, precision, accuracy (R > 0.99 and coefficient of variation <5%).					

Table 14. Chromatographic conditions.

2.9. Statistical Analysis

The results are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using SPSS (Version 22). Levene test, T-Student Test, Analysis of variance (ANOVA) and Scheffe tests were used for statistics. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.





3.Objetivos.





El objetivo general de esta tesis es estudiar la influencia de excipientes farmacéuticos de uso habitual en los procesos de disgregación, disolución, y permeación y su repercusión en la biodisponibilidad del fármaco.

Siendo los objetivos específicos:

1. Desarrollar métodos *in vitro* para detectar inequivalencia *in vitro* entre formulaciones de liberación inmediata de disolución lenta que contienen fármacos clase I, II y III según el sistema de clasificación biofarmacéutico.
2. Desarrollo de correlaciones *in vitro-in vivo* para formulaciones de liberación inmediata de un fármaco clase II: Telmisartán.
3. Evaluar un método *in situ* para la determinación del efecto de excipientes sobre la permeabilidad intestinal de fármacos.
4. Determinar el efecto de excipientes específicos en la permeabilidad de fármacos que se absorben por difusión pasiva como el Atenolol y los que son sustrato de Glicoproteína-P como la Rodamina.
5. Estudiar el efecto de la leche en el proceso de disolución y absorción de medicamentos administrados a pacientes pediátricos.
6. Estudiar el efecto de espesantes comerciales comúnmente usados en pacientes con disfagia en el proceso de disgregación y disolución de medicamentos habitualmente usados en esta población.



3.Objectives.





The general objective of this thesis is to study the influence of pharmaceutical excipients commonly used in the processes of disintegration, dissolution, and permeation and their impact on the bioavailability of the drug.

Being the specific objectives:

1. Develop *in vitro* methods to detect *in vitro* inequivalence between immediate-release slow-release formulations containing class I, II and III drugs according to the biopharmaceutical classification system.
2. Development of *in vitro-in vivo* correlations for immediate release formulations of a class II drug: Telmisartan.
3. Evaluate an *in situ* method for determining the effect of excipients on the intestinal permeability of drugs.
4. Determine the effect of specific excipients on the permeability of drugs that are absorbed by passive diffusion such as Atenolol and those that are a substrate of P-glycoprotein such as Rhodamine.
5. Study the effect of milk on the process of dissolution and absorption of medications administered to pediatric patients.
6. Study the effect of commercial thickener commonly used in patients with dysphagia in the process of disintegration and dissolution of medications commonly used in the geriatric population.



4.Resultados y Discusión.





4.1. Desarrollar métodos *in vitro* para detectar inequivalencia *in vivo* basándonos en el BCS

Para desarrollar métodos *in vitro* capaces de detectar o predecir inequivalencias *in vivo* nos basaremos en el sistema de clasificación biofarmacéutica (57). Este sistema clasifica los fármacos en cuatro grandes grupos según su solubilidad y permeabilidad. Es importante determinar la clase BCS del fármaco a estudiar dado que tanto la estrategia como las conclusiones a las que podremos llegar están íntimamente relacionadas con su clase BCS.

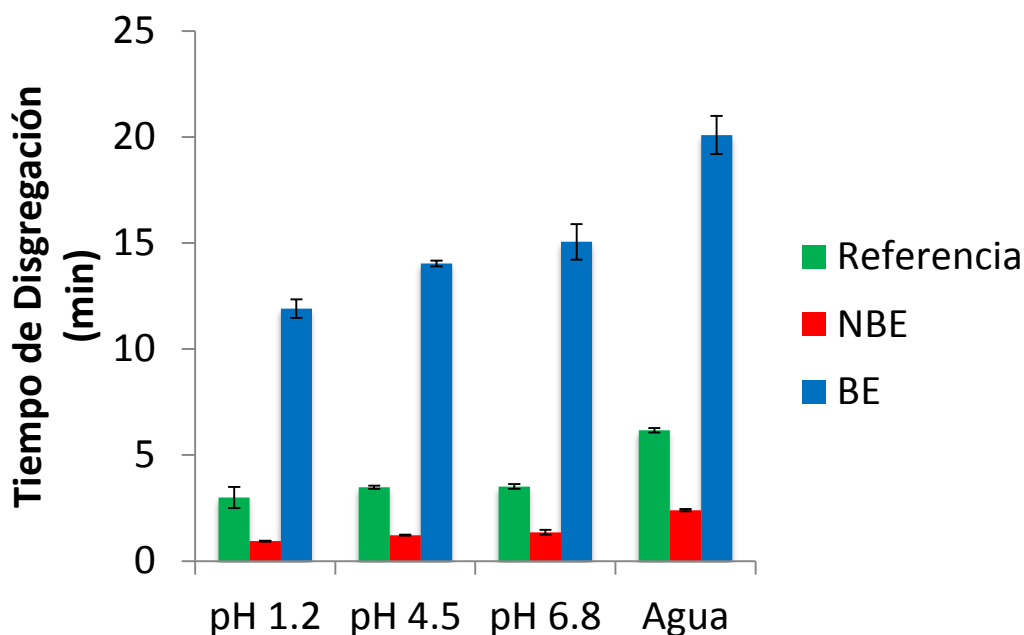
En el primer caso a estudiar nos centraremos en la Pravastatina, Un fármaco BCS clase III, es decir, de alta solubilidad y baja permeabilidad (411). Por lo tanto, el paso limitante que determinará la biodisponibilidad es la absorción del fármaco.

Se disponían de tres formulaciones de Pravastatina para este estudio, una referencia (Lipemol) y dos test donde una demostró ser bioequivalente (BE) y otra no bioequivalente (NBE) en los ensayos *in vivo*. La formulación NBE no mostró bioequivalencia en $C_{m\acute{a}x}$. Estas tres formulaciones presentaban diferencias tanto cualitativas como cuantitativas en su composición de excipientes.

El primero del conjunto de procesos que caracterizan la evolución temporal de un medicamento es la Liberación, por lo que, hablando de la forma farmacéutica más extendida hoy día, el comprimido, se centra en los procesos de disgregación y disolución.

Primero se evaluó el proceso de disgregación de las formulaciones en diferentes medios en el aparato de disgregación convencional USP.

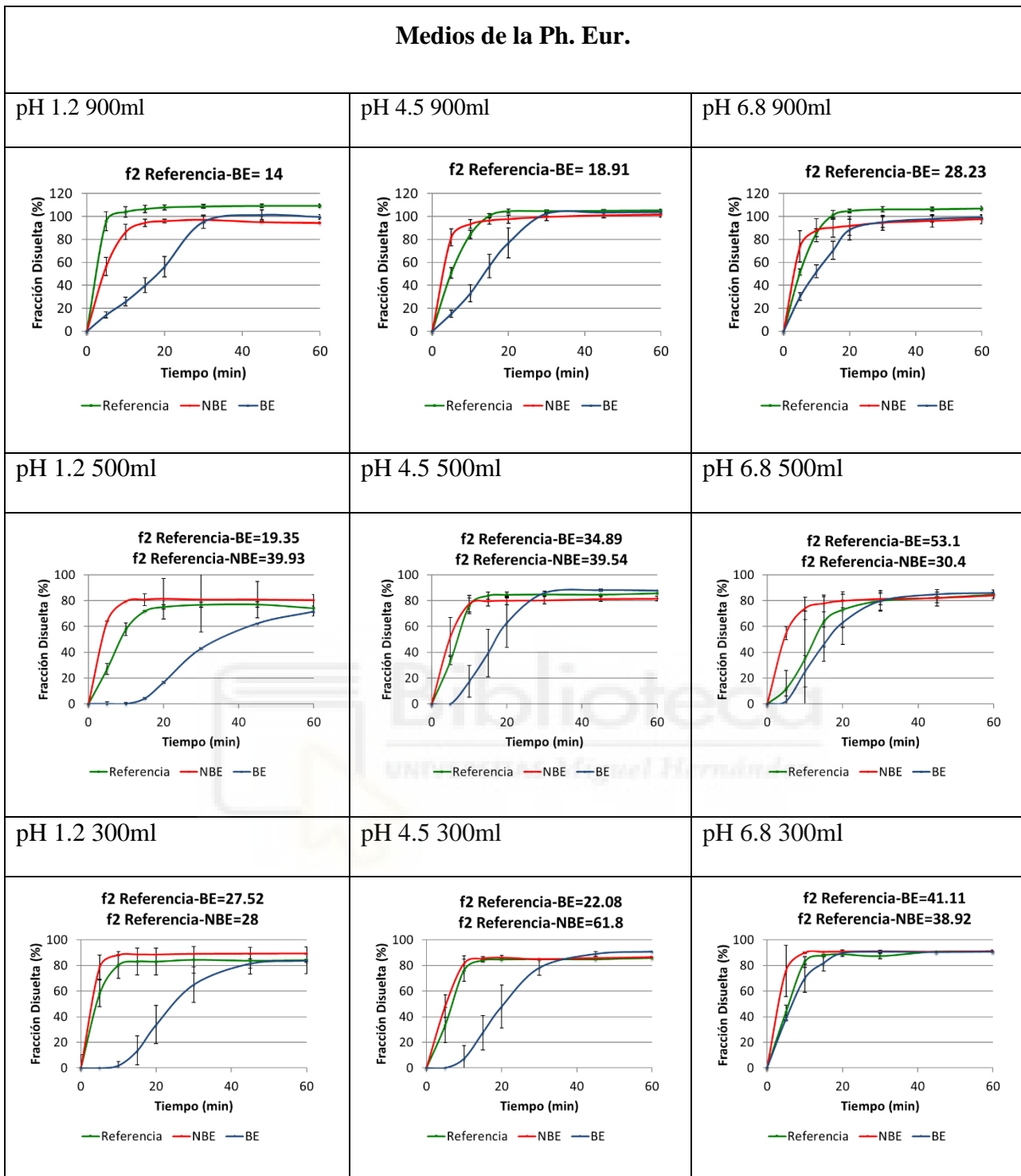
Resultados y Discusión



Gráfica 1. Tiempos de disgregación de diferentes formulaciones de Pravastatina en diferentes pH y agua (BE tiene Fosfato de Calcio).

Los datos de disgregación de las formulaciones de Pravastatina están en consonancia con los resultados *in vivo* en todos los medios para la formulación NBE dado que su tiempo de disgregación es menor que el de referencia y esto podría causar un aumento en la concentración máxima observada *in vivo*, pero no es así para la formulación BE ya que esta presenta unos tiempos de disgregación muy superiores a la referencia. La formulación BE tiene algunos excipientes que no presentan las otras dos formulaciones como son; almidón glicolato de sodio, trometamol, fosfato sódico dibásico dihidrato y fosfato cálcico monobásico anhidro, siendo este último el que se presenta en mayor cantidad representando más de dos tercios del peso total de los excipientes. Es por eso que podemos atribuir esta resistencia al proceso de disgregación a este excipiente.

Proseguiremos evaluando las diferencias de las formulaciones en el proceso de disolución. Los experimentos se realizaron en el Aparato USP II, a 50 rpm y 37°C.



Gráfica 2. Perfiles de disolución de tres formulaciones de Pravastatina (producto de referencia, formulación No Bioequivalente (NBE) y formulación Bioequivalente (BE)) en el Aparato USP II a 50 rpm en medios tamponados a pH 1.2, 4.5 y 6.8.

Resultados y Discusión

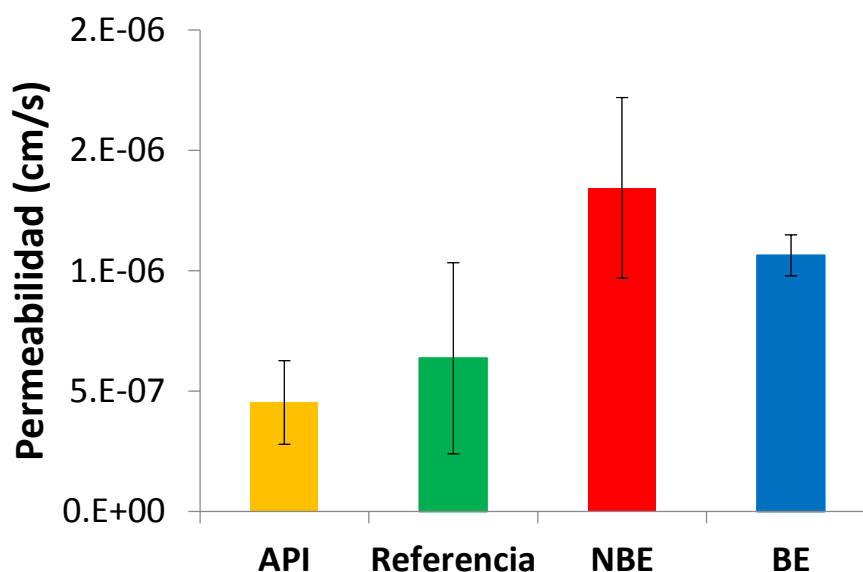
Los perfiles de disolución van acordes con los resultados obtenidos en la prueba de disgregación, teniendo la formulación NBE una velocidad de disolución mayor que la de referencia y esta mayor que la de la formulación BE.

Para que los perfiles de disolución sean representativos del comportamiento *in vivo*, el perfil de la formulación NBE tiene que estar por encima de la referencia y no ser similar y la formulación BE ser similar a la referencia.

En los ensayos a 900ml ninguno de los medios estudiados es capaz de detectar diferencias entre NBE y referencia y, sin embargo, la formulación BE no presenta perfiles similares a los de referencia. Los perfiles de disolución en volúmenes reducidos (500 y 300ml) demostraron ser más discriminatorios en cuanto al comportamiento *in vivo*. Sin embargo, únicamente a pH 6,8 y con un volumen de 500ml los perfiles reflejan el comportamiento *in vivo*, siendo el perfil NBE superior y no similar al de referencia y el perfil BE demostrar ser similar al de referencia.

Esto puede deberse a la representación más fidedigna del volumen *in vivo* en el tracto gastrointestinal, que se acerca más a los volúmenes reducidos que al volumen estándar de 900ml.

Para continuar con el estudio se realizaron los cálculos de permeabilidades mediante experimentos *in situ* basados en el método Doluisio (395) del API así como de las referencias.



Gráfica 3. Valores de permeabilidad a la Pravastatina de API, formulaciones de referencia, no bioequivalente (NBE) y bioequivalente (BE).

En conclusión, a pesar de haber encontrado un medio y las condiciones que reflejan el comportamiento *in vivo* de las formulaciones, dado que se trata de un fármaco BCS clase III, no se puede concluir que este experimento sea biopredictivo. En los BCS clase III el paso limitante es la absorción, por lo que al presentar diferencias en la composición de excipientes y estos a su vez poder tener algún efecto en el proceso de absorción, no se puede concluir que los ensayos de disolución sean biopredictivos (412).

Para continuar con el estudio de las metodologías *in vitro* y su capacidad biopredictiva se eligió un modelo que se acercara más al tracto gastrointestinal que los aparatos convencionales. Este aparato es el GIS (Gastrointestinal Simulator), un dispositivo de disolución de tres compartimentos, que consiste en; una cámara gástrica, una cámara duodenal y una cámara yeyunal. El diseño del GIS se representa en la Figura 35.

Resultados y Discusión

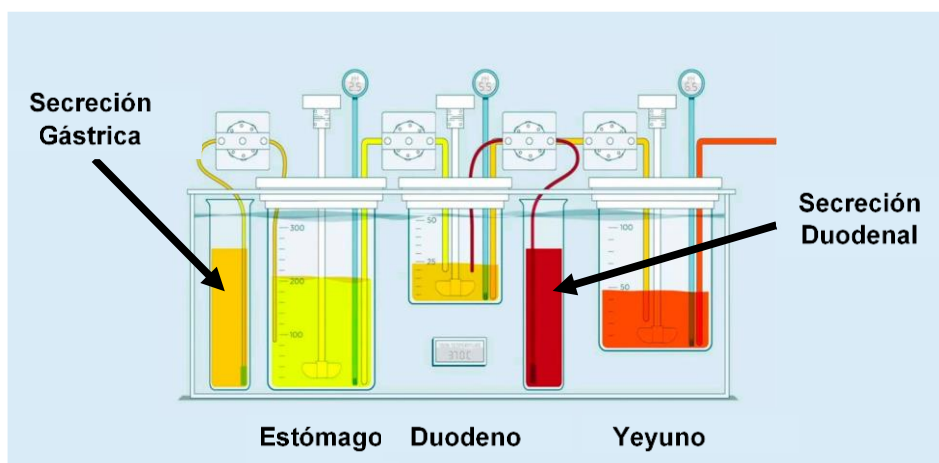


Figura 35. Esquema del GIS. Imagen adaptada de Bermejo et al.(413).

Para determinar la capacidad de discriminación del GIS se disponían de tres formulaciones diferentes de Dexketoprofeno, una referencia, una NBE y otra BE. El Dexketoprofeno es un fármaco BCS clase II por lo que el paso limitante es el proceso de disolución. Esto quiere decir que si se replica *in vitro* el comportamiento *in vivo* y se desarrolla una correlación *in vitro-in vivo*, se obtendrá una poderosa herramienta biopredictiva. En este caso la formulación NBE presentaba un C_{max} superior al de referencia.

Los protocolos usados en los experimentos en el GIS se detallan en la Tabla 15.

Condiciones en ayunas		Estómago	Duodeno
Protocolo 1	Medio de Disolución	Fluido Gástrico Simulado (SGF), pH 2.0, 0.01 M HCl	Buffer Fosfato, pH 6.8–50 mM
	Volumen inicial	50 ml SGF + 250 ml de agua	50 ml
	Secreción	1 ml/min de SGF	1 ml/min de Buffer Fosfato, pH 6.8–100 mM

Resultados y Discusión

Protocolo 2	Medio de Disolución	Fluido Gástrico Simulado (SGF), pH 2.0, 0.01 M HCl+ 34.2 mM NaCl	FaSSIF-v1 (pH 6.5)
	Volumen inicial	50 ml SGF + 250 ml de agua	50 ml
	Secreción	1 ml/min de SGF	1 ml/min de FaSSIF-v1 concentración 4 veces superior (4x FaSSIF-v1)

Tabla 15. Protocolos 1 y 2 ensayados en el GIS (413).

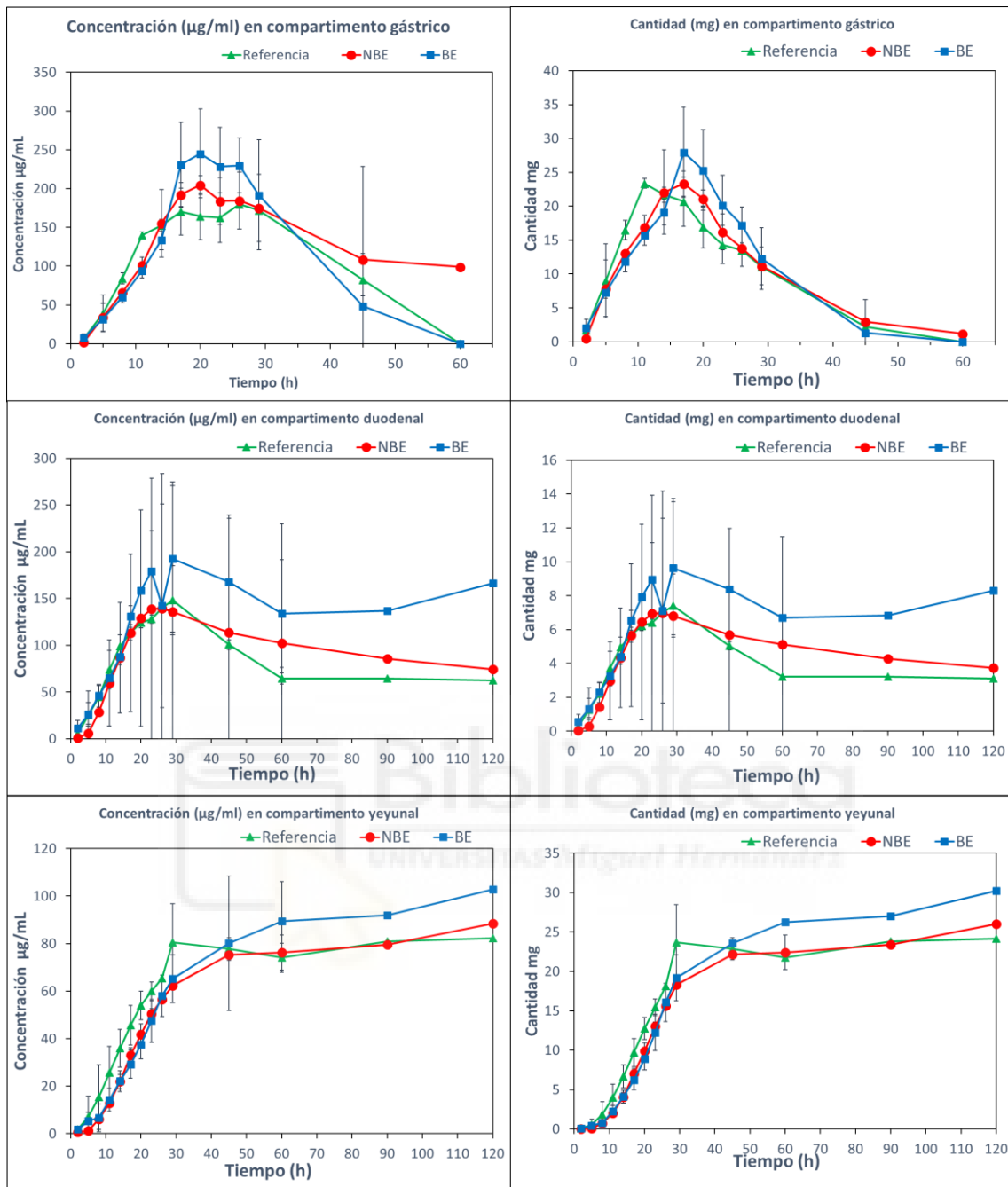
La principal diferencia entre los protocolos es la presencia de NaCl en el estómago en el protocolo 2 y la composición del medio duodenal (Buffer fosfato en el protocolo 1 y FaSSIF-v1 en el 2).

Los resultados de los ensayos en el GIS se presentan en las Gráficas 4A y 4B.

Se observaron diferencias en el comportamiento de disolución en el compartimento gástrico del GIS en presencia y ausencia de NaCl. Cuando el NaCl estaba ausente (Protocolo 1), los perfiles de disolución gástrica no discriminaban entre las tres formulaciones, pero cuando se añadió NaCl al medio gástrico (Protocolo 2), se observaron diferencias que reflejaban en comportamiento *in vivo*.

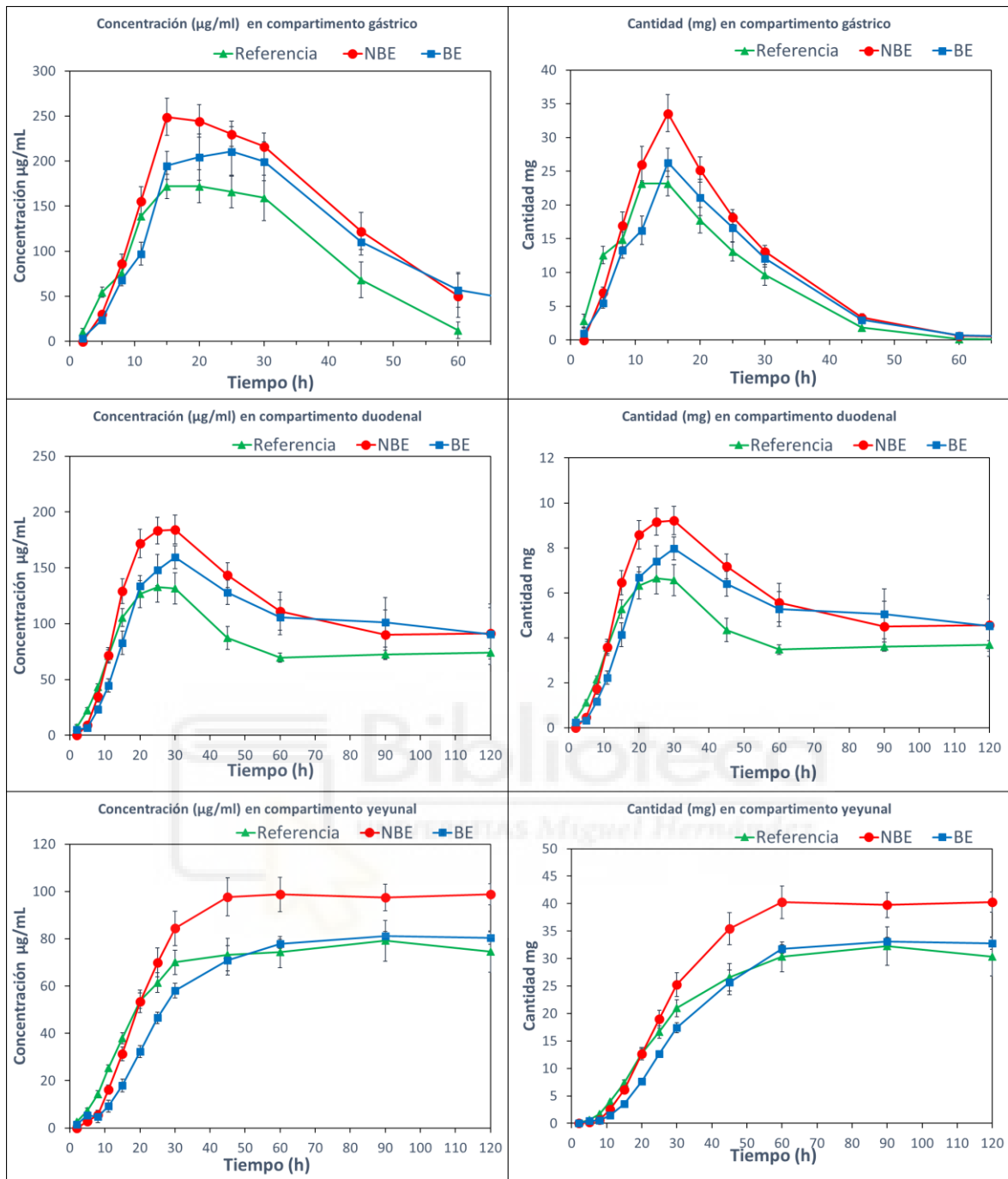
Las diferencias en el compartimento gástrico observadas con el Protocolo 2 se mantuvieron después de la transferencia a la cámara duodenal. Finalmente, en el yeyuno se acumularon las diferencias y los perfiles de disolución acumulativa de las tres formulaciones analizadas siguieron la misma tendencia que los datos *in vivo*.

Resultados y Discusión



Gráfica 4A. Concentraciones (izquierda) y cantidades (derecha) de Dexketoprofen en los diferentes compartimentos del GIS con el protocolo 1. n=3.

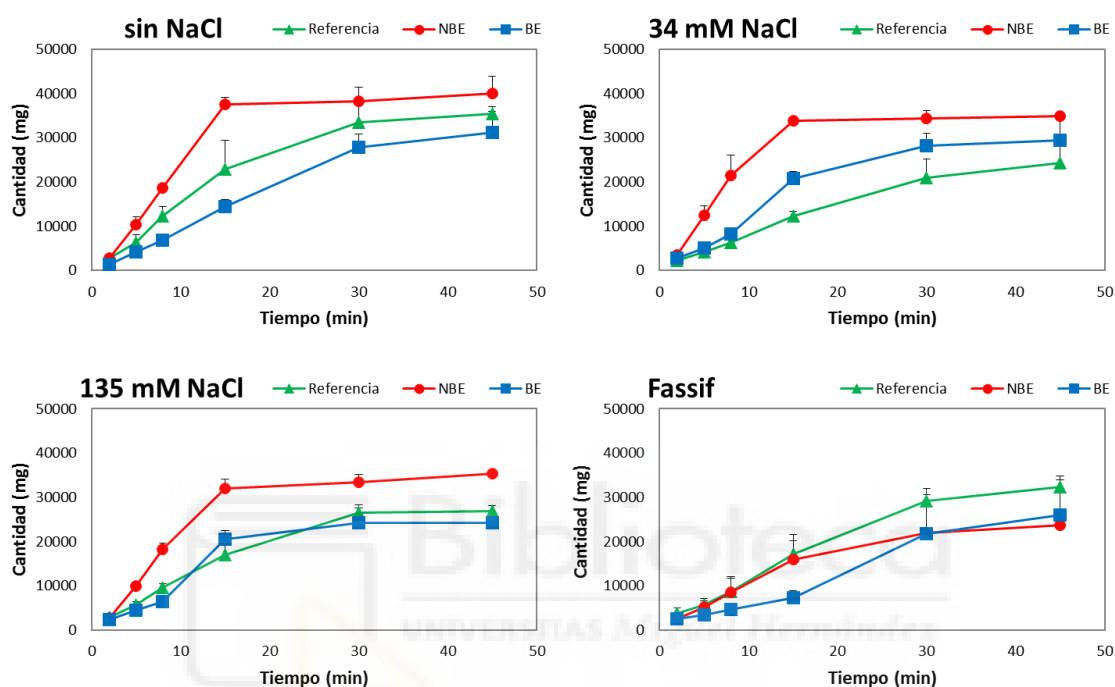
Resultados y Discusión



Gráfica 4B. Concentraciones (izquierda) y cantidades (derecha) de Dexketoprofeno en los diferentes compartimentos del GIS con el protocolo 2. n=3.

Resultados y Discusión

Para determinar si el hecho de que el protocolo 2 presentara diferencias entre las formulaciones se debía a la presencia de NaCl en estómago o al medio FaSSIF-v1 en el duodeno, se realizaron ensayos de disolución en el Aparato USP II. Los datos se presentan en la Gráfica 5.



Gráfica 5. Cantidad de Dexketoprofeno disuelto en Aparato USP II en diferentes medios, con diferentes concentraciones de NaCl.

La presencia de NaCl afectó principalmente el proceso de disgregación y disolución de la formulación NBE, lo que dio como resultado una velocidad de disolución mejorada en presencia de NaCl, que no se observó para la formulación BE y la referencia. Esto está probablemente relacionado con el alto contenido de fosfato de calcio en el núcleo del comprimido de la formulación NBE, que no está presente en las otras formulaciones. Este alto nivel de fosfato de calcio en el núcleo del comprimido puede aumentar el pH en la superficie sólida, acelerando la disolución y también facilitando la disgregación. La modulación del pH microambiental se ha demostrado como una

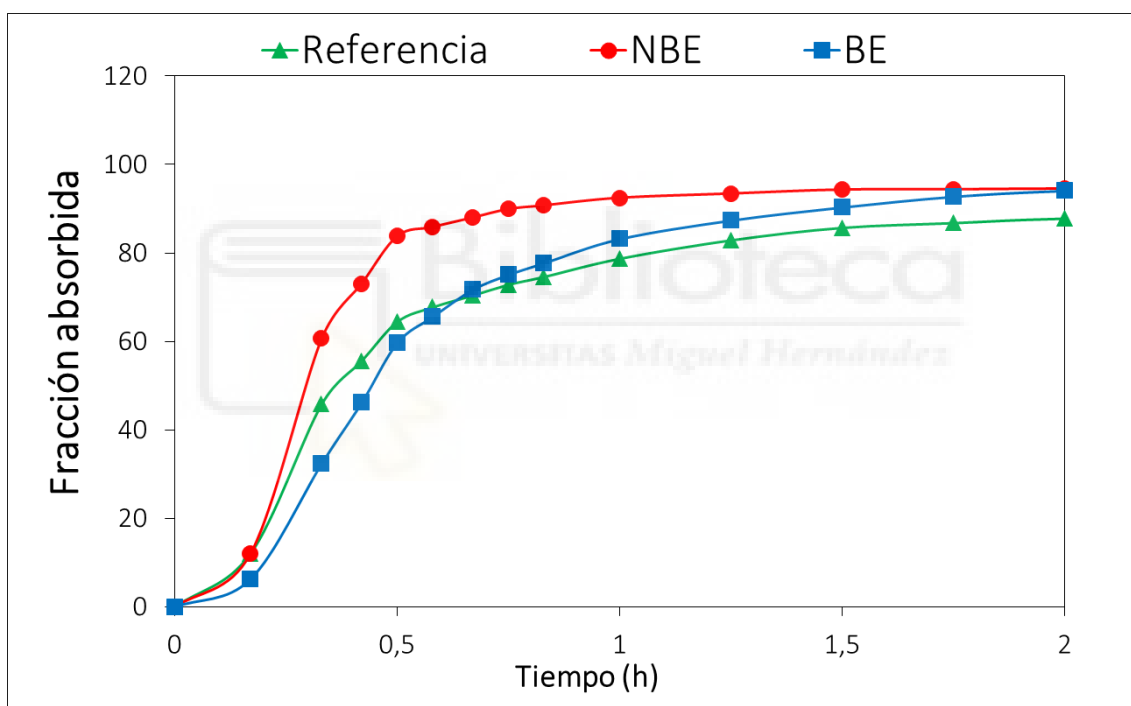
estrategia efectiva para modular la velocidad de disolución de GDC-0810, un ácido débil de un fármaco anticancerígeno oral, mediante el uso de bicarbonato de sodio para cambiar el pH de la superficie sólida (414). Esta misma estrategia se ha propuesto como un mecanismo de modulación de la liberación en dispersiones sólidas (415) y otras formas de dosificación de liberación inmediata (416). Los datos de pH de superficie sólida no se obtuvieron en estos experimentos de disolución y los valores de pH de los medios durante los experimentos de disolución solo estaban disponibles en el compartimento gástrico a los 13 minutos con el Protocolo 2. En ese momento, la formulación NBE, que contenía fosfato de calcio presentó un pH de 3.5, 1 unidad más alta que el pH de la formulación de referencia y BE que fue aproximadamente 2.5. El fosfato de calcio puede aumentar el pH en la superficie sólida de las partículas de los excipientes del fármaco, luego aumentar la solubilidad de Dexketoprofeno y, en consecuencia, disminuir el grado de sobresaturación, lo que, posteriormente, evitará o reducirá el gradiente de precipitación (416). Además del fosfato de calcio, los tensoactivos FaSSIF-v1 parecen jugar un papel importante en el equilibrio de la sobresaturación / precipitación de ácido libre, como se ha informado para otros compuestos ionizables (417–419).

Teniendo en cuenta que se trata de un fármaco BCS clase II, de que se encontró un protocolo capaz de reflejar el comportamiento *in vivo* y de que se disponían de datos *in vivo* de los ensayos de bioequivalencia de las tres formulaciones, se procedió a realizar una IVIVC.

Resultados y Discusión

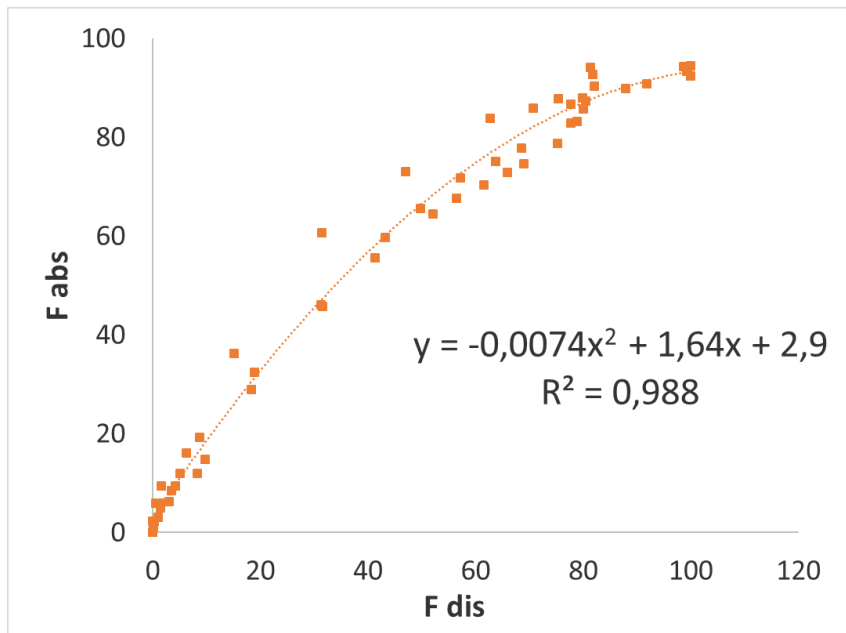
Parámetro	Unidades	Valor	Error Estándar	Coefficiente de Variación (%)
V_1	ml	3549.53	201.23	5.67
K_{10}	1/h	1.64	0.08	5.14
K_{12}	1/h	0.93	0.13	14.34
K_{21}	1/h	0.96	0.09	8.91

Tabla 16. Parámetros de una cinética bicompartimental de Dexketoprofeno: V_1 representa el volumen del compartimento central; K_{10} representa la constante de primer orden de velocidad de eliminación; K_{12} y K_{21} representan las constantes de distribución entre el compartimento central y el periférico.



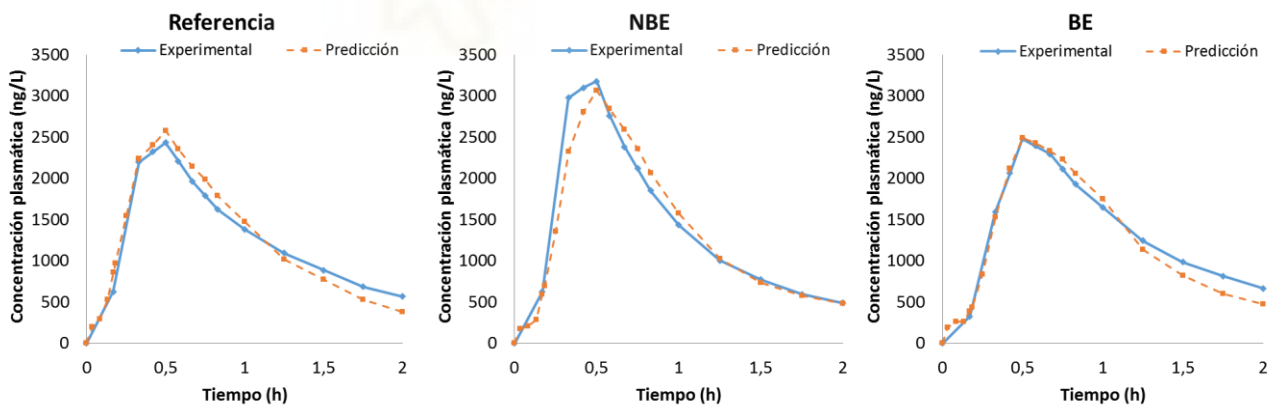
Gráfica 6. Fracciones absorbidas de Dexketoprofeno obtenidas de los perfiles plasmáticos a través de la deconvolución mediante el método de Loo-Riegelman.

Posteriormente y después de escalar el tiempo mediante un plot de Levy, se procedió a enfrentar las fracciones absorbidas (*in vivo*) frente a las fracciones disueltas (*in vitro*) desarrollando así una IVIVC. Que servirá como herramienta predictiva para futuras formulaciones.



Gráfica 7. Correlación *in vitro-in vivo* nivel A de Dexketoprofeno.

Para validar esta herramienta se procedió a realizar una validación interna, viendo como es capaz de predecir los perfiles *in vivo* usando la correlación y las perfiles *in vitro* de las tres formulaciones.



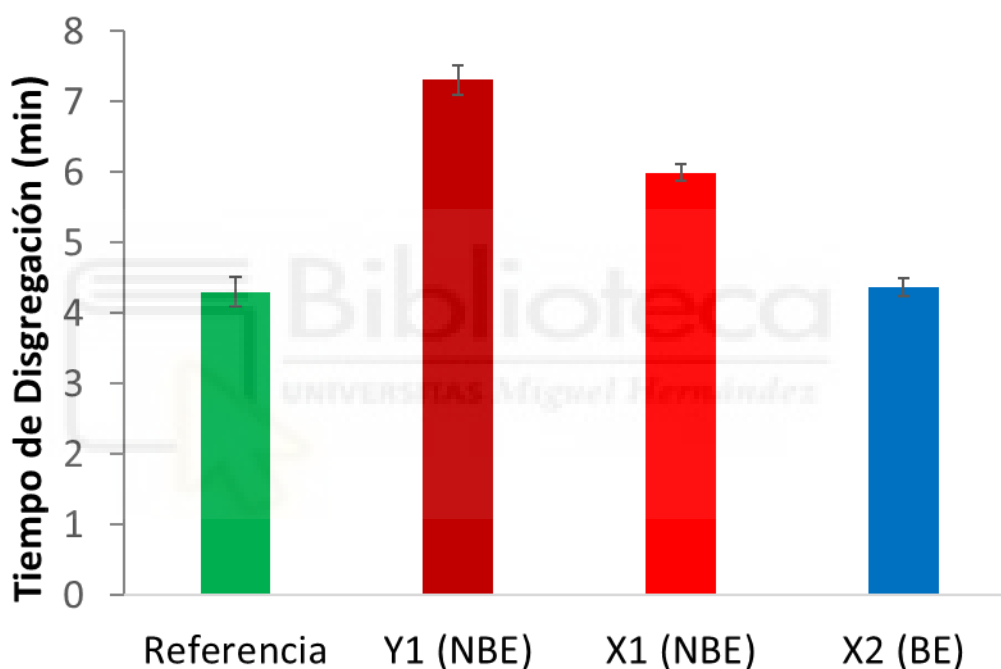
Gráfica 8. Validación interna a través de la predicción de los niveles plasmáticos

Los errores de predicción relativos de la $C_{m\acute{a}x}$ y el AUC en plasma fueron inferiores al 10% para todas las formulaciones.

Resultados y Discusión

Los fármacos BCS clase II son candidatos perfectos para el desarrollo de IVIVC siempre que los datos *in vivo* estén disponibles. En ocasiones el problema reside en encontrar el medio y/o aparato capaz de reflejar el comportamiento *in vivo*.

En el siguiente ejemplo se disponen de 4 formulaciones de Telmisartán [Micardis (Referencia), Y1 (NBE), X1(NBE) y X2(BE)] y de sus perfiles *in vivo* de los respectivos ensayos de bioequivalencia *in vivo*. El Telmisartán es un fármaco BCS clase II por lo que es un buen candidato para el desarrollo de una IVIVC.



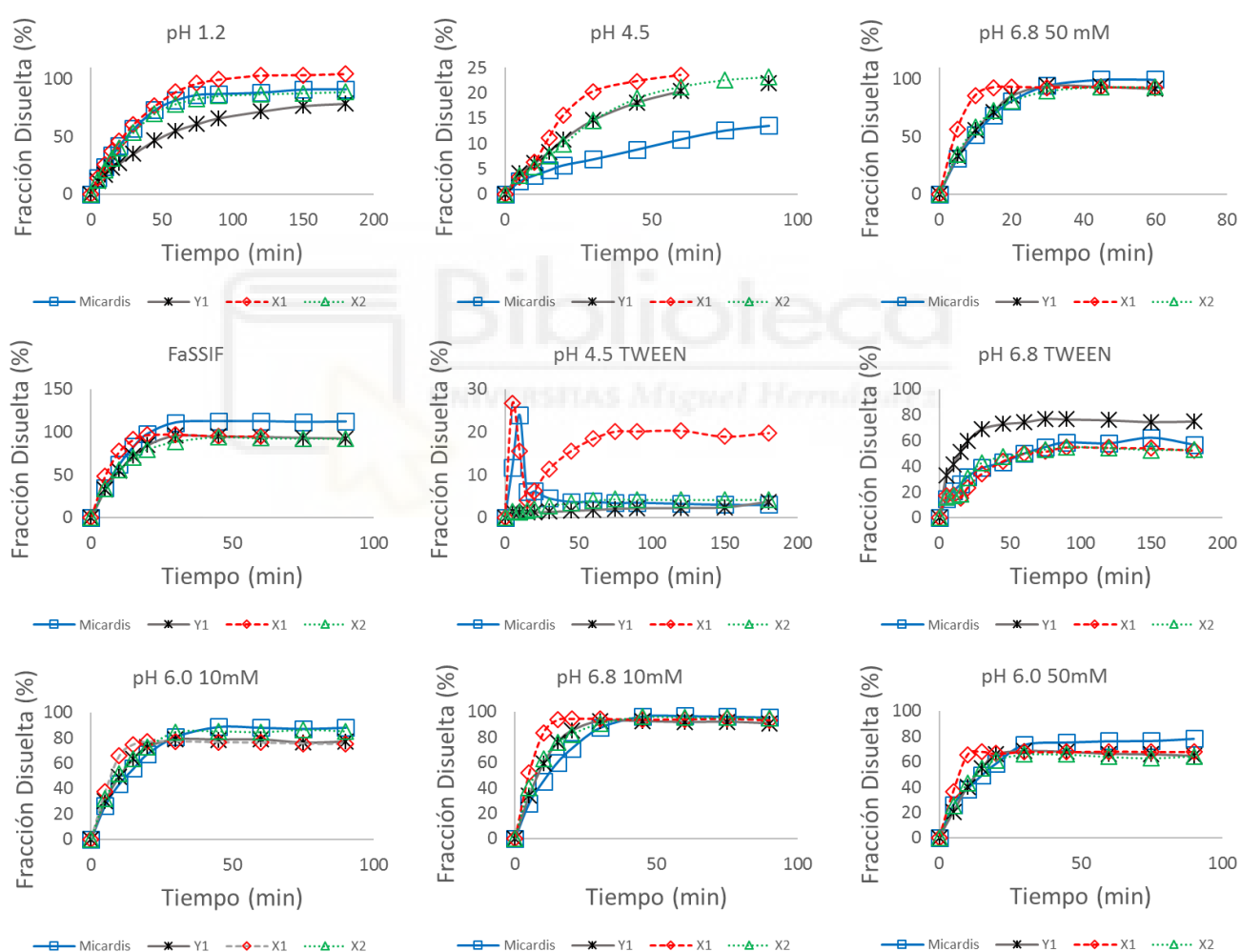
Gráfica 9. Tiempos de disgregación de diferentes formulaciones de Telmisartán en agua a 37°C

El tiempo de disgregación de Micardis fue de 4,30 min. Este tiempo es muy similar al obtenido con la formulación BE X2 (4,37 min). Ambas formulaciones NBE obtuvieron tiempos de desintegración más altos que los de la referencia, lo que indica que este proceso fue claramente más lento. En este caso, la prueba de desintegración ha demostrado ser indicativa de las diferencias observadas *in vivo*. Aunque esta prueba se

Resultados y Discusión

usa solo para fines de control de calidad, se necesita mucha más investigación para evaluar su potencial y confiabilidad como una herramienta biopredictiva (181,182,420,421).

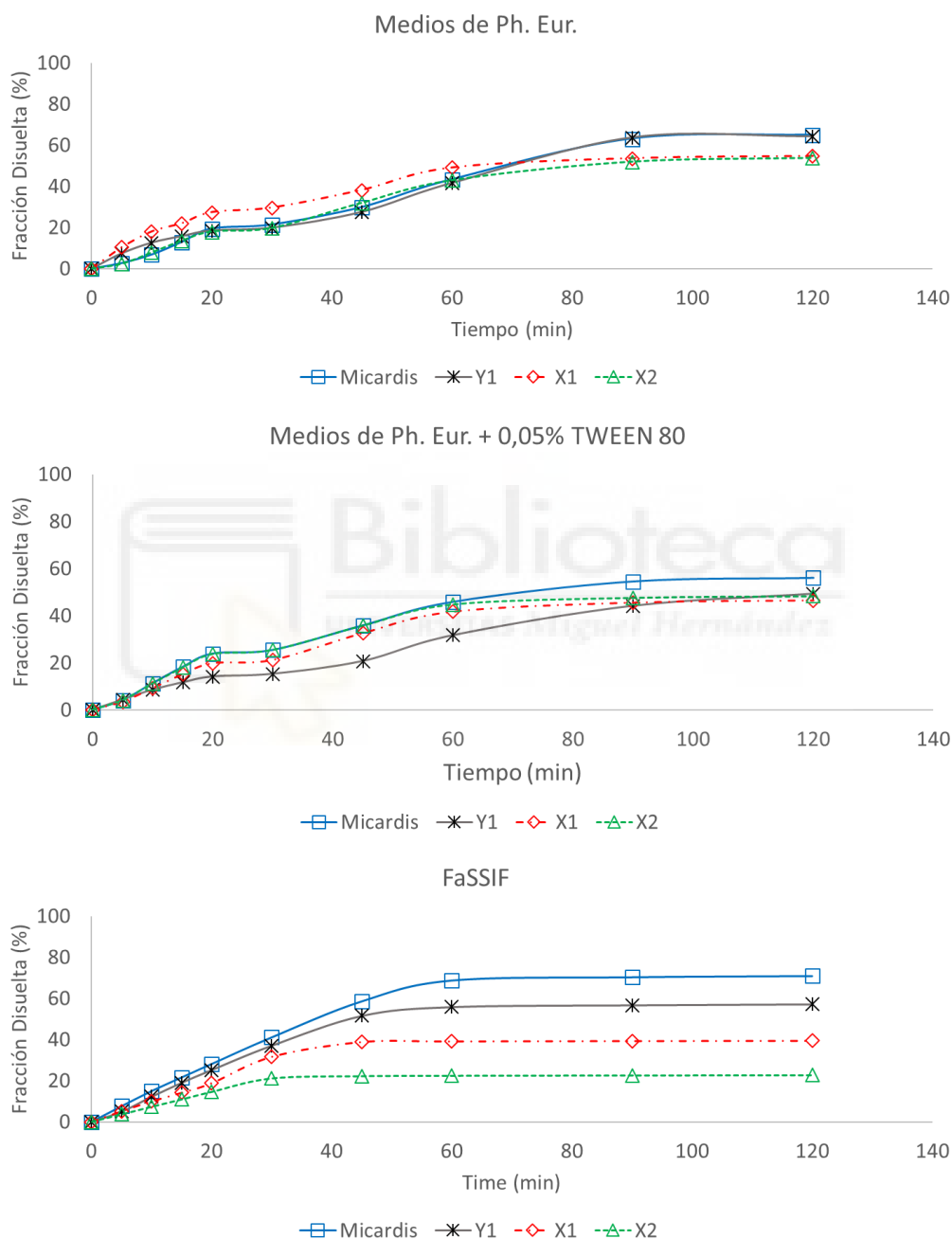
Se procedió a realizar ensayos de disolución de las formulaciones. El objetivo fue encontrar un medio y aparato capaz de ordenar los perfiles de forma que reflejaran el comportamiento *in vivo*. Los perfiles deben ordenarse de la siguiente manera; Micardis (Referencia), X2 (BE), X1 (NBE) e Y1(NBE).



Gráfica 10. Perfiles de Disolución de las cuatro formulaciones de Telmisartán [Micardis (Referencia), Y1 (NBE), X1(NBE) y X2(BE)] en el Aparato USP II (velocidad de agitación 50 rpm) en diferentes medios y condiciones.

Resultados y Discusión

Se probaron diferentes medios en el aparato USP II, tanto medios de la farmacopea como de buffers de diferentes capacidades, con surfactantes y medios biorrelevantes. En ninguno de los casos estudiados los perfiles se ordenaron para reflejar el comportamiento *in vivo*.



Gráfica 11. Perfiles de Disolución de las cuatro formulaciones de Telmisartán [Micardis (Referencia), Y1 (NBE), X1(NBE) y X2(BE)] en el Aparato USP IV (Sistema de celda de flujo) en diferentes condiciones.

Resultados y Discusión

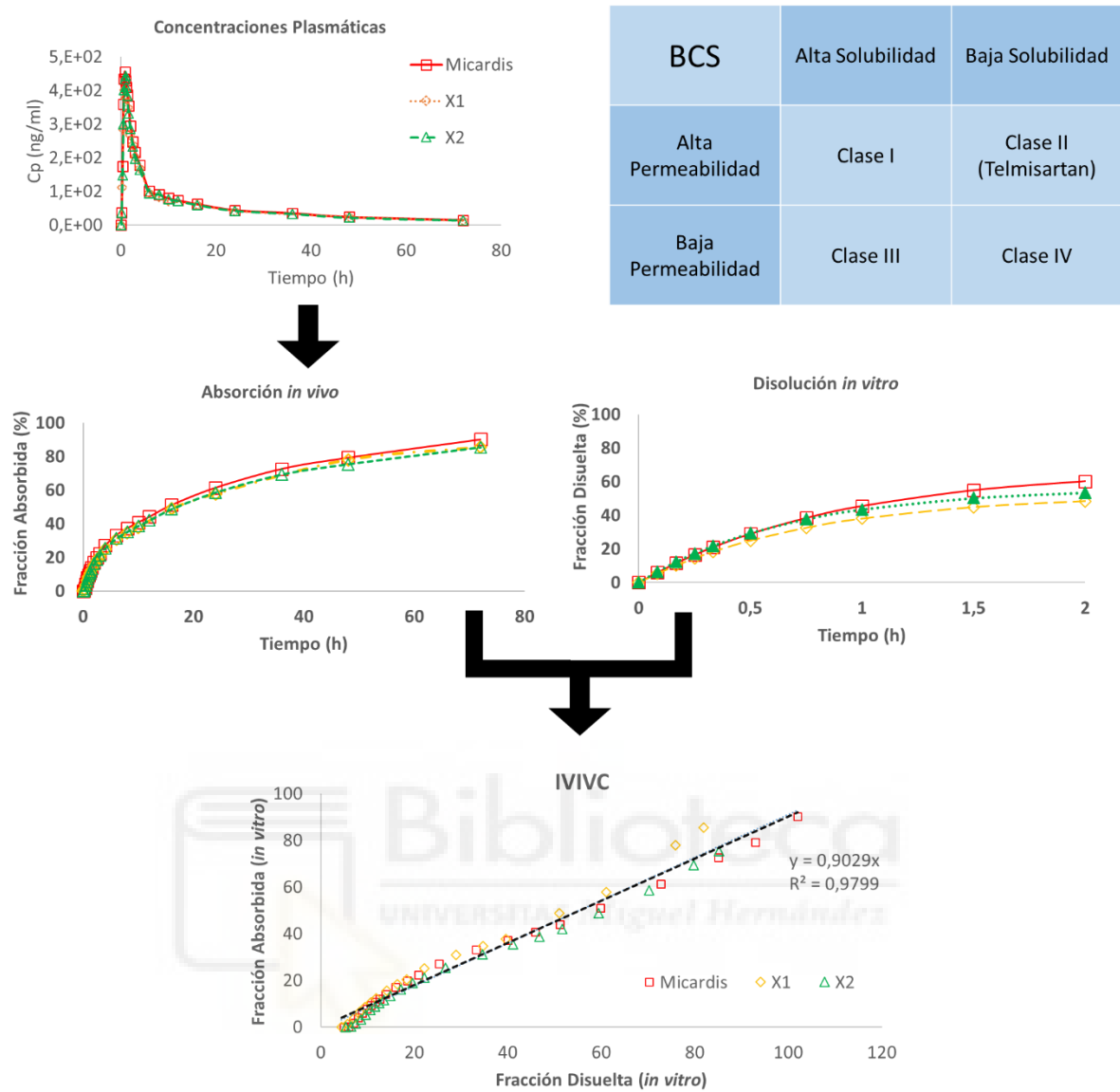
Los valores de f_2 comparando el perfil de Micardis versus X1, X2 e Y1 obtenidos en el aparato USP IV con cambio de medios, y en presencia de surfactante, fueron 59,08 73,99 y 43,04, respectivamente. Por lo que es el medio que mejor representa el comportamiento *in vivo*.

Se procedió a la construcción de la IVIVC para las formulaciones Micardis, X1 y X2 (Y1 se reservó para la validación externa).

En la Gráfica 12 se esquematiza los pasos a seguir después de encontrar el medio capaz de replicar el comportamiento *in vivo*. Se transforman los perfiles plasmáticos mediante el método de deconvolución de Loo-Riegelman. Se escogió este método después de fallar al intentarlo con el método Wagner-Nelson. La diferencia entre estos dos métodos es que el primero funciona cuando la cinética es monocompartimental y el segundo permite la deconvolución cuando la cinética es bicompartimental. Posteriormente y tras escalar el tiempo mediante el plot de Levy, se combinan los datos *in vivo* e *in vitro* para construir la IVIVC.

Los errores de predicción estaban dentro de los límites aceptados para las formulaciones X1 y X2 (15% para las formulaciones individuales y 10% para el promedio), pero el error de predicción fue más alto que el aceptado en las pautas reguladoras para Y1, por lo que no sería adecuado para una bioexención. Esto podría deberse a que Y1 es una formulación diferente de una compañía diferente con diferentes excipientes y un proceso de fabricación diferente, fuera del espacio de diseño del fabricante de X1 y X2. Sin embargo, gracias a la correlación, el método de disolución propuesto obtenido en este estudio podría ser útil como herramienta de desarrollo para seleccionar la formulación más prometedora para futuros estudios *in vivo*.

Resultados y Discusión



Gráfica 12. Esquema de la correlación *in vitro-in vivo* de tres formulaciones de Telmisartán.

	C _{max}			AUC		
	exp	pred	EP%	exp	pred	EP%
Micardis	456,1	439,5	3,6	4445,5	4522,5	1,7
X1	400,2	390,9	2,3	4187,3	3562,1	14,9
X2	445,2	474,8	6,6	4208,9	3884,0	7,7
Y1	369,5	231,5	37,3	4312,2	4285,1	0,6

Tabla 17. Errores de predicción de los valores de C_{máx} y AUC de la validación de la correlación *in vitro-in vivo*.

4.2. Evaluar un método *in situ* para la determinación del efecto de excipientes sobre la permeabilidad intestinal de fármacos

La política de las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) determina que con objeto de reducir el uso de animales se utilicen métodos *in vitro* como las monocapas celulares Caco-2 para calcular la permeabilidad de los fármacos y/o la influencia de los excipientes en dicho proceso (422–424). No obstante, estos métodos se alejan del comportamiento *in vivo* y en general parece que las Caco-2 son mucho más sensibles al efecto de los excipientes sin que los efectos observados se reproduzcan *in vivo* (425,426). Por todo ello para evaluar el efecto de los excipientes siguen siendo necesarios los ensayos en animales de experimentación.

Para evaluar la capacidad de predicción de las fracciones absorbidas en humanos a partir de datos de permeabilidades *in situ* de rata Wistar obtenidos por el método Doluisio (395) se compararon datos bibliográficos y datos experimentales.

Hasta ahora, los datos de permeabilidad humana disponibles eran de yeyuno (427,428), y el número de determinaciones de Peff humano en el intestino delgado distal humano y el intestino grueso humano eran limitadas. Por lo tanto, solo se emplearon los valores de Peff yeyunal humano para validar el poder predictivo de los diferentes modelos preclínicos de absorción intestinal (incluida la rata) (402). Los métodos de perfusión de permeabilidad humana han actualizado el estándar de oro para predecir la fracción oral absorbida en humanos (F_{abs}) obtenida de estudios farmacocinéticos o de balance de masa (394,427,429). Obviamente, la necesidad de validar otros métodos preclínicos para predecir la absorción humana en la fase de desarrollo requiere la comparación con los datos humanos.

Resultados y Discusión

Las técnicas comunes de perfusión humana para estudiar los datos de permeabilidad humana de diferentes segmentos gastrointestinales se caracterizan por su complejidad experimental. Sin embargo, Dahlgren y colaboradores (430), desarrollaron una nueva técnica menos invasiva basada en un método de desconvolución que permite obtener valores de permeabilidad humana en diferentes segmentos intestinales con menos desafíos experimentales.

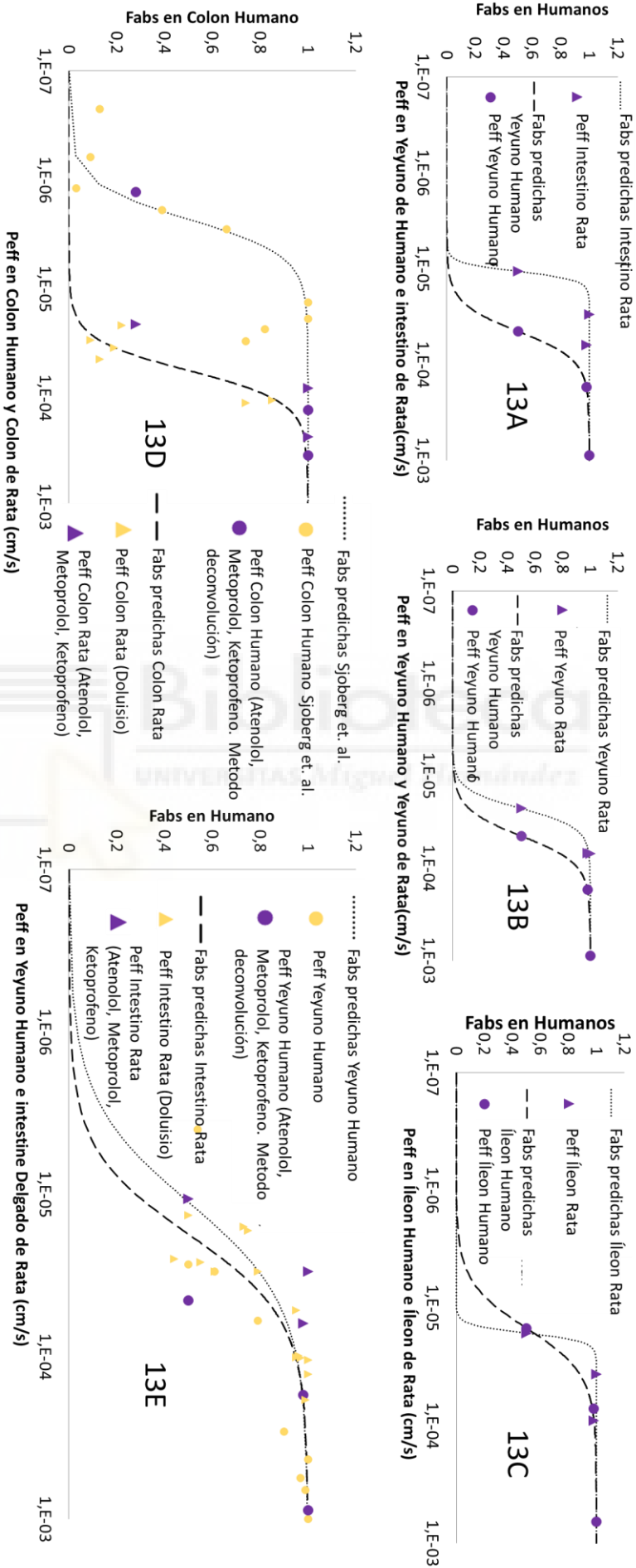
Las Gráficas 13D y E representan las correlaciones entre fracciones absorbidas y permeabilidades previamente obtenidas por Lozoya y colaboradores (431) y Dalghren y colaboradores (430) en colon de rata y colon humano (13D) y en intestino completo de rata y yeyuno humano (13E). Sobre estas correlaciones se han representado las permeabilidades experimentales obtenidas en este estudio para Metoprolol, Atenolol y Ketoprofeno en colon de rata y en intestino completo de rata. Como se observa los nuevos datos experimentales se superponen adecuadamente en las correlaciones previas que permiten predecir con razonable aproximación las fracciones absorbidas en colon y en intestino humano completo.

Las Gráficas 13 A-C muestran una correlación razonable entre fracciones absorbidas humanas (en cada segmento obtenidas por deconvolución) y la P_{eff} de rata/humana en intestino completo rata/yeyuno humano (13 A) y en los segmentos de yeyuno (13 B) e íleon rata/humano (13 C). La razón de la diferente forma de las curvas necesita más investigación. Sería difícil garantizar que haya una diferencia mecanicista real, o si la diferencia en la forma se debe al bajo número de compuestos analizados. En general, el hecho de que todas las curvas de ratas están a la izquierda de las humanas se ha explicado por la superficie menos efectiva para la penetración en el intestino delgado de la rata, ya que este animal carece de pliegues de Kerckring. Para los compuestos de

baja permeabilidad, en general hidrófilos, una "estanqueidad" similar a la humana de las uniones conduciría a permeabilidades más bajas, haciendo similares las pendientes de las curvas en 13A-C, pero como se puede observar en la Gráfica 13C, las permeabilidades de rata predichas en la parte inferior de las curvas son en realidad más altas que las humanas. Eso podría indicar una mayor permeabilidad paracelular, como se observa en el colon.

En el yeyuno y el íleon hay pocos datos disponibles en humanos para comparar con los experimentos con ratas, por lo que para mostrar que las correlaciones presentadas son factibles, la Gráfica 13D presenta una correlación previa de la permeabilidad del colon humano y la permeabilidad del colon de la rata versus la fracción absorbida en el colon humano, incluyendo Atenolol, Metoprolol y Ketoprofeno. La figura muestra que los datos están razonablemente de acuerdo con los resultados publicados anteriormente y mantienen la relación ya demostrada. La tendencia general que se puede observar en 13D es que los valores de permeabilidad del colon de rata son más altos que los obtenidos del colon humano. Esta diferencia ya se ha visto en un trabajo anterior (431) y probablemente se debió a las uniones estrechas más anchas en la membrana del colon de la rata que en la membrana del colon humano.

Resultados y Discusión



Gráfica 13. Correlación entre la permeabilidad en humano y la permeabilidad en intestino delgado de la rata Wistar. Permeabilidad en rata frente a fracción absorbida en humanos.

Resultados y Discusión

La concordancia entre los valores de permeabilidad es particularmente buena en el colon. Sin embargo, la rata presenta permeabilidades de colon más altas para un compuesto particular, mientras que en humanos los valores son similares o más bajos. Por otro lado, la Gráfica 13E confirma la tendencia observada en 13A-C, que indican que, en general, las permeabilidades intestinales de las ratas son más bajas que las humanas en el yeyuno y, por lo tanto, la curva de correlación de la rata está a la izquierda en comparación con la correlación humana. La razón de ese comportamiento se ha explicado anteriormente debido a la superficie inferior disponible en el intestino de la rata en comparación con los humanos, ya que la rata carece de las carpetas de Kerckring. En resumen, las Gráficas 13D y 13E señalan las diferencias en colon de rata versus intestino delgado de rata en comparación con los mismos segmentos humanos. En cualquier caso, con el número adecuado de compuestos en ambos modelos, será posible establecer una buena correlación y luego el factor de conversión para predecir a partir del modelo de rata, el valor homólogo en humanos.

Por todo esto podemos afirmar que el modelo de perfusión *in situ* en ratas (Doluisio) ha demostrado ser una herramienta confiable para predecir la permeabilidad humana segmentaria en el yeyuno y el colon.

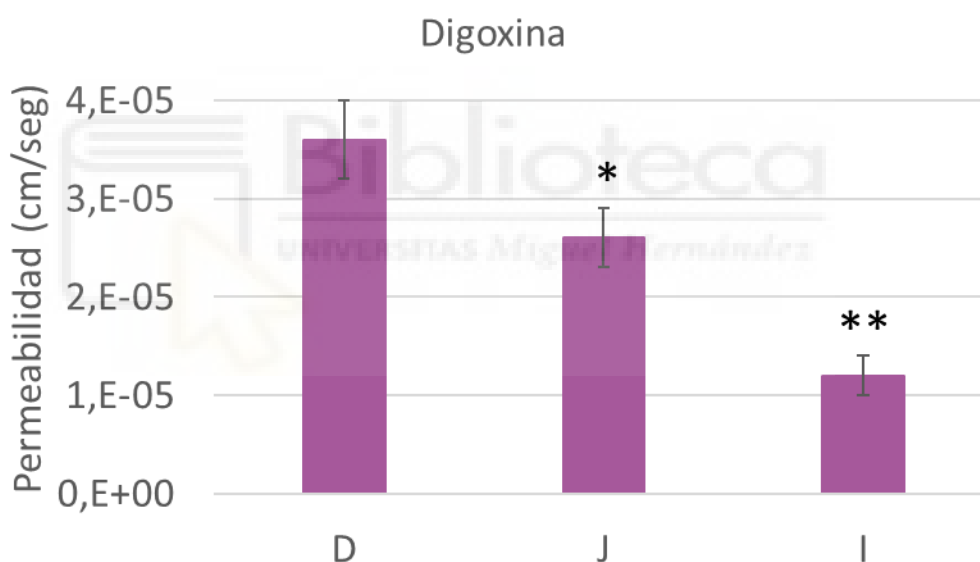
Para demostrar la aplicabilidad del método de perfusión *in situ* en ratas y se procedió a determinar la permeabilidad de la Digoxina a concentraciones clínicamente relevantes.

La Digoxina tiene un índice terapéutico estrecho y para obtener una respuesta adecuada y evitar la toxicidad, la dosis oral puede variar de 0.25 mg a 1.5 mg (432). Es un sustrato bien conocido de la Glicoproteína-P (433–437), pero la mayoría de los datos de permeabilidad en la literatura se han obtenido a concentraciones que exceden las

Resultados y Discusión

concentraciones clínicamente relevantes por lo que reflejan principalmente el componente de difusión pasiva de su transporte a través de la membrana.

Se sabe que la expresión de los transportadores cambia en todo el tracto gastrointestinal. Por ejemplo, se destacan dos transportadores de secreción del intestino delgado: la proteína 2 de resistencia a múltiples fármacos (MRP2) y la Glicoproteína-P (P-gp). Ambos se encuentran en la región apical de los enterocitos, sin embargo, MRP2 muestra una mayor expresión en la región proximal del intestino delgado, mientras que P-gp ha aumentado la expresión a lo largo del tracto gastrointestinal, presentando una mayor concentración en el íleon (434,438,439).



Gráfica 14. Valores de permeabilidad obtenidos por el método de perfusión *in situ* en ratas (n = 4–6) para Digoxina 1,0 μg / ml en los segmentos intestinales Duodeno (D), Yeyuno (J) e Íleon (I) (media \pm DE). * Diferencia significativa entre yeyuno e íleon ($p < 0.05$). ** Diferencia significativa entre duodeno e íleon ($p < 0.01$).

En la Gráfica 14 se puede ver las permeabilidades de Digoxina en los diferentes tramos intestinales. La permeabilidad en duodeno es mayor que en Yeyuno y esta mayor que en Íleon. Los datos concuerdan con lo su mecanismo de absorción, dado que es un

Resultados y Discusión

conocido sustrato de Glicoproteína-P y este transportador de secreción aumenta a lo largo de los diferentes segmentos intestinales.

El modelo de perfusión *in situ* en ratas (Doluisio) ha demostrado aportar datos fiables para predecir la permeabilidad humana, por lo que podría ser una herramienta valiosa para el desarrollo de medicamentos y la comparación entre formulaciones (440).





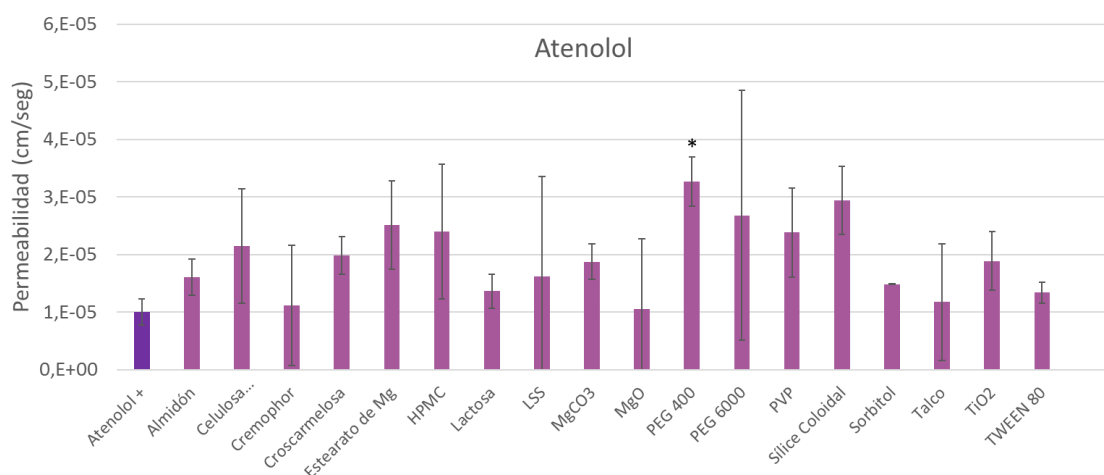
4.3. Determinar el efecto de excipientes específicos en la permeabilidad

Se ha observado que algunos excipientes pueden provocar cambios en la membrana intestinal y/o afectar de diferentes formas a los transportadores específicos del tracto gastrointestinal modificando de así la permeabilidad (441). Algunos autores describen los efectos en función de mecanismo (442) mientras que otros autores proponen una clasificación biofarmacéutica de excipientes (72) según afecten a la permeabilidad o al metabolismo a ambos.

En esta tesis nos hemos centrado en el estudio del posible efecto de los excipientes en el proceso general de permeabilidad sin establecer el mecanismo concreto de alteración de la misma.

Para analizar el efecto de los excipientes en la permeabilidad de moléculas que se absorben de forma pasiva se usó el Atenolol como fármaco control (443) un BCS clase III ya que presenta permeabilidades más bajas que el Metoprolol (440). Recientemente se ha visto que la absorción intestinal de atenolol se reduce mediante la ingestión simultánea de zumos de frutas, como el zumo de manzana (444,445). Este hallazgo implica la posibilidad de que un sistema de transporte mediado por transportista no identificado, que podría ser interferido por algunos componentes de esos jugos, podría estar involucrado en la absorción de atenolol. Esto puede indicar que este fármaco no es el más indicado para determinar el efecto sobre el proceso concreto de la difusión pasiva. Sin embargo, el estudio de permeabilidad si que dará información sobre la influencia de los excipientes en el proceso general de permeabilidad.

Resultados y Discusión

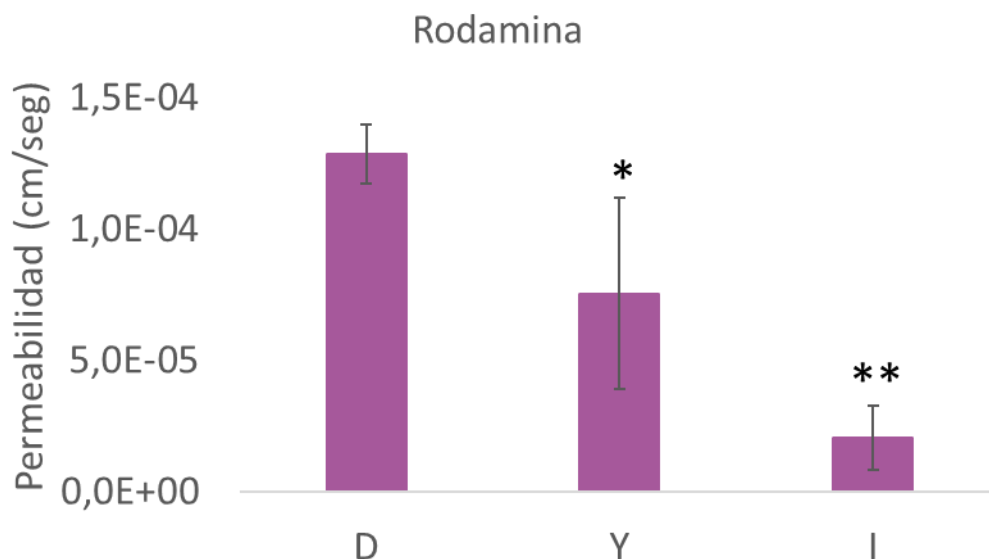


Gráfica 15. Valores de permeabilidad obtenidos de Atenolol en intestino completo de rata Wistar en ausencia y presencia de excipientes. * Diferencia significativa ($p < 0.05$).

Presenta diferencias estadísticas cuando hemos administrado Atenolol con PEG400 que presentan mayor permeabilidad que Atenolol en solitario.

Este efecto podría ser una interacción del excipiente con la membrana de los enterocitos o con el mismo fármaco facilitando en cualquier caso el paso del fármaco a través de la membrana. En otros estudios, con diferentes fármacos, también se ha visto este efecto con concentraciones muy bajas de PEG 400 se mejora la absorción de Ranitidina, posiblemente por modulación de la permeabilidad intestinal (117). Por todo ello la hipótesis es que el PEG 400 afecta a la membrana intestinal aumentando así la permeabilidad.

Para analizar el efecto de los excipientes en el transportador de secreción Glicoproteína-P se usó como fármaco control la Rodamina y se realizó el experimento en diferentes segmentos del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) dado que la expresión de este transportador va aumentando a lo largo del intestino delgado (434,438,439).



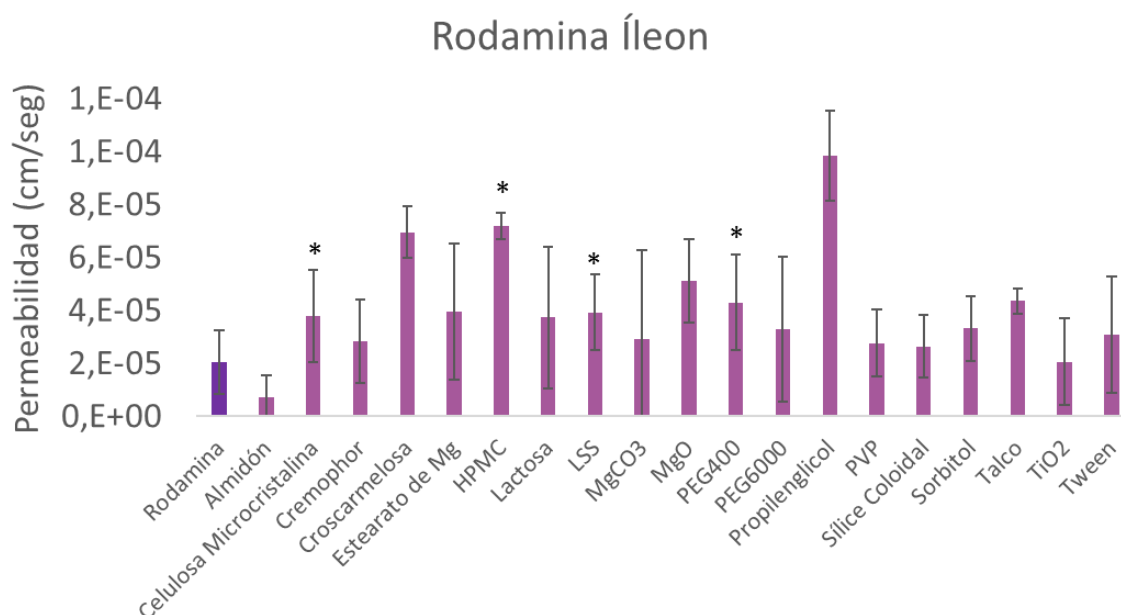
Gráfica 16. Permeabilidad de Rodamina en Duodeno (D) Yeyuno (Y) e Íleon (I) obtenida en ensayos *in situ* basados en el método Doluisio en rata Wistar. * Diferencia significativa entre yeyuno e íleon ($p < 0.05$). ** Diferencia significativa entre duodeno e íleon ($p < 0.05$).

Como se puede ver en la Gráfica 16, el método detecta diferencias significativas entre la permeabilidad obtenida en Duodeno al compararla con la obtenida en Yeyuno e Íleon. Las permeabilidades en los tramos distales son inferiores que en duodeno. Los datos coinciden con lo que sabemos de la Glicoproteína-P dado que la expresión de esta proteína de transporte de secreción va aumentando a lo largo del intestino delgado.

En la Gráfica 17 se presentan los datos de permeabilidad de Rodamina en presencia de diferentes excipientes en el íleon de rata Wistar. Este estudio se realizó en el tramo distal del intestino por la mayor expresión de Glicoproteína-P.

Presenta diferencias estadísticas cuando se ha administrado Rodamina con: HPMC, LSS, Celulosa Microcristalina y PEG400. En todos estos casos el resultado de la permeabilidad es mayor que el de la Rodamina administrada en solitario.

Resultados y Discusión



Gráfica 17. Valores de permeabilidad obtenidos *in situ* en Íleon de rata Wistar con Rodamina en ausencia y presencia de excipientes. * Diferencia significativa ($p < 0.05$).

Este efecto, podría ser una interacción del excipiente con la Glicoproteína-P bloqueando su efecto de secreción intestinal. Otros estudios coinciden en el efecto del PEG 400 sobre el transportador P-gp (129).

Este es un primer acercamiento al efecto de los excipientes en la permeabilidad. Los mecanismos de acción no son discernibles con el experimento planteado y por otro lado las formulaciones comerciales no presentan un único excipiente sino varios que pueden interactuar entre ellos además de con el API.

Para determinar el mecanismo por el cual los excipientes alteran la absorción sería necesario realizar ensayos a diferentes dosis de excipientes. Los resultados podrían demostrar si el excipiente está alterando la fluidez de la membrana aumentando la absorción por difusión pasiva o dificulta de alguna manera la unión a transportadores específicos ya que a concentraciones altas de excipiente los bloqueará saturándolos.

4.4. Pacientes pediátricos: Efecto de la leche en el proceso de disolución y absorción

Los pacientes pediátricos son complejos debido a las múltiples diferencias farmacocinéticas con los adultos. Además de ser muy complicado realizar ensayos clínicos en esta población debido a los problemas éticos involucrados. Por lo tanto, existe un vacío terapéutico cuya solución no se centra en prescribir una dosis ajustada de acuerdo con el peso o la superficie corporal del niño, un niño no es un adulto pequeño, sino que estudia los requisitos de esta población que ofrece una terapia terapéutica efectiva, segura y racional. Al no disponer de formulaciones comerciales adaptadas a ellos, los servicios de farmacia de los hospitales se ven obligados a desarrollar formas farmacéuticas líquidas adaptadas. Además de todo esto, la dieta de estos pacientes es principalmente leche materna o un sucedáneo de la misma (446).

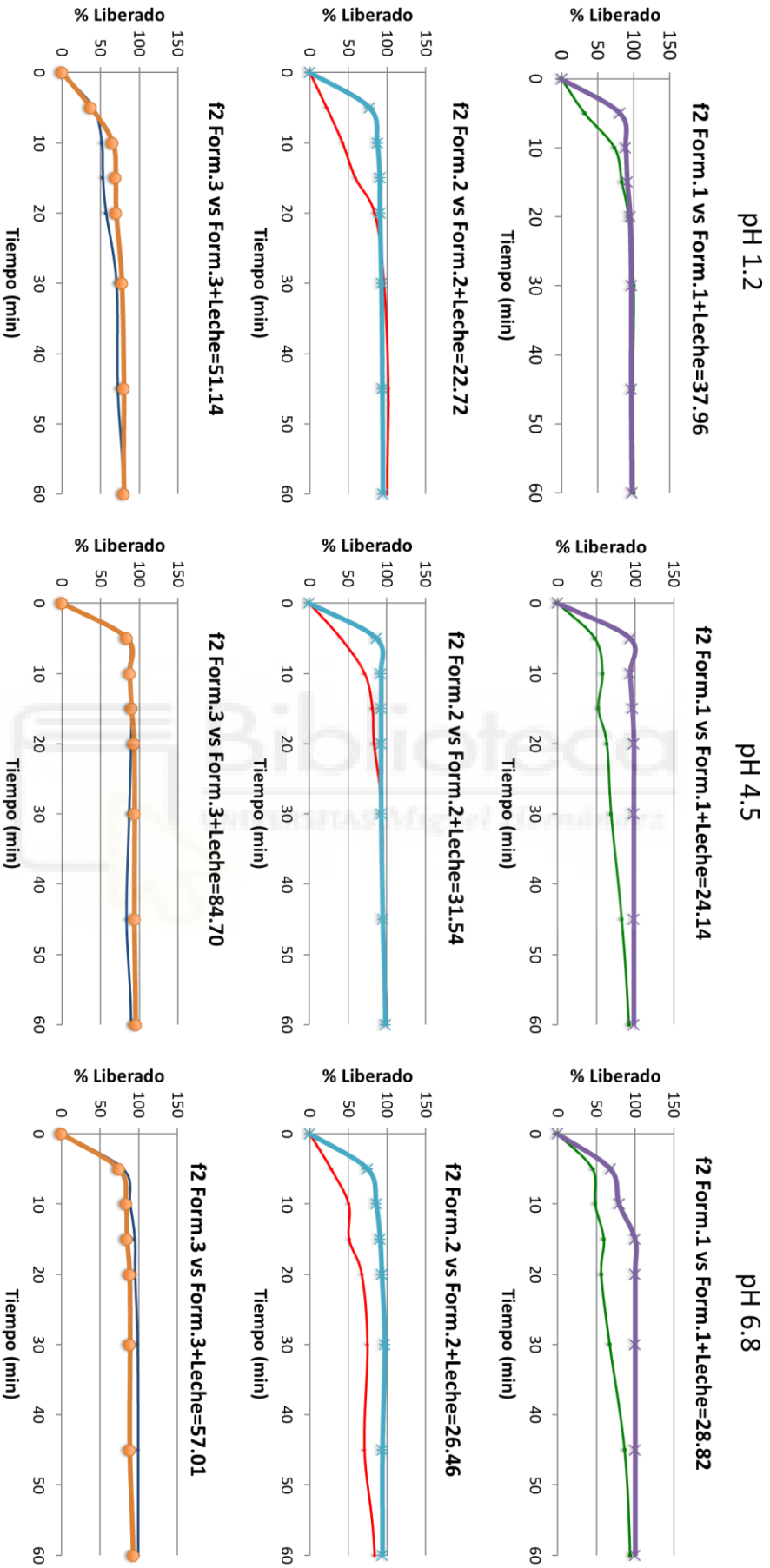
Por todo ello, se hace especialmente difícil clasificar los medicamentos en el marco del Sistema de Clasificación de Biofarmacéutica (BCS) para pacientes pediátricos (447).

Se recogieron formulaciones realizadas por diferentes servicios de farmacia de hospitales de la Comunidad Valenciana. Tres formulaciones de Hidrocortisona, dos de Levofloxacino y dos de Omeprazol.

Las Gráficas 18-20 representan los perfiles de disolución en Aparato USP II de las diferentes formulaciones de Hidrocortisona, Levofloxacino y Omeprazol en presencia y ausencia de leche.

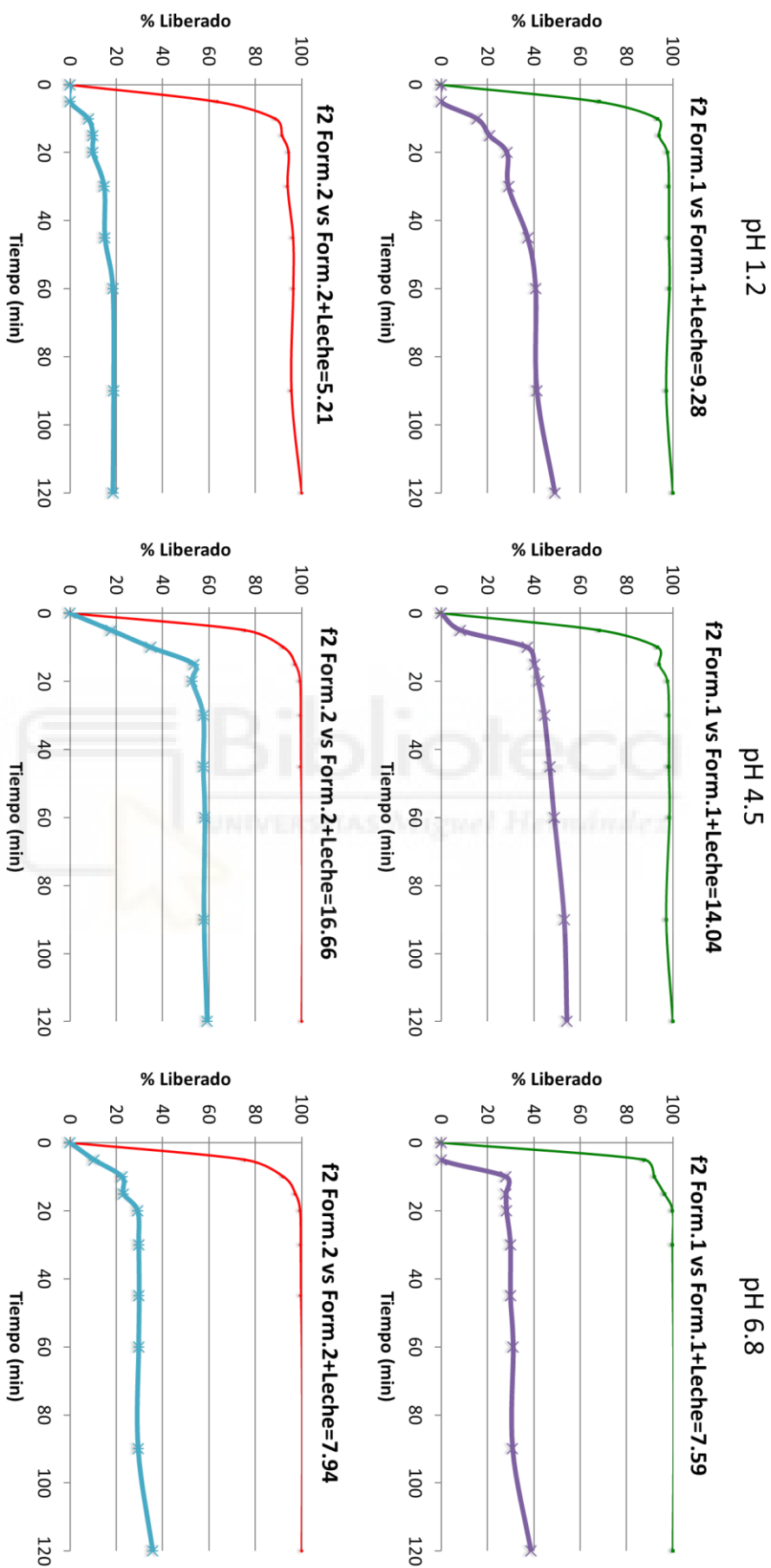
Resultados y Discusión

Hidrocortisona



Gráfica 18. Perfiles de disolución de Hidrocortisona a pH 1.2, 4.5 y 6.8 en presencia y ausencia de leche

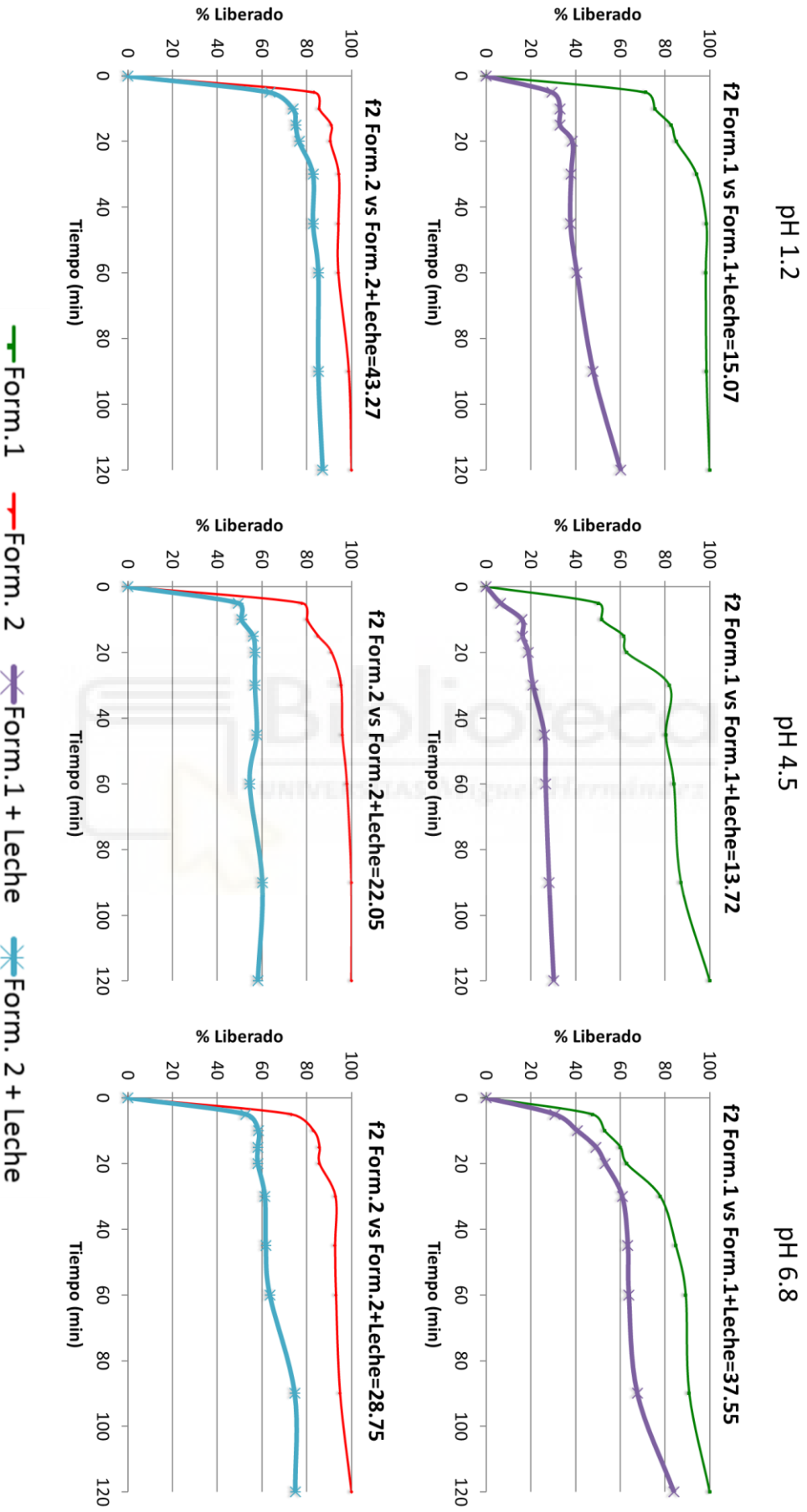
Levofloxacinó



Gráfica 19. Perfiles de disolución de Levofloxacinó a pH 1.2, 4.5 y 6.8 en presencia y ausencia de leche

Resultados y Discusión

Omeprazol



Gráfica 20. Perfiles de disolución de Omeprazol a pH 1.2, 4.5 y 6.8 en presencia y ausencia de leche

Resultados y Discusión

En el caso de las formulaciones de Hidrocortisona solo la formulación 3 demostró no verse alterada por la presencia de leche. Para las formulaciones 1 y 2 sin embargo se percibió que la presencia de leche altera la velocidad de disolución aumentándola. La hidrocortisona es un fármaco BCS clase IV según el BCS pediátrico (448). La hidrocortisona es soluble en la leche materna (449). Su coeficiente de reparto octanol/agua expresado en LogP es igual a 1,6 (450), lo que indica que su disolución en un medio rico en lípidos está favorecida.

En el caso de las formulaciones de Levofloxacino para las formulaciones 1 y 2 se percibió que la presencia de leche altera la velocidad de disolución disminuyéndola e impidiendo la correcta disolución del 100% de la dosis administrada. Es un fármaco BCS pediátrico clase IV (448). El Levofloxacino forma quelatos en presencia de minerales como el calcio, aluminio o hierro (451). La leche incluye minerales en su composición por lo que es más que probable que esta disminución en la cantidad disuelta en presencia de leche se deba a la precipitación del Levofloxacino en forma de quelato al combinarse con estos metales.

En el caso de las formulaciones de Omeprazol para las formulaciones 1 y 2 se percibió que la presencia de leche altera la velocidad de disolución disminuyéndola e impidiendo la correcta disolución del 100% de la dosis administrada. Es un fármaco BCS pediátrico clase II (448). El LogP del Omeprazol es de 2,2 (452), por lo que se esperaba un comportamiento parecido a la hidrocortisona, pero esto se puede explicar por la forma farmacéutica del Omeprazol. Este fármaco se presenta en forma de capsulas rellenas de pellets recubiertos con polímero gastrorresistente. Estas suspensiones se hacen abriendo las capsulas y añadiendo estos pellets al vehículo escogido. El comportamiento puede ser debido a que la leche dificulte la disolución de este polímero impidiendo así la disolución del propio Omeprazol. Este proceso parece mejorar en la disolución en la formulación 2

Resultados y Discusión

que lleva bicarbonato concentrado que ayuda a neutralizar la acidez del polímero y favorece su disolución.

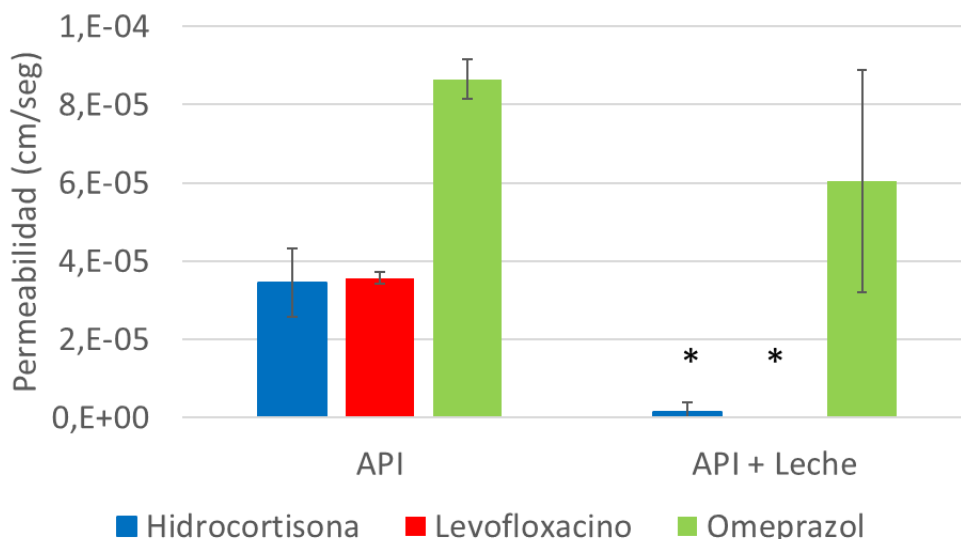
Al ser fármacos clase II y IV es muy posible que este efecto sea predictivo del comportamiento *in vivo*, pero al no disponer de una IVIVC no podemos concluir que esto sea biopredictivo.

Al comparar las diferentes formulaciones entre ellas sin la presencia de leche se obtuvieron valores de f_2 que se presentan en la Tabla 18.

Para las tres formulaciones de Hidrocortisona no se obtuvieron perfiles similares en ninguno de los tres medios ensayados. En el caso del Levofloxacino las dos formulaciones fueron similares en todos los medios y en el de Omeprazol solo a pH 1.2 se observó similitud entre los perfiles de las dos formulaciones. Descubrir el motivo de estas diferencias requeriría el estudio de los excipientes por separado.

Valores del factor de similitud f_2				
Formulación	pH	1vs2	1vs3	2vs3
Hidrocortisona	1.2	42.14	31.24	35.53
	4.5	36.99	30.27	34.55
	6.8	47.08	23.72	24.13
Levofloxacino	1.2	66.11		
	4.5	63.71		
	6.8	53.03		
Omeprazol	1.2	51.46		
	4.5	33.25		
	6.8	34.03		

Tabla 18. Valores del factor de similitud f_2 para las formulaciones ensayadas de Hidrocortisona, Levofloxacino y Omeprazol a los pH fisiológicos. (Verde = Similar)



Gráfica 21. Permeabilidad aparente de la formulación 2 de Hidrocortisona, Levofloxacino y Omeprazol en presencia y ausencia de Leche obtenidos *in situ* por el método Doluisio en rata Wistar (n=3). * Diferencia significativa ($p < 0.05$).

Por último, se decidió evaluar la influencia conjunta de la leche en el proceso de disolución y permeación. Para ello se utilizó la misma técnica de Doluisio, pero en vez de perfundir una disolución del principio activo, se utilizaron directamente las formulaciones (suspensiones de los principios activos) en ausencia o presencia de leche. Ello implica que la evolución de las concentraciones luminales representa el balance del proceso de disolución y permeación, obteniéndose un parámetro que denominaremos permeabilidad aparente.

En la Gráfica 21 se muestran las permeabilidades aparentes de las dispersiones de Hidrocortisona, Levofloxacino y Omeprazol en presencia y ausencia de Leche. Las diferencias son significativas en el caso de la Hidrocortisona y el Levofloxacino, siendo la permeabilidad en presencia de leche significativamente inferior llegando a cero en el caso del Levofloxacino. En el caso de la Hidrocortisona las vesículas grasas de la leche y las pseudomicelas presentes secuestran la Hidrocortisona por su carácter lipófilo de

Resultados y Discusión

manera que la concentración libre disponible para la difusión a través de la membrana disminuye lo que origina una disminución de la permeabilidad aparente. Este efecto ya se ha observado en otros fármacos lipófilos cuando en el ensayo en rata Wistar se utilizan pseudosoluciones micelares de diferentes tensioactivos (453,454).

En el caso del Levofloxacino, como se observaba también en el ensayo de disolución, es previsible la formación de un quelato con calcio insoluble. En el caso del Omeprazol, aunque la variabilidad del ensayo en presencia de leche no ha permitido detectar diferencias, si se observa también una tendencia a una menor permeabilidad aparente. Dado que lo que está presente en lumen es la dispersión de Omeprazol-polimero de recubrimiento a un pH cercano a 6,8 al cual *in vitro* se ha observado una velocidad de disolución ligeramente inferior en presencia de leche y considerando que el Omeprazol es de alta permeabilidad, es decir su absorción puede estar limitada por la disolución, tendría sentido una disminución de la permeabilidad aparente si la disolución con leche es más lenta. Por otro lado, una vez disuelto el Omeprazol, al igual que la Hidrocortisona puede quedar secuestrada en la fracción grasa lo que enlentecería su absorción.

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman la necesidad de establecer protocolos de formulación magistral para prevenir posibles diferencias de biodisponibilidad del fármaco en el organismo del lactante.

4.5. Pacientes Geriátricos: Disfagia y Espesantes

Hay indicios de que para 2050, un tercio de la población mundial será de edad avanzada. (455) La disfagia es un problema cada vez más presente entre los ancianos. El envejecimiento y algunas patologías comunes son factores que predisponen a la aparición de disfagia (456).

La prevalencia de disfagia depende de múltiples factores. Las estimaciones generales sugieren que al menos el 15% de la población de edad avanzada sufre de disfagia (457). Además, la disfagia aumenta el riesgo de desnutrición y neumonía (456).

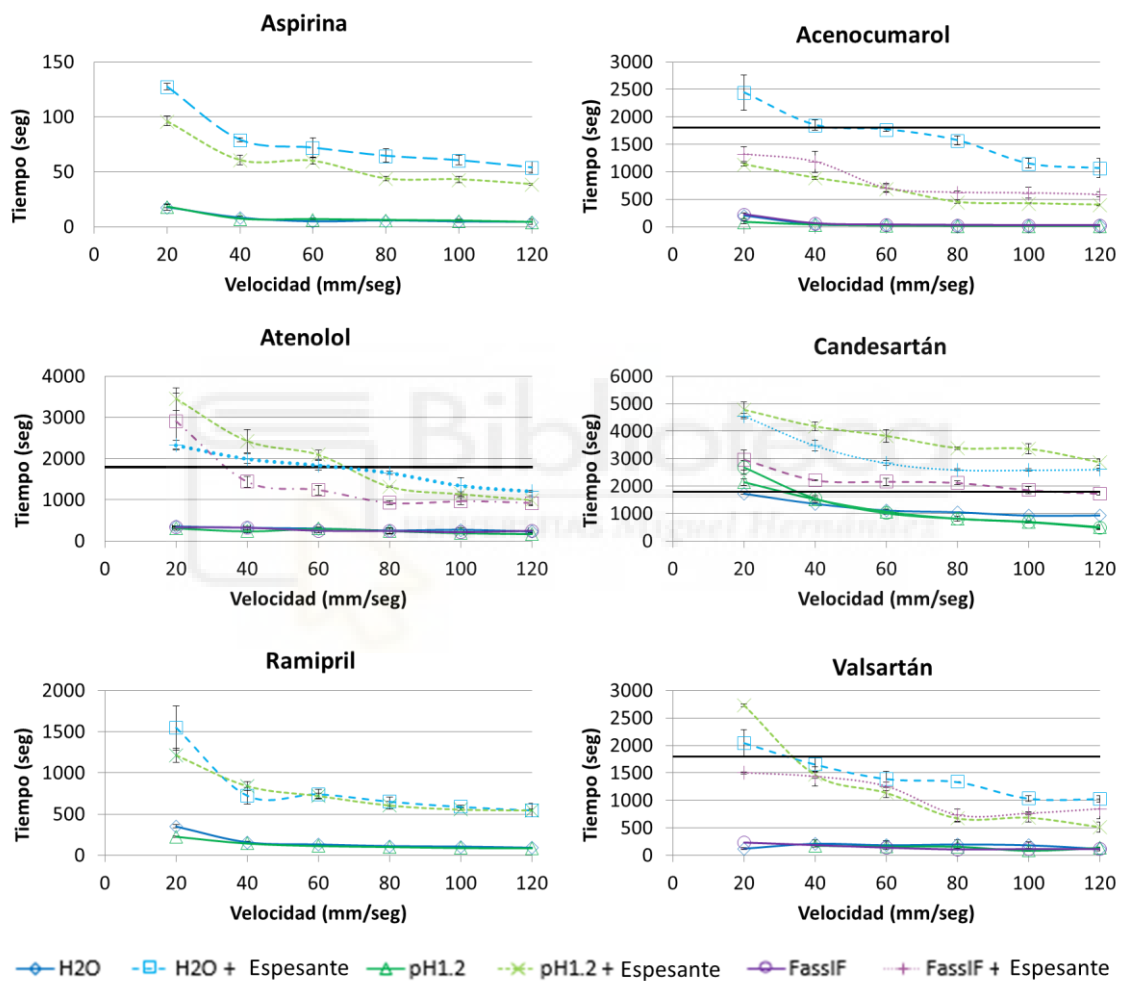
Las personas de edad avanzada generalmente están polimedicadas y generalmente su medicación se administra en forma de comprimidos orales de liberación inmediata. La disfagia dificulta la administración de medicamentos. Los cuidadores de las unidades geriátricas generalmente trituran estos comprimidos para facilitar su administración (458). En general, el agua es el medio comúnmente utilizado para administrar medicamentos, ayudando a la transición de la cavidad oral al estómago. La dificultad para tragar puede generar problemas de eficacia y seguridad, además de representar un problema grave de adherencia al tratamiento (459).

En consecuencia, el uso de espesantes en pacientes con disfagia es muy común. En general, se acepta que la presencia de espesantes ayuda a controlar la velocidad, la dirección, la duración y la eliminación del bolo. Aunque no hay evidencia científica para apoyar el uso de espesantes, esta es la estrategia de primera elección en pacientes con disfagia en la mayoría de las instituciones de salud (460).

Resultados y Discusión

Esta parte del proyecto se centra en determinar el posible efecto del espesante en los procesos de disgregación, disolución y absorción de fármacos comúnmente usados en pacientes geriátricos.

Se empezó analizando el efecto del espesante en el proceso de disgregación, estos ensayos se llevaron a cabo en un el aparato de disgregación modificada (182).



Gráfica 22. Velocidad de agitación frente a tiempo de disgregación de Aspirina, Acenocumarol, Atenolol, Candesartán, Ramipril y Valsartán en diferentes medios con y sin espesante. (Línea gruesa horizontal representa 30 minutos).

Como se puede observar en la Gráfica 22, al añadir espesante a los diferentes medios el tiempo de disgregación aumenta significativamente en todos los casos, llegando

incluso a más de 30 minutos a velocidades bajas, en el caso del Atenolol, Candesartán y Valsartán.

La disgregación de comprimidos de liberación inmediata *in vivo* tiene lugar en la parte proximal del tracto gastrointestinal. Se identificaron los factores que rigen este proceso *in vivo*. Incluyen la viscosidad de los medios, la precipitación de los componentes de los alimentos en la superficie del comprimido y los cambios en la hidrodinámica en los medios circundantes de la forma de dosificación sólida (172).

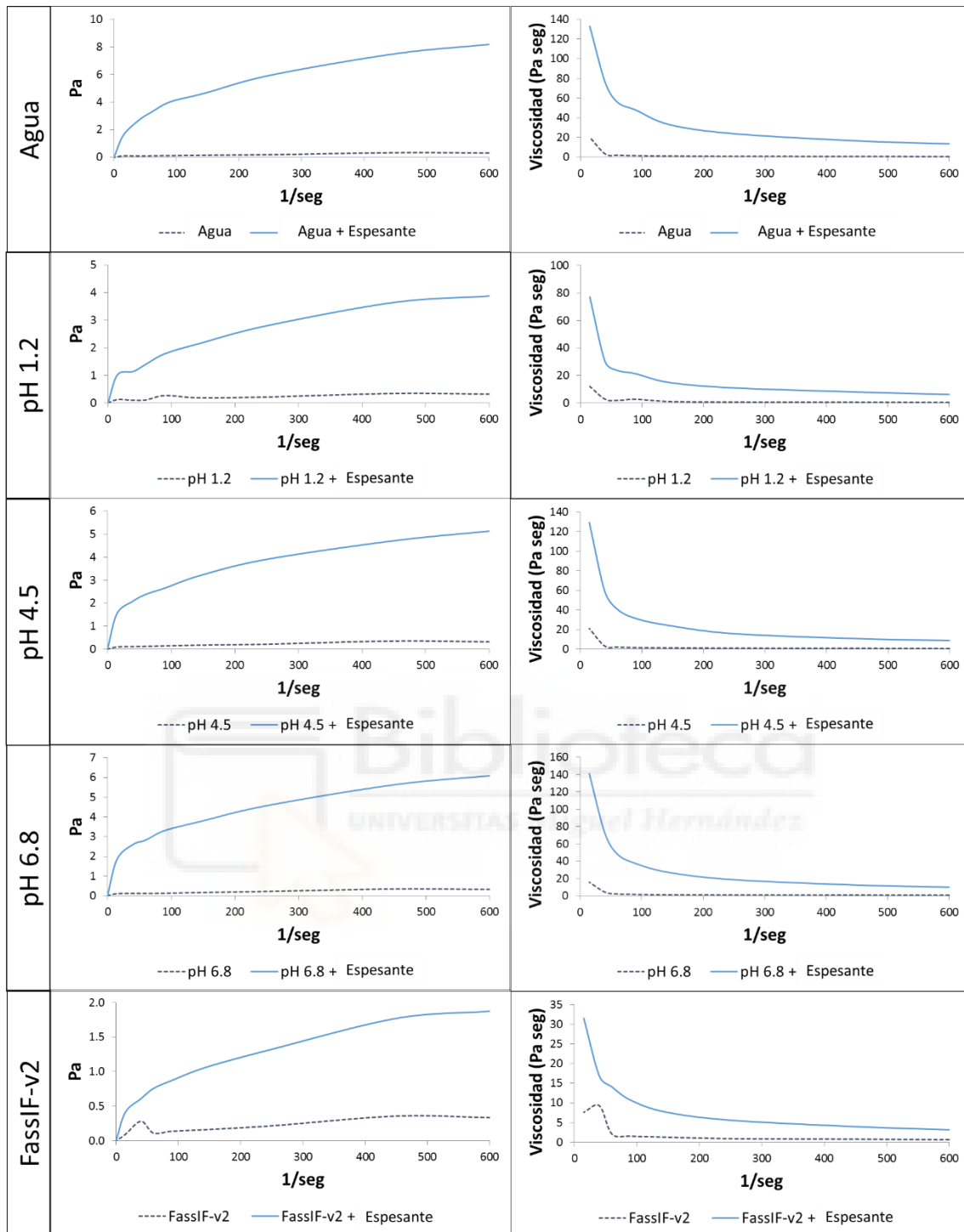
El modelo experimental seleccionado es capaz de simular las condiciones hidrodinámicas que sufrirá el comprimido de una forma más cercana a la realidad *in vivo* que los experimentos realizados en el modelo de la USP (182). Considerando que la administración de los medicamentos se hiciera en ayunas para eliminar la posible interacción de los alimentos en el proceso, solo queda determinar si el espesante altera la viscosidad de los medios estudiados.

Para ello se realizaron pruebas reológicas de los diferentes medios, se pueden ver en la Gráfica 23.

En la Gráfica 23 se puede apreciar como la presencia de espesante en todos los casos estudiados hace que la resistencia al movimiento aumente claramente. Este aumento está directamente relacionado con la viscosidad del medio (461,462). Si el espesante no aumentara la viscosidad los perfiles con y sin espesante hubieran sido similares.

Otros autores han visto que la viscosidad inducida por los alimentos puede retrasar la disgregación y la posterior liberación de API de la forma de dosificación sólida, lo que puede conducir a una reducción severa de la biodisponibilidad (463,464).

Resultados y Discusión



Gráfica 23. Perfiles reológicos de los medios estudiados. Resistencia al giro (Pa) frente a velocidad de giro del reómetro (1/seg) (Columna Izquierda). Viscosidad (Pa·seg) frente a velocidad de giro (1/seg) (Columna derecha). Línea discontinua = medio estudiado. Línea continua = medio con espesante.

Resultados y Discusión

El proceso de disgregación se basa principalmente en dos mecanismos, las fuerzas de cizalla que se aplican al comprimido durante su tránsito por el tracto gastrointestinal y el hinchamiento del propio comprimido al penetrar el líquido por los poros del mismo, siendo este último el de mayor relevancia (86). El hecho de que la viscosidad aumente puede afectar a ambos mecanismos, pero si la fuerza del efecto estuviera en la modificación de las fuerzas de cizalla, el resultado de añadir espesante sería el inverso, las fuerzas aumentarían disminuyendo el tiempo de disgregación. Por otro lado, tiene más sentido relacionar el aumento de la viscosidad con la incapacidad del líquido a penetrar por los microporos del comprimido impidiendo el hinchamiento (135,144).

A pesar de disponer únicamente de ensayos *in vitro*, pero basándonos en datos bibliográficos que apoyan la hipótesis de que el método elegido se acerca a representar el proceso *in vivo*, podemos concluir que el espesante utilizado en pacientes geriátricos aumenta la viscosidad del medio, dificultando la disgregación de los comprimidos y, por lo tanto, podría afectar a dicho proceso *in vivo*.

Posteriormente se evaluó el efecto de un espesante comercial en la velocidad de disolución. Estos experimentos se realizaron en el Aparato USP II, a 37°C, 50 rpm, un volumen de 500ml y administrando el comprimido intacto o triturado (eliminando el proceso de disgregación en gran medida) en presencia y ausencia de espesante. Las Gráficas 24-26 representan los perfiles de disolución de Atenolol, Candesartán y Valsartán.

En la Gráfica 24 se presentan los datos del Atenolol, un fármaco BCS clase III, es decir, de alta solubilidad y baja permeabilidad. El efecto del espesante no se percibe a pH 1.2 ya que, en el caso del comprimido intacto, los dos perfiles alcanzan el 85% en menos de 15 min, por lo que se consideran similares independientemente de f2. En el caso de

Resultados y Discusión

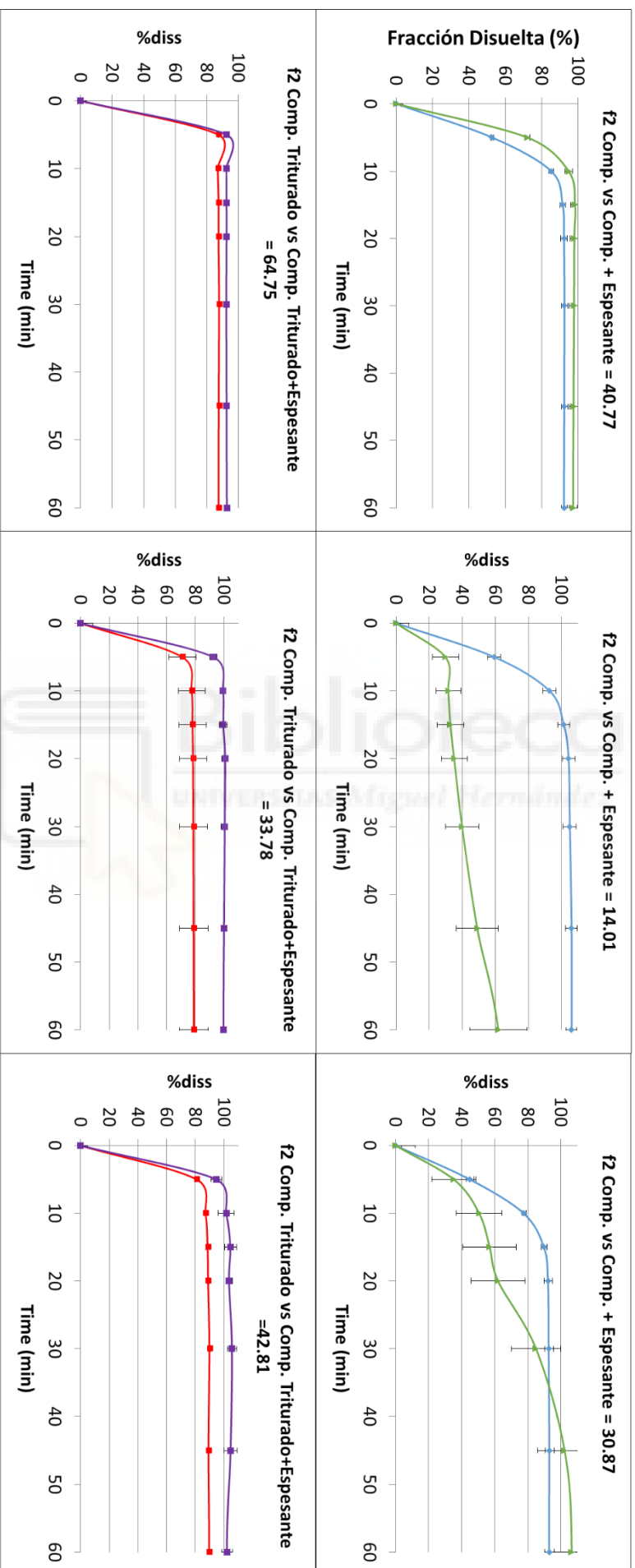
triturar el comprimido, a pH 1.2, f_2 es mayor de 50 por lo que también se consideran perfiles similares. A los otros pH, f_2 tiene valores inferiores a 50 por lo que son significativamente diferentes. A pesar de ello, los perfiles de los comprimidos triturados se acercan más a la similitud que al administrar los comprimidos intactos. El efecto en la biodisponibilidad es cuestionable ya que al ser un BCS clase III el paso limitante es la permeabilidad (464). Además, a pH 1.2, que simula el ambiente gástrico, es donde se inicia el proceso de disgregación y disolución, y es donde el espesante no demostró afectar al proceso de disolución. Lo ideal para este tipo de fármacos es comprobar si el espesante es capaz de modificar la permeabilidad, como veremos a continuación.

En la Gráfica 25 y 26 se presentan los datos de Candesartán y Valsartán respectivamente. Son fármacos BCS clase II, es decir, de baja solubilidad y alta permeabilidad.

En el caso del Candesartán, el porcentaje disuelto no alcanzó el 5% en ningún caso, siendo 0 en el caso de la administración del comprimido intacto con espesante a pH 1.2 y 4.5. A pH 6.8 ocurre el efecto contrario, el espesante parece facilitar la disolución cuando el comprimido se administra intacto. A pesar de que f_2 detecta diferencias entre los perfiles, este efecto parece tener poca relevancia *in vivo* debido a la baja fracción disuelta alcanzada.

En el caso del Valsartán, a pH 1.2, las fracciones disueltas son bajas, no llegando al 8%. En este caso los cálculos de f_2 no detectaron diferencias ni en el comprimido intacto ni en el triturado. Para los pH 4.5 y 6.8, el porcentaje disuelto va aumentando, debido principalmente a la solubilidad del fármaco (465). Las f_2 para estos pH si que demostraron diferencias entre los perfiles con y sin espesante. En el caso de los casos de los comprimidos triturados los perfiles se acercaban más a la similitud que los perfiles de los comprimidos intactos.

Atenolol



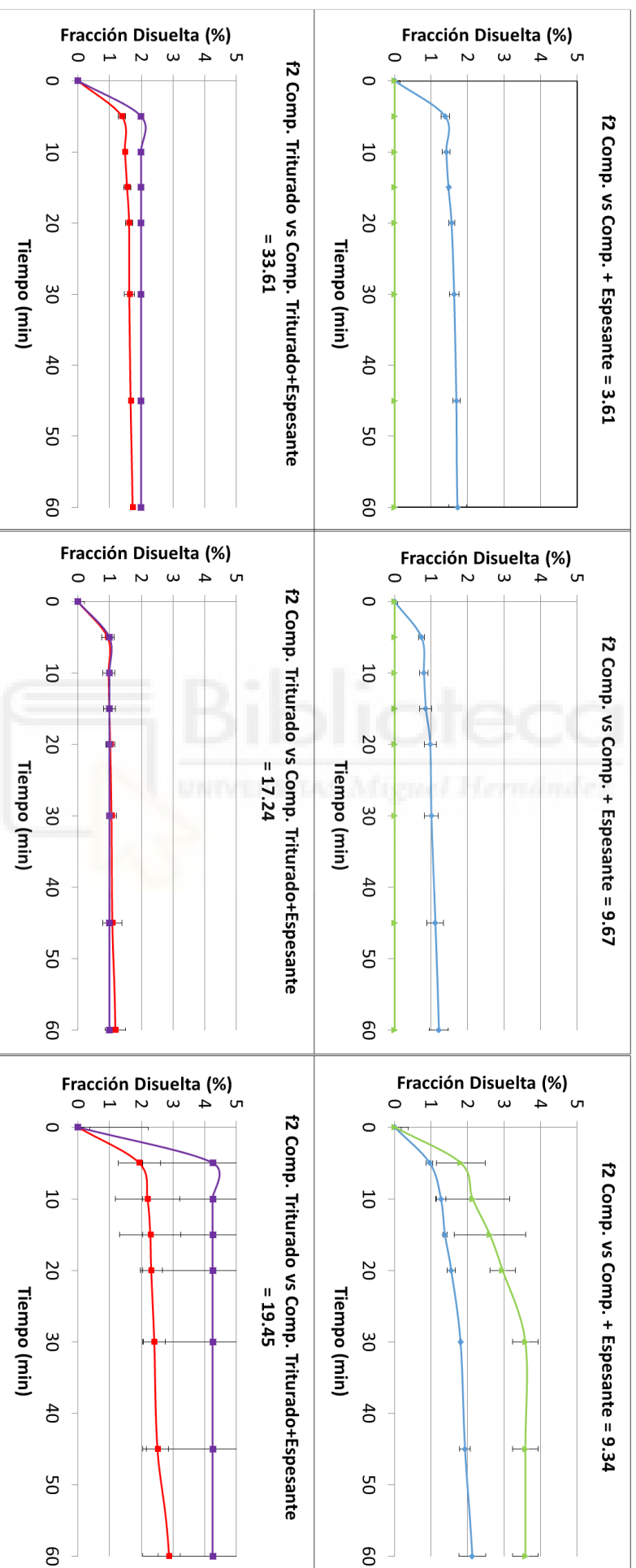
Gráfica 24. Perfiles de disolución de Atenolol a pH 1.2, 4.5 y 6.8 en forma de comprimido o comprimido triturado con y sin espesante.

Candesartán

pH 1.2

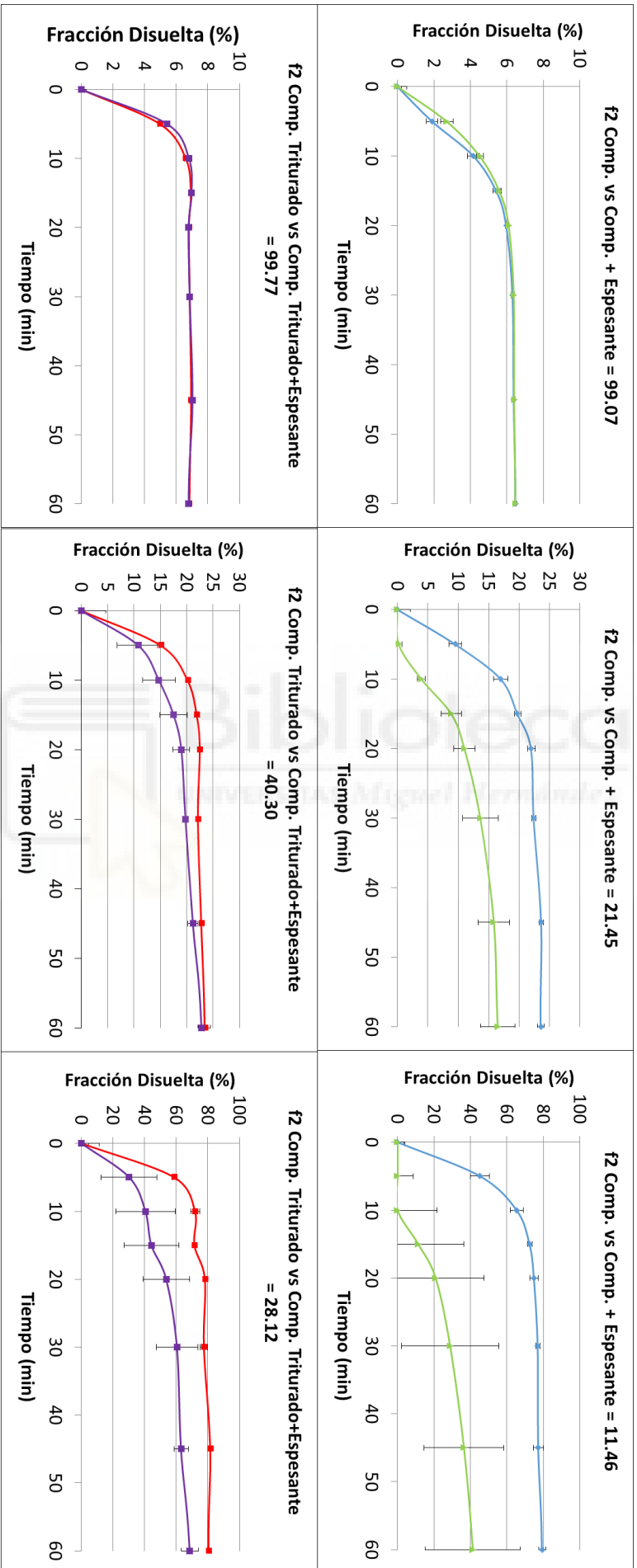
pH 4.5

pH 6.8



Gráfica 25. Perfiles de disolución de Candesaratán a pH 1.2, 4.5 y 6.8 en forma de comprimido o comprimido triturado con y sin espesante.

Valsartán

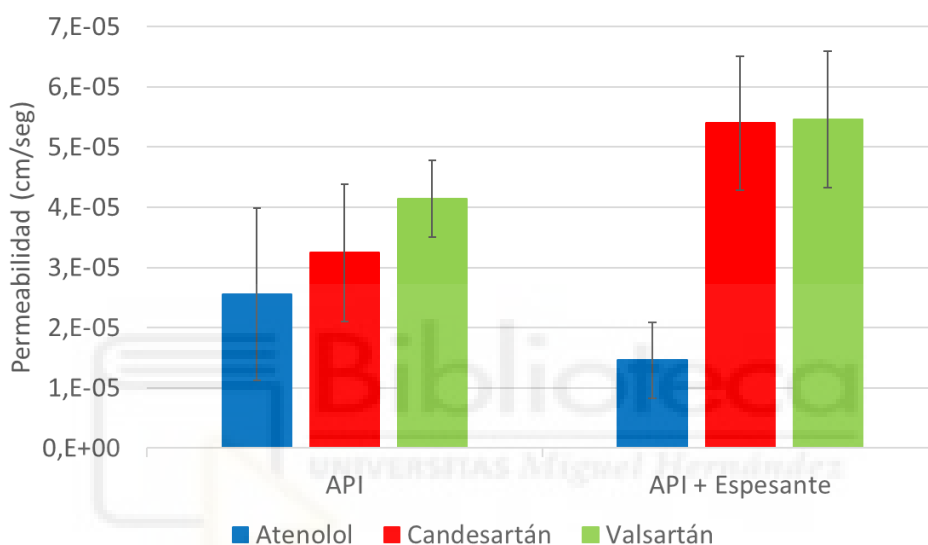


Gráfica 26. Perfiles de disolución de Valsartán a pH 1.2, 4.5 y 6.8 en forma de comprimido o comprimido triturado con y sin espesante.

Resultados y Discusión

Al ser fármacos clase II el paso limitante para determinar su biodisponibilidad es la solubilidad, por lo que es más probable que este efecto tenga relevancia *in vivo* (466–468). Aun así, en ausencia de IVIVC tampoco podemos saber si esas diferencias observadas son relevantes. Existen IVIVC de estos fármacos (469,470) por lo que sería interesante evaluar el efecto de los espesantes en los medios que resultaron ser biopredictivos para evaluar la repercusión *in vivo* de dicho efecto.

En la Gráfica 27 se representa el efecto del espesante en el proceso de absorción.



Gráfica 27. Permeabilidades de Atenolol, Candesartán, y Valsartán en presencia y ausencia de espesante obtenidos *in situ* por el método Doluisio en rata Wistar (n = 4–6).

Las diferencias no son estadísticamente significativas pero la presencia de espesante parece aumentar la permeabilidad del fármaco en el caso del Candesartán y el Valsartán. Las limitaciones de este estudio son que el fármaco se administró en forma de solución (Atenolol y Valsartán) o suspensión (Candesartán). El Candesartán se administró en forma de suspensión debido a su baja solubilidad. Estos experimentos se hicieron con el API de los fármacos para evitar la influencia de los propios excipientes de las formulaciones y ver el efecto del espesante únicamente, por lo que al descartar el efecto del resto de excipientes no se pueden extrapolar los resultados *in vivo*. El método Doluisio

Resultados y Discusión

se basa en monitorizar la desaparición del fármaco disponible para absorción en el lumen intestinal. La hipótesis es que el espesante se deposita en la membrana intestinal impidiendo su absorción, pero capturando el fármaco libre. Para determinar el efecto del espesante sería interesante hacer un ensayo *in vivo* de administración oral en ratas Wistar, donde se tomarían muestras de plasma determinando así la permeabilidad de forma directa.

Los procesos de disgregación y disolución se ven afectados por la presencia de espesante *in vitro*, por lo que no se podría concluir que tiene efecto en la biodisponibilidad. Para confirmar esto se deberían realizar ensayos más próximos al proceso *in vivo* que envuelvan los procesos LADME en su totalidad.





5. Conclusiones





Conclusiones

1. Diferentes condiciones aplicadas a los aparatos de disolución han demostrado ser capaces de reproducir el rendimiento *in vivo* de formulaciones de liberación inmediata de disolución lenta. Utilizando el aparato USP IV con los tampones descrito en farmacopea y adicionando Tween 0.05% en el caso de formulación de Telmisartán (BCS II), variando los volúmenes de disolución en el Aparato USP II para Pravastatina (BCS III), o utilizando dispositivos multicompartimentales como en el caso de Dexketoprofeno (BCS I).
2. Se han desarrollado y validado correlaciones *In vitro-In vivo* tipo A en dos pasos para diferentes formulaciones de Dexketoprofeno Trometamol y Telmisartán, que predicen de manera satisfactorio perfiles *in vivo* a partir de ensayos *in vitro*. Las validaciones internas en ambos casos presentaron errores de predicción para C_{max} y AUC inferiores al 15%.
3. El método *in situ* sin recirculación en rata Wistar basado en el método de Doluisio se ha evaluado para determinar la permeabilidad en segmentos intestinales y colon de fármacos que se absorben únicamente por difusión pasiva (Atenolol) y para detectar el efecto de la Glicoproteína-P en la absorción activa (Digoxina). Se ha comprobado que la permeabilidad del Atenolol es inferior a la del Metoprolol y que la Digoxina presenta valores de permeabilidad que reflejan la expresión de la Glicoproteína-P en los distintos tramos de intestino en rata Wistar.
4. Se determinó el efecto de los excipientes más utilizados en las formulaciones orales de liberación inmediata en la absorción de los fármacos control (Atenolol y Rodamina). En el caso del Atenolol, la permeabilidad en intestino completo aumenta

Conclusiones

de manera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en presencia de PEG400. En el caso de la Rodamina la permeabilidad se calculó en íleon ya que es donde hay mayor expresión de Glicoproteína-P y el valor de la permeabilidad aumentó de forma significativa ($p < 0.05$) en presencia de: HPMC, LSS, Celulosa Microcristalina y PEG400.

5. La leche artificial demostró afectar a los procesos de disolución y absorción de diferentes formas farmacéuticas líquidas elaboradas para pacientes pediátricos en los servicios de farmacia. En el caso de la Hidrocortisona y Levofloxacino, la leche dificulta de manera significativa el proceso de absorción y disolución a los pH fisiológicos. En el caso del Omeprazol, este efecto solo es apreciable de manera significativa en el proceso de disolución.

6. El espesante comúnmente utilizado en pacientes con disfagia demostró afectar de manera significativa en los procesos de liberación, pero no en los procesos de absorción. En el caso de Aspirina, Acenocumarol, Atenolol, Candesartán, Ramipril y Valsartán el tiempo de disgregación aumenta para todas las velocidades y medios estudiados. En los ensayos de disolución en Aparato USP II se demostró que el espesante impedía la disolución de los fármacos estudiados, (Atenolol, Candesartán y Valsartán).

5. Conclusions





1. Different conditions applied to dissolution apparatus have proven to be able to reproduce the *in vivo* performance of immediate slow-release immediate release formulations. Using the USP IV Apparatus with the buffers described in pharmacopoeia and additives of Tween 0.05% in the case of Telmisartan formulation (BCS II), varying the dissolution volumes in the USP II Apparatus for Pravastatin (BCS III), or using multicompartmental devices as in the case of Desketoprofen (BCS I).
2. *In vitro-In vivo* type A correlations have been developed and validated in two steps for different formulations of Desketoprofen Trometamol and Telmisartan, which successfully predict *in vivo* profiles from *in vitro* assays. The internal validations in both cases presented prediction errors for C_{\max} and AUC below 15%.
3. The *in situ* method without recirculation in Wistar rat based on the Doluisio method has been evaluated to determine the permeability in intestinal and colon segments of drugs that are absorbed only by passive diffusion (Atenolol) and to detect the effect of P-glycoprotein in active absorption (Digoxin). It has been proven that the permeability of Atenolol is lower than Metoprolol and that Digoxin has permeability values that reflect the expression of P-glycoprotein in the different intestine segments in Wistar rat.
4. The effect of the most commonly used excipients in oral immediate-release formulations on the absorption of control drugs (Atenolol and Rhodamine) was determined. In the case of Atenolol, permeability in the complete intestine increases statistically significantly ($p < 0.05$) in the presence of PEG400. In the case of Rhodamine, permeability was calculated in the ileum since it is where there is greater expression of

Conclusions

P-glycoprotein and the value of permeability increased significantly ($p < 0.05$) in the presence of: HPMC, LSS, Microcrystalline Cellulose and PEG400.

5. Artificial milk was shown to affect the dissolution and absorption processes of different liquid pharmaceutical forms developed for pediatric patients in pharmacy services. In the case of Hydrocortisone and Levofloxacin, milk significantly hinders the process of absorption and dissolution at physiological pH. In the case of Omeprazole, this effect is only significant in the dissolution process.

6. The thickener commonly used in patients with dysphagia was shown to significantly affect the release processes but not the absorption processes. In the case of Aspirin, Acenocoumarol, Atenolol, Candesartan, Ramipril and Valsartan, the disintegration time increases for all the speeds and media studied. In the dissolution tests in USP II Apparatus it was shown that the thickener prevented the dissolution of the drugs studied, (Atenolol, Candesartan and Valsartan).

6. Bibliografía





1. IPEC Federation [Internet]. Available from: <http://ipec-federation.org/>
2. Rabasco Álvarez AM. Biofarmacia Y Farmacocinética Básica. 2009;
3. Fisiología AY, Aparato DEL. Anatomía y fisiología del aparato digestivo. Soc Catalana Dig. Available from:
http://www.scdigestologia.org/docs/patologies/es/anatomia_fisio_es.pdf
4. SMART - Servier Medical ART [Internet]. Available from:
<https://smart.servier.com/>
5. Dean JR, Ma R. Approaches to assess the oral bioaccessibility of persistent organic pollutants: A critical review. *Chemosphere*. 2007 Jul;68(8):1399–407. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17490715>
6. Parada J, Aguilera JM. Food Microstructure Affects the Bioavailability of Several Nutrients. *J Food Sci*. 2007 Mar;72(2):R21–32. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17995848>
7. McAllister M. Dynamic Dissolution: A Step Closer to Predictive Dissolution Testing? *Mol Pharm*. 2010 Oct 4;7(5):1374–87. Available from:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/mp1001203>
8. Woda A, Mishellany-Dutour A, Batier L, François O, Meunier J-P, Reynaud B, et al. Development and validation of a mastication simulator. *J Biomech*. 2010 Jun 18;43(9):1667–73. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20392449>
9. Wallig MA. Digestive System. *Fundamentals of Toxicologic Pathology: Third Edition*. 2017. p. 395–442.
10. Barrett KE. *Gastrointestinal Physiology, 2e* | AccessMedicine | McGraw-Hill Medical [Internet]. Available from:
<https://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookID=691>
11. Kong F, Singh RP. Disintegration of Solid Foods in Human Stomach. *J Food Sci*. 2008 Jun;73(5):R67–80. Available from:

Bibliografia

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18577009>
12. Golding M, Wooster TJ. The influence of emulsion structure and stability on lipid digestion. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2010 Apr 1;15(1–2):90–101. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S135902940900106X>
 13. Ballance S, Sahlstrøm S, Lea P, Nagy NE, Andersen P V., Dessev T, et al. Evaluation of gastric processing and duodenal digestion of starch in six cereal meals on the associated glycaemic response using an adult fasted dynamic gastric model. *Eur J Nutr.* 2013 Mar 12;52(2):799–812. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22684609>
 14. Booijink CCGM, El-Aidy S, Rajilić-Stojanović M, Heilig HGJ, Troost FJ, Smidt H, et al. High temporal and inter-individual variation detected in the human ileal microbiota. *Environ Microbiol.* 2010 Dec;12(12):3213–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20626454>
 15. van den Bogert B, de Vos WM, Zoetendal EG, Kleerebezem M. Microarray analysis and barcoded pyrosequencing provide consistent microbial profiles depending on the source of human intestinal samples. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Mar 15;77(6):2071–80. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21257804>
 16. Schubert ML. Hormonal regulation of gastric acid secretion. *Curr Gastroenterol Rep.* 2008 Dec;10(6):523–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19006605>
 17. Mayer EA. Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication. *Nat Rev Neurosci.* 2011 Jul 13;12(8):453–66. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21750565>
 18. Mason KL, Huffnagle GB, Noverr MC, Kao JY. Overview of Gut Immunology. In: *GI Microbiota and Regulation of the Immune System.* New York, NY: Springer New York; 2008. p. 1–14. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18841699>

19. NAVARRO A, Hospital de Gastroenterología Dr. Carlos Bonorino Udaondo, Buenos Aires A. Anatomía Quirúrgica De Estómago Y Duodeno. Ii-200. Soc Argenita Cirugía Dig del Hosp Gastroenterol Dr Carlos bonorino Udaondo, Buenos Aires Argentina. 2009;II:22. Available from: www.sacd.org.ar
20. Netter FH. Atlas de Anatomia Humana. Journal of Sho. 2011.
21. DeSesso JM, Jacobson CF. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. Food Chem Toxicol. 2001 Mar;39(3):209–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278053>
22. Wilson CG. The transit of dosage forms through the colon. Int J Pharm. 2010 Aug 16;395(1–2):17–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20576492>
23. Shen L. Functional Morphology of the Gastrointestinal Tract. In 2009. p. 1–35. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-01846-6_1
24. Fisiología del recién nacido > Pfizer.es [Internet]. Available from: https://www.pfizer.es/salud/prevencion_habitos_saludables/consejos_salud/fisiologia_recien_nacido.html
25. El sistema digestivo del bebé - Blevit [Internet]. Available from: https://www.ordesa.es/club_padres/mi-hijo/articulo/el-sistema-digestivo-del-bebe/
26. Efectos del envejecimiento sobre el aparato digestivo - Trastornos gastrointestinales - Manual MSD versión para público general [Internet]. Available from: <https://www.msmanuals.com/es-co/hogar/trastornos-gastrointestinales/biolog%25C3%25ADa-del-aparato-digestivo/efectos-del-envejecimiento-sobre-el-aparato-digestivo>
27. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines Dysphagia [Internet]. Available from: <http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/dysphagia/dysphagia-english>

Bibliografia

28. Mayersohn M. Principles of Drug Absorption. 2002 May 24;50–114. Available from:
<https://www.taylorfrancis.com/books/e/9780824744694/chapters/10.1201%252F9780824744694-5>
29. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991 Mar 29;175(3):880–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1673839>
30. Rang HP. Pharmacology [Internet]. Churchill Livingstone; 2003. 797 p. Available from:
https://books.google.de/books/about/Pharmacology.html?id=QWpqAAAAMAAJ&redir_esc=y
31. Bradshaw DM, Arceci RJ. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *J Clin Oncol*. 1998 Nov 21;16(11):3674–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9817290>
32. Krishan A, Fitz CM, Andritsch I. Drug retention, efflux, and resistance in tumor cells. *Cytometry*. 1997 Dec 1;29(4):279–85. Available from:
<http://doi.wiley.com/10.1002/%2528SICI%25291097-0320%252819971201%252929%253A4%253C279%253A%253AAID-CYTO3%253E3.0.CO%253B2-5>
33. Berndt WO. The Role of Transport in Chemical Nephrotoxicity. *Toxicol Pathol*. 1998 Jan 28;26(1):52–7. Available from:
<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/019262339802600107>
34. Baly DL, Horuk R. The biology and biochemistry of the glucose transporter. *Biochim Biophys Acta*. 1988 Oct 11;947(3):571–90. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3048404>
35. Owens MJ, Nemeroff CB. The serotonin transporter and depression. *Depress Anxiety*. 1998;8 Suppl 1:5–12. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9809208>

36. Reith ME, Xu C, Chen NH. Pharmacology and regulation of the neuronal dopamine transporter. *Eur J Pharmacol.* 1997 Apr 11;324(1):1–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9137907>

37. Ganas P, Brandsch R. Uptake of L-nicotine and of 6-hydroxy-L-nicotine by *Arthrobacter nicotinovorans* and by *Escherichia coli* is mediated by facilitated diffusion and not by passive diffusion or active transport. *Microbiology.* 2009 Jun 1;155(6):1866–77. Available from: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.028688-0>

38. Lorenzo Fernández P de. Velázquez farmacología básica y clínica [Internet]. Available from: <https://www.medicapanamericana.com/Libros/Libro/6003/Velazquez-Farmacologia-Basica-y-Clinica.html>

39. Estudante M, Morais JG, Soveral G, Benet LZ. Intestinal drug transporters: An overview. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013 Oct;65(10):1340–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23041352>

40. Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. *Physiol Rev.* 2006 Oct;86(4):1179–236. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17015488>

41. Sun J, He Z-G, Cheng G, Wang S-J, Hao X-H, Zou M-J. Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction. *Med Sci Monit.* 2004 Jan 6;10(1):RA5-14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14704647>

42. Dahan A, Amidon GL. Grapefruit Juice and its Constituents Augment Colchicine Intestinal Absorption: Potential Hazardous Interaction and the Role of P-Glycoprotein. *Pharm Res.* 2009 Apr 2;26(4):883–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19048359>

43. Fontestad CN, Fontestad CN, Álvarez IG, Casabó V, Merino V, Bermejo M. *Revista Médicas UIS.* [Internet]. Vol. 21, *Revista Médicas UIS.* Universidad

Bibliografía

- Industrial de Santander; 2008. Available from:
<https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistamedicasuis/article/view/1137>
44. Meier Y, Eloranta JJ, Darimont J, Ismail MG, Hiller C, Fried M, et al. Regional Distribution of Solute Carrier mRNA Expression Along the Human Intestinal Tract. *Drug Metab Dispos.* 2007 Jan 12;35(4):590–4. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17220238>
45. Piquette- Miller M, Pak A, Kim H, Anari R, Shahzamani A. Decreased Expression and Activity of P-Glycoprotein in Rat Liver During Acute Inflammation. *Pharm Res.* 1998;15(5):706–11. Available from:
<http://link.springer.com/10.1023/A:1011962818051>
46. Benet LZ, Izumi T, Zhang Y, Silverman JA, Wachter VJ. Intestinal MDR transport proteins and P-450 enzymes as barriers to oral drug delivery. *J Control Release.* 1999 Nov 1;62(1–2):25–31. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365999000346>
47. Schinkel AH, Wagenaar E, Mol CA, van Deemter L. P-glycoprotein in the blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J Clin Invest.* 1996 Jun 1;97(11):2517–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8647944>
48. Chan LM., Lowes S, Hirst BH. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability. *Eur J Pharm Sci.* 2004 Jan 1;21(1):25–51. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098703002264>
49. Debenham PG, Kartner N, Siminovitch L, Riordan JR, Ling V. DNA-mediated transfer of multiple drug resistance and plasma membrane glycoprotein expression. *Mol Cell Biol.* 1982 Aug 1;2(8):881–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6127625>
50. Mauad TH, van Nieuwkerk CM, Dingemans KP, Smit JJ, Schinkel AH, Notenboom RG, et al. Mice with homozygous disruption of the *mdr2* P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of nonsuppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *Am J Pathol.* 1994

- Nov;145(5):1237–45. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7977654>
51. Ueda K, Taguchi Y, Morishima M. How does P-glycoprotein recognize its substrates? *Semin Cancer Biol.* 1997 Jun;8(3):151–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9441945>
52. Ambudkar S V., Dey S, Hrycyna CA, Ramachandra M, Pastan I, Gottesman MM. BIOCHEMICAL, CELLULAR, AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS OF THE MULTIDRUG TRANSPORTER. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999 Apr 28;39(1):361–98. Available from:
<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.361>
53. Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE. From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci.* 2001 Jun;58(7):931–59. Available from:
<http://link.springer.com/10.1007/PL00000912>
54. Sun L, Liu X, Xiang R, Wu C, Wang Y, Sun Y, et al. Structure-based prediction of human intestinal membrane permeability for rapid *in silico* BCS classification. *Biopharm Drug Dispos.* 2013 Sep;34(6):321–35. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23716273>
55. Mangas-Sanjuan V. Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos | Editorial UMH. In 2015. Available from:
<https://editorial.edu.umh.es/2015/05/24/metodologias-biofarmaceuticas-en-el-desarrollo-de-medicamentos/>
56. Shah VP, Amidon GL. G.L. Amidon, H. Lennernas, V.P. Shah, and J.R. Crison. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability, *Pharm Res* 12, 413–420, 1995—Backstory of BCS. *AAPS J.* 2014 Sep 25;16(5):894–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24961917>
57. Amidon GL, Lennernäs H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res.* 1995 Mar;12(3):413–20.

Bibliografía

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7617530>
58. Löbenberg R, Amidon GL. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *Eur J Pharm Biopharm.* 2000 Jul;50(1):3–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10840189>
 59. Tsume Y, Mudie DM, Langguth P, Amidon GE, Amidon GL. The Biopharmaceutics Classification System: Subclasses for in vivo predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC. *Eur J Pharm Sci.* 2014 Jun 16;57:152–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24486482>
 60. Yu LX, Amidon GL, Polli JE, Zhao H, Mehta MU, Conner DP, et al. Biopharmaceutics classification system: the scientific basis for biowaiver extensions. *Pharm Res.* 2002 Jul;19(7):921–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12180542>
 61. Amidon KS, Langguth P, Lennernäs H, Yu L, Amidon GL. Bioequivalence of oral products and the biopharmaceutics classification system: science, regulation, and public policy. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 Sep;90(3):467–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21775984>
 62. Guidance for Industry Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. In Tel; 1997. p. 301–827. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance.htm>
 63. BMJ G. What are excipients doing in medicinal products ? 2014;47(7):81–5.
 64. Pramod GL, Reddy KS, Reddy JD, Vasantharaju SG. Global regulatory perspective of bulk pharmaceutical excipients. *Pharm Rev.* 2010;8(3). Available from: <https://manipal.pure.elsevier.com/en/publications/global-regulatory-perspective-of-bulk-pharmaceutical-excipients>
 65. excipiente | Definición de excipiente - Diccionario de la lengua española - Edición del Tricentenario [Internet]. Available from: <http://dle.rae.es/srv/search?m=30&w=excipiente>

66. García-Arieta A. Interactions between active pharmaceutical ingredients and excipients affecting bioavailability: Impact on bioequivalence. *Eur J Pharm Sci.* 2014;
67. Pifferi G, Restani P. The safety of pharmaceutical excipients. *Farm.* 2003 Aug 1;58(8):541–50. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014827X0300079X>
68. pharmpedia.com - Diese Website steht zum Verkauf! - Informationen zum Thema pharmpedia. [Internet]. Available from:
<http://www.pharmpedia.com/Tablet>
69. Avis KE, Lieberman HA, Lieberman HH. *Pharmaceutical Dosage Forms* [Internet]. 1992. Available from:
https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/50503594/lachman-vol2_parenteral.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1548165616&Signature=e1ut%252Fxu9IIEebYdCsjNVjuljMs%253D&response-content-disposition=inline%253Bfilename%253Dlachman-vol2_parente
70. Banker GS. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. *J Pharm Sci.* 1970 Oct 1;59(10):1531. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915375390>
71. Katdare A, Mahesh VC. Excipient Development for Pharmaceutical, Biotechnology, and Drug Delivery ... - Google Books [Internet]. Available from:
https://books.google.de/books?hl=en&lr=&id=_QVIS81xti8C&oi=fnd&pg=PP1&dq=Excipients+for+Semisolid+Formulations+excipient+development+for+pharmaceutical+biotechnology+and+drug+delivery+systems%253B+&ots=Jc7MPjfFbM&sig=EXtH8BRoH-jFIY4XXX3u2pJQYxs#v=onepage&q=
72. Vasconcelos T, Marques S, Sarmiento B. The biopharmaceutical classification system of excipients. *Therapeutic Delivery.* 2017.
73. Kelly K, O'Mahony B, Lindsay B, Jones T, Grattan TJ, Rostami-Hodjegan A, et al. Comparison of the rates of disintegration, gastric emptying, and drug absorption following administration of a new and a conventional paracetamol formulation, using gamma scintigraphy. *Pharm Res.* 2003 Oct;20(10):1668–73.

Bibliografía

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14620524>
74. Kato R, Takanaka A, Onoda K, Omori Y. Effect of syrup on the absorption of drugs from gastrointestinal tract. *Jpn J Pharmacol.* 1969 Sep;19(3):331–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5307466>
75. Pestel S, Martin H-J, Maier G-M, Guth B. Effect of commonly used vehicles on gastrointestinal, renal, and liver function in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2006 Sep;54(2):200–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16567111>
76. Yuen K-H. The transit of dosage forms through the small intestine. *Int J Pharm.* 2010 Aug 16;395(1–2):9–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20478371>
77. Adkin D, Davis S, Sparrow R, Huckle P, Phillips A, Wilding I. The effects of pharmaceutical excipients on small intestinal transit. *Br J Clin Pharmacol.* 1995 Apr 1;39(4):381–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2125.1995.tb04466.x>
78. Adkin DA, Davis SS, Sparrow RA, Huckle PD, Phillips AJ, Wilding IR. The Effect of Different Concentrations of Mannitol in Solution on Small Intestinal Transit: Implications for Drug Absorption. *Pharm Res.* 1995;12(3):393–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/A:1016256619309>
79. Panakanti R, Narang AS. Impact of Excipient Interactions on Drug Bioavailability from Solid Dosage Forms [Internet]. Cham: Springer International Publishing; Oct. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-20206-8_10
80. Chen M-L, Straughn AB, Sadrieh N, Meyer M, Faustino PJ, Ciavarella AB, et al. A Modern View of Excipient Effects on Bioequivalence: Case Study of Sorbitol. *Pharm Res.* 2006 Dec 5;24(1):73–80. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-006-9120-4>
81. Basit AW, Newton JM, Short MD, Waddington WA, Ell PJ, Lacey LF. The Effect of Polyethylene Glycol 400 on Gastrointestinal Transit: Implications for

- the Formulation of Poorly-Water Soluble Drugs. *Pharm Res.* 2001;18(8):1146–50. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/A:1010927026837>
82. Basit AW, Podczeck F, Newton JM, Waddington WA, Ell PJ, Lacey LF. Influence of Polyethylene Glycol 400 on the Gastrointestinal Absorption of Ranitidine. *Pharm Res.* 2002;19(9):1368–74. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/A:1020315228237>
83. Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. The Theory and practice of industrial pharmacy [Internet]. Lea & Febiger; 1986. 902 p. Available from: https://books.google.de/books/about/The_Theory_and_Practice_of_Industrial_Ph.html?id=p_VsAAAAMAAJ&redir_esc=y
84. Rowe RC, Sheskey PJ, Owen SC, American Pharmacists Association. Handbook of pharmaceutical excipients [Internet]. Pharmaceutical Press; 2006. 918 p. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/101258346>
85. Odeku OA, Akinwande BL. Effect of the mode of incorporation on the disintegrant properties of acid modified water and white yam starches. *Saudi Pharm J.* 2012 Apr 1;20(2):171–5. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319016411000740>
86. Desai PM, Liew CV, Heng PWS. Review of Disintegrants and the Disintegration Phenomena. *J Pharm Sci.* 2016 Sep;105(9):2545–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27506604>
87. Jackson, Young, Pant. Drug-excipient interactions and their affect on absorption. *Pharm Sci Technolo Today.* 2000 Oct 1;3(10):336–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050458>
88. Mohamed MB, Talari MK, Tripathy M, Abdul Majeed AB. PHARMACEUTICAL APPLICATIONS OF CROSPVIDONE: A REVIEW. 2012;
89. Sarisuta N, Lawanprasert P, Puttipipatkachorn S, Srikummoon K. The Influence of Drug-Excipient and Drug-Polymer Interactions on Butt Adhesive Strength of Ranitidine Hydrochloride Film-Coated Tablets. *Drug Dev Ind Pharm.* 2006 Jan

Bibliografia

- 25;32(4):463–71. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16638685>
90. Kathpalia H, Sharma K, Doshi G. Recent trends in Hard Gelatin capsule delivery system. *J Adv Pharm Educ Res.* 2014;4(2):165–77. Available from:
www.japer.in
91. Fuhrman LC, Jr. *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 8th Edition. *Am J Pharm Educ.* 2006;70(3). Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1636965/>
92. Rahman MA, Hussain A, Hussain MS, Mirza MA, Iqbal Z. Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system (SEDDS/SMEDDS). *Drug Dev Ind Pharm.* 2013 Jan 29;39(1):1–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22372916>
93. Cole ET, Cadé D, Benameur H. Challenges and opportunities in the encapsulation of liquid and semi-solid formulations into capsules for oral administration. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Mar 17;60(6):747–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096270>
94. Ling WC. Thermal degradation of gelatin as applied to processing of gel mass. *J Pharm Sci.* 1978 Feb;67(2):218–23. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/621641>
95. Benza HI, Munyendo WLL. A REVIEW OF PROGRESS AND CHALLENGES IN SOFT GELATIN CAPSULES FORMULATIONS FOR ORAL ADMINISTRATION. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 10(1). Available from:
www.globalresearchonline.net
96. D. M. Two-Piece Hard Capsules for Pharmaceutical Formulations. 2013;2013. Available from: <http://www.ivtnetwork.com/article/two-piece-hard-capsules-pharmaceutical-formulations>
97. Balasubramaniam J, Bindu K, Rao VU, Ray D, Haldar R, Brzeczko AW. *Dissolution Technologies.* 2008; Available from:
http://www.dissolutiontech.com/DTresour/200805Articles/DT200805_A03.pdf

98. Bindra DS, Stein D, Pandey P, Barbour N. Incompatibility of croscarmellose sodium with alkaline excipients in a tablet formulation. *Pharm Dev Technol.* 2014 May 26;19(3):285–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23528069>
99. Bühler V. Polyvinylpyrrolidone excipients for pharmaceuticals : povidone, crospovidone, and copovidone. Springer; 2005. 254 p.
100. Patel S, Kaushal AM, Bansal AK. The effect of starch paste and sodium starch glycolate on the compaction behavior of wet granulated acetaminophen formulations. *J Excipients Food Chem.* 2016 Nov 22;2(3):1120. Available from: <https://jefc.scholasticahq.com/article/1120-the-effect-of-starch-paste-and-sodium-starch-glycolate-on-the-compaction-behavior-of-wet-granulated-acetaminophen-formulations>
101. Al-Gousous J, Langguth P. Effect of Calcium Ions on the Disintegration of Enteric-Coated Solid Dosage Forms. *J Pharm Sci.* 2016;105(2):509–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.24700>
102. **PROTOCOL TO CONDUCT EQUILIBRIUM SOLUBILITY EXPERIMENTS FOR THE PURPOSE OF BIOPHARMACEUTICS CLASSIFICATION SYSTEM-BASED CLASSIFICATION OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS FOR BIOWAIVER.**
103. Stegemann S, Leveiller F, Franchi D, de Jong H, Lindén H. When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. *Eur J Pharm Sci.* 2007 Aug;31(5):249–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17616376>
104. Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 44(1):235–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11274893>
105. Rodríguez- hornedo N, Murphy D. Significance of controlling crystallization mechanisms and kinetics in pharmaceutical systems. *J Pharm Sci.* 1999 Jul 1;88(7):651–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002235491550837X>

Bibliografía

106. Box K, Comer J, Gravestock T, Stuart M. New Ideas about the Solubility of Drugs. *Chem Biodivers*. 2009 Nov;6(11):1767–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19937815>
107. Yamashita T, Kokubo T, Zhao C, Ohki Y. Antiprecipitant Screening System for Basic Model Compounds Using Bio-Relevant Media. *J Assoc Lab Autom*. 2010 Aug 1;15(4):306–12. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1016/j.jala.2009.12.001>
108. Yamashita K, Nakate T, Okimoto K, Ohike A, Tokunaga Y, Ibuki R, et al. Establishment of new preparation method for solid dispersion formulation of tacrolimus. *Int J Pharm*. 2003 Nov 28;267(1–2):79–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14602386>
109. Gao P, Rush BD, Pfund WP, Huang T, Bauer JM, Morozowich W, et al. Development of a supersaturable SEDDS (S- SEDDS) formulation of paclitaxel with improved oral bioavailability. *J Pharm Sci*. 2003 Dec 1;92(12):2386–98. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354916313752>
110. Bi M, Kyad A, Kiang Y-H, Alvarez-Nunez F, Alvarez F. Enhancing and Sustaining AMG 009 Dissolution from a Matrix Tablet Via Microenvironmental pH Modulation and Supersaturation. *AAPS PharmSciTech*. 2011 Dec 13;12(4):1157–62. Available from: <http://link.springer.com/10.1208/s12249-011-9679-x>
111. Gao P, Guyton ME, Huang T, Bauer JM, Stefanski KJ, Lu Q. Enhanced Oral Bioavailability of a Poorly Water Soluble Drug PNU- 91325 by Supersaturatable Formulations. *Drug Dev Ind Pharm*. 2004 Jan 3;30(2):221–9. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1081/DDC-120028718>
112. Li S, Pollock-Dove C, Dong LC, Chen J, Creasey AA, Dai W-G. Enhanced Bioavailability of a Poorly Water-Soluble Weakly Basic Compound Using a Combination Approach of Solubilization Agents and Precipitation Inhibitors: A Case Study. *Mol Pharm*. 2012 May 7;9(5):1100–8. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp200352q>

113. Goole J, Lindley DJ, Roth W, Carl SM, Amighi K, Kauffmann J-M, et al. The effects of excipients on transporter mediated absorption. *Int J Pharm.* 2010 Jun 30;393(1–2):17–31. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517310002917>
114. Martin GP, Marriott C, Kellaway IW. Direct effect of bile salts and phospholipids on the physical properties of mucus. *Gut.* 1978 Feb 1;19(2):103–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/631625>
115. Tomita M, Hayashi M, Horie T, Ishizawa T, Awazu S. Enhancement of Colonic Drug Absorption by the Transcellular Permeation Route. *Pharm Res.* 1988;05(12):786–9. Available from:
<http://link.springer.com/10.1023/A:1015992819290>
116. Rege BD, Yu LX, Hussain AS, Polli JE. Effect of Common Excipients on Caco-2 Transport of Low-Permeability Drugs. *J Pharm Sci.* 2001 Nov 1;90(11):1776–86. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916308668>
117. Schulze JDR, Waddington WA, Ell PJ, Parsons GE, Coffin MD, Basit AW. Concentration-Dependent Effects of Polyethylene Glycol 400 on Gastrointestinal Transit and Drug Absorption. *Pharm Res.* 2003 Dec;20(12):1984–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/B:PHAM.0000008046.64409.bd>
118. Takizawa Y, Kishimoto H, Nakagawa M, Sakamoto N, Tobe Y, Furuya T, et al. Effects of pharmaceutical excipients on membrane permeability in rat small intestine. *Int J Pharm.* 2013 Sep 10;453(2):363–70. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.05.055>
119. Larocque G, Arnold AA, Chartrand É, Mouget Y, Marcotte I. Effect of sodium bicarbonate as a pharmaceutical formulation excipient on the interaction of fluvastatin with membrane phospholipids. *Eur Biophys J.* 2010 Nov 27;39(12):1637–47. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00249-010-0622-y>
120. Li Y-H, Zhang M, Wang J-C, Zhang S, Liu J-R, Zhang Q. [Effects of absorption enhancers on intestinal absorption of lumbrokinase]. *Yao Xue Xue Bao.* 2006 Oct;41(10):939–44. Available from:

Bibliografía

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17184110>
121. Peppas NA, Kavimandan NJ. Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: Insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. *Eur J Pharm Sci.* 2006 Nov 1;29(3–4):183–97. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098706001175>
 122. Ferte J. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane. *Eur J Biochem.* 2000 Jan 1;267(2):277–94. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1432-1327.2000.01046.x>
 123. Zhang H, Yao M, Morrison RA, Chong S. Commonly used surfactant, Tween 80, improves absorption of P-glycoprotein substrate, digoxin, in rats. *Arch Pharm Res.* 2003 Sep;26(9):768–72. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF02976689>
 124. Bromberg L, Alakhov V. Effects of polyether-modified poly(acrylic acid) microgels on doxorubicin transport in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers. *J Control Release.* 2003 Feb 14;88(1):11–22. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365902004194>
 125. Dintaman JM, Silverman JA. Inhibition of P-Glycoprotein by D- α -Tocopheryl Polyethylene Glycol 1000 Succinate (TPGS). *Pharm Res.* 1999;16(10):1550–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/A:1015000503629>
 126. Zhao HZ, Tan EC, Yung LYL. Potential use of cholecalciferol polyethylene glycol succinate as a novel pharmaceutical additive. *J Biomed Mater Res Part A.* 2008 Mar 15;84A(4):954–64. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.31402>
 127. Tayrouz Y, Ding R, Burhenne J, Riedel K, Weiss J, Hoppe- Tichy T, et al. Pharmacokinetic and pharmaceutical interaction between digoxin and Cremophor RH40. *Clin Pharmacol Ther.* 2003 May 1;73(5):397–405. Available from: [http://doi.wiley.com/10.1016/S0009-9236\(03\)00059-6](http://doi.wiley.com/10.1016/S0009-9236(03)00059-6)
 128. Batrakova E V., Li S, Li Y, Alakhov VY, Kabanov A V. Effect of Pluronic P85

- on ATPase Activity of Drug Efflux Transporters. *Pharm Res.* 2004 Dec 1;21(12):2226–33. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-004-7675-5>
129. Shen Q, Lin Y, Handa T, Doi M, Sugie M, Wakayama K, et al. Modulation of intestinal P-glycoprotein function by polyethylene glycols and their derivatives by in vitro transport and in situ absorption studies. *Int J Pharm.* 2006 Apr 26;313(1–2):49–56. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517306000652>
130. Arima H, Yunomae K, Morikawa T, Hirayama F, Uekama K. Contribution of Cholesterol and Phospholipids to Inhibitory Effect of Dimethyl- β -Cyclodextrin on Efflux Function of P-Glycoprotein and Multidrug Resistance-Associated Protein 2 in Vinblastine-Resistant Caco-2 Cell Monolayers. *Pharm Res.* 2004 Apr;21(4):625–34. Available from: <http://link.springer.com/10.1023/B:PHAM.0000022409.27896.d4>
131. Arima H, Yunomae K, Hirayama F, Uekama K. Contribution of P-glycoprotein to the Enhancing Effects of Dimethyl- β -cyclodextrin on Oral Bioavailability of Tacrolimus. *J Pharmacol Exp Ther.* 2001;297(2).
132. Yunomae K, Arima H, Hirayama F, Uekama K. Involvement of cholesterol in the inhibitory effect of dimethyl- β -cyclodextrin on P-glycoprotein and MRP2 function in Caco-2 cells. *FEBS Lett.* 2003 Feb 11;536(1–3):225–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/S0014-5793%252803%252900059-0>
133. Nyström C, Alderborn Gör, Duberg M, Karehill P-G. Bonding Surface area and Bonding Mechanism—Two Important Factors for the Understanding of Powder Comparability. *Drug Dev Ind Pharm.* 1993 Jan 20;19(17–18):2143–96. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03639049309047189>
134. Peppas NA, Colombo P. Development of disintegration forces during water penetration in porous pharmaceutical systems. *J Control Release.* 1989 Dec 1;10(3):245–50. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168365989900746>
135. Quodbach J, Kleinebudde P. A critical review on tablet disintegration. *Pharm*

Bibliografía

- Dev Technol. 2015 May 15;21(6):1–12. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25975586>
136. Lowenthal W. Mechanism of Action of Starch as a Tablet Disintegrant V: Effect of Starch Grain Deformation. *J Pharm Sci.* 1972 Mar 1;61(3):455–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915383702>
137. Patel S, Kaushal AM, Bansal AK. Effect of Particle Size and Compression Force on Compaction Behavior and Derived Mathematical Parameters of Compressibility. *Pharm Res.* 2006 Dec 5;24(1):111–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17063396>
138. Schott H. Swelling kinetics of polymers. *J Macromol Sci Part B Phys.* 1992;31(1):1–9. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=lmsb20>
139. Schott H. Kinetics of swelling of polymers and their gels. *J Pharm Sci.* 1992 May 1;81(5):467–70. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354915488203>
140. Szymkiewicz A. Modelling water flow in unsaturated porous media : accounting for nonlinear permeability and material heterogeneity. 237 p.
141. CURLIN LC. A note on tablet disintegration with starch. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim).* 1955 Jan;44(1):16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13233086>
142. Markl D, Zeitler JA. A Review of Disintegration Mechanisms and Measurement Techniques. *Pharm Res.* 2017 May 1;34(5):890–917. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-017-2129-z>
143. GANDERTON D, FRASER DR. Some observations of the penetration and disruption of tablets by water. *J Pharm Pharmacol.* 1970 Dec 1;22(S1):95S-103S. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2042-7158.1970.tb08586.x>
144. Guyot-Hermann AM, Ringard J. Disintegration Mechanisms of Tablets Containing Starches. Hypothesis About the Particle-Particle Repulsive Force.

- Drug Dev Ind Pharm. 1981;7(2):155–77. Available from:
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iddi20>
145. Bi YX, Sunada H, Yonezawa Y, Danjo K. Evaluation of Rapidly Disintegrating Tablets Prepared by a Direct Compression Method. *Drug Dev Ind Pharm.* 1999 Jan 15;25(5):571–81. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10219525>
146. Tye CK, Sun C (Calvin), Amidon GE. Evaluation of the effects of tableting speed on the relationships between compaction pressure, tablet tensile strength, and tablet solid fraction. *J Pharm Sci.* 2005 Mar;94(3):465–72. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15696587>
147. Nogami H, Hasegawa J, Miyamoto M. Studies on Powdered Preparations. XX. Disintegration of the Aspirin Tablets containing Starches as Disintegrating Agent. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1967 Mar 25;15(3):279–89. Available from:
<http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/cpb1958/15.279?from=CrossRef>
148. Adolfsson Å, Nyström C. Tablet strength, porosity, elasticity and solid state structure of tablets compressed at high loads. *Int J Pharm.* 1996 Apr 30;132(1–2):95–106. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378517395043365>
149. Ruegger CE, Çelick M. The Effect of Compression and Decompression Speed on the Mechanical Strength of Compacts. *Pharm Dev Technol.* 2000 Jan 21;5(4):485–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11109248>
150. Wu C-Y, Ruddy OM, Bentham AC, Hancock BC, Best SM, Elliott JA. Modelling the mechanical behaviour of pharmaceutical powders during compaction. *Powder Technol.* 2005 Apr 29;152(1–3):107–17. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591005000288>
151. Sinka IC, Motazedian F, Cocks ACF, Pitt KG. The effect of processing parameters on pharmaceutical tablet properties. *Powder Technol.* 2009 Jan 31;189(2):276–84. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032591008001976>

Bibliografia

152. Lowenthal W. Disintegration of tablets. *J Pharm Sci.* 1972 Nov;61(11):1695–711. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4569113>
153. Berry H, Ridout CW. THE PREPARATION OF COMPRESSED TABLETS: Part III.-A Study of the Value of Potato Starch and Alginic Acid as Disintegrating Agents. *J Pharm Pharmacol.* 1950 Sep 1;2(1):619–29. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.2042-7158.1950.tb12981.x>
154. Koponen A, Kataja M, Timonen J. Permeability and effective porosity of porous media [Internet]. 1997. Available from: <https://journals.aps.org/pre/pdf/10.1103/PhysRevE.56.3319>
155. Berg CF. Permeability Description by Characteristic Length, Tortuosity, Constriction and Porosity. *Transp Porous Media.* 2014 Jul 4;103(3):381–400. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11242-014-0307-6>
156. van Brakel J, Heertjes PM. Analysis of diffusion in macroporous media in terms of a porosity, a tortuosity and a constrictivity factor. *Int J Heat Mass Transf.* 1974 Sep 1;17(9):1093–103. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0017931074901902>
157. Van Brakel J. Pore space models for transport phenomena in porous media review and evaluation with special emphasis on capillary liquid transport. *Powder Technol.* 1975 May 1;11(3):205–36. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0032591075800490>
158. DJEMAI A, SINKA I. NMR imaging of density distributions in tablets. *Int J Pharm.* 2006 Aug 17;319(1–2):55–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16723199>
159. Ellison CD, Ennis BJ, Hamad ML, Lyon RC. Measuring the distribution of density and tableting force in pharmaceutical tablets by chemical imaging. *J Pharm Biomed Anal.* 2008 Sep 10;48(1):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18539424>
160. May RK, Su K, Han L, Zhong S, Elliott JA, Gladden LF, et al. Hardness and Density Distributions of Pharmaceutical Tablets Measured by Terahertz Pulsed

- Imaging. *J Pharm Sci.* 2013 Jul;102(7):2179–86. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23609052>
161. Zhao N, Augsburger LL. The influence of swelling capacity of superdisintegrants in different pH media on the dissolution of hydrochlorothiazide from directly compressed tablets. *AAPS PharmSciTech.* 2005 Sep 20;6(1):E120-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16353956>
162. Anwar S, Fell JT, Dickinson PA. An investigation of the disintegration of tablets in biorelevant media. *Int J Pharm.* 2005 Feb 16;290(1–2):121–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15664137>
163. ABBOTT DD, PACKMAN EW, REES EW, HARRISSON JW. A preliminary report of the effect of gastric mucous upon tablet disintegration. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim).* 1959 Jan;48(1):19–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13610723>
164. Cooper BF, Brecht EA. Surfactants in Tablets to Improve Disintegration**School of Pharmacy, University of North Carolina, Chapel Hill. *J Am Pharm Assoc (Scientific ed).* 1957 Sep;46(9):520–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0095955315343456>
165. Kabiri K, Omidian H, Hashemi SA, Zohuriaan-Mehr MJ. Synthesis of fast-swelling superabsorbent hydrogels: effect of crosslinker type and concentration on porosity and absorption rate. *Eur Polym J.* 2003 Jul 1;39(7):1341–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305702003919>
166. Omidian H, Rocca JG, Park K. Advances in superporous hydrogels. *J Control Release.* 2005 Jan 20;102(1):3–12. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365904004729>
167. Omidian H, Park K, Rocca JG. Recent developments in superporous hydrogels. *J Pharm Pharmacol.* 2007 Mar;59(3):317–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17331335>
168. Zarmi P, Flanagan T, Meehan E, Mann J, Fotaki N. Biopharmaceutical aspects and implications of excipient variability in drug product performance. *Eur J*

Bibliografia

- Pharm Biopharm. 2017 Feb 1;111:1–15. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0939641116305604>
169. Leane M, Pitt K, Reynolds G, Manufacturing Classification System (MCS) Working Group. A proposal for a drug product Manufacturing Classification System (MCS) for oral solid dosage forms. *Pharm Dev Technol.* 2015 Jan 2;20(1):12–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25162770>
170. Wlosnewski JC, Kumpugdee-Vollrath M, Sriamornsak P. Effect of drying technique and disintegrant on physical properties and drug release behavior of microcrystalline cellulose-based pellets prepared by extrusion/spheronization. *Chem Eng Res Des.* 2010 Jan 1;88(1):100–8. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0263876209001701>
171. Dokoumetzidis A, Macheras P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *Int J Pharm.* 2006 Sep 14;321(1–2):1–11. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517306005813>
172. Radwan A, Wagner M, Amidon GL, Langguth P. Bio-predictive tablet disintegration: Effect of water diffusivity, fluid flow, food composition and test conditions. *Eur J Pharm Sci.* 2014;57(1):273–9. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2013.08.038>
173. Cammarn SR, Sakr A. Predicting dissolution via hydrodynamics: salicylic acid tablets in flow through cell dissolution. *Int J Pharm.* 2000 May 25;201(2):199–209. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10878326>
174. Switzerland. Pharmacopoea Helvetica. Bern 1934 [Internet]. Available from:
https://www.abebooks.com/servlet/BookDetailsPL?bi=1392290252&searchurl=t+n%253Dpharmacopoea%252Bhelvetica%2526sortby%253D17&cm_sp=snippet-_-srp4-_-title1
175. Maney P V., Kuever RA. Enteric coating**Presented to the Scientific Section, A. PH. A., Detroit meeting, 1941. *J Am Pharm Assoc (Scientific ed).* 1941 Oct 1;30(10):276–82. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0095955315303863>

176. Sperandio GJ, Evanson RV, Dekay HG. The Disintegration of Compressed Tablets*. J Am Pharm Assoc (Scientific ed). 1948 Feb 1;37(2):71–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0095955315312907>
177. Gershberg S, Stoll FD. Apparatus, for Tablet Disintegration, and for Shaking-Out Extractions. *. J Am Pharm Assoc (Scientific ed). 1946 Sep 1;35(9):284–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0095955315310799>
178. EUROPEAN PHARMACOPOEIA 5.0 2.9.1. Disintegration of tablets and capsules [Internet]. Available from: <http://uspbpep.com/ep50/2.9.1.disintegration.of.tablets.and.capsules.pdf>
179. Disintegration. In: United States Pharmacopoeia [Internet]. 2008. Available from: https://www.uspnf.com/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/generalChapter701.pdf
180. Supplement I to the Japanese Pharmacopoeia Fourteenth Edition [Internet]. Available from: <http://jpdb.nihs.go.jp/kyokuhou/JP14e-1.pdf>
181. Kindgen S, Wachtel H, Abrahamsson B, Langguth P. Computational Fluid Dynamics Simulation of Hydrodynamics and Stresses in the PhEur/USP Disintegration Tester under Fed and Fasted Fluid Characteristics. J Pharm Sci. 2015;104(9):2956–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jps.24511>
182. Kindgen S, Rach R, Nawroth T, Abrahamsson B, Langguth P. A Novel Disintegration Tester for Solid Dosage Forms Enabling Adjustable Hydrodynamics. J Pharm Sci. 2016;105(8):2402–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.xphs.2016.05.028>
183. Fda, Cder, Yeaton, Ayse. Dissolution Testing and Acceptance Criteria for Immediate-Release Solid Oral Dosage Form Drug Products Containing High Solubility Drug Substances Guidance for Industry [Internet]. 2018. Available from: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>
184. Noyes AA, Whitney WR. THE RATE OF SOLUTION OF SOLID

Bibliografia

- SUBSTANCES IN THEIR OWN SOLUTIONS. *J Am Chem Soc.* 1897 Dec;19(12):930–4. Available from:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja02086a003>
185. Flanner H, Moore JW. Mathematical comparison of curves with an emphasis on dissolution profiles | □□□□□□ □□□. 1996; Available from:
https://www.researchgate.net/publication/251253993_Mathematical_comparison_of_curves_with_an_emphasis_on_dissolution_profiles
186. Shah VP, Tsong Y, Sathe P, Liu JP. In vitro dissolution profile comparison--statistics and analysis of the similarity factor, f_2 . *Pharm Res.* 1998 Jun;15(6):889–96. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9647355>
187. Kostewicz ES, Abrahamsson B, Brewster M, Brouwers J, Butler J, Carlert S, et al. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms. *Eur J Pharm Sci.* 2014 Jun 16;57:342–66. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23988843>
188. Dressman JB (Jennifer B., Krämer J. *Pharmaceutical dissolution testing.* Taylor & Francis; 2005. 429 p.
189. SCHILLER C, FROHLICH C-P, GIESSMANN T, SIEGMUND W, MONNIKES H, HOSTEN N, et al. Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005 Nov 15;22(10):971–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16268972>
190. Mudie DM, Murray K, Hoad CL, Pritchard SE, Garnett MC, Amidon GL, et al. Quantification of Gastrointestinal Liquid Volumes and Distribution Following a 240 mL Dose of Water in the Fasted State. *Mol Pharm.* 2014 Sep 2;11(9):3039–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25115349>
191. Hamlin WE, Northam JI, Wagner JG. Relationship Between In Vitro Dissolution Rates and Solubilities of Numerous Compounds Representative of Various Chemical Species. *J Pharm Sci.* 1965 Nov 1;54(11):1651–3. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915351662>

192. Wagner C, Jantratid E, Kesisoglou F, Vertzoni M, Reppas C, B. Dressman J. Predicting the oral absorption of a poorly soluble, poorly permeable weak base using biorelevant dissolution and transfer model tests coupled with a physiologically based pharmacokinetic model. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012 Sep;82(1):127–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22652546>
193. Markopoulos C, Andreas CJ, Vertzoni M, Dressman J, Reppas C. In-vitro simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: Choosing the appropriate test media. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015 Jun;93:173–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25836053>
194. Vardakou M, Mercuri A, Barker SA, Craig DQM, Faulks RM, Wickham MSJ. Achieving antral grinding forces in biorelevant in vitro models: comparing the USP dissolution apparatus II and the dynamic gastric model with human in vivo data. *AAPS PharmSciTech.* 2011 Jun;12(2):620–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21557037>
195. Garbacz G, Golke B, Wedemeyer R-S, Axell M, Söderlind E, Abrahamsson B, et al. Comparison of dissolution profiles obtained from nifedipine extended release once a day products using different dissolution test apparatuses. *Eur J Pharm Sci.* 2009 Sep 10;38(2):147–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19591927>
196. Gu C-HHC, Rao D, Gandhi RB, Hilden JJ o. n., Raghavan K. Using a novel multicompartement dissolution system to predict the effect of gastric pH on the oral absorption of weak bases with poor intrinsic solubility. *J Pharm Sci.* 2005 Jan;94(1):199–208. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761943>
197. Mercuri A, Passalacqua A, Wickham MSJ, Faulks RM, Craig DQM, Barker SA. The Effect of Composition and Gastric Conditions on the Self-Emulsification Process of Ibuprofen-Loaded Self-Emulsifying Drug Delivery Systems: A Microscopic and Dynamic Gastric Model Study. *Pharm Res.* 2011 Jul 24;28(7):1540–51. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11095-011-0387-8>

Bibliografia

198. Blanquet-Diot S, Denis S, Chalancon S, Chaira F, Cardot J-M, Alric M. Use of Artificial Digestive Systems to Investigate the Biopharmaceutical Factors Influencing the Survival of Probiotic Yeast During Gastrointestinal Transit in Humans. *Pharm Res.* 2012 Jun 9;29(6):1444–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22068280>
199. Brouwers J, Anneveld B, Goudappel G-J, Duchateau G, Annaert P, Augustijns P, et al. Food-dependent disintegration of immediate release fosamprenavir tablets: In vitro evaluation using magnetic resonance imaging and a dynamic gastrointestinal system. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011 Feb;77(2):313–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21055466>
200. Vardakou M, Mercuri A, Naylor TA, Rizzo D, Butler JM, Connolly PC, et al. Predicting the human in vivo performance of different oral capsule shell types using a novel in vitro dynamic gastric model. *Int J Pharm.* 2011 Oct 31;419(1–2):192–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21843611>
201. Castela-Papin N, Cai S, Vatier J, Keller F, Souleau CH, Farinotti R. Drug interactions with diosmectite: a study using the artificial stomach-duodenum model. *Int J Pharm.* 1999 May 10;182(1):111–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10332080>
202. Tenjarla S, Romasanta V, Zeijdner E, Villa R, Moro L. Release of 5-aminosalicylate from an MMX mesalamine tablet during transit through a simulated gastrointestinal tract system. *Adv Ther.* 24(4):826–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17901032>
203. Souliman S, Blanquet S, Beyssac E, Cardot J-M. A level A in vitro/in vivo correlation in fasted and fed states using different methods: Applied to solid immediate release oral dosage form. *Eur J Pharm Sci.* 2006 Jan;27(1):72–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16169713>
204. Blanquet S, Marol-Bonnin S, Beyssac E, Pompon D, Renaud M, Alric M. The ‘biodrug’ concept: an innovative approach to therapy. *Trends Biotechnol.* 2001 Oct;19(10):393–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11587764>

205. Lobell M, Hendrix M, Hinzen B, Keldenich J, Meier H, Schmeck C, et al. In Silico ADMET Traffic Lights as a Tool for the Prioritization of HTS Hits. *ChemMedChem*. 2006 Nov 13;1(11):1229–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16991174>
206. Di L, Kerns EH, Carter GT. Drug-like property concepts in pharmaceutical design. *Curr Pharm Des*. 2009;15(19):2184–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19601822>
207. Dressman JB, Reppas C. In vitro-in vivo correlations for lipophilic, poorly water-soluble drugs. *Eur J Pharm Sci*. 2000 Oct;11 Suppl 2:S73-80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11033429>
208. Higashino H, Hasegawa T, Yamamoto M, Matsui R, Masaoka Y, Kataoka M, et al. In vitro-in vivo correlation of the effect of supersaturation on the intestinal absorption of BCS class 2 drugs. *Mol Pharm*. 2014 Mar 3;11(3):746–54. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp400465p>
209. Bevernage J, Brouwers J, Annaert P, Augustijns P. Drug precipitation–permeation interplay: Supersaturation in an absorptive environment. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012 Oct;82(2):424–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22841881>
210. Psachoulias D, Vertzoni M, Goumas K, Kalioras V, Beato S, Butler J, et al. Precipitation in and Supersaturation of Contents of the Upper Small Intestine After Administration of Two Weak Bases to Fasted Adults. *Pharm Res*. 2011 Dec 15;28(12):3145–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21674262>
211. Hsieh Y-L, Ilevbare GA, Van Eerdenbrugh B, Box KJ, Sanchez-Felix MV, Taylor LS. pH-Induced precipitation behavior of weakly basic compounds: determination of extent and duration of supersaturation using potentiometric titration and correlation to solid state properties. *Pharm Res*. 2012 Oct 12;29(10):2738–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580905>
212. Llinàs A, Goodman JM. Polymorph control: past, present and future. *Drug*

Bibliografía

- Discov Today. 2008 Mar;13(5–6):198–210. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18342795>
213. Dai W-G. In vitro methods to assess drug precipitation. *Int J Pharm.* 2010 Jun 30;393(1–2):1–16. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20347943>
214. Paulekuhn GS, Dressman JB, Saal C. Trends in Active Pharmaceutical Ingredient Salt Selection based on Analysis of the Orange Book Database. *J Med Chem.* 2007 Dec;50(26):6665–72. Available from:
<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm701032y>
215. Buckley ST, Frank KJ, Fricker G, Brandl M. Biopharmaceutical classification of poorly soluble drugs with respect to “enabling formulations.” *Eur J Pharm Sci.* 2013 Sep 27;50(1):8–16. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583787>
216. Bevernage J, Brouwers J, Brewster ME, Augustijns P. Evaluation of gastrointestinal drug supersaturation and precipitation: Strategies and issues. *Int J Pharm.* 2013 Aug 30;453(1):25–35. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378517312010332>
217. Augustijns P, Brewster ME. Supersaturating Drug Delivery Systems: Fast is Not Necessarily Good Enough. *J Pharm Sci.* 2012 Jan;101(1):7–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953470>
218. Kalepu S, Nekkanti V. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. *Acta Pharm Sin B.* 2015 Sep;5(5):442–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26579474>
219. Kawakami K. Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturatable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 May 1;64(6):480–95. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22265844>
220. Brewster ME, Vandecruys R, Peeters J, Neeskens P, Verreck G, Loftsson T.

- Comparative interaction of 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin and sulfobutylether- β -cyclodextrin with itraconazole: Phase-solubility behavior and stabilization of supersaturated drug solutions. *Eur J Pharm Sci.* 2008 Jul 3;34(2–3):94–103.
Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18420390>
221. Gao P, Shi Y. Characterization of supersaturatable formulations for improved absorption of poorly soluble drugs. *AAPS J.* 2012 Dec;14(4):703–13. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3475868&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
222. Mitra A, Fadda HM. Effect of Surfactants, Gastric Emptying, and Dosage Form on Supersaturation of Dipyridamole in an *in Vitro* Model Simulating the Stomach and Duodenum. *Mol Pharm.* 2014 Aug 4;11(8):2835–44. Available from:
<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp500196f>
223. Jakubiak P, Wagner B, Grimm HP, Petrig-Schaffland J, Schuler F, Alvarez-Sánchez R. Development of a Unified Dissolution and Precipitation Model and Its Use for the Prediction of Oral Drug Absorption. *Mol Pharm.* 2016 Feb 5;13(2):586–98. Available from:
<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00808>
224. Rubbens J, Brouwers J, Tack J, Augustijns P. Gastrointestinal dissolution, supersaturation and precipitation of the weak base indinavir in healthy volunteers. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016 Dec;109:122–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27693678>
225. Hens B, Brouwers J, Corsetti M, Augustijns P. Supersaturation and Precipitation of Posaconazole Upon Entry in the Upper Small Intestine in Humans. *J Pharm Sci.* 2016 Sep;105(9):2677–84. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26505884>
226. Hens B, Corsetti M, Brouwers J, Augustijns P. Gastrointestinal and Systemic Monitoring of Posaconazole in Humans After Fasted and Fed State Administration of a Solid Dispersion. *J Pharm Sci.* 2016 Sep;105(9):2904–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27178739>

Bibliografia

227. Kourentas A, Vertzoni M, Symillides M, Goumas K, Gibbon R, Butler J, et al. Effectiveness of supersaturation promoting excipients on albendazole concentrations in upper gastrointestinal lumen of fasted healthy adults. *Eur J Pharm Sci.* 2016 Aug 25;91:11–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27185297>
228. Bevernage J, Hens B, Brouwers J, Tack J, Annaert P, Augustijns P. Supersaturation in human gastric fluids. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012 May;81(1):184–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641112000380>
229. Griffin BT, Kuentz M, Vertzoni M, Kostewicz ES, Fei Y, Faisal W, et al. Comparison of in vitro tests at various levels of complexity for the prediction of in vivo performance of lipid-based formulations: Case studies with fenofibrate. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014 Apr;86(3):427–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24184675>
230. Babinszky L, Van Der Meer JM, Boer H, Den Hartog LA. An in-vitro method for prediction of the digestible crude protein content in pig feeds. *J Sci Food Agric.* 1990;50(2):173–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.2740500205>
231. Englyst HN, Kingman SM, Hudson GJ, Cummings JH. Measurement of resistant starch in vitro and in vivo. *Br J Nutr.* 1996 May;75(5):749–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8695601>
232. Garrett DA, Failla ML, Sarama RJ. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *J Agric Food Chem.* 1999 Oct;47(10):4301–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10552806>
233. Oomen AG, Rompelberg CJM, Bruil MA, Dobbe CJG, Pereboom DPKH, Sips AJAM. Development of an In Vitro Digestion Model for Estimating the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Arch Environ Contam Toxicol.* 2003 Apr 1;44(3):281–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12712286>
234. Chen J, Gaikwad V, Holmes M, Murray B, Povey M, Wang Y, et al.

- Development of a simple model device for *in vitro* gastric digestion investigation. *Food Funct.* 2011 Apr;2(3–4):174. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21779576>
235. Miller DD, Schricker BR, Rasmussen RR, Van Campen D. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr.* 1981 Oct 1;34(10):2248–56. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6794346>
236. Hoebler C, Lecannu G, Belleville C, Devaux M-F, Popineau Y, Barry J-L. Development of an *in vitro* system simulating bucco-gastric digestion to assess the physical and chemical changes of food. *Int J Food Sci Nutr.* 2002 Jan 6;53(5):389–402. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12396464>
237. Kong F, Singh RP. A Human Gastric Simulator (HGS) to Study Food Digestion in Human Stomach. *J Food Sci.* 2010 Nov;75(9):E627–35. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21535598>
238. Fiolka T, Dressman J. Development, current applications and future roles of biorelevant two-stage *in vitro* testing in drug development. *J Pharm Pharmacol.* 2018 Mar;70(3):335–48. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29380369>
239. Cohen JL, Hubert BB, Leeson LJ, Rhodes CT, Robinson JR, Roseman TJ, et al. The development of USP dissolution and drug release standards. *Pharm Res.* 1990 Oct;7(10):983–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2281043>
240. Dissolution Methods. Available from:
<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/>
241. Vandecruys R, Peeters J, Verreck G, Brewster ME. Use of a screening method to determine excipients which optimize the extent and stability of supersaturated drug solutions and application of this system to solid formulation design. *Int J Pharm.* 2007 Sep 5;342(1–2):168–75. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17573214>

Bibliografia

242. Brewster ME, Vandecruys R, Verreck G, Peeters J. Supersaturating drug delivery systems: effect of hydrophilic cyclodextrins and other excipients on the formation and stabilization of supersaturated drug solutions. *Pharmazie*. 2008 Mar;63(3):217–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18444510>
243. Yamashita T, Ozaki S, Kushida I. Solvent shift method for anti-precipitant screening of poorly soluble drugs using biorelevant medium and dimethyl sulfoxide. *Int J Pharm*. 2011 Oct 31;419(1–2):170–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21840385>
244. Carlet S, Pålsson A, Hanisch G, von Corswant C, Nilsson C, Lindfors L, et al. Predicting Intestinal Precipitation—A Case Example for a Basic BCS Class II Drug. *Pharm Res*. 2010 Oct 18;27(10):2119–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20717839>
245. DiNunzio JC, Miller DA, Yang W, McGinity JW, Williams RO. Amorphous Compositions Using Concentration Enhancing Polymers for Improved Bioavailability of Itraconazole. *Mol Pharm*. 2008 Dec 27;5(6):968–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19434851>
246. Klein S, Buchanan NL, Buchanan CM. Miniaturized transfer models to predict the precipitation of poorly soluble weak bases upon entry into the small intestine. *AAPS PharmSciTech*. 2012 Dec;13(4):1230–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22968547>
247. Kuentz M. Analytical technologies for real-time drug dissolution and precipitation testing on a small scale. *J Pharm Pharmacol*. 2015 Feb;67(2):143–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24834963>
248. Klein S, Shah VP. A standardized mini paddle apparatus as an alternative to the standard paddle. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(4):1179–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19034672>
249. Klein S. The Mini Paddle Apparatus—a Useful Tool in the Early Developmental Stage? Experiences with Immediate-Release Dosage Forms. 2006; Available from:

- http://www.dissolutiontech.com/DTresour/200611Articles/DT200611_A01.pdf
250. Alsenz J, Meister E v. a., Haenel E. Development of a partially automated solubility screening (PASS) assay for early drug development. *J Pharm Sci.* 2007 Jul;96(7):1748–62. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17238197>
251. Overhoff KA, Moreno A, Miller DA, Johnston KP, Williams RO. Solid dispersions of itraconazole and enteric polymers made by ultra-rapid freezing. *Int J Pharm.* 2007 May 4;336(1):122–32. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17184938>
252. Chandran S, Gesenberg C, Levons J, Hubert M, Raghavan K. A high-throughput spectrophotometric approach for evaluation of precipitation resistance. *J Pharm Biomed Anal.* 2011 Dec 5;56(4):698–704. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816556>
253. Palmelund H, Madsen CM, Plum J, Müllertz A, Rades T. Studying the Propensity of Compounds to Supersaturate: A Practical and Broadly Applicable Approach. *J Pharm Sci.* 2016 Oct;105(10):3021–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27488902>
254. Tsinman K, Avdeef A, Tsinman O, Voloboy D. Powder Dissolution Method for Estimating Rotating Disk Intrinsic Dissolution Rates of Low Solubility Drugs. *Pharm Res.* 2009 Sep 19;26(9):2093–100. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19543816>
255. Avdeef A, Tsinman K, Tsinman O, Sun N, Voloboy D. Miniaturization of Powder Dissolution Measurement and Estimation of Particle Size. *Chem Biodivers.* 2009 Nov;6(11):1796–811. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19937817>
256. Plum J, Madsen CM, Teleki A, Bevernage J, da Costa Mathews C, Karlsson EM, et al. Investigation of the Intra- and Interlaboratory Reproducibility of a Small Scale Standardized Supersaturation and Precipitation Method. *Mol Pharm.* 2017 Dec 4;14(12):4161–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29043811>

Bibliografija

257. Petruševska M, Urleb U, Peternel L. Evaluation of a High-Throughput Screening Method for the Detection of the Excipient-Mediated Precipitation Inhibition of Poorly Soluble Drugs. *Assay Drug Dev Technol.* 2013 Mar;11(2):117–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23116459>
258. Petruševska M, Urleb U, Peternel L. Evaluation of the light scattering and the turbidity microtiter plate-based methods for the detection of the excipient-mediated drug precipitation inhibition. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013 Nov;85(3):1148–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24056092>
259. Christfort JF, Plum J, Madsen CM, Nielsen LH, Sandau M, Andersen K, et al. Development of a Video-Microscopic Tool To Evaluate the Precipitation Kinetics of Poorly Water Soluble Drugs: A Case Study with Tadalafil and HPMC. *Mol Pharm.* 2017 Dec 4;14(12):4154–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28763224>
260. Box KJ, Comer J, Taylor R, Karki S, Ruiz R, Price R, et al. Small-Scale Assays for Studying Dissolution of Pharmaceutical Cocrystals for Oral Administration. *AAPS PharmSciTech.* 2016 Apr 25;17(2):245–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26208438>
261. Gravestock T, Box K, Comer J, Frake E, Judge S, Ruiz R. The “GI dissolution” method: a low volume, in vitro apparatus for assessing the dissolution/precipitation behaviour of an active pharmaceutical ingredient under biorelevant conditions. *Anal Methods.* 2011;3(3):560. Available from: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0ay00434k>
262. Mathias NR, Xu Y, Patel D, Grass M, Caldwell B, Jager C, et al. Assessing the Risk of pH-Dependent Absorption for New Molecular Entities: A Novel *in Vitro* Dissolution Test, Physicochemical Analysis, and Risk Assessment Strategy. *Mol Pharm.* 2013 Nov 4;10(11):4063–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24032349>
263. Kondo N, Iwao T, Hirai K-I, Fukuda M, Yamanouchi K, Yokoyama K, et al. Improved Oral Absorption of Enteric Coprecipitates of a Poorly Soluble Drug. *J*

- Pharm Sci. 1994 Apr 1;83(4):566–70. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915494377>
264. Kostewicz ES, Wunderlich M, Brauns U, Becker R, Bock T, Dressman JB. Predicting the precipitation of poorly soluble weak bases upon entry in the small intestine. 2004;43–51.
265. Ruff A, Berlin M. A simple “dumping method” for evaluating in vitro supersaturation and precipitation behaviour of poorly soluble weak bases using the transfer model, in: Poster presentation at the 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition. 2015.
266. Hansmann S, Miyaji Y, Dressman J. An in silico approach to determine challenges in the bioavailability of ciprofloxacin, a poorly soluble weak base with borderline solubility and permeability characteristics. Eur J Pharm Biopharm. 2018 Jan;122:186–96. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29111469>
267. Kambayashi A, Yasuji T, Dressman JB. Prediction of the precipitation profiles of weak base drugs in the small intestine using a simplified transfer (“dumping”) model coupled with in silico modeling and simulation approach. Eur J Pharm Biopharm. 2016 Jun;103:95–103. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27012902>
268. Ruff A, Fiolka T, Kostewicz ES. Prediction of Ketoconazole absorption using an updated in vitro transfer model coupled to physiologically based pharmacokinetic modelling. Eur J Pharm Sci. 2017 Mar 30;100:42–55. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28011125>
269. Mann J, Dressman J, Rosenblatt K, Ashworth L, Muenster U, Frank K, et al. Validation of Dissolution Testing with Biorelevant Media: An OrBiTo Study. Mol Pharm. 2017 Dec 4;14(12):4192–201. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28737403>
270. Kambayashi A, Dressman JB. An in vitro–in silico–in vivo approach to predicting the oral pharmacokinetic profile of salts of weak acids: Case example dantrolene. Eur J Pharm Biopharm. 2013 May;84(1):200–7. Available from:

Bibliografía

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23262163>
271. Vialpando M, Smulders S, Bone S, Jager C, Vodak D, Van Speybroeck M, et al. Evaluation of Three Amorphous Drug Delivery Technologies to Improve the Oral Absorption of Flubendazole. *J Pharm Sci*. 2016 Sep;105(9):2782–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27113473>
272. Frank KJ, Locher K, Zecevic DE, Fleth J, Wagner KG. In vivo predictive mini-scale dissolution for weak bases: Advantages of pH-shift in combination with an absorptive compartment. *Eur J Pharm Sci*. 2014 Sep 30;61(1):32–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24413061>
273. Locher K, Borghardt JM, Frank KJ, Kloft C, Wagner KG. Evolution of a mini-scale biphasic dissolution model: Impact of model parameters on partitioning of dissolved API and modelling of in vivo-relevant kinetics. *Eur J Pharm Biopharm*. 2016 Aug;105:166–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27297570>
274. Kong F, Oztop MH, Singh RP, McCarthy MJ. Physical Changes in White and Brown Rice during Simulated Gastric Digestion. *J Food Sci*. 2011 Aug;76(6):E450–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22417496>
275. Yvon M, Beucher S, Scanff P, Thirouin S, Pelissier JP. In vitro simulation of gastric digestion of milk proteins: comparison between in vitro and in vivo data. *J Agric Food Chem*. 1992 Feb;40(2):239–44. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf00014a014>
276. Vatieer J, Célice-Pingaud C, Farinotti R. Interests of the ‘artificial stomach’ techniques to study antacid formulations: Comparison with in vivo evaluation. *Fundam Clin Pharmacol*. 1998 Nov 12;12(6):573–83. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-8206.1998.tb00989.x>
277. Mainville I, Arcand Y, Farnworth ER. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int J Food Microbiol*. 2005 Apr 1;99(3):287–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15808363>

278. Fuchs A, Leigh M, Kloefer B, Dressman JB. Advances in the design of fasted state simulating intestinal fluids: FaSSIF-V3. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015 Aug;94:229–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26032292>
279. Jantratid E, Janssen N, Reppas C, Dressman JB. Dissolution Media Simulating Conditions in the Proximal Human Gastrointestinal Tract: An Update. *Pharm Res.* 2008 Jul 11;25(7):1663–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404251>
280. Fei Y, Kostewicz ES, Sheu M-T, Dressman JB. Analysis of the enhanced oral bioavailability of fenofibrate lipid formulations in fasted humans using an in vitro–in silico–in vivo approach. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013 Nov;85(3):1274–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23500116>
281. Steingoetter A, Fox M, Treier R, Weishaupt D, Marincek B, Boesiger P, et al. Effects of posture on the physiology of gastric emptying: A magnetic resonance imaging study. *Scand J Gastroenterol.* 2006 Jan 8;41(10):1155–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16990200>
282. Marciani L, Cox EF, Hoad CL, Pritchard S, Totman JJ, Foley S, et al. Postprandial Changes in Small Bowel Water Content in Healthy Subjects and Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology.* 2010 Feb;138(2):469-477.e1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19909743>
283. Psachoulias D, Vertzoni M, Butler J, Busby D, Symillides M, Dressman J, et al. An In Vitro Methodology for Forecasting Luminal Concentrations and Precipitation of Highly Permeable Lipophilic Weak Bases in the Fasted Upper Small Intestine. *Pharm Res.* 2012 Dec 14;29(12):3486–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22890986>
284. Kourentas A, Vertzoni M, Stavrinouidakis N, Symillidis A, Brouwers J, Augustijns P, et al. An in vitro biorelevant gastrointestinal transfer (BioGIT) system for forecasting concentrations in the fasted upper small intestine: Design, implementation, and evaluation. *Eur J Pharm Sci.* 2016 Jan 20;82:106–14.

Bibliografía

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26594026>
285. Berlin M, Przyklenk K-H, Richtberg A, Baumann W, Dressman JB. Prediction of oral absorption of cinnarizine – A highly supersaturating poorly soluble weak base with borderline permeability. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014 Nov;88(3):795–806. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25195981>
286. Arnold YE, Imanidis G, Kuentz MT. Advancing in-vitro drug precipitation testing: new process monitoring tools and a kinetic nucleation and growth model. *J Pharm Pharmacol.* 2011 Mar;63(3):333–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21749380>
287. Carino SR, Sperry DC, Hawley M. Relative Bioavailability of Three Different Solid Forms of PNU-141659 as Determined with the Artificial Stomach-Duodenum Model. *J Pharm Sci.* 2010 Sep;99(9):3923–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20564336>
288. Carino SR, Sperry DC, Hawley M. Relative bioavailability estimation of carbamazepine crystal forms using an artificial stomach-duodenum model. *J Pharm Sci.* 2006 Jan;95(1):116–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16315223>
289. Ding X, Gueorguieva I, Wesley JA, Burns LJ, Coutant CA. Assessment of In Vivo Clinical Product Performance of a Weak Basic Drug by Integration of In Vitro Dissolution Tests and Physiologically Based Absorption Modeling. *AAPS J.* 2015 Nov;17(6):1395–406. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26126932>
290. Bhattachar SN, Perkins EJ, Tan JS, Burns LJ. Effect of gastric pH on the pharmacokinetics of a bcs class II compound in dogs: Utilization of an artificial stomach and duodenum dissolution model and gastroplus,TM simulations to predict absorption. *J Pharm Sci.* 2011 Nov;100(11):4756–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21681753>
291. Takeuchi S, Tsume Y, Amidon GE, Amidon GL. Evaluation of a Three Compartment In Vitro Gastrointestinal Simulator Dissolution Apparatus to Predict In Vivo Dissolution. *J Pharm Sci.* 2014 Nov;103(11):3416–22. Available

- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25251982>
292. Matsui K, Tsume Y, Amidon GE, Amidon GL. *In Vitro* Dissolution of Fluconazole and Dipyridamole in Gastrointestinal Simulator (GIS), Predicting *in Vivo* Dissolution and Drug–Drug Interaction Caused by Acid-Reducing Agents. *Mol Pharm*. 2015 Jul 6;12(7):2418–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25985298>
293. Alsenz J, Haenel E, Anedda A, Du Castel P, Cirelli G. Miniaturized INtrinsic DISSolution Screening (MINDISS) assay for preformulation. *Eur J Pharm Sci*. 2016 May 25;87:3–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26360839>
294. Havenaar R. A multicompartamental dynamic computer-controlled model simulating the stomach and small intestine. *ATLA Altern Lab Anim*. Altern to Lab Anim ATLA. Available from: http://www.academia.edu/19356813/A_multicompartamental_dynamic_computer-controlled_model_simulating_the_stomach_and_small_intestine._ATLA_Altern_Lab_Anim
295. Blanquet-Diot S, Soufi M, Rambeau M, Rock E, Alric M. Digestive Stability of Xanthophylls Exceeds That of Carotenes As Studied in a Dynamic *in Vitro* Gastrointestinal System. *J Nutr*. 2009 May 1;139(5):876–83. Available from: <https://academic.oup.com/jn/article/139/5/876/4670363>
296. Martin AH, de Jong GAH. Enhancing the *in vitro* Fe(2+) bio-accessibility using ascorbate and cold-set whey protein gel particles. *Dairy Sci Technol*. 2012 Mar;92(2):133–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22662291>
297. Krul CAM, Zeilmaker MJ, Schothorst RC, Havenaar R. Intra-gastric formation and modulation of N-nitrosodimethylamine in a dynamic *in vitro* gastrointestinal model under human physiological conditions. *Food Chem Toxicol*. 2004 Jan;42(1):51–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14630130>
298. Torres-Escribano S, Denis S, Blanquet-Diot S, Calatayud M, Barrios L, Vélez D,

Bibliografía

- et al. Comparison of a static and a dynamic *in vitro* model to estimate the bioaccessibility of As, Cd, Pb and Hg from food reference materials Fucus sp. (IAEA-140/TM) and Lobster hepatopancreas (TORT-2). *Sci Total Environ.* 2011 Jan 1;409(3):604–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21109290>
299. Dickinson PA, Abu Rmaileh R, Ashworth L, Barker RA, Burke WM, Patterson CM, et al. An Investigation into the Utility of a Multi-compartmental, Dynamic, System of the Upper Gastrointestinal Tract to Support Formulation Development and Establish Bioequivalence of Poorly Soluble Drugs. *AAPS J.* 2012 Jun 29;14(2):196–205. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22374384>
300. Kheadr E, Zihler A, Dabour N, Lacroix C, Le Blay G, Fliss I. Study of the physicochemical and biological stability of pediocin PA-1 in the upper gastrointestinal tract conditions using a dynamic *in vitro* model. *J Appl Microbiol.* 2010 Jan;109(1):54–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20059619>
301. Tsinman K, Tsinman O. Dissolution permeability Apparatus with Integrated In Situ Concentration Monitoring of both Donor and Receiver Compartments. *AAPS Annual Meeting 2013*; poster No. W5300.
302. Zhu AZX, Ho M-CD, Gemski CK, Chuang B-C, Liao M, Xia CQ. Utilizing In Vitro Dissolution-Permeation Chamber for the Quantitative Prediction of pH-Dependent Drug-Drug Interactions with Acid-Reducing Agents: a Comparison with Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling. *AAPS J.* 2016 Nov 6;18(6):1512–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27600136>
303. Sironi D, Christensen M, Rosenberg J, Bauer-Brandl A, Brandl M. Evaluation of a dynamic dissolution/permeation model: Mutual influence of dissolution and barrier-flux under non-steady state conditions. *Int J Pharm.* 2017 Apr 30;522(1–2):50–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28263834>
304. di Cagno M, Bibi HA, Bauer-Brandl A. New biomimetic barrier Permeapad™

- for efficient investigation of passive permeability of drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2015 Jun 20;73:29–34. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25840123>
305. Bibi HA, Di Cagno M, Holm R, Bauer-Brandl A. Permeapad TM for investigation of passive drug permeability: The effect of surfactants, co-solvents and simulated intestinal fluids (FaSSIF and FeSSIF). 2015; Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.07.028>
306. Ginski MJ, Taneja R, Polli JE. Prediction of dissolution-absorption relationships from a continuous dissolution/Caco-2 system. *AAPS PharmSci.* 1999;1(2):E3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11741200>
307. Kobayashi M, Sada N, Sugawara M, Iseki K, Miyazaki K. Development of a new system for prediction of drug absorption that takes into account drug dissolution and pH change in the gastro-intestinal tract. *Int J Pharm.* 2001 Jun 19;221(1–2):87–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11397570>
308. Sugawara M, Kadomura S, He X, Takekuma Y, Kohri N, Miyazaki K. The use of an in vitro dissolution and absorption system to evaluate oral absorption of two weak bases in pH-independent controlled-release formulations. *Eur J Pharm Sci.* 2005 Sep;26(1):1–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15961297>
309. Kohri N, Yamayoshi Y, Xin H, Iseki K, Sato N, Todo S, et al. Improving the oral bioavailability of albendazole in rabbits by the solid dispersion technique. *J Pharm Pharmacol.* 1999 Feb;51(2):159–64. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10217314>
310. Kataoka M, Masaoka Y, Yamazaki Y, Sakane T, Sezaki H, Yamashita S. In Vitro System to Evaluate Oral Absorption of Poorly Water-Soluble Drugs: Simultaneous Analysis on Dissolution and Permeation of Drugs. *Pharm Res.* 2003;20(10):1674–80. Available from:
<http://link.springer.com/10.1023/A:1026107906191>
311. Kataoka M, Sugano K, da Costa Mathews C, Wong JW, Jones KL, Masaoka Y, et al. Application of Dissolution/Permeation System for Evaluation of

Bibliografia

- Formulation Effect on Oral Absorption of Poorly Water-Soluble Drugs in Drug Development. *Pharm Res.* 2012 Jun 2;29(6):1485–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22134778>
312. Takano R, Kataoka M, Yamashita S. Integrating drug permeability with dissolution profile to develop IVIVC. *Biopharm Drug Dispos.* 2012 Oct;33(7):354–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22581486>
313. Dimopoulou M, Mourouti C-S, Vertzoni M, Symillides M, Reppas C. In-vitro evaluation of performance of solid immediate release dosage forms of weak bases in upper gastrointestinal lumen: experience with miconazole and clopidogrel salts. *J Pharm Pharmacol.* 2016 May;68(5):579–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25828405>
314. Kourentas A, Vertzoni M, Khadra I, Symillides M, Clark H, Halbert G, et al. Evaluation of the Impact of Excipients and an Albendazole Salt on Albendazole Concentrations in Upper Small Intestine Using an In Vitro Biorelevant Gastrointestinal Transfer (BioGIT) System. *J Pharm Sci.* 2016 Sep;105(9):2896–903. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27372549>
315. Kourentas A, Vertzoni M, Symillides M, Hens B, Brouwers J, Augustijns P, et al. In vitro evaluation of the impact of gastrointestinal transfer on luminal performance of commercially available products of posaconazole and itraconazole using BioGIT. *Int J Pharm.* 2016 Dec 30;515(1–2):352–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27732895>
316. Hens B, Brouwers J, Anneveld B, Corsetti M, Symillides M, Vertzoni M, et al. Gastrointestinal transfer: In vivo evaluation and implementation in in vitro and in silico predictive tools. *Eur J Pharm Sci.* 2014 Oct 15;63:233–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25064697>
317. Kourentas A, Vertzoni M, Bampatsalou V, Augustijns P, Beato S, Butler J, et al. The BioGIT System: a Valuable In Vitro Tool to Assess the Impact of Dose and Formulation on Early Exposure to Low Solubility Drugs After Oral Administration. *AAPS J.* 2018 Jul 24;20(4):71. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29797293>
318. Gu C, Rao D, Gandhi RB, Hilden J o. n., Raghavan K. Using a Novel Multicompartment Dissolution System to Predict the Effect of Gastric pH on the Oral Absorption of Weak Bases with Poor Intrinsic Solubility. *J Pharm Sci.* 2005 Jan;94(1):199–208. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761943>
319. Mitra A, Fadda HM. Effect of surfactants, gastric emptying, and dosage form on supersaturation of dipyridamole in an in vitro model simulating the stomach and duodenum. *Mol Pharm.* 2014 Aug 4;11(8):2835–44. Available from:
<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp500196f>
320. Selen A. Exploring Suitability and Feasibility of a Novel In Vitro Dissolution System. AAPS Annual Meeting 2008; poster No. R6313.
321. Selen A. Exploring Sensitivity and Robustness of FloVitro_ Technology a Novel in vitro Dissolution System. AAPS Annual Meeting 2010; poster No. T3047.
322. Selen A. Application of FloVitro™ Technology to Evaluate Dissolution of Furosemide and Danazol in Simulated Media at Fed and Fasted Conditions. AAPS Annual Meeting 2011; poster No. W5274 [Internet]. Available from:
<https://pergamos.lib.uoa.gr/uoalibrary/default/data/2765404/theFile>
323. Motz SA, Schaefer UF, Balbach S, Eichinger T, Lehr C-M. Permeability assessment for solid oral drug formulations based on Caco-2 monolayer in combination with a flow through dissolution cell. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007 May;66(2):286–95. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17156983>
324. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology.* 1989 Mar;96(3):736–49. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2914637>
325. Yamashita S, Tanaka Y, Endoh Y, Taki Y, Sakane T, Nadai T, et al. Analysis of drug permeation across Caco-2 monolayer: implication for predicting in vivo

Bibliografia

- drug absorption. *Pharm Res.* 1997 Apr;14(4):486–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9144736>
326. Sun H, Chow EC, Liu S, Du Y, Pang KS. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008 Apr 23;4(4):395–411. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18433344>
327. Thu Hoa N, Kinget R. Design and Evaluation of Two-Phase Partition–Dissolution Method and Its Use in Evaluating Artemisinin Tablets. *J Pharm Sci.* 1996 Oct;85(10):1060–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8897271>
328. Grundy JS, Anderson KE, Rogers JA, Foster RT. Studies on dissolution testing of the nifedipine gastrointestinal therapeutic system. II. Improved in vitro-in vivo correlation using a two-phase dissolution test. *J Control Release.* 1997 Sep;48(1):9–17. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168365997016386>
329. Gabriëls M, Plaizier-Vercammen J. Design of a dissolution system for the evaluation of the release rate characteristics of artemether and dihydroartemisinin from tablets. *Int J Pharm.* 2004 Apr 15;274(1–2):245–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15072800>
330. Vangani S, Li X, Zhou P, Del-Barrio M-A, Chiu R, Cauchon N, et al. Dissolution of poorly water-soluble drugs in biphasic media using USP 4 and fiber optic system. *Clin Res Regul Aff.* 2009 Jun;26(1–2):8–19. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10601330902905887>
331. Shi Y, Gao P, Gong Y, Ping H. Application of a Biphasic Test for Characterization of In Vitro Drug Release of Immediate Release Formulations of Celecoxib and Its Relevance to In Vivo Absorption. *Mol Pharm.* 2010 Oct 4;7(5):1458–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20704265>
332. Tsume Y, Igawa N, Drelich AJ, Amidon GE, Amidon GL. The Combination of GIS and Biphasic to Better Predict In Vivo Dissolution of BCS Class IIb Drugs, Ketoconazole and Raloxifene. *J Pharm Sci.* 2018 Jan;107(1):307–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28919384>

333. Hate SS, Reutzel-Edens SM, Taylor LS. Absorptive Dissolution Testing of Supersaturating Systems: Impact of Absorptive Sink Conditions on Solution Phase Behavior and Mass Transport. *Mol Pharm*. 2017 Nov 6;14(11):4052–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28985676>
334. Berben P, Brouwers J, Augustijns P. Assessment of Passive Intestinal Permeability Using an Artificial Membrane Insert System. *J Pharm Sci*. 2018 Jan;107(1):250–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28826878>
335. Déat E, Blanquet-Diot S, Jarrige J-F, Denis S, Beyssac E, Alric M. Combining the Dynamic TNO-Gastrointestinal Tract System with a Caco-2 Cell Culture Model: Application to the Assessment of Lycopene and α -Tocopherol Bioavailability from a Whole Food. *J Agric Food Chem*. 2009 Dec 9;57(23):11314–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19899761>
336. Larsson M, Minekus M, Havenaar R. Estimation of the Bioavailability of Iron and Phosphorus in Cereals using a Dynamic In Vitro Gastrointestinal Model. *J Sci Food Agric*. 1997 May 1;74(1):99–106. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/%2528SICI%25291097-0010%2528199705%252974%253A1%253C99%253A%253AAID-JSFA775%253E3.0.CO%253B2-G>
337. Verwei M, Freidig AP, Havenaar R, Groten JP. Predicted Serum Folate Concentrations Based on In Vitro Studies and Kinetic Modeling are Consistent with Measured Folate Concentrations in Humans. *J Nutr*. 2006 Dec 1;136(12):3074–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17116722>
338. Krul C, Luiten-Schuite A, Baandagter R, Verhagen H, Mohn G, Feron V, et al. Application of a dynamic in vitro gastrointestinal tract model to study the availability of food mutagens, using heterocyclic aromatic amines as model compounds. *Food Chem Toxicol*. 2000 Sep;38(9):783–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10930699>

Bibliografía

339. Lila MA, Ribnicky DM, Rojo LE, Rojas-Silva P, Oren A, Havenaar R, et al. Complementary Approaches To Gauge the Bioavailability and Distribution of Ingested Berry Polyphenolics. *J Agric Food Chem*. 2012 Jun 13;60(23):5763–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22111523>
340. Medicines Agency E. Guideline on the qualification and reporting of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modelling and simulation [Internet]. 2016. Available from: www.ema.europa.eu/contact
341. Green, Dionna. Physiologically Based Pharmacokinetic Analyses — Format and Content Guidance for Industry [Internet]. 2018. Available from: <https://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>
342. Margolskee A, Darwich AS, Pepin X, Aarons L, Galetin A, Rostami-Hodjegan A, et al. IMI – Oral biopharmaceutics tools project – Evaluation of bottom-up PBPK prediction success part 2: An introduction to the simulation exercise and overview of results. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Jan 1;96:610–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27816631>
343. Hens B, Pathak SM, Mitra A, Patel N, Liu B, Patel S, et al. *In Silico* Modeling Approach for the Evaluation of Gastrointestinal Dissolution, Supersaturation, and Precipitation of Posaconazole. *Mol Pharm*. 2017 Dec 4;14(12):4321–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28817288>
344. Ruff A, Holm R, Kostewicz ES. Evaluating the predictability of the in vitro transfer model and in vivo rat studies as a surrogate to investigate the supersaturation and precipitation behaviour of different Albendazole formulations for humans. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Jul 15;105:108–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28473227>
345. Sjögren E, Thörn H, Tannergren C. In Silico Modeling of Gastrointestinal Drug Absorption: Predictive Performance of Three Physiologically Based Absorption Models. *Mol Pharm*. 2016 Jun 6;13(6):1763–78. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.5b00861>
346. Hansmann S, Darwich A, Margolskee A, Aarons L, Dressman J. Forecasting oral

- absorption across biopharmaceutics classification system classes with physiologically based pharmacokinetic models. *J Pharm Pharmacol.* 2016 Dec;68(12):1501–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27781273>
347. Siegel JA, Urbain JL, Adler LP, Charkes ND, Maurer AH, Krevsky B, et al. Biphasic nature of gastric emptying. *Gut.* 1988 Jan;29(1):85–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3343018>
348. Payne AN, Zihler A, Chassard C, Lacroix C. Advances and perspectives in in vitro human gut fermentation modeling. *Trends Biotechnol.* 2012 Jan;30(1):17–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21764163>
349. Molly K, Vande Woestyne M, Verstraete W. Development of a 5-step multi-chamber reactor as a simulation of the human intestinal microbial ecosystem. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1993 May;39(2):254–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00228615>
350. Marzorati M, Verhelst A, Luta G, Sinnott R, Verstraete W, de Wiele T Van, et al. In vitro modulation of the human gastrointestinal microbial community by plant-derived polysaccharide-rich dietary supplements. *Int J Food Microbiol.* 2010 May 15;139(3):168–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20362351>
351. Meullenet J-F, Gandhapuneni RK. Development of the BITE Master II and its application to the study of cheese hardness. *Physiol Behav.* 2006 Aug 30;89(1):39–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16797617>
352. Salles C, Tarrega A, Mielle P, Maratray J, Gorria P, Liaboeuf J, et al. Development of a chewing simulator for food breakdown and the analysis of in vitro flavor compound release in a mouth environment. *J Food Eng.* 2007 Sep;82(2):189–98. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877407000891>
353. Anson NM, Selinheimo E, Havenaar R, Aura A-M, Mattila I, Lehtinen P, et al. Bioprocessing of Wheat Bran Improves in vitro Bioaccessibility and Colonic Metabolism of Phenolic Compounds. *J Agric Food Chem.* 2009 Jul

Bibliografia

- 22;57(14):6148–55. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19537710>
354. Fässler C, Arrigoni E, Venema K, Brouns F, Amadò R. In vitro fermentability of differently digested resistant starch preparations. *Mol Nutr Food Res*. 2006 Dec;50(12):1220–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17103375>
355. Maathuis AJH, van den Heuvel EG, Schoterman MHC, Venema K. Galacto-Oligosaccharides Have Prebiotic Activity in a Dynamic In Vitro Colon Model Using a 13C-Labeling Technique. *J Nutr*. 2012 Jul 1;142(7):1205–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22623395>
356. Maccaferri S, Klinder A, Cacciatore S, Chitarrari R, Honda H, Luchinat C, et al. In vitro fermentation of potential prebiotic flours from natural sources: Impact on the human colonic microbiota and metabolome. *Mol Nutr Food Res*. 2012 Aug;56(8):1342–52. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753180>
357. Payne AN, Chassard C, Banz Y, Lacroix C. The composition and metabolic activity of child gut microbiota demonstrate differential adaptation to varied nutrient loads in an in vitro model of colonic fermentation. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012 Jun 1;80(3):608–23. Available from:
<https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2012.01330.x>
358. Hawcutt DB, Smyth RL. Drug development for children: how is pharma tackling an unmet need? *IDrugs*. 2008 Jul;11(7):502–7. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18600597>
359. Vermeiren J, den Abbeele P, Laukens D, Vigsnaes LK, Vos M, Boon N, et al. Decreased colonization of fecal *Clostridium coccoides*/*Eubacterium rectale* species from ulcerative colitis patients in an in vitro dynamic gut model with mucin environment. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012 Mar;79(3):685–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22092917>
360. Van de Wiele TR, Oomen AG, Wragg J, Cave M, Minekus M, Hack A, et al.

- Comparison of five in vitro digestion models to in vivo experimental results: Lead bioaccessibility in the human gastrointestinal tract. *J Environ Sci Heal Part A*. 2007 Jul 18;42(9):1203–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17654140>
361. Kader A, Islam S. In vitro-In vivo correlations as a surrogate for bioequivalence testing : the current state of play. 2011;6:176–90.
362. Hayes S, Dunne A, Smart T, Davis J. Interpretation and Optimization of the Dissolution Specifications for a Modified Release Product with an In Vivo–In Vitro Correlation (IVIVC). *J Pharm Sci*. 2004 Mar;93(3):571–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14762896>
363. United States Pharmacopeial Convention. USP-NF. [Internet]. United States Pharmacopeial Convention; 2005. Available from: <https://es.scribd.com/document/351753204/USP-35-NF-30-EN-ESPANOL-VOLUMEN-3-pdf>
364. Emami J. In vitro - in vivo correlation: from theory to applications. *J Pharm Pharm Sci*. 2006;9(2):169–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16959187>
365. Guidance for Industry Extended Release Oral Dosage Forms: Development, Evaluation, and Application of In Vitro/In Vivo Correlations [Internet]. Vol. 20857. Tel; 1997. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
366. González-García I, Mangas-Sanjuán V, Merino-Sanjuán M, Álvarez-Álvarez C, Díaz-Garzón Marco J, Rodrí-Guez-Bonnín MA, et al. IVIVC approach based on carbamazepine bioequivalence studies combination. *Pharmazie*. 2017;
367. González-García I, Mangas-Sanjuán V, Merino-Sanjuán M, Bermejo M. *In vitro–in vivo* correlations: general concepts, methodologies and regulatory applications. *Drug Dev Ind Pharm*. 2015 Dec 2;41(12):1935–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26133085>
368. Wagner JG, Nelson E. Kinetic Analysis of Blood Levels and Urinary Excretion in the Absorptive Phase after Single Doses of Drug. *J Pharm Sci*. 1964

Bibliografía

- Nov;53(11):1392–403. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915346475>
369. Loo JCK, Riegelman S. New Method for Calculating the Intrinsic Absorption Rate of Drugs. *J Pharm Sci.* 1968 Jun;57(6):918–28. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5671338>
370. Kim J-S, Mitchell S, Kijek P, Tsume Y, Hilfinger J, Amidon GL. The Suitability of an in Situ Perfusion Model for Permeability Determinations: Utility for BCS Class I Biowaiver Requests. *Mol Pharm.* 2006 Dec;3(6):686–94. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17140256>
371. Cabrera MA. Métodos QSAR en el desarrollo de medicamentos: Aplicaciones Biofarmacéuticas. Valencia. 2012;26–8. Available from:
<https://www.uv.es/uvweb/farmacia/es/facultad-farmacia/metodos-qsar-desarrollo-medicamentos-aplicaciones-biofarmaceuticas-1285849056598/Esdeveniment.html?id=1285867253108>
372. Gad SC. Preclinical development handbook Toxicology. Wiley-Interscience; 2008. 1059 p.
373. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *J Med Chem.* 1998 Mar 26;41(7):1007–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9544199>
374. Sugano K, Nabuchi Y, Machida M, Aso Y. Prediction of human intestinal permeability using artificial membrane permeability. *Int J Pharm.* 2003 May 12;257(1–2):245–51. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12711179>
375. Bermejo M, Avdeef A, Ruiz A, Nalda R, Ruell JA, Tsinman O, et al. PAMPA—a drug absorption in vitro model. *Eur J Pharm Sci.* 2004 Mar;21(4):429–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14998573>
376. Delie F, Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2

- model. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1997;14(3):221–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9282267>
377. Artursson P. Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1991;8(4):305–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1769065>
378. Hillgren KM, Kato A, Borchardt RT. In vitro systems for studying intestinal drug absorption. *Med Res Rev.* 1995 Mar;15(2):83–109. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7537838>
379. Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1977 Feb;58(2):209–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/833871>
380. Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie.* 1986 Sep;68(9):1035–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3096381>
381. Zweibaum A, Laburthe M, Grasset E, Louvard D. Use of Cultured Cell Lines in Studies of Intestinal Cell Differentiation and Function. In: *Comprehensive Physiology.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2011. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.cp060407>
382. Prueksaritanont T, Gorham LM, Hochman JH, Tran LO, Vyas KP. Comparative studies of drug-metabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines, and in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos.* 1996 Jun;24(6):634–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8781778>
383. Mehran M, Levy E, Bendayan M, Seidman E. Lipid, apolipoprotein, and lipoprotein synthesis and secretion during cellular differentiation in Caco-2 cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1997 Feb;33(2):118–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9081219>
384. Van Beers EH, Al RH, Rings EH, Einerhand AW, Dekker J, Büller HA. Lactase and sucrase-isomaltase gene expression during Caco-2 cell differentiation.

Bibliografía

- Biochem J. 1995 Jun 15;308 (Pt 3)(Pt 3):769–75. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8948431>
385. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Mar 1;46(1–3):27–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11259831>
386. Stewart BH, Chan OH, Lu RH, Reyner EL, Schmid HL, Hamilton HW, et al. Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models: relationship to absorption in humans. *Pharm Res.* 1995 May;12(5):693–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7479555>
387. USSING HH, ZERAHN K. Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short-circuited Isolated Frog Skin. *Acta Physiol Scand.* 1951 Oct 25;23(2–3):110–27. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14868510>
388. Rozehnal V, Nakai D, Hoepner U, Fischer T, Kamiyama E, Takahashi M, et al. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. *Eur J Pharm Sci.* 2012 Aug 15;46(5):367–73. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22418036>
389. Sjöberg Å, Lutz M, Tannergren C, Wingolf C, Borde A, Ungell A-L. Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. *Eur J Pharm Sci.* 2013 Jan 23;48(1–2):166–80. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103351>
390. Díez-Sampedro A, Pérez M, Cobo MT, Martínez JA, Barber A. Effect of different beta-adrenergic agonists on the intestinal absorption of galactose and phenylalanine. *J Pharm Pharmacol.* 1998 Aug;50(8):907–11. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751456>
391. Stewart BH, Amidon GL, Brabec RK. Uptake of prodrugs by rat intestinal mucosal cells: Mechanism and pharmaceutical implications. *Pharm Sci.* Available from:

- https://www.researchgate.net/publication/19366960_Uptake_of_prodrugs_by_rat_intestinal_mucosal_cells_Mechanism_and_pharmaceutical_implications
392. Fagerholm U, Johansson M, Lennernäs H. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. *Pharm Res.* 1996 Sep;13(9):1336–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8893271>
 393. Dahan A, Amidon GL. Segmental Dependent Transport of Low Permeability Compounds along the Small Intestine Due to P-Glycoprotein: The Role of Efflux Transport in the Oral Absorption of BCS Class III Drugs. *Mol Pharm.* 2009 Feb 2;6(1):19–28. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/mp800088f>
 394. Dahan A, Miller JM, Amidon GL. Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. *AAPS J.* 2009 Dec;11(4):740–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19876745>
 395. Doluisio JT, Billups NF, Dittert LW, Sugita ET, Swintosky J V. Drug absorption. I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J Pharm Sci.* 1969 Oct;58(10):1196–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5394662>
 396. Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Peraire i Guitart C. Tratado general de biofarmacia y farmacocinética [Internet]. Síntesis; 2013. Available from: <https://www.sintesis.com/farmacia-32/tratado-general-de-biofarmacia-y-farmacocinetica-volumen-i-libro-1751.html>
 397. González Álvarez I, Cabrera Pérez MÁ, Bermejo Sanz M del V. Metodolías Biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos. In.
 398. Gschwind H-P, Glaenzel U, Waldmeier F, Wirz B, Sabia HD, Picard F, et al. Metabolism and disposition of the oral absorption enhancer ¹⁴C-radiolabeled 8-(N-2-hydroxy-5-chlorobenzoyl)-amino-caprylic acid (5-CNAC) in healthy postmenopausal women and supplementary investigations in vitro. *Eur J Pharm Sci.* 2012 Aug 30;47(1):44–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22579664>

Bibliografía

399. Winiwarter S, Bonham NM, Ax F, Hallberg A, Lennernäs H, Karlén A. Correlation of Human Jejunal Permeability (in Vivo) of Drugs with Experimentally and Theoretically Derived Parameters. A Multivariate Data Analysis Approach. *J Med Chem*. 1998 Dec 3;41(25):4939–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9836611>
400. Igel S, Drescher S, M??rdter T, Hofmann U, Heinkele G, Tegude H, et al. Increased Absorption of Digoxin from the Human Jejunum Due to Inhibition of Intestinal Transporter-Mediated Efflux. *Clin Pharmacokinet*. 2007;46(9):777–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17713975>
401. Lennernaäs H. Human Intestinal Permeability. *J Pharm Sci*. 1998 Apr;87(4):403–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9548891>
402. Dahlgren D, Roos C, Sjögren E, Lennernäs H. Direct In Vivo Human Intestinal Permeability (Peff) Determined with Different Clinical Perfusion and Intubation Methods. *J Pharm Sci*. 2015 Sep;104(9):2702–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25410736>
403. Lennernäs H, Knutson L, Knutson T, Hussain A, Lesko L, Salmonson T, et al. The effect of amiloride on the in vivo effective permeability of amoxicillin in human jejunum: experience from a regional perfusion technique. *Eur J Pharm Sci*. 2002 Apr;15(3):271–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923059>
404. Ewp. Committee for medical products for human use (CHMP) guideline on the investigation of bioequivalence discussion in the joint efficacy and quality working group adoption Rev.1 [Internet]. 1997. Available from: <http://www.ema.europa.eu>
405. Midha KK, Shah VP, Amidon G, Barends D, Dressman J, Hubbard J, et al. MULTISOURCE (GENERIC) PHARMACEUTICAL PRODUCTS: GUIDELINES ON REGISTRATION REQUIREMENTS TO ESTABLISH INTERCHANGEABILITY DRAFT REVISION The World Health Organization acknowledges with the thanks the input of the following FIP/WHO BCS Task Force members [Internet]. 2005. Available from:

- https://www.who.int/medicines/services/expertcommittees/pharmprep/QAS04_093Rev4_final.pdf
406. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed.* 2010 Sep;99(3):306–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20176408>
407. Valles J, Artigas R, Crea A, Muller F, Paredes I, Zapata A, et al. Clinical pharmacokinetics of parenteral dexketoprofen trometamol in healthy subjects. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2006 Jun;28 Suppl A:7–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16801987>
408. Stangier J, Su C, Roth W. Pharmacokinetics of Orally and Intravenously Administered Telmisartan in Healthy Young and Elderly Volunteers and in Hypertensive Patients. *J Int Med Res.* 2000 Aug 25;28(4):149–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11014323>
409. Humbert H, Cabiac MD, Bosshardt H. In vitro-in vivo correlation of a modified-release oral form of ketotifen: in vitro dissolution rate specification. *J Pharm Sci.* 1994 Feb;83(2):131–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915493657>
410. Tuğcu-Demiröz F, Gonzalez-Alvarez I, Gonzalez-Alvarez M, Bermejo M. Validation of phenol red versus gravimetric method for water reabsorption correction and study of gender differences in Doluisio's absorption technique. *Eur J Pharm Sci.* 2014 Oct 1;62:105–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24887261>
411. AEMPS. FICHA TÉCNICA LIPEMOL [Internet]. Available from: http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/62376/FT_62376.pdf
412. Flanagan T. Potential for pharmaceutical excipients to impact absorption: A mechanistic review for BCS Class 1 and 3 drugs. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019;141(March):130–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.05.020>

Bibliografía

413. Bermejo M, Kuminek G, Al-Gousous J, Ruiz-Picazo A, Tsume Y, Garcia-Arieta A, et al. Exploring Bioequivalence of Dexketoprofen Trometamol Drug Products with the Gastrointestinal Simulator (GIS) and Precipitation Pathways Analyses. *Pharmaceutics*. 2019 Mar 15;11(3):122. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30884755>
414. Hou HH, Jia W, Liu L, Cheeti S, Li J, Nauka E, et al. Effect of Microenvironmental pH Modulation on the Dissolution Rate and Oral Absorption of the Salt of a Weak Acid – Case Study of GDC-0810. *Pharm Res*. 2018 Feb;35(2):37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29380076>
415. Tran PH-L, Tran TT-D, Lee K-H, Kim D-J, Lee B-J. Dissolution-modulating mechanism of pH modifiers in solid dispersion containing weakly acidic or basic drugs with poor water solubility. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010 May 7;7(5):647–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20205605>
416. Badawy SIF, Hussain MA. Microenvironmental pH Modulation in Solid Dosage Forms. *J Pharm Sci*. 2007 May;96(5):948–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17455349>
417. Indulkar AS, Gao Y, Raina SA, Zhang GGZ, Taylor LS. Crystallization from Supersaturated Solutions: Role of Lecithin and Composite Simulated Intestinal Fluid. *Pharm Res*. 2018 Aug 18;35(8):158. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29916053>
418. Indulkar AS, Mo H, Gao Y, Raina SA, Zhang GGZ, Taylor LS. Impact of Micellar Surfactant on Supersaturation and Insight into Solubilization Mechanisms in Supersaturated Solutions of Atazanavir. *Pharm Res*. 2017 Jun 28;34(6):1276–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28352994>
419. Bevernage J, Brouwers J, Clarysse S, Vertzoni M, Tack J, Annaert P, et al. Drug Supersaturation in Simulated Human Intestinal Fluids Representing Different Nutritional States. *J Pharm Sci*. 2010 Nov;99(11):4525–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20845451>
420. Nickerson B, Kong A, Gerst P, Kao S. Correlation of dissolution and

- disintegration results for an immediate-release tablet. *J Pharm Biomed Anal.* 2018 Feb 20;150:333–40. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29287259>
421. Al-Gousous J, Langguth P. Oral Solid Dosage Form Disintegration Testing - The Forgotten Test. *J Pharm Sci.* 2015;104(9):2664–75.
422. Hampshire VA, Gilbert SH. Refinement, Reduction, and Replacement (3R) Strategies in Preclinical Testing of Medical Devices. *Toxicol Pathol.* 2019 Apr;47(3):329–38. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30270765>
423. Bert B, Dörendahl A, Leich N, Vietze J, Steinfath M, Chmielewska J, et al. Rethinking 3R strategies: Digging deeper into AnimalTestInfo promotes transparency in in vivo biomedical research. Macleod M, editor. *PLOS Biol.* 2017 Dec 14;15(12):e2003217. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29240762>
424. Schiffelers M-J, Blaauboer BJ, Hendriksen CFM, Bakker WE. Regulatory acceptance and use of 3R models: a multilevel perspective. *ALTEX.* 2012;29(3):287–300. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22847256>
425. Kiss L, Walter FR, Bocsik A, Veszelka S, Ózsvári B, Puskás LG, et al. Kinetic Analysis of the Toxicity of Pharmaceutical Excipients Cremophor EL and RH40 on Endothelial and Epithelial Cells. *J Pharm Sci.* 2013 Apr;102(4):1173–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23362123>
426. Anderberg EK, Nyström C, Artursson P. Epithelial Transport of Drugs in Cell Culture. VII: Effects of Pharmaceutical Surfactant Excipients and Bile Acids on Transepithelial Permeability in Monolayers of Human Intestinal Epithelial (Caco- 2) Cells. *J Pharm Sci.* 1992 Sep;81(9):879–87. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1432633>
427. Lennernäs H. Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination. *Xenobiotica.* 2007 Nov 29;37(10–11):1015–51. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17968735>

Bibliografía

428. Lennernäs H. Regional intestinal drug permeation: Biopharmaceutics and drug development. *Eur J Pharm Sci.* 2014 Jun 16;57:333–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23988845>
429. Fairstein M, Swissa R, Dahan A. Regional-Dependent Intestinal Permeability and BCS Classification: Elucidation of pH-Related Complexity in Rats Using Pseudoephedrine. *AAPS J.* 2013 Apr 26;15(2):589–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23440549>
430. Dahlgren D, Roos C, Lundqvist A, Abrahamsson B, Tannergren C, Hellström PM, et al. Regional Intestinal Permeability of Three Model Drugs in Human. *Mol Pharm.* 2016 Sep 6;13(9):3013–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27504798>
431. Lozoya-Agullo I, González-Álvarez I, González-Álvarez M, Merino-Sanjuán M, Bermejo M. In Situ Perfusion Model in Rat Colon for Drug Absorption Studies: Comparison with Small Intestine and Caco-2 Cell Model. *J Pharm Sci.* 2015 Sep;104(9):3136–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25891783>
432. Neuhoff S, Yeo KR, Barter Z, Jamei M, Turner DB, Rostami-Hodjegan A. Application of permeability-limited physiologically-based pharmacokinetic models: Part I—digoxin pharmacokinetics incorporating P-glycoprotein-mediated efflux. *J Pharm Sci.* 2013 Sep;102(9):3145–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354915309448>
433. Gandia P, Lacombe O, Woodley J, Houin G. The Perfused Everted Intestinal Segment of Rat. *Arzneimittelforschung.* 2011 Dec 25;54(08):467–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15460214>
434. Yao H-M, Chiou WL. The complexity of intestinal absorption and exsorption of digoxin in rats. *Int J Pharm.* 2006 Sep 28;322(1–2):79–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16781832>
435. Suzuki M, Komura H, Yoshikawa T, Enya S, Nagao A, Takubo H, et al. Characterization of gastrointestinal absorption of digoxin involving influx and efflux transporter in rats: application of *mdr1a* knockout (–/–) rats into

- absorption study of multiple transporter substrate. *Xenobiotica*. 2014 Nov 19;44(11):1039–45. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24839994>
436. Nielsen CU, Abdulhussein AA, Colak D, Holm R. Polysorbate 20 increases oral absorption of digoxin in wild-type Sprague Dawley rats, but not in *mdr1a*(-/-) Sprague Dawley rats. *Int J Pharm*. 2016 Nov 20;513(1–2):78–87. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27601334>
437. Oda K, Murakami T. Pharmacokinetic interaction of green tea beverage containing cyclodextrins and high concentration catechins with P-glycoprotein substrates in LLC-GA5-COL150 cells in vitro and in the small intestine of rats in vivo. *J Pharm Pharmacol*. 2017 Dec;69(12):1736–44. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28980319>
438. Tamaki A, Ierano C, Szakacs G, Robey RW, Bates SE. The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. *Essays Biochem*. 2011 Sep 7;50(1):209–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21967059>
439. Dahan A, Lennernäs H, Amidon GL. The Fraction Dose Absorbed, in Humans, and High Jejunal Human Permeability Relationship. *Mol Pharm*. 2012 Jun 4;9(6):1847–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22524707>
440. Ruiz-Picazo A, Lozoya-Agullo I, Ortiz-Azcarate M, Merino-Sanjuán M, González-Álvarez M, González-Álvarez I, et al. Comparison of segmental-dependent permeability in human and in situ perfusion model in rat. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Sep 30;107:191–6. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28687530>
441. Dahlgren D. Biopharmaceutical aspects of intestinal drug absorption: Regional permeability and absorption-modifying excipients [Internet]. 2018. Available from: <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1247511/FULLTEXT01.pdf>
442. Pangeni R, Jha SK, Maharjan R, Choi JU, Chang K-Y, Choi YK, et al. Intestinal transport mechanism and in vivo anticancer efficacy of a solid oral formulation incorporating an ion-pairing complex of pemetrexed with deoxycholic acid derivative. *Int J Nanomedicine*. 2019 Aug;Volume 14:6339–56. Available from:

Bibliografía

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31496690>
443. Artursson P. Epithelial Transport Of Drugs In Cell Culture. I: A Model For Studying The Passive Diffusion Of Drugs Over Intestinal Absorbive (Caco-2) Cells. *J Pharm Sci.* 1990 Jun;79(6):476–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1975619>
444. Mimura Y, Yasujima T, Ohta K, Inoue K, Yuasa H. Functional Identification of Plasma Membrane Monoamine Transporter (PMAT/SLC29A4) as an Atenolol Transporter Sensitive to Flavonoids Contained in Apple Juice. *J Pharm Sci.* 2017 Sep;106(9):2592–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354917300126>
445. Mimura Y, Yasujima T, Ohta K, Inoue K, Yuasa H. Functional identification of organic cation transporter 1 as an atenolol transporter sensitive to flavonoids. *Biochem Biophys reports.* 2015 Jul;2:166–71. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405580815000369>
446. Cañete-Ramírez C, Cabañas-Poy M. Terapéutica farmacológica en pediatría: aspectos generales. In: *Farmacia Pediátrica Hospitalaria*. 2011. Available from: https://gruposedetrabajo.sefh.es/gefp/images/stories/documentos/LIBRO_FARMACIA_PEDIATRICA/LIBRO_FARMACIA.pdf
447. Gandhi S V., Rodriguez W, Khan M, Polli JE. Considerations for a Pediatric Biopharmaceutics Classification System (BCS): Application to Five Drugs. *AAPS PharmSciTech.* 2014 Jun 21;15(3):601–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24557773>
448. DelMoral-Sanchez J-M, Gonzalez-Alvarez I, Gonzalez-Alvarez, Marta Navarro A, Bermejo M. Classification of WHO Essential Oral Medicines for Children Applying a Provisional Pediatric Biopharmaceutics Classification System. *Pharmaceutics.* 2019;11.
449. van der Voorn B, de Waard M, Dijkstra LR, Heijboer AC, Rotteveel J, van Goudoever JB, et al. Stability of Cortisol and Cortisone in Human Breast Milk During Holder Pasteurization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017 Dec;65(6):658–

60. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00005176-201712000-00014>
450. Suitchmezian V, Jeß I, Näther C. Structural, Thermodynamic, and Kinetic Aspects of the Trimorphism of Hydrocortisone. *J Pharm Sci.* 2008 Oct;97(10):4516–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022354916327307>
451. Tanaka M, Kurata T, Fujisawa C, Ohshima Y, Aoki H, Okazaki O, et al. Mechanistic study of inhibition of levofloxacin absorption by aluminum hydroxide. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993 Oct;37(10):2173–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8257141>
452. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Omeprazole. [Internet]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Omeprazole>
453. Garrigues TM, Collado EF, Fabra-Campos S, Pérez-Buendía MD, Martín-Villodre A, Plá-Delfina JM. Absorption-partition relationships for true homologous series of xenobiotics as a possible approach to study mechanisms of surfactants in absorption. III. Aromatic amines and cationic surfactants. *Int J Pharm.* 1989 Dec 29;57(3):189–96. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378517389902068>
454. Segura-Bono MJ, Garrigues TM, Merino V, Bermejo MV. Compared effects of synthetic and natural bile acid surfactants on xenobiotic absorption. III. studies with mixed micelles. *Int J Pharm.* 1994 Jul 4;107(2):159–66. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378517394904537>
455. Nobili A, Garattini S, Mannucci PM. Multiple Diseases and Polypharmacy in the Elderly: Challenges for the Internist of the Third Millennium. *J Comorbidity.* 2011 Jan 27;1(1):28–44. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.15256/joc.2011.1.4>
456. Aslam M, Vaezi MF. Dysphagia in the Elderly [Internet]. Vol. 9, *Gastroenterology & Hepatology.* 2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3999993/pdf/GH-09-784.pdf>

Bibliografia

457. Barczy SR, Sullivan PA, Robbins J. How should dysphagia care of older adults differ? Establishing optimal practice patterns. *Semin Speech Lang.* 2000;21(4):347–61. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11085258>
458. Logrippo S, Ricci G, Sestili M, Cespi M, Ferrara L, Palmieri GF, et al. Oral drug therapy in elderly with dysphagia: between a rock and a hard place! *Clin Interv Aging.* 2017 Jan;Volume 12:241–51. Available from:
<https://www.dovepress.com/oral-drug-therapy-in-elderly-with-dysphagia-between-a-rock-and-a-hard-peer-reviewed-article-CIA>
459. Dou ZL, Dai M, An DLL, Zhang YWW. EFFECTS OF USING A SWALLOWING ASSISTIVE GEL TO DELIVER CAPSULES IN HEALTHY INDIVIDUALS: A PRELIMINARY STUDY. *Dysphagia.* 2018 Aug 5;33(4):484–588. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29872992>
460. Robbins J, Nicosia M, Hind JA, Gill GD, Blanco R, Logemann J. Defining Physical Properties of Fluids for Dysphagia Evaluation and Treatment. *Perspect Swallowing Swallowing Disord.* 2002 Jun 1;11(2):16. Available from:
<http://sig13perspectives.pubs.asha.org/article.aspx?doi=10.1044/sasd11.2.16>
461. TA Instruments. Understanding Rheology of Structured Fluids. In. Available from:
http://www.tainstruments.com/pdf/literature/AAN016_V1_U_StructFluids.pdf
462. Kim C-Y, Yoo B. Rheological characterization of thickened protein-based beverages under different food thickeners and setting times. *J Texture Stud.* 2018 Jun;49(3):293–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29574854>
463. Zaheer K, Langguth P. Designing robust immediate release tablet formulations avoiding food effects for BCS class 3 drugs. *Eur J Pharm Biopharm.* 2019 Jun;139:177–85. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30902732>
464. Zaheer K, Langguth P. Formulation strategy towards minimizing viscosity

- mediated negative food effect on disintegration and dissolution of immediate release tablets. *Drug Dev Ind Pharm*. 2018 Mar 4;44(3):444–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29098885>
465. Wang J-R, Wang X, Lu L, Mei X. Highly Crystalline Forms of Valsartan with Superior Physicochemical Stability. *Cryst Growth Des*. 2013 Jul 3;13(7):3261–9. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cg400762w>
466. Kristin F, René H, Boontida M, Buraphacheep JV, Maximilian A, Johanna M, et al. Dissolution and dissolution/permeation experiments for predicting systemic exposure following oral administration of the BCS class II drug clarithromycin. *Eur J Pharm Sci*. 2017;101:211–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2017.02.003>
467. Van Den Abeele J, Schilderink R, Schneider F, Mols R, Minekus M, Weitschies W, et al. Gastrointestinal and Systemic Disposition of Diclofenac under Fasted and Fed State Conditions Supporting the Evaluation of *in Vitro* Predictive Tools. *Mol Pharm*. 2017 Dec 4;14(12):4220–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28621952>
468. Biswas N. Modified mesoporous silica nanoparticles for enhancing oral bioavailability and antihypertensive activity of poorly water soluble valsartan. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Mar 1;99:152–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27993684>
469. Zaid AN, Radwan A, Jaradat N, Mousa A, Ghazal N, Bustami R. Formulation and In Vitro, In Vivo Correlation Between Two Candesartan Cilexetil Tablets. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2018 Aug;7(6):621–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29746726>
470. Figueroa-Campos A, Sánchez-Dengra B, Merino V, González-Álvarez M, García-Arieta A, González-Álvarez I, et al. Candesartan cilexetil in vitro-in vivo correlation (IVIVC): Predictive dissolution as development tool.



7.Anexo





Del conjunto de esta tesis surgen los siguientes trabajos científicos:

Trabajos Publicados:

Título: Comparison of segmental-dependent permeability in human and *in situ* perfusion model in rat. (2017) IF: 3.756 Q1 Pimer Autor

Título: Determination of intestinal permeability using *in situ* perfusion model in rats: Challenges and advantages to BCS classification applied to Digoxin. (2018) IF: 4.213 Q1 Pimer Autor compartido

Título: *In Vitro* Dissolution as a Tool for Formulation Selection: Telmisartan Two-Step IVIVC. (2018) IF: 4.556 Q1 Pimer Autor

Trabajos pendientes de publicación:

Effect of excipients on oral absorption process according to the different gastrointestinal segments

Autores: Alejandro Ruiz-Picazo, Isabel Lozoya-Agullo, Marta Gonzalez-Alvarez, Marival Bermejo, Isabel Gonzalez-Alvarez

Changes in biopharmaceutical properties of pediatric drug in presence of Milk “Hero baby 1 pediolac”

Autores: Alejandro Ruiz-Picazo, Isabel Gonzalez-Alvarez, Marival Bermejo, Marta Gonzalez-Alvarez

Effect of the thickener on the administration of oral solid pharmaceutical forms on bioavailability.

Autores: Alejandro Ruiz-Picazo, Sarin Colon-Useche, Isabel Gonzalez-Alvarez, Marta Gonzalez-Alvarez, Marival Bermejo, Peter Langguth

Effect of common excipients in intestinal drug absorption.

Autores: Alejandro Ruiz-Picazo, Marta Gonzalez-Alvarez, Marival Bermejo, Isabel Gonzalez-Alvarez



Comparison of segmental-dependent permeability in human and in situ perfusion model in rat

Autores: Alejandro Ruiz-Picazo, Isabel Lozoya-Agullo, Miguel Ortiz-Azcarate, Matilde Merino-Sanjuán, Marta González-Álvarez, Isabel González-Álvarez, Marival Bermejo

Revista: European Journal of Pharmaceutical Sciences 107 (2017) 191–196

DOI: 10.1016/j.ejps.2017.06.033

Abstract:

Nowadays, alternative methods have been developed to predict intestinal permeability values in human as in vitro, in situ or ex vivo methods. They were developed by the necessity to avoid the problems of the human permeability experiments. However, determination of human permeability is needed to properly validate the alternative methods. For this reason, recently, Dahlgren et al. published an indirect method based on a deconvolution technique to estimate the human permeability in different gastrointestinal segments (jejunum, ileum and colon). Therefore, the objective of this research was to demonstrate that Doluisio technique is a useful method to predict the human permeability in different gastrointestinal segments. To achieve this goal, the rat permeability in different segments, of the same drugs studied by Dahlgren et al. (atenolol, metoprolol and ketoprofen), have been compared with the human data obtained by the deconvolution method. The results obtained in this work show that the Doluisio method is a reliable tool to predict segmental human permeability. Consequently, the deconvolution method can be employed to build an extensive database of human permeability, overall from ileum and colon, because there is a lack of human permeability data of these distal segments. Once there are enough human data available, the Doluisio technique will be a valuable alternative method to predict the permeability of new molecules with therapeutic activity without the requirement of human experiments.



1. Introduction

The Biopharmaceutic Classification System (BCS) developed in 1995 by Amidon et al. (1995) establishes the intestinal permeability as one of the most important parameters determining rate and extent of drug absorption (Zur et al., 2014). The parameter employed to quantify drug absorbability is the effective intestinal membrane permeability (Peff). This is a kinetic parameter which reflects the velocity at which a molecule crosses the intestinal barrier and thus it affects the performance of oral drug products in combination with drug solubility and formulation dissolution (Fagerholm, 2008; Sun et al., 2013).

Human Peff is usually determined by in situ human intestinal perfusion technique by means of a multi-lumen tube (Loc-I-Gut), which is invasive, has several difficulties and, moreover, it involves the ethical issues associated with human experiments (Dahlgren et al., 2015; Knutson et al., 2009; Lennernas, 2007). For this reason, alternative methods have been developed, as in vivo and in situ animal models and in vitro models with intestinal tissue or cell cultures. However, human intestinal permeability data are required to achieve a strong validation of the alternative method. Until recently, only jejunal human Peff values were available, mainly determined by Lennernas (2007, 2014). Therefore, there is a lack of Peff data from distal gastrointestinal segments, i.e. ileum and colon. Knowing the absorption of therapeutic molecules from distal segments is highly relevant to predict the behaviour of controlled release (CR) formulations. To determine human Peff values in distal segments is even a more difficult challenge than in the human jejunum; because of this, recently less invasive methods have been developed. For example, Dahlgren et al. (2016) published in 2016 an indirect method to estimate the human permeability in different gastrointestinal segments (both, in the small intestine and in the large intestine). A deconvolution method, previously validated (Sjogren et al., 2015), is employed to calculate the permeability values. This method uses the plasma concentration-time profiles from the tested drug after administering the dissolution in a specific location in the gastrointestinal tract.

Nevertheless, the ideal goal of the permeability studies would be to avoid the use of humans and replace them by alternative methods. This objective will only be achieved when enough human data are available to validate the alternative method. The deconvolution method, mentioned in the above paragraph, allows to obtain easily human

permeability data in different segments and consequently it would be the desirable reference for developing and validating preclinical methods. Several works have shown a good correlation between the rat and human small intestine permeability (Cao et al., 2006; Lennernas, 2014; Zakeri-Milani et al., 2007). The perfusion in situ techniques in rat intestine are an effective option to study the permeability (Stappaerts et al., 2015). The Doluisio method, developed by Doluisio et al. (1969), is a in situ perfusion technique that has demonstrated to be a reliable method to measure the drug permeability in rat small intestine and different intestinal segments, including the colon (Lozoya-Agullo et al., 2015a, 2015b, 2016b, 2017).

The objective of this work was to explore the ability of Doluisio technique to predict the human permeability in different gastrointestinal segments. To achieve this goal, the data obtained in human by the deconvolution method have been compared with the rat permeability of the same model drugs (atenolol, metoprolol and ketoprofen) calculated with the Doluisio method in jejunum, ileum, colon and complete small intestine. Moreover, several correlations have been established between human permeability data and rat permeability data in order to show the suitability of the Doluisio in situ perfusion method to estimate human data.

2. Materials and methods

Atenolol, metoprolol and ketoprofen were purchased from SigmaAldrich. Methanol, acetonitrile and water were HPLC grade. All other chemicals were of analytical reagent grade.

2.1. Rat permeability studies

The Doluisio studies were approved by the Scientific Committee of the Faculty of Pharmacy, Miguel Hernandez University, and followed the guidelines described in the EC Directive 86/609, the Council of the Europe Convention ETS 123 and Spanish national laws governing the use of animals in research.

The absorption rate coefficients and the permeability values of the three drugs studied were determined in jejunum, ileum, colon and complete small intestine ($n = 6-7$) using in situ “closed loop” perfusion method based in Doluisio Technique (Doluisio et al., 1969) modified to adapt it to each segment as described in previous works (Lozoya-

Agullo et al., 2015a, 2016a, 2016b). Briefly, male Wistar rats (body weight, 250–300 g) were anesthetized using a mixture of pentobarbital (40 mg/ kg) and butorphanol (0.5 mg/kg). Isolated segments in the jejunum (≈ 45 cm), ileum (≈ 45 cm), colon (≈ 10 cm) and the complete small intestine (≈ 100 cm) were created. In order to remove all the intestinal contents each segment was copiously flushed with a physiologic isotonic solution (1% Sørensen phosphate buffer (v/v), 37 °C). The pH of the isotonic solution was adjusted at the physiological pH of each segment (6.5 for jejunum, 7.4 for ileum, 7.0 for colon and 7.0 for complete small intestine). When the surgical procedure was finished, the abdomen was covered with a cotton wool pad avoiding peritoneal liquid evaporation and heat losses. The drug solution was introduced inside the compartment and the samples were collected every 5 min up to a period of 30 min. Perfused drug solutions were prepared in isotonic saline buffered with Sørensen phosphate buffer (66.6 mM).

At the end of the experiments the animals were euthanized. In order to separate solid components from the samples, they were centrifuged 5 min at 5000 r.p.m. All samples were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) as described in Table 1 with a previously validated procedure with adequate precision and accuracy and covering the range of the experimental samples.

Table 1

Summary of HPLC conditions for the compounds tested with Doluisio's method.

Analytical methods were validated for each compound in terms of specificity, selectivity, linearity, precision and accuracy. All the compounds were analyzed at room temperature, with a flow rate of 1 mL/min and a 150 mm \times 4.6 mm C-18 column (5 μ m particle size).

Drug	Detection ^a	Mobile phase (aqueous:organic)	λ (nm)	Retention time (min)
Atenolol	F	Water (pH 3): MeOH:MeCN (90:5:5) ^b	231/307 ^c	7.0
Metoprolol	F	Water (pH 3): MeOH: MeCN (60:20:20) ^b	231/307 ^c	4.3
Ketoprofen	UV	Water (pH 3): MeOH (50:50) ^b	360	4.9

Note: MeCN: acetonitrile, MeOH: methanol. a UV: drug analyzed with an ultraviolet detector, F: drug analyzed with a fluorescence detector. b Water (pH 3) was 0.1% trifluoroacetic acid in water. c λ for excitation/ λ for emission.

At the end of the experiments there is a reduction in the volume of the perfused solutions due to water reabsorption, consequently, a correction became necessary to calculate the absorption rate constants accurately. Water reabsorption was characterized as an apparent zero order process. A method based on direct measurement of the remaining volume of the test solution was employed to calculate the water reabsorption zero order constant (k_o). The volume at the beginning of the experiment (V_0) is composed from the volume of the drug solution (4 mL for jejunum and ileum, 5 mL for colon and 10 mL for complete small intestine) plus the residual volume after flushing the intestinal segment. This residual volume was previously characterized and is on average 0.3 to 0.5 mL. The volume at the end of the experiment (V_{end}) was measured for each animal by carefully extracting and squeezing the intestinal segment. An individual value of k_o was estimated for each animal as:

$$k_o = -(V_0 - V_{end})/t_{end} \quad (1)$$

where V_{end} is the measured volume at the end of the experiment ($t_{end} = 30$ min) in each animal. k_o value was used to estimate the remaining water volume in the different segments at each time point (V_t). Finally, the experimental analyzed drug concentrations (C_e) were corrected at each time point to obtain the actual C_t by the following equation:

$$C_t = C_e \frac{V_0}{V_t} \quad (2)$$

where C_t represents the drug gut concentration in the absence of any water reabsorption at time t , and C_e represents the actual experimental value. The C_t values (corrected concentrations) were used to calculate the actual absorption rate coefficients (Tugcu-Demiroz et al., 2014).

The absorption rate coefficient (k_a) was determined by nonlinear regression analysis of the remaining concentrations in lumen (C_t) versus time.

$$C_t = C_0 e^{-k_a t} \quad (3)$$

This k_a value was transformed into permeability value with the following relationship:

$$P_{eff} = k_a \frac{Ra}{l} \quad (4)$$

where R is the effective radius of the intestinal segment. R was calculated considering the intestinal segment as a cylinder with the relationship:

$$Volume = \pi R^2 L \quad (5)$$

Estimation was done using a 4 mL perfusion volume for jejunum and ileum, 5 mL perfusion volume for colon and 10 mL perfusion volume for complete small intestine. The intestinal length (L) was 45 cm for jejunum and ileum, 10 cm for colon and 100 cm for complete small intestine.

2.2. Human permeability data

The human permeability data from jejunum, ileum and colon employed to build the figures shown in the results section were taken from Dahlgren et al. (2016).

2.3. Fraction absorbed (F_{abs}) data

In order to establish correlations between the P_{eff} values, from human and rat, and the oral F_{abs} in humans, the following equation was used:

$$F_{abs} = 1 - e^{-P_{eff} R^2 T} \quad (6)$$

where R represents the effective radius of the segment perfused according to Eq. (5), and T is the effective absorption time.

3. Results

The permeability values obtained in rat with the perfusion technique based on Doluisio method are shown in Table 2. Table 2 summarized the permeability data in all the rat intestinal segments: jejunum, ileum and colon.

Furthermore, Table 3 shows the rat intestinal permeability using the whole small intestine and the data from the study of Dahlgren et al. (2016) with the human intestinal permeability in jejunum as well as the physicochemical characteristics of the compounds. The Log P values of atenolol, metoprolol and ketoprofen have been taken from literature (Lozoya-Agullo et al., 2016b; Shohin et al., 2012).

Figs. 1–4 shows the correlations established between rat permeability data and human F_{abs} . In the same figures the human permeability values obtained with the deconvolution method by Dahlgren et al. (2016), and their correlation with human F_{abs} is shown. Fig. 1 refers to the P_{eff} values obtained in complete rat small intestine, Fig. 2 shows the P_{eff} values from jejunum, and Fig. 3 presents the P_{eff} data from rat ileum. F_{abs} human data have been obtained from literature (Skolnik et al., 2010; Zakeri-Milani et al., 2007).

We are aware that the number of studied compounds is too low to attempt any significant correlation either between rat permeability or human F_{abs} or between rat P_{eff} and human P_{eff} . For that reason, in order to put in context both datasets and the previous correlations in Figs. 4 and 5, previously published data with both methods (rat and human) in colon and small intestine and their correlations with human oral fraction absorbed have been used to overlap the current data and to show the comparability with previous results. The rat and human permeability data corresponding to these drugs have been taken from previous works (Lozoya-Agullo et al., 2015a; Sjoberg et al., 2013; Tannergren et al., 2009; Zakeri-Milani et al., 2007).

Table 2

Rat permeability values (P_{eff} , cm/s) obtained with Doluisio method. Data presented as average and (SD).

Drug	Jejunum	Ileum	Colon
Atenolol	$2.27 \cdot 10^{-5}$ ($1.80 \cdot 10^{-6}$)	$1.63 \cdot 10^{-5}$ ($1.20 \cdot 10^{-6}$)	$2.11 \cdot 10^{-5}$ ($4.30 \cdot 10^{-6}$)
Metoprolol	$6.85 \cdot 10^{-5}$ ($5.00 \cdot 10^{-6}$)	$9.05 \cdot 10^{-5}$ ($1.23 \cdot 10^{-5}$)	$8.14 \cdot 10^{-5}$ ($1.87 \cdot 10^{-5}$)
Ketoprofen	$6.95 \cdot 10^{-5}$ ($1.59 \cdot 10^{-6}$)	$3.65 \cdot 10^{-5}$ ($3.31 \cdot 10^{-6}$)	$2.28 \cdot 10^{-4}$ ($1.49 \cdot 10^{-5}$)

Table 3

Permeability values (P_{eff} , cm/s) from rat complete small intestine and standard deviation (SD) (Doluisio method) and human jejunum (deconvolution method) as well as physicochemical properties of the compounds. *** Data from reference (Dahlgren D., et al).

Drug	P_{eff} (cm/s)		Physicochemical properties***		
	Rat	Human***	MW	Log P	pKa
Atenolol	$1.07 \cdot 10^{-5}$ ($2.40 \cdot 10^{-6}$)	$4.50 \cdot 10^{-5}$	266.3	0.16	9.60b
Metoprolol	$6.24 \cdot 10^{-5}$ ($6.46 \cdot 10^{-6}$)	$1.72 \cdot 10^{-4}$	684.8	1.88	9.70b
Ketoprofen	$3.00 \cdot 10^{-5}$ ($1.03 \cdot 10^{-6}$)	$8.85 \cdot 10^{-4}$	254.3	3.12	4.45a

Note: MW: molecular weight (g/mol). a Acid drugs. b Basic drugs.

4. Discussion

The common human perfusion techniques to study human permeability data from different gastrointestinal segments are characterized by their experimental complexity. However, Dahlgren et al. (2016), developed a new less invasive technique based on a deconvolution method that allows to obtain human permeability values with less experimental challenges.

Nevertheless, once the database of human intestinal permeability values gets big enough, replacing the human experiments by alternative methods is the next desirable goal. The Doluisio rat perfusion method has shown to be a reliable perfusion technique to study the permeability in rat small and large intestine and also in different intestinal segments (Lozoya-Agullo et al., 2015a, 2015b, 2016b, 2017). Therefore, the objective of this work was to evaluate the suitability of the rat and the Doluisio method as a preclinical model to predict the segmental variation in drug permeability of different compounds. To achieve this objective, the permeability of the three model drugs (atenolol, metoprolol

and ketoprofen), assayed in humans with the deconvolution method, has been measured in rats with the Doluisio perfusion technique in the same segments studied by Dahlgren et al. (2016): jejunum, ileum and colon. Moreover, the P_{eff} values in the whole rat small intestine have been tested as well. The results of these perfusion experiments in rats can be seen in Table 2.

Until now, the human permeability data available was from jejunum (Lennernas, 2007, 2014), and the number of human P_{eff} determinations in distal human small intestine and human large intestine was limited. Therefore, only the human jejunal P_{eff} values were employed to validate the predictability of the different preclinical intestinal absorption models (including rat) (Dahlgren et al., 2015). The human permeability perfusion methods have been up to date the gold standard to predict the human oral fraction absorbed (F_{abs}) obtained from pharmacokinetic or mass-balance studies in humans (Dahan et al., 2009; Fairstein et al., 2013; Lennernas, 2007). Obviously the need to validate other preclinical methods to predict human absorption in the development phase requires the comparison against human data.

Figs. 1 to 3 shows a reasonable correlation between rat P_{eff} in the jejunum and ileum segments and human oral F_{abs} with the same trend displayed by the segmental P_{eff} data in human jejunum and ileum versus human F_{abs} . The phenomenon that the rat values are lower than human values is interesting, and it explains why the rat curves in all Figs. 1 to 3 are to the left of the human ones. However, the reason for the different shape of the curves needs further research. It would be difficult to ensure there is a real mechanistic difference, or if the different shape is due to the low number of assayed compounds. In general, the fact that all the rat curves are to the left of the human ones has been explained for the less effective surface for permeation in the rat small intestine, as this animal lacks of Kerckring folds. The different shape of the curves in the different segments could be explained by a different segmental change of the tight junction's leakiness in rat versus human. For the low permeable compounds, in general hydrophilic, a similar to human "tightness" of the junctions would lead to lower permeabilities, making similar the slopes of the curves in Figs. 1 to 3, but as it can be observed in Fig. 3, predicted rat permeabilities on the lower portion of the curves are actually higher than the human ones. That could indicate higher paracellular permeability, as it is observed in colon.

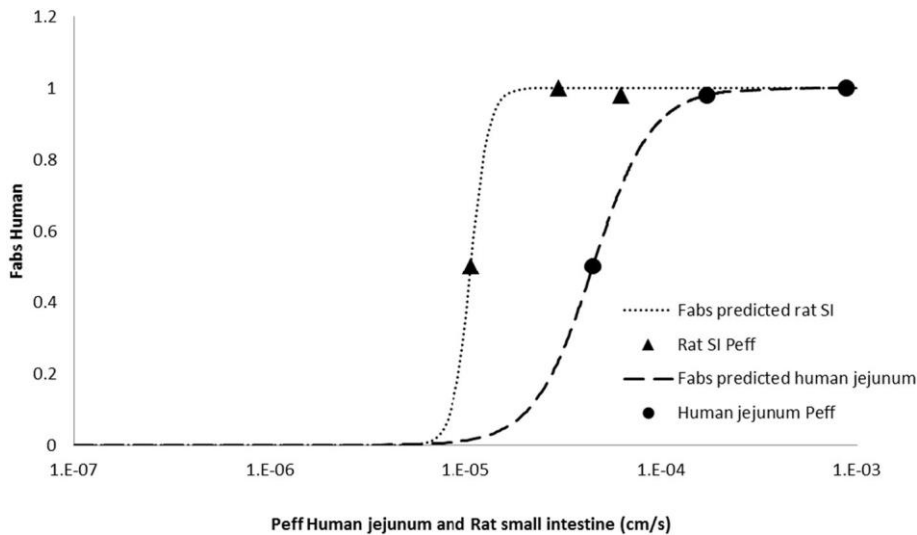


Fig. 1. Correlations between human jejunum permeability and whole rat small intestine (SI) permeability versus human fraction absorbed of the three drugs studied in this paper.

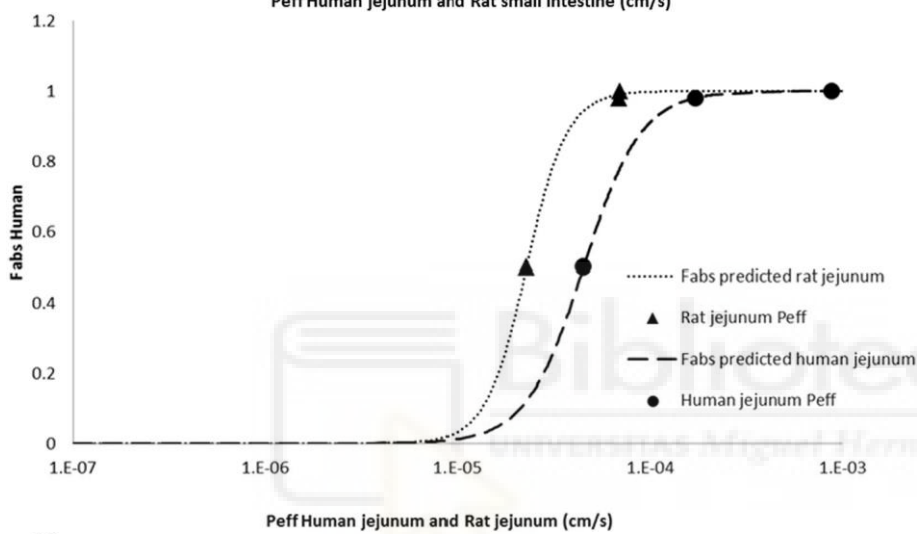


Fig. 2. Correlations between human jejunum permeability and rat jejunum permeability versus human fraction absorbed of the three drugs studied in this paper.

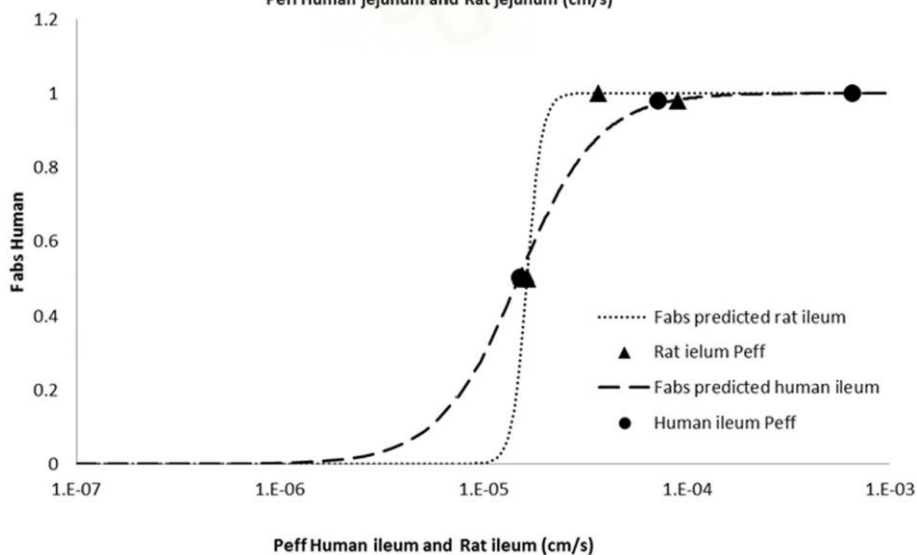


Fig. 3. Correlations between human ileum permeability and rat ileum permeability versus human fraction absorbed of the three drugs studied in this paper.

Table 4

	Fig. 1		Fig. 2		Fig. 3		Fig. 4	
	Human	Rat	Human	Rat	Human	Rat	Human	Rat
RSS	3.1E-08	4.0E-04	3.1E-08	1.8E-04	1.3E-04	4.0E-04	7.8E-02	1.3E-12
AIC	-47.881	-19.472	-47.881	-21.731	-22.892	-19.472	-1.092	-50.676
R2	0.9999	0.9987	0.9999	0.9988	0.9997	0.9987	1.00	1.00

Goodness of fit indexes of the different P_{eff} vs F_{abs} correlations established with the three drugs studied.

In jejunum and ileum there are few available data in human to compare with the rat experiments so in order to show that the correlations presented are feasible Fig. 4 presents previous correlation of human colon permeability and rat colon permeability versus fraction absorbed in human colon, including atenolol, metoprolol and ketoprofen. The figure shows that the current data is in reasonable agreement with our previously published results and maintain the already demonstrated relationship. The general trend can be observed from Fig. 4 is that permeability values from rat colon are higher than those obtained from human colon. This difference has already been seen in a previous work (Lozoya-Agullo et al., 2015a) and it was likely due to the wider tight junctions in rat colon membrane than in human colon membrane.

The goodness of fit indexes of the different correlations established (Figs. 1–4) can be observed in Table 3. All of them have statistical significance ($p < 0.05$), this fact illustrates that both methods, deconvolution (humans) and Doluisio (rats), predict correctly the human absorption in different gastrointestinal segments. Therefore, the Doluisio in situ perfusion technique is a useful alternative method to predict human absorption in different gastrointestinal segments, so it can be employed to avoid human permeability assays.

Table 4 shows the lipophilicity (Log P) and permeability (P_{eff}) human and rat values. Even if a direct correlation is not good and the statistical significance would be limited with just three compounds, those values show that the trend is similar in both data

sets and a higher lipophilicity is reflected in higher effective permeability. The good agreement between human data and rat model has been already described in several works (Dahan et al., 2013; Gonzalez-Alvarez et al., 2007; Lozoya-Agullo et al., 2016b; Masaoka et al., 2006; Pham-The et al., 2013). The agreement between permeability values is in particular good in colon. Nevertheless, when comparing across segments in a particular model, the rat presents higher colon permeabilities for a particular compound while in humans the values are similar or lower. On the other hand, Fig. 5 confirms the trend observed in Figs. 1 to 3, which indicate that in general rat intestinal permeabilities are lower than the human ones in jejunum, and thus the rat correlation curve is to the left compared with the human correlation. The reason of that behaviour has been previously explained due to the lower surface available in rat intestine compared to humans as the rat lacks of Kerckring's folds (plicae). In summary Figs. 4 and 5 point out the differences in rat colon versus rat small intestine in comparison to the same human segments. In any case with the adequate number of compounds in both models it will be possible to establish a good correlation and then the conversion factor to predict from the rat model and segment the homologous value in humans.

More human and rat data will be necessary in the future for characterizing the correlation across segmental permeabilities in both models but the data in this work shows that for the jejunum and ileum, the rat shows less differences than the human intestine for that reason the agreement between rat and human is good in jejunum and colon but less good in ileum.

5. Conclusion

The in situ perfusion model in rat (Doluisio) has demonstrated to be a reliable tool to predict segmental human permeability in jejunum and colon, thus could be a valuable tool for the development of controlled release drug products.

Acknowledgement

The authors acknowledge partial financial support to project SAF2016-78756 from MINECO (Spanish Ministry of economy, industry and competitiveness) and Red Biofarma (DCI ALA/19.09.01/10/21526/ 245-297/ALFA 111(2010)29). DCI ALA/19.09.01/10/21526/245-297/ ALFA 111(2010)29, funded by European

Commission. Isabel LozoyaAgullo received a grant from the Ministry of Education and Science of Spain (FPU 2012-00280).

References

Amidon, G.L., Lennernas, H., Shah, V.P., Crison, J.R., 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 12, 413–420.

Cao, X., Gibbs, S.T., Fang, L., Miller, H.A., Landowski, C.P., Shin, H.C., Lennernas, H., Zhong, Y., Amidon, G.L., Yu, L.X., Sun, D., 2006. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharm. Res.* 23, 1675–1686.

Dahan, A., Miller, J.M., Amidon, G.L., 2009. Prediction of solubility and permeability class membership: provisional BCS classification of the world's top oral drugs. *AAPS J.* 11, 740–746.

Dahan, A., Wolk, O., Kim, Y.H., Ramachandran, C., Crippen, G.M., Takagi, T., Bermejo, M., Amidon, G.L., 2013. Purely in silico BCS classification: science based quality standards for the world's drugs. *Mol. Pharm.* 10, 4378–4390.

Dahlgren, D., Roos, C., Sjogren, E., Lennernas, H., 2015. Direct in vivo human intestinal permeability (Peff) determined with different clinical perfusion and intubation methods. *J. Pharm. Sci.* 104, 2702–2726.

Dahlgren, D., Roos, C., Lundqvist, A., Abrahamsson, B., Tannergren, C., Hellstrom, P.M.,

Sjogren, E., Lennernas, H., 2016. Regional intestinal permeability of three model drugs in human. *Mol. Pharm.* 13, 3013–3021.

Doluisio, J.T., Billups, N.F., Dittert, L.W., Sugita, E.T., Swintosky, J.V., 1969. Drug absorption. I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J. Pharm. Sci.* 58, 1196–1200.

Fagerholm, U., 2008. The role of permeability in drug ADME/PK, interactions and toxicity—presentation of a permeability-based classification system (PCS) for prediction of ADME/PK in humans. *Pharm. Res.* 25, 625–638.

Fairstein, M., Swissa, R., Dahan, A., 2013. Regional-dependent intestinal permeability and BCS classification: elucidation of pH-related complexity in rats using pseudoephedrine. *AAPS J.* 15, 589–597.

Gonzalez-Alvarez, I., Fernandez-Teruel, C., Casabo-Alos, V.G., Garrigues, T.M., Polli, J.E., Ruiz-Garcia, A., Bermejo, M., 2007. In situ kinetic modelling of intestinal efflux in rats: functional characterization of segmental differences and correlation with in vitro results. *Biopharm. Drug Dispos.* 28, 229–239.

Knutson, T., Fridblom, P., Ahlstrom, H., Magnusson, A., Tannergren, C., Lennernas, H., 2009. Increased understanding of intestinal drug permeability determined by the LOC-I-GUT approach using multislice computed tomography. *Mol. Pharm.* 6, 2–10.

Lennernas, H., 2007. Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination. *Xenobiotica* 37, 1015–1051.

Lennernas, H., 2014. Regional intestinal drug permeation: biopharmaceutics and drug development. *Eur. J. Pharm. Sci.* 57, 333–341.

Lozoya-Agullo, I., Gonzalez-Alvarez, I., Gonzalez-Alvarez, M., Merino-Sanjuan, M., Bermejo, M., 2015a. In situ perfusion model in rat colon for drug absorption studies: comparison with small intestine and Caco-2 cell model. *J. Pharm. Sci.* 104, 3136–3145.

Lozoya-Agullo, I., Zur, M., Wolk, O., Beig, A., Gonzalez-Alvarez, I., Gonzalez-Alvarez, M., Merino-Sanjuan, M., Bermejo, M., Dahan, A., 2015b. In-situ intestinal rat perfusions for human Fabs prediction and BCS permeability class determination: investigation of the single-pass vs. the Doluisio experimental approaches. *Int. J. Pharm.* 480, 1–7. Lozoya-Agullo, I., Gonzalez-Alvarez, I., Gonzalez-Alvarez, M., Merino-Sanjuan, M., Bermejo, M., 2016a. Development of an ion-pair to improve the colon permeability of a low permeability drug: atenolol. *Eur. J. Pharm. Sci.* 93, 334–340.

Lozoya-Agullo, I., Zur, M., Beig, A., Fine, N., Cohen, Y., Gonzalez-Alvarez, M., MerinoSanjuan, M., Gonzalez-Alvarez, I., Bermejo, M., Dahan, A., 2016 Dec 30b. Segmentaldependent permeability throughout the small intestine following oral drug administration: single-pass vs. Doluisio approach to in-situ rat perfusion. *Int. J. Pharm.* 515 (1-2), 201–208. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.061>. Epub 2016 Sep 22.

Lozoya-Agullo, I., Zur, M., Fine-Shamir, N., Markovic, M., Cohen, Y., Porat, D., GonzalezAlvarez, I., Gonzalez-Alvarez, M., Merino-Sanjuan, M., Bermejo, M., Dahan, A., 2017 Jul 15. Investigating drug absorption from the colon: single-pass vs. Doluisio approaches to in-situ rat large-intestinal perfusion. *Int. J. Pharm.* 527 (1-2), 135–141. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.018>. Epub 2017 May 10.

Masaoka, Y., Tanaka, Y., Kataoka, M., Sakuma, S., Yamashita, S., 2006. Site of drug absorption after oral administration: assessment of membrane permeability and luminal concentration of drugs in each segment of gastrointestinal tract. *Eur. J. Pharm. Sci.* 29, 240–250.

Pham-The, H., Garrigues, T., Bermejo, M., Gonzalez-Alvarez, I., Monteagudo, M.C., Cabrera-Perez, M.A., 2013. Provisional classification and in silico study of biopharmaceutical system based on caco-2 cell permeability and dose number. *Mol. Pharm.* 10, 2445–2461.

Shohin, I.E., Kulinich, J.I., Ramenskaya, G.V., Abrahamsson, B., Kopp, S., Langguth, P., Polli, J.E., Shah, V.P., Groot, D.W., Barends, D.M., Dressman, J.B., 2012. Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: ketoprofen. *J. Pharm. Sci.* 101, 3593–3603.

Sjoberg, A., Lutz, M., Tannergren, C., Wingolf, C., Borde, A., Ungell, A.L., 2013. Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* 48, 166–180.

Sjogren, E., Dahlgren, D., Roos, C., Lennernas, H., 2015. Human in vivo regional intestinal permeability: quantitation using site-specific drug absorption data. *Mol. Pharm.* 12, 2026–2039.

Skolnik, S., Lin, X., Wang, J., Chen, X.H., He, T., Zhang, B., 2010. Towards prediction of in vivo intestinal absorption using a 96-well Caco-2 assay. *J. Pharm. Sci.* 99, 3246–3265.

Stappaerts, J., Brouwers, J., Annaert, P., Augustijns, P., 2015. In situ perfusion in rodents to explore intestinal drug absorption: challenges and opportunities. *Int. J. Pharm.* 478, 665–681.

Sun, L., Liu, X., Xiang, R., Wu, C., Wang, Y., Sun, Y., Sun, J., He, Z., 2013. Structure-based prediction of human intestinal membrane permeability for rapid in silico BCS classification. *Biopharm. Drug Dispos.* 34, 321–335.

Tannergren, C., Bergendal, A., Lennernas, H., Abrahamsson, B., 2009. Toward an increased understanding of the barriers to colonic drug absorption in humans: implications for early controlled release candidate assessment. *Mol. Pharm.* 6, 60–73.

Tugcu-Demiroz, F., Gonzalez-Alvarez, I., Gonzalez-Alvarez, M., Bermejo, M., 2014. Validation of phenol red versus gravimetric method for water reabsorption correction and study of gender differences in Doluisio's absorption technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* 62, 105–110.

Zakeri-Milani, P., Valizadeh, H., Tajerzadeh, H., Azarmi, Y., Islambolchilar, Z., Barzegar, S., Barzegar-Jalali, M., 2007. Predicting human intestinal permeability using singlepass intestinal perfusion in rat. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 10, 368–379.

Zur, M., Hanson, A.S., Dahan, A., 2014. The complexity of intestinal permeability: assigning the correct BCS classification through careful data interpretation. *Eur. J. Pharm. Sci.* 61, 11–17.



Determination of intestinal permeability using in situ perfusion model in rats: Challenges and advantages to BCS classification applied to digoxin

Autores: Tamires Guedes Caldeira*, Alejandro Ruiz-Picazo*, Isabel Lozoya-Agullo, Dênia Antunes Saúde-Guimarães, Marta González-Álvarez Jacqueline de Souza, Isabel González-Álvarez, Marival Bermejo

*Both author are considered jointly first authors as they contributed equally to this work.

Revista: International Journal of Pharmaceutics 551 (2018) 148–157

DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.09.022

Abstract:

The purpose of this work was to describe the closed loop in situ perfusion method in rats and to compare the difficulties and advantages with other methods proposed by regulatory agencies for BCS classification and finally to illustrate its application to evaluate the permeability of digoxin at relevant clinical concentrations. Digoxin was evaluated at two concentration levels: 1.0 µg/ml (with and without sodium azide 65.0 µg/ml) and 6.0 µg/ml. These concentrations correspond to the ratio of the highest dose strength (0.25 mg) and the highest single dose administered (1.5 mg) and the 250 ml of water. In situ closed loop perfusion studies in rats were performed in the whole small intestine and also in duodenum, jejunum and ileum segments to evaluate the relevance of Pgp secretion in the overall permeability. A kinetic modelling approach involving passive permeation and efflux transport mechanism allowed the estimation of the passive diffusional component and the Michaelis-menten parameters. The estimated Km value demonstrated that at clinical luminal concentrations the efflux process is not saturated and then it could be inhibited by other drugs, excipients or food components leading to the already reported clinical drug-drug and drug-food interactions. The present data confirms from a mechanistic point of view these interactions.



1. Introduction

According to the European Medicines Agency (EMA), BCS (Biopharmaceutic Classification System) permeability classification of a drug requires absolute bioavailability or mass balance studies. However, the Food and Drug Administration (FDA) and World Health Organization (WHO) accept for BCS classification the results from other methods able to predict the extent of drug absorption in humans, such as in vivo or in situ intestinal perfusion in animal models (e.g. rats), or in vitro permeability methods using intestinal tissues or monolayers of suitable epithelial cells (EMA, 2010, FDA, 2015, WHO, 2015).

According to the BCS, solubility, permeability and dissolution rate from dosage form are the fundamental parameters that control drug absorption rate and extent. Based on this concept, drugs were grouped into four classes: class I, high solubility and high permeability, class II, low solubility and high permeability, class III, high solubility and low permeability and class IV, low solubility and low permeability (Amidon et al., 1995).

Among the different methods used to evaluate the permeability, in situ intestinal perfusion has been widely used due to its similarity with in vivo conditions such as the presence of blood irrigation, innervation, active transporters, metabolizing enzymes and compatibility with complex solvent systems (Balimane et al., 2000, Volpe, 2010, Stappaerts et al., 2015).

In addition, in situ perfusion in rats can also be used to investigate drug absorption in the presence of pathophysiological changes, for instance, changes in motility and intestinal barrier integrity associated with parasitic diseases. Fast and fed states can also be simulated in the perfusion method by changing the perfusion media (since there is a change in the pH and composition of intestinal fluids in postprandial conditions) (Lautenschläger et al., 2010, Stappaerts et al., 2015).

In situ intestinal perfusion in rats presents a good correlation with human intestinal permeability, for passively absorbed drugs, and moderate correlation between the expression levels of transporters in the rat and human, which provides

similar molecular mechanisms for the absorption of drugs between the two species. Therefore, the permeability of passively transported compounds can be predicted with a particularly high degree of accuracy. However, special care must be taken for drugs with a carrier-mediated transport mechanism, and a scaling factor has to be used (Lennernäs, 1997, Cao et al., 2006, Lennernäs, 2014, Lozoya-Agullo et al., 2015b).

Then, a well-established protocol for permeability studies using the in situ intestinal perfusion can clarify the transport mechanisms of a drug through the intestinal barrier, contributing to its adequate biopharmaceutical classification and correlating, in a reliable way, with the process of oral bioavailability and therapeutic action of the drug (Dezani et al., 2017).

Therefore, the purpose of this work is to describe the in situ closedloop perfusion method in rats (Doluisio et al., 1969), and to discuss the difficulties and advantages in comparison with other methods proposed by regulatory agencies for BCS classification, illustrating its application to evaluate the permeability of digoxin as model drug. Digoxin is a cardiac glycoside with capacity to increase the contractile force of the myocytes due to positive inotropic effect. Digoxin has a narrow therapeutic index (NTI) and in order to obtain an adequate response and avoid toxicity, the oral dosage can vary from 0.25 mg to 1.5 mg, in patients with normal body weight and renal function (Neuhoff et al., 2013). It is a well-known substrate of P-glycoprotein (Gandia et al., 2004, Yao and Chiou, 2006, Suzuki et al., 2014, Nielsen et al., 2016, Oda and Murakami, 2017), but most of the permeability reported data in the literature have been obtained at concentrations that exceed the clinically relevant concentrations in lumen reflecting mainly the passive diffusional component of its membrane transport. Thus, in addition to demonstrating the applicability of the in situ closed-loop perfusion method in rats and determining the permeability of digoxin at clinically relevant concentrations, the saturation level of the transporter was evaluated, which could explain the reported drug-drug and drug-food reported interactions (Hanratty et al., 2000, Yao and Chiou, 2006).

2. Materials and methods

2.1. Materials

Digoxin and sodium azide were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Acetonitrile HPLC grade was purchased from VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, France). Water was obtained from a Millipore purification system. All other chemicals were of analytical grade or higher.

2.2. Perfusion solution

Perfusion solution used in the in situ intestinal perfusion studies was prepared with phosphate buffer 50 mM adjusted to pH 6.8.

Digoxin was evaluated at two concentration levels: 1.0 µg/ml (with and without sodium azide 65.0 µg/ml) and 6.0 µg/ml. These con-

centrations were obtained by dividing the highest dose strength (0.25 mg) and the highest single dose administered (1.5 mg) of digoxin that can be administered with 250 ml of water (volume of water generally used for the administration of a drug product in bioequivalence studies).

Perfusion solutions were maintained at 37 °C until use.

2.3. Animals

Male Wistar rats weighting 250–300 g (n = 4–6) were used for all in situ permeability studies. Animal experiments were approved by the Scientific Committee of the Faculty of Pharmacy, Miguel Hernandez University, and followed the guidelines described in the EC Directive 86/609, the Council of the Europe Convention ETS 123 and Spanish national laws governing the use of animals in research.

2.4. Intestinal perfusion of digoxin

Effective permeability of digoxin was determined in the complete small intestine at concentrations of 1.0 µg/ml and 6.0 µg/ml and in duodenum, jejunum and ileum only at the concentration of 1.0 µg/ml using in situ closed-loop perfusion based in Doluisio

method (Doluisio et al., 1969) modified to evaluate in each intestinal segment (LozoyaAgullo et al., 2016). In addition, the passive permeability of the drug was evaluated in the ileum with the perfusion solution of digoxin 1.0 µg/ml and sodium azide 65.0 µg/ml.

Rats were anesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital (40 mg/kg) and divided into two groups. In the first group, an abdominal midline incision was made and the complete small intestine (approximately 100 cm) was identified and cannulated at both ends using glass cannulae attached to silicone tubing for connection with stopcock valves and glass syringes. In the second group, segments of duodenum (approximately 10 cm), jejunum (approximately 45 cm) and ileum (approximately 45 cm) were identified and cannulated, in the same animal, at both ends using also glass cannulae linked with glass syringes. In both groups, the bile duct was ligated to prevent the release of bile salts into the intestinal lumen.

In order to remove all the intestinal contents, each segment was gently washed with perfusion solution free of drug. After complete removal of the intestinal contents, syringes with three-way stopcock valve were coupled to the cannulae and the perfusion solution containing digoxin was introduced into the segment: 2ml for duodenum, 4 ml for jejunum and ileum, and 10 ml for complete small intestine.

150 µl of the perfusion solution were collected every 5 min for 30 min, alternating the collection end, without replacement. The sample withdrawn volume was, later on, taken into account for water reabsorption estimation.

At the end of the experiment the animals were euthanized by cervical dislocation, the samples were centrifuged at 10000 rpm for 5 min and quantified by HPLC. In addition, the remaining perfusion solution in the intestine was collected to evaluate the degree of water absorption presented by the animal. Water reabsorption was characterized as an apparent order zero process and the water reabsorption constant (k_0) was calculated as described in Eq. (1).

$$k_0 = (V_0 - V_{end})/t_{end} \quad \text{Equation 1}$$

where V_0 is the volume of perfusion solution introduced into the intestinal segment at the beginning of the experiment, V_{end} is the volume of perfusion solution measured at the end of the experiment, t_{end} is the total time of experiment (30 min). k_0 value was used to estimate the remaining water volume at each time point (V_t).

Thus, the experimental concentration (C_e) was corrected at each time point using the Eq. (2):

$$C_t = C_e(V_t/V_0) \quad \text{Equation 2}$$

where C_t represents the drug concentration in the absence of water reabsorption at time t , and C_e represents the correct experimental value. C_t values were used to calculate the real absorption rate coefficients (Tugcu-Demiroz et al., 2014).

The absorption rate coefficient (k_a) was determined by nonlinear regression analysis of the remaining concentrations in lumen of segment intestinal (C_t) versus time (Eq. (3)).

$$C_t = C_0 e^{-k_a t} \quad \text{Equation 3}$$

From the k_a value is possible to calculate the effective permeability (P_{eff}) using Eq. (4):

$$P_{eff} = k_a R/2 \quad \text{Equation 4}$$

where r is the radius of the intestinal segment. r was calculated considering the intestinal segment as a cylinder (Volume = $\pi r^2 L$). Estimation was done using the perfusion volume for each intestinal segment.

2.5. Kinetic parameter estimation

A kinetic modelling approach to estimate permeability transport components was applied to the data. The kinetic model was fitted to the whole dataset simultaneously (duodenum, jejunum, ileum and ileum in presence of sodium azide), by keeping in common the shared parameters across segments/conditions and estimating separately the nonshared ones.

This procedure is based in the following assumptions:

- a) Same passive diffusion component on the apparent permeability along the complete small intestine, as the experiments were performed at the same luminal pH value.
- b) Same K_m value as index of the affinity for the transporter in all intestinal segments.
- c) Maximal efflux velocity (V_m) was modelled as a function of Pgp expression level. The procedure is described in González-Álvarez et al. (2007): a baseline value was taken to be the expression level in ileum (V_{mI}). The value of maximal velocity in duodenum (V_{mD}) and jejunum (V_{mJ}) was calculated from the baseline value and a correction factor (E_f), based on mRNA-MDR1 expression reported for Wistar rats (Takara et al., 2003). According to Takara et al. (2003), the expression level in the duodenum is 3.25-fold lower than ileum and 1.44-fold lower in jejunum versus ileum. Then, E_f in duodenum was $1/3.25$ and E_f in jejunum was $1/1.44$.

The kinetic model is based on four differential equations, one per segment/condition as the next one: Segments

$$\frac{dC_i}{dt} = - \left(\frac{2}{r_x} P_{diff} \right) C_i + \frac{2}{r_x} \frac{V_{mx} \times C_i}{K_m + C_i} \quad \text{Equation 5}$$

Ileum in presence of sodium azide

$$\frac{dC_{ilaz}}{dt} = - \left(\frac{2}{r} P_{diff} \right) C_{ilaz} \quad \text{Equation 6}$$

where C_i represents the digoxin concentration, P_{diff} the passive diffusion permeability, and K_m is the Michaelis-Menten constant. r represents the effective radius and accounts for the volume/surface ratio. The subscript x refers to segment in question: V_{mD} for duodenum, V_{mJ} for jejunum, and V_{mI} for ileum.

The maximal velocity was estimated to be the product of the baseline value (in ileum) and the expression factor (E_f) for the segment according to Eq. (7) and (8).

$$V_{mD} = E_{fD} \times V_{mI} \quad \text{Equation 7}$$

$$VmJ = EfJ \times Vml \quad \text{Equation 8}$$

Curve fitting procedures were performed in Berkeley-Madonna 8.3.23.0. (apparent permeability values at each concentration/condition) and in Phoenix-Winonlin 8.0.0.3176. The winonlin ASCII code is provided in the Table A1.

2.6. Chromatographic conditions

Digoxin was quantified using HPLC system (Waters Alliance® e2695, Milford, MA, USA) with UV detector at 218 nm (Waters 2487, Milford, MA, USA). Using as mobile phase a mixture of 72:28 (v/v) water:acetonitrile and column Nova Pak® Waters (C18 3.9 ×150 mm;

4.0 μm). Temperature was set at 25 °C. Injection volume was 50 μl and flow of 1 ml/minute. The method was previously validated with adequate linearity, precision, accuracy (R > 0.99 and coefficient of variation <5%) and LLOQ of 0.33 μg/ml.

2.7. Statistical analysis

Permeability values are expressed as mean ± standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using Graphpad Prism version 5.1 (Graphpad Software, INC., La Jolla, CA, USA). Analysis of variance (ANOVA) and Tukey tests were used for statistics. A value of p < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. Permeability studies

Cultures of suitable epithelial cells or animal tissues and in situ intestinal perfusion in rats are well characterized experimental methods to evaluate intestinal drug permeability in preclinical studies (Lennernäs, 2014, Hens et al., 2016). These methods are accepted by some regulatory agencies to BCS drug classification with regulatory purposes (EMA, 2010, FDA, 2015, WHO, 2015).

Among the epithelial cells, Caco-2 cells deserve attention. Caco-2 cells are derived from human colon adenocarcinoma and were first isolated by Fogh et al. (Fogh

and Trempe, 1975). Initially they were used in the investigation of tumor mechanisms of cancer cells and studies on anti-neoplastic therapy (Pinto et al., 1983).

Since the 1980s, Caco-2 cells have become a promising tool for permeability studies because they present many characteristics of intestinal absorption cells, such as: microvillus, hydrolysis enzymes, ion, peptide and sugar transporters. In addition, to performing both passive and some types of active drug transport (Pinto et al., 1983, Hilgers et al., 1990, Balimane et al., 2000, Souza et al., 2009, Gonçalves et al., 2012).

Despite these characteristics, permeability studies using Caco-2 cells present some disadvantages, such as the long period to obtain viable cells for the tests (usually 21 days) and the significant difference between the expression level of transporters in Caco-2 cells and human intestine. In addition, some experimental problems related to the unstirred water layer, the adherence of highly lipophilic drugs in polycarbonate filters, the pH of donor/receptor media and use of co-solvents, can change the results and make difficult the interlaboratory reproducibility (Balimane et al., 2000, Souza et al., 2007, Gonçalves et al., 2012).

The use of intestinal tissues is also very common. Two techniques for the evaluation of permeability were developed from animal tissues.

Everted intestinal assay utilizes portions of animals intestine, generally rats, in everted form, which are immersed in a buffer solution containing the drug, in order to evaluate the transport from the mucosal to the serosal side (Wilson and Wiseman, 1954, Balimane et al., 2000, Souza et al., 2007).

The second technique uses of intestinal segments in bicompartamental apparatus, usually, Ussing chambers (horizontal) or Franz cells (vertical). The mucosal side faces the donor compartment and the serosal portion faces the receiver one. Absorption is based on the appearance of the drug on the serosal side from disappearance on the mucosal side (Ussing and Zerahn, 1951, Balimane et al., 2000, Souza et al., 2007).

Although these techniques control many of the variables found in the absorption process, they suffer with the main disadvantage of in vitro studies: lack of innervation and blood supply. The drug must diffuse not only through the membrane barrier but also through the muscle, connective tissue, fatty tissue, and other structures of intestinal wall. So, as a result, absorption rates measured by these in vitro techniques can be slow and accumulation of drug in the “membrane” can be extremely large. In addition, in vitro preparations show rapid loss of cell viability due to morphological changes (Doluisio et al., 1969, Balimane et al., 2000).

In situ intestinal perfusion in rats is performed with several methods but essentially in all of them drug solutions are introduced in the intestinal segment of interest with the animal under anesthesia. Absorption is evaluated from the disappearance of the drug from the intestinal lumen. In addition to evaluate the permeability, this technique allows the analysis of the kinetic mechanism of drug absorption (Doluisio et al., 1969, Balimane et al., 2000, Tugcu-Demiroz et al., 2014, LozoyaAgullo et al., 2016).

Blood supply and innervation are maintained, thus the technique is able to mimic the in vivo conditions. However, some limitations are observed as the fact that the absorption is correlated only with the disappearance of the compound from the intestinal lumen, thus disregarding any pre-systemic or luminal metabolism (Doluisio et al., 1969, Balimane et al., 2000).

In recent years, in situ intestinal perfusion in rats with blood sampling has gained focus on permeability studies of substances. Cannulation of the mesenteric vein allows determining the appearance of compounds in the blood and is of great use, especially, when evaluating the absorption of compounds submitted to intestinal metabolism. In addition, rats express intestinal transporters and P450 enzymes, then, in situ intestinal perfusion in rats has been used to study the intestinal absorption of drugs that are affected by intestinal metabolism and efflux transporters. For some compounds, it is possible to monitor the appearance of metabolites, originating from intracellular metabolism, in the perfusion media. These metabolites can reach the intestinal lumen

by active or passive transport processes and serve as a measure of the metabolism (Stappaerts et al., 2015, Dezani et al., 2017).

To compare the prediction of drug absorption by different methods, Lozoya-Agullo et al. (2015a) evaluated the permeability of several compounds using in situ intestinal perfusion and Caco-2 cells. Differences in permeability ranges in cell culture compared to in situ perfusion models were observed for all drugs. This is a reflection of the difference in the surface area available for transport (in the cellular model there are only villus, while in the animal model there are villus and folds) and in the expression of transporters (Lozoya-Agullo et al., 2015a).

Although human data are considered most reliable in comparison with in vitro and in situ intestinal perfusion studies, ethical and bureaucratic issues, besides the high cost of studies, should not be ignored. Ethical issues are also involved in the use of animals and experimental protocols must be approved by ethics committees. However, in situ intestinal perfusion is a simple, inexpensive and fast method, and presents a good correlation with the permeability and absorbed fraction data in humans when compared to other in vitro studies, mainly for drugs absorbed by passive diffusion (main route for drug absorption) (Balimane et al., 2000, Cao et al., 2006, Volpe, 2010, Lozoya-Agullo et al., 2015b). Furthermore, this method can be used to evaluate the carrier-mediated mechanisms on permeation process (Cao et al., 2006, Dezani et al., 2017). A single animal produces suitable experimental data for complete kinetic analysis, being four animals the minimum number for obtaining relevant, reliable and safe data (Doluisio et al., 1969).

3.2. Variations of in situ intestinal perfusion

In order to improve and become closer to the reality of the human organism, several variations were developed for in situ intestinal perfusion technique: single-pass intestinal perfusion (Amidon et al., 1981), recirculating perfusion (Van Rees et al., 1974), oscillating perfusion (Schurgers and De Blaey, 1984) and closed-loop method (Doluisio et al., 1969). Among them, single-pass intestinal perfusion and closed-loop or Doluisio method have more widespread application.

In single-pass intestinal perfusion (SPIP), the drug solution is perfused, at a constant flow through a cannula, into 10–15 cm of intestinal segment. Samples are collected in the distal region, in which the intestine was cannulated, at predetermined times (Amidon et al., 1981). Effective permeability (P_{eff}) is calculated from the relationship between the initial and final concentrations of the drug, the flow and the intestinal segment area, according to Eq. (9) (Dahan et al., 2009).

$$P_{eff} = \frac{-Q \cdot \ln\left(\frac{C_f}{C_i}\right)}{2\pi rL} \quad \text{Equation 9}$$

where Q is the perfusion flow rate, C_f/C_i is the ratio of the final and the initial concentration of drug that has been adjusted for water absorption. r is the radius of the intestinal segment and L is the length of the perfused intestinal segment.

In the closed-loop method, the intestinal segment is completely isolated with two cannulas at the beginning and at the end of the segment. Drug solution is perfused and samples are collected at predetermined times. The results are highly reproducible and produce absorption rates realistic and comparable to those calculated from blood concentration from oral administration of drug to humans and animals. The disappearance of drug from the intestinal lumen in the time frame of the experiments (30–60 min) follows an apparent firstorder kinetic process. Moreover, the experimental technique is simple, utilizes readily available laboratory equipment and small volume of perfusion solution, when compared to SPIP, an advantage when only small amounts of compound are available (Doluisio et al., 1969).

In SPIP method permeability is estimated from the ratio of inlet and outlet concentration in the intestinal segment after reaching steadystate while in Closed loop method used in this study we are not under steady-state conditions and we are estimating permeability from the disappearance rate. We have performed a extensive research in order to compare both perfusion methods and calculation approaches and we have demonstrated a very good correlation between both experimental approach, not only for digoxin but also for a extensive dataset of compounds of different physicochemical characteristics and in diferente rat intestinal segments. Both

techniques perform similarly in terms of the obtained P_{eff} values which are comparable in range and in variability.

Lozoya-Agullo et al. (2015b) evaluated the in situ intestinal perfusion of 15 model drugs with different permeability characteristics (low, moderate, and high, as well as passively and actively absorbed), in both SPIP and Doluisio (closed-loop) methods. An excellent correlation (coefficient of determination (r^2) of 0.93) was obtained for the P_{eff} values using the two techniques. Consequently, the absorbed fraction predicted from the permeability values showed a good correlation with human data. In addition, for 14 of the 15 drugs evaluated, the permeability class according to BCS presented, for both methods, was similar to the data reported in the literature (Lozoya-Agullo et al., 2015b).

The comparison of SPIP and Doluisio method has also been performed using intestinal segments such as upper jejunum, mid-small intestine, ileum and colon. Good correlation between the SPIP and Doluisio approaches was obtained for jejunum ($r^2 = 0.95$) and midsmall intestine ($r^2 = 0.9$), while for ileum ($r^2 = 0.85$) and colon ($r^2 = 0.81$), lower values were reported (Lozoya-Agullo et al, 2015b, Lozoya-Agullo et al., 2016, Lozoya-Agullo et al., 2017).

Permeability is dependent on the intestinal region (Dahan et al., 2009), due to this fact, despite the good correlations between SPIP and Doluisio, the second method makes it possible to use any length of intestinal segment (SPIP can only use 10–15 cm), and thus to evaluate the action of transporters better.

It is known that the expression of transporters changes throughout the gastrointestinal tract. For example, two efflux transporters of the small intestine stand out: multidrug-resistance protein 2 (MRP2) and Pglycoprotein (Pgp). Both are located in apical region of the enterocytes, however, MRP2 shows greater expression in proximal region of the small intestine while Pgp has increased expression along the gastrointestinal tract, presenting a higher concentration in the ileum (Yao and Chiou, 2006, Tamaki et al., 2011, Dahan et al., 2012).

Table 1

Absorption rate coefficients and effective permeability values obtained by in situ perfusion method in rat for digoxin (mean \pm SD).

Concentration	k_a (min^{-1})	P_{eff} (cm/s)	
1.0 $\mu\text{g/ml}$	0.016 ± 0.008	2.36×10^{-5}	$\pm 1.25 \times 10^{-5}$
6.0 $\mu\text{g/ml}$	0.031 ± 0.005	4.57×10^{-5}	$\pm 7.96 \times 10^{-6}$
1.0 $\mu\text{g/ml}$ with sodium azide	0.040 ± 0.020	5.58×10^{-5}	$\pm 2.61 \times 10^{-5}$
Intestinal segment			
Duodenum	0.013 ± 0.003	3.61×10^{-5}	$\pm 5.53 \times 10^{-6}$
Jejunum	0.018 ± 0.006	2.69×10^{-5}	$\pm 7.37 \times 10^{-6}$
Ileum	0.009 ± 0.005	1.35×10^{-5}	$\pm 7.45 \times 10^{-6}$

Intestinal perfusion in rats using both closed-loop and single-pass methods provided similar effective permeability values, demonstrating the robustness of the techniques and the possibility of combining data from different laboratories (Lozoya-Agullo et al., 2015b). However, due to the technical simplicity, greater speed and good correlation, the closed-loop method was chosen to carry out the study of digoxin.

3.3. A digoxin study

Permeability of digoxin was evaluated throughout the complete small intestine and in the intestinal segments duodenum, jejunum and ileum.

Absorption rate coefficients (k_a) and effective permeability (P_{eff}) values obtained for digoxin using the in situ intestinal perfusion technique in rats are shown in Table 1.

Fig. 1 shows comparative graphs of P_{eff} values obtained for digoxin at the different concentrations (1.0 $\mu\text{g/ml}$ with and without sodium azide and 6.0 $\mu\text{g/ml}$) used in the study. Sodium azide is a non-specific metabolic inhibitor that produces a decrease in ATP levels due to interference in the transport of electrons in the mitochondrial matrix. Therefore, as the transport system in the rat model was ATP-dependent, sodium azide is able to inhibit the digoxin transport by any type of carrier (uptake and efflux), resulting in the passive permeability of the drug (Valenzuela et al., 2001, Fernandez-Teruel et al., 2005). The passive permeability of digoxin in presence of sodium azide was

about 2-fold higher than effective permeability with both components passive plus secretion carrier-mediated.

Fig. 2 shows comparative graphs of P_{eff} values obtained for digoxin 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in the different intestinal segments. No statistically significant differences were observed between duodenum and jejunum, however statistically significant differences were observed between jejunum and ileum ($p < 0.05$) and between duodenum and ileum ($p < 0.01$).

In order to estimate the kinetic parameters, in addition to the P_{eff} values obtained for clinical doses of digoxin, P_{eff} data of digoxin at 10.0 μM (7.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were reported from Lozoya-Agullo et al. (2016). According to Lozoya-Agullo et al. (2016), digoxin at 10.0 μM showed P_{eff} (\pm SD) of 3.87×10^{-5} ($\pm 1.01 \times 10^{-5}$), 2.93×10^{-5} ($\pm 1.19 \times 10^{-6}$), 2.18×10^{-5} ($\pm 8.14 \times 10^{-6}$), in the intestinal segments duodenum, jejunum and ileum, respectively. Table 2 shows the estimated parameters from the kinetic model described in Eq.(5)–(8).

As it can be seen in Table 2 the estimated passive diffusional component P_{diff} is closer to the experimental value obtained in presence of sodium azide when all the carrier-mediated processes are inhibited. On the other hand, the estimated K_m value is higher than the experimental concentration used in this study and similar to the concentration used by Valizadeh et al. (2012). This fact confirms that the efflux component is not saturated at the clinically relevant concentrations.

A previous attempt to characterize the permeability of digoxin in intestinal segments of rats was performed by Stephens et al. (2001), using excised segments. A P-gp mediated efflux was also demonstrated, which was higher in ileum in accordance with the higher expression levels in this segment, and estimated K_m values ranged from 51 to 81 μM (Stephens et al., 2001). This divergence between K_m values (in this work and in Stephens et al. (2001)) can be due to the differences in experimental conditions (excised segment versus in situ perfusion, and different perfusion buffer). On the other hand the V_m values reported in jejunum and ileum (4.7 and 9.3 $\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$) are closer to our range observed for V_m (1.48 and 2.13 $\text{nmol}/\text{cm}^2/\text{h}$), which is a reasonable difference considering all the changes in experimental variables.

As shown in Fig. 3, the kinetic model presents a good predictive performance considering the simplicity of the assumptions, the diffusional component is corrected based on the surface/volume ratio by using a different radius value (0.25 cm for duodenum; 0.18 cm for jejunum and 0.17 for ileum) and the expression levels reported by Takara et al. (2003) to estimate the V_m in each segment.

Digoxin is rapidly absorbed, with peak serum concentrations occurring within 1.5–6 h after administration of the oral dose. Tablets have a bioavailability of 70–80%, while gel capsules and elixirs approach 100%. The bioavailability of digoxin does not appear to change significantly with advancing age, although the rate of absorption is faster in younger patients (Borron et al., 1997, Hanratty et al., 2000).

From effective permeability values for digoxin (lower than metoprolol), the fraction absorbed (F_a) in humans was predicted by LozoyaAgullo et al. (2015b). Digoxin had F_a predicted in the range of 72–81%, i.e., values closer to the tablets bioavailability and to the reported in the literature (81%) by Varma et al. (2012). Regarding to capsules and elixirs, the increased bioavailability can be related to the presence of excipients able to inhibit the efflux transporter thus leading to a higher permeability value and to a complete fraction absorbed.

Digoxin has a molecular weight of 780.9 g/mol, LogP of 1.46 and 1.95, CLogP of 1.27 and apparent linear absorption, therefore it is considered a lipophilic drug absorbed mainly by passive transcellular route (Kasim et al., 2004). There are reports suggesting the involvement of the OATP-mediated mechanism in the uptake of digoxin. While it is well known that digoxin is a substrate of the P-glycoprotein (Pgp), efflux transporter located on the apical surface of enterocytes and responsible for pumping drugs back into the intestinal lumen (Gandia et al., 2004, Yao and Chiou, 2006, Suzuki et al., 2014, Nielsen et al., 2016, Oda and Murakami, 2017).

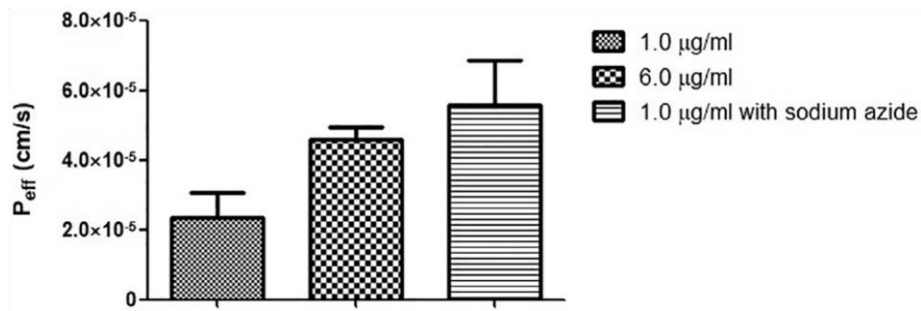


Fig. 1. P_{eff} values obtained by in situ perfusion method in rats ($n = 4-6$) for digoxin 1.0 µg/ml, 6.0 µg/ml and 1.0 µg/ml with sodium azide (mean ± SD). No statistically significant differences were observed ($p > 0.05$).

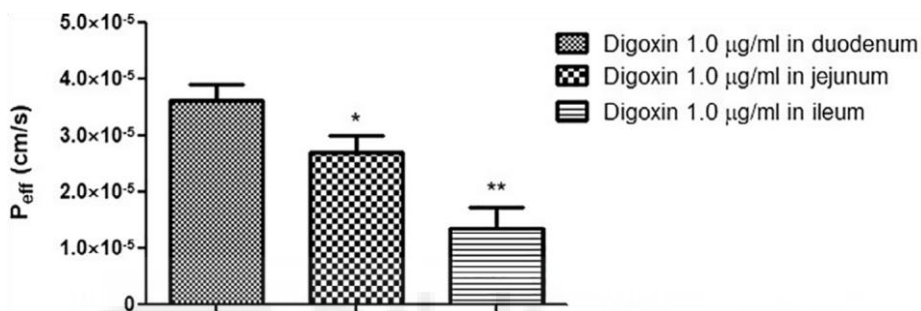


Fig. 2. P_{eff} values obtained by in situ perfusion method in rats ($n = 4-6$) for digoxin 1.0 µg/ml in the intestinal segments duodenum, jejunum and ileum (mean ± SD). * Significant difference between jejunum and ileum ($p < 0.05$). ** Significant difference between duodenum and ileum ($p < 0.01$).

Table 2

Parameters obtained by curve fitting of Eqs. (5)–(8) to the experimental data (concentrations versus time profiles in the three studied segments).

Parameter	Value
P_{diff}	5.97×10^{-5} cm/s
K_m	10.73 µg/ml
V_{mD}	1.77×10^{-3} µg/ml/s
V_{mJ}	4.00×10^{-3} µg/ml/s
V_{mI}	5.77×10^{-3} µg/ml/s
r	0.968
SSR	0.206

r = coefficient of correlation and SSR =residual sum of squares.

P-glycoprotein (Pgp) is widely distributed in the body and is found in epithelial and endothelial tissues, such as the intestinal mucosa and blood-brain barrier, and in organs, such as the liver and kidney. Increasing its importance in drug interactions involving digoxin and in the secretion of the drug along the tissues in the organism (Thiebaut et al., 1989, Fenner et al., 2009, Cook et al., 2010, Suzuki et al., 2014). Regarding drug interactions, Fenner et al. (2009) and Cook et al. (2010) evaluated the clinical relevance of drug-drug interactions mediated through Pgp using digoxin as model drug. These authors identified that many coadministered drugs (co-meds) with digoxin are cardiovascular agents, which caused a clinically significant drug interaction (25% change in AUC ratio). The presence of cardiovascular agents may alter cardiac output and/or renal activity, acting alone or being additional components to increase digoxin exposure along with Pgp interaction (Fenner et al., 2009, Cook et al., 2010).

Analysis of 123 study reports examining digoxin pharmacokinetics in the presence and absence of co-meds (substrates or inhibitors of Pgp) showed only small changes in pharmacokinetic parameters. In addition, inhibition of Pgp is more pronounced in the intestine, since systemic inhibition would cause an increase in exposure < 25% (Fenner et al., 2009).

Digoxin administered as tablets is approximately 70% absorbed. If Pgp only limits the absorption of digoxin, then a maximum increase of 42% in exposure (AUC) would be expected when coadministered with a potent inhibitor acting only in the intestine. In contrast, digoxin administered as soft gelatin capsule is almost completely absorbed, not expecting changes in exposure when coadministered with a similar inhibitor, thus being less susceptible to clinically important interactions. Less drug-drug interactions were observed after intravenous administration of digoxin, suggesting that interactions resulting in digoxin toxicities may be a greater concern with tablets rather than capsules (complete absorption in the upper gastrointestinal tract) (Fenner et al. 2009, Cook et al., 2010).

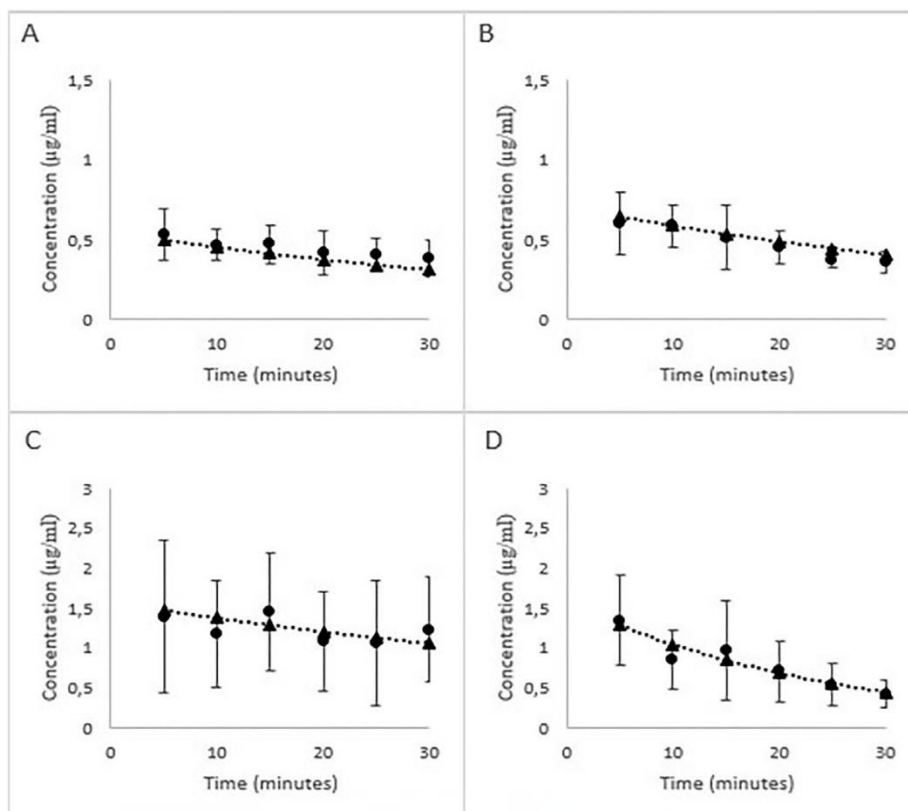


Fig. 3. Mean experimental concentrations (●) obtained by in situ perfusion method in rats (n =4–6) for digoxin and the model (Eq (5)-(8) predicted ones (▲) in: (A) duodenum, (B) jejunum, (C) ileum and (D) ileum in presence of sodium azide.

In the intestine, inhibition of the Pgp by coadministration of drugs can increase the absorption of its drug substrates. Due to its narrow therapeutic index, interactions with digoxin are particularly important because any inhibition of the Pgp action can lead to potentially toxic increases in systemic circulation. Pgp is also expressed at high levels in the liver, kidneys and blood-brain barrier, then, interactions mediated by the competitive inhibition of this efflux transporter can also have significant effects on tissue excretion and distribution, especially in the penetration of drugs into the brain (Collett et al., 2005, Fenner et al., 2009).

Intestinal secretion of drugs is an important clearance mechanism that also affects the oral bioavailability of many drugs. Intestinal secretory capacity does not only affect absorption kinetics but also contributes to total clearance of cardiac glycosides (Hunter and Hirst, 1997).

Mayer et al. (1996) showed this by evaluating the excretion of digoxin and its distribution along the tissues in wild-type mice and in mice with a disrupted *mdr1a* gene (*mdr1a* (-/-) mice), i.e., mice without expression of Pgp (Mayer et al., 1996).

Intestinal Pgp contributes to a substantial excretion of digoxin through the intestinal epithelium, not only being important for the elimination of the drug from the systemic circulation, but also for a decrease in the intestinal re-uptake of digoxin after biliary excretion, modulating its absorption along the intestine (Mayer et al., 1996).

In the brain of wild-type mice, digoxin levels remained very low, while in *mdr1a* (-/-) mice these levels gradually increased over 3 days, resulting in approximately 200-fold difference from wild-type mice in the same period. The prolonged accumulation of digoxin in brains of *mdr1a* (-/-) mice reinforces the pharmacological importance of Pgp in the blood-brain barrier, making doctors and scientists aware of a possible increased risk of toxicity in patients exposed to coadministration of substrates or inhibitors of Pgp with digoxin (Mayer et al., 1996).

Many studies performed to provisionally classify drugs according to the BCS, only evaluate solubility data and LogP (experimental) or CLogP (predicted) values, which frequently can overestimate or infraestimate experimental permeability if there are carrier-mediated processes, as the lipophilicity is a good predictor only of the passive diffusional component. For example, digoxin is often provisionally classified as BCS class I or II (Kasim et al., 2004, Lindenberg et al., 2004, Wu and Benet, 2005, Butler and Dressman, 2010).

Other studies using different techniques have demonstrated the divergence regarding the permeability of digoxin.

Varma and Panchagnula (2005) evaluated the permeability for several compounds, among them, digoxin, using in situ single-pass perfusion method in rat. Intestinal perfusion of digoxin at 20 μM (15.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was performed along 12–15 cm of ileum, and showed P_{eff} equal to $0.04 \times 10^{-4} \text{ cm}/\text{s}$. This value indicates low permeability because only drugs with P_{eff} higher than $0.2 \times 10^{-4} \text{ cm}/\text{s}$ are completely absorbed (Varma et al., 2004, Varma and Panchagnula, 2005).

Valizadeh et al. (2012) evaluated the permeability of digoxin using in situ permeation studies in rats in 10 cm of jejunum and four different concentrations of digoxin. Effective permeability (cm/s) of digoxin at concentrations of 5, 10, 15 and 20 μM (3.9, 7.8, 11.7 and 15.6 $\mu\text{g/ml}$) were 3.0×10^{-5} , 2.9×10^{-5} , 3.2×10^{-5} and 2.4×10^{-5} , respectively. Digoxin was classified as BCS class IV, because it presented, in addition to $P_{\text{eff}} < 5.09 \times 10^{-5}$ cm/s (on the basis of the relationship between human and rat intestinal permeability, P_{eff} values in rats $> 5.09 \times 10^{-5}$ cm/s correspond to $F_a > 85\%$), a dose number (D_o) greater than 1 (Zakeri-Milani et al., 2009, Valizadeh et al., 2012).

In a third study, permeability values of digoxin were determined using the 2/4/A1 cell line (2/4/A1 is rat fetal intestinal epithelial cell and has a paracellular permeability comparable with human small intestinal epithelium, showing a better correlation with human effective permeability). The cutoff value for high permeability compounds is 55×10^{-6} cm/s in this cell line. So, digoxin (range from 0.1 mM (78.0 $\mu\text{g/ml}$) to 1.0 mM (780.0 $\mu\text{g/ml}$)) with P_{app} equal to $56, 1 \times 10^{-6}$ cm/s was considered highly permeable (Zaki et al., 2010).

Transport studies across the rat ileum using Ussing chambers were performed and it was observed that only about 3–4% of perfused digoxin (10 μM –7.8 $\mu\text{g/ml}$) was absorbed. Demonstrating P_{app} between 8 and 10×10^{-6} cm/s (Oga et al., 2013). While in an intestinal absorption study in rats using in situ closed-loop perfusion method, digoxin at concentrations of 10 (7.8 $\mu\text{g/ml}$) and 100 μM (78.0 $\mu\text{g/ml}$), presented an estimated absorption of 27 and 53%, respectively (Suzuki et al., 2014).

Due to this divergence of values and to the fact that most studies have been performed at concentrations higher than clinical concentrations (i.e dose/administered volume assuming complete dissolution) not ensuring the saturation of efflux transporters, and consequently overestimating permeability values, it was decided to perform the permeability studies of digoxin, in clinical doses/concentration, using in situ closed-loop perfusion method in rats.

The results obtained (Table 1) for P_{eff} of digoxin were analyzed by comparison with the P_{eff} values obtained for metoprolol (high permeability standard). Drugs that

have permeability values below the P_{eff} value of metoprolol are considered poorly permeable.

Ruiz-Picazo et al. (2017) using in situ perfusion in rats study based in Doluisio method found that metoprolol shows P_{eff} of 6.24×10^{-5} cm/s, 6.85×10^{-5} cm/s and 9.05×10^{-5} cm/s for complete small intestine, jejunum and ileum, respectively (Ruiz-Picazo et al., 2017).

Beyond to the comparison with metoprolol, the P_{eff} values obtained for digoxin were evaluated according to the guidelines established by Zakeri-Milani et al. (2009): a drug is highly permeable when exhibits P_{eff} (rat) $> 5.09 \times 10^{-5}$ cm/s, and of low permeability when P_{eff} (rat) $< 4.2 \times 10^{-5}$ cm/s. Drugs with effective permeability between 4.2×10^{-5} and 5.09×10^{-5} cm/s were considered as borderline (Zakeri-Milani et al., 2009).

Clinical doses of 0.25 mg (1.0 μ g/ml) and 1.5 mg (6.0 μ g/ml) showed P_{eff} below the P_{eff} value for metoprolol (6.4×10^{-5} cm/s) as well as below the limits established by Zakeri-Milani et al. (2009). In addition, both concentrations had P_{eff} values below the passive permeability of digoxin (digoxin with sodium azide) indicating that administration of these two doses did not saturate the efflux transporter.

Regarding the intestinal segments, a greater effective permeability was observed in the duodenum and jejunum (no statistically significant differences were observed between these two segments $p > 0.05$) when compared to ileum (Table 1 and Fig. 2).

Permeability is dependent on the intestinal region. In addition to the heterogeneous expression of efflux transporters (e.g. MRP2 and Pgp), the regional permeability is determined by the physicochemical properties of the drug and the function of the membrane and the pH of intestinal fluids. The intestinal segments differ in many aspects, being the total lipid surface area, tight junctional resistance and area, enzymatic activities, amount and capacity of transporters, water flow, unstirred water layer and capillary blood flow, the main factors affecting permeability (Fagerholm et al., 1997, Ungell et al., 1998). However, the segmental absorption of digoxin points out the differential contribution of the efflux component associated with the different expression level. Distribution of P-glycoprotein is not homogeneous along the intestine

and there is a progressive increase in the function/expression of Pgp from duodenum to ileum (Yao and Chiou, 2006, Nishimura et al., 2008). Incorporating in the mathematical model the reported expression levels has permitted a good prediction of the concentrations versus time digoxin intestinal profiles.

Such in the complete small intestine, the P_{eff} values obtained for digoxin in the intestinal segments were lower than P_{eff} values for metoprolol and the limit imposed by Zakeri-Milani et al. (2009) for highly permeable drugs.

Therefore, the results obtained using in situ perfusion technique based on Doluisio method, in these experimental conditions, along with the parameter estimation based in a kinetic model involving passive and efflux mechanism suggest the low permeability of digoxin at the clinical concentrations, with a decrease in the drug permeation along the small intestine.

4. Conclusion

Among the techniques recommended by regulatory agencies for the classification of drugs according to BCS, intestinal perfusion in rats has been widely used due to simplicity, low cost and throughput when compared to in vivo studies in humans. In comparison with Caco-2 cells method, even if the cell culture could provide a higher throughput for screening, the rat presents more similar expression of transporters and the advantage of segmental comparisons. In summary, it shows good correlation with human data, due to physiological and morphological similarities between the two species.

The application of the in situ perfusion technique in rats allowed the evaluation of the effective permeability of digoxin, in clinically relevant concentrations (i.e dose/250 ml), suggesting the low permeability of this drug, due to lower P_{eff} values when compared with metoprolol and to the cutoff value proposed by Zakeri-Milani et al. (2009). The estimated K_m value demonstrated that at clinical concentrations the efflux process is not saturated and then it could be inhibited by other drugs, excipients or food components leading to the already reported clinical drug-drug and drug-food

interactions. The present data confirms from a mechanistic point of view these interactions.

It should be emphasized that the techniques used to classify the permeability of drugs according to the guidelines of the BCS must be standardized. It is essential to know the variables and possible modifications in the experimental procedure, in order to apply the most suitable model to optimize the results, generating data as close as possible to the reality of the human organism.

Acknowledgments

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil, fellowship Edital nº 19/2016) for financial support to the stage of Tamires Guedes Caldeira in Universidad Miguel Hernandez. Partial support from “MODELOS IN VITRO DE EVALUACION BIOFARMACEUTICA” SAF2016-78756 (AEI/FEDER, EU) funded by Agencia Estatal Investigación and European Union, through FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional).

Appendix

Table A1

Winnonlin ASCII code.

Model 1

remark

remark Developer: Marival Bermejo remark Digoxin absorption model in rat intestinal segments at

remark different initial concentrations and in presence of sodium azide

remark Model Date: 07-26-2017 remark

remark – define model-specific commands

COMMANDS

NFUNCTIONS 4

NDERIVATIVES 4

NPARAMETERS 3

PNames 'Pdiff','km','vm'

Ncons 3 END

remark – define temporary variables

TEMPORARY Pdiff = P(1) km = P(2) vm = P(3) A = con(1) e1 = con(2) e2 = con(3)

remark A = Lduo/lileon 0.222 remark e1 = 1/3.25 and e2 = 1/1.44 from Takara et al.

t = x END

remark – define differential equations starting values

START

Z(1) = 0.55

Z(2) = 0.7082

Z(3) = 1.58

Z(4) = 1.59 END

remark - define differential equations rema Z(1) duodenum Z(2) jejunum rema Z(3) ileum Z(4) ileum + azida

DIFF

DZ(1) = -A * (2 * (Pdiff/0.25) * Z(1)) + (e1 * Vm * Z(1)/(km + Z(1)))

DZ(2) = -(2 * (Pdiff/0.18) * Z(2)) + (e2 * vm * Z(2)/(km + Z(2)))

DZ(3) = -(2 * (Pdiff/0.17) * Z(3)) + (vm * Z(3)/(km + Z(3)))

DZ(4) = -2 * (Pdiff/0.17) * Z(4) END

remark – define algebraic functions

FUNCTION 1

F = Z(1)

END

FUNCTION 2

F = Z(2)

END

FUNCTION 3

F = Z(3)

END

FUNCTION 4

F = Z(4)

END

EOM

References

Amidon, G.E., Ho, N.F.H., French, A.B., Higuchi, W.I., 1981. Predicted absorption rates with simultaneous bulk fluid flow in the intestinal tract. *J. Theor. Biol.* 89, 195–210. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(81\)90306-4](https://doi.org/10.1016/0022-5193(81)90306-4).

Amidon, G.L., Lennernäs, H., Shah, V.P., Crison, J.R., 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 12, 413–420. <https://doi.org/10.1023/A:1016212804288>.

Balimane, P.V., Chong, S., Morrison, R.A., 2000. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 44, 301–312. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(00\)00113-1](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00113-1).

Borron, S.W., Bismuth, C., Muszynski, J., 1997. Advances in the management of digoxin toxicity in the older patient. *Drugs Aging* 10, 18–33. <https://doi.org/10.2165/00002512-199710010-00003>.

Butler, J.M., Dressman, J.B., 2010. The developability classification system: application of biopharmaceutics concepts to formulation development. *J. Pharm. Sci.* 99, 4940–4954. <https://doi.org/10.1002/jps.22217>.

Cao, X., Gibbs, S.T., Fang, L., Miller, H.A., Landowski, C.P., Shin, H.C., Lennernas, H., Zhong, Y., Amidon, G.L., Yu, L.X., Sun, D., 2006. Why is it challenging to predict intestinal drug absorption and oral bioavailability in human using rat model. *Pharm. Res.* 23, 1675–1685. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9041-2>.

Collett, A., Tanianis-Hughes, J., Carlson, G.L., Harwood, M.D., Warhurst, G., 2005. Comparison of P-glycoprotein-mediated drug–digoxin interactions in Caco-2 with human and rodent intestine: Relevance to in vivo prediction. *Eur. J. Pharm. Sci.* 26, 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.07.013>.

Cook, J.A., Feng, B., Fenner, K.S., Kempshall, S., Liu, R., Rotter, C., Smith, D.A., Troutman, M.D., Ullah, M., Lee, C.A., 2010. Refining the in vitro and in vivo critical parameters for P-Glycoprotein, $[I]/IC_{50}$ and $[I_2]/IC_{50}$, that allow for the exclusion of drug candidates from clinical digoxin interaction studies. *Mol. Pharm.* 7, 398–411. <https://doi.org/10.1021/mp900174z>.

Dahan, A., West, B.T., Amidon, G.L., 2009. Segmental-dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: evaluation of a triple singlepass intestinal perfusion (TSPiP) approach in the rat. *Eur. J. Pharm. Sci.* 36, 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.10.013>.

Dahan, A., Lennernas, H., Amidon, G.L., 2012. The fraction dose absorbed, in humans, and high jejunal human permeability relationship. *Mol. Pharm.* 9, 1847–1851. <https://doi.org/10.1021/mp300140h>.

Dezani, T.M., Dezani, A.B., Silva, M.M.C., Serra, C.H.R., 2017. In situ intestinal perfusion in rodents: future perspectives for application on absorption studies and classification of drugs. *Mini Rev. Med. Chem.* 17, 746–757. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160921145613>.

Doluisio, J.T., Billups, N.F., Dittert, L.W., Sugita, E.T., Swintosky, J.V., 1969. Drug absorption I: an in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J. Pharm. Sci.* 58, 1196–1200. <https://doi.org/10.1002/jps.2600581006>.

EMA (2010). Guideline on the investigations of bioequivalence. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf (Accessed 01.12.2017).

Fagerholm, U., Lindahl, A., Lennernäs, H., 1997. Regional intestinal permeability in rats of compounds with different physicochemical properties and transport mechanisms. *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 687–1490. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06093.x>.

FDA (2015). Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms base on a Biopharmaceutics Classification System. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf> (Accessed 01.12.17).

Fenner, K.S., Troutman, M.D., Kempshall, S., Cook, J.A., Ware, J.A., Smith, D.A., Lee, C.A., 2009. Drug-Drug interactions mediated through P-Glycoprotein: clinical relevance and In Vitro–In Vivo correlation using digoxin as a probe drug. *Clin. Pharmacol. Ther.* 85, 173–181. <https://doi.org/10.1038/clpt.2008.195>.

Fernandez-Teruel, C., González-Álvarez, I., Casabó, V.G., Ruiz-Garcia, A., Bermejo, M., 2005. Kinetic modelling of the intestinal transport of sarafloxacin. *Studies in situ in rat and in vitro in Caco-2 cells.* *J. Drug Target.* 13, 199–212. <https://doi.org/10.1080/10611860500087835>.

Fogh, J., Trempe, G., 1975. New human tumor cell lines. In: Fogh, J. (Ed.), *Human Tumor Cells In Vitro*. Plenum, New York, pp. 115–141.

Gandia, P., Lacombe, O., Woodley, J., Houin, G., 2004. The perfused everted intestinal segment of rat. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 54, 467–473.

Gonçalves, J.E., Fernandes, M.B., Chiann, C., Gai, M.N., Souza, J., Storpirtis, S., 2012. Effect of pH, mucin and bovine serum on rifampicin permeability through Caco-2 cells. *Biopharm. Drug Dispos.* 33, 316–323. <https://doi.org/10.1002/bdd.1802>.

González-Álvarez, I., Fernández-Teruel, C., Casabó-Alós, V.G., Garrigues, T.M., Polli, J.E., Ruiz-García, A., Bermejo, M., 2007. In situ kinetic modelling of intestinal efflux in rats: functional characterization of segmental differences and correlation with in vitro results. *Biopharm. Drug Dispos.* 28, 229–239. <https://doi.org/10.1002/bdd.548>.

Hanratty, C.G., McGlinchey, P., Johnston, G.D., Passmore, A.P., 2000. Differential pharmacokinetics of digoxin in elderly patients. *Drugs Aging* 17, 353–362. <https://doi.org/10.2165/00002512-200017050-00003>.

Hens, B., Corsetti, M., Spiller, R., Marciani, L., Vanuytsel, T., Tack, J., Talattof, A., Amidon, G.L., Koziolk, M., Weitschies, W., Wilson, C.G., Bennink, R.J., Brouwers, J., Augustijns, P., 2016. Exploring gastrointestinal variables affecting drug and formulation behavior: methodologies, challenges and opportunities. *Int. J. Pharm.* 519, 79–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.11.063>.

Hilgers, A.R., Conradi, R.A., Burton, P.S., 1990. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm. Res.* 7, 902–910. <https://doi.org/10.1023/A:1015937605100>.

Hunter, J., Hirst, B.H., 1997. Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 25, 129–157. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00497-3](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00497-3).

Kasim, N.A., Whitehouse, M., Ramachandran, C., Bermejo, M., Lennernäs, H., Hussain, A.S., Junginger, H.E., Stavchansky, S.A., Midha, K.K., Shah, V.P., Amidon, G.L., 2004. Molecular properties of who essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol. Pharm.* 1, 85–96. <https://doi.org/10.1021/mp034006h>.

Lautenschläger, I., Dombrowsky, H., Frerichs, I., Kuchenbecker, S.C., Bade, C., Schultz, H., Zabel, P., Scholz, J., Weiler, N., Uhlig, S., 2010. A model of the isolated perfused rat small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298, 304–313. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00313.2009>.

Lennernäs, H., 1997. Human jejunal effective permeability and its correlation with preclinical drug absorption models. *J. Pharm. Pharmacol.* 49, 627–638. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06084.x>.

Lennernäs, H., 2014. Regional intestinal drug permeation: biopharmaceutics and drug development. *Eur. J. Pharm. Sci.* 57, 331–341. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2013.08.025>.

Lindenberg, M., Kopp, S., Dressman, J.B., 2004. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.001>.

Lozoya-Agullo, I., Zur, M., Wolk, O., Beig, A., González-Álvarez, I., González-Álvarez, M., Merino-Sanjuán, M., Bermejo, M., Dahan, A., 2015b. In-situ intestinal rat perfusions for human Fabs prediction and BCS permeability class determination: investigation of the single-pass vs. the Doluisio experimental approaches. *Int. J. Pharm.* 480, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.01.014>.

Lozoya-Agullo, I., González-Álvarez, I., González-Álvarez, M., Merino-Sanjuán, M., Bermejo, M., 2015a. In situ perfusion model in rat colon for drug absorption studies: comparison with small intestine and Caco-2 cell model. *J. Pharm. Sci.* 104, 3136–3145. <https://doi.org/10.1002/jps.24447>.

Lozoya-Agullo, I., Zur, M., Beig, A., Fine, N., Cohen, Y., González-Álvarez, M., MerinoSanjuán, M., González-Álvarez, I., Bermejo, M., Dahan, A., 2016. Segmental-dependent permeability throughout the small intestine following oral drug administration: single-pass vs. Doluisio approach to in-situ rat perfusion. *Int. J. Pharm.* 515, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.061>.

Lozoya-Agullo, I., Zur, M., Fine-Shamir, N., Markovic, M., Cohen, Y., Porat, D., GonzálezÁlvarez, I., González-Álvarez, M., Merino-Sánjuan, M., Bermejo, M., Dahan, A., 2017. Investigating drug absorption from the colon: single-pass vs. Doluisio approaches

to in-situ rat large-intestinal perfusion. *Int. J. Pharm.* 527, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.018>.

Mayer, U., Wagenaar, E., Beijnen, J.H., Smit, J.W., Meijer, D.K.F., Asperen, J.V., Borst, P., Schinkel, A.H., 1996. Substantial excretion of digoxin via the intestinal mucosa and prevention of long-term digoxin accumulation in the brain by the mdr1a P-glycoprotein. *Br. J. Pharmacol.* 119, 1038–1044. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1996.tb15775.x>.

Neuhoff, S., Yeo, K.R., Barter, Z., Jamei, M., Turner, D.B., Hodjegan, A.M., 2013. Application of permeability-limited physiologically-based pharmacokinetic models: Part I-Digoxin pharmacokinetics incorporating P-Glycoprotein-mediated efflux. *J. Pharm. Sci.* 102, 3145–3160. <https://doi.org/10.1002/jps.23594>.

Nielsen, C.U., Abdulhussein, A.A., Colak, D., Holm, R., 2016. Polysorbate 20 increases oral absorption of digoxin in wild-type Sprague Dawley rats, but not in mdr1a(-/-) Sprague Dawley rats. *Int. J. Pharm.* 513, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.011>.

Nishimura, T., Kato, Y., Amano, N., Ono, M., Kubo, Y., Kimura, Y., Fujita, H., Tsuji, A., 2008. Species difference in intestinal absorption mechanism of etoposide and digoxin between cynomolgus monkey and rat. *Pharm. Res.* 25, 2467–2476. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9658-4>.

Oda, K., Murakami, T., 2017. Pharmacokinetic interaction of green tea beverage containing cyclodextrins and high concentration catechins with P-glycoprotein substrates in LLC-GA5-COL150 cells in vitro and in the small intestine of rats in vivo. *J. Pharm. Pharmacol.* 69, 1736–1744. <https://doi.org/10.1111/jphp.12817>.

Oga, E.F., Sekine, S., Horie, T., 2013. Ex vivo and in vivo investigations of the effects of extracts of *Vernonia amygdalina*, *Carica papaya* and *Tapinanthus sessilifolius* on digoxin transport and pharmacokinetics: assessing the significance on rat intestinal p-glycoprotein efflux. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 28, 314–320. <https://doi.org/10.2133/dmpk.DMPK-12-RG-117>.

Pinto, M., Robine, S., Appay, M.D., 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* 47, 323–330. Ruiz-Picazo, A., Lozoya-Agullo, I., Ortiz-Azcarate, M., Merino-Sanjuán, M., GonzálezÁlvarez, M., González-Álvarez, I., Bermejo, M., 2017. Comparison of segmental-dependent permeability in human and in situ perfusion model in rat. *Eur. J. Pharm. Sci.* 107, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.06.033>.

Schurgers, N., De Blaey, C.J., 1984. Effect of pH, buffer concentration and buffer composition on the absorption of theophylline from the small intestine of the rat. *Int. J. Pharm.* 19, 283–295. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(84\)90058-9](https://doi.org/10.1016/0378-5173(84)90058-9).

Souza, J., Freitas, Z.M.F., Storpirtis, S., 2007. Modelos in vitro para determinação da absorção de fármacos e previsão da relação dissolução/absorção. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 43, 515–527. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000400004>.

Souza, J., Benet, L.Z., Huang, Y., Storpirtis, S., 2009. Comparison of bidirectional lamivudine and zidovudine transport using MDCK, MDCK–MDR1, and Caco-2 cell monolayers. *J. Pharm. Sci.* 98, 4413–4419. <https://doi.org/10.1002/jps.21744>.

Stappaerts, J., Brouwers, J., Annaert, P., Augustijns, P., 2015. In situ perfusion in rodents to explore intestinal drug absorption: challenges and opportunities. *Int. J. Pharm.* 478, 665–681. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.11.035>.

Stephens, R.H., O'Neill, C.A., Warhurst, A., Carlson, G.L., Rowland, M., Warhurst, G., 2001. Kinetic profiling of P-glycoprotein-mediated drug efflux in rat and human intestinal epithelia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, 584–591.

Suzuki, M., Komura, H., Yoshikawa, T., Enya, S., Nagao, A., Takubo, H., Kogayu, M., 2014. Characterization of gastrointestinal absorption of digoxin involving influx and efflux transporter in rats: application of *mdr1a* knockout (-/-) rats into absorption study of multiple transporter substrate. *Xenobiotica* 44, 1039–1045. <https://doi.org/10.3109/00498254.2014.920551>.

Takara, K., Ohnishi, N., Horibe, S., Yokoyama, T., 2003. Expression profiles of drugmetabolizing enzyme CYP3A and drug efflux transporter multidrug resistance 1

subfamily mRNAs in small intestine. *Drug Metab. Dispos.* 31, 1235–1239. <https://doi.org/10.1124/dmd.31.10.1235>.

Tamaki, A., Ierano, C., Szakacs, G., Robey, R.W., Bates, S.E., 2011. The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. *Essays Biochem.* 50, 209–232. <https://doi.org/10.1042/BSE0500209>.

Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., Willingham, M.C.,

1989. Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the Multidrug Transport Protein P170: evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J. Histochem. Cytochem.* 37, 159–164. <https://doi.org/10.1177/37.2.2463300>.

Tugcu-Demiroz, F., González-Álvarez, I., González-Álvarez, M., Bermejo, M., 2014. Validation of phenol red versus gravimetric method for water reabsorption correction and study of gender differences in Doluisio's absorption technique. *Eur. J. Pharm. Sci.* 62, 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.05.016>.

Ungell, A.L., Nylander, S., Bergstrand, S., Sjöberg, A., Lennernäs, H., 1998. Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat. *J. Pharm. Sci.* 87, 360–366. <https://doi.org/10.1021/js970218s>.

Ussing, H.H., Zerahn, K., 1951. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol. Scand.* 23, 110–127. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1951.tb00800.x>.

Valenzuela, B., Nácher, A., Casabó, V.G., Martín-Villodre, A., 2001. The influence of active secretion processes on intestinal absorption of salbutamol in the rat. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 52, 31–37. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(01\)00155-2](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(01)00155-2).

Valizadeh, H., Mehtari, M., Zakeri-Milani, P., 2012. Evidence for enhanced intestinal absorption of digoxin by p-glycoprotein inhibitors. *Trop. J. Pharm. Res.* 11, 939–945. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v11i6.10>.

Van Rees, H., De Wolff, F.A., Noach, E.L., 1974. The influence of diphenylhydantoin on intestinal glucose absorption in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 28, 310–315. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(74\)90284-2](https://doi.org/10.1016/0014-2999(74)90284-2).

Varma, M.V., Gardner, I., Steyn, S.J., Nkansah, P., Rotter, C.J., Whitney-Pickett, C., Zhang, H., Di, L., Cram, M., Fenner, K.S., El-Kattan, A.F., 2012. pH-dependent solubility and permeability criteria for provisional Biopharmaceutics Classification (BCS and BDDCS) in early drug Discovery. *Mol. Pharm.* 9, 1199–1212. <https://doi.org/10.1021/mp2004912>.

Varma, M.V.S., Panchagnula, R., 2005. Prediction of in vivo intestinal absorption enhancement on P-Glycoprotein inhibition, from rat in situ permeability. *J. Pharm. Sci.* 94, 1694–1704. <https://doi.org/10.1002/jps.20309>.

Varma, M.V.S., Kapoor, N., Sarkar, M., Panchagnula, R., 2004. Simultaneous determination of digoxin and permeability markers in rat in situ intestinal perfusion samples by RP-HPLC. *J. Chromatogr. B* 813, 347–352. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.09.047>.

Volpe, D.A., 2010. Application of method suitability for drug permeability classification. *AAPS J.* 12, 670–678. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9227-8>.

WHO (2015). WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/81144/1/WHO_TRS_981_eng.pdf (Accessed 01.12.17).

Wilson, T.H., Wiseman, G., 1954. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J. Physiol.* 123, 116–125. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1954.sp005036>.

Wu, C.Y., Benet, L.Z., 2005. Predicting drug disposition via application of bcs: transport/ absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm. Res.* 22, 11–23. <https://doi.org/10.1007/s11095-004-9004-4>.

Determination of intestinal permeability using in situ perfusion model in rats: Challenges and advantages to BCS classification applied to digoxin

Yao, H.M., Chiou, W.L., 2006. The complexity of intestinal absorption and exsorption of digoxin in rats. *Int. J. Pharm.* 322, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.05.030>.

Zakeri-Milani, P., Valizadeh, H., Tajerzadeh, H., Islambulchilar, Z., 2009. The utility of rat jejunal permeability for biopharmaceutics classification system. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 35, 1496–1502. <https://doi.org/10.3109/03639040903037199>.

Zaki, N.M., Artursson, P., Bergström, C.A.S., 2010. A modified physiological bcs for prediction of intestinal absorption in drug discovery. *Mol. Pharm.* 7, 1478–1487. <https://doi.org/10.1021/mp100124f>.



In Vitro Dissolution as a Tool for Formulation Selection: Telmisartan Two-Step IVIVC

Autores: Alejandro Ruiz Picazo, M^a Teresa Martinez-Martinez, Sarin Colon-Useche, Ramon Iriarte, Barbara Sánchez-Dengra, Marta Gonzalez-Alvarez, Alfredo García-Arieta, Isabel Gonzalez-Alvarez, Marival Bermejo

Revista: Molecular Pharmaceutics 2018, 15, 2307-2315

DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00153

ABSTRACT:

The purpose of this investigation was to develop an exploratory two-step level A IVIVC for three telmisartan oral immediate release formulations, the reference product Micardis, and two generic formulations (X1 and X2). Correlation was validated with a third test formulation, Y1. Experimental solubility and permeability data were obtained to confirm that telmisartan is a class II compound under the Biopharmaceutic Classification System. Bioequivalence (BE) studies plasma profiles were combined using a previously published reference scaling procedure. X2 demonstrated in vivo BE, while X1 and Y1 failed to show BE due to the lower boundary of the 90% confidence interval for C_{max} being outside the acceptance limits. Average plasma profiles were deconvoluted by the Loo-Riegelman method to obtain the oral fractions absorbed (f_a). Fractions dissolved (f_{diss}) were obtained in several conditions in USP II and USP IV apparatus, and later, the results were compared in order to find the most biopredictive model, calculating the f₂ similarity factor. The apparatus and conditions showing the same rank order than in vivo data were selected for further refinement of conditions. A Levy plot was constructed to estimate the time scaling factor and to make both processes, dissolution and absorption, superimposable. The in vitro dissolution experiment that reflected more accurately the in vivo behavior of the different formulations of telmisartan employed the USP IV dissolution apparatus and a dissolution environment with a flow rate of 8 mL/min and a three-step pH change, from 1.2 to 4.5 and 6.8, with a 0.05% of Tween 80. Thus, these conditions gave rise to a biopredictive dissolution test. This new model is able to predict the formulation differences in dissolution that were previously observed in vivo, which could be used as a risk-analysis tool for formulation selection in future bioequivalence trials



INTRODUCTION

In vivo predictive dissolution methods (iPD) are useful tools for product development, since they have the ability to predict with accuracy and precision the bioequivalence of new formulations of the innovator or generic products after patent expiration.

In vitro–in vivo correlations (IVIVC) are developed to confirm that in vitro dissolution methods are predictive within the design space under investigation. IVIVC corresponds with a mathematical model that allows, after the validation of its predictability by comparison with human in vivo results, to pass from an in vitro characteristic of a drug product to its in vivo biological behavior, such as from the in vitro dissolution profiles to in vivo absorption profiles.

Class II drugs are characterized by low solubility and high permeability, and in this case, dissolution is the limiting process in the absorption rate. For low solubility drugs, bioequivalence should in principle be demonstrated by means of human pharmacokinetics studies unless a class A IVIVC is developed and validated. Level A correlation is a point to point relationship between the in vitro dissolution and the in vivo absorption rate of a drug from the dosage form.¹

The main objective of this investigation was to develop an exploratory two-step level A IVIVC for three telmisartan oral immediate release formulations, the reference product Micardis, and two generic formulations (X1 and X2). X2 demonstrated in vivo bioequivalence (BE), while X1 failed to show bioequivalence due to the lower boundary of the 90% confidence interval for C_{\max} being outside the acceptance limits.

Telmisartan belongs to class II of the Biopharmaceutic Classification System. It is a low solubility, high permeability compound ($\log P$ of 7.23²) with pH-dependent solubility.³ Telmisartan is an ionizable substance with pKa values of 3.5, 4.1, and 6.0. Its solubility is extremely low between pH 3 and 9 (intrinsic solubility = 0.00469 $\mu\text{g/mL}$).⁴

In the present work, telmisartan BCS classification was experimentally confirmed through solubility–pH profile characterization and permeability estimation in vitro. The work included the in vivo BE assay provided by a pharmaceutical company, the development of the in vitro dissolution method, the analysis of the potential reasons of the BE failure on the basis of drug and formulation characteristics, and the development of the in vitro–in vivo correlation.

EXPERIMENTAL SECTION

Drug and Formulations. Telmisartan ($MW = 514.64 \text{ g/mol}$; $\log P = 7.23^2$) was given by a pharmaceutical company. Test formulations and the reference product were kindly provided by two pharmaceutical companies. All of them consist of immediate release telmisartan formulations with conventional excipients in customary amounts. Metoprolol and HPLC liquids were purchased from Sigma (Barcelona, Spain).

In Vivo Studies. Study 1 was a single-blind, controlled, balanced, randomized, two-period crossover BE study using 71 healthy subjects. Study 2 was an open label, balanced, randomized, two-treatment, three-period, three sequence, single-dose, reference-replicated, crossover, BE study in 55 healthy subjects. In each study, the volunteers received two formulations, one immediate release (IR) dose of the test formulation (X1 or X2, 80 mg) and one dose of the reference formulation (Micardis, 80 mg) in a sequence determined by randomization. A washout period of 14 and 10 days, respectively, was set between periods in each study. Blood samples were taken up to 72 h. Telmisartan concentration in blood samples was determined by a validated HPLC method in both studies. C_{max} and AUC were calculated from the average or individual plasma concentration time profiles. AUC were estimated individually by noncompartmental methods from the in vivo observations. On the other hand, public data from the 90% confidence interval as the outcome of a third BE study was available as well as the employed formulation Y1, which was also kindly provided by the manufacturing pharmaceutical company.

The results obtained in all of the crossover BE studies are reported in Table 1. The nonbioequivalent formulations X1 and Y1 (NBE) were not bioequivalent formulation in C_{max}, as their 90% confidence interval was not inside the acceptance limits (0.8–1.25). In addition, the 90% confidence intervals of the X1 and Y1 C_{max} did not include the 100% value, showing that there was a statistical significant difference with the reference products at the significance level employed.

Experimental Techniques. Solubility Assays: Saturation Shake-Flask Procedure. The solubility of telmisartan was estimated by adding an excess of solid in a standard buffer solution at 37 °C (pH 1.2, 4.5, and 6.8) and taking samples until saturated conditions were reached, when concentration remained unchanged. Flasks were shaken for 4, 8, 24, and 48 h. The determination of sample concentration was done by fluorescence detection using a validated HPLC method.

Permeability Assays: Cell Culture and Transport Studies. Dubelcco's Modified Eagle's Media supplemented with Lglutamine, fetal bovine serum (10%), and penicillin/streptomycin (5%) was the media used to grow Caco-2 cells. They were maintained in an incubator at 37 °C, 90% relative humidity, and 5% CO₂ during the growth of cells in flasks, and they were seeded on polycarbonate membranes at 250 000 cells/cm² and maintained during 20 days until the experiment to ensure transporters were expressed. Afterward, the trans-epithelial electrical resistance (TEER) was measured to evaluate the integrity of each cell monolayer. Standard operating procedures (SOPs) were described and validated previously in our laboratory.^{5–9} To fill the receiver chamber and to prepare the drug solution (API or formulation) that was placed in the donor chamber, Hank's balanced salt solution (HBSS) supplemented with HEPES was used. The transport studies in the presence of formulation excipients were carried out by crushing and dissolving a tablet of each formulation in 250 mL of transport buffer and drug.

An orbital environmental shaker at constant temperature (37 °C) and at agitation rate of 50 rpm was used to conduct the transport studies, which were performed in apical-to-basal (A-toB) direction and pH = 7 in both chambers. At 15, 30, 45, and 90 min, samples were taken from the receiver side and replaced each time with fresh buffer.

Permeability assays have been carried out in metoprolol (100 μM), telmisartan (API), and four pharmaceutical formulations (micardis, X1, X2, and Y1).

The apparent permeability coefficient was calculated according to the following equation: where $C_{\text{receiver},t}$ is the drug concentration in the receiver chamber at time t , Q_{total} is the total amount of drug, V_{receiver} and V_{donor} are the volumes in receiver and donor chamber, $C_{\text{receiver},t-1}$ is the drug concentration in the receiver chamber at the previous time, f is the sample replacement dilution factor, P_{eff} is the permeability coefficient, S is the surface area, and Δt is the time interval as described by Mangas-Sanjuan et al.⁷

Disintegration. The tablet disintegration rate was measured with a tablet disintegration tester (PharmaTest) in water at 37 °C, and the experiment was done six times (Ph. Eur. Method 2.9.1). Mean of values and standard deviation were reported.

Table 1. In Vivo Bioequivalence Results of the Test Formulations^a

point estimate and 90% CI (%)	pharmacokinetic parameter	
	C_{max}	AUC _{0-tlast}
X1 (NBE)	86.31 (71.11–95.37)	93.99 (89.27–98.97)
X2 (BE) 93.80	(82.77–106.33)	93.50 (89.30–97.94)
Y1 (NBE) 81.34	(72.31–91.51)	97.04 (92.43–101.97)

^aCI: confidence interval; BE: bioequivalent formulation; NBE: nonbioequivalent formulation.

Dissolution Assays. Dissolution Tests. Media Composition. The media used for dissolution assays were the standard buffers described in the European Pharmacopeia.^{10–12} The same media at pH 4.5 and 6.8 but containing Tween 80 at 0.05% and fasted state simulating media, FaSSIF, were also tested.^{10–12}

An apparatus 2 (paddle method) (Pharma-Test PT-DT70) with 900 mL of different media (Table 2) at 37 ± 0.5 °C and 50 rpm was used to perform the dissolution assays. Samples (5 mL) at different times were taken and filtered in line through a 10 μM (Pharma test) filter. The same volume of buffer was replaced in order to keep the test volume constant throughout the entire test. These experiments were performed in six replicates.

Table 2. Dissolution Media, Paddle Rotational Speed, and Sampling Times Used for Dissolution Studies in Apparatus 2 (Paddle Model)

dissolution media	rotation speed (rpm)	sampling times (min)
Ph. Eur. media		
pH 1.2	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60
pH 4.5	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60
pH 6.8	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60
different buffer capacity pH 6.0, 10 mM	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60
pH 6.5, 10 mM	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60

pH 6.8, 10 mM	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60
Ph. Eur. media with surfactant		
pH 4.5 with Tween 80 (0.05%)	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60
pH 6.8 with Tween 80 (0.05%)	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60
biorelevant media		
FaSSIF	50	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60

Telmisartan dissolution profiles were assayed also using a USP IV apparatus. These dissolution profiles were obtained with an automated flow-through cell system, USP IV apparatus (Erweka, Germany) with 22.6 mm cells (i.d.) and a piston pump (Erweka, Germany).

The experiments using USP IV apparatus (without recycling) were performed at 37.0 ± 0.5 °C and with a flow rate of 8 mL/ min. Sequential sampling using 0.45 µm nitrocellulose membranes (Millipore) were taken at different intervals of time using six replicates. Tables 2 and 3 show, respectively, the experimental conditions using Apparatus 2 (paddle model) and Apparatus 4 (automated flow-through cell system). The amount of dissolved telmisartan was determined by HPLC.

Table 3. Dissolution Media, Flow Rate, and Sampling Times Used for Dissolution Studies in Apparatus 4

dissolution media	flow rate (mL/min)	sampling times (min)
Ph. Eur. media		
pH 1.2 (during 15 min)	8	5, 10, 15
pH 4.5 (during 15 min)	8	20, 30
pH 6.8 (during 90 min)	8	45, 60, 90, 120
Ph. Eur. media with surfactant		
pH 1.2 with Tween 80 (0.05%) (15')	8	5, 10, 15
pH 4.5 with Tween 80 (0.05%) (15')	8	20, 30
pH 6.8 with Tween 80 (0.05%) (15')	8	45, 60, 90, 120
Biorelevant media		
FaSSIF	8	5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120

To compare the dissolution profiles between test and reference formulations in each condition, the F_2 similarity factor was used. F_2 values greater than or equal to 50 indicates that the dissolution profiles are similar. When more than 85% of the drug is dissolved within 15 min, dissolution profiles may be accepted as similar without further mathematical evaluation.^{10,13}

Analysis of the Samples. Samples were analyzed by HPLC with a fluorescence detector (excitation wavelength = 305 nm and emission wavelength = 365 nm) in following conditions: the column was a Nova-Pak C18 column (4 µM, 3.9 × 150 mm); the mobile phase was 6.5 mM trifluoroacetic acid solution and acetonitrile (54:1:45) and

had a flow-rate of 1.0 mL/min. The accuracy of the method was calculated using five standards and analyzed in triplicate. Precision was calculated as the coefficient of variation of five determinations over the same standards (values less than 5%). Linearity was established over the range of concentrations present in the samples ($r^2 > 0.999$). The limit of quantification for telmisartan was 3.4 $\mu\text{g/mL}$.

Statistical Analysis. Two-tailed Student's *t* tests were used to compare mean values of two groups, and analysis of variance (ANOVA) and Scheffé post hoc test were used to compare mean values of more than two groups with a significance level of 0.05. The statistical analyses were made with the statistical package SPSS, V.20.00.

In Vitro–in Vivo Correlation. To develop the IVIVC with three formulations of different release rates, the data from both BE studies were combined. Test formulation plasma profiles were normalized based on the reference's ratios.¹⁴ Normalization was carried out using the average concentration time profiles from each reference formulation. At each sampling time, reference ratios were calculated to obtain the normalization factor for correcting the test average concentration profiles of the second study. So finally, the reference profile, test 1, and test 2 normalized curves were used for the deconvolution analysis. As sampling times differed slightly in both BE studies for the nonmatching sampling times, the normalization factor was estimated as the average of the previous and next matching sampling time.

Telmisartan intravenous pharmacokinetic parameters were obtained by curve fitting a two compartment open model to the plasma profiles of a 40 mg intravenous 30 min infusion.¹⁵ Data was captured from Figure 1 of the reference with the aid of a GetData Graph Digitizer V.2.26. Curve fitting was performed in Microsoft Excel (Redmond, WA) with the PKsolver add-in macro.¹⁶ Distribution microconstants (k_{12} and k_{21}) and the elimination rate constant from the central compartment (k_{13}) were estimated from alpha and beta disposition rate constants. In vivo oral fractions absorbed were estimated by the LooRiegelmann deconvolution method from the average plasma profiles. In vitro fractions dissolved and in vivo fractions absorbed profiles were made superimposable by a time scale correction based on a previously constructed Levy plot. A Levy plot consists of a relationship between the time required in vivo and in vitro for the dissolution/absorption of a given fraction. An extent correction factor was also necessary to account for the incomplete in vitro release of telmisartan. In vitro profiles were scaled in extent, and the scaled in vitro dissolved fraction was used for construction of the Levy plot. In order to estimate the time needed for in vitro dissolution of a particular fraction, a first order dissolution model was previously fitted to the experimental values of each formulation.

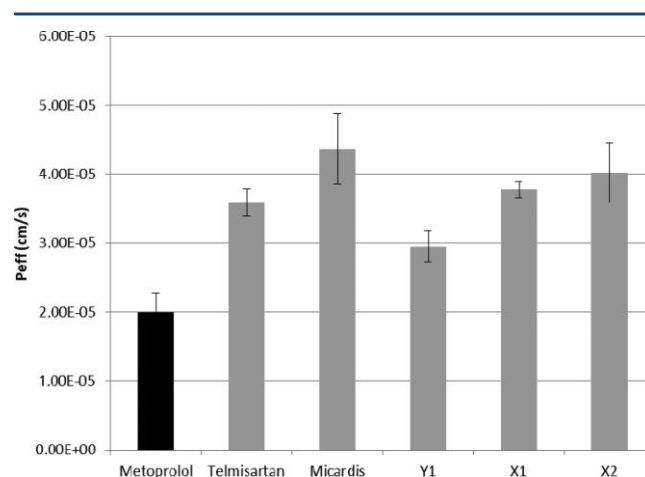


Figure 1. Telmisartan permeability as active substance, metoprolol, and different telmisartan formulations (reference product, nonbioequivalent formulation (X1, Y1), bioequivalent formulation (X2), and metoprolol).

The internal validation was done by estimating the prediction error percentage (PE%) on C_{max} and AUC values with the three formulations used for developing the correlation, i.e., Reference, X1, and X2. The external validation was done by calculating the prediction error of C_{max} of Y1, the nonbioequivalent formulation not included in the IVIVC development.

RESULTS

The solubility values of telmisartan were 0.229 ± 0.009 , $1.05 \times 10^{-3} \pm 3.55 \times 10^{-5}$, and $1.56 \times 10^{-3} \pm 1.18 \times 10^{-4}$ mg/mL, at pH 1.2, 4.5, and 6.8, respectively; therefore, the lowest solubility of telmisartan was $1.05 \times 10^{-3} \pm 3.55 \times 10^{-5}$ at pH 4.5. The dose numbers ($Do = 80 \text{ mg}/250 \text{ mL}/\text{solubility mg/mL}$) were 1.40, 304.76, and 205.13, respectively, at pH 1.2, 4.5, and 6.8. In all of the conditions, Do is higher than 1, confirming the low solubility classification for telmisartan.

The permeability of telmisartan was studied at the clinical concentration (80 mg administered with 250 mL of water: $185.7 \mu\text{M}$), and to determine BCS classification, the telmisartan permeability value was compared with the metoprolol permeability value (Figure 1). In this Figure, the permeability of different formulations of telmisartan was shown too.

Mean values of telmisartan and metoprolol were compared with two-tailed Student's *t* tests, differences among both compounds were detected ($p < 0.05$), and ANOVA analysis detected statistically significant differences ($p = 0.004$) between products. The results indicated statistically significant differences ($p = 0.42$ and $p = 0.02$) between the nonbioequivalent formulation (Y1) and the other formulations, but the test did not show differences between other formulations (Micardis, BE (X2), NBE (X1)).

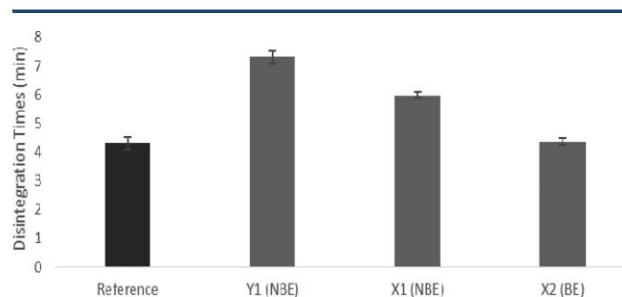


Figure 2. Disintegration times of telmisartan products.

Figure 2 summarizes the disintegration times of telmisartan products.

Dissolution profiles of all the formulations in the USP II apparatus in different conditions are summarized in Figure 3. Dissolution profiles obtained in the USP IV apparatus are depicted in Figure 4.

If the dissolution medium can predict the in vivo results, the dissolution profiles should be ordered this way: Micardis, X2, X1, and Y1; the f_2 value should be more than or equal to 50 for the formulation X2 and less than 50 for the others. The values of f_2 comparing the Micardis profile versus X1, X2, and Y1 obtained in the USP IV apparatus with media change, and in the presence of surfactant, they were 59.08, 73.99, and 43.04, respectively.

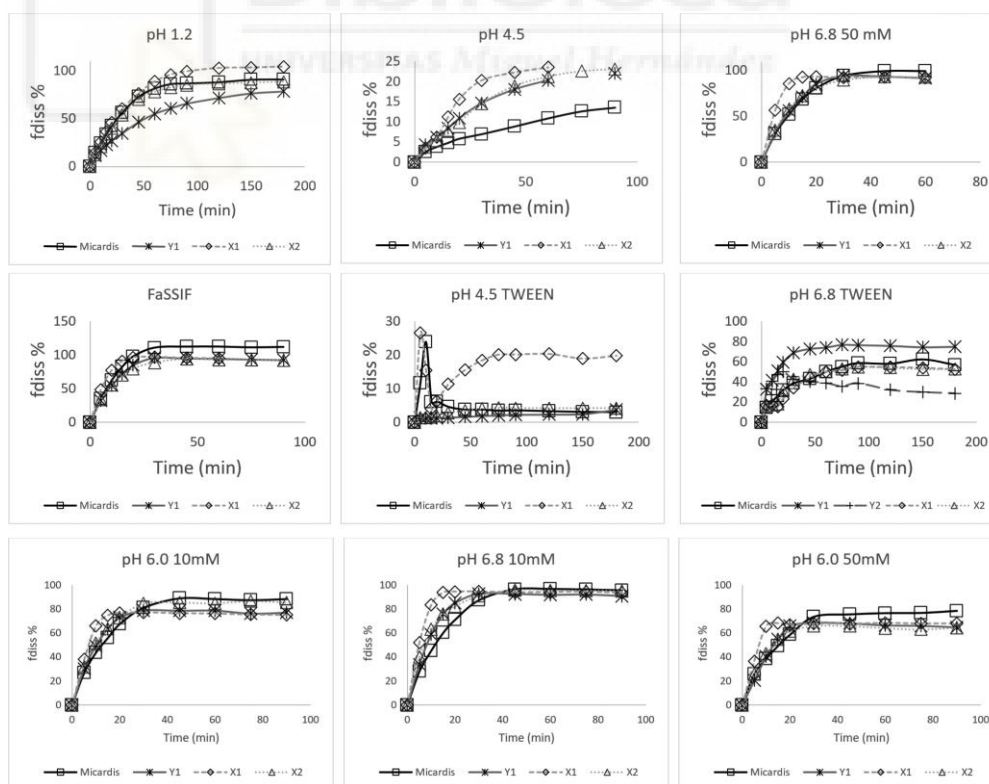


Figure 3. Dissolution profiles of telmisartan formulations (reference product, nonbioequivalent formulations (X1, Y1), and bioequivalent formulation (X2)) in the Apparatus 2 (paddle method 50 rpm) in different media conditions.

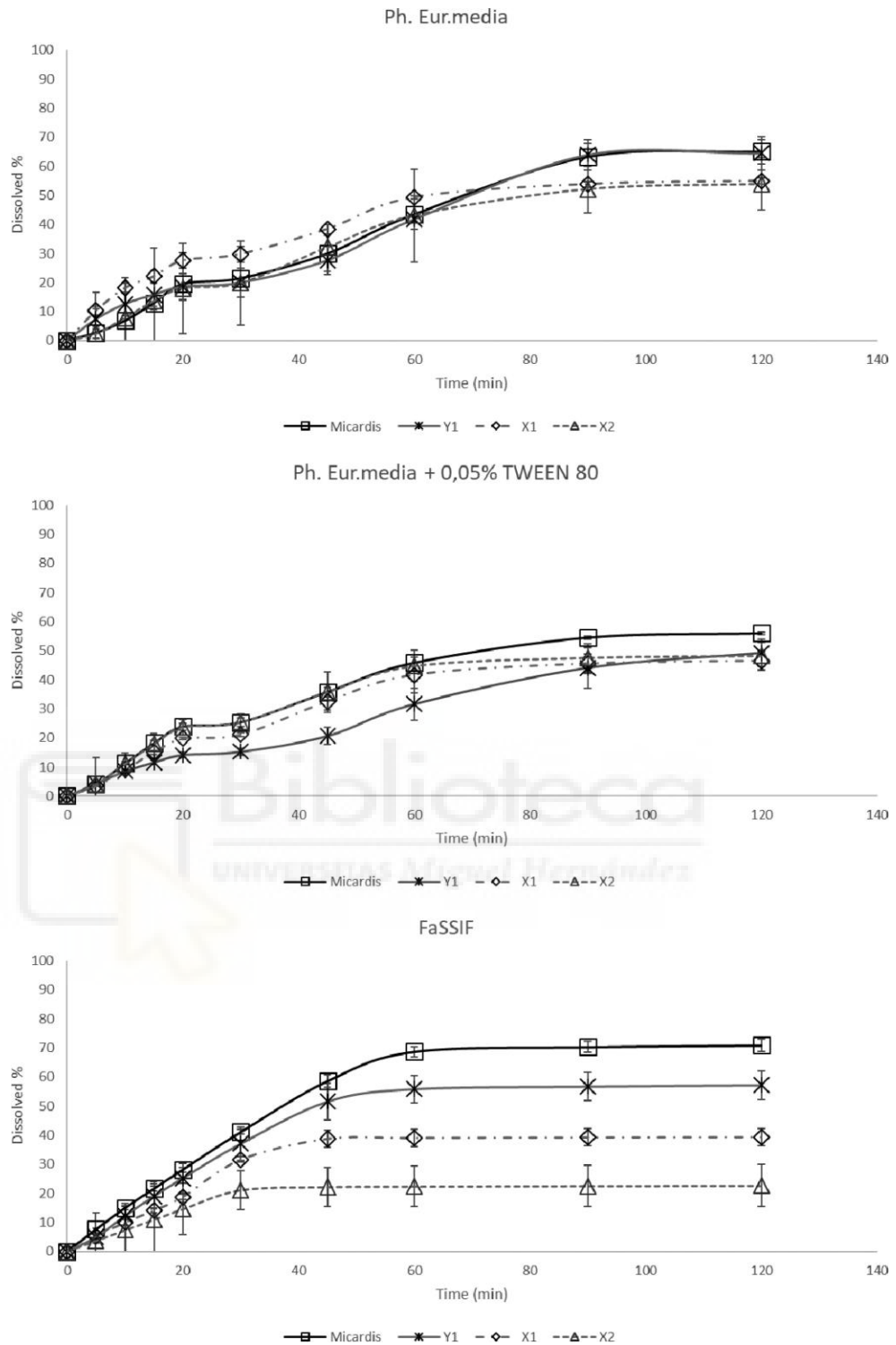


Figure 4. Dissolution profiles of telmisartan formulations (reference product, nonbioequivalent formulations (X1, Y1), and bioequivalent formulation (X2)) in the Apparatus 4 (automated flow-through cell system) in different conditions.

Figure 5 shows the absorption profiles of the three formulations studied obtained by the Loo-Riegelman deconvolution method. In addition, Figure 6 shows all of the absorption and dissolution profiles (obtained with USP IV apparatus) in the same graph to highlight the time scale and extent difference between in vitro and in vivo.

In order to correct for the time scale difference, a Levy plot was constructed. As a change in slope was observed, a preliminary Levy plot was constructed with two linear relationships, and finally, a second order equation was applied to avoid time discontinuities in the estimations of the equivalent in vitro times. Both Levy plots are shown in Figure 7.

After Levy Plot adjustment, absorption and dissolution profiles were made superimposable (Figure 8), and a linear correlation was established between the in vitro fraction dissolved and oral fraction absorbed, which is represented in Figure 9.

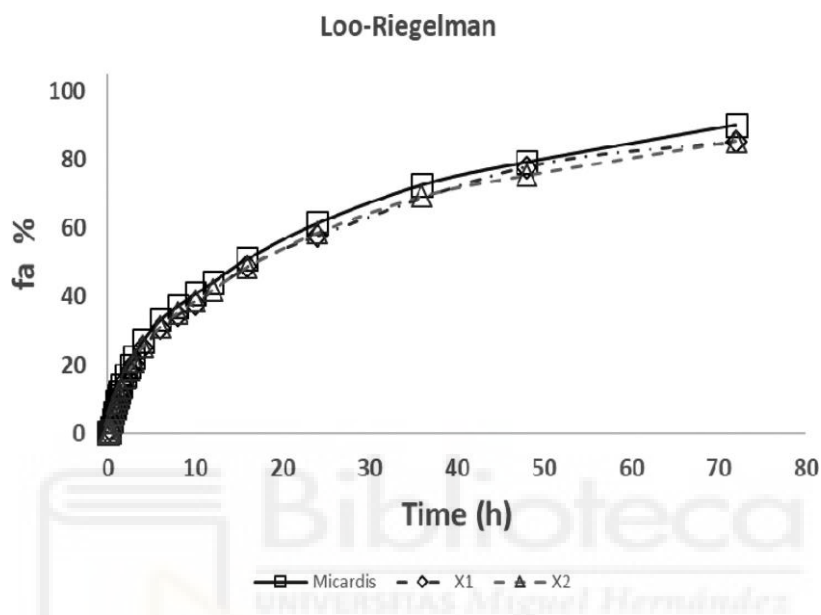


Figure 5. In vivo absorption profiles (oral fraction absorbed (fa) versus time) of telmisartan formulations (reference, X1, and X2) obtained by Loo-Riegelman method.

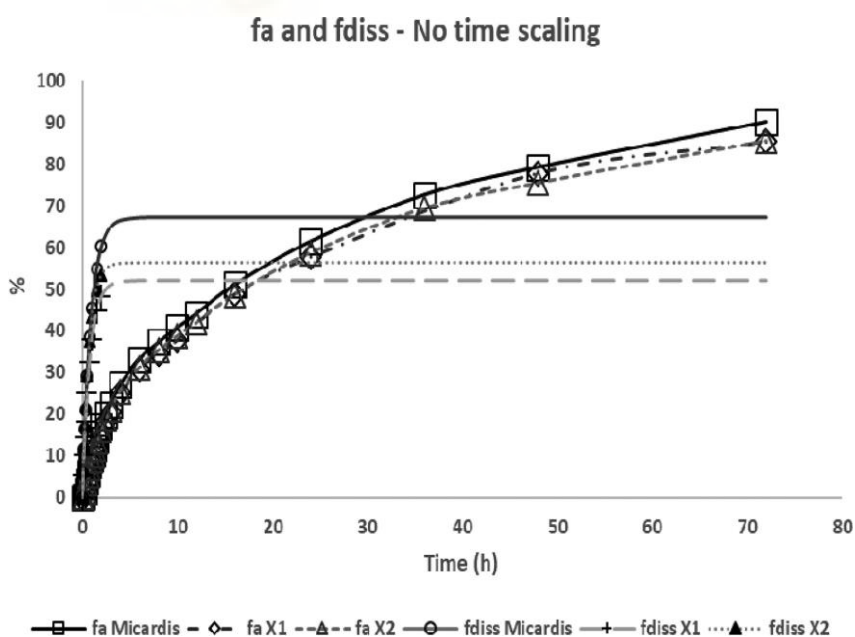


Figure 6. Fractions absorbed and fractions dissolved represented together in the real scale to show the extent and time scale difference in vitro versus in vivo. In vitro release was not complete after 2 h, while 100% fa was reached in vivo.

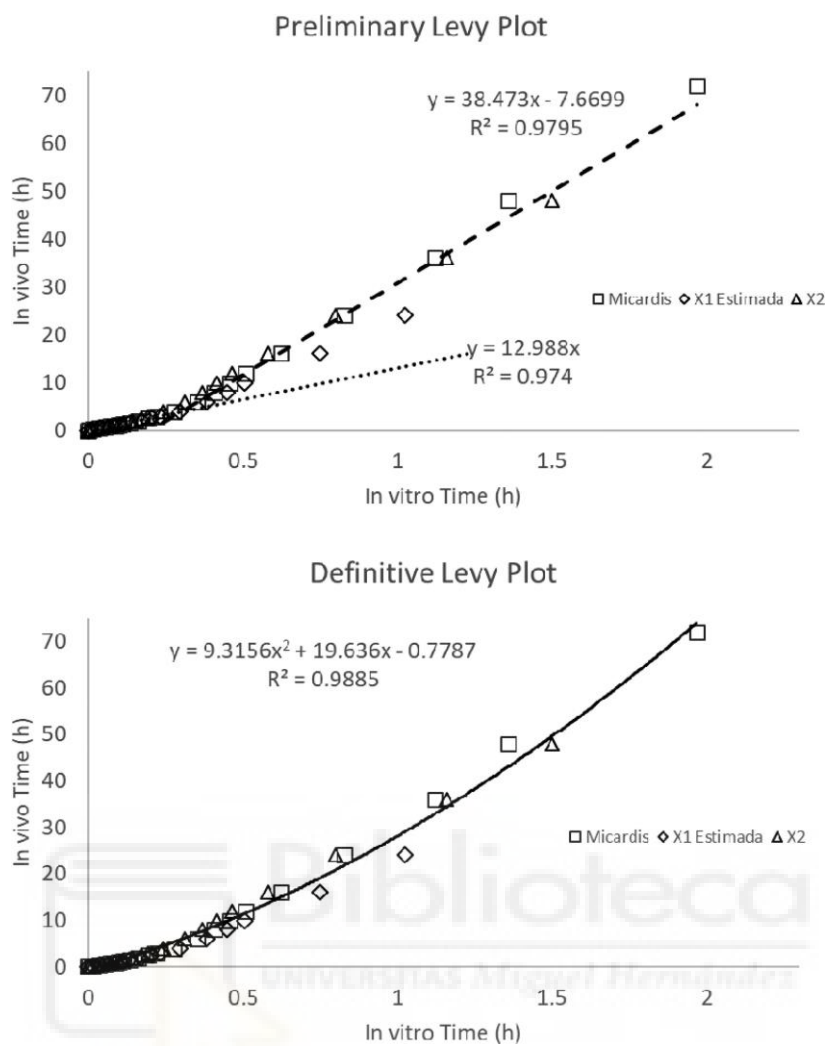


Figure 7. Levy plot.

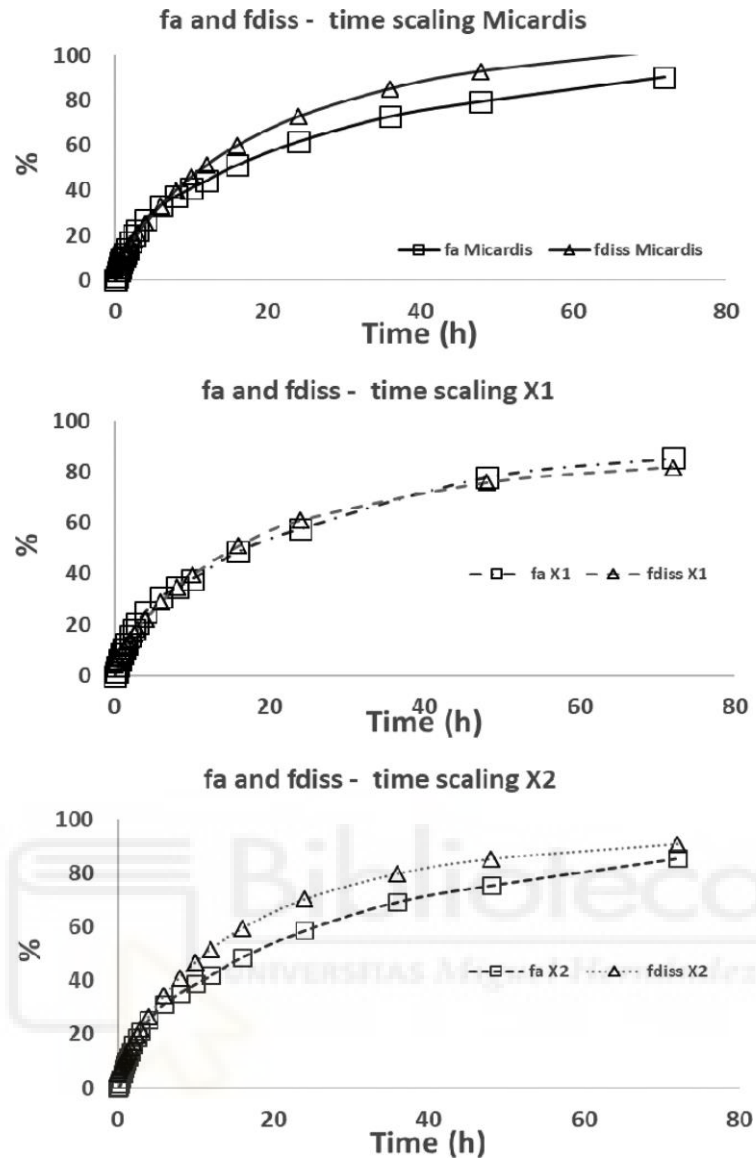


Figure 8. Absorption and dissolution processes after time and extent scaling.

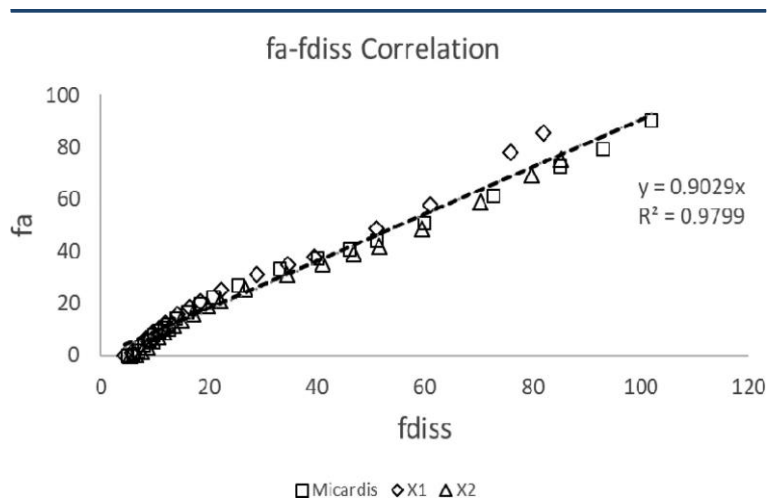


Figure 9. In vitro – in vivo correlation.

Table 4 summarizes the internal and external validation. Prediction error percentages (PE%) for C_{max} and AUC were obtained comparing the experimental values and the predicted values. Experimental and predicted plasma profiles are represented in Figure 10.

To predict C_{max} and AUC values, the fractions absorbed were estimated from the experimental fractions dissolved through the IVIVC relationship, and then, the predicted fractions absorbed were reconvoluted with the disposition parameters to obtain the predicted plasma profiles.¹⁴ Plasma profiles of the scaled test formulation were rescaled to the original scale with the original scaling factors at each time point.

Table 4. Prediction Errors of C_{max} and AUC Values from the Developed in Vitro–in Vivo Correlation

	C _{max}			AUC		
	exp	pred	PE%	exp	pred	PE%
Micardis	456.1	439.5	3.6	4445.5	4522.5	1.7
X1 scaled	400.2	390.9	2.3	4187.3	3562.1	14.9
X2	445.2	474.8	6.6	4208.9	3884.0	7.7
Y1	369.5 ^a	231.5	37.3	4312.2	4285.1	0.6

^a Estimated experimental value from the point estimate of the ratio and Micardis value.

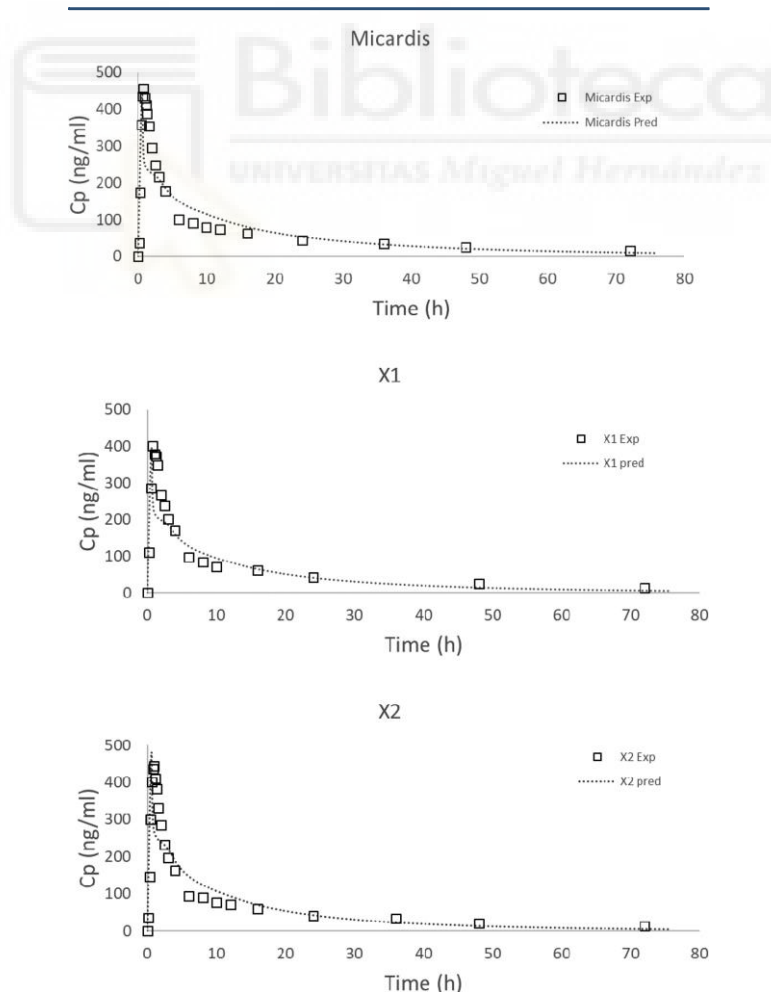


Figure 10. Experimental and predicted telmisartan plasma profiles for the three studied formulations.

DISCUSSION

Both solubility and permeability experimental results confirm the BCS class II nature of telmisartan. In vivo dissolution from its formulations is the limiting step for its absorption, and in this work, an in vivo predictive–in vitro dissolution method has been successfully developed.

The telmisartan permeability value ($3.59 \times 10^{-5} \pm 2.03 \times 10^{-6}$) was higher than the metoprolol permeability value ($2.00 \times 10^{-5} \pm 2.85 \times 10^{-6}$). Telmisartan permeability in the presence of the formulations' excipients was also higher than the metoprolol permeability, confirming that the high permeability characteristics of the drug are not affected by the excipients of these formulations. Telmisartan permeability in the presence of the excipients' Y1 formulation was statistically significant lower compared to the other formulations. Nevertheless, that value is still higher than the metoprolol value; thus, in principle, it would not be expected that this fact affects the telmisartan rate and extent of absorption. Nevertheless, a negative effect on C_{max} due to the excipients affecting the permeation rate cannot be ruled out. Borbas et al.¹⁷ recently reported the effect of some excipients on telmisartan flux across membranes, and the in vitro dissolution profiles obtained in a dissolution–permeation system were well correlated with the human in vivo BE studies. The authors used for the predictions the early phase of the dissolution–permeation test, which showed the combined effect of both processes, as it is difficult to ascertain the true limiting step. One of the formulations showing a reduced telmisartan flux presented a lower boundary of the 90% confidence interval of C_{max} outside the acceptance limit (80%), so some effect of the altered permeability rate in the obtained results with the Y1 formulation cannot be discarded.

The disintegration time of Micardis was 4.30 min. This time is very similar to that obtained with the BE formulation X2 (4.37 min). Both nonbioequivalent formulations obtained disintegration times higher than that of the reference, indicating that this process was clearly slower. In this case, the disintegration test has proven to be indicative of the in vivo observed differences. Although this test is used only for quality control purposes, much more research is needed to evaluate its potential and reliability as a biopredictive tool.^{18–21}

Regarding the several dissolution conditions assayed, only the USP IV apparatus with media change and in the presence of 0.05% of tween 80 was able to order the formulations in vitro in the same sequence as obtained in vivo. F2 values of the dissolution profiles in this condition confirm the similarity of the bioequivalent formulations and the dissimilarity of the nonbioequivalent ones.

In vitro dissolution in the selected conditions is not complete, which probably reflects in vivo dissolution and leads to an incomplete oral bioavailability. The fraction absorbed was determined in humans to be 50%, while absolute bioavailability is 43%.²² As permeability is high, this fact indicates that in vivo dissolution is not complete, and it is the limiting factor for telmisartan absorption. Nevertheless, in the two-step approach, the incomplete in vitro dissolution required a correction of the extent to correlate the fractions dissolved with fractions absorbed that was obtained with the Loo-Riegelman method, which always reached 100%. A time scale correction was also necessary, as in vitro dissolution was faster than the in vivo dissolution process, or in other words, the in

vitro dissolution and in vivo input curves were not directly superimposable, and they were made superimposable by the use of a scaling factor (Levy Plot). The Levy plot was not a single linear correlation, and there is a clear slope change around 4 h (in vivo time). This fact points out a change in in vivo dissolution conditions, which could be explained by the transit from small intestine to colon with a more alkaline pH and less fluid available. The higher value of this second slope in the in vivo versus in vitro times plot means a further reduction in the dissolution rate for later time points. Finally, with the adequate scaling of time and extent, the method used to establish a Level A IVIVC was successful and allowed an IVIVC with a determination coefficient (r^2) of 0.92.

The prediction errors were within the accepted limits for X1 and X2 formulations (15% for the individual formulations and 10% for the average), but the PE were higher than accepted in regulatory guidelines for Y1, so it would not be adequate for a biowaiver claim. This is not surprising, because Y1 is a different formulation from a different company with different excipients and a different manufacturing process, outside of the design space of the manufacturer of X1 and X2. Nevertheless, thanks to the correlation, the proposed dissolution method obtained in this study could be useful as a development tool for selecting the most promising formulation for further in vivo studies.

In summary from a regulatory point of view, Y1 would have never been acceptable for a formal IVIVC; however, this IVIVC would predict that formulation X1 would not be bioequivalent to the reference prior to the in vivo study. This is highly valuable for the formulation developer and could save valuable resources and avoid BE failures, by selecting with the in vitro method the formulation with highest probability of success in the human BE trial.

CONCLUSION

Telmisartan is a pH-dependent low solubility drug, for which in vivo dissolution seems to be the limiting factor for absorption. The in vivo dissolution of telmisartan formulations is determined by physiological variables, as pH changes during intestinal transit and the presence of natural surfactants.

In this work, a more physiological dissolution set up in the USP IV apparatus has been developed, allowing simulation of the pH gradient and the presence of surfactants in the gastrointestinal tract. This new model is able to predict the formulation differences in dissolution that were previously observed in vivo in one successful and one failed bioequivalence study.

The studies carried out during this investigation have allowed the development of a level A IVIVC with a good correlation coefficient, which could be used as a risk-analysis tool for formulation selection in future bioequivalence trials.

The dissolution conditions of the in vitro biopredictive test presented here would need further refinement to improve the IVIVC predictability and to fulfill regulatory requirements for a biowaiver claim.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: isabel.gonzalez@goumh.umh.es; Mailing Address: Isabel Gonzalez-Alvarez, Edificio Muhammad Al-Shafra, Facultad de Farmacia, UMH, Carretera Alicante Valencia km 87, 03550 San Juan de Alicante, Alicante, Spain; Phone +34 965 919217; Fax +34 963544911 (I.G.-A.)

ORCID 

Isabel Gonzalez-Alvarez: 0000-0002-1685-142X

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge partial financial support to projects: “Modelos in vitro de evaluación biofarmacéutica” SAF201678756(AEI/FEDER, EU) funded by Agencia Estatal Investigación and European Union, through FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) and FA-426-08-07-C, Comparación de los perfiles de disolución de distintos principios activos, from CDCHT-ULA. S.C.U. received a grant from DAP, University of Los Andes, Venezuela, to develop this project.

ABBREVIATIONS

BE, bioequivalent; N-BE, nonbioequivalent; BCS, Biopharmaceutics Classification System; H, high; L, low

REFERENCES

- (1) Tsume, Y.; Mudie, D. M.; Langguth, P.; Amidon, G. E.; Amidon, G. L. The Biopharmaceutics Classification System: subclasses for in vivo predictive dissolution (IPD) methodology and IVIVC. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2014, 57, 152–63.
- (2) Yang, L.; Shao, Y.; Han, H. K. Improved pH-dependent drug release and oral exposure of telmisartan, a poorly soluble drug through the formation of drug-aminoclay complex. *Int. J. Pharm.* 2014, 471 (1–2), 258–63.

- (3) Park, J.; Cho, W.; Cha, K. H.; Ahn, J.; Han, K.; Hwang, S. J. Solubilization of the poorly water soluble drug, telmisartan, using supercritical anti-solvent (SAS) process. *Int. J. Pharm.* 2013, 441 (1–2), 50–5.
- (4) Pubchem. Telmisartan: Chemical and Physical Properties. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/65999#section=Chemical-andPhysical-Properties>.
- (5) Ruiz-Garcia, A.; Lin, H.; Pla-Delfina, J. M.; Hu, M. Kinetic characterization of secretory transport of a new ciprofloxacin derivative (CNV97100) across Caco-2 cell monolayers. *J. Pharm. Sci.* 2002, 91 (12), 2511–9.
- (6) Oltra-Noguera, D.; Mangas-Sanjuan, V.; Centelles-Sangüeesa, A.; Gonzalez-Garcia, I.; Sanchez-Castano, G.; Gonzalez-Alvarez, M.; Casabo, V.; Merino, V.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M. Variability of permeability estimation from different protocols of subculture and transport experiments in cell monolayers. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 2015, 71, 21–32.
- (7) Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, I.; Gonzalez-Alvarez, M.; Casabo, V. G.; Bermejo, M. Modified nonsink equation for permeability estimation in cell monolayers: comparison with standard methods. *Mol. Pharmaceutics* 2014, 11 (5), 1403–14.
- (8) Gundogdu, E.; Mangas-Sanjuan, V.; Gonzalez-Alvarez, I.; Bermejo, M.; Karasulu, E. *In vitro-in situ* permeability and dissolution of fexofenadine with kinetic modeling in the presence of sodium dodecyl sulfate. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 2012, 37 (1), 65–75.
- (9) Gonzalez-Alvarez, I.; Fernandez-Teruel, C.; Garrigues, T. M.; Casabo, V. G.; Ruiz-Garcia, A.; Bermejo, M. Kinetic modelling of passive transport and active efflux of a fluoroquinolone across Caco-2 cells using a compartmental approach in NONMEM. *Xenobiotica* 2005, 35 (12), 1067–88.
- (10) European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on the Investigation of Bioequivalence; CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1; 2010.

- (11) US Department of Health and Human Services, US FDA, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: bioavailability and bioequivalence studies for orally administered drug products—general considerations; 2002.
- (12) WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Multisource (generic) pharmaceutical products: guidelines on registration requirements to establish interchangeability; WHO Technical Report Series, No. 992; 2006.
- (13) US Department of Health and Human Services, US FDA, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: dissolution testing of immediate release solid oral dosage forms; 1997.
- (14) Humbert, H.; Cabiac, M. D.; Bosshardt, H. In vitro-in vivo correlation of a modified-release oral form of ketotifen: in vitro dissolution rate specification. *J. Pharm. Sci.* 1994, 83 (2), 131–6.
- (15) Stangier, J.; Su, C. A.; Roth, W. Pharmacokinetics of orally and intravenously administered telmisartan in healthy young and elderly volunteers and in hypertensive patients. *J. Int. Med. Res.* 2000, 28 (4), 149–67.
- (16) Zhang, Y.; Huo, M.; Zhou, J.; Xie, S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput. Methods Programs Biomed* 2010, 99 (3), 306–14.
- (17) Borbas, E.; Nagy, Z. K.; Nagy, B.; Balogh, A.; Farkas, B.; Tsinman, O.; Tsinman, K.; Sinko, B. The effect of formulation additives on in vitro dissolution-absorption profile and in vivo bioavailability of telmisartan from brand and generic formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2018, 114, 310– 317.
- (18) Nickerson, B.; Kong, A.; Gerst, P.; Kao, S. Correlation of dissolution and disintegration results for an immediate-release tablet. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2018, 150, 333–340.
- (19) Kindgen, S.; Rach, R.; Nawroth, T.; Abrahamsson, B.; Langguth, P. A Novel Disintegration Tester for Solid Dosage Forms Enabling Adjustable Hydrodynamics. *J. Pharm. Sci.* 2016, 105 (8), 2402–9.

- (20) Kindgen, S.; Wachtel, H.; Abrahamsson, B.; Langguth, P. Computational Fluid Dynamics Simulation of Hydrodynamics and Stresses in the PhEur/USP Disintegration Tester Under Fed and Fasted Fluid Characteristics. *J. Pharm. Sci.* 2015, 104 (9), 2956–68.
- (21) Al-Gousous, J.; Langguth, P. Oral Solid Dosage Form Disintegration Testing - The Forgotten Test. *J. Pharm. Sci.* 2015, 104 (9), 2664–75.
- (22) Stangier, J.; Schmid, J.; Turck, D.; Switek, H.; Verhagen, A.; Peeters, P. A.; van Marle, S. P.; Tamminga, W. J.; Sollie, F. A.; Jonkman, J. H. Absorption, metabolism, and excretion of intravenously and orally administered [¹⁴C]telmisartan in healthy volunteers. *J. Clin Pharmacol* 2000, 40 (12 Pt 1), 1312–1322.





