



## **FACULTAD DE FARMACIA**

Grado en Farmacia

# **MODIFICACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE FÁRMACOS EN PRESENCIA DE EXCIPIENTES**

Memoria de Trabajo Fin de Grado

Sant Joan d'Alacant

Junio 2017

**Autor:** Alexandra Rodríguez Cabrero

**Modalidad:** Experimental

**Tutor/es:** María Isabel González Álvarez y Marta González Álvarez

## ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
<b>2.</b>	<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
2.1	Impacto del marco legislativo de los medicamentos genéricos en España .....	4
2.2	Administración de fármacos por vía oral .....	6
2.2.1	<i>Procesos pasivos.....</i>	<i>8</i>
2.2.2	<i>Mecanismos especializados de transporte.....</i>	<i>9</i>
2.3	Sistema de Clasificación Biofarmacéutico .....	10
2.4	Técnicas para la determinación de la permeabilidad y la solubilidad .....	11
2.5	Terazosina.....	13
2.6	Influencia de excipientes en la absorción oral de fármacos .....	14
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
4.1	COMPUESTOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO .....	19
4.1.1	<i>Fármaco ensayado.....</i>	<i>19</i>
4.1.2	<i>Excipientes utilizados.....</i>	<i>20</i>
4.2	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	20
4.3	ENSAYOS DE ABSORCIÓN .....	21
4.3.1	<i>Preparación de las soluciones previas al ensayo de absorción.....</i>	<i>21</i>
4.3.2	<i>Método experimental.....</i>	<i>22</i>
4.3.3	<i>Cirugía .....</i>	<i>22</i>
4.3.4	<i>Perfusión y toma de muestras .....</i>	<i>24</i>
4.3.5	<i>Reabsorción de agua .....</i>	<i>25</i>
4.3.6	<i>Tratamiento de las muestras.....</i>	<i>25</i>
4.4	Método analítico .....	25
4.5	Métodos matemáticos y análisis estadístico .....	26
4.5.1	<i>Cálculo de la velocidad de reabsorción del agua .....</i>	<i>26</i>
4.5.2	<i>Cálculo de la constante aparente de la velocidad de absorción (ka).....</i>	<i>27</i>
4.5.3	<i>Cálculo de la permeabilidad intestinal.....</i>	<i>28</i>
4.6	Prueba de comparación de medias .....	28
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>35</b>

6.1	Técnica experimental seleccionada.....	36
6.2	Interpretación de resultados.....	37
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>39</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>40</b>



## 1. RESUMEN

La industria farmacéutica que desea fabricar un genérico necesita demostrar la bioequivalencia de su producto, para ello selecciona la metodología más adecuada, siguiendo las directrices regulatorias del estado en que se encuentre. Este sistema permite simplificar los ensayos de bioequivalencia *in vivo* y establecer criterios para la concesión de bioexenciones, garantizando la calidad del genérico.

El presente trabajo pretende esclarecer el fracaso de un ensayo de bioequivalencia en voluntarios sanos. Las diferencias apreciadas *in vivo* donde las formulaciones de referencia (Terazosina) y test (genérico) no son bioequivalentes porque los valores de C<sub>max</sub> y AUC son superiores para la formulación test, se pueden deber al cambio cuali-cuantitativo de excipientes, que afectan al proceso de absorción del fármaco. Para ello, se realizan ensayos de Terazosina en presencia de distintos excipientes por separado (ciclurato, propilenglicol y sorbitol) mediante la técnica de perfusión *in situ* sin recirculación aplicada a los distintos tramos del intestino delgado de rata wistar.

Los resultados del estudio muestran que el sorbitol no afecta a la permeabilidad de la Terazosina. Sin embargo, se observa un incremento de la permeabilidad del fármaco en duodeno y yeyuno en presencia de propilenglicol.

Por lo tanto, el aumento de C<sub>max</sub> y AUC de la formulación test de Terazosina se puede deber a la presencia de propilenglicol, ya que este excipiente aumenta la permeabilidad intestinal de la Terazosina y no estaba en la formulación comercial con la que se comparaba. Además se ha demostrado que la Terazosina es un fármaco de baja permeabilidad según el sistema de clasificación biofarmacéutico y es sustrato de MRP1, transportador de absorción que se encuentra localizado en íleon principalmente.

## 2. INTRODUCCIÓN

La comercialización de nuevos medicamentos en los últimos años se ha centrado sobre todo en el mercado de medicamentos genéricos en detrimento del número de nuevas moléculas patentadas. La posibilidad de lanzar un medicamento al mercado evitando los costosos ensayos clínicos en humanos,

comparada con la opción de sustituirlos por procesos más cortos y económicos o incluso por ensayos *in vitro* en el caso de las bioexenciones, ha sido el principal factor que ha impulsado el desarrollo de la industria de genéricos. En cualquier caso, constituirse como laboratorio de medicamentos genéricos como TEVA o instaurar una nueva línea de genéricos en una planta de producción ya existente como es el caso de KERN *pharma*, no exime a la persona física o jurídica de garantizar la seguridad, calidad y eficacia del medicamento en cuestión. Independientemente de la metodología empleada, bioexención o ensayo clínico, durante el proceso de pre-comercialización los laboratorios farmacéuticos deben seguir las directrices marcadas por las agencias reguladoras, la *European Medicines Agency* (EMA) en el ámbito Europeo y la *Food and Drug Administration* (FDA) en EE.UU. Trabajando bajo el amparo de este marco regulatorio, garantizamos la calidad de nuestro medicamento y las autoridades competentes aprobarán las solicitudes de autorización de comercialización del mismo siempre que los resultados de los ensayos, tanto *in vivo* como *in vitro*, se encuentren dentro de los límites establecidos por las agencias reguladoras de cada país. Los ensayos fuera de límites suponen un fracaso económico para los laboratorios.

## **2.1 Impacto del marco legislativo de los medicamentos genéricos en España**

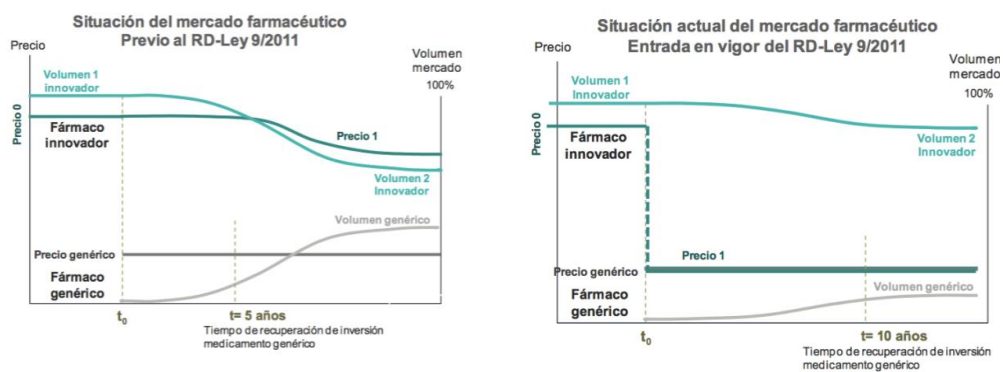
La definición de medicamento genérico viene recogida en el artículo 2 del texto refundido de 2015 de la Ley de garantías y uso racional del medicamento: “todo medicamento que tenga la misma composición cualitativa y cuantitativa en principios activos y la misma forma farmacéutica, y cuya bioequivalencia con el medicamento de referencia haya sido demostrada por estudios adecuados de biodisponibilidad. Las diferentes sales, ésteres, éteres, isómeros, mezclas de isómeros, complejos o derivados de un principio activo se considerarán un mismo principio activo, a menos que tengan propiedades considerablemente diferentes en cuanto a seguridad y/o eficacia. Las diferentes formas farmacéuticas orales de liberación inmediata se considerarán una misma forma farmacéutica.”

La crisis económica, que ha sufrido España en los últimos años, ha obligado a los gobiernos a instaurar medidas legislativas de contención del gasto farmacéutico, impactando negativamente en la industria del medicamento genérico. Entre las medidas más importantes publicadas en Real Decreto 09/2011 que han afectado al mercado de genéricos se encuentran:

- a. La modificación del artículo 3.6 de la Ley 29/2006, que produjo un incremento del 5% al 10% en los descuentos que los distribuidores pueden realizar a las farmacias en los medicamentos de marca.
- b. Por otro lado, la modificación del artículo 85, que propuso generalizar la prescripción por principio activo.
- c. El artículo 93, aclaró el concepto de conjunto del sistema de precios de referencia, aplicando el mismo concepto cuando se trate de incorporaciones de medicamentos a conjuntos ya formados. Los medicamentos afectados por el sistema de precios de referencia se acomodan al precio de referencia, sin poder superar el del conjunto correspondiente.

En la figura 1 se muestra el escenario previo a la entrada en vigor del RDL 9/2011, donde el precio del medicamento innovador se mantenía por encima del genérico, y la cuota de este descendía de forma rápida debido a las diferencias de precio con el genérico y un mayor descuento del mayorista a los canales de distribución. A su vez, la cuota de mercado del genérico aumentaba rápidamente, lo que posibilitaba una contención del precio compensada por el crecimiento rápido de los volúmenes de producción.

**Figura 1.** Situación del genérico previo y posterior a la entrada en vigor del RDL 9/2011

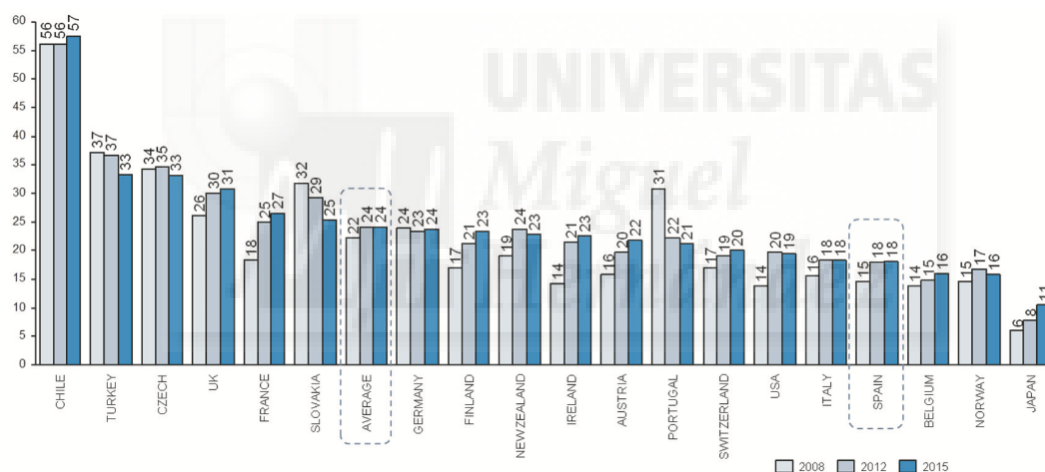


**Figura 1.** Imagen tomada de AESEG <sup>1</sup>

En la figura 2 se refleja el panorama posterior al RDL 9/2011, donde el precio del medicamento innovador se iguala al del genérico tras la expiración de la patente. La cuota de mercado del genérico no crece apenas al entrar en un mercado saturado por los medicamentos de marca y donde no existen diferencias de precio<sup>1</sup>.

Otra de las implicaciones de la entrada en vigor del RDL 09/2011 es el distanciamiento de España de los ratios de uso de medicamentos genéricos de países de referencia como Alemania, Reino unido, Francia o Portugal. Según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), la cuota de mercado de los genéricos en España asciende al 18% en 2015, y es inferior a la de otros países de referencia.

**Figura 2.** Cuota de mercado de medicamentos genéricos en distintos Países.



**Figura 2.** Imagen tomada de AESEG<sup>1</sup>

Aun así, ante estos cambios legislativos, la industria de los medicamentos genéricos ha impuesto medidas de mejora de la productividad para ser más competitiva en el mercado

## 2.2 Administración de fármacos por vía oral

La vía oral es la más utilizada y comúnmente aceptada para la administración de fármacos ya que es la vía más fisiológica para que los medicamentos accedan a la circulación sistémica tras su absorción en el intestino delgado, preferentemente. El intestino delgado que mide, en conjunto, unos 7 m de largo

aproximadamente, está constituido por tres secciones de diferente longitud y distinto pH:

- Duodeno: con una longitud de aproximadamente 30 centímetros es la porción más corta del intestino. Se extiende desde el píloro y termina en la unión duodeno-yeyuno, donde se encuentra el ligamento de Treitz que fija el duodeno a la pared posterior del abdomen. El rango de pH de esta zona oscila entre 4,9-6,4.
- Yeyuno: este segmento es la continuación del duodeno a partir del ligamento de Treitz con una longitud de 240 cm aproximadamente. Posee un pH comprendido entre 4,4-6,5.
- Íleon: este tramo es la continuación del yeyuno y acaba en la válvula ileocecal, mediante la cual se une al ciego. Es más largo que el yeyuno, pues posee una longitud de 300 cm y un pH comprendido entre 6,5 y 8,00.

La mucosa del intestino delgado posee unas características morfológicas especiales debido a la presencia de: pliegues de kerckring, vellosidades y microvellosidades. Los pliegues de kerckring, dispuestos circularmente, proporcionan soporte anatómico a las vellosidades de la mucosa intestinal. Estas vellosidades son proyecciones digitiformes que sobresalen del revestimiento de la pared intestinal cuyas paredes se encuentran tapizadas por los enterocitos. Estas células, las principales del epitelio intestinal, están cubiertas en la superficie de su membrana luminal por un borde en cepillo constituido por numerosas microvellosidades. Con la combinación de las tres estructuras morfológicas consigue un aumento de la superficie útil de absorción de la mucosa intestinal, alcanzando cifras de hasta 250 m<sup>2</sup> o más<sup>2</sup>.

La acción terapéutica satisfactoria de cualquier fármaco administrado por vía oral requiere su liberación de la forma farmacéutica que lo contenga, para que pueda absorberse de forma adecuada y consiga una concentración eficaz en el lugar de acción durante un período de tiempo determinado. Las etapas de liberación de fármacos en formulaciones sólidas engloban la disgregación de la forma farmacéutica, la disolución del fármaco en el medio fisiológico, y la



difusión hasta la membrana. Las principales características de cada una de estas fases son:

- Disgregación: en tecnología farmacéutica, durante la elaboración de formas sólidas, es indispensable la adición de disgregantes en la formulación para que tenga lugar la primera fase de la liberación. La disgregación actúa como factor limitativo de absorción en el caso de sustancias muy hidrosolubles, por ello se realizan ensayos de disgregación descritos en las farmacopeas, garantizando así la eficacia del fármaco.
- Disolución: Es un paso trascendental en el proceso de liberación del fármaco, puede ser el factor limitante de absorción cuando el fármaco es poco soluble en agua o se ha formulado de tal forma que tarda más tiempo en disolverse. Resulta esencial conocer la velocidad de disolución al pH característico del lugar de absorción del fármaco porque, partiendo únicamente de los datos de su hidrosolubilidad, estamos ante un punto de referencia impreciso.
- Difusión: el fármaco ha de difundir hasta su lugar de absorción, la membrana de los enterocitos. Generalmente, la difusión no se considera un factor limitante a tener en cuenta en la absorción excepto en las formas farmacéuticas orales en cuya formulación se incorporan viscosizantes o cuando se ingieren después de comidas grasas.
- Absorción: Es un proceso complejo y regulado por la presencia de la membrana lipídica y la existencia de otros componentes: extracelulares (interfase lumen/ membrana), intracelulares y tisulares (interfase membrana/ plasma)<sup>3</sup>.

Básicamente, existen dos tipos de mecanismos de absorción de fármacos a través de la membrana celular: procesos pasivos y mecanismos especializados de transporte.

### 2.2.1 *Procesos pasivos*

- Filtración a través de poros : tanto las sustancias polares, iones y otras moléculas pequeñas pasan la membrana a través de poros. La carga de

las sustancias limita el paso, siendo los iones con carga negativa los primeros en filtrarse normalmente.

- Ruta paracelular: restringida a las moléculas hidrófilas con peso molecular bajo que acceden a través de los espacios intercelulares.
- Difusión pasiva o ruta transcelular: se realiza a favor de gradiente de concentración simplemente por disolución en la bicapa lipídica, siendo este el sistema más frecuente utilizado por los fármacos para cruzar la membrana. Está condicionado por la lipofilia de las sustancias y el coeficiente de difusión que se rige por la primera ley de Fick<sup>4</sup>. Por otro lado, las modificaciones en el pH también controlan el proceso y en el caso de moléculas polares, pasan al otro lado de la membrana a través de canales formados por las proteínas.

### 2.2.2 *Mecanismos especializados de transporte*

- Difusión facilitada: se realiza sin consumo de energía metabólica y requiere una proteína transportadora, habitualmente inducible y la velocidad de transporte sigue una cinética de Michaelis-Menten. Se distinguen dos tipos de proteínas transportadoras: las proteínas canales, formadas por poros pequeños a través de los cuales los iones traspasan la membrana difundiendo libremente. Por otro lado, están las proteínas transportadoras *per se* que se unen a moléculas específicas y después sufren cambios conformacionales abriendo los canales para permitir el paso de las moléculas al lado contrario de la membrana.
- Transporte activo: se produce contra gradiente de concentración, requieren consumo energía y la utilización de proteínas transportadoras de membrana. Son relevantes en el transporte de sustancias endógenas, no obstante, son escasos los fármacos que se absorben activamente<sup>5</sup>. Existen dos tipos, en función de la fuente de energía utilizada para producirlo:
  - Transporte activo directo: la energía proviene directamente de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP).

- Transporte activo indirecto: la molécula transportada pasa a través de la membrana a favor de gradiente de concentración, generado previamente por un transporte activo directo.
- Transporte de secreción o eflux: se trata de un transporte inverso, cuya función es proteger al torrente sanguíneo de la intrusión de tóxicos y sustancias extrañas. Su función es impedir el paso del fármaco a través de la membrana, devolviendo al lumen intestinal las sustancias que atraviesan la membrana. Las proteínas localizadas en membrana apical de los enterocitos más representativas en este tipo de transporte son la glicoproteína-P (g-p) y una proteína de resistencia a fármacos (MRPs), la MRP2. La glucoproteína-P, también conocida como MDR1, pertenece a la superfamilia ABC (*ATP binding cassette transporters*), está involucrada en la restricción de la absorción de muchos fármacos importantes<sup>6</sup>. En concreto, la proteína MRP1 se localiza en la membrana basolateral y su función fisiológica es proteger al organismo de sustancias tóxicas<sup>7</sup>.

### **2.3 Sistema de Clasificación Biofarmacéutico**

Los parámetros farmacocinéticos recogidos en las guías de bioequivalencia de la EMA evaluados para determinar si un genérico es aprobado o no, son C<sub>max</sub> y AUC en ensayos clínicos con voluntarios sanos. Estudios exhaustivos llevaron al Dr. Amidon a sugerir que estos parámetros son función de la solubilidad y la permeabilidad del principio activo contenido en una forma farmacéutica para medicamentos administrados por la vía oral<sup>8</sup>. Fruto de sus investigaciones propuso a la comunidad científica una clasificación biofarmacéutica (SCB) que agrupa a los fármacos en 4 clases distintas atendiendo a estos dos parámetros:

- Clase I: alta solubilidad alta permeabilidad
- Clase II: baja solubilidad alta permeabilidad
- Clase III: alta solubilidad baja permeabilidad
- Clase IV: baja solubilidad y baja permeabilidad

Según la EMA, una sustancia es altamente soluble cuando la dosis más alta administrada se disuelve en 250 mL de agua en un rango de pH de 1,0-6,8. Se considera de alta permeabilidad cuando el grado de absorción intestinal, determinado experimentalmente, sea igual o superior al 85 %<sup>9</sup>. Para aplicar el SCB al uso de bioexenciones es necesario combinar los conceptos de permeabilidad y solubilidad con las características de disolución *in vitro* de un fármaco (velocidad de disolución), los tres factores más importantes que controlan la absorción de un compuesto. La bioexención consiste en sustituir los ensayos *in vivo* por ensayos *in vitro*. Son objeto de bioexención algunos fármacos de la clase I y III, es decir, aquellas formulaciones sólidas de liberación inmediata y alta solubilidad, siempre y cuando los excipientes que puedan afectar la biodisponibilidad sean cualitativamente y cuantitativamente iguales en ambas formulaciones. En el caso de fármacos que son objeto de una bioexención es suficiente con comparar los perfiles de disolución *in vitro* de dos sustancias, referencia y test, de manera que si alcanzan un cierto porcentaje de similitud podemos sustituir el ensayo de bioequivalencia *in vivo* por uno *in vitro*, lo que supone un ahorro considerable a la industria farmacéutica. Además el SCB tiene utilidad como herramienta en la etapa de desarrollo de fármacos puesto que define los factores limitantes para la absorción oral. Por ejemplo, en el caso de fármacos pertenecientes a la clase I y III, que se disuelven al menos el 85% de la sustancia en menos en 15 minutos (condición para aplicar bioexención según la EMA), el paso limitante es el vaciado gástrico.

#### **2.4 Técnicas para la determinación de la permeabilidad y la solubilidad**

Por todo lo anteriormente expuesto, la industria farmacéutica y la comunidad científica ha dirigido y dirige sus esfuerzos al desarrollo de técnicas para determinar la permeabilidad y la solubilidad de manera fiable y sencilla.

Las agencias reguladoras recomiendan emplear métodos debidamente validados para la determinación de la solubilidad. Los ensayos de disolución son un procedimiento homologado a nivel internacional recogido en las distintas farmacopeas, por lo que se han configurado como la herramienta de uso rutinario en la industria farmacéutica destinada a demostrar bioequivalencia

mediante la determinación de la velocidad de disolución en determinados grupos de fármacos. La permeabilidad puede determinarse a partir de técnicas *in situ*, *in vitro*, *in vivo* y también *in silico*, siendo estas últimas las más novedosas. El Metoprolol ha sido aceptado como fármaco de referencia para establecer el punto de corte en la clasificación de los fármacos según su permeabilidad. Todos los compuestos con una permeabilidad igual o superior a la del Metoprolol serán considerados de alta permeabilidad mientras que los compuestos de la clase III son compuestos cuya permeabilidad es menor que la del Metoprolol. Dentro de las técnicas *in vitro*, destaca el ensayo de permeabilidad de Membrana Artificial paralela (PAMPA), que simula el comportamiento de la membrana celular para predecir la absorción transcelular. Se usa en sustancias que se absorben de forma pasiva. Es el método de elección en industria farmacéutica, ya que los métodos más complejos como los de perfusión *in situ* necesitan personal cualificado y mayor tiempo de ensayos<sup>10</sup>. Con el fin de evaluar el impacto de los mecanismos de transporte activo de fármacos, se han utilizado ensayos basados en células Caco-2. Además, existe otro modelo *in vitro*, muy versátil, en el que se aíslan secciones de segmento intestinal para cultivarlas posteriormente sobre células que nos permite determinar: la secreción, el metabolismo y el transporte intestinal paracelular y transcelular.

En cuanto a las técnicas *in situ* en animales, resultan fiables para determinar la permeabilidad y para la clasificación del SCB. Tanto el método de single-pass intestinal perfusión model (SPIP) como el Doluisio (closed-loop) han demostrado efectividad<sup>11</sup>. Por otro lado, los métodos *in vivo* en ratas, mediante el método de la canulación de la vena yugular, permiten administrar el compuesto por cualquier vía de administración y medir su aparición en sangre a través del catéter, lo que permite predecir la permeabilidad de manera indirecta. En cuanto a la determinación indirecta de la permeabilidad en humanos, se administra por vía oral el fármaco radiomarcado y se cuantifican los metabolitos del fármacos en todas las muestras biológicas, con el fin de estudiar los parámetros farmacocinéticos. Otra manera indirecta para medir permeabilidad en humanos, consiste en determinar la biodisponibilidad

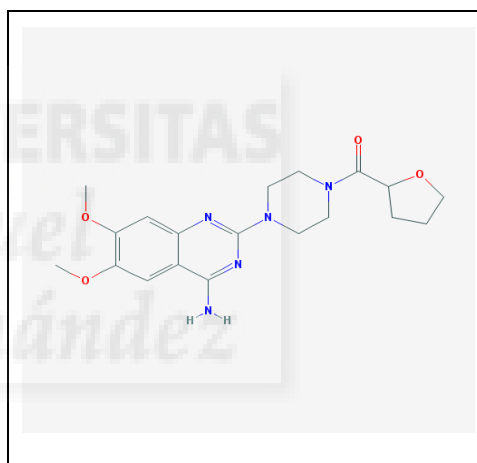
absoluta, comparando la biodisponibilidad de un fármaco administrado por vía oral con los datos de una dosis intravenosa.

Por último, las técnicas *in silico* basadas en modelos computacionales, son las más novedosas para predecir solubilidad y permeabilidad a partir de datos recogidos de estructuras químicas<sup>12</sup>, se trata de un método de cribado inicial en el campo de la investigación de nuevas moléculas. Además El SCB permite también predecir correlaciones *in vitro/in vivo* (IVIVCs), que se define como una relación matemática predictiva que conecta, por ejemplo, los datos de disolución obtenidos *in vitro* con los datos farmacocinéticos obtenidos *in vivo*. Las IVIVCs están incluidas en las guías de la EMA y la FDA.

## 2.5 Terazosina

La Terazosina es un antagonista alfa-1 adrenérgico perteneciente al grupo de las quinazolininas, cuyo mecanismo de acción es bloquear los receptores alfa-1 de manera reversible, produciendo vasodilatación arterial y venosa. Fundamentalmente se utiliza para el tratamiento de la hipertensión arterial leve o moderada y la hiperplasia benigna de próstata (HBP). Presenta una larga semivida

Figura 3. Estructura química Terazosina



(18 horas) lo que permite administrar al paciente una única dosis diaria, lo cual resulta ventajoso frente a principios activos de su misma categoría como la Prazosina. Además, su prolongado período de latencia para la instauración del efecto hipotensor, se ha relacionado con su menor tendencia a producir hipotensión postural. Incluso puede mejorar el perfil lipídico, podría ser un fármaco de elección en pacientes con HBP y alteraciones metabólicas como las dislipemias. La posología inicialmente utilizada es de 1 mg/día, aumentándose la dosis en 1 mg cada 5 días según la respuesta. La dosis de mantenimiento habitual es de 5 mg/24 h, con un máximo de 10 mg/24 h<sup>13,14,15</sup>.

Según el resultado de la búsqueda por principio activo a través de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) en el centro de información online del medicamento (CIMA) se obtienen actualmente registradas en España 20 especialidades farmacéuticas de Terazosina, que se recogen en la tabla 1.

En cuanto a las presentaciones en forma de solución oral, en España están registradas 3 especialidades: Sutif, Mayul, Zayasel. La primera en comercializarse fue Zayasel 1mg/ml solución oral, el 17 de noviembre del año 2000 ,por los Laboratorios Salvat, S.A. En ese mismo año se autorizó el Sutif, que es fabricado por laboratorios Salvat, S.A. Por último se comercializó Mayul en 2007<sup>16</sup>.

**Tabla 1.** Efecto de distintos excipientes en la permeabilidad

Presentaciones de terazosina	Especialidades
Terazosina hidrocloreuro 2 mg comprimidos	Deflox, Magnurol, Terazosina cinfa, Terazosina Mabo, Terazosina Normon
Terazosina hidrocloreuro 5 mg comprimidos	Alfaprost, Deflox, Magnurol, Mayul, Sutif, Terazosina Alter, Terazosina Cinfa, Terazosina Kern pharma, Terazosina Mabo, Terazosina Normon
Terazosina hidrocloreuro 1mg/ml solución oral	Sutif, Mayul, Zayasel
Terazosina hidrocloreuro dihidrato 2 mg comprimidos	Zayasel
Terazosina hidrocloreuro dihidrato 5 mg comprimidos	Zayasel

## 2.6 Influencia de excipientes en la absorción oral de fármacos

Los excipientes, se han considerado tradicionalmente sustancias inactivas, que se mezclan con los principios activos para darles el sabor, consistencia y forma para facilitar su administración y uso. Sin embargo, numerosos estudios muestran que los excipientes son fundamentales en las etapas previas a la absorción oral del fármaco, incluso pueden afectar a la eficacia final del tratamiento si el fármaco no se libera, se disuelve y se absorbe



apropiadamente. Estos estudios siguen aumentando y se han convertido en objetivo de la industria farmacéutica, que considera a los excipientes como un parámetro de variabilidad del rendimiento de su producto final<sup>17</sup>.

Podemos establecer una clasificación de los excipientes atendiendo al parámetro que modifican: velocidad de disolución, tránsito intestinal y permeabilidad. Son muchos los excipientes descritos en la literatura científica tales como tensioactivos, cosolventes, ciclodextrinas y fosfolípidos utilizados para aumentar la solubilidad de los fármacos durante su desarrollo farmacéutico<sup>18</sup>. Aunque según algunos autores, ciertos solubilizantes aumentan la solubilidad de fármacos poco solubles pero también pueden disminuir la absorción del fármaco a través del epitelio intestinal debido a la menor fracción de fármaco libre disponible para absorción<sup>19</sup>.

Asimismo es fundamental tener en cuenta el papel de los excipientes en el tránsito intestinal como factor limitante en la absorción de muchos fármacos de baja permeabilidad pertenecientes a la clase III. Como se recogen en distintas publicaciones, tanto el PEG 400, manitol, xilitol como el ácido pirofosfato sódico aumentan la motilidad intestinal con el consiguiente aumento de la velocidad de tránsito<sup>20</sup>. De hecho se ha demostrado que el PEG presenta un efecto dependiente de la dosis, es decir, a mayor dosis, menor tiempo de residencia del fármaco en el intestino delgado, acompañado de una disminución en la absorción<sup>21</sup>. Otro estudio realizado en voluntarios sanos demostró que la biodisponibilidad total y la tasa de absorción de la Ranitidina (clase III) se reducía de manera significativa en presencia de PEG<sup>22</sup>.

En el abordaje del estudio de la permeabilidad, es importante conocer el pKa del principio activo a estudiar, ya que sólo la fracción no ionizada es capaz de atravesar las membranas biológicas. En el caso de ser ionizable son sensibles al pH del entorno. Los principios activos fácilmente ionizables en presencia de excipientes que modifiquen el pH del entorno pueden ver afectada su permeabilidad. A su vez, los excipientes pueden afectar a la integridad de las uniones estrechas entre células, a los transportadores activos y por último a la actividad del citocromo P-450.



En un estudio cuyo objetivo es dar soporte a las las bioexenciones en fármacos de clase III como el Aciclovir, Atenolol, Ganciclovir, y Nadolol se determinó permeabilidad de cada uno de los compuestos a distintas concentraciones, con distintos excipientes (D-lactosa, povidona, HPMC, SLS y PEG 400) en dos modelos diferentes: monocapas de células Caco-2 y perfusión intestinal *in situ* en ratas. La Antipirina (clase I) se utilizó como control por su alta permeabilidad. No se observaron aumentos en la permeabilidad de ninguno de los compuestos en presencia de cualquiera de los excipientes ensayados en ninguno de los modelos, a excepción de la alteración de la integridad de la monocapa de células Caco-2 por laurilsulfato sódico a partir de una concentración de 0,1 mg/ml<sup>23</sup>. Rege y colaboradores<sup>24</sup> apoyan estos resultados, concluyeron que tensioactivos como el lauril sulfato sódico, incrementan considerablemente la permeabilidad, ya que afectan a las uniones estrechas aumentando la distancia intercelular y son capaces de arrastrar la capa de difusión acuosa estática.

Takizawa y colaboradores<sup>25</sup> evaluaron el efecto de distintos excipientes en la permeabilidad del intestino (yeyuno e íleon) de rata mediante el modelo de sacos evertidos, demostraron que los excipientes afectaban la permeabilidad de la membrana de compuestos solubles en agua a través de la vía paracelular, y se observó una diferencia regional en la absorción dentro del intestino delgado.

Además, existen excipientes que provocan alteraciones de la permeabilidad debido a la inhibición de transportadores de secreción. Cornaire y colaboradores<sup>26</sup> determinaron en su publicación alteraciones en la permeabilidad de la Digoxina y el Celiprolol, ambos sustratos de la glicoproteína-p. Realizaron un primer ensayo usando la técnica de sacos evertidos. De todos los excipientes utilizados en este primer ensayo se seleccionaron los 5 que habían mejorado la absorción de los fármacos *in vitro* para realizar un posterior estudio *un vivo* con ratas. En el estudio *in vivo* de la Digoxina el único excipiente que produjo un aumento total del AUC fue softigen 767. También se observó un aumento de la absorción temprana de la digoxina (entre 0 y 40 minutos) con el TPGS, imwitor 742 y el softigen 767. En cuanto a

los ensayos *in vivo* con Celiprolol no aumentaron los AUC totales (de 0 a 60 minutos), pero sí se modificaron el perfil de la cocentraciones plasmáticas, concretamente el TPGS y el softigen 767 desplazan el valor de tmax a la derecha.

En la tabla 2, se ha recogido el efecto sobre la permeabilidad de distintos excipientes, determinada mediante distintas técnicas por distintos autores.

**Tabla 2.** Efecto de distintos excipientes en la permeabilidad

Excipiente	Fármaco	SCB	Técnica	Efecto	Cita
<b>Metilcelulosa</b>	5-CF (Carboxifluoresceína)	-	Modelo de saco in vitro	Aumento permeabilidad en yeyuno	Takizawa (25)
<b>Propilenglicol</b>	Ranitidina	III	Células Caco-2	No afecta a la permeabilidad	Rege (24)
<b>Propilenglicol</b>	Digoxina	IV	1) Sacos evertidos  2) In vivo ratas	No afecta a la permeabilidad	Cornaire (26)
<b>Propilenglicol</b>	Ampicilina Antipirina	-	In vivo perros	No afecta a la permeabilidad	Schulze (29)
<b>Sorbitol</b>	Ranitidina	III	In vivo en perros	No afecta a la permeabilidad	Koch (40)
<b>PEG 300</b>	Taxol Doxorrubicina	-	Células caco- 2	Aumenta la permeabilidad	Gole (27)
<b>DMSO</b>	Acido salicílico	I	Revisión bibliográfica	No afecta a la permeabilidad	Buggins (28)
<b>PEG 400</b>	Ranitidina	III	Ensayo con voluntarios in vivo	No afecta a la biodisponibilidad, afecta al tiempo de tránsito	Basit (22)
<b>Metil-B-ciclodextrina</b>	5-CF	-	Modelo de sacos evertidos	Aumenta la permeabilidad en yeyuno	Takizawa (25)
<b>Ciclodextrina</b>	Fármacos con baja solubilidad	-	Células Caco-2	Aumenta permeabilidad inhibe g-p	Gole (27)
<b>Almidón</b>	5-CF	-	Modelo de sacos evertidos	Aumento de la permeabilidad en yeyuno	Takizawa (25)
<b>Hidroxipropilcelulosa</b>	5-CF	-	Modelo de sacos evertidos	Aumento de la permeabilidad en yeyuno	Takizawa (25)
<b>Croscarmelosa</b>	5-CF	-	Modelo de sacos evertidos	Aumento de la permeabilidad en yeyuno	Takizawa (25)

Excipiente	Fármaco	SCB	Técnica	Efecto	Cita
Ácido silícico anhidro	5-CF	-	Modelo de sacos evertidos	Aumento de la permeabilidad paracelular	Takizawa (25)
Manitol	Nitroglicerina	-	Revisión bibliográfica	Aumento de la permeabilidad paracelular	Gole (27)
Lactosa	Atenolol Aciclovir Hidroclorotiazida	-	Caco 2	No afecta a la permeabilidad  De ningún fármaco	Rege (24)
Tween 80	Hidroclorotiazida	III	Caco-2	Aumenta la permeabilidad	Rege (24)
Diocil sulfosuccinato de sodio	Cimetidina	III	Caco-2	Aumento de la permeabilidad	Rege (24)
Lactosa	Aciclovir Antipirina Ganciclovir Atenolol Nadolol	III	Células Caco-2 y perfusión intestinal en rata	No afectan a la permeabilidad del fármaco.	Parr (23)
Sorbitol	Ranitidina	III	Revisión bibliográfica	Disminución de la absorción	Panakanti (30)
Sorbitol	Metoprolol	I	Revisión bibliográfica	Disminución de la absorción	Panakanti (30)

### 3. OBJETIVOS

Este trabajo de investigación forma parte de un proyecto cuyo objetivo final consiste en dar explicación a los ensayos de bioequivalencia en humanos fallidos o exitosos. El objetivo de la investigación es encontrar modelos *in vitro* o *in situ* que permitan predecir el comportamiento encontrado en los estudios con voluntarios sanos. Para comparar el papel de los excipientes en el resultado del ensayo de bioequivalencia de Zayasel frente al genérico fracasado, se siguen los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la permeabilidad de la Terazosina en los distintos tramos de intestino.
- Comparar la permeabilidad de la Terazosina con la de Metoprolol.
- Recoger datos sobre las diferencias en la formulación del Zayasel y la formulación genérica.
- Determinar la permeabilidad intestinal de Terazosina en presencia de la concentración utilizada de propilenglicol en la formulación genérica.

- Estimar la permeabilidad intestinal de Terazosina en presencia de la concentración de sorbitol utilizada para en ensayo de la formulación genérica.
- Determinar la permeabilidad intestinal de Terazosina en presencia de ciclamato.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

##### 4.1 COMPUESTOS EMPLEADOS EN EL ESTUDIO

###### 4.1.1 *Fármaco ensayado*

Por solicitud de la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios se inicia el estudio de formulaciones de Terazosina. El fármaco se seleccionó por disponer de los datos del estudio de bioequivalencia en humanos, así como la cooperación de las empresas de genéricos involucradas en el proyecto para aportar sus formulaciones estudiadas. Las concentraciones de fármaco ensayadas se seleccionaron a partir de las que contiene la formulación comercializada de Zayasel y los excipientes según la formulación comercializada comparada con la formulación genérica ensayada y fallida (dato confidencial proporcionado por la empresa que desarrolló el medicamento genérico). El AUC y Cmax del ensayo fallido fueron superiores en la formulación test que en la de referencia.

**Tabla 3.** Composición de la formulación test y formulación referencia

Formulación Zayasel	Formulación ensayada
Sorbitol	Sorbitol
Parahidroxibenzoato de metilo	Parahidroxibenzoato de metilo
Parahidroxibenzoato de propilo	Parahidroxibenzoato de propilo
Aroma de piña	Aroma de piña
-----	Propilenglicol
-----	Ciclamato

#### 4.1.2 Excipientes utilizados

- Sorbitol: además de humectante y plastificante, se usa como diluyente en comprimidos, especialmente útil en comprimidos masticables debido a su sabor dulce. En las preparaciones líquidas se utiliza como vehículo en formulaciones sin azúcar y en los jarabes resulta eficaz para evitar la cristalización alrededor del tapón de las botellas. La concentración adecuada para formulaciones líquidas es del 70% (p/v).
- Propilenglicol: se utiliza como desinfectante, conservante, humectante, plastificante, disolvente y cosolvente miscible en agua. En cuanto a sus aplicaciones, se ha utilizado como disolvente y conservante tanto en formulaciones parenterales como en no parenterales. Capaz de disolver un elevado número de sustancias como , fenoles, corticoides, vitaminas como la A y la D, barbitúricos, la mayoría de los alcaloides y muchos anestésicos locales.
- Ciclamato: se suele utilizar en forma de ciclamato de sodio también conocido como E952. Se utiliza como un agente edulcorante en formulaciones farmacéuticas y en industria alimentaria. Su poder edulcorante es aproximadamente 30 veces el de sacarosa en soluciones diluidas de hasta aproximadamente 0,17% p/v. Sin embargo, a concentraciones más altas (0,5% p/v) produce un sabor amargo. Además, ayuda a enmascarar algunas características de sabor desagradables<sup>31</sup>.

#### 4.2 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Los estudios en animales experimentales incluyeron 16 ratas de ambos sexos, pertenecientes a la raza Wistar, con edad comprendida entre dos y tres meses.

La variabilidad de peso de los animales tras permanecer 4 horas en ayuno fue de entre 230-250 gramos.

Todos los experimentos se realizaron siguiendo las normas éticas establecidas por la Comunidad Europea y la legislación Española de acuerdo a lo establecido en el RD 53/2013 de 1 de febrero, que traspone la directiva

2010/63/UE de 22 de septiembre. Los estudios con ratas Wistar fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad Miguel Hernández.

### 4.3 ENSAYOS DE ABSORCIÓN

#### 4.3.1 Preparación de las soluciones previas al ensayo de absorción.

##### (A) Solución anestésica

En función del peso, se utilizó una dosis capaz de anestesiar a las ratas manteniendo sus constantes vitales, aproximadamente 0,4 ml por cada 100 gramos de peso del roedor. La solución se mantiene a 37° grados para su administración por vía intraperitoneal.

##### (B) Solución de lavado intestinal A

Se emplea para limpiar el lumen intestinal, con el objetivo de arrastrar los residuos que persisten en él tras el período de ayuno. Su composición se describe a continuación:

Cloruro Sódico .....	9,00 g
Cloruro potásico .....	0,34 g
Cloruro cálcico .....	0,19 g
Fosfato monopotásico .....	0,76 g
Agua destilada c.s.p .....	1000 mL

##### (C) Solución de lavado intestinal B

Previo a los ensayos de absorción, se elabora una solución con un pH 7,00 utilizando un tampón fosfato para adecuar la mucosa intestinal con una composición de:

NaCl .....	9,00g
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> 1/15 M .....	3,9 mL
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1/15M .....	6,1 mL
H <sub>2</sub> O destilada c.s.p .....	1000 mL

#### (D) Solución de perfusión

Para preparar la solución de Terazosina se añadieron las cantidades adecuadas de cada componente, previamente pesadas, a la solución de lavado B. Elevadas concentraciones de fosfato podrían afectar al correcto funcionamiento de la mucosa intestinal, por lo que para equilibrar el pH a  $7.00 \pm 2$  se utiliza NaOH 0,1 N .

#### 4.3.2 Método experimental

Las constantes aparentes de velocidad de absorción ( $K_{pa}$ ) del Zayasel se determinaron a partir de una técnica de perfusión *in situ* sin recirculación en el intestino delgado completo adaptada de la inicialmente propuesta por Doluisio y colaboradores<sup>32</sup>. Se trata de una técnica de perfusión que supuso un avance respecto a las técnicas *in situ* del momento para el cálculo de la constante de absorción de fármacos en el tracto gastrointestinal de las ratas<sup>33</sup>. La principal característica del método de Doluisio es su capacidad para mantener la solución de estudio en un compartimento intestinal estanco que permite observar la desaparición del fármaco en el segmento del intestino acotado.

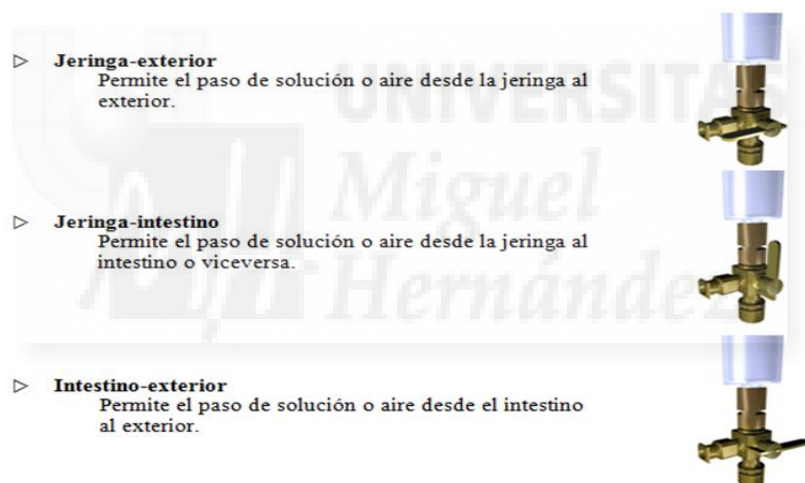
#### 4.3.3 Cirugía

Antes de comenzar el ensayo las ratas se mantienen en condiciones estables a 25°C , con restricción de alimento sólido y libre ingesta de agua 4 horas antes del procedimiento. Las ratas se anestesian por vía inhalatoria, utilizando un anestésico volátil tipo halogenado isofluorano. La inducción a la anestesia se lleva a cabo con una inyección de pentobarbital sódico en la zona peritoneal con la dosis correspondiente a su peso. La monitorización de la anestesia se basa en la comprobación de ausencia o presencia de la respuesta refleja durante todo el ensayo. En el momento que comprueba la carencia de reflejos, se sitúa al animal en posición decúbito supino.

La técnica requiere pasos quirúrgicos preestablecidos que se mencionan a continuación. El primer paso consiste en seccionar la piel para descubrir la cavidad abdominal dos centímetros por encima del poro genital. A continuación, se hace una incisión siguiendo la línea alba de la capa muscular

abdominal. Una vez abierta la cavidad abdominal se localiza el duodeno, segmento del intestino en el cual converge el conducto biliar. Este conducto debe obstruirse con una sutura de seda para evitar el paso de la secreción biliar al intestino y la presencia de un posible ciclo enterohepático. En el siguiente paso, se realiza un ligero corte en bisel en el extremo del duodeno para introducir una cánula de vidrio en forma de L con bordes romos, la cual se sostiene al intestino suturando con hilo de seda. El otro extremo de la cánula se conecta mediante un tubo de polietileno, a una llave de tres pasos tipo stopcock. Variando la posición de esta llave se pueden conseguir las siguientes conexiones como se muestra en la figura 4.

**Figura 4.** Esquema posiciones llave tres pasos



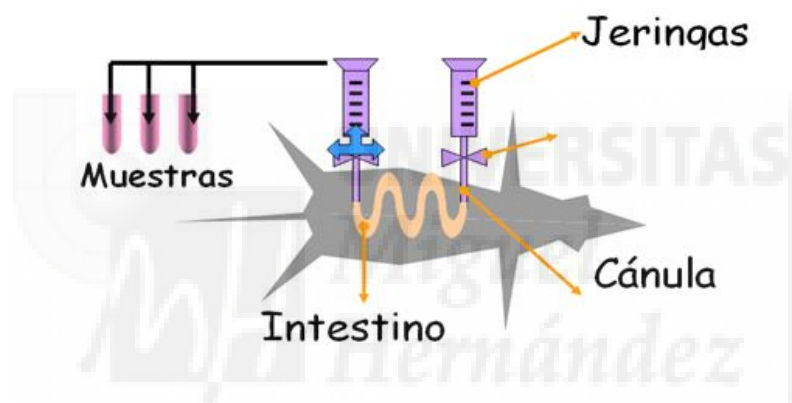
**Figura 4.** Imagen tomada del Libro de Metodologías Biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos <sup>7</sup>.

La llave de tres pasos está encajada con una rosca a una jeringa de vidrio de 10 mL de capacidad, sujeta mediante una pinza a un soporte universal. A continuación se localiza ciego, donde se realiza otra incisión en bisel y se procede a la limpieza del intestino, primero con la solución lavado A para limpiar la mucosa del intestino. Consecutivamente se administra la solución de lavado B para recobrar el pH y preparar a la mucosa para el ensayo, aunque nunca llegamos a eliminar del todo los restos de la solución preservando un



volumen residual de aproximadamente 0,7 ml<sup>34</sup>. Tras finalizar los lavados, se efectúa el ensayo por tramos, es decir, se procede a perfundir el duodeno, yeyuno e íleon por separado, de modo que se deben canular ambos extremos de estos tres segmentos, acotando cada zona. Se comienza por delimitar el íleon, para ello ayudándonos con un hilo de seda de 45 centímetros medimos su longitud y en el punto donde termina este hilo se coloca la cánula en sentido opuesto a la cánula anterior(en el extremo íleo-cecal). Este mismo proceso se repite con el yeyuno, y por último se delimita el duodeno canulando desde el ligamento de Treitz (marca anatómica que referencia la transición duodeno-yeyunal) hasta la primera cánula.

**Figura 5.** Esquema de la Técnica de Doluisio para un solo tramo de intestino



**Figura 5.** Imagen tomada del Libro de Metodologías Biofarmacéuticas en el desarrollo de medicamentos <sup>7</sup>.

#### 4.3.4 Perfusión y toma de muestras

La solución de Terazosina se vierte en las jeringas proximales. Se necesita un volumen de 2 ml para el duodeno y 4 ml para el yeyuno e íleon.

La llave de tres pasos se mantiene en posición intestino-exterior. Acto seguido, la llave distal se coloca en posición intestino-exterior y la llave proximal en posición jeringa-intestino. Se introduce la solución en el intestino presionando ligeramente el émbolo de la jeringa proximal. De esta manera, el aire contenido en dicha cavidad se desplaza al exterior sin producir una distensión excesiva de la pared intestinal. Se orientan las llaves en posición jeringa-exterior y obtenemos el compartimento estanco.

La toma de muestras se realiza cada 5 minutos alternando cada una de las jeringas. La primera muestra se realiza por la jeringa distal y la última, por la proximal. Se recogen un total de seis muestras (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min) de 150 µl cada una.

Para extraer la muestra, es necesario colocar las dos llaves en posición jeringa-intestino. Se coge aire con la jeringa opuesta al muestreo y se introduce en el intestino a la vez que la solución asciende por la otra jeringa.

Una vez realizada la toma de todas las muestras, se sacrifica el animal y a continuación se extrae el líquido remanente en el intestino para medir su volumen.

#### *4.3.5 Reabsorción de agua*

En el ensayo de reabsorción de agua, se extrae todo el líquido sobrante del intestino. Se desconecta la cánula distal del íleon y se vierte el líquido en un vaso de precipitados; La extracción finaliza una vez desconectada la cánula proximal, a partir de la cual se presiona con los dedos el tramo de intestino de principio a fin, vaciando completamente su contenido. Se repite el mismo proceso para el tramo de yeyuno y duodeno. Por último, se mide el volumen extraído de cada tramo junto con su longitud, datos necesarios para el cálculo posterior de la constante de velocidad de absorción.

#### *4.3.6 Tratamiento de las muestras*

Las muestras recogidas se centrifugan a 8000 rpm durante 10 minutos para separar el sobrenadante que contiene la muestra, de los restos de la mucosa intestinal que se han podido arrastrar durante el vaciado. Se toman 0,1 mL del sobrenadante y se colocan en viales topacio de vidrio especiales para HPLC.

### **4.4 Método analítico**

Para valorar las muestras se utiliza la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) de fase inversa y detección de fluorescencia a unas longitudes de onda de 485nm y 546nm.

La técnica analítica se validó previamente por el grupo de investigación por lo tanto, la precisión y exactitud del método analítico se mantuvieron dentro de los

límites recomendados (5%). Las concentraciones ensayadas se encontraron en todo momento por encima del límite de detección del método y dentro del ámbito de las rectas de calibración. En cuanto a la fase estacionaria seleccionada se trata de un sistema compuesto por una precolumna Teknocroma TCR-C130-B, con dos filtros de 2  $\mu\text{m}$  relleno con micropartículas C-18 de 40  $\mu\text{m}$  de tamaño y una columna de acero inoxidable Waters modelo Nova Pak C-18 de 150 mm de longitud. La fase móvil es una mezcla de 40% acetonitrilo y 60%  $\text{H}_2\text{O}$  adicionada con 1% de trifluoroacético.

#### **4.5 Métodos matemáticos y análisis estadístico**

##### *4.5.1 Cálculo de la velocidad de reabsorción del agua*

Considerar la influencia del agua en el ensayo de absorción es un aspecto fundamental a la hora de realizar los cálculos de las permeabilidades. El agua sufre un proceso de reabsorción al mismo tiempo que nuestra sustancia problema se absorbe. La falta de agua en el lumen intestinal aumenta la concentración de la sustancia y los resultados pueden quedar falseados por exceso, en especial los de las muestras tomadas en los últimos tiempos.

Para evitar una concentración sesgada, se calcula el volumen remanente a cada tiempo de toma de muestra. Puesto que el volumen sigue una cinética de orden 0, la ecuación diferencial del proceso y su forma integrada son :

$$\frac{dV}{dt} = -k_0 \qquad V = V_0 - k_0 \cdot t$$

En la que  $V$  es el volumen remanente en el intestino a cada tiempo,  $V_0$  es el volumen remanente a tiempo inicial y  $K_0$  constituye la constante de velocidad de absorción de agua (mL/min).

Una vez conocida la  $K_0$  para cada tramo junto con el  $V_0$  se puede determinar el volumen teórico para cada tiempo de muestra ( $V_t$ ).

Con los  $V_t$  se corrigen los valores experimentales de las concentraciones de sustancia en las muestras, utilizando la siguiente ecuación:

$$C=E \frac{V_t}{V_0}$$

Siendo C la concentración de soluto corregida y E la concentración obtenida experimentalmente con el HPLC.

Los parámetros  $V_0$  (ordenada en el origen) y  $K_0$  (pendiente), con los que se determinan los volúmenes teóricos para cada tiempo de toma de muestra ( $V_t$ ), se obtienen a partir de la regresión lineal por mínimos cuadrados de los volúmenes obtenidos.

#### 4.5.2 Cálculo de la constante aparente de la velocidad de absorción ( $k_a$ )

La velocidad de salida del fármaco desde el lugar de absorción, sigue una cinética de primer. Se considera que la desaparición del compuesto se debe únicamente a la absorción. La ecuación matemática que rige este proceso es la siguiente:

$$\frac{dC}{dt} = -k_a \cdot C$$

Donde C se refiere a la concentración remanente de fármaco en el intestino y la  $K_a$  a la constante de velocidad de absorción de primer orden. Su forma integrada es:

$$C=C_0 \cdot e^{-k_a \cdot t}$$

Donde C es la concentración de fármaco a tiempo t y  $C_0$  corresponde a la concentración inicial de fármaco a tiempo 0.

Se ha ajustado la ecuación en cada uno de los casos a los datos teóricos mediante el uso del programa Excel y la herramienta Solver. Las estimaciones iniciales consideradas se obtienen mediante regresión lineal de los datos.

#### 4.5.3 Cálculo de la permeabilidad intestinal

A partir de este método experimental se obtienen las constantes de velocidad de absorción ( $K_{ap}$ ) ( $h^{-1}$ ) que se transforman en valores de permeabilidad intestinal efectiva ( $P_{eff}$ ) mediante la siguiente relación:

$$P_{eff} = \frac{K_{ap} \cdot R}{2}$$

Donde  $K_{ap}$  es la constante de absorción ( $seg^{-1}$ ) y  $r$  es el radio del tramo del intestino estudiado (cm). Esta transformación es imprescindible si se pretenden comparar los datos obtenidos en distintos tramos intestinales, ya que cada tramo tiene una longitud y un volumen perfundido distinto.

#### 4.6 Prueba de comparación de medias

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

Las pruebas estadísticas para analizar si existen o no diferencias significativas en los valores de permeabilidades obtenidas, previa comprobación de la homogeneidad de varianza (prueba de Levene con una significación mayor de 0,05) fue la prueba de comparación múltiple de Scheffé.

### 5. RESULTADOS

En las siguientes tablas se presentan las concentraciones corregidas en el lumen intestinal frente al tiempo tras la administración de Terazosina con los distintos excipientes.

**Tabla 4.** Concentraciones de Terazosina remanente ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de Terazosina en duodeno a una concentración  $4 \mu\text{g/ml}$

<b>Terazosina (<math>4\mu\text{g/ml}</math>)</b>				
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Concentraciones remanentes en lumen (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>			
	<b>Tramo: Duodeno</b>			
	<b>Animales experimentación</b>			
	1	2	3	4
5	3,27	2,40	1,58	0,85
10	2,66	2,15	1,29	0,73
15	2,30	1,76	1,22	0,62
20	1,58	1,37	1,09	0,52
25	1,14	0,96	1,01	0,42
30	0,58	0,83	0,88	0,34
<b>Peff (cm/s)</b>	<b>4,07E-06</b>	<b>8,17E-06</b>	<b>6,02E-06</b>	<b>7,34E-06</b>
<b>Peff <math>\pm</math> DE = <math>6,04\text{E-}06 \pm 1,79\text{E-}06</math> cm/s</b>				

**Tabla 5.** Concentraciones de Terazosina remanente ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de Terazosina en yeyuno a una concentración  $4 \mu\text{g/ml}$

<b>Terazosina (<math>4\mu\text{g/ml}</math>)</b>				
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Concentraciones remanentes en lumen (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>			
	<b>Tramo: Yeyuno</b>			
	<b>Animales experimentación</b>			
	1	2	3	4
5	1,60	2,95	1,07	0,87
10	1,51	2,17	0,93	0,79
15	1,42	2,04	0,84	0,73
20	1,36	1,93	0,73	0,65
25	1,31	1,86	0,60	0,54
30	1,06	1,35	0,53	0,43
<b>Peff (cm/s)</b>	<b>5,30E-05</b>	<b>2,90E-05</b>	<b>3,87E-05</b>	<b>2,02E-05</b>
<b>Peff <math>\pm</math> DE = <math>3,52\text{E-}05 \pm 1,40\text{E-}05</math> cm/s</b>				

**Tabla 6.** Concentraciones de Terazosina remanente ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de Terazosina en íleon a una concentración  $4 \mu\text{g/ml}$

<b>Terazosina (<math>4\mu\text{g/ml}</math>)</b>				
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Concentraciones remanentes en lumen (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>			
	<b>Tramo: Íleon</b>			
	<b>Animales experimentación</b>			
	1	2	3	4
5	2,08	3,08	1,90	
10	1,85	1,76	1,54	
15	1,61	1,42	1,49	
20	1,30	1,23	1,37	
25	1,41	1,03	1,21	
30	1,15	0,84	1,12	
<b>Peff (cm/s)</b>	<b>7,73E-05</b>	<b>6,30E-05</b>	<b>5,95E-05</b>	
<b>Peff <math>\pm</math> DE = <math>6,66\text{E-}05 \pm 9,42\text{E-}06</math> cm/s</b>				

**Tabla 7.** Concentraciones de Terazosina remanente + propilengliol ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de Terazosina en duodeno a una concentración  $4 \mu\text{g/ml}$

<b>Terazosina (<math>4\mu\text{g/ml}</math>) + propilenglicol</b>				
<b>Concentraciones remanentes en lumen (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>				
<b>Tramo: Duodeno</b>				
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Animales experimentación</b>			
	1	2	3	4
<b>5</b>	3,31	3,31	3,34	3,22
<b>10</b>	2,95	2,51	3,30	2,65
<b>15</b>	2,42	1,50	2,99	2,23
<b>20</b>	1,64	0,44	2,86	1,63
<b>25</b>	1,24	0,12	2,64	1,33
<b>30</b>	0,96	0,13	2,49	0,86
<b>Peff (cm/s)</b>	<b>1,53E-04</b>	<b>9,34E-05</b>	<b>1,01E-04</b>	<b>9,38E-05</b>
<b>Peff <math>\pm</math> DE = <math>1,10\text{E-}04 \pm 2,87\text{E-}05</math> cm/s</b>				

**Tabla 8.** Concentraciones de Terazosina remanente + propilengliol ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de Terazosina en yeyuno a una concentración  $4 \mu\text{g/ml}$

<b>Terazosina (<math>4\mu\text{g/ml}</math>) + propilenglicol</b>				
<b>Concentraciones remanentes en lumen (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>				
<b>Tramo: Yeyuno</b>				
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Animales experimentación</b>			
	1	2	3	4
<b>5</b>	3,45	3,44	3,44	
<b>10</b>	3,36	3,30	3,00	
<b>15</b>	3,33	3,06	2,73	
<b>20</b>	3,21	2,45	2,37	
<b>25</b>	2,69	1,75	1,32	
<b>30</b>	2,36	1,65	1,29	
<b>Peff (cm/s)</b>	<b>5,36E-05</b>	<b>8,55E-05</b>	<b>8,75E-05</b>	
<b>Peff <math>\pm</math> DE = <math>7,55\text{E-}05 \pm 1,90\text{E-}05</math> cm/s</b>				

**Tabla 9.** Concentraciones de Terazosina remanente + propilengliol ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de Terazosina en íleon a una concentración  $4 \mu\text{g/ml}$

<b>Terazosina (<math>4\mu\text{g/ml}</math>) + propilenglicol</b>				
<b>Concentraciones remanentes en lumen (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>				
<b>Tramo: Íleon</b>				
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Animales experimentación</b>			
	1	2	3	4
<b>5</b>	3,44	3,45	3,58	3,42
<b>10</b>	3,27	3,07	3,12	2,45
<b>15</b>	2,93	2,93	2,72	2,33
<b>20</b>	2,65	2,41	2,50	1,68
<b>25</b>	2,32	2,11	2,04	1,31
<b>30</b>	1,82	1,28	1,84	1,00
<b>Peff (cm/s)</b>	<b>4,77E-05</b>	<b>8,59E-05</b>	<b>4,34E-05</b>	<b>8,01E-05</b>
<b>Peff <math>\pm</math> DE = <math>6,43\text{E-}05 \pm 2,81\text{E-}05</math> cm/s</b>				

**Tabla 10.** Concentraciones de Terazosina remanente+ sorbitol ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de Terazosina en duodeno a una concentración 4  $\mu\text{g/ml}$

<b>Terazosina (4<math>\mu\text{g/ml}</math>) + sorbitol</b>				
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Concentraciones remanentes en lumen (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>			
	<b>Tramo: Duodeno</b>			
	<b>Animales experimentación</b>			
	1	2	3	4
5	3,55		3,43	3,51
10	2,38		3,51	3,28
15	2,29		3,26	3,28
20	2,11		3,22	3,21
25	1,83		3,17	3,17
30	1,75		3,06	3,07
<b>Peff (cm/s)</b>	<b>1,78E-05</b>		<b>1,57E-05</b>	<b>9,74E-06</b>
<b>Peff <math>\pm</math> DE = 1,44E-05 <math>\pm</math> 4,18E-06 cm/s</b>				

**Tabla 11.** Concentraciones de Terazosina remanente+ sorbitol ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de Terazosina en yeyuno a una concentración 4  $\mu\text{g/ml}$

<b>Terazosina (4<math>\mu\text{g/ml}</math>) + sorbitol</b>				
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Concentraciones remanentes en lumen (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>			
	<b>Tramo: Yeyuno</b>			
	<b>Animales experimentación</b>			
	1	2	3	4
5	3,53	3,56	3,60	3,50
10	3,16	3,50	3,51	3,26
15	2,97	3,24	3,38	3,14
20	2,80	3,22	3,25	3,05
25	2,57	3,17	3,00	2,96
30	2,47	2,87	2,92	2,84
<b>Peff (cm/s)</b>	<b>2,45E-05</b>	<b>2,36E-05</b>	<b>1,96E-05</b>	<b>2,52E-05</b>
<b>Peff <math>\pm</math> DE = 2,32E-05 <math>\pm</math> 2,51E-06 cm/s</b>				

**Tabla 12.** Concentraciones de Terazosina remanente+ sorbitol ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de Terazosina en íleon a una concentración 4  $\mu\text{g/ml}$

<b>Terazosina (4<math>\mu\text{g/ml}</math>) + sorbitol</b>				
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Concentraciones remanentes en lumen (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>			
	<b>Tramo: Íleon</b>			
	<b>Animales experimentación</b>			
	1	2	3	4
5	3,59	3,52	3,58	3,57
10	3,53	3,56	3,30	3,44
15	3,35	2,99	3,31	3,42
20	2,94	2,68	3,19	3,23
25	2,98	2,58	3,09	3,20
30	2,41	2,08	2,42	2,59
<b>Peff (cm/s)</b>	<b>5,44E-05</b>	<b>4,44E-05</b>	<b>4,53E-05</b>	<b>5,87E-05</b>
<b>Peff <math>\pm</math> DE = 5,07E-05 <math>\pm</math> 6,00E-06 cm/s</b>				



**Tabla 13.** Concentraciones de Terazosina remanente+ ciclamato ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de Terazosina en duodeno a una concentración 4  $\mu\text{g/ml}$

<b>Terazosina (4<math>\mu\text{g/ml}</math>) + ciclamato</b>				
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Concentraciones remanentes en lumen (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>			
	<b>Tramo: Duodeno</b>			
	<b>Animales experimentación</b>			
	1	2	3	4
5	3,30	3,39	3,49	3,45
10	2,15	2,67	3,10	2,93
15	2,04	2,42	2,96	2,39
20	1,68	2,10	2,78	2,02
25	1,43	1,78	2,55	1,64
30	1,20	1,55	2,38	1,32
<b>Peff (cm/s)</b>	<b>1,07E-05</b>	<b>9,96E-06</b>	<b>1,05E-05</b>	<b>1,54E-05</b>
<b>Peff <math>\pm</math> DE = 1,17E-05 <math>\pm</math> 2,54E-06 cm/s</b>				

**Tabla 14.** Concentraciones de Terazosina remanente+ ciclamato ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de Terazosina en yeyuno a una concentración 4  $\mu\text{g/ml}$

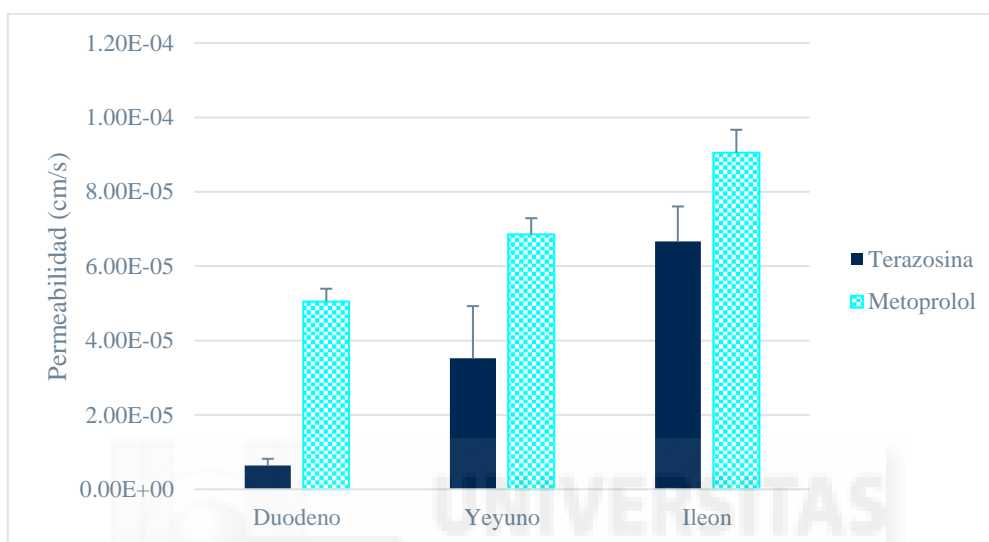
<b>Terazosina (4<math>\mu\text{g/ml}</math>) + ciclamato</b>				
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Concentraciones remanentes en lumen (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>			
	<b>Tramo: Yeyuno</b>			
	<b>Animales experimentación</b>			
	1	2	3	4
5	3,52	3,42	3,26	3,54
10	3,41	3,34	3,20	2,93
15	2,98	3,10	2,99	2,63
20	2,85	2,66	2,66	2,23
25	2,28	2,40	2,34	2,01
30	2,13	2,01	1,96	1,42
<b>Peff (cm/s)</b>	<b>4,59E-05</b>	<b>3,73E-05</b>	<b>4,30E-05</b>	<b>4,38E-05</b>
<b>Peff <math>\pm</math> DE = 4,25E-05 <math>\pm</math> 3,70E-06 cm/s</b>				

**Tabla 15.** Concentraciones de Terazosina remanente+ ciclamato ( $\mu\text{g/ml}$ ) en el lumen intestinal a los distintos tiempos de toma de muestra, obtenidas tras la perfusión de una solución de Terazosina en íleon a una concentración 4  $\mu\text{g/ml}$

<b>Terazosina (4<math>\mu\text{g/ml}</math>) + ciclamato</b>				
<b>Tiempo (minutos)</b>	<b>Concentraciones remanentes en lumen (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>			
	<b>Tramo: Íleon</b>			
	<b>Animales experimentación</b>			
	1	2	3	4
5	3,27	3,36	3,61	3,51
10	3,05	3,27	3,16	2,91
15	2,77	3,16	2,97	2,87
20	2,59	3,02	2,56	2,35
25	2,35	2,70	2,41	2,16
30	2,04	2,29	1,52	1,85
<b>Peff (cm/s)</b>	<b>8,05E-05</b>	<b>4,84E-05</b>	<b>6,12E-05</b>	<b>7,92E-05</b>
<b>Peff <math>\pm</math> DE = 6,74E-05 <math>\pm</math> 1,54E-05 cm/s</b>				

En la figura 6 se presenta el gráfico de las permeabilidades de Terazosina comparada con la permeabilidad del Metoprolol en presencia de excipientes en los distintos tramos intestinales.

**Figura 6.** Permeabilidad de la Terazosina en los distintos tramos del intestino y su comparación con el Metoprolol.



Se ha realizado una prueba de comparación paramétrica previa comprobación de la homogeneidad de varianza (prueba de Levene con una significación mayor de 0,05).

**Tabla 16.** Resultado de la comparación múltiple de permeabilidades obtenidas en los distintos tramos intestinales tras la administración de Terazosina (4 µg/ml).

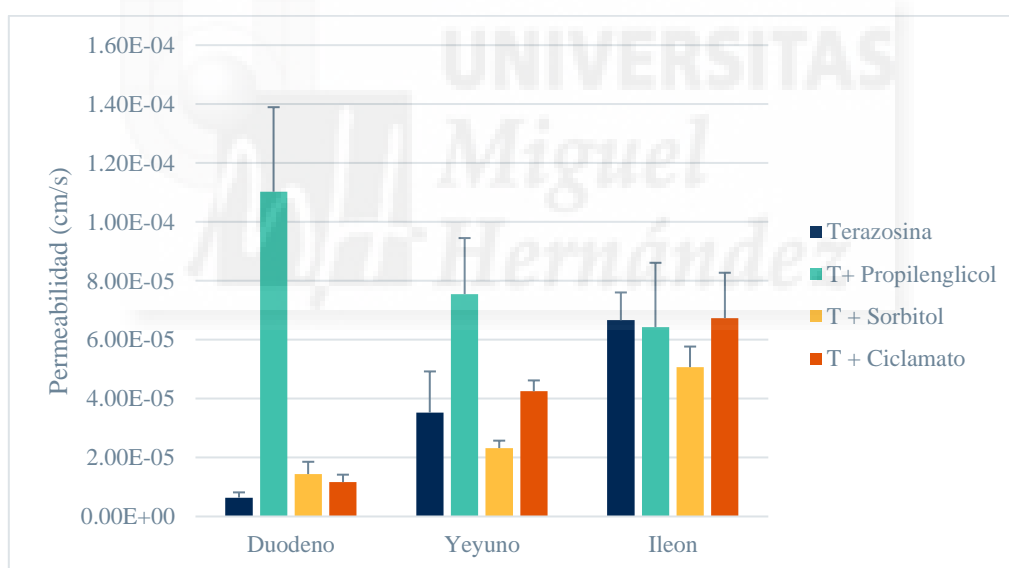
Prueba de comparación múltiple de Scheffé		
	Duodeno	Yeyuno
Duodeno	-	-
Yeyuno	S	-
Ileon	S	S

**Tabla 17.** Prueba de *t* de Student para la comparación de la permeabilidad entre Metoprolol y Terazosina para cada uno de los segmentos intestinales ensayados

TRAMO INTESTINAL	Sig.
Duodeno	S
Yeyuno	S
Íleon	NS

En la figura 7 se presenta el gráfico de las permeabilidades de Terazosina y las permeabilidades del fármaco con cada uno de los excipientes en los distintos tramos intestinales.

Figura 7. Permeabilidad entre Terazosina (4 µg/ml) en presencia de cada uno de los excipientes para cada uno de los segmentos intestinales ensayados.

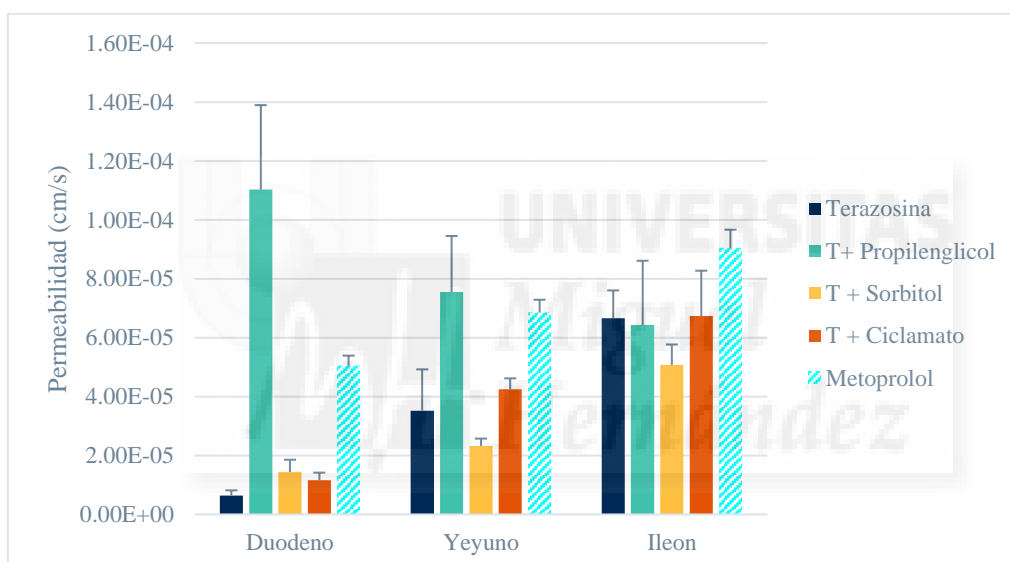


Las pruebas estadísticas para analizar si existen o no diferencias significativas en los valores de permeabilidades obtenidas, se realizó un análisis de t-student previa comprobación de la homogeneidad de varianza (prueba de Levene con una significación mayor de 0,05).

**Tabla 18.** Prueba de t de Student para la comparación de la permeabilidad entre Terazosina y el fármaco en presencia de cada uno de los excipientes para cada uno de los segmentos intestinales ensayados

	DUODENO	YEYUNO	ILEON
	TERAZOSIN	TERAZOSIN	TERAZOSIN
<b>Terazosin</b>	-	-	-
<b>Terazosin + Propilenglicol</b>	S	S	NS
<b>Terazosin + Sorbitol</b>	NS	NS	NS
<b>Terazosin + Ciclamato</b>	NS	NS	NS

**Figura 8.** Permeabilidad entre Terazosina en presencia de cada uno de los excipientes para cada uno de los segmentos intestinales ensayados y su comparación con el Metoprolol.



## 6. DISCUSIÓN

Los compuestos clasificados como clase III según el sistema de clasificación biofarmacéutico son compuestos cuya permeabilidad es menor que la del Metoprolol. Muchas de las moléculas, pueden modificar su permeabilidad por el efecto de algunos excipientes que se emplean en la elaboración de la formulación. La absorción de fármacos se produce a lo largo de todo el tramo gastrointestinal pero es en el intestino delgado donde la superficie disponible para la absorción esta aumentada y por lo tanto se centra el estudio de la absorción de fármacos administrados por vía oral en este tramo. Una vez el fármaco ha alcanzado este tramo solo la fracción no ionizada del fármaco es

capaz de atravesar las membranas biológicas. En este trabajo se ha estudiado la permeabilidad de Terazosina cuyo pKa es 7.2 y estará no ionizado en el tramo intestinal estudiado.

### **6.1 Técnica experimental seleccionada**

La permeabilidad de la Terazosina y el efecto sobre la absorción de los excipientes utilizados en las formulaciones se estudiaron, mediante técnica de perfusión *in situ* sin recirculación. Gracias a esta metodología se logra obtener mayor exactitud en los datos de absorción porque mantiene indemne las condiciones fisiológicas de la barrera epitelial del intestino delgado en cada ensayo. Tal precisión en las mediciones es posible al llevarse a cabo sin recirculación, lo que permite conservar intacta la capa acuosa de difusión adherida a la membrana intestinal. El contacto de la solución con la membrana no sufre interrupciones durante todo el ensayo (30 minutos) permitiendo así un rendimiento de la absorción superior al alcanzado por otras técnicas en las cuales el contacto de la solución con la membrana intestinal es discontinuo. La toma de muestras resulta cómoda y reproducible al realizarse *in situ* con el animal anestesiado. Entre las mejoras proporcionadas por esta técnica se encuentra proporcionar un flujo sanguíneo adecuado, las secreciones intestinales y los movimientos peristálticos, con lo cual mantiene las características que existen *in vivo*, siendo una técnica sencilla, económica y con una dedicación de 60 minutos por experimento (cirugía y toma de muestras).

La técnica experimental permite medir la longitud del tramo intestinal en el que se administra el fármaco, por lo tanto se pueden transformar los datos de constante de velocidad de absorción en permeabilidad para poder comparar valores obtenidos en distintos tramos o por distintas técnicas experimentales.

Los inconvenientes en esta técnica son que requiere el sacrificio de animales de experimentación, con los problemas éticos y económicos que conlleva. Otro inconveniente es que el fármaco o formulación se administra disuelta o en suspensión en el lumen intestinal y se crea un compartimento estanco, por lo tanto no permite considerar variaciones en el vaciado gástrico o en la velocidad

de tránsito intestinal. Otra limitación es que la permeabilidad intestinal se calcula a partir de las concentraciones remanentes en el lumen intestinal, por ello es necesario comprobar que la desaparición se produce únicamente por absorción y no por degradación o metabolismo.

En el tracto gastrointestinal, tiene lugar un proceso de reabsorción de agua paralelo al de absorción del fármaco. En algunos casos supone la reducción de más del 10% del volumen al finalizar el ensayo de absorción, sigue una cinética de orden cero y es necesario tenerlo en cuenta para el cálculo adecuado de la permeabilidad intestinal.

## **6.2 Interpretación de resultados**

Los resultados obtenidos en la figura 6 muestran que la permeabilidad en duodeno es estadísticamente diferente a la permeabilidad de yeyuno e íleon. Esto sugiere que existen transportadores intestinales que están facilitando el paso del fármaco a nivel del tramo intestinal distal, lo que concuerda con los datos bibliográfico que describen que este compuesto es sustrato del transportador MRP1 que se localiza principalmente en íleon y es un transportador de absorción activa<sup>35,7</sup>.

El Metoprolol ha sido ampliamente usado como modelo para clasificar los fármacos según su permeabilidad ya que ha sido estudiado con la técnica de intubación en humanos, demostrando que es un fármaco que se absorbe bien tanto en duodeno como en yeyuno. La fracción de dosis absorbida de Metoprolol está muy bien documentada en estudios realizados mediante la excreción del fármaco y metabolitos radiomarcados, después de su administración oral e intravenosa<sup>8</sup>.

Como la permeabilidad del Metoprolol en tramos intestinales de rata Wistar se determinó recientemente por el grupo de trabajo<sup>36</sup> y si comparamos los datos de permeabilidad de Metoprolol y los de Terazosina en cada tramo intestinal podemos concluir que la Terazosina se comporta como un fármaco de baja permeabilidad en los tramos intestinales fisiológicos de duodeno y yeyuno y dichos transportadores parecen estar saturados en el tramo distal del intestino delgado, ya que no existe diferencias significativas entre el valor de

permeabilidad de Metoprolol y Terazosina en este tramo a las concentraciones ensayadas.

Para esclarecer si el fallo de bioequivalencia en humanos se debió a que los excipientes distintos en ambas formulaciones afectaban al proceso de absorción de Terazosina se realizaron ensayos de fármaco en presencia de los distintos excipientes por separado (sorbitol, propilenglicol y ciclamato).

Las diferencias apreciadas *in vivo* donde las formulaciones de referencia y test no son bioequivalentes porque los valores de C<sub>max</sub> y AUC son superiores para la formulación test, se pueden deber a la presencia de propilenglicol en la formulación que incrementa la permeabilidad del fármaco en duodeno y yeyuno (figura 7). Este incremento de permeabilidad se ha comprobado administrando propilenglicol junto con una solución de Atenolol (fármaco de baja permeabilidad intestinal y que atraviesa la membrana a favor de gradiente de concentración) donde se duplica la permeabilidad de Atenolol en presencia de la misma cantidad de propilenglicol.

En la figura 7 se puede observar que el sorbitol no afecta a la permeabilidad de Terazosina. Nuestro grupo de trabajo ha estudiado la permeabilidad de otros compuestos como Atenolol o Rhodamina en presencia y ausencia de sorbitol y se han obtenido resultados similares (dato no publicado). Así pues, los datos farmacocinéticos determinados tras los ensayos *in vivo* no pueden atribuirse a un efecto directo de sorbitol sobre la membrana absorbente, que implique un cambio en la permeabilidad.

Como ya se ha explicado anteriormente, una de las limitaciones de esta técnica experimental es que se administra el fármaco disuelto y se crea un compartimento estanco, con lo cual no se pueden evaluar fallos de Bioequivalencia debidos a cambios de disgregación del comprimido o determinar si los excipientes tienen algún efecto sobre la velocidad de vaciado gástrico o tránsito intestinal que pudiera afectar a la absorción. Koch y colaboradores<sup>37</sup> realizaron un estudio *in vivo* en perros en el que se analizó la influencia de distintos excipientes en el tiempo de tránsito intestinal y demostraron que excipientes como el polietilenglicol 400 (PEG 400), sorbitol,

manitol y ácido pirofosfato sódico aumentan la velocidad del tránsito debido a la estimulación de la motilidad gastrointestinal. Los excipientes que modifican el tránsito intestinal de fármacos clase III podrían producir problemas de no bioequivalencia en formulaciones diseñadas. Por esa razón habría que realizar más estudios para completar el estudio del efecto del cambio de excipientes en ambas formulaciones

## **7. CONCLUSIONES**

1. A través del método experimental de absorción intestinal sin recirculación *in situ* aplicado a los distintos tramos intestinales se ha demostrado que Terazosina es un fármaco de baja permeabilidad según el sistema de clasificación biofarmacéutico y es sustrato de MRP1 transportador de absorción que se encuentra localizado en íleon principalmente.
2. El aumento de C<sub>max</sub> y AUC de la formulación test de Terazosina se puede deber a la presencia de propilenglicol en la formulación test, ya que este excipiente aumenta la permeabilidad intestinal de la Terazosina y no estaba en la formulación comercial con la que se comparaba.



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. AESEG. Asociación Española de Medicamentos genéricos. [sede web]. Madrid, España. Disponible en: <http://www.aeseg.es/es/>.
2. Hall J.E, Guyton A.C. Digestión y absorción en el tubo digestivo. En: Hall J.E, Guyton A.C. Tratado de fisiología médica. 12a ed. Barcelona, España: Editorial Eselvier; 2011. p. 789-97.
3. Plá Delfina J.M., Martín Villodre A. Absorción gastrointestinal. En: José Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Plá Delfina J.M. Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen II. Madrid, España: Editorial Sintesis; 1999. p.124-44.
4. Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza J.C, Moro M.A, Portolés A. Velázquez Farmacología Básica y Clínica. 18a ed. Madrid, España: Editorial médica panamericana; 2008.
5. Hall J.E, Guyton A.C. Transporte de sustancias a través de membranas celulares. En: Hall J.E, Guyton A.C. Tratado de fisiología médica. 12a ed. Barcelona, España: Editorial Eselvier; 2011. p. 45-52.
6. Terao T, Hisanaga E, Sai Y, Tamai I, Tsuji A. Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier. J Pharm Pharmacol 1996; 48: 1083-9.
7. González-Álvarez I, Cabrera MÁ, Bermejo-Sanz M. Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos. España: Editorial Universidad Miguel Hernández; 2015.
8. Amidon G.L, Lennernas H, Shah V.P, Crison J.R .A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. Pharm Res.1995; 12(3): 413-20.
9. EMA. European Medicines Agency. [sede web]. Londres, Reino Unido. [acceso 25 de mayo 2017] Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2010/01/WC500070039.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/01/WC500070039.pdf).
10. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeability assay in the

- description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* 1998;41(7):1007–10.
11. Lozoya-Agullo I, Zur M, Wolk O, Beig A, González-Álvarez I, González-Álvarez M et al. In-situ intestinal rat perfusions for human Fams prediction and BCS Permeability class determination; Investigation of the single-pass vs. the Doluisio experimental approaches. *Int J Pharm.* 2015; 480(1-2): 1-7.
  12. Cabrera Pérez M, Bermejo Sanz M, Ramos Torres L, Grau Ávalos R, Pérez Gonzalez M, González Diaz H. A topological sub-structural approach for predicting human intestinal absorption of drugs. *Eur J Med Chem.* 2004; 39 (11): 905-16.
  13. Pubchem [base de datos de internet]. Bethesda: National Library of Medicine (USA); 2017 [acceso 14 mayo 2017]. National Center for Biotechnology Information, Pharmacology [aprox una pantalla]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5401#section=Top>.
  14. Florez J, Armijo J, Mediavila A. *Farmacología Humana*. 6ª edición. Barcelona, España: Editorial Eselvier; 2014.
  15. AEMPS. Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios[sede web]. Madrid,España. [14 mayo 2017] Disponible en: [https://www.aemps.gob.es/cima/dohtml/ft/63458/FichaTecnica\\_63458.html](https://www.aemps.gob.es/cima/dohtml/ft/63458/FichaTecnica_63458.html).
  16. AEMPS. Agencia Española de medicamentos y productos sanitarios[sede web].Madrid,España. [30 de mayo 2017] Disponible en: <https://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=buscar>.
  17. Zarnpi T, Flanagan T, Meehan E, Mann J, Fotaki N. Biopharmaceutical aspects and implications of excipient variability in drug product performance. *Eur J Pharm Biopharm*, 2017; 111: 1-15.
  18. Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res.* 2004; 21(2) 201–30.
  19. A. Dahan, Miller JM, Hoffman A, Amidon GE, Amidon GL.The solubility-permeability interplay in using cyclodextrins as pharmaceutical

- solubilizers: mechanistic modeling and application to progesterone. *J. Pharm. Sci.* 2010; 99 (6):2739–49.
20. Yuen KH. The transit of dosage forms through the small intestine. *Int J Pharm* . 2010;395 (1–2): 9–16.
  21. Schulze JD, Waddington WA, Eli PJ, Parsons GE, Coffin MD, Basit AW. Concentration-dependent effects of polyethylene glycol 400 on gastrointestinal transit and drug absorption. *Pharm Res.*2003; 20(12):1984-8.
  22. Basit AW, Podczeczek F, Newton J.M, Waddington W.A, Eli P.J, Lacey P.F. Influence of polyethylene glycol 400 on the gastrointestinal absorption of ranitidine. *Pharm. Res.* 2002;19 (9):1368–74.
  23. Parr A, Hidalgo I, Bode C, Brown W, Yazdanian M, González M, et al. The Effect of Excipients on the Permeability of BCS Class III Compounds and Implications for Biowaivers. *Pharm Res.* 2016; 33: 167–176.
  24. Rege BD, Yu LX, Hussain AS, Polli JE. Effect of Common Excipients on Caco-2 Transport of Low-Permeability Drugs. *J Pharm Sci.*2011;90(11):1776-86.
  25. 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;453(2):363-70.
  26. Cornaire G, Woodley J.F, Hermann P, Cloarec A, Houin G. Impact of excipients on the absorption of P-glycoprotein substrates in vitro and in vivo. *Int. J. Pharm.* 2004; 278: 119–131.
  27. Gole J, Lindley DJ, Roth W, Carl SM, Amighi K, kauffmann JM, et al. The effects of excipients on transporter mediated absorption. *Int J Pharm* 2010;393(1-2):17-31.
  28. Buggins TR, Dickinson PA, Taylor G.The effects of pharmaceutical excipients on drug disposition. *Adv Drug Deliv Rev.*2007; 59(15): 1482-503
  29. Schulze JD, Peters EE, Vickers AW, Staton JS, Coffin MD, Parsons E, et al. Excipient effects on gastrointestinal transit and drug absorption in beagle dogs, *Int. J. Pharm.* 2005; 300(1-2) 67–75.

30. Panakanti R, Narang AS. Impact of excipient interactions on drug bioavailability from solid dosage forms. *Pharm Res.* 2012; 29(10): 2639-59.
31. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 5a ed. Londres, Reino Unido: Pharmaceutical Press; 2006.
32. Doluisio JT, Billups NF, Dittert LW, Sugita ET, Swintosky JV. Drug absorption. I. An in situ rat gut technique yielding realistic absorption rates. *J Pharm Sci.* 1969; 58:1196-200.
33. Schanker LS, Tocco DJ, Brodie BB, Hogben CAM. Absorption of drugs from rat small intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 1958; 123: 81-88.
34. Martin-Villodre A, Plá-Delfina JM, Moreno J, Pérez-Buendía D, Miralles J, Collado EF, et al. Studies on the reliability of a bihyperbolic functional absorption model I Ring-substituted anilines. *J Pharmacokinet Biopharm* 1986; 14(6): 615-33.
35. DrugBank. DrugBank [sede web]. [13 junio 2005;19 mayo 2017]. Disponible en: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01162>.
36. Lozoya-Agullo I, Zur M, Beig A, Fine N, Cohen Y, González-Álvarez M, et al. Segmental-dependent permeability throughout the small intestine following oral drug administration: Single-pass vs. Doluisio approach to in-situ rat perfusion. *Int J Pharm.* 2016; 515 (1-2): 201-8.
37. Koch KM, Parr AF, Tomlinson JJ, Sandefer EP, Digenis GA, Donn KH, et al. Effect of sodium acid pyrophosphate on ranitidine bioavailability and gastrointestinal transit time. *Pharm Res.* 1993; 10(7): 1027-30.