

Absorción de Drogas: Prueba de Validez para el Modelo de Intestino Aislado de Rata

Pablo LUFRANO y Claudia G. MARANO

*Area Producción y Ensayo de Medicamentos, División Farmacia,
Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas,
Universidad Nacional de La Plata, Calles 47 y 115, 1900 La Plata, Argentina.*

RESUMEN. El presente trabajo tiene como finalidad justificar el uso del coeficiente de correlación, su correspondiente prueba de hipótesis nula y los límites de confianza del coeficiente de regresión como criterio de validez de los estudios de absorción *in vitro* con intestino aislado de rata.

SUMMARY. "Absorption of Drugs: Validity Test for the Isolate Rat Intestine Model". The present work has been made with the aim of justify the use of the correlation coefficient, its corresponding test of null hypothesis and the confidence limits of the regression coefficient as validity criterion in *in vitro* absorption studies using isolate rat intestine.

En la etapa de preformulación de un fármaco de administración bucal resulta necesario conocer el mecanismo de absorción de una droga en el tránsito gastrointestinal, así como la incidencia de la presencia de excipientes, nutrientes y sustancias endógenas.

Entre los modelos diseñados para este tipo de estudio sobresale la técnica del intestino aislado, evertido y sin evertir, de animales pequeños tales como la rata, siendo numerosos los trabajos que utilizan dicha técnica, Lovering y Black ¹ examinan el efecto del pH y de varias sustancias en la transferencia de la fenilbutazona. En una serie de publicaciones Feldman ²⁻⁴ describe el efecto que ejercen sobre la absorción intestinal la formación de complejos con la droga activa y la presencia de tensioactivos iónicos y no iónicos. Riegelman *et al.* ⁵⁻⁶ utilizan este modelo a fin de analizar la absorción y la degradación de una droga en distintas regiones del tránsito intestinal. Chowhan y Amoro ⁷ adoptan esta técnica con el objeto de marcar diferencias en una familia química. Por nuestra parte hemos estudiado la transferencia de la metoclopramida y de la ranitidina ⁸⁻⁹ en intestino aislado de rata evertido.

PALABRAS CLAVE: Absorción *in vitro*, Absorción de fármacos, Validez estadística.

KEY WORDS: *In vitro* Absorption, Drug Absorption, Statistic validity.

En todos estos trabajos los resultados se expresan como cantidad acumulativa transferida en función del tiempo, con el propósito de estimar un parámetro de absorción útil para la discusión del estudio experimental. Para poder obtener el mismo se emplean tan sólo aquellos valores registrados una vez que el preparado logra el estado estacionario, siendo esto posible en la medida que el intestino aislado mantenga su integridad, puesto que cualquier cambio estructural en su membranas provocará un sesgo que invalidará la experiencia .

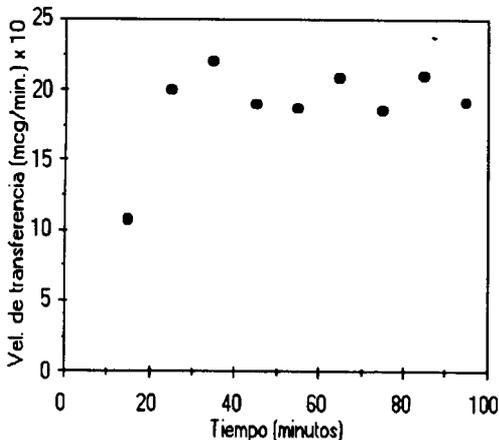
Gibaldi y Grundhofer ¹⁰ proponen utilizar la velocidad de la cantidad transferida para cada tiempo de control, a fin de señalar el instante en que se logra el estado estacionario y así acreditar la viabilidad del modelo in vitro. Breschi *et al.*¹¹ también dirigen su atención hacia la integridad de este preparado experimental y observan que la velocidad de transferencia se mantiene constante por un período de 80 minutos.

De este modo, en general, los resultados que se obtienen con este modelo en cada experiencia se tratan de una manera similar de acuerdo a la siguiente secuencia:

a) En una tabla se vuelca la cantidad de droga transferida a cada tiempo.

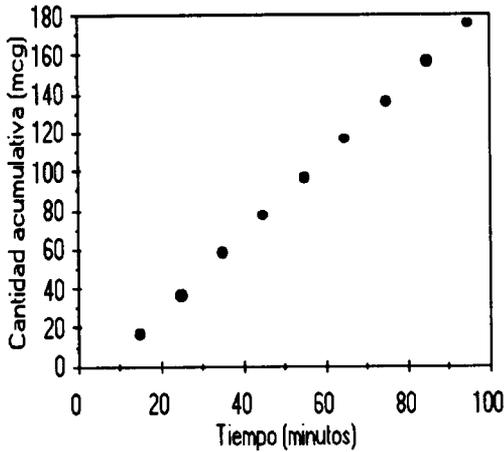
tiempo (min)	cantidad transferida no acumulativa (µg)
15	16,00
25	20,00
35	22,00
45	19,00
55	18,70
65	20,75
75	18,50
85	20,96
95	19,13

b) Para cada experiencia individual se representa la velocidad de la cantidad transferida registrada en cada intervalo, a fin de precisar el período de tiempo en el que se ha logrado y mantenido el estado estacionario del preparado experimental.



tiempo (min)	Vel. transferencia (µg/min) x 10
15	10,66
25	20,00
35	22,00
45	19,00
55	18,70
65	20,75
75	18,50
85	20,96
95	19,13

c) Para cada experiencia se representa la cantidad acumulativa de la droga transferida a los distintos tiempos de registro, y se calcula el parámetro de absorción, empleando tan sólo aquellos datos comprendidos en el estado estacionario.



tiempo (min) (µg)	Cantidad acumulativa
15	16,00
25	36,00
35	58,00
45	77,00
55	95,70
65	116,45
75	134,95
85	155,91
95	175,04

Por nuestra parte hemos coincidido en el manejo de los resultados tal como se señalara anteriormente y, al igual que el resto de los autores, seleccionamos los valores del estado estacionario mediante la observación de una representación gráfica.

En esta oportunidad proponemos seguir empleando la velocidad de transferencia para indicar el estado estacionario, pero efectuado con un apoyo estadístico a fin de eliminar cualquier resto de subjetividad que surja de la observación de un gráfico.

Sabemos que desde un punto de vista puramente teórico, en el estado estacionario las velocidades de transferencia serán iguales entre sí, pero que en la práctica esto raramente sucede, ya que los valores de las mismas son afectados por distintos tipos de errores, que pueden generar por consiguiente cierto grado de incertidumbre en acreditar validez al experimento ensayado.

Por lo dicho anteriormente sugerimos aplicar los parámetros *estadísticos coeficiente de correlación, su correspondiente prueba de hipótesis nula y los límites de confianza del coeficiente de regresión* a fin de seleccionar los datos obtenidos en cada experiencia en particular.

Como ya hemos señalado, en el estado estacionario la velocidad de transferencia (Vt) es una constante a lo largo del tiempo. Por lo tanto, la evaluación estadística de las variables Vt y tiempo (t) debe permitirnos registrar un coeficiente de correlación r bajo, aprobar la prueba de hipótesis nula (H_0) de la no existencia de relación lineal entre Vt y t , los límites de confianza del coeficiente de regresión para un nivel de probabilidad del 95% deberán atrapar al valor cero y estar comprendidos entre $\pm 0,1$ del valor de la pendiente.

Si se cumplen estas condiciones, disponemos de una probabilidad del 95% de no equivocarnos al decir que el estado estacionario se ha logrado; de lo contrario deberá desecharse la experiencia, puesto que la incertidumbre pesa demasiado.

A efecto de una mejor comprensión del uso del coeficiente de correlación y

de los límites de confianza del coeficiente de regresión, supondremos que disponemos de datos logrados en dos experiencias de transferencia de una droga cualquiera con el modelo del intestino aislado de rata.

Experiencia N° 1

tiempo (min)	cantidad de droga no acumulativa transferida (µg)	velocidad de transferencia
15	16,00	1,06
25	20,00	2,00
35	22,00	2,02
45	19,00	1,90
55	18,70	1,87
65	20,75	2,07
75	18,50	1,85
85	20,96	2,09
95	19,13	1,91

La observación de los valores de la velocidad de transferencia correspondientes a los distintos tiempos evidencian que el preparado ha logrado un funcionamiento diferente a partir de los 25 minutos. El procesamiento estadístico del conjunto de pares de valores comprendidos entre 25 y 95 minutos nos permitirá criticar la experiencia.

El coeficiente de correlación *r* resulta = -0,1558, alejado del valor absoluto 1, y además se acepta la correspondiente hipótesis nula.

El cálculo de los límites de confianza para un nivel de probabilidad del 95% y un número de grados de libertad de 6 se realiza mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$b \pm t_{n-2, \alpha = 0,05} \sqrt{\frac{\sum y^2 - b \sum x^2}{n - 2}} \cdot \frac{1}{\sqrt{\sum x^2}}$$

donde *b* es el coeficiente de regresión y resulta de relacionar: $\sum xy / \sum x$; $\sum xy$ representa la suma de los productos de las desviaciones de los distintos valores de *x* (tiempo) respecto de la media *x* por las desviaciones de *y* (velocidad de transferencia) respecto de la media de *y*; $\sum x^2$ y $\sum y^2$ representan las sumas de los cuadrados respecto de las medias, para los valores de *x* e *y* respectivamente; finalmente $t_{n-2, \alpha = 0,05}$ representa el valor de *t* para 6 grados de libertad en esta experiencia y un $\alpha = 0,05$.

Reemplazando cada término por su valor numérico en la fórmula (1) resultan los límites -0,012 y +0,04163. En dicho intervalo puede hallarse el valor cero, por lo que esta experiencia posee validez para la discusión definitiva de los resultados, dado que la integridad del preparado ha permitido al fenómeno de transferencia operar en estado estacionario.

Experiencia N° 2

tiempo (min)	cantidad de droga no acumulativa transferida (μg)	velocidad de transferencia
10	8,00	0,80
20	19,00	1,90
30	19,76	1,97
40	20,74	2,07
50	22,00	2,20
60	23,53	2,35
70	25,41	2,54
80	27,72	2,77
90	30,47	3,04

La simple observación de los resultados muestra que la velocidad de transferencia crece en función del tiempo, pudiendo denunciar una falta de integridad en el preparado de intestino aislado. Veamos ahora cómo interpretan los parámetros estadísticos al conjunto de resultados volcados en la tabla.

El coeficiente de correlación r resulta 0,9776 y se rechaza la correspondiente prueba de hipótesis nula (H_0), señalando que las variables se hallan íntimamente relacionadas.

En tanto, los límites de confianza del coeficiente de regresión muestran un intervalo que va desde + 0,14796 a + 0,17496, excluyendo al valor cero. Estos parámetros no se corresponden con los resultados de una experiencia que ha logrado el estado estacionario; por consiguiente los datos de esta experiencia no poseen validez y deben desecharse.

Apoyándonos en el razonamiento expuesto en los dos ejemplos hipotéticos anteriores proponemos que, a fin de otorgar validez a los resultados obtenidos en una experiencia de absorción intestinal *in vitro*, tendrán que satisfacerse las siguientes condiciones:

1. El coeficiente de correlación debe resultar un valor bajo, alejado de 1.
2. La prueba de la hipótesis nula debe aprobarse.
3. El intervalo de confianza para un nivel de probabilidad del 95% deberá incluir al valor cero.
4. El intervalo de confianza no debe exceder un delta de más menos 0,1 respecto del coeficiente de regresión.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Lovering, E. G. & D. B. Black (1974) *J. Pharm. Sci.* **63**: 671-6
2. Feldman, S. (1976) *J. Pharm. Sci.* **65**: 1460-2

3. Feldman, S., J. Richardson, C. Freeman, S. Pollock, J. Berger, F. Kaplan & G. Rhoa (1974) *J. Pharm. Sci.* **63**: 454-6
4. Feldman, S. (1969) *J. Pharm. Sci.* **58**: 425-8
5. Barr, W.H. & S. Riegelman (1970) *J. Pharm. Sci.* **59**: 155-63
6. Rowland, M., S. Riegelman, P. Harris & J.S. Sholkoff (1972) *J. Pharm. Sci.* **61**: 379.-85
7. Chowhan, Z.T. & A.A. Amoro (1977) *J. Pharm. Sci.* **66**: 1249-53
8. Volonté, M.G., C.G.Marano, M.I. Reinoso & P. Lufrano (1990) *Acta Farm. Bonaerense* **9**: 95-100
9. Marano, C.G. & P. Lufrano (1991) *Acta Farm. Bonaerense* **10**:145-51
10. Gibaldi, M. & B. Grundhofer (1972) *J. Pharm. Sci.* **61**: 116-9
11. Breschi, C., V. Carelli, G. Di Colo & E. Nannipieri (1980) *Il Farmaco. Ed. Sc.* **36**: 166-80