FACULTAD DE FARMACIA
CARRERA DE QUÍMICA Y FARMACIA
LABORATORIO DE BIOFARMACIA

CARACTERIZACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DEL ESTÁNDAR METOPROLOL A TRAVÉS DE UNA TÉCNICA DE PERFUSIÓN INTESTINAL IN SITU

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

SIDNEY LEIVA SAAVEDRA

Director de Tesis
Prof. Dr. Alexis Aceituno Álvarez
Co-Director
Prof. MSc. Virginia Sánchez Montoya

2014

AGRADECIMIENTOS

“Quiero agradecer a todos los que estuvieron conmigo durante estos 7 años. Gracias a los que ofrecieron sus conocimientos sin esperar nada a cambio, los que me ayudaron día a día con una palabrita de aliento, los que rieron y lloraron conmigo y los que me aguantaron desde el principio hasta el final. Gracias a las personas que siempre han estado en mi vida y a las valiosas personitas que conocí mientras recorría este camino, los amo a todos. Por último, quiero darle las gracias a todos los animalitos que fueron parte de este estudio; sin ustedes, éste trabajo de final de carrera no habría sido posible”

¡MUCHAS GRACIAS!

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS i
ÍNDICE ii
I. RESUMEN 1
II. ABSTRACT 2
III. INTRODUCCIÓN 3
III. 1. *METOPROLOL* 6
1.1. Propiedades farmacocinéticas 6
1.2. Propiedades fisicoquímicas 7
III. 2. *FUNDAMENTOS DE LA ABSORCIÓN EN SISTEMAS BIOLÓGICOS* 8
III. 3. *ESTUDIO DEL PROCESO DE ABSORCIÓN DE MEDICAMENTOS* 9
III. 4. *SISTEMA DE CLASIFICACION BIOFARMACÉUTICA (SCB)* 10
III. 5. *PERFUSIÓN INTESTINAL IN SITU* 13
III. 6. *HPLC (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN)* 14
III. 7. *VALIDACION DEL METODO ANALITICO* 16
7.1. Linealidad e intervalo lineal 17
7.2. Exactitud 18
7.3. Precisión 18
7.4. Especificidad o Selectividad 18
7.5. Límite de detección 19
7.6. Límite de cuantificación 19
7.7. Robustez 19
IV. HIPÓTESIS 21
V. OBJETIVOS 22
V. 1. OBJETIVO GENERAL 22
V. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 22
VI. MATERIALES Y MÉTODOS 23
VI. 1. MATERIALES 23
VI. 2. MÉTODOS 26

2.1. *Determinación de las concentraciones a utilizar en el ensayo in situ.* 26
2.2. *Soluciones de trabajo de metoprolol tartrato.* 26
2.3. *Implementación del método analítico para la cuantificación de metoprolol tartrato*. 27
2.4. *Tratamiento de las muestras pre-inyección*. 28
2.5. *Validación del método analítico por HPLC*. 28
2.6 *Técnica de permeabilidad in situ* 34
2.7. *Cálculo de permeabilidad de metoprolol tartrato* 38
VII. RESULTADOS 40
VII. 1. *Validación del método analítico* 40
1.1. Linealidad. 40
1. 2. Exactitud. 41
1. 3. Precisión. 42
1. 4. Selectividad o especificidad. 43
1. 5. Límites. 45
1. 6. Robustez. 45
VII. 2. *Idoneidad del sistema* 46
VII. 3. *Permeabilidad intestinal de metoprolol* 47
VIII. DISCUSION 50
IX. CONCLUSIONES 55
X. BIBLIOGRAFIA 57

I. RESUMEN

El metoprolol es un β-bloqueador cardio-selectivo de elección para el tratamiento de patologías cardiovasculares. Debido a su selectividad por el receptor β_1, tiene menor incidencia de efectos adversos en comparación con otros β-bloqueadores. Dada su alta solubilidad en diversos medios tamponados y alta permeabilidad intestinal (fracción absorbida), se clasifica como Clase 1, según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB). Estas características, avalan su uso como estándar de alta permeabilidad, para comparativamente clasificar otros fármacos.

En este estudio se caracterizó la permeabilidad de metoprolol utilizando la técnica in situ descrita por Doluisio en ratas. El objetivo fue validar el uso de metoprolol tartrato como estándar para clasificar otros fármacos, cuya permeabilidad se haya caracterizado a través de la misma metodología. Se utilizaron soluciones de metoprolol de 800, 400, 200 y 80 µg/mL. La cantidad de fármaco remanente en el fluido intestinal fue cuantificada utilizando una metodología validada de HPLC. Con estos datos se calculó el coeficiente de permeabilidad efectiva del fármaco.

Se concluyó que el principal mecanismo de absorción de metoprolol tartrato es la difusión pasiva. El valor de coeficiente de permeabilidad de metoprolol tartrato se encuentra dentro del rango de valores reportados en la literatura científica, pero es ligeramente más bajo que la media. Se recomienda utilizar este valor de coeficiente de permeabilidad como estándar en el estudio de permeabilidad de otros principios activos, siempre y cuando éstos sean estudiados bajo las mismas condiciones utilizadas en el presente trabajo.

II. ABSTRACT

Metoprolol is a cardioselective β-blocker used for the treatment of cardiovascular diseases. Because of its selectivity for the β_1 receptor, it has a lower incidence of adverse effects compared to other β-blockers. Because of its high solubility in a variety of buffer solutions and high intestinal permeability (absorptive fraction) is classified as Class 1, according to the Biopharmaceutical Classification System. All these characteristics, allows the use of metoprolol as standard of high permeability to comparatively classify other drugs.

In this study, metoprolol permeability was characterized using the Doluisio and col. in situ technique in rats. The main goal was to validate the use of metoprolol tartrate as standard to classify other drugs, when the same methodology was used to obtain their permeability coefficient. Solutions of 800, 400, 200 and 80 µg/mL metoprolol were used. The amount of remaining drug was quantified in the intestinal fluid using a validated HPLC technique. Using these data the metoprolol intestinal permeability was calculated.

The main absorption mechanism of metoprolol tartrate is the passive diffusion. The calculated permeability coefficient of metoprolol is in the range of values reported in the literature, but slightly lower than the average value. We recommend using this value of permeability coefficient as a standard in the study of permeability of drugs, only if the study is developed under the same experimental conditions used in this paper.

III. INTRODUCCIÓN

Una de las familias de fármacos utilizada para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares como hipertensión arterial [1], angina de pecho [1], tratamiento post infarto de miocardio [1-3], insuficiencia cardiaca [1,4-6] y algunas arritmias, son los β-bloqueadores o antagonistas de los β-adrenoreceptores. Esta familia se caracteriza por poseer una alta afinidad y especificidad por los β-adrenoreceptores [7], ya sea β_1 y/o β_2 e incluso β_3. La naturaleza de la inhibición del receptor es de tipo competitiva, es decir, una mayor concentración de fármaco adrenérgico o una mayor actividad simpática logra desplazar al β-bloqueador del receptor.

Existen los β-bloqueadores cardio-selectivos y los no selectivos [4,7]. Los β-bloqueadores cardio-selectivos se unen principalmente a los receptores β_1, mientras que los no selectivos se unen tanto a los receptores β_1 como a los β_2.

Los receptores β_1 se encuentran principalmente en el tejido cardíaco, siendo los encargados de regular su función al inducir un efecto inotrópico y cronotrópico positivo [4]; en cambio, los receptores β_2 están presentes en gran cantidad en el músculo liso vascular y en el tejido bronquial, por lo que regulan el flujo de sangre y aire, respectivamente, al producir relajación [4]. El bloqueo de ambos receptores produciría disminución de la fuerza y frecuencia cardiaca (efecto terapéutico) y aumento de la presión arterial y broncoespasmo (efectos adversos); es por esto que se prefiere el uso de medicamentos cardio-selectivos en pacientes que presentan broncoespasmo, síndrome de Raynaud [4] y en pacientes embarazadas

[1]. Los β-bloqueadores cardio-selectivos también son de elección en diabetes, ya que evitan la inhibición de secreción de insulina producida por el bloqueo β_2 [4]. En general, los efectos que producen los β-bloqueadores en el organismo son los siguientes:

- Cardiovascular: Disminución de la frecuencia y contractilidad cardíaca, lo que lleva a disminuir el gasto cardíaco y la utilización de oxígeno por inhibición del receptor β_1. También inhiben la liberación de renina y noradrenalina al bloquear los receptores β_2. Las características mencionadas hacen de los β-bloqueadores una familia de elección para el tratamiento de arritmias cardiacas, insuficiencia coronaria e hipertensión arterial [7].
- Bronquial, uterino: Al bloquear los receptores β_2, se contrae el músculo liso bronquial y uterino, por lo cual los β-bloqueadores están contraindicados en pacientes con enfermedades pulmonares obstructivas. Lo ideal es una mayor selectividad por el bloqueo β_1 para evitar este efecto adverso.
- Metabólico y hormonal: El bloqueo β_2 lleva a la inhibición de la secreción de insulina, mientras que el bloqueo β_1 inhibe la lipólisis [7]. Además, al evitar la unión catecolamina-receptor adrenérgico, los β-bloqueadores no selectivos pueden retardar la recuperación de la hipoglucemia en Diabetes Mellitus tipo 1 (pero pocas veces en la tipo 2) y disminuyen la percepción de sus síntomas (temblor, taquicardia); debido a lo anterior, si es necesario

utilizar un β-bloqueador, se prefiere emplear aquellos que sean cardio-selectivos [4].

- Otras acciones: El bloqueo β-adrenérgico ayuda a disminuir las manifestaciones vegetativas que aparecen en situaciones generadoras de ansiedad. También reducen la intensidad y frecuencia de las jaquecas mediante mecanismos desconocidos [4,7].

Para tener afinidad con el receptor β, es necesario que estos fármacos cuenten con ciertas características estructurales. Cada fármaco posee un grupo aromático unido a un grupo amino mediante una cadena hidrocarbonada. La mitad aromática de los β-bloqueadores no selectivos, como propanolol y carvedilol (Figura 1 A y B), es muy variada, en cambio, los cardio-selectivos tienen estructuras aromáticas similares entre sí (Figura 1 C y D) [4].

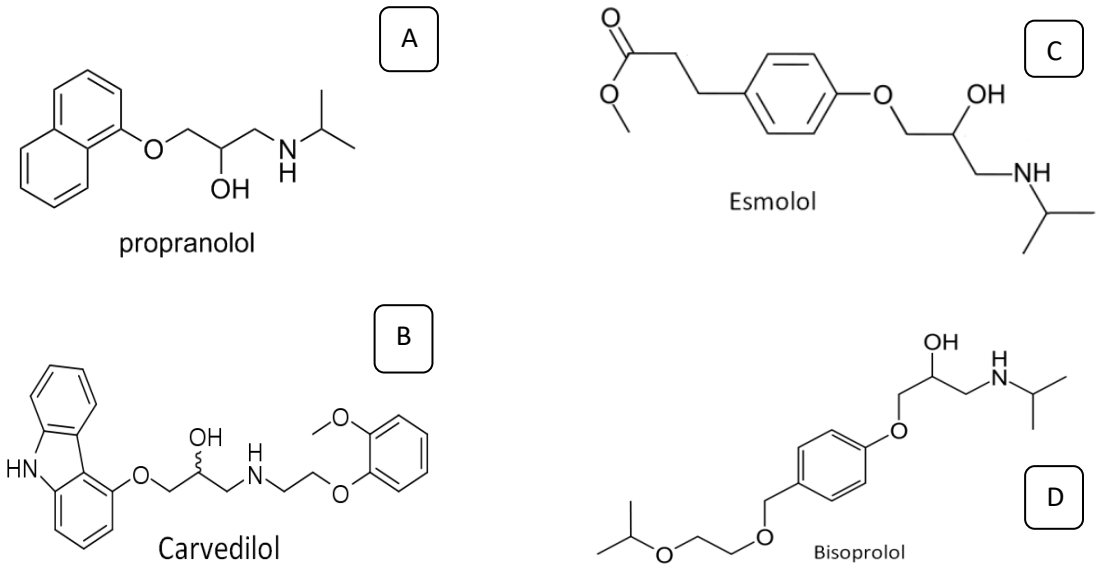

Figura 1: Ejemplo de β-bloqueadores no selectivos (A) (B) y cardio-selectivos (C) (D) [4].

III. 1. ***METOPROLOL***

Uno de los β-bloqueadores cardio-selectivos es el metoprolol. El metoprolol, en sus distintas formas farmacéuticas, se utiliza para el tratamiento de la hipertensión (dosis de 100 mg/día), angina estable (50 mg dos veces/día), tratamiento inicial de infarto agudo al miocardio (por vía intravenosa para luego pasar a la vía oral) y para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica [1,4,7,8].

1.1. Propiedades farmacocinéticas

La absorción de metoprolol es casi completa por vía oral, siendo el intestino delgado el sitio donde se lleva a cabo la mayor parte de este proceso [9-11]. El porcentaje y la velocidad de absorción se ven aumentados en presencia de alimentos [9]. En humanos, la fracción absorbida de metoprolol es de 0,95 [12], pero su biodisponibilidad es relativamente baja (40-50%) a causa del efecto del metabolismo de primer paso [4,7,13]; este parámetro no se ve afectado por la ingesta concomitante de alimentos [9]. Su unión a proteínas plasmáticas es de un 12% y su volumen de distribución es de 4,2 ± 0,7 L/kg, el cual aumentaría en caso de embarazo [4,13]. El tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima ($C_{máx}$) en sangre luego de la administración ($t_{máx}$) es entre 2 a 3 horas. La $C_{máx}$ en metabolizadores rápidos es de 99 ± 53 ng/mL y 262 ± 29 ng/mL para metabolizadores lentos [4] (datos obtenidos a partir de una dosis única de 100 mg de metoprolol vía oral). El metoprolol sufre un gran metabolismo en hígado por la enzima CYP2D6, por lo que solo un 10% del fármaco administrado es recuperado inalterado en la orina [4,13], el resto corresponde a metabolitos hidroxilados

inactivos (65%) y a los metabolitos activos α-hidroximetoprolol y o-desmetilmetoprolol (10%) [13]. La vida media del metoprolol es de 3 a 4 horas, pero puede llegar a 7 u 8 horas dependiendo de la capacidad metabolizadora de la persona [4,13]. Hay que destacar que CYP2D6 tiene una gran cantidad de polimorfismos, por lo que los fármacos metabolizados por esta vía pueden tener una farmacocinética distinta dependiendo de la genética del individuo.

1.2. Propiedades fisicoquímicas

El metoprolol es una molécula con alta liposolubilidad [8], con un coeficiente de partición (LogP octanol/agua) de 1,9 [13]. El fármaco posee un pK_a de 9,7 [13], por lo que corresponde a una base débil. Según sus características acido/base, a pH intestinal se encontraría mayoritariamente en su forma no ionizada, lo que explicaría su gran absorción en ésta zona [10,11].

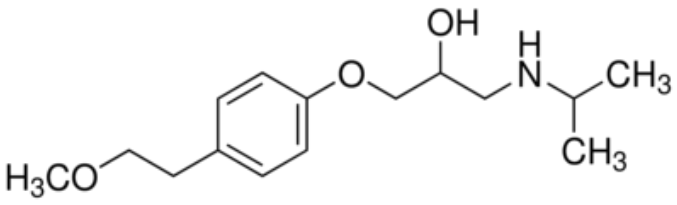

Figura 2: Estructura Química de Metoprolol [13].

El metoprolol como principio activo corresponde a una sal, la cual puede ser de succinato o tartrato; ambas altamente solubles en agua [13]. En cuanto a su forma farmacéutica, el metoprolol puede presentarse como inyectables, comprimidos, grageas o comprimidos recubiertos de liberación prolongada [14] en dosis de 50, 100 ó 200 mg.

III. 2. ***FUNDAMENTOS DE LA ABSORCIÓN EN SISTEMAS BIOLÓGICOS***

Toda sustancia que se administra al organismo debe pasar necesariamente por los procesos de disolución y luego absorción para llegar a su sitio de acción. La absorción, en un sistema biológico, está condicionada por barreras de naturaleza lipídica llamadas membranas. Moléculas de pequeño tamaño pueden atravesar las membranas por difusión pasiva, difusión facilitada o por transporte activo, mientras que las de gran tamaño deben atravesar estas barreras a través de procesos más sofisticados como pinocitosis y exocitosis [7]. Como lo dice el principio de "lo semejante disuelve lo semejante", moléculas liposolubles pueden atravesar membranas lipídicas con facilidad; de la misma manera, moléculas que se encuentren en su forma no ionizada serán capaces de difundir, mientras que aquellas que se encuentran ionizadas no serán capaces de hacerlo, en el caso de electrolitos débiles (ácidos, bases o anfolitos).

Los medicamentos corresponden a ácidos o bases débiles, por lo que el grado de ionización adquiere un importante rol en su proceso de absorción. La cantidad de fármaco ionizado y no ionizado dependerá del pK_a de la molécula y del pH del medio en el cual se encuentra. Un principio activo con características de base débil se encontrará mayormente ionizado a nivel estomacal, debido a la gran cantidad de protones circulantes y mayormente no ionizada a nivel intestinal. Por el contrario, un principio activo de características ácidas se encontrará mayormente ionizado a nivel intestinal, y mayormente no ionizado a nivel estomacal. Esto explica porqué fármacos con características ácidas se absorben

en gran cantidad en estómago y fármacos de características básicas se absorben mayoritariamente a nivel de intestino delgado, siempre y cuando su principal mecanismo de absorción sea la difusión pasiva.

III. 3. ***ESTUDIO DEL PROCESO DE ABSORCIÓN DE MEDICAMENTOS***

La absorción del medicamento y los factores que influyen en este proceso pueden ser limitantes en la eficacia terapéutica, por lo que es de vital importancia conocer los mecanismos por los cuales se produce. También es de suma importancia caracterizar el proceso mediante el cálculo de parámetros como la constante de absorción y el coeficiente de permeabilidad, para así predecir el comportamiento de cada medicamento en el organismo humano.

Para estudiar la absorción de medicamentos se pueden utilizar tres métodos: estudios in sílico, estudios in vitro y estudios in vivo.

> *Estudios in sílico:* son estudios en ordenadores que predicen las características farmacocinéticas y farmacodinámicas del medicamento de acuerdo a su estructura química [15]; para ello, es necesario contar con una gran cantidad de datos experimentales de moléculas estructuralmente variadas.
>
> *Estudios in vitro:* consisten en ubicar un modelo de estudio, ya sean membranas artificiales (como PAMPA, MAI, etc), líneas celulares (como MDCK, Caco-2, etc) o tejidos extraídos (intestino de animal), en un sistema controlado donde se simulan las condiciones fisiológicas durante el periodo

de tiempo en que se expone al medicamento el modelo seleccionado [15,16].

Estudios in vivo: consisten en administrar el medicamento al animal vivo; para ello se pueden utilizar técnicas in situ como la perfusión de paso simple, recirculación y la técnica de loop cerrado, en las cuales se aísla una zona intestinal y se perfunde una solución que contiene el medicamento en estudio [16,17], de manera que se mantengan intactas las condiciones fisiológicas de absorción.

En todos estos métodos, la absorción se evalúa en función de la permeabilidad del medicamento.

III. 4. ***SISTEMA DE CLASIFICACION BIOFARMACÉUTICA (SCB)***

Existen muchos medicamentos en el mercado que contienen el mismo principio activo en su interior, en la misma potencia, con la misma forma farmacéutica y la misma forma de liberación, los denominados “similares” [18]; pero ¿qué nos asegura que todos ellos tendrán el mismo efecto terapéutico? Si bien, el principio activo es el mismo, los excipientes empleados pueden variar en forma cuali y cuantitativa entre uno y otro laboratorio productor, por lo que no es posible asegurar que los procesos de liberación-disolución y absorción sucederán de manera óptima en humanos, una vez que el medicamento es administrado, sin investigar más a fondo.

Para probar la eficacia terapéutica de los productos similares, que se expenden con la Denominación Común Internacional (DCI) o nombre de fantasía, sería necesario realizar estudios de bioequivalencia in vivo para así definir su biodisponibilidad (BD) y bioequivalencia (BE), pero ésto implicaría utilizar voluntarios humanos, tiempo y dinero. Es por ésto que se creó la bioexención, la cual permite el registro de los medicamentos, sin tener que pasar por los estudios de BD y BE en humanos, siempre y cuando, dicho principio activo, cumpla con los criterios del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB).

El SCB es un marco científico para clasificar los principios activos en base a su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal [18] y, toma en cuenta los parámetros de: solubilidad, permeabilidad y liberación-disolución [19]. El SCB, clasifica los principios activos en clase 1 a la 4 según la siguiente tabla:

Tabla 1: Sistema de Clasificación Biofarmacéutica [18].

Clase	Solubilidad	Permeabilidad
1	Alta	Alta
2	Baja	Alta
3	Alta	Baja
4	Baja	Baja

Según la Tabla 1, la clasificación se basa en definir si el principio activo posee alta o baja solubilidad y permeabilidad.

- Solubilidad: El principio activo es *altamente soluble* cuando su mayor concentración posológica (la dosis más alta disponible en el mercado como producto de liberación inmediata) es soluble en 250 mL o menos, en un

medio acuoso con valores de pH comprendidos entre 1-6,8 [20,21]. Si no cumple con éste criterio, se clasifica como principio activo de *baja solubilidad*.

- Permeabilidad: Se basa en la fracción de la dosis de principio activo que es absorbida en el hombre (no en la BD sistémica) y en la velocidad de transferencia de masa a través del epitelio intestinal humano, siendo posible utilizar como alternativa sistemas no humanos para predecir la absorción [19]. Se considera que el principio activo es *altamente permeable* cuando la fracción absorbida de la dosis administrada en humanos es ≥90% [22], valores menores lo clasificarían como principio activo de *baja permeabilidad*.

De acuerdo a las características de permeabilidad y solubilidad, el metoprolol se clasifica como principio activo de clase 1, es decir, posee alta solubilidad y alta permeabilidad y, a su vez, dichos parámetros no son limitantes en su BD, por lo que productos que contienen este principio activo son candidatos a bioexención, siempre y cuando se sepa que los excipientes usados en la forma farmacéutica y el proceso de fabricación no afectan significativamente el proceso de liberación-disolución y absorción [23].

Debido a las características mencionadas, el metoprolol es utilizado como estándar interno según la FDA [19], es decir, en lugar de hacer un estudio de permeabilidad en humanos con un principio activo, se puede realizar un ensayo de permeabilidad utilizando un método in vivo y comparar dichos resultados con los

de metoprolol; si la permeabilidad del principio activo es mayor o igual a la de metoprolol, se lo clasifica como de alta permeabilidad y se le permite optar a la bioexención.

III. 5. ***PERFUSIÓN INTESTINAL IN SITU***

Para evaluar la permeabilidad intestinal de un medicamento, una de las técnicas más utilizadas es la perfusión intestinal in situ descrita por Doluisio y col [17]. La técnica de perfusión intestinal in situ hace uso de animales vivos, por lo general ratas. Se han realizado estudios sobre la permeabilidad de diversos medicamentos utilizando el modelo de permeabilidad in situ en ratas y se ha visto que dichos resultados se correlacionan con los de estudios de permeabilidad en humanos. No solo hay correlación en cuanto al coeficiente de permeabilidad [24], sino que también es posible predecir otros factores relacionados, como el sitio de absorción de medicamentos específicos [25] y el mecanismo por el cual se absorben [24,26].

La técnica de Doluisio y col. consiste en exponer el segmento de intestino requerido para el estudio, canularlo, perfundir la solución que contiene el medicamento y recoger alícuotas de la solución remanente en intervalos de tiempo predefinidos. El procedimiento se realiza cuidando que la integridad de los vasos sanguíneos no se vea alterada, para que el paso del medicamento por el intestino ocurra en condiciones similares a las fisiológicas. Para conocer la cantidad de

fármaco absorbido, se calcula la diferencia entre la cantidad de fármaco perfundido y la cantidad de fármaco remanente en el fluído intestinal.

Para cuantificar el fármaco en el fluido intestinal es necesario tener una técnica analítica capaz de diferenciar el fármaco de los posibles interferentes que pueden estar presentes en fluidos de origen biológico. Es por esto que la técnica utilizada fue High Performance Liquid Chromatography, más conocida como HPLC.

III. 6. ***HPLC (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN)***

La cromatografía es una técnica que permite separar los componentes de una mezcla compleja que, normalmente, serían difíciles o imposibles de separar mediante el uso de otra técnica. Para separar los componentes, la muestra se desplaza con una fase móvil a través de una fase estacionaria, con la que es inmiscible, la cual se encuentra fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria [27-28]. Los componentes que presenten una gran afinidad con la fase estacionaria se moverán más lentamente a través de la columna que aquellos que presentan una baja afinidad [28], por lo tanto, la separación se basa en las interacciones físicas y/o químicas, de cada componente de la muestra, con la fase móvil y la fase estacionaria. Debido a la distinta movilidad, los componentes de la muestra se separan en bandas que pueden ser analizadas cualitativa o cuantitativamente [27].

Dentro de los tipos de cromatografía, la High Performance Liquid Chromatography, o HPLC, es una de las técnicas más utilizadas, esto es debido a su sensibilidad, fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y su gran aplicabilidad a diversas sustancias de interés [27].

La técnica de HPLC utiliza bombas de presión para hacer avanzar la fase móvil a través de la fase estacionaria (columna). Los tamaños de partícula en la columna son mucho más pequeños, lo cual permite una mayor eficacia en la separación [27]. En este trabajo se utilizó la técnica de HPLC llamada “fase reversa”, lo que implica que las partículas de la fase estacionaria son de carácter apolar, por lo que se utilizan solventes relativamente polares (agua, metanol o acetonitrilo) como fase móvil [27]. Los componentes más polares eluyen primero y los menos polares tardan más tiempo en salir de la columna.

Para asegurar la idoneidad del sistema de HPLC en las condiciones de trabajo designadas, existen dos parámetros a evaluar:

6.1. Número de Platos Teóricos (NPT)

La columna cromatográfica puede dividirse en rodajas imaginarias, llamadas platos. En cada uno de los platos se consigue un equilibrio transitorio antes de que la fase móvil avance hacia el siguiente. La eficiencia de la columna cromatográfica y, por lo tanto, su poder separativo se mide en función del NPT [29].

6.2. Factor de Asimetría (As)

Como su nombre indica, el As revela qué tan asimétrico es el pico cromatográfico. La asimetría del pico produce errores en la integración, lo que aumenta el error en la cuantificación del analito [29].

Antes de realizar cualquier tipo de medición en el HPLC, se deben estimar las condiciones cromatográficas con las que se va a trabajar, como por ejemplo flujo, pH, porcentaje de fase móvil, temperatura, entre otros. Una vez decididas, se procede a validar el uso de dichas condiciones.

III. 7. ***VALIDACION DEL METODO ANALITICO***

La validación es un proceso que permite asegurar que la metodología analítica entrega valores confiables y que el método es adecuado para los fines previstos [30]. El proceso de validación consta de una serie de pasos, los cuales dependen del tipo de análisis a realizar. Existen categorías para definir que parámetros se deben evaluar dentro de la validación; estas categorías son [31]:

- *Categoría I*: Procedimientos analíticos para la cuantificación de los componentes principales de fármacos a granel o ingredientes activos (incluyendo conservantes) en productos farmacéuticos terminados.
- *Categoría II*: Procedimientos analíticos para la determinación de impurezas en fármacos a granel o productos de degradación en productos farmacéuticos terminados. Estos procedimientos incluyen análisis cuantitativos y pruebas de límite.

- *Categoría III*: Procedimientos analíticos para la determinación de las características de desempeño (p.ej. disolución, liberación de fármacos, etc)
- *Categoría IV*: Pruebas de identificación.

Los parámetros de validación requeridos para cada categoría se indican en la siguiente tabla:

Tabla 2: Parámetros de validación requeridos según categoría [31].

Características de desempeño analítico	Categoría I	Categoría II		Categoría III	Categoría IV
		Análisis Cuantitativos	Pruebas de Límite		
Exactitud	Sí	Sí	*	*	No
Precisión	Sí	Sí	No	Sí	No
Especificidad	Sí	Sí	Sí	*	Sí
Limite de Detección	No	No	Sí	*	No
Limite de Cuantificación	No	Sí	No	*	No
Linealidad	Sí	Sí	No	*	No
Intervalo	Sí	Sí	*	*	No

*Pueden requerirse dependiendo de la naturaleza de la prueba específica.

7.1. ***Linealidad e intervalo lineal***

La linealidad es la capacidad de un procedimiento analítico para obtener resultados de prueba que sean proporcionales, ya sea directamente, o por medio de una transformación matemática, a la concentración de analito en muestras dentro de un intervalo dado [31]. El intervalo se determina construyendo curvas de calibrado de concentraciones conocidas utilizando un estándar del analito a cuantificar. Con éstos datos, se determina: *ecuación de la recta* (pendiente e intercepto), *coeficiente de correlación* (r), *coeficiente de determinación* (r^2) y *test de linealidad* (t de Student para la pendiente) [29-31].

7.2. Exactitud

La exactitud expresa la cercanía que existe entre el valor verdadero y el valor obtenido [29]. En la práctica, la exactitud se expresa como el porcentaje de recuperación o como la diferencia entre el valor medio obtenido y el valor real, más conocido como sesgo [29,30].

7.3. Precisión

Es el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el procedimiento repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea [29]. La precisión se expresa como el coeficiente de variación de una serie de mediciones. La precisión se debe evaluar dentro de un mismo día con las mismas condiciones y el mismo operario (repetibilidad) y en días distintos con operarios diferentes (reproducibilidad) [29,30].

7.4. Especificidad o Selectividad

Capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de impurezas, productos de degradación o componentes de la matriz [29,30]. Para evaluarla se realizan lecturas de: matriz sin fármaco, matriz con fármaco, matriz con fármaco expuesto a distintas condiciones (hidrólisis ácida, hidrólisis básica, oxidación, termólisis, etc). El principio activo presente en la muestra debe ser cuantificable a pesar de los productos de degradación. Los picos deberán identificarse adecuadamente [29].

7.5. Límite de detección

Es la cantidad mínima de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, en las condiciones experimentales indicadas [31].

7.6. Límite de cuantificación

Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede determinar con precisión y exactitud aceptables en las condiciones experimentales indicadas [31]. Los límites de cuantificación y detección pueden estimarse a partir de la curva de regresión, siempre que se hayan considerado concentraciones bajas de analito, por extrapolación a concentración cero [29].

7.7. Robustez

Muestra la capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por las variaciones pequeñas, pero deliberadas de los parámetros del método. El objetivo es optimizar el método y describir bajo qué condiciones analíticas se obtienen resultados confiables con dicho método [29,32]. Para definir la robustez, se deben identificar los parámetros que podrían afectar los resultados. A cada parámetro se le asigna un valor por sobre el valor normal y uno por debajo del valor normal y luego se lee la muestra bajo estas nuevas condiciones.

Una vez realizada la validación del método analítico, es posible implementarlo y utilizarlo las veces que sea necesario con la seguridad de que los resultados serán confiables y reproducibles.

Dentro de éste trabajo se realizó la validación de un método analítico en HPLC, para cuantificar metoprolol tartrato en el fluido intestinal de rata obtenido a partir del ensayo de permeabilidad in situ descrito por Doluisio y col. Con los datos obtenidos se calculó el coeficiente de permeabilidad y se lo comparó con los datos existentes en la literatura. Las conclusiones obtenidas a partir de éste trabajo, ayudarán a confirmar o refutar el uso de metoprolol tartrato como estándar de alta permeabilidad en el marco del SCB.

IV. HIPÓTESIS

Debido a que el metoprolol posee una alta permeabilidad y solubilidad a pH fisiológico, es un principio activo clasificado como Clase 1 según el SCB y, dado que es un estándar de permeabilidad empleado por agencias regulatorias, se postula que el resultado de este estudio de permeabilidad intestinal de metoprolol en ratas permitirá corroborar la validez de su uso como estándar de comparación en la clasificación de la permeabilidad intestinal de otros medicamentos.

V. OBJETIVOS

V. 1. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la permeabilidad intestinal de metoprolol tartrato mediante la aplicación de una técnica de perfusión intestinal *in situ*.

V. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar y validar un método analítico para la cuantificación de metoprolol tartarato mediante una técnica de HPLC en fluido de perfusión intestinal en ratas.
- Aplicar y adaptar el modelo de perfusión intestinal in situ en el estudio de la permeabilidad intestinal de metoprolol tartarato.
- Obtener la constante de absorción aparente y coeficiente de permeabilidad aparente de metoprolol tartarato.
- Establecer el valor experimental de permeabilidad del estándar interno a objeto de ser empleado como patrón para otras moléculas cuya permeabilidad se evalúe con la misma metodología.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI. 1. MATERIALES

1.1 Reactivos.

Agua ultra pura.

Methanol Gradient grade for Liquid Chromatography. Merck.

Estándar secundario de Metoprolol Tartrato Sigma.

Uretano p.a. Sigma.

Éter etílico para análisis. p.a. Merck.

Cloruro de sodio. p.a. Mallinckroadt.

Cloruro de potasio. p.a. Scharlau PO0200.

Cloruro de calcio. p.a. Merck.

Fosfato monobásico de potasio. p.a. J.T. Baker.

Fosfato monoácido de potasio. p.a. Merck.

Solución de lavado largo (LCS).

Solución de lavado corto (SCS).

1.2 Instrumental y Equipos.

Baño termorregulador Memment DSB500E.

Balanza Analítica Denver Instrument Company AA-200.

Baño de ultrasonido J.R. Selecta 3000152.

Filtros MilliQ Millipore Simplicity.

pH-metro Orion® 420-A.

Micropopeta Pipet 4u®, AHN Biotechnologie, p1000.

Micropipeta Dragon med® DS51085, p5000.

Refrigerador Samsung RTZASKPN. 2-8°C. Frezeer -18°C.

Centrífuga refrigerada Hermle Z300.

Centrifuga refrigerada Eppendorf 5810R.

HPLC: Columna HiQsil C18HS 4,6mmx150mmL.

Bomba Jasco PU-2089 Plus.

Detector Jasco -2010Plus.

Horno Jasco co-2067 Plus.

Interfase Jasco LC-NetII/ADC Plus.

Inyector Jasco AS-2055 Plus.

1.3 Material de Laboratorio.

Material de vidrio clase A.

Válvulas tipo stop-cock acero inoxidable Cole Palmer.

Jeringas de vidrio 10 mL.

Jeringas desechabes 3 mL, 21Gx$1^{1/2}$ Nipro.

Jeringas desechables 10 mL. Nipro.

Material quirúrgico convencional para microcirugía.

Cánulas de vidrio en L (UTFSM).

Guantes desechables de vinilo.

Viales HPLC CHROMES 1,8 mL mouth 100/pk.

Tapas viales CHROMES 8 mm wide-lip 100/pk.

Insertos para viales HPLC Agilent 150 µL f/8 screw vial, 100/pk.

VI. 2. MÉTODOS

2.1. *Determinación de las concentraciones a utilizar en el ensayo in situ.*

Es necesario demostrar que la permeabilidad intestinal del medicamento es independiente de la concentración inicial administrada, es por esto que se recomienda probar tres concentraciones distintas de fármaco correspondientes al 100, 10 y 0,1% de la mayor concentración posológica disuelta en 250 mL [18]. En el caso de metoprolol, la mayor concentración posológica corresponde a 200 mg en 250 mL, por lo que las concentraciones de trabajo a utilizar son 800, 80 y 8 µg/mL. La concentración de 8 µg/mL se encuentra por debajo del límite de detección y cuantificación de la técnica, por lo que en su lugar se utilizó una concentración intermedia, de 400 µg/mL, entre 800 y 80 µg/mL. Si bien se probó la concentración de 800 µg/mL, la validación del método analítico, mostró que concentraciones por sobre los 400 µg/mL producen picos asimétricos y, por lo tanto, menos confiables. Debido a esto, se probó una concentración adicional de 200 µg/mL. En resumen, las concentraciones de trabajo fueron: 800 µg/mL, 400 µg/mL, 200 µg/mL y 80 µg/mL.

2.2. *Soluciones de trabajo de metoprolol tartrato.*

Para la validación y para el ensayo de permeabilidad in situ, se prepararon soluciones frescas de 800 µg/mL y se realizaron diluciones para obtener soluciones de menor concentración a partir de la ecuación:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Donde C corresponde a concentración (uno y dos) y V a volumen (uno y dos).

Para la solución de 800 µg/mL, se pesaron 0,0400 ± 0,0001 g de estándar de metoprolol tartrato, los cuales fueron transferidos a un matraz de aforo de 50 mL y aforados con solución de lavado corto (SCS).

2.3. *Implementación del método analítico para la cuantificación de metoprolol tartrato*.

Las condiciones cromatográficas utilizadas en éste trabajo fueron adaptadas a partir de publicaciones en las cuales se cuantificó metoprolol en fluido intestinal de rata [22-33] y pruebas preliminares realizadas en dos equipos de HPLC. Dichas condiciones son las siguientes:

- Cromatografía de fase reversa.
- Detector de arreglo de diodo.
- Columna HiQsil C18HS 4,6 mm x 150 mm.
- Fase móvil: metanol: buffer fosfato 0,05M pH 4,0, 55:45.
- Temperatura: 25°C.
- Longitud de onda: 272 nm.
- Flujo isocrático: 1 mL/min.
- Volumen del loop: 50 µL.
- Tiempo total de análisis: 6 min.
- Tiempo de retención: 2,7 min.

2.4. *Tratamiento de las muestras pre-inyección*.

Durante este trabajo, se analizaron dos tipos de muestras: estándar puro de metoprolol y fluido intestinal de rata. Antes de realizar cualquier lectura en el HPLC, fue necesario tratar las muestras para minimizar las interferencias y evitar la contaminación del equipo.

a) Estándar puro: corresponde a una muestra limpia, por lo que el único tratamiento necesario es la filtración de la solución a través de un filtro de 0,45 µm con ayuda de una jeringa.
b) Fluido intestinal de rata: Durante el ensayo in situ se extrajeron volúmenes de 350 µL de fluido intestinal, los cuales fueron transferidos a un tubo eppendorf, luego se centrifugaron a 8000 rpm por 8 min a una temperatura de 5°C. La concentración de fármaco se midió en el sobrenadante. De ésta manera se eliminan los interferentes o contaminantes presentes en el fluido intestinal (células epiteliales, proteínas, elementos figurados, etc).

2.5. *Validación del método analítico por HPLC*.

2.5.1 Linealidad e intervalo lineal

Se construyeron curvas de calibrado de concentraciones conocidas utilizando estándar de metoprolol en 3 rangos de concentraciones: 60 a 100 µg/mL, 140 a 380 µg/mL y 400 a 800 µg/mL. Cada curva cuenta con 5 puntos.

Utilizando Microsoft Excel (con su herramienta de análisis de datos) se determinaron los siguientes parámetros [29-31,34]:

a) Ecuación de la recta: muestra la pendiente e intercepto de la curva de calibrado.

$$y = bx + a$$

b) Coeficiente de correlación (r): indica el grado de relación entre la variable concentración (x) y la variable respuesta (y). Valores cercanos a 1 o -1 indican una gran probabilidad de correlación entre las variables, mientras que valores cercanos a 0 indican independencia de las variables x e y. El valor recomendado para r es ≥ 0,999.

$$r = S_{xy} / (S_x * S_y)$$

$$S_{xy} = {}_{i=1}[(\Sigma n\ x_i \cdot y_i) / n] - (x_{prom} \cdot y_{prom})$$

$$S_x = \sqrt{((\Sigma\ x_i^2 / n) - (x_{prom}^2))}$$

$$S_y = \sqrt{((\Sigma\ y_i^2 / n) - (y_{prom}^2))}$$

c) Coeficiente de determinación (r^2): Se acepta si su valor corresponde a un número ≥ 0,99.

d) Test de linealidad t de Student: se realiza esta prueba ya que es un mejor indicador de que el modelo es lineal. Para ello se calcula el valor de t_{calc} con n-2 grados de libertad y se compara con el valor tabulado (t_{tabla}) para un nivel de

confianza α = 0,05. En éste caso se utilizaron dos curvas de calibrado, cada una de 5 puntos por lo que n=10. Si $t_{calc} \geq t_{tabla}$, la correlación lineal es significativa.

$$t_{calc} = [| r | \sqrt{(n-2)}] / \sqrt{(1- r^2)}$$

Donde: t_{calc} = Valor estimado t Student obtenido para el coeficiente de correlación.

| r | = Valor absoluto del coeficiente de correlación.

(n-2) = Número de grados de libertad.

r^2 = Valor del coeficiente de correlación.

2.5.2. Exactitud

Se calculó el porcentaje de recuperación de tres concentraciones de metoprolol correspondientes a 200, 260 y 320 µg/mL, utilizando la fórmula [29,30]:

$$\%R= [(C_e-C_0)/C_a]*100.$$

Donde: R= Recuperación

C_e= Concentración del analito de la muestra enriquecida.

C_0= Concentración de la muestra sin adicionar.

C_a= Concentración de la muestra enriquecida.

Luego, se realizó la prueba t utilizando la siguiente fórmula:

$$t_{cal}=[(100-\%R) * (\sqrt{n}) /S]$$

Donde: t_{cal}= t calculado.

%R = Porcentaje de recuperación.

S = Desviación estándar de las lecturas de %R.

n = Número de lecturas o valores observados.

Se comparó t_{cal} con el t-Student teórico (t_{tab}) para un α de 0,05, con un 95% de confianza (t_{tab}=2,31). Un $t_{cal} > t_{tab}$ indica diferencias significativas entre los valores observados, es decir, los datos deben ser corregidos [30], en caso contrario, no se puede demostrar que existe diferencia, por lo que se acepta la prueba.

2.5.3. Precisión

Para evaluar la repetibilidad, se realizaron 12 lecturas de soluciones estándar de 260 µg/mL de metoprolol, dentro de un mismo día, en las mismas condiciones, por el mismo operario [29-30]. Se calculó el coeficiente de variación con la siguiente fórmula:

$$CV_{r1} = S / X$$

Donde: CV_{r1}= Coeficiente de variación.

X = Promedio de las lecturas.

S = Desviación estándar de las lecturas.

Para evaluar la reproducibilidad se realizaron 10 lecturas de soluciones estándar de 260 µg/mL de metoprolol, preparadas y leídas en distintos días [29,30] y se calculó el CV_{r2} utilizando la fórmula anterior.

Como criterio de aceptación de repetibilidad y reproducibilidad se utilizó el coeficiente de variación de Horwitz, el cual se calcula como:

$$CV_h = (2^{(1-0,5)\log C}) / 2$$

Donde CV_h= Coeficiente de variación de Horwitz intralaboratorio.

C = Valor nominal del analito expresado en potencia de 10 (en este caso corresponde a 0,00026).

Si $CV_r < CV_h$, (CV_h=0,14) la reproducibilidad y repetibilidad del método son aceptables.

2.5.4. Especificidad o Selectividad

Se realizó la lectura de un estándar de metoprolol de 260 µg/mL y se comparó con la lectura de un blanco de matriz. Además, se realizó una degradación artificial de la muestra de metoprolol bajo las siguientes condiciones [29]:

- Hidrólisis ácida: se adicionó 1 mL de HCl 1N a la solución y se mantuvo a 80°C por 2 horas.
- Hidrólisis básica: se adicionó 1 mL de NaOH 1N a la solución y se mantuvo a 80°C por 2 horas.
- Termólisis: la solución se mantuvo a 80°C por 2 horas.
- Oxidación: se agregaron gotas de peróxido de hidrógeno y se mantuvo a 80°C por 2 horas.
- Fotólisis: la solución se expuso a radiación solar directa durante 6 horas.

Como criterio de aceptación se considera que el método debe ser capaz de cuantificar el analito a pesar de las interferencias. Los productos de degradación deben presentar un tiempo de retención distinto al del analito.

2.5.5. Límite de detección y Límite de cuantificación

Se calcularon a partir de la lectura por triplicado de las concentraciones más bajas de la curva de calibrado (60, 70 y 80 µg/mL), utilizando la siguiente ecuación [31-34].

$$LD = Y_{bl} + 3\,S_{bl} / b \qquad LC = Y_{bl} + 10\,S_{bl} / b$$

Donde: LD = Límite de Detección.

LC = Límite de Cuantificación.

Y_{bl} = Intercepto del blanco.

S_{bl} = Desviación estándar del blanco.

b = Pendiente de la curva de calibrado.

2.5.6. Robustez

Se le asignaron valores altos y bajos a tres variables fundamentales en el método cromatográfico: pH (A), temperatura (B) y flujo (C). Una vez asignados los valores, se utilizó la prueba de Youden y Steiner para diseñar el orden de las variables en cada experimento [32-34]:

Tabla 3: Prueba de Youden y Steiner para robustez [32]

	Análisis							
Valor de la variable	1	2	3	4	5	6	7	8
A, a	A	A	A	A	a	a	a	a
B, b	B	B	b	b	B	B	b	b
C, c	C	c	C	c	C	c	C	c
D, d	D	D	d	d	d	d	D	D
E, e	E	e	E	e	e	E	e	E
F, f	F	f	f	F	F	f	f	F
G, g	G	g	g	G	g	G	G	g
RESULTADOS:	s	t	u	v	w	x	y	z

Las letras mayúsculas (A-G) indican el valor alto y las minúsculas (a-g) el valor bajo de cada variable. Las letras s a la z representan los resultados obtenidos en los experimentos 1al 8 respectivamente (en este caso concentración en µg/mL). En éste estudio solo se analizaron 3 variables (A-C), pero con el método de Youden y Steiner se pueden estudiar la influencia de hasta 8 variables. El efecto de cada variable se calcula de la siguiente manera:

$$(s + t + u + w) / 4 = A \qquad y \qquad (w + x + y + z) / 4 = a$$

$$A\text{-}a = \Delta\text{variable A}$$

Mientras mayor sea ∆variable A, mayor influencia tiene dicha variable en el método analítico. Este procedimiento matemático se realiza para cada variable. Si ∆variable es mayor a la raíz de dos por la desviación estándar del método (S de la precisión), existe diferencia significativa, por lo que el método es sensible a dicha variable y, para obtener valores confiables, no debe ser modificada.

$$\Delta\text{variable} < \sqrt{2}*S$$

2.6 *Técnica de permeabilidad in situ*

2.6.1. Condiciones Generales

El procedimiento experimental fue realizado en las dependencias de la Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso. Todo procedimiento en el cual se utilizó animales de experimentación se llevó a cabo de acuerdo al “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals del National Research Council” de Estados Unidos

[35]. Los procedimientos poseen certificación de bioética por el Comité de Bioética de la Facultad de Farmacia, Universidad de Valparaíso.

2.6.2. Animales de experimentación

Se utilizaron ratas machos Sprague-Dawley de 240-270 g de peso, mantenidas a temperatura de 21ºC, ciclos de luz/oscuridad (12/12) y acceso *ad libitum* a alimento y agua, con ayuno pre-operatorio de 12-16 horas. Las ratas fueron obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

2.6.3. Anestesia y eutanasia

Las ratas fueron anestesiadas una hora antes de la cirugía con una inyección de etiluretano al 25% p/p (la anestesia profunda se analizó por la ausencia del reflejo palpebral) y colocadas en un ambiente termo-regulado para mantener la temperatura normal del cuerpo. Una vez terminado el procedimiento experimental, la eutanasia se llevó a cabo mediante dislocación cervical.

2.6.4. Soluciones de lavado

Dentro del experimento se utilizan dos tipos de soluciones de lavado:

1. Solución de lavado largo (LCS): Está compuesta por cloruro de sodio 9,2 g/L, cloruro de potasio 0,34 g/L, cloruro de calcio 0,19 g/L y fosfato monobásico 0,76 g/L ajustada a pH 7,2 con NaOH 0,1 M. Su función es lavar el intestino de la rata antes de realizar el experimento de permeabilidad.

2. Solución de lavado corto (SCS): Está compuesta por cloruro de sodio 9,2 g/L, 3,9 mL/L de fosfato monobásico de potasio 0,2 M y 6,1 mL/L de fosfato monoácido de potasio 0,2 M ajustada a pH 7,2 con NaOH 0,1 M. Esta solución se utiliza para acondicionar el intestino de la rata antes de realizar el experimento. También se utiliza para aforar las soluciones de metoprolol preparadas para la validación y para el experimento de permeabilidad intestinal in situ.

Éstas dos soluciones, junto con la solución de metoprolol y etiluretano al 25% p/p, se mantienen en un baño termorregulado a 37°C durante todo el experimento.

2.6.5. Cirugía y toma de muestras

Se realizó un procedimiento adaptado del ensayo de perfusión intestinal in situ descrito por Doluisio y cols [17], los pasos se describen a continuación:

Luego de comprobar que la rata se encuentra anestesiada, se realizó un corte de aproximadamente 1 cm en la línea media abdominal, a la altura de las caderas. Con ayuda de las pinzas, se expuso parte del intestino delgado, para buscar el inicio del duodeno y el final del ileon, zonas en las cuales se realiza un pequeño corte para insertar las cánulas de vidrio en “L”, formando el compartimiento estanco. Se fijaron las cánulas en su lugar con sutura. Es necesario buscar el conducto biliar y atarlo con sutura para evitar la recirculación enterohepática. El procedimiento se realizó con cuidado para mantener intacta la irrigación sanguínea en la zona.

Se unieron segmentos de cuatro centímetros de tubo plástico a los extremos expuestos de cada cánula. Luego, se ensambló una jeringa hipodérmica de 10 mL ajustada con una válvula stop-cock, en el tubo plástico unido al duodeno (tubo 1), dejando libre el tubo plástico unido al íleon (tubo 2). Se llenó la jeringa con LCS y se introdujo en el intestino lentamente para limpiar su contenido. Todo el fluido fue recogido a través del tubo 2 con ayuda del émbolo. Se repitió este procedimiento hasta que la solución recolectada presentó un color claro. Se realizó el mismo procedimiento con SCS para acondicionar la mucosa intestinal antes de los experimentos. Una vez acondicionado el intestino, se ensambló otra jeringa hipodérmica de 10 mL ajustada con una válvula stop-cock en el tubo 2.

Se introdujeron 10 mL de solución de metoprolol a través de la jeringa duodenal con ayuda del émbolo. El cronómetro se activó una vez que toda la solución se encontraba dentro del intestino. Utilizando el émbolo, se empujó el contenido del lumen hacia una de las jeringas para así tomar alícuotas de 350 µL (las alícuotas se recolectan en tubos eppendorf). Tener en cuenta que la solución restante debe regresar al intestino dentro de 15 a 20 segundos. Se recolectaron alícuotas cada 5 minutos alternando las jeringas para asegurar concentraciones homogéneas dentro del intestino. El tiempo total de muestreo fue de 30 minutos. Una vez terminado el muestreo, se recolectó el líquido remanente en el intestino en un tubo falcon, se centrifugó y se midió el volumen de líquido remanente.

2.7. *Cálculo de permeabilidad de metoprolol tartrato*

2.7.1. Corrección de las concentraciones en el segmento intestinal.

Es necesario corregir la concentración obtenida en las alícuotas de fluido intestinal, ya que la absorción pasiva de agua en el lumen puede llevar a una sobre estimación de la concentración. Para ello se utiliza el volumen remanente en el intestino y las siguientes fórmulas:

$$C_c = [C_r (V_t)] / V_0 \quad \rightarrow \quad V_t = V_0 - k_0 t_i$$

$$k_0 = (V_0 – V_r) / t \quad \rightarrow \quad V_r = V_{ri} + (6 * A)$$

Donde C_c = Concentración corregida.

C_r = Concentración calculada con la metodología analítica.

V_t = Volumen a tiempo t.

V_0 = Volumen a tiempo cero (volumen inicial 10,9 mL).

k_0 = Constante de absorción pasiva de agua.

T_i = Tiempo de muestreo (5, 10, 15, 20, 25 y 30 min).

V_r = Volumen residual.

t = Tiempo total de muestreo (30 min).

V_{ri} = Volumen remanente (el medido al final del experimento).

A = volumen de la alícuota (0,35 mL).

2.7.2. Tratamiento farmacocinético de los datos experimentales

La absorción intestinal de metoprolol en rata se ajustaría a una cinética de orden 1, por lo que se puede calcular la constante de absorción aparente:

$$C = C_0 e^{(-kappt)}$$

Donde: C = Concentración de analito al tiempo t.

C_0 = Concentración inicial de analito.

t = Tiempo de muestreo.

k_{app}= Constante de absorción aparente (min^{-1}).

En este trabajo no se calculó la constante mediante ésta ecuación, sino que se utilizó la herramienta Solver de Microsoft Excel para calcular una k_{app} más exacta, a partir de una regresión no líneal. Utilizando el valor de esta constante, se calculó el coeficiente de permeabilidad aparente de acuerdo a la siguiente ecuación [36]:

$$P_{eff} = (k_{app} R) / (2 * 60)$$

Donde P_{eff} = Coeficiente de Permeabilidad Aparente (cm/s).

R = Radio del Intestino (0,18 cm).

2.7.3. Evaluación de la diferencia de los datos (ANOVA)

Una vez obtenidos los valores de P_{eff}, es necesario evaluar si existen diferencias significativas entre ellos. Utilizando la herramienta “Análisis de varianza de un factor” de Microsoft Excel, es posible determinar si los resultados son diferentes entre sí. Si el valor crítico de F es menor al F calculado, existen diferencias significativas entre los datos [34], por lo que hay que corregirlos. Criterio de aceptación:

$$F_{calculado} < F_{crítico}.$$

VII. RESULTADOS

VII. 1. *Validación del método analítico*

1.1. Linealidad.

Gráfico de Linealidad: Se utilizaron dos curvas de calibrado de 5 puntos. Una de 60 a 100 µg/mL y otra de 140 a 380 µg/mL.

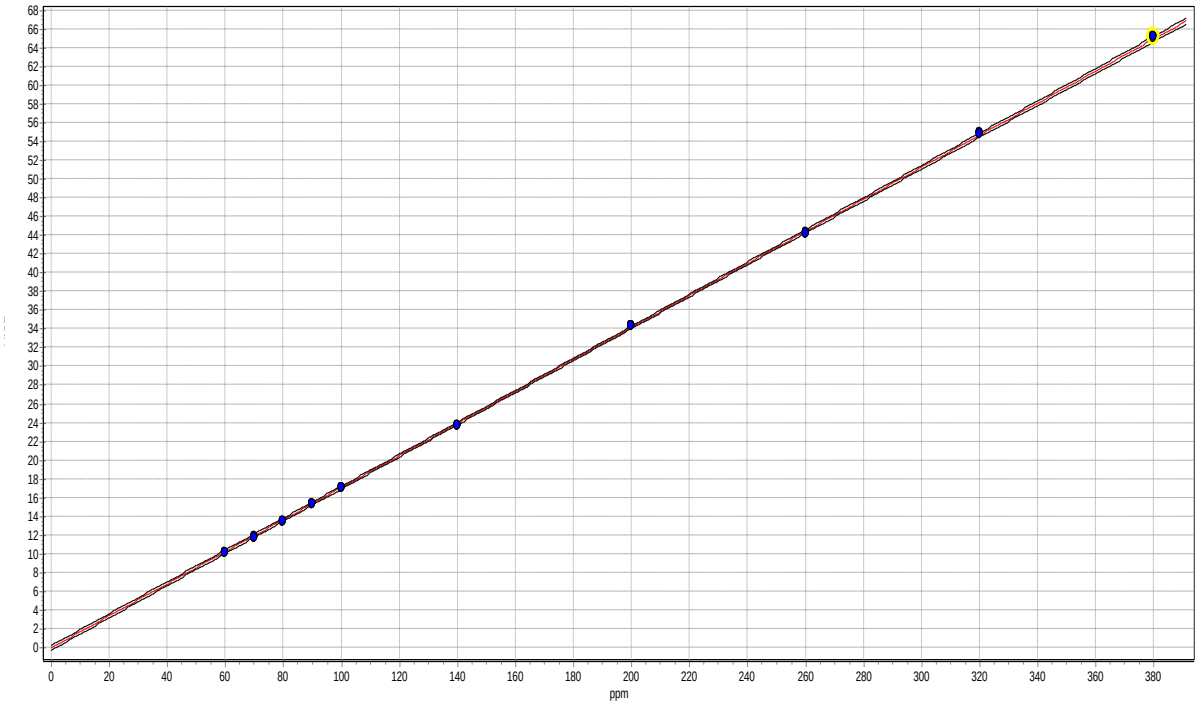

Figura 3: Gráfica de la curva de calibrado de 10 puntos para metoprolol tartrato.

Estimadores de regresión lineal:

Ecuación de la recta: $y= 0,172x – 0,218$.

a = -0,218.

b = 0,172.

r= 1,0000. Criterio de aceptación r≥0,999.

r^2= 1,0000. Criterio de aceptación r^2≥0,999.

Evaluación estadística t-Student:

t_{Tabla} = 2,306.

$t_{Calculado}$ = 491,72 Criterio de aceptación $t_{Calculado} \geq$ 2,306.

El comportamiento del medicamento es lineal en todo el rango de concentración probado, pero, sobre los 400 ppm disminuye el valor de la pendiente (de 0,172 a 0,163) y varía el intercepto (de -0,218 a +3,386). Además, se produce un aumento de la asimetría en los picos (As ≥ 2).

1. 2. Exactitud.

Recuperación: Criterio de aceptación $t_{Calculado} \leq t_{Tabla}$.

Tabla 3: Recuperación de metoprolol tartrato en % y valores de t para la aceptabilidad de la prueba.

Agregado (µg/mL)	Hallado (µg/mL)			% Recuperación		
200,0	198,79	198,75	198,71	99,40	99,38	99,36
260,0	260,82	260,64	260,66	100,32	100,25	100,25
320,0	320,44	320,39	320,52	100,14	100,12	100,16

R (n=9)	**99,93%**
S	**0,0042**
CV	**0,0042**
t_{tabla}	**2,3060**
t_{cal}	**0,5056**

Con una recuperación del 99,93%, $t_{cal} < t_{tabla}$, por lo que el método posee una exactitud aceptable.

1. 3. Precisión.

Repetibilidad: Criterio de aceptación $\%CV_{r1} \leq \%CV_h$.

Tabla 4: Resultados de CV para un analista en el mismo día.

n° Muestra	µg/mL	Promedio	S
1	259,93	259,47	0,46
2	259,73		
4	259,21		
5	259,29		
6	259,46		
7	259,14		
8	259,54		
9	259,57		
10	260,22		
11	258,45		
12	259,63		

CV_{r1}	**0,18%**
CV_h	**14,43%**

Reproducibilidad: Criterio de aceptación $\%CV_{r2} \leq \%CV_h$.

Tabla 5: Resultados de CV para un analista en distintos días.

n° día	µg/mL	Promedio	S
1	256,44	261,151	2,63
2	257,83		
3	260,64		
4	261,52		
5	259,38		
6	264,81		
7	263,89		
8	261,96		
9	262,62		
10	262,42		

CV_{r2}	**1,01%**
CV_h	**14,43%**

1. 4. Selectividad o especificidad.

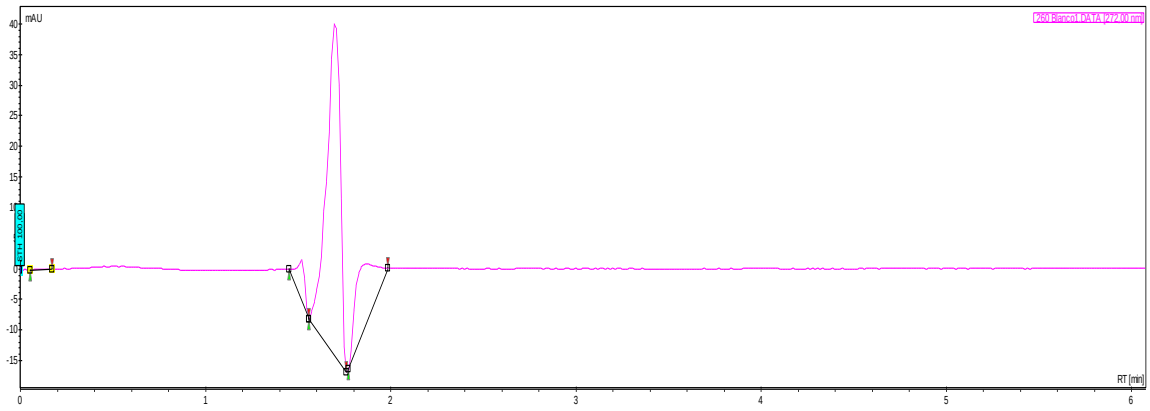

Figura 4: Lectura del Blanco. Concentración de Metoprolol 0,0 µg/mL.

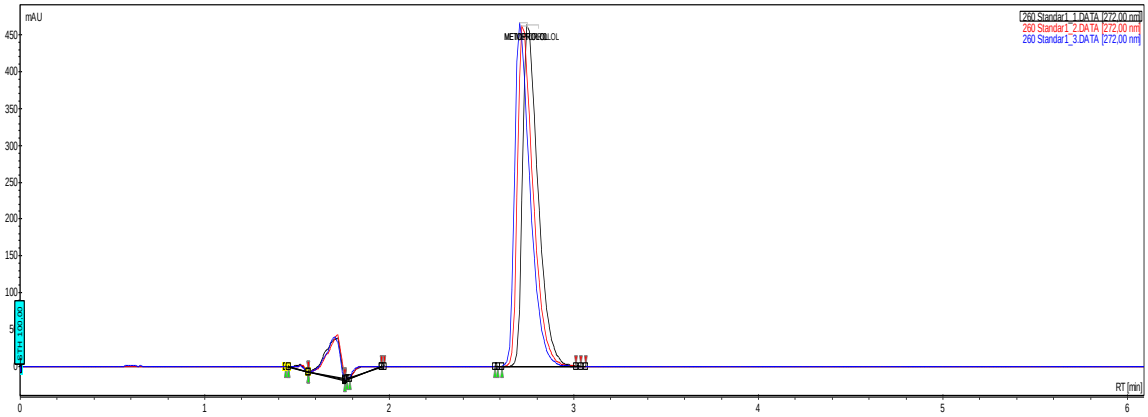

Figura 5: Lectura del Estándar. Concentración de Metoprolol 263,71 µg/mL.

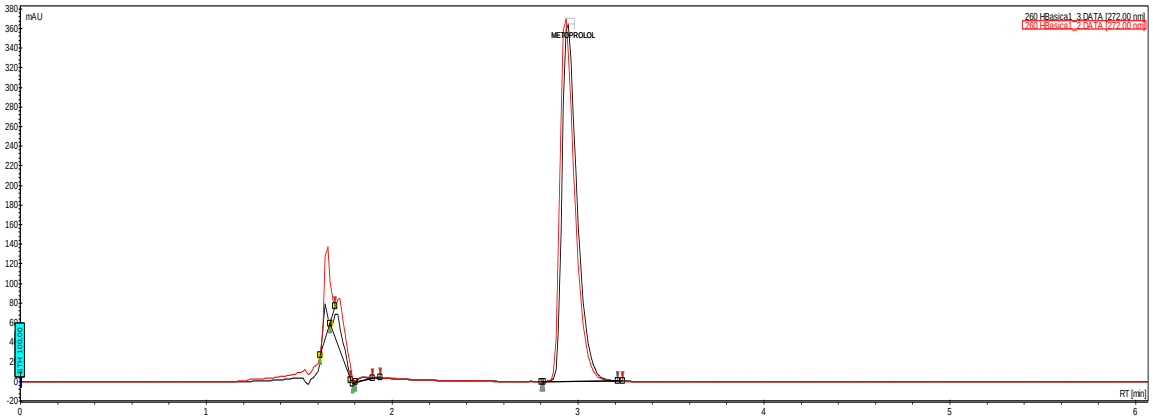

Figura 6: Lectura del estándar luego de la hidrólisis básica. Concentración de Metoprolol 200,52 µg/mL.

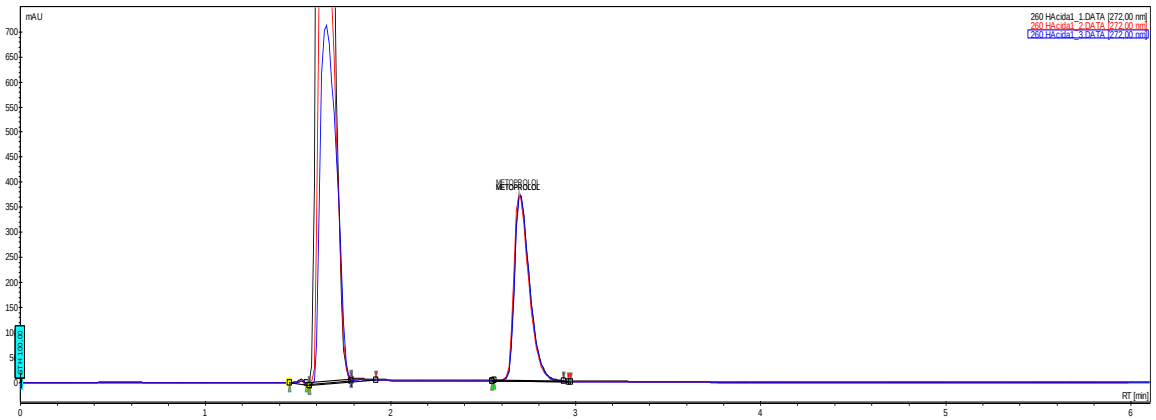

Figura 7: Lectura del estándar luego de la hidrólisis ácida. Concentración de Metoprolol 206,38 µg/mL.

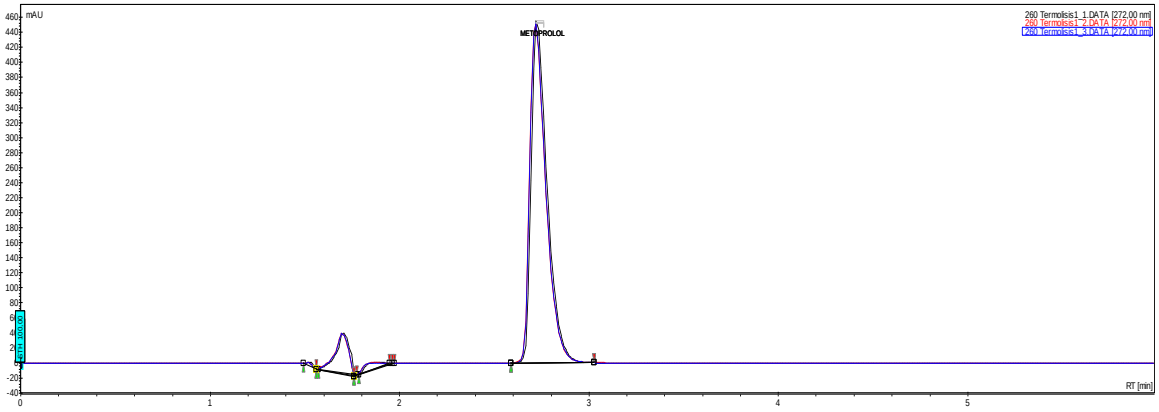

Figura 8: Lectura del estándar luego de la termólisis. Concentración de Metoprolol 259,96 µg/mL.

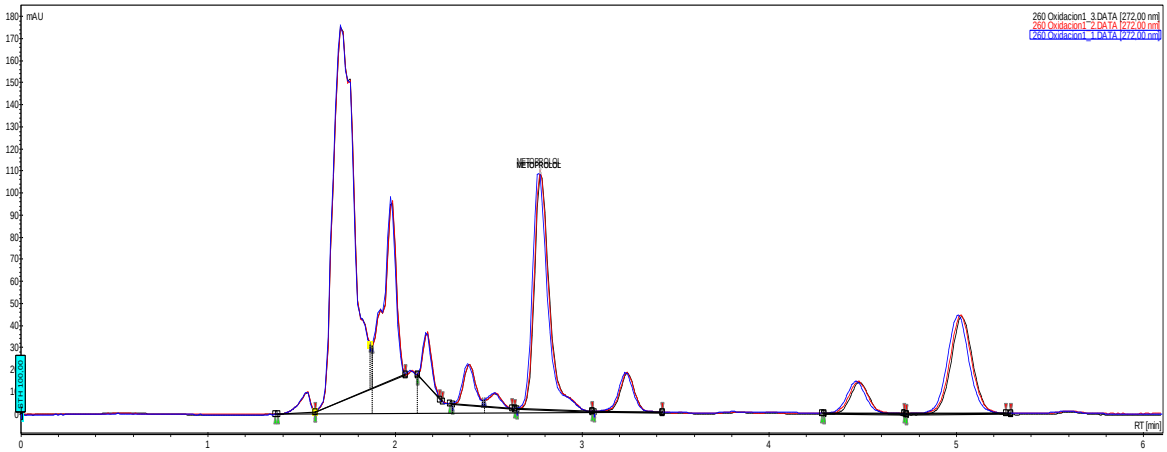

Figura 9: Lectura del estándar luego de la oxidación. Concentración de Metoprolol 60,91 µg/mL.

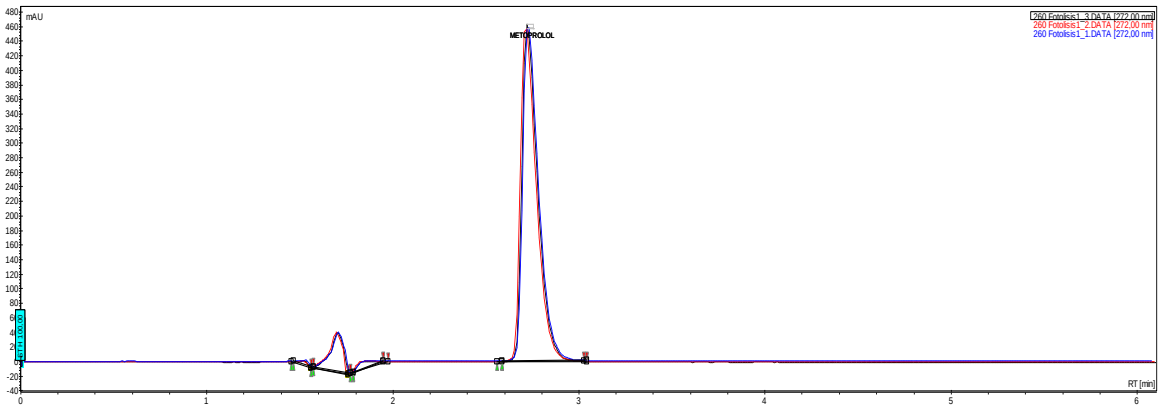

Figura 10: Lectura del estándar luego de la fotólisis: Concentración de Metoprolol 265,94 µg/mL.

Metoprolol se degrada en medio ácido, básico y oxidante. Si bien se degradó a 80°C, la cantidad degradada no es significativa en comparación con las 3 experiencias mencionadas anteriormente. No hubo degradación con la fotólisis, pero posiblemente se produjo pérdida de agua debido al calor. Estas dos últimas experiencias indican que no son necesarias medidas especiales cuando se trabaja con soluciones de metoprolol tartrato; entiéndase control riguroso de la termperatura, mantener el medicamento en frasco ambar, etc.

1. 5. Límites.

Límite de detección = 8,40 µg/mL.

Límite de cuantificación = 18,18 µg/mL.

1. 6. Robustez.

Tabla 6: Valor de las variables a evaluar para la robustez del método.

Variable/ Nivel	Nivel alto	Nivel bajo
pH	4,1	3,9
Tº (ºC)	26	24
Flujo (mL/min)	1,0	0,9

Tabla 7: Variables organizadas según estudio y los resultados de concentración obtenidos.

Variable/nº ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
Ph	4,1	4,1	4,1	4,1	3,9	3,9	3,9	3,9
Tº (ºc)	26	26	24	24	24	24	26	26
Flujo (mL/min)	1,0	0,9	0,9	1,0	0,9	1,0	1,0	0,9
Resultado (µg/mL)	261,49	294,03	290,23	260,45	290,46	264,09	261,62	290,86

Si la diferencia entre el valor mayor y el valor menor es mayor a 0,52 µg/mL, el método es sensible a dicha variable:

- Para pH (A-a)=0,21 µg/mL. No existe evidencia de que pequeñas variaciones de pH afecten significativamente el método.
- Para T° (B-b)=0,69 µg/mL. El método es sensible a esta variable, no modificar.
- Para Flujo (C–c)=126,61 µg/mL. El método es sensible a esta variable, no modificar.

La asimetría y el tiempo de retención no son sensibles al pH, la temperatura ni al flujo. El número de platos teóricos (NPT) se ve afectado por todos éstos factores, pero no llega a valores que comprometan la idoneidad del sistema (NPT siempre es mayor a 2000).

VII. 2. *Idoneidad del sistema*

Si bien no se considera parte de la validación, es importante evaluarla.

Tabla 8: Parámetros de aceptabilidad de la idoneidad del sistema.

	Criterio de aceptación	Valor obtenido
NPT	>2000	5032
As	<2	1,5

El equipo es apto para desarrollar la metodología analítica y llevar a cabo el análisis de muestras en las condiciones descritas.

VII. 3. *Permeabilidad intestinal de metoprolol*

En el siguiente gráfico se observa la disminución de la concentración de metoprolol en función del tiempo de recolección de las muestras desde el lumen intestinal.

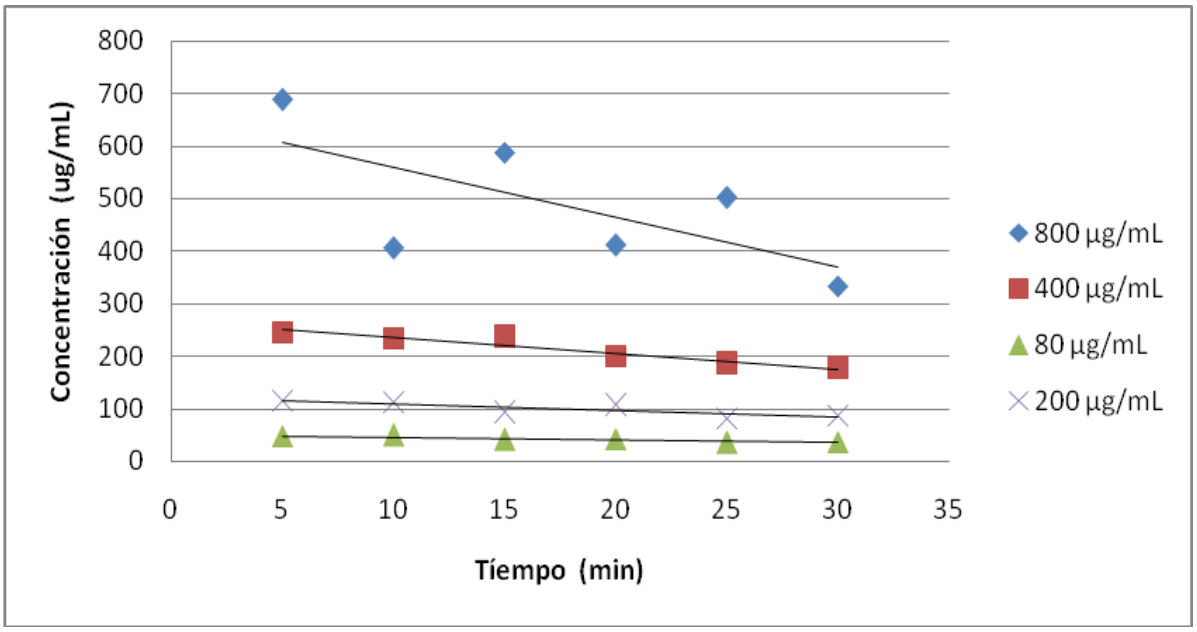

Figura 11: Gráfico concentración de metoprolol versus tiempo en el fluido intestinal de rata.

Las concentraciones evaluadas se comportan de manera lineal y decreciente, a excepción de la concentración de 800 µg/mL, donde se observan puntos por fuera de la recta. Es posible que surgieran errores de cuantificación en dicha concentración, ya que, como se indicó en la validación, valores por sobre 400 µg/mL entregan picos asimétricos. Aún así, la tendencia muestra que la

desaparición de metoprolol desde el lumen intestinal va aumentando a medida que pasa el tiempo.

La gráfica anterior debe ser linealizada para calcular los parámetros que definen la absorción de metoprolol. Para ello, los datos de concentraciones se transforman en logaritmos del valor, obteniéndose la siguiente gráfica:

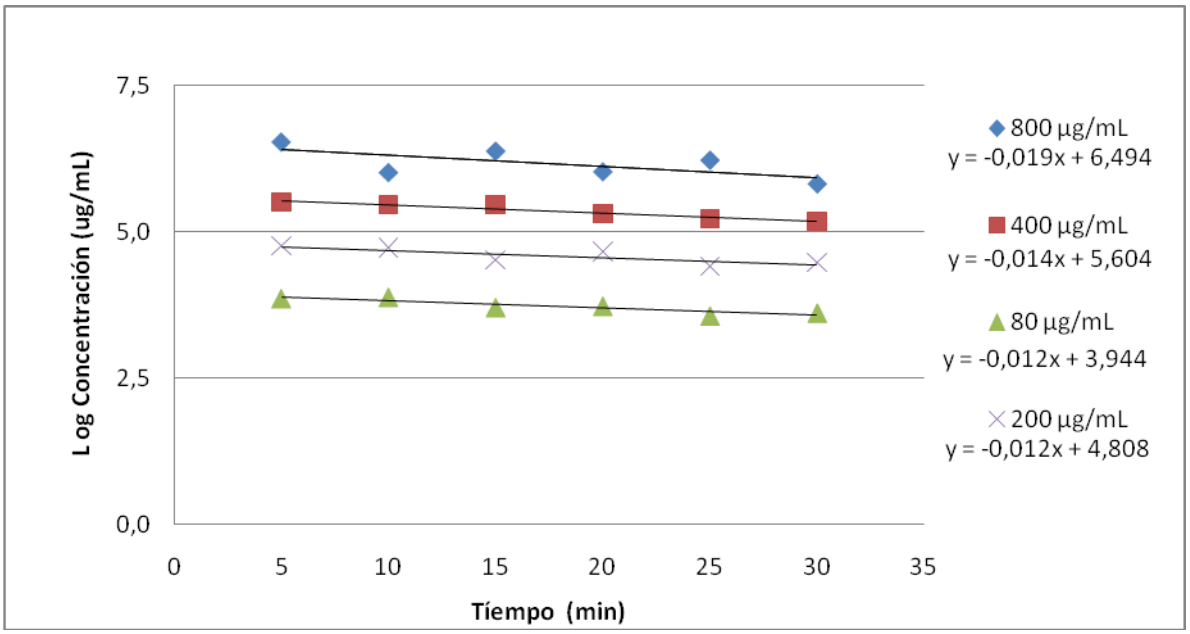

Figura 12: Gráfica logarítmica de la concentración de metoprolol en el lumen intestinal versus tiempo.

Los valores de pendiente son similares en todas las concentraciones estudiadas, lo que indica que la absorción de metoprolol es independiente de la concentración inicial administrada. Las pendientes que se muestran en la gráfica corresponden a un estimativo de la constante de absorción (k_{app}). Se calcularon las k_{app} no lineales de metoprolol para cada concentración utilizando la herramienta SOLVER de Microsoft Excel. Los resultados se muestran a continuación:

Tabla 6: Constantes de absorción aparente en min^{-1} calculadas a partir de la regresión no lineal.

k_{app} (min-1)	800 µg/mL	400 µg/mL	200 µg/mL	80 µg/mL	
RATA 1	0,043874	0,009762	0,011896	0,006466	
RATA 2	0,016507	0,009315	0,012480	0,019258	
RATA 3	0,020951	0,009989	0,004992	0,020980	
RATA 4	0,014978	0,014663	0,011532	0,006256	
RATA 5	0,019689	0,000369	0,007918	0,009854	
RATA 6	0,012566	0,048855	0,015233	0,013465	
Promedio	0,021427	0,015492	0,010675	0,012713	***0,0151 ± 0,0109***

*En negrita se muestra el promedio ± S de las k_{app}.

A partir de estos valores de k_{app} se calculó el coeficiente de permeabilidad (P_{eff}):

Tabla 7: Coeficiente de permeabilidad de metoprolol tartrato a 800, 400, 200 y 80 µg/mL.

P_{eff} x10^{-5} (cm/s)	800 µg/mL	400 µg/mL	200 µg/mL	80 µg/mL	
RATA 1	6,58	1,46	1,78	0,97	
RATA 2	2,48	1,40	1,87	2,89	
RATA 3	3,14	1,50	0,70	3,15	
RATA 4	2,25	2,20	1,73	0,93	
RATA 5	2,95	0,05	1,19	1,48	
RATA 6	1,88	7,33	2,28	2,02	
Promedio	3,21	2,32	1,60	1,91	***2,26 ± 1,64***

*En negrita se muestra el promedio ± S de las P_{eff}.

Utilizando la herramienta “Análisis de datos” de Microsoft Excel, se realizó el análisis ANOVA para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos para la permeabilidad intestinal de metoprolol. Con un $F_{crítico}$ de 3,10, el $F_{calculado}$ es de 1,11, por lo que se concluye que no hay evidencia que señale que los valores de permeabilidad intestinal obtenidos a distintas concentraciones en las distintas ratas, presenten diferencias significativas.

VIII. DISCUSION

El primer paso de éste trabajo de tesis consistió en la validación de un método analítico en HPLC para cuantificar metoprolol tartrato en el fluido intestinal de rata. Según los datos entregados por la validación, el equipo es capaz de dar una señal lineal en todo el rango de concentraciones estudiadas, pero las concentraciones por sobre los 400 µg/mL entregan valores poco confiables debido al aumento de la asimetría en los picos. Esto pudo producir problemas en la cuantificación de metoprolol en el fluido intestinal de rata en la concentración de 800 µg/mL. A pesar de lo observado en la validación, se realizó el estudio de la concentración de 800 µg/mL, ya que corresponde a la máxima concentración posológica utilizada en humanos, por lo tanto, es importante conocer sus resultados. A pesar de lo anterior, el análisis ANOVA arrojó que los valores de k_{app} y P_{eff} para las cuatro concentraciones no presentan diferencias significativas.

El método validado presenta una exactitud, presión y linealidad aceptables bajo los parámetros establecidos. El estudio de selectividad indica que el método es capaz de diferenciar la señal de metoprolol en presencia de los productos de degradación, a pesar de la disminución de su concentración. Además, se pudo concluir que es posible manipular una solución de metoprolol durante el día sin que se vea afectada por variables cotidianas como la temperatura y la exposición a la luz solar.

La robustez mostró que problemas en la bomba y en el horno durante la utilización rutinaria del método, podrían afectar los resultados y que, por el contrario,

pequeñas fluctuaciones de pH en la preparación del buffer no tendrían una repercusión significativa.

Luego de realizar la validación, se procedió a implementar la técnica de perfusión intestinal utilizando soluciones de metoprolol tartrato. En todas las concentraciones evaluadas se produce una disminución de la concentración en el lumen intestinal en función del tiempo, lo que se ajusta a un modelo de absorción de primer orden aparente. Además, las pendientes son similares en todas las concentraciones, es decir, la constante de absorción no varía con la concentración, por lo tanto, el proceso de absorción es independiente de la dosis inicial administrada, indicativo de un mecanismo de absorción de tipo pasivo.

Según la literatura, el P_{eff} de metoprolol oscila entre 2,0 y 3,3 $*10^{-5}$ cm/s. En la tabla 8 se muestran valores de P_{eff} obtenidos de distintas publicaciones.

Tabla 8: Coeficientes de permeabilidad aparente de metoprolol calculados a partir de estudios de permeabilidad in situ.

P_{eff} $*10^{-5}$ cm/s	Técnica	Referencia
3,3 ± 1,50	Paso simple	24
3,2 ± 0,09	Paso simple	33
2,0 ± 0,40	Paso simple	37
2,7 ± 0,70	Paso simple	38

El P_{eff} obtenido en este trabajo de tesis es 2,3 ± 1,64 $*10^{-5}$ cm/s, por lo que se encuentra dentro del rango de valores obtenidos por otros investigadores en otros estudios publicados.

Es importante destacar que existe una correlación lineal entre los valores de P_{eff} en ratas obtenidos a partir del ensayo in situ y los P_{eff} obtenidos en humanos [24].

El P_{eff} humano es de 6 a 11 veces mayor que el P_{eff} de rata. Debido a ésta correlación es posible predecir la fracción de medicamento que será absorbido (F_a) en humanos. Si P_{eff} es mayor a $5,9*10^{-5}$ cm/s, F_a en humanos será alrededor de 1. Valores de P_{eff} menores a $3,3*10^{-5}$ cm/s indican un F_a menor al 0,6 [24]. Metoprolol es un principio activo de alta permabilidad en humano, pero según el valor de P_{eff} obtenido en este trabajo, su F_a en humanos sería mucho menor a 0,6. Existen diversos factores que pueden afectar el valor de P_{eff} y, por lo tanto la predicción de F_a:

1. Existe variabilidad en la absorción intestinal de las ratas cuando son muy jóvenes o muy viejas [39], en este trabajo se utilizaron ratas de 240 – 270 g de peso, lo que corresponde a edad adulta, por lo que no es un factor que debiese afectar.
2. El ensayo de Doluisio y col fue descrito para ratas Sprague Dawley, pero la mayor parte de los estudios de permeabilidad se realizan en ratas Wistar. Hay estudios que respaldan la intercambiabilidad entre especies, debido a la similitud entre los valores de k_{app} en ambas razas [40], pero, los valores obtenidos en ratas Sprague Dawley son menores que los obtenidos en ratas Wistar.
3. Se sabe que la anestesia puede disminuir la motilidad intestinal y por lo tanto disminuir la absorción. Dentro de los anestésicos, los barbitúricos son los que menor influencia tienen sobre la motilidad intestinal [41], pero en este trabajo no se utilizaron; el anestésico utilizado fue etiluretano, debido a la disponibilidad de reactivos. Si bien etiluretano tiene ventajas como

anestésico (mayor tiempo de duración de la anestesia profunda, menor incidencia de depresión respiratoria y cardíaca [42]), presenta uno de los más grandes problemas en un estudio de permeabilidad: el etiluretano disminuye la motilidad intestinal disminuyendo la absorción [43]. A ésto se le suma el hecho de que la cirugía en sí produce disminución de la irrigación y motilidad intestinal [41-43].

4. La gran mayoría de los datos de permeabilidad disponibles en la literatura son en base al método in situ de paso simple, no por el método del loop intestinal, por lo que es válido pensar que los P_{eff} pudieran variar de una técnica a otra. Lamentablemente no se cuenta con estudios al respecto. El mecanismo por el cual se obtienen las alícuotas del loop podría producir una subestimación de la fracción absorbida, ya que cada 5 minutos la solución es retirada del lumen. Está descrito que la solución debe volver al lumen dentro de los 15-20 segundos siguientes para que no se produzcan interferencias en la absorción [17], pero, tomando en cuenta que el proceso se realiza manualmente y con el cuidado de no dañar el intestino, es difícil cumplir con ese plazo de tiempo. En la técnica de paso simple, la solución fluye por el intestino y desemboca en un contenedor que recolecta la muestra cada cierto tiempo gracias a un proceso de bombeo [16], por lo que la solución perfundida no pierde contacto con la pared intestinal.
5. Variables como las horas de sueño, temperatura, ruido, olores, ambiente, etc, pueden causar estrés, el cual produce cambios fisiológicos afectando los resultados finales, por lo que es de vital importancia mantener a los

animales de experimentación en condiciones saludables, tanto física como psicológicamente. Nuestro laboratorio no cuenta con un bioterio equipado con todas las comodidades necesarias, los tipos de experimentos que se realizan en las instalaciones son muy variados, por lo que el personal también lo es; es por esto que las condiciones ambientales son difícilmente controlados. Debido a lo anterior, las ratas son trasladadas al laboratorio con un mínimo 24 horas antes de realizar cualquier procedimiento, esperando someterlas al menor estrés posible.

6. Por último, la variabilidad biológica es el mayor y mas importante factor a considerar cuando se obtiene y analiza un resultado a partir de un ser vivo. Cada ser es único y responde de manera única a un mismo estímulo.

Se espera que los resultados de este trabajo ayuden a caracterizar la permeabilidad intestinal del estándar metoprolol tartrato en ratas Sprague-Dawley utilizando la técnica del loop intestinal descrita por Doluisio y col y etiluretano al 25%p/p como anestésico (1g/kg de peso). Bajo dichas condiciones se busca definir límites de permeabilidad para clasificar otros medicamentos de absorción pasiva, analizados bajo las mismas condiciones, como de alta o baja permeabilidad. Esta información se pone a disposición de las entidades regulatorias del país para ayudar con las políticas de acreditación de equivalencia terapéutica de los medicamentos similares.

IX. CONCLUSIONES

1. Se validó e implementó satisfactoriamente una metodología analítica para la cuantificación de metoprolol tartrato mediante la técnica de HPLC según las recomendaciones de la USP y el ISP. Dentro de la validación se encuentran definidas las variables críticas a considerar para obtener resultados confiables y reproducibles.
2. Se adaptó con éxito la técnica de perfusión intestinal descrita por Doluisio y col para caracterizar la permeabilidad intestinal de metoprolol tartrato en ratas Sprague-Dawley.
3. Se obtuvo el valor del coeficiente de absorción aparente de metoprolol tartrato a partir de las muestras de fluido intestinal de rata recolectadas y, utilizando las herramientas matemáticas descritas durante éste trabajo se logró calcular el coeficiente de permeabilidad aparente.
4. El valor de coeficiente de permeabilidad aparente para metoprolol tartrato en ratas Sprague Dawley utilizando la técnica de Doluisio y col es de 2,3 $*10^{-5}$ cm/s, el cual se encuentra dentro del rango de valores reportados en la literatura científica.
5. Los resultados de permeabilidad no presentan diferencias significativas en las distintas concentraciones ensayadas, por lo que el principal mecanismo de absorción sería la difusión pasiva.
6. Debido a los datos bibliográficos de solubilidad y permeabilidad de metoprolol tartrato en humanos y a la concordancia de los resultados

obtenidos en éste estudio con los reportados en la literatura, se concluye que metoprolol es un estándar de alta permeabilidad y que el valor de P_{eff} obtenido puede ser utilizado para clasificar otros principios activos según su permeabilidad siempre y cuando dicho principio activo sea estudiado bajo las mismas condiciones utilizadas en éste trabajo.

X. BIBLIOGRAFIA

[1] Ministerio de Salud. 2010. Guía Clínica Hipertensión Arterial Primaria o Esencial en personas de 15 años y más. MINSAL. Santiago. 29-35 pp.

[2] Ministerio de Salud. 2010. Guía Clínica Infarto Agudo del Miocardio con Supradesnivel del Segmento ST. MINSAL. Santiago. 28 pp.

[3] Chen Z.M., Pan H.C., Chen Y.P., Peto R., Collins R., Jiang L.X., Xie J.X., Liu L.S. 2005. COMMIT (Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) collaborative group. Early intravenous then oral metoprolol in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. Lancet. 366(9497):1622-32.

[4] Brunton L.L., Lazo J.S., Parker K.L. 2007. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la Terapéutica. 11º Edición. Ed. Mc Graw Hill. Colombia. 168, 272, 277, 284, 1850 pp.

[5] Grupo de Trabajo de Diagnóstico y Tratamiento de la Insuficiencia Cardíaca Crónica de la Sociedad Europea de Cardiología. 2005. Guías de Práctica Clínica sobre el diagnóstico y tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica. Versión resumida (actualización 2005). Rev Esp Cardiol. 58(9):1062-92.

[6] SEMERGEN. 2008. Documentos Clínicos SEMERGEN: Área Cardiovascular, Hipertensión Arterial. EDICOMPLET. Barcelona. 36 pp.

[7] Florez J. 2003. Farmacología Humana. 4º Edición. Ed. Masson S.A. Barcelona. 35, 50, 286-293 pp.

[8] Grupo de Trabajo sobre Bloqueadores beta de la Sociedad Eurpea de Cardiología. 2005. Documento de Consenso de Expertos sobre Bloqueadores de los receptores beta adrenérgicos. Rev Esp Cardiol. 58(1): 65-90.

[9] Evard D., Vidon N., Godbillon J., Bovet M., Duval M., Schoeller J.P., Bernier J.J., Hirtz J. 1985. Investigation of drug absorption from the gastrointestinal tract of man. IV. Influence of food and digestive secretions on metoprolol jejunal absorption. J. Clin. Pharm. 19: 119S-125S.

[10] Doménech J., Alba M., Morera J.M., Obach R., Plá Delfina J.M. 1985. Gastric, intestinal and colonic absorption of metoprolol in the rat. J. Clin. Pharm. 19: 85S-89S.

[11] Jobin G., Cortot A., Godbillon J., Duval M., Schoeller J.P., Hirtz J. and Bernier J.J. 1985. Investigation of drug absorption from the gastrointestinal tract of man. I. Metoprolol in the stocach, duodenum and jejunum. J. Clin. Pharm. 19: 97S-105S.

[12] H. Lennernas. 1998. Human intestinal permeability. J Pharm Sci, 87:403-410.

[13] Moffar, Osselton and Widdop. 2004. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 3rd Edition. Volume 2. Pharmaceutical Press. Great Britain. 1275-1276 pp.

[14] MINSAL. 2013. Disponible en: http://200.68.11.21/RegistrosISP/fiMenu.asp [Visitada en 21-03-2013].

[15] Herrera D., Hernández E., Espinoza J.C., de la Luz I., Beltrán A., Martínez J.M. 2012. Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos. Rev Mex Cienc Farm. 43(1):18-32.

[16] Marano C., Reinoso M., Lufrano P. 1991. Absorción de Fármacos. Modelos in vitro e in situ. Acta Farm Bonaer. 10(1):37-48.

[17] 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(10):1196-1200.

[18] ISP. 2007. Guía Técnica G-BIOF02: Bioexención de los estudios de Biodisponibilidad/ Bioequivalencia para establecer Equivalencia Terapéutica de Formas Farmacéuticas Solidas Orales. MINSAL. Chile. 6, 9, 12, 13, 23 pp.

[19] FDA. 2010. Guidance for industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms based on Biopharmaceutics Classification System. US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, USA.

[20] Bermejo M., Amidon G. 2005. Bioequivalencia In Vitro. ¿Porqué, cuando y cómo? Aplicación del BCS (Sistema de Clasificación Biofarmacéutico). En: Primer Encuentro Iberolatinoamericano de Academias de Farmacia. Valparaíso, Chile.

[21] Yasdanian N., Briggs K., Jankosky C., Hawi A. 2004. The "High Solubility" definition on the current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System may be too strict for acidic drugs. Pharml Res, 21(2): 293-299.

[22] Le Cluyse E., Sutton, S. 1997. In vitro models for selection of development candidates. Permeability Studies to defined mechanisms of absorption enhancement. Adv. Drug Del. Rev., 23:163-183.

[23] Amidon, G. L., Lennernäs H., Shah V. P., Crison J. R. 1995. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutics Drug Classification: The Correlation of In Vitro Drug Product Dissolution and In Vivo Bioavailability. Pharm Res. 12 (3): 413-420.

[24] Zakeri-Milani P., Valizadeha H., Tajerzadeh H., Azarmia Y., Islambolchilara Z., Barzegara S., Barzegar-Jalali M. 2007. Predicting Human Instestinal Permeability usin Single-pass Intestinal Perfusion in rat. J.Pharm.Pharmaceut.Sci. 10(3):368-379.

[25] Nagare N., Damre A., Singh K.S., Mallurwar S.R., Iyer S., Naik A., Chintamaneni M. 2010. Determination of site of absorption of propanolol in rat gut using in situ single.pass intestinal perfusion. Indian J Pharm Sci. 72(5): 625–629.

[26] Vidon N., Evard D., Godbillon J., Rongier M., Duval M., Schoeller J.P., Bernier J.J., Hirtz J. 1985. Investigation of drug absorption from the gastrointestinal tract of man. II. Metoprolol in the jejunum and ileum. Br. J. Clin. Pharmac. 19:107S-112S.

[27] Skoog D., Holler F., Nieman T. 2005. Principios de Análisis Instrumental. Quinta Edición. Mc Graw Hill. España. 730-755, 785-828 pp.

[28] Kupiec T. 2004. Quality-Control Analytical Methods: High-Performance Liquid Chromatography. Int J of Pharm Comp, 8(3):223-227.

[29] Quattrocchi O, de Andrizzi S, Losa R. 1992. Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica. ArtesGráficasFarro S.A. Argentina. 301-327 pp.

[30] ISP. 2010. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos”. Santiago, Chile. 27-48 pp.

[31] USP XXXV. The United States Pharmacopeia Convention. 2012. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Formulario Nacional. USP35 NF30. Validación de procedimientos Farmacopéicos. Estados Unidos. 967-972 pp.

[32] Valcárcel M., Ríos A. 1992. La calidad en los laboratorios analíticos. Editorial REVERTÉ, S.A. Barcelona. 168-171 pp.

[33] Zakeri-Milani P., Valizadeh H., Azarmi Y., Barzegar-Jalali M., Tajerzadeh H. 2006. Simultaneous Determination of Metoprolol, Propanolol and Phenol Red in samples from Rat In Situ Intestinal Perfusion Studies. DARU. 14(2):102-108.

[34] Pappa H., Escobar M., Concha J. 2013. Curso conjunto U.S. Pharmacopeial Convention-Farmacopea Chilena: Validación de Métodos Analíticos. Valparaíso, Chile.

[35] National Academy Press, 2010. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. National Research Council. Washington, D.C.

[36] Rodriguez-Ibañez B., Sánchez-Castaño G., Montalar-Montero M., Garrigues T.M., Bermejo M., Merino V. 2006. Mathematical modelling of in situ and in vitro efflux of ciprofloxacin and grepafloxacin. Int.J.Pharm. 307:33-41.

[37] Kim J.S., Mitchell S., Kijek P., Tsume Y., Hilfinger J., Amidon G.L. 2006. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: utility for BCS Class I biowaiver requests. Mol Pharm. 3 (6): 686-694.

[38] Wahajuddin, Singh S.P., Raju KSR., Nafis A., Jain G.K. 2012. Simultaneous Determination of Nine Model Compounds in Permeability Samples using RP-HPLC: Application to Prove the Cassette Administration Principle in Single Pass Intestinal Perfusion Study in Rats. J of Pharm Biomed Anal. 67-68, 71-76.

[39] Lindahl A., Krondhal E., Gruden A., Ungel A., Lennernas H.1997. Is the jejunal permeability in rats age-dependent?. Pharm Res. 14:1278-1281.

[40] Oltra D.M. 2010. Tesis Doctoral: Estudio de la variabilidad de la permeabilidad intestinal de fármacos. Estudio in vitro e in situ. Departamento de Farmacia y Tecnología farmacéutica, Universidad de Valencia. Servei de Publicacions. España.

[41] Yuasa H., Matsuda K., Watanabe J. 1993. Influence of anaesthetics regimens on intestinal absorption in rats. Pharm Res. 10:884-888.

[42] Kushawaha S., Malpani A., Aswar U.M., Bodhankar S.L., Malpani A., Shivakumar S. 2011. Effect of different anaesthetic agents on cardiovascular parameters in male Wistar rats. RJPBCS. (2)2:685-690.

[43] Yuasa H., Watanabe J. 1994. Influence of urethane anesthesia and abdominal surgery on gastrointestinal motility in rats. Biol Pharm Bull. 17(9):1309-12.