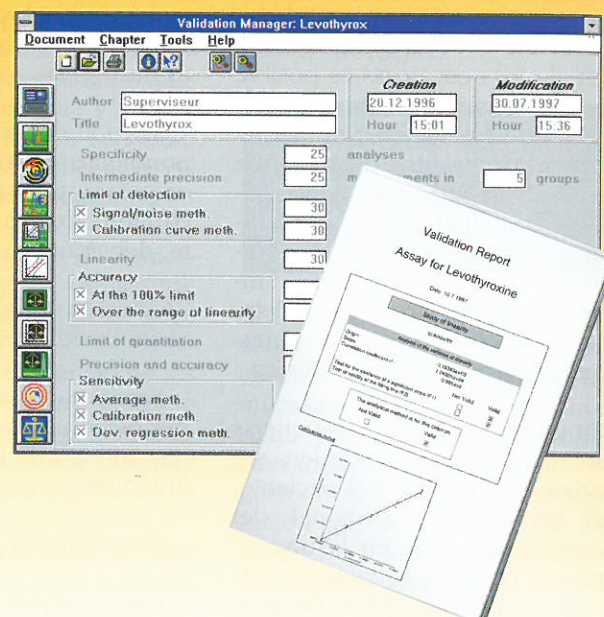


Ahorre tiempo con LaChrom® Validation Manager

El primer software Certificado para Validaciones

Ref. 47

- Cálculos según recomendaciones de la ICH
- Formatos de informes internacionalmente reconocidos
- Entrada de datos manual o automática
- Flexibilidad total en la elección de métodos estadísticos
- Exportación de informes a procesadores de texto.



MERCK División LAB. Tel. 93 565 55 00 - Fax 93 544 02 87

Diseño experimental I: concepto, aplicaciones y metodología

C. Sánchez-Lafuente López, A.M^a Rabasco Alvarez, J. Alvarez-Fuentes y M. Fernández-Arévalo
Dpto. de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.
Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla

1. Introducción

La biofarmacia y farmacocinética y la tecnología farmacéutica se interrelacionan en sus contenidos, de manera que ambas se condicionan mutuamente. Esto se demuestra en que los procesos tecnológicos implicados en la producción del medicamento se seleccionan en función del comportamiento biofarmacéutico requerido por parte de éste, así como por las características farmacocinéticas que posea el principio activo, y viceversa. Y todo ello orientado hacia la consecución de una respuesta terapéutica que debe ser la óptima para el caso planteado.

Centrándonos en la respuesta terapéutica y considerando sólo parámetros tecnológicos, existe un elevado número de factores que la condicionan, normalmente demasiados. Por ello, la puesta a punto de los medicamentos es costosa en términos de tiempo, mano de obra y recursos [1]. Debido a esto, cada vez es más frecuente recurrir a técnicas de optimización estadística para, detectando y evaluando los factores más críticos, intentar reducir el número de experiencias para obtener la información deseada. Y es que, tanto en la industria farmacéutica como en cualquier ámbito en el que nos movamos, el balance tiempo / trabajo / gasto / resultados es fundamental.

Una de estas técnicas estadísticas más útiles es el diseño experimental.

2. Definición, objetivos y aplicaciones del diseño experimental

Como se ha comentado, el acercamiento clásico a la planificación de experimentos requiere mucho tiempo y esfuerzo y, en aquellos casos en donde pueda aparecer el factor interacciones, es, con mucho, inaplicable. El camino más eficaz para intensificar el resultado que buscamos y reducir el tiempo en el proceso de obtención de resultados es a través del diseño experimental.

Se puede definir el Diseño Experimental como la estrategia para establecer el menor número de experimentos de tal manera que la información requerida se obtenga del modo más eficaz y preciso posible, llevando a cabo eficazmente la experimentación necesaria [10].

El diseño experimental es un método que aplica las matemáticas y la estadística para, [13]:

A) Obtener la máxima información a través de datos experimentales. En aquellos casos en donde los objetivos no sean cuantificables, es decir, que no puedan ser expresados por un número, se trata de predecirlos suponiendo que exista relación con alguna observación experimental que sí se pueda medir y cuantificar.

B) Encontrar las condiciones

La experimentación se puede definir como aquella investigación que, llevada a cabo teniendo presente un objetivo firme y concreto, hace uso de las herramientas adecuadas, permitiendo obtener conclusiones a partir de datos experimentales previamente obtenidos. Es vital en el diseño experimental el planteamiento de un objetivo y de unas variables a estudiar.

FABRICACIÓN • ENVASADO ACONDICIONADO PARA TERCEROS

- Lab. Farmacéutico Plantas Medicinales
- Lab. Dietético
- Envasador Polivalente
- Envasador Prod. Biológicos
- Lab. Cosmético
- Lab. Dentífricos

Ref. 48



HUMEDAD 35%
(Preinstalación 10%)
TEMP. 22°C
FILTRO ABSOLUTO
PRESURIZADO



Mercurio, 10 - Pol. Ind. Almeda
08940 CORNELLÀ DE LLOB. (Barcelona)
Tel.: +(34) 934 744 096 - Fax: +(34) 934 744 787
E-mail: sincrofarm@smc.es
Web: http://www.sincrofarm.com

más óptimas para la ejecución de un determinado proceso experimental, es decir, optimizar. Optimizar significa encontrar el mejor valor posible de una variable dependiente, mediante la variación de diversas variables independientes [6].

De este modo se puede afirmar, de forma más concreta, que el objetivo del diseño experimental es obtener un resultado establecido previa la optimización del proceso y la consecución del menor número de experiencias posibles. Se cuenta para ello con un plan detallado de una serie de experimentos convenientemente organizados, de modo que el resultado observado en estas experiencias proporcione la información deseada; dicho de otro modo, el diseño experimental permite encontrar de la manera más eficaz posible la respuesta a la cuestión previamente planteada [4].

El diseño experimental es utilizado ampliamente en muchos campos, como pueden ser la química, la farmacología, la medicina, e incluso la psicología y el estudio del comportamiento. En estos campos tan diversos el esquema que se plantea es parecido, aunque lógicamente tanto los objetivos como las variables y las respuestas son distintas.

Centrándonos en el ámbito farmacéutico, el diseño experimental ha resultado ser una herramienta útil en muchos procesos. A continuación se nombran algunos ejemplos:

- Caracterización y optimización de formulaciones, sobre todo cuando existe limitación en la cantidad del material a utilizar y se pretende reducir el número de experiencias [16].

- Estudios de compatibilidad de excipientes en trabajos de preformulación analizando los productos de degradación del principio activo en estudio en varias formulaciones elaboradas con los excipientes que se están evaluando, para comprobar

la existencia o no de interacciones [9].

- A través de perfiles de disolución, observar la influencia de distintos recubrimientos en gránulos variando los componentes de dichos recubrimientos, los porcentajes en peso y la cantidad de laca aplicada en la superficie de los gránulos [2].

- Estimación de porcentajes de liberación de principios activos a partir de comprimidos elaborados con excipientes modificados [7].

- Puesta a punto de una formulación. Estas son, por definición, mezclas de distintos componentes, por lo que el diseño experimental permite investigar la influencia de, por ejemplo, las diferentes proporciones de los componentes [12, 15]; distintas composiciones en la mezcla de excipientes [3, 15]; diferentes fracciones granulométricas [15]; o en el caso de la forma farmacéutica comprimido, distintas fuerzas de compresión [15].

- Optimización de una formulación de liposomas con problemas de inestabilidad a causa de diferentes factores, donde las respuestas elegidas son el grado de estabilidad y el porcentaje de atrapamiento en los liposomas [11].

- Mejorar las características reológicas y farmacotécnicas de una formulación estudiando la influencia de determinados excipientes en diversos tests de preformulación [14].

- Validación de un ensayo de disolución evaluando posibles factores que influyen en la disolución "in vitro" de cualquier sustancia; en este estudio en concreto, se trata de comprimidos del antihipertensivo felodipina [8].

La aplicación del diseño experimental se ve facilitada, y en algunos casos es posible, gracias a la informática y a diferentes programas de ordenador. Algunos de los programas más utilizados

en el diseño experimental son: NEMROD, STATGRAPHICS, MATLAB, MSFIT, JMP (en distintas versiones).

3. Modelos matemáticos

En la aplicación del diseño experimental, para poder llevarlo a cabo es necesario hacer uso de modelos matemáticos. Con estos modelos se pretende encontrar una función que relacione, de la mejor manera posible, las diferentes variables implicadas en un proceso (x_i) con una respuesta deseada (y), e incluso determinar las posibles interacciones, si es que las hubiera, entre dichas variables. Dichos modelos llegan a establecer cuáles de las variables estudiadas tienen una influencia verdadera en el valor del resultado buscado. Esta función debe ser hipotetizada por el investigador antes de poner en práctica un diseño. Una expresión general de esta función puede ser:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_i)$$

3.1. Elección del modelo matemático

Como se ha indicado, en primer lugar, el investigador debe formular una hipótesis para al final deducir una ecuación matemática general que describa la relación entre aquellos factores considerados como variables del proceso en estudio.

Existen distintos tipos de modelos matemáticos dependiendo de:

- La naturaleza de la planificación experimental.
- El tipo y el número de experimentos a realizar.
- La clase de información obtenida.

Estos modelos, capaces de explicar la relación entre variables y respuestas, son polinomios de variables codificadas, normalizadas, representando factores que están transformados en la mis-

ma escala y con coeficientes constantes [10]. Pueden ser:

3.1.1. MODELO LINEAL SIN INTERACCION

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_i x_i + \epsilon$$

Siendo:

β : coeficiente del modelo.

ϵ : error experimental.

x_i : nivel codificado de las variables independientes.

3.1.2. MODELO LINEAL CON INTERACCION

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_i x_i + \beta_{12} x_1 x_2 + \dots + \beta_{1i} x_1 x_i + \beta_{23} x_2 x_3 + \dots + \beta_{2i} x_2 x_i + \dots + \beta_{ji} x_j x_i + \epsilon$$

El término $\beta_{ji} x_j x_i$ se usa cuando se prevé interacción entre variables (x_j, x_i) siendo el coeficiente de dicha interacción β_{ji} .

3.1.3. MODELO LINEAL CON TERMINOS CUADRATICOS

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_i x_i + \beta_{12} x_1 x_2 + \dots + \beta_{1i} x_1 x_i + \beta_{11} x_1^2 + \dots + \beta_{ii} x_i^2 + \epsilon$$

El término que proporciona, en este caso, un efecto cuadrático es $\beta_{ii} x_i^2$. Este exponente da a la variable x_i un mayor efecto y una mayor influencia en la respuesta en evaluación. Es representativo de la curvatura a lo largo del eje coordinado asociado a la variable concreta.

Lo normal es empezar con el modelo más sencillo, el lineal sin interacciones. Si éste no satisface debe pasarse al modelo lineal con interacciones, y así sucesivamente aumentando el grado de complicación hasta encontrar el modelo más adecuado. La idoneidad viene indicada por la calidad del ajuste del modelo elegido a los datos obtenidos experimentalmente.

3.2. Estimación de los coeficientes del modelo

Una vez hipotetizado el modelo

es necesario estimar los coeficientes β presentes en la ecuación del modelo. Esta estimación se obtiene por medio del análisis de regresión multivariable a partir de una respuesta obtenida en los experimentos previstos en una matriz experimental, consistente en una representación codificada del experimento. A partir de esta matriz experimental se obtendrá la matriz del modelo. Tanto la matriz experimental como la matriz del modelo usan valores codificados de las variables a fin de superar el problema de unidades de medidas diversas. Para estimar β también se emplea la matriz inversa de la matriz del modelo.

Para efectuar esta estimación de coeficientes se utiliza, principalmente, la siguiente ecuación [10]:

$$b_i = (X' \cdot X)^{-1} \cdot X' \cdot y_i$$

Siendo, $b_i = \beta_i + \epsilon$

X : Matriz del modelo.

X' : Matriz inversa de la matriz del modelo.

y_i : Vector respuesta experimental.

$(X' \cdot X)$: Matriz de información.

$(X' \cdot X)^{-1}$: Matriz de dispersión.

La estimación de b y, por tanto del coeficiente del modelo β , es muy importante, ya que es la expresión del efecto que cada variable tiene individualmente en la respuesta, o bien la interacción entre variables, o incluso el efecto cuadrático de la variable. Para calcular la significación estadística del efecto de la variable, y comprobar así si verdaderamente influye en la respuesta, descartando de esta manera que el valor obtenido sea debido simplemente al error experimental [5], se emplea el test estadístico de la t-Student, que compara respuestas medidas experimentalmente con las respuestas que da el modelo.

El valor absoluto de b representa el peso que la variable, o combinación de variables, o el efecto cuadrático de una varia-

ble, según corresponda, tiene sobre la respuesta. Un coeficiente es significativo si su valor es mayor que el valor crítico tabulado en función de unos grados de libertad (n° experimentos - n° coeficientes estimados) y de una probabilidad fija (normalmente del 95%). Como cada coeficiente b_i representa a una variable X_i , si dicho coeficiente resulta significativo se traduce en que dicha variable ejerce una influencia significativa en el efecto o respuesta y_i en estudio.

El signo de b_i (+, -) indica la zona del dominio experimental a estudiar, es decir, el intervalo de valores que la variable X_i puede asumir.

En un diseño con dos niveles se habla de nivel bajo y nivel alto para indicar respectivamente el valor más pequeño y el valor más alto que la variable puede asumir. Convencionalmente, el nivel bajo se codifica con -1 y el nivel alto con +1, y si existiera un nivel intermedio entre los dos (nivel central), se identificaría con 0.

El signo de los coeficientes es importante ya que en función de si interesa maximizar o minimizar la respuesta se tendrán que obtener en la ecuación del modelo todos los términos positivos o negativos, respectivamente. Por ejemplo, si interesa maximizar la respuesta, es decir, si interesa obtener el máximo valor posible de una respuesta, el producto del signo del coeficiente por el signo del valor codificado de la variable deberá ser positivo (valor máximo), es decir, si el coeficiente resulta positivo, la variable debe adoptar el nivel alto (+1) (+ · + = +) y, si por el contrario el coeficiente resulta negativo, para que la respuesta siga siendo máxima, la zona del dominio experimental que la variable debe adoptar será el nivel bajo (-1) (- · - = +).

3.3. Ajuste del modelo

Para poder aplicar el modelo ma-

temático elegido, éste debe ajustarse lo más posible a los datos. Ese ajuste viene dado por [12]:

- r^2 o el equivalente decimal del porcentaje de variación de la respuesta que se explica por el modelo elegido y no por el error experimental. El ajuste máximo se traduce con un valor de 1.

- Validación. La validación consta de tres fases:

• Fase de predicción: en esta etapa se predice una respuesta teórica sustituyendo en la ecuación del modelo elegido un valor de variable optimizada según una respuesta deseable. Es, por tanto, la fase teórica de la validación.

• Fase de validación: implica la realización del experimento utilizando las condiciones óptimas y cuyo fin es la obtención de una respuesta. Es la fase experimental.

• Finalmente se establece la relación entre respuesta obtenida y respuesta prevista en función de la variable optimizada, y se comparan. El modelo se considera válido si el cociente entre la respuesta prevista y la respuesta obtenida en un día concreto es igual o más pequeño que el cociente entre respuestas obtenidas en días distintos.

4. Planificación de las experiencias

La planificación de experimentos se verá limitada y definida por tres factores:

- Número de coeficientes beta (β).
- Número de variables en estudio (X).
- Complicación del modelo matemático.

Teniendo en cuenta esas premisas se puede plantear como estrategia experimental óptima aquella con la que se consiga [13]:

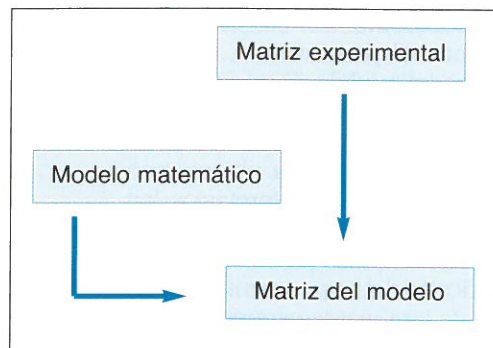


Figura 1. Representación esquemática de la relación entre matriz experimental y matriz del modelo

1. Obtener la respuesta buscada y deseada mediante los coeficientes b del modelo.

2. Que cada coeficiente represente una variable (b_i representa x_i) con la mejor calidad posible.

3. Efectuar el menor número posible de experimentos.

A modo de resumen, en la planificación de las experiencias, se comienza con un modelo lineal sin interacciones que, aún teniendo un elevado número de variables, permite el menor número de experimentos. Así se valora la influencia ejercida por cada variable y se determina el dominio experimental de cada una de ellas.

Caso de que este modelo lineal sin interacciones no satisfaga ni resuelva la situación concreta se postularían modelos más complicados.

5. Matrices

En párrafos anteriores ha aparecido ya el término "Matriz". Se trata de una tabla constituida por m filas y n columnas donde están representados los datos. Al ser una ordenación de elementos puede, sin ningún problema, representar un diseño experimental [10]. Se diferencia la matriz experimental de la matriz del modelo en lo siguiente:

a) En la matriz experimental los datos que se representan son los que corresponden a las experiencias que se van a realizar,

siendo m (n° filas) el número de experimentos y n (n° columnas) el número de variables. Es, pues, una representación codificada de las condiciones bajo las cuales se deben llevar a cabo los experimentos.

b) En la matriz del modelo, las filas siguen representando los experimentos, pero las columnas representan los términos presentes en la ecuación del modelo.

La figura 1 muestra la explicación esquemática de cómo Vojnovic y cols. representan esta diferencia [16].

En el caso de un modelo lineal sin interacciones, la matriz del modelo difiere de la matriz experimental únicamente en una columna relativa al término denominado b_0 la cual está constituida sólo por términos positivos (+1).

Si se trata de un modelo con interacciones, a la matriz experimental se le añaden tantas columnas como número de interacciones existan en el modelo. Ese número de interacciones se obtiene multiplicando entre sí las columnas relativas a las variables de las que se desea conocer la interacción.

Así, en definitiva, el tipo de matriz experimental e incluso el tipo y el número de experimentos a efectuar, depende en particular del número de coeficientes β a estimar, que a su vez está ligado al número de variables en estudio y al tipo de modelo matemático hipotetizado.

6. Representaciones gráficas

La representación gráfica de la ecuación del modelo puede ser un instrumento útil y una ayuda visual importante y, para las técnicas de estudio superficie-respuesta, es algo indispensable.

Se pueden obtener gráficas de

superficie - respuesta a partir de un escaso número de experimentos, pero bien diseñados y dirigidos. Para expresar gráficamente la ecuación del modelo se pueden emplear las siguientes representaciones [13].

6.1. Curvas superficie-respuesta

Se trata de la representación en el espacio de las variaciones de la respuesta buscada y deseada en función de los valores de las variables. Es una representación tridimensional con lo que, con la adecuada combinación de valores de las variables, se puede obtener la mejor respuesta posible. Así, si se quiere maximizar la respuesta se busca la zona del gráfico en donde exista la máxima superficie de respuesta; si por el contrario interesa minimizar, se seleccionaría la combinación de variables que proporcione la mínima superficie de respuesta.

6.2. Superficies de ISO- respuesta

Es la representación a modo de líneas concéntricas a lo largo de las cuales la respuesta se mantiene constante. Esta representación es bidimensional.

7. Resumen

Finalmente, en este apartado, se trata de simplificar y esquematizar todo el concepto de diseño experimental. Los pasos a seguir para diseñar la matriz experimental de un estudio son:

Buscar y hacer uso de toda la información disponible referente al tema a tratar:

- Bibliografía.
- Conocimientos anteriores.

Definición del problema planteado en el estudio:

- Naturaleza y número de variables o factores implicados.

- Dominio experimental.
- Naturaleza y número de las respuestas experimentales.

Elección del modelo:

- Matriz del modelo: X
- Matriz de información: (debe tener un valor máximo): $X' \cdot X$
- Matriz de dispersión: (debe adoptar un valor mínimo): $(X' \cdot X)^{-1}$

Elección de la matriz experimental:

- Realización de los experimentos.
- Resultados experimentales:

- Cálculo de los coeficientes b con la expresión: $b_i = (X' \cdot X)^{-1} \cdot X' \cdot y_i$
- Aplicación de tests estadísticos para estimar la significación.

8. Bibliografía

[1] Armstrong, N.A. y James, K.C. "Understanding experimental design and interpretation in pharmaceuticals". Ed. Ellis Horwood, Pharmaceutical Technology. New York (1991).

[2] Bodea, A. y Leucuta, S.E. "Optimization of Propranolol Hydrochloride sustained-release pellets using Box-Behnken design and desirability function". Drug Dev. Ind. Pharm., 24, (2), 145-155 (1998).

[3] Campisi, B.; Chicco, D.; Vojnovic, D. y Phan-Tan-Luu, R. "Experimental design for a pharmaceutical formulation: optimisation and robustness". J. Pharm. Biomed. Anal., 18, 57-65 (1998).

[4] Carlson, R. "Design and optimization in organic synthesis". Data Handling in Science and Technology, nº 8. Ed. Elsevier, Amsterdam, pág. 75-88 (1992).

[5] Cirunay, J.J.N.; y Plaizier-Vercammen, J.A. "Evaluation of Xylitab 200, a new filler/binder for direct compression, using Factorial Design". Drug Dev. Ind. Pharm., 23, (4), 363-368 (1997a).

[6] Cirunay, J.J.N. y Plaizier-Vercammen, J.A.: "Optimization of a new filler/binder for direct compression using Central Composite Design". Drug Dev. Ind. Pharm., 23, (10), 945-950 (1997b).

[7] Fernández-Arévalo, M.; Holgado, M.A.; Ginés, J.M. y Rabasco, A.M. "Using multivariable functions to predict the dissolution of tablets prepared using modified excipients". Pharm. Techn. Int., 4, (8), 24, 28-30, 32-34 (1992).

[8] Gottfries, J.; Ahlbom, J.; Harang, V.; Johansson, E.; Josefson, M.; Morsing, T.; Pettersson, A. y Torstensson, A. "Validation of an extended release tablet dissolution testing system using design and multivariate analysis". Int. J. Pharm., 106, 141-148 (1994).

[9] Leuenberger, H.; y Becher, W. "A factorial design for compatibility studies in preformulation work". Pharm. Acta Helv., 50, (4), 88-91 (1975).

[10] Lewis, G.A.; Mathieu, D.; y Phan-Tan-Luu, R. "Pharmaceutical Experimental Design". Ed. Marcel Dekker, Inc. New York (1999).

[11] Loukas, Y.L. "A computer-based expert system designs and analyzes a $2^{(k-p)}$ fractional factorial design for the formulation optimization of a novel multicomponent liposomes". J. Pharm. Biomed. Anal., 17, 133-140 (1998).

[12] Marti-Mestres, G.; Nielloud, F.; Marti, R. y Maillols, H. "Optimization with experimental design of nonionic, anionic, and amphoteric surfactants in a mixed system". Drug Dev. Ind. Pharm., 23, (10), 993-998 (1997).

[13] Orlandini, S. "Metodologie di disegno sperimentale nello sviluppo e nella convalida di un metodo polarografico per la determinazione dell'acido chinolinico nel plasma e nelle urine dopo estrazione in fase solida". Tesi di Laurea, Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Facoltà di Farmacia, Università degli studi di Firenze. Anno Accademico (1996-1997).

[14] Renoux, R.; Demazieres, J.A.; Cardot, J.M.; Aiache, J.M. "Experimentally designed optimization of direct compression tablets". Drug Dev. Ind. Pharm., 22, (2), 103-109 (1996).

[15] Sánchez-Lafuente, C.; Faucci, M.T.; Furlanetto, S.; Fernández-Arévalo, M.; Alvarez-Fuentes, J.; Rabasco, A.M. y Mura, P. "Application of Experimental Design for optimization of didanosine controlled-release matrix tablets". Acta Techn. Legis Medic., X, (2) Drug Delivery for the Third Millennium, Pisa, pág. 120, 10-12 octubre (1999).

[16] Vojnovic, D.; Moneghini, M. y Rubessa, F. "Experimental design for a granulation process with a priori criterias". Drug Dev. Ind. Pharm., 21, (7), 823-831 (1995).