



Diseño experimental II: estrategias

Aplicación práctica

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

1. Planteamiento de un diseño experimental

El trabajo experimental de un proyecto, visto desde el punto de vista del Diseño Experimental, debe ser llevado a cabo siguiendo, de manera secuencial, las siguientes etapas [4]:

1.1. Screening

Palabra anglosajona derivada del verbo *to screen*, que significa seleccionar, de entre los factores que puedan influir en el fenómeno estudiado, aquellos que tengan un efecto real, una influencia que se distinga, sin lugar a dudas, del ruido de fondo. Para abordar un trabajo, éste se puede hacer desde muy diversos puntos de vista. Lo normal, cuando un problema es desconocido, es empezar estudiando la posible influencia de distintas variables en un proceso (*screening*). Con las llamadas matrices de *screening* se estudian *k* variables en un número determinado de experimentos, comparándose los efectos de dichas variables sobre la respuesta en estudio. Este método permite identificar variables activas, por lo que es un estudio cualitativo. Los diseños o matrices que se pueden emplear en esta etapa inicial aparecen recogidos en la Tabla I.

1.2. Estudio cuantitativo de los efectos

Una vez determinadas las variables que ejercen influencia con significación estadística, se continúa cuantificando estas influencias, considerando las variables tanto de modo individual como interaccionando entre ellas. Los diseños que hacen posible este estudio se muestran en la Tabla I.

1.3. Estudio superficie - respuesta

Una forma de continuar con el diseño experimental y estadístico de experimentos, cuando ya son conocidos los factores influyentes en un proceso concreto, es optimizar la respuesta considerando sólo esos factores influyentes y manteniendo constantes otros factores en sus valores óptimos para nuestra respuesta, o manteniéndolos constantes por no tener una influencia significativa en el estudio. Esto se puede hacer mediante el estudio gráfico de la respuesta, es decir, mediante el estudio superficie - respuesta.

Cuando se desarrolla una formulación o un proceso, a lo que se quiere llegar es a entender lo más posible, bajo el dominio experimental, los efectos de posibles modificaciones [4]. El obje-

LABORATORIOS MAGRIÑA, S.L.



Cosmética de Tratamiento para Terceros

- Investigación y desarrollo de fórmulas (propias o del cliente).
- Fabricación y envasado.
- Control de calidad.
- Comunicación a Sanidad.
- Asesoramiento publicitario.



Pereda, 1-7 - Telf.: 93 462 15 35 - Fax: 93 462 22 03
08930 ST. ADRIA DEL BESOS (Barcelona)

Para más información señalar en la última página de la revista 49

Chromolith
columns

Para más información señalar en la última página de la revista

50

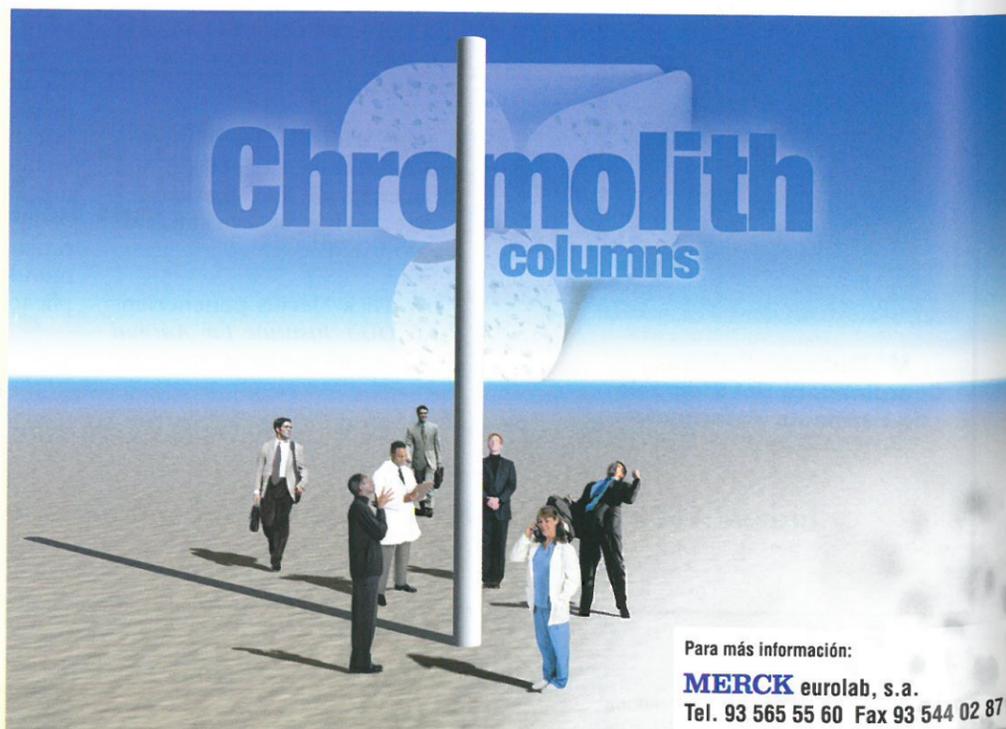
Chromolith™

Descubra los secretos de una nueva era en cromatografía

Se inaugura una nueva era en HPLC con la introducción de las varillas monolíticas de sílice, Chromolith™ de Merck. Esta tecnología innovadora permite:

- ✓ Enormes ahorros de tiempo
- ✓ Eficacia de separación extra

Chromolith™ Speed ROD y Chromolith™ Performace son las primeras columnas de una nueva generación fabricada con la nueva tecnología de monolitos porosos. Ideales en aplicaciones que requieran altas velocidades de análisis, como las empleadas en entornos de investigación y desarrollo de métodos, aumentan significativamente la productividad del laboratorio más allá de lo posible con las columnas convencionales. Con similar selectividad a la exhibida por la sílice tradicional, la transferencia directa de los métodos existentes está asegurada.



Para más información:

MERCK eurolab, s.a.
Tel. 93 565 55 60 Fax 93 544 02 87

Como se indicó en el primer trabajo sobre el diseño experimental, publicado en INDUSTRIA FARMACEUTICA noviembre/diciembre 00, ("Diseño Experimental I: concepto, aplicaciones y metodología"), éste se puede definir como la estrategia a seguir para diseñar experimentos de manera que la información deseada se obtenga con la mayor eficacia y precisión, mediante el desarrollo del menor número posible de experiencias. Las estrategias a plantear son muy variadas, en función del tipo de estudio que se deba llevar a cabo. Así, por ejemplo, en una primera fase de screening se hará uso de un determinado diseño o matriz, como podría ser un diseño factorial fraccionado, distinto del que se utilizaría en una fase más avanzada de optimización de un proceso o formulación, donde se podría emplear un Diseño de Doehlert. Por eso, en este trabajo se hace una recopilación de los distintos diseños y matrices que se pueden utilizar y en qué casos son más adecuados. Además se incluye una aplicación práctica en un caso concreto.

tivo de esta metodología superficie - respuesta es obtener modelos predictivos para usarlos en procesos de optimización y validación. La Tabla I muestra una pequeña clasificación.

Estos métodos predicen respuestas dentro de un dominio experimental, contemplando las variables y sus respectivos niveles y el modelo matemático estudiado. Una función de *desiderability* mediante la cual se obtienen las condiciones a las que someter un proceso para conseguir una respuesta deseada. Fijando unos máximos y unos mínimos en los niveles de las variables se obtiene la combinación mejor de variables para una respuesta dada.

Un objetivo adicional podría ser encontrar las condiciones con las que el resultado del proceso (el producto) sea insensible a las variaciones del proceso, es decir, que el proceso sea "robusto" [4]. Por ejemplo, una formulación robusta es aquella que es insensible a variaciones "normales" en el proceso de elaboración [6].

1.4. Optimización

Una vez llegados a esta etapa, se pretende encontrar las mejores condiciones (condiciones ópti-

mas) para un proceso determinado. Es decir, se pretende llegar a saber los niveles más adecuados que debe adoptar cada variable estudiada para obtener la respuesta deseada. Estos estudios se hacen siguiendo una metodología de análisis gráfico de una respuesta, por lo que los diseños o matrices se corresponden con los de estudio superficie-respuesta mostrados en la Tabla I. El diseño experimental ha sido ampliamente utilizado en la optimización de diferentes procesos [9].

1.5. Validación

Finalmente esta última etapa permite establecer la relación existente entre la respuesta experimentalmente obtenida y la respuesta prevista según el modelo empleado, en función de la variable optimizada, y comparar. De este modo se podrá hacer uso del método o proceso validado sin tener que emplear cada vez la experimentación. Los diseños son los mismos que para la etapa estudio superficie-respuesta de la Tabla I.

2. Diseño de matrices

Como se indica en el apartado anterior, en la Tabla I se muestra una pequeña clasificación

Tabla I. Diseños clasificados en función de su uso

Uso	Diseños	
Screening	- Diseño Factorial Fraccionado - Matriz de Hadamard o de Plackett-Burman - Matriz 3/4 - Diseño D-Optimal	
Estudio cuantitativo de las variables	- Diseño Factorial Saturado - Diseño Factorial Fraccionado - Matriz 3/4	
Estudio superficie-respuesta	de 1 ^{er} orden	- Diseño Factorial Fraccionado a dos niveles - Matriz de Hadamard o de Plackett-Burman - Método Simplex
	de 2 ^o orden	- Central Composite Design - Diseño de Doehlert - Diseño de Box-Behnken

de los diseños o matrices que se emplean según la etapa del diseño experimental en donde nos encontremos. A priori se deben tomar dos decisiones cruciales: los factores a estudiar y los niveles de esos factores; los objetivos del experimento dependerán de ambos aspectos [1]. A continuación, se realiza una breve descripción de algunos de estos diseños y de las matrices a utilizar, según convenga.

2.1. Diseño factorial saturado

El diseño del que derivan casi todas las demás matrices es el diseño factorial. Los modelos más simples son los desarrollados como: diseño factorial saturado y diseño factorial fraccionado; los demás diseños se elaboran derivados de éstos.

El diseño factorial saturado es aquel diseño en que cada variable o factor es estudiado a unos niveles fijos. Normalmente se emplea a dos niveles, llamándose entonces diseño factorial saturado a dos niveles. Si hubiera más niveles se emplearían otros diseños con otras matrices. El número de niveles para cada una de las variables en estudio debe ser el mismo. El número final de experimentos depende del número de variables y de sus niveles del modo siguiente [4]:

$$n^{\circ} \text{ experimentos} = r^k$$

siendo:

- k : n^o variables.
- r : n^o niveles.

2.2. Diseño factorial fraccionado

El diseño factorial fraccionado se utiliza, en lugar del diseño factorial saturado, para disminuir el número de experimentos en aquellos estudios en los que se plantean demasiadas variables (normalmente más de cua-

Tabla II. Primeras líneas para las matrices experimentales de diseños de Plackett-Burman de 4 a 24 experimentos

Nº de experimentos	Primera línea de diseño
4	++ -
8	+++ - + - -
12	++ - +++ - - - + -
16	++++ - + - + - - + - - -
20	++ - - + - + - - + - - - + - -
24	+++++ - + - + - - + - - - + - - - -

tro), circunstancia que complica el proceso demasiado. Como de lo que se trata es de disminuir el número de experiencias a realizar, algunas influencias habrá que considerarlas despreciables. El número de experimentos con este tipo de matrices es:

$$n^{\circ} \text{ experimentos} = r^{k \cdot p}$$

siendo:

- k : n^o variables.
- r : n^o niveles.
- p : fracción del diseño factorial saturado usado, elegido por el investigador.

El diseño factorial fraccionado implica el estudio de sólo una parte del dominio experimental ya que no se puede abarcar todo el espacio con un número limitado de experiencias. Con este tipo de diseño se pierde información, pero este es un riesgo que hay que asumir si se opta por disminuir el número de experimentos.

2.3. Matriz 3/4

Esta matriz se construye eligiendo tres de las cuartas partes (de ahí el nombre) de un diseño factorial saturado a dos niveles 2^k . Para ello, un diseño factorial saturado se subdivide en cuatro fracciones cada una de las cuales contiene 1/4 de los experi-

mentos totales (n^o experimentos = 1/4 (2^k) = $2^{-2} \cdot 2^k = 2^{k-2}$). Se seleccionan tres de las cuatro partes de modo que no exista "confusión" entre los efectos principales y las interacciones de interés [5].

2.4. Matriz de Hadamard o de Plackett-Burman

La información obtenida con esta matriz proporciona la influencia que cada variable tiene individualmente en la respuesta, e incluso al efecto principal de una variable en particular (b_i). Por eso puede ser usada cuando el modelo es lineal sin interacción, ya que así se puede evaluar cada variable por separado.

El número de experimentos que es necesario realizar es múltiplo de cuatro. Siendo k el número de variables, el número final de experiencias será el número múltiplo de cuatro inmediatamente superior al número de variables (k). Por ejemplo, con tres variables habrá que hacer cuatro experimentos, con cuatro variables se realizarán ocho experimentos.

Con este tipo de matriz, las variables se estudian a dos niveles, normalmente representados como +1 y -1, y en la mayoría de los casos la matriz experimental se construye a partir de una pri-

mera fila siempre fija. En la Tabla II aparecen las primeras líneas de diseños de Plackett-Burman de 4 a 24 experimentos. Para la segunda fila, el primer elemento será el último de la primera fila, continuando los siguientes desplazando hacia la derecha cada dato una posición, excepto la última fila, la cual debe estar constituida enteramente por signos negativos. En la Tabla III se recoge un ejemplo de una matriz de Hadamard o de Plackett-Burman para siete variables a dos niveles [1 y 4].

2.5. Diseño D-Optimal

Es un instrumento del diseño experimental que, como tal, pretende obtener los coeficientes del modelo hipotetizado utilizando el menor número de experimentos posibles y con la mejor calidad de información. En concreto, este diseño hace uso de un algoritmo que consiste en extraer de una matriz original, que puede ser un diseño factorial saturado, un *Central Composite Design* o un diseño de Doehlert (estos dos últimos se verán más adelante), una serie de experimentos tales que la matriz resultante tenga, respecto a todas las otras posibilidades, una serie de criterios de calidad que satisfagan la garantía de los resultados que se obtendrán a continuación. Es el investigador el que decidirá cuántos experimentos se llevarán a cabo y el que elegirá, de entre todas las matrices posibles, aquella que responda mejor a las propias exigencias [5].

Este diseño se suele utilizar en fases de *screening*, y también cuando las variables a evaluar no tienen todas los mismos niveles.

2.6. Diseño de Doehlert

Las aproximaciones a este tipo de estudio tanto con el diseño de Doehlert como con el *Central Composite Design* (y su variante *Faced Centred Design*)

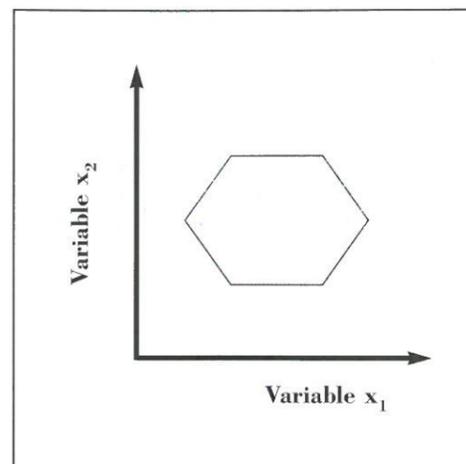


Figura 1. Sólido de Doehlert para 2 variables siguiendo un diseño de Doehlert

que se verán a continuación, tienen como característica común el estudiar las variables a más de dos niveles, ya que lo que se va a estudiar es un área (si las variables tuvieran sólo dos niveles la representación gráfica que se obtendría sería una línea recta que uniría los dos extremos).

En el diseño de Doehlert el número de experimentos previstos será:

$$n^{\circ} \text{ experimentos} = k^2 + k + n$$

siendo:

- k : n° variables.
- n : n° experimentos situados en el centro del dominio experi-

mental, es decir, el número de repeticiones. El valor de n , lo elige el investigador, debiendo ser como mínimo uno.

El Doehlert es una figura geométrica que, en general, se denomina sólido de Doehlert y que, en el caso de dos variables es un hexágono (Fig. 1). Para más de dos variables se obtiene un poliedro de diversa complicación en el espacio en función del número de variables. Los experimentos a realizar se situarán uno a uno en los vértices del hexágono, o del poliedro concreto, y las repeticiones fijadas por n en el centro de la figura.

Con este diseño ya no se busca determinar las posibles influencias de las variables, sino que lo que se pretende es, una vez obtenida la superficie de respuesta, encontrar las condiciones óptimas de experimentación. Es decir, en base a los resultados obtenidos, el sólido de Doehlert se puede situar en la dirección de respuesta óptima por movimiento de traslación, de forma que el nuevo Doehlert trasladado estará centrado sobre los vértices correspondientes al experimento que haya dado el mejor resultado. Este diseño permite, por lo tanto, llegar a las condiciones óptimas mediante el estudio de la superficie de respuesta.

2.7. Central Composite Design (CCD)

La matriz de un *Central Composite Design* (CCD) deriva de la de un diseño factorial saturado de k variables a dos niveles (2^k) a la cual se le añaden puntos extra elegidos adecuadamente para aproximarse a la ortogonalidad [2]. Estos puntos extra son concretamente dos experimentos situados en la parte opuesta respecto al origen del eje coordinado asociado a cada variable ($2k$), y a una distancia alfa (α), que es igual a la semidiagonal del poliedro concreto, es decir, de un cuadrado si las variables a estudiar son dos ($k = 2$), o de un cubo en el caso que el valor de k sea tres. Por tanto, el número de experimentos necesarios en un diseño de este tipo es:

$$n^{\circ} \text{ experimentos} = 2^k + 2k + n$$

siendo:

- k : n° variables.
- n : n° experimentos centrales.
- $2k$: valores adicionales adecuadamente seleccionados.

Una variante del CCD es el *Face Centred Design* (FCD). En este diseño el valor de alfa es uno, y cada variable es estudiada a tres niveles, normalmente -1 , 0 y $+1$. El dominio experimental es ahora un hipercubo.

Los puntos se encuentran geoméricamente localizados sobre la cara (*face*) del hipercubo en el caso de FCD, o del cuadrado o del cubo, cuando es un CCD, que representan los experimentos del diseño factorial saturado de origen [5].

2.8. Método Simplex

Se trata de un método estadístico de tipo secuencial que prescinde totalmente de la relación funcional existente entre la respuesta y la variable. En general, igual que el Doehlert, es un método de avance del Simplex, figura geométrica con $k + 1$ vértices

donde k es el número de variables sobre la superficie de respuesta a partir de un mínimo set de experimentos iniciales, hacia la dirección de la respuesta óptima [5]. A veces, incluso se combinan estos dos métodos, Simplex y Doehlert, para reducir significativamente el número de experimentos y optimizar aún más la respuesta [8].

2.9. Diseño de Box- Behnken

Este diseño se utiliza en el estudio superficie-respuesta de segundo orden. Consta de un punto central replicado y un conjunto de puntos en el punto medio de cada eje de un cubo multidimensional que define la región de interés. El Box-Behnken requiere menos experimentos que un diseño factorial saturado, por lo que algo de información se pierde [3].

3. Pasos en el diseño experimental

Llegado a este punto se muestra un posible orden o metodología de trabajo a seguir cuando se pretende abordar un trabajo mediante el diseño experimental. Los pasos indicados son comunes en todos los estudios, lo único que cambia es la elección de la matriz, que según se ha visto varía en función del tipo de estudio o evaluación que se quiera realizar. Los pasos se muestran en el siguiente listado [4] y un ejemplo concreto, y que se expone a continuación, sería el *screening* realizado entre diversas variables en un estudio de puesta a punto de una formulación para comprimidos matriciales del fármaco didanosina [7]:

- Descripción del problema: evaluar la posible influencia de distintas variables en la liberación *in vitro* del fármaco.
- Análisis de los datos existentes: revisión bibliográfica.
- Identificación de la situación:

problema, objetivos a cumplir y medios disponibles. El diseño que se eligió para este estudio fue el D-Optimal.

- Listado definitivo de factores o variables a estudiar ($x_1 = x_1$, x_2 , x_3 , x_4): fuerza de compresión, porcentaje de didanosina, proporción de los polímeros en la mezcla de excipiente (Eudragit® RS-PM, Ethocel® 100), fracción granulométrica de los polímeros.

- Listado de las respuestas experimentales ($y_i = y_1$, y_2 , y_3 , y_4 , y_5): porcentaje de didanosina liberado a diferentes tiempos (60, 180 y 360 min), eficacia de disolución al final del ensayo ($D.E._{360}$), $t_{10\%}$.

- Modelo matemático: lineal sin interacciones.

- Límites establecidos: fuerza de compresión (1,5 y 0,5 tons); fracción granulométrica de los polímeros (50-100 y 150-200 μm); cantidad de fármaco en los diversos lotes elaborados (5, 10 y 15%), relación Eudragit® RS-PM/Ethocel® 100 (0/100, 25/75, 50/50, 75/25, 100/0).

- Diseño de la matriz experimental: en filas y columnas se representaron de manera codificada los experimentos a realizar.

- Plan de experimentación o protocolo.

- Experimentación, propiamente dicha.

- Análisis de los datos, respuestas obtenidas (significación estadística): todas las respuestas resultaron ser estadísticamente significativas, por lo que las variables se pudieron evaluar. La fuerza de compresión no resultó ser influyente en este caso concreto, las demás sí. La fracción granulométrica que maximizaba la liberación y minimizaba la $t_{10\%}$ fue el intervalo 150-200 μm ; la cantidad de didanosina fue el 15%; la mejor relación de combinación de polímeros fue 100/0 y 75/25.

4. Bibliografía

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

[2] 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 (1997).

[3] Khan, M.A., Dib, J. y Reddy, I.K. "Statistical optimization of Ketoprofen-Eudragit® S100 coprecipitates to obtain controlled-release tablets". Drug Dev. Ind. Pharm., 22, (2), 135-141 (1996).

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

[5] Orlandini, S. "Metodologie di disegno sperimentale nello sviluppo e nella convalida di un metodo polarografico per la determinazione dell'acido chinolínico 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).

[6] Porter, S.C., Versepunt, R.P. y Cunningham, C.R. "Process optimization using design of experiments". Pharm. Techn., 21, (10), 60-70 (1997).

[7] 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 (1999).

[8] Vojnovic, D., Moneghini, M. y Masiello, S. "Design and optimization of teophylline pellets obtained by wet spherization in a high-shear mixer". Drug Dev. Ind. Pharm., 21, (18), 2129-2137 (1995).

[9] Zhou, F., Vervaet, C., Massart, D.L., Massart, B. y Remon, J.P. "Optimization of the processing of matrix pellets based on the combination of waxes and starch using Experimental Design". Drug Dev. Ind. Pharm., 24, (4), 353-358 (1998).

