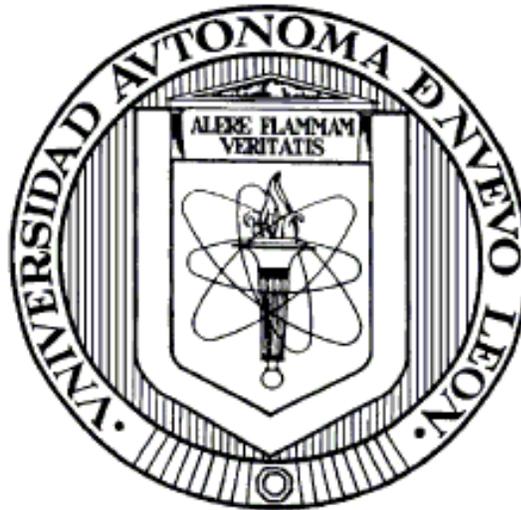


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LAS CARACTERÍSTICAS DE
LIBERACIÓN DE GABAPENTINA A PARTIR DE BIOMATERIALES
OBTENIDOS VÍA SOL-GEL**

Por

Q.F.B. Laura Yesenia Villarreal Salinas

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con orientación en
FARMACIA

Diciembre, 2011

Aprobación de la tesis:

**EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LAS CARACTERÍSTICAS DE
LIBERACIÓN DE GABAPENTINA A PARTIR DE BIOMATERIALES
OBTENIDOS VÍA SOL-GEL**

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas
Presidente

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Secretario

Vocal

Dra. María Teresa Garza González
Subdirector de Estudios de Posgrado

Diciembre, 2011

Revisión de la tesis:

**EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LAS CARACTERÍSTICAS DE
LIBERACIÓN DE GABAPENTINA A PARTIR DE BIOMATERIALES
OBTENIDOS VÍA SOL-GEL**

Dra. Lucía Guadalupe Cantú Cárdenas
Director de Tesis

Dra. Ma. Araceli Hernández Ramírez
Co-director de Tesis

Dra. Patricia González Barranco
Comité tutorial

Dra. María Aurora Hernández Benítez
Comité tutorial

Dra. Sandra Leticia Gracia Vásquez
Comité tutorial

Dra. María Teresa Garza González
Subdirector de Estudios de Posgrado

Diciembre, 2011

RESUMEN

Q.F.B Laura Yesenia Villarreal Salinas

Fecha de Graduación: Diciembre, 2011

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio:

EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LAS
CARACTERÍSTICAS DE LIBERACIÓN DE GABAPENTINA
A PARTIR DE BIOMATERIALES OBTENIDOS VIA SOL-
GEL

Número de páginas:

**Candidato para el grado de Maestría en
Ciencias con orientación en Farmacia**

Área de Estudio: Tecnología Farmacéutica

Propósito y Método del Estudio: El propósito de esta tesis radica en realizar el estudio de un biomaterial que contiene el principio activo gabapentina para evaluar su perfil de liberación, utilizando matrices cerámicas de SiO₂ sintetizadas por el proceso sol-gel. El objetivo de preparar estos biomateriales cerámicos que tienden a presentar liberación sostenida, permite tener una terapia en la que se reduzca el rango entre los niveles plasmáticos mínimos y máximos del principio activo y de esta manera reducir las reacciones adversas dependientes de la dosis, aunado a la reducción en la frecuencia de administración, con lo que se mejora el cumplimiento de la terapia farmacológica por parte del paciente.

Contribuciones y Conclusiones: El estudio de la incorporación de gabapentina en una matriz cerámica y la forma en que se libera el fármaco del biomaterial implica la generación de conocimiento útil en el desarrollo de nuevas alternativas de formas farmacéuticas de liberación sostenida.

FIRMA DEL ASESOR: _____

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIA

A mis padres

César O. Villarreal Garza y Laura L. Salinas Garza

A mis hermanos

Leo, Wendy y Luisito

A mi abuelita maravillosa

Ma. Evangelina Salinas Flores

A mi tío César Alanís de la Rosa

(Un ángel más en el cielo)

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
RESUMEN	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA.....	iii
TABLA DE CONTENIDO	iv
LISTA DE FIGURAS	ix
NOMENCLATURA	xiii
Capítulo 1: Introducción	16
1.1 Formas farmacéuticas de liberación modificada	16
1.1.2 Ventajas y desventajas de las FFLM.....	18
1.2 Modelos para evaluar la cinética de liberación de los fármacos.....	18
1.3 Sistemas de liberación modificada de fármacos.....	20
1.3.1 Biomateriales poliméricos	24
1.3.2 Biomateriales metálicos.....	25
1.3.3 Biomateriales cerámicos	26
1.4 Proceso Sol-Gel	27
1.4.1 Etapas del proceso Sol-Gel (Figura 5)	28
1.5 Fármaco incorporado: Gabapentina	30
1.5.1 Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas.	30
1.5.2 Usos terapéuticos.....	32
1.5.3 Reacciones adversas	35
1.5.4 Mecanismo de acción.....	36
1.5.5 Marcas comerciales	37
1.6 Validación de métodos analíticos	39
Capítulo 2: Antecedentes	41
2.1 Análisis crítico de la literatura.....	41
2.1.1 Fármacos incorporados en matrices cerámicas	42
2.1.2 Estudios de gabapentina de liberación sostenida	49
2.1.3 Métodos analíticos validados para cuantificar gabapentina. .	51
2.2 Hipótesis.....	53
2.3 Objetivo General.....	53
2.4 Objetivos Específicos	54
Capítulo 3: Materiales y Métodos	55

3.1 Materiales.....	55
3.1.1 Reactivos.....	55
3.1.2 Equipos	56
3.1.3 Ubicación del Equipo.....	56
3.2. Metodología General	57
3.2.1 Validación de los métodos analíticos.....	57
3.2.1.2 Validación del método para determinar gabapentina mediante la reacción de derivatización con ninhidrina por espectrofotometría UV-Visible.	61
3.2.2 Extracción de gabapentina del biomaterial.....	69
3.2.3 Estudios de liberación de gabapentina <i>in vitro</i>	73
3.2.4 Liberación de gabapentina <i>in vivo</i>	78
Capítulo 4: Resultados y Discusión	80
4.1 Validación del método para determinar gabapentina por HPLC con detector arreglo de diodos sin derivatización	81
4.2 Validación del método para determinar gabapentina mediante la reacción de derivatización con ninhidrina por espectrofotometría UV-Vis.....	87
4.3 Validación del método para cuantificar gabapentina en solución mediante LC/MS.....	90
4.4 Validación del método para cuantificar gabapentina en plasma humano mediante LC/MS.....	94
4.5 Extracción de gabapentina de los biomateriales (G5REL16 y G9REL18).....	102
4.5.1 Extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10%, cuantificación por derivatización con ninhidrina (UV-Vis)...	102
4.5.2 Extracción de gabapentina del biomaterial G9REL18 al 10% cuantificación por derivatización con ninhidrina (UV-Vis)...	106
4.5.3 Extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en solventes hidrocarbonados; cuantificación por derivatización con ninhidrina (UV-Vis)	111
4.5.4 Extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en distintos solventes por triplicado y cuantificado por LC/MS.....	118
4.6 Pruebas de liberación de gabapentina <i>in vitro</i>	122
4.6.1 Pruebas de liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 y G9REL18 <i>in vitro</i> , cuantificación por HPLC con arreglo de diodos.	122
4.6.2 Pruebas de disolución de gabapentina comercial (Neurontin®), cuantificación HPLC arreglo de diodos.	126
4.7 Pruebas de liberación de gabapentina <i>in vivo</i>	137
Capítulo 5: Conclusiones	148
Recomendaciones.....	153
Resumen atobibliográfico.....
Bibliografía.....

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Modelos de Cinética de liberación de fármacos.....	19
Tabla 2. Mecanismos de transporte de acuerdo al modelo semiempírico de Peppas.....	20
Tabla 3. Clasificación de sistemas de liberación modificada según Ding et al.	21
Tabla 4. Clasificación de sistemas de liberación modificada según Chien y Lin.	22
Tabla 5. Clasificación de sistemas de liberación modificada por Costa et. al ...	23
Tabla 6. Propiedades farmacocinéticas de gabapentina.	31
Tabla 7. Medicamentos que se comercializan en México que contienen como principio activo gabapentina.	37
Tabla 8. Medicamentos que contienen gabapentina comercializados en E.U.A38	
Tabla 9. Fármacos incorporados en matrices cerámicas.....	42
Tabla 10. Cuadro comparativo de métodos analíticos propuestos para gabapentina	52
Tabla 11. Preparación de estándares de gabapentina en solución HPLC.....	59
Tabla 12. Preparación de estándares de gabapentina en solución UV-Vis	62
Tabla 13. Preparación de estándares de gabapentina en plasma LC/MS	66
Tabla 14. Nomenclatura de los biomateriales.....	70
Tabla 15. Condiciones establecidas para las pruebas de disolución <i>in vitro</i> con los biomateriales (G5REL16, G9REL18).	74
Tabla 16. Datos obtenidos por triplicado (Validación del método por HPLC) ...	85
Tabla 17. Parámetros generales de validación parcial del método por HPLC ..	86
Tabla 18. Datos obtenidos por triplicado (Validación del método por espectrofotometría UV-Vis).....	88
Tabla 19. Parámetros generales de validación parcial del método con la reacción de derivatización con ninhidrina	89
Tabla 20. Datos obtenidos por quintuplicado, gabapentina en solución (Validación del método por LC/MS).	91

Tabla 21. Parámetros generales de validación parcial del método para gabapentina en solución por LC/MS.....	92
Tabla 22. Precisión del método para cuantificar gabapentina en solución por LC/MS.....	92
Tabla 23. Exactitud del método para cuantificar gabapentina en solución por LC/MS.....	92
Tabla 24. Datos obtenidos por quintuplicado, gabapentina en plasma (Validación del método por LC/MS)	95
Tabla 25. Parámetros generales de validación del método para gabapentina en plasma por LC/MS	96
Tabla 26. Precisión del método para cuantificar gabapentina en plasma por LC/MS.....	96
Tabla 27. Exactitud del método para cuantificar gabapentina en plasma por LC/MS.....	96
Tabla 28. Porcentaje de extracción de gabapentina del biomaterial.....	102
Tabla 29. Porcentaje de extracción de gabapentina del biomaterial.....	106
Tabla 30. Tabla general de extracciones en distintos solventes (G5REL16 y G9REL18) cuantificado por espectrofotometría UV-Vis (derivatización con ninhidrina)	110
Tabla 31. Extracción de G5REL16 al 10% en distintos solventes para evaluar la polaridad.....	111
Tabla 32. Porcentaje de extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 en solventes hidrocarbonados	113
Tabla 33. Soluciones a diferente pH para evaluar la extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16.....	117
Tabla 34. Extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16, efecto del pH del medio.	117
Tabla 35. Porcentajes de extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en diferentes solventes, cuantificación por LC/MS	118
Tabla 36. Concentraciones y porcentaje de disolución de Neurontin® en Jg y Ji.	126

Tabla 37. Concentraciones y porcentaje de disolución de biomaterial G5REL16 al 10% en Jg y Ji.....	129
Tabla 41. Comparación entre las concentraciones plasmáticas de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% y del Neurontin®. Perro 3	142

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Curvas de concentración plasmática vs tiempo para la administración oral de una forma farmacéutica de liberación a) acelerada, b) diferida o retardada, c) prolongada, extendida o sostenida, d) liberación convencional o inmediata dosis múltiple.....	17
2. Ejemplos de aplicaciones de biomateriales poliméricos	24
3. Ejemplos de aplicaciones de biomateriales metálicos	25
4. Ejemplos de aplicaciones de biomateriales cerámicos	26
5. Esquema general del proceso Sol-Gel	29
6. Estructura de la gabapentina	30
7. Dolor fisiológico (A) vs Dolor neuropático (B). ³¹	33
8. Principales reacciones adversas de la gabapentina	36
9. Cromatógrafo de líquidos. HPLC Waters 2695	60
10. Reacción de derivatización de gabapentina con ninhidrina	61
11. Esquema de reacción de derivatización con ninhidrina.	63
12. Esquema de precipitación de proteínas.....	67
13. LC/MS Agilent G1312A.....	68
14. Proceso general de extracción de gabapentina incorporada en SiO ₂	72
15. Disolutor Vankel VK700	76
16. Esquema general de las pruebas de disolución <i>in vitro</i> por HPLC.	77
17. Esquema general de las pruebas de disolución <i>in vitro</i> por LC/MS.....	77
18. Perro <i>beagle</i> utilizado en pruebas de liberación <i>in vivo</i>	79
19. Diseño cruzado y aleatorizado del estudio <i>in vivo</i>	79
20. Cromatograma de gabapentina (1 mg/L)	82
21. Cromatograma de gabapentina (5 mg/L)	82
22. Cromatogra de gabapentina (10 mg/L)	82
23. Cromatograma de gabapentina (20 mg/L)	83
25. Cromatograma de gabapentina (40 mg/L)	83
26. Cromatograma de gabapentina (50 mg/L)	84

27. Cromatograma FM: mezcla tampón de KH_2PO_4 (0.028 M; pH 5.2), metanol, acetonitrilo (65:25:10, v/v).....	84
28. Curva de calibración de gabapentina por HPLC	85
29. Reacción de derivatización con ninhidrina (120-480 mg/L)	87
30. Espectro UV-Vis del producto de la derivatización de gabapentina con ninhidrina (Estándar de gabapentina de 300 mg/L)	88
31. Curva de calibración de gabapentina por reacción con ninhidrina.....	89
32. Curva de calibración de gabapentina en solución por LC/MS.....	91
33. Cromatogramas de gabapentina en solución LC/MS (0.1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).	93
34. Curva de calibración de gabapentina en plasma por LC/MS	95
35. Cromatogramas de gabapentina en plasma humano LC/MS	97
36. Efecto de la matriz biológica.	99
37. Especificidad del método cromatográfico para gabapentina por LC/MS... ..	100
38. Espectro de masas para gabapentina.	101
39. Extracción Biomaterial G5REL16 y cuantificación por método de ninhidrina	103
40. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción de la gabapentina en agua desionizada.	104
41. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción de gabapentina en Jugo intestinal simulado.....	104
42. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción en Jugo gástrico simulado.....	105
43. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción en etanol.....	105
44. Extracción Biomaterial G9REL18 y cuantificación por método ninhidrina.	107
45. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G9REL18 después de la extracción de la gabapentina en agua desionizada.	108
46. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G9REL18 después de la extracción de gabapentina en Jugo intestinal simulado.....	108
47. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G9REL18 después de la extracción en Jugo gástrico simulado.....	109

48. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G9REL18 después de la extracción en etanol.....	109
49. Ejemplificación de liberación de gabapentina por la presencia de solventes orgánicos	112
51. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción en etanol.....	114
50. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción en metanol.....	114
52. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción en alcohol isopropílico.	115
53. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción en 2-butanol.....	115
54. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción en hexano.....	116
55. Cromatogramas de la extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% cuantificación por LC/MS	119
56. Cromatograma liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 5% en Jg al tiempo de 2 h. Aparato I	122
57. Cromatograma liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 5% en Ji al tiempo de 2 h. Aparato I	123
58. Cromatograma liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en Jg al tiempo de 2 h. Aparato I.	123
59. Cromatograma liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en Ji al tiempo de 2 h. Aparato I.	124
60. Aparato I (canastillas), Aparato II (paletas)	124
61. Cromatograma liberación de gabapentina del biomaterial G9REL18 al 10% en Jg al tiempo de 2 h. Aparato II.	125
62. Cromatograma liberación de gabapentina del biomaterial G9REL18 al 10% en Ji al tiempo de 2 h. Aparato II.	125
63. Perfil de Disolución de Neurontin® en jugo gástrico e intestinal ambos simulados.....	127

64. Porcentaje de liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% utilizando etanol como solvente.....	128
65. Perfil de liberación del biomaterial G5REL16 al 10% en jugo gástrico e intestinal ambos simulados.....	129
66. Cromatogramas de la liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en Jg, cuantificación por LC/MS.	131
67. Cromatogramas de la liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en Jg, cuantificación por LC/MS.	132
68. Cromatogramas de la liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en Ji, cuantificación por LC/MS.	133
69. Cromatogramas de la liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en Ji, cuantificación por LC/MS.	134
70. Perro <i>beagle</i> utilizado en las pruebas <i>in vivo</i>	138
71. Proceso de colocación de catéter y toma de muestra.	138
72. Realización de estudio en clínica veterinaria especializada.	138
73. Comparación entre la concentración plasmática de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% y el Neurontin®. Perro 1	140
74. Comparación entre la concentración plasmática de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% y el Neurontin®. Perro 2	141
75. Comparación entre la concentración plasmática de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% y el Neurontin®. Perro 3	142
76. Comparación promedio entre la concentración plasmática de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% y el Neurontin®.	143
77. Prueba Kruskal Wallis para determinat tmáx	144
78. Prueba Mood para calculo de Cmax.....	145

NOMENCLATURA

Å	Amstrong
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
CELAES	Centro de Laboratorios Especializados
DRX	Difracción de rayos X
FCQ	Facultad de Ciencias Químicas
FDA*	Food and Drug Administration
FDNB	1-fluoro-2,4-dinitrobenceno
FFLM	Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada
FM	Fase Móvil
FTIR*	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier
GABA	Ácido gama amino butírico
GC*	Cromatografía de Gases
GC/MS*	Cromatografía de Gases acoplada a Espectroscopía de Masas
HPLC*	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
Jg	Jugo gástrico simulado sin enzimas (pH 1.2)
Ji	Jugo intestinal simulado sin enzimas (pH 6.8)
KH ₂ PO ₄	Fosfato diácido de potasio
LC/MS*	Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectroscopía de Masas

LOD*	Límite de detección
LOQ*	Límite de cuantificación
LQI	Licenciado en Química Industrial
MC	Maestría en Ciencias
NaOH	Hidróxido de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PDMS	Polidimetetilsiloxano
PEG	Polietilenglicol
PVC	Policloruro de vinilo
RA	Reactivo Analítico
RPBI	Residuo Peligroso Biológico Infeccioso
rpm	Revoluciones por minuto
SEM*	Microscopía electrónica de barrido
SNC	Sistema Nervioso Central
SPE*	Solid-Phase Extraction
TEOS	Tetraetoxisilano
TGA-DGA*	Análisis termogravimétrico – análisis térmico diferencial
tR	Tiempo de retención
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
USP	United States Pharmacopeia
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
λ	longitud de onda

* Por sus siglas en inglés

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

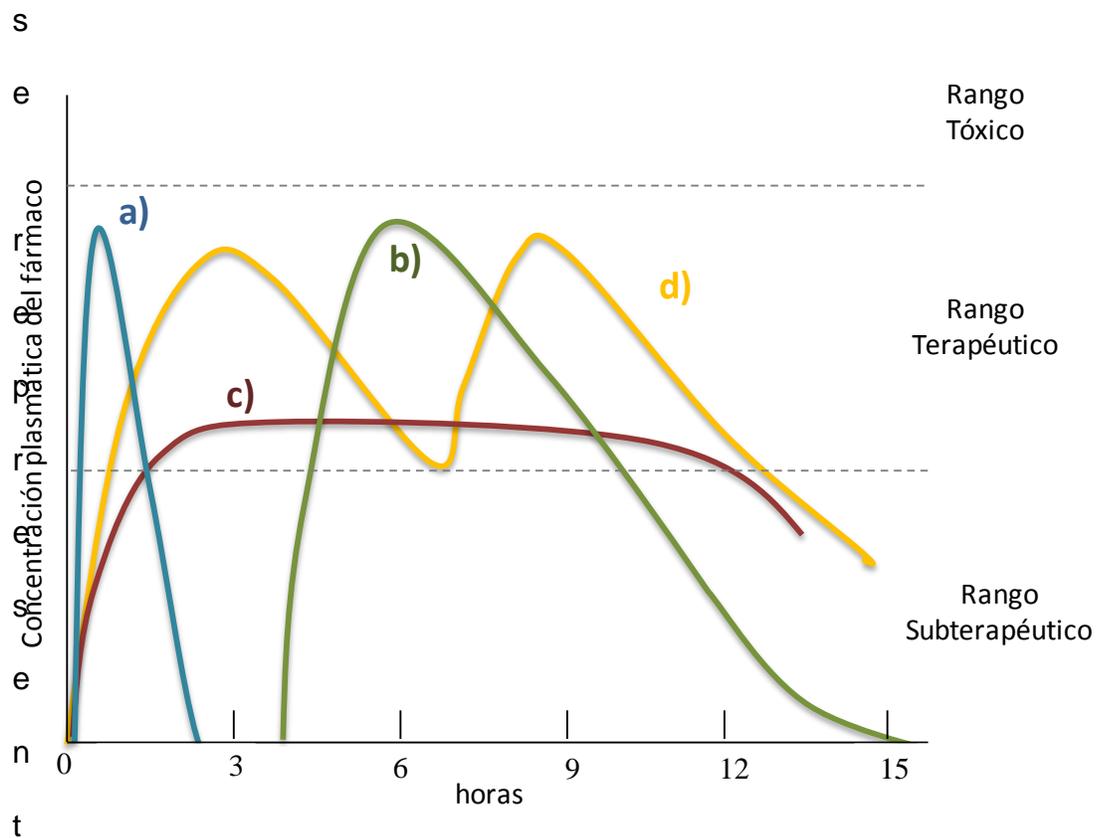
La investigación farmacéutica continúa siendo un reto, tanto en la búsqueda de nuevos principios activos como en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas; este último punto ha tenido un crecimiento exponencial desde hace tres décadas, donde destacan de manera muy especial las formas farmacéuticas de liberación modificada (FFLM), que a diferencia de las formas farmacéuticas de liberación inmediata o convencional (en las cuales la dosis del principio activo está totalmente disponible para ser absorbido después de su administración), éstas buscan controlar el tiempo o lugar de la liberación del principio activo^{1,2}.

1.1 Formas farmacéuticas de liberación modificada

a) *Liberación acelerada*: Es aquella preparación farmacéutica cuya velocidad de liberación del principio activo es más rápida que la de una forma de liberación convencional destinada a la misma vía de administración¹.

b) *Liberación diferida o retardada*: Es la preparación farmacéutica cuya velocidad de liberación del principio activo ocurre en un momento posterior al de la forma farmacéutica de liberación convencional¹.

c) *Liberación prolongada, extendida o sostenida*: Es la preparación farmacéutica que permite una reducción de al menos dos veces la frecuencia de administración en comparación con una forma convencional, ya que la liberación ocurre de forma lenta¹. En la Figura 1



an los comportamientos de liberación descritos.

Figura 1. Curvas de concentración plasmática vs tiempo para la administración oral de una forma farmacéutica de liberación a) acelerada, b) diferida o retardada, c) prolongada, extendida o sostenida, d) liberación convencional o inmediata dosis múltiple.

1.1.2 Ventajas y desventajas de las FFLM

Los sistemas de liberación modificada tienen numerosas ventajas entre ellas:^{1,2,3}

- reducción de la frecuencia de administración (simplificación de la posología).
- disminución de la fluctuación de niveles plasmáticos.
- efecto terapéutico más uniforme.
- reducción de efectos secundarios relacionados con dosis elevadas.

No obstante existen algunas desventajas entre las que se pueden señalar:^{1,2,3}

- costo elevado.
- correlaciones *in vitro/in vivo* difíciles de predecir.
- posible sobre-dosificación por liberación inmediata e incontrolada de la dosis.
- dificultad de ajuste de dosificación.

1.2 Modelos para evaluar la cinética de liberación de los fármacos

Conocer la forma en la que se liberan los principios activos es crucial para el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas; sin embargo, es un fenómeno complejo que depende de muchos factores: estructura química, cantidad de fármaco, solubilidad, tamaño del fármaco, condiciones del medio de liberación, entre otras. Tratar de modelar la liberación del fármaco es complicado, por ello en las últimas décadas se ha hecho un esfuerzo importante

por intentar comprender los modelos y mecanismos de liberación, desarrollando numerosas ecuaciones; pese a todo el trabajo realizado la información para conocer los factores reales que controlan la liberación de los fármacos no es del todo contundente, en la Tabla 1 se muestran algunos de los modelos propuestos para explicar el proceso de liberación en diversas formas farmacéuticas^{1,2,3,4}.

Tabla 1. Modelos de Cinética de liberación de fármacos

Modelos Matemáticos Mecanicistas		
Tipo de mecanismo	Características	Aplicaciones
Orden Cero	La velocidad de disolución es constante e independiente de la cantidad de fármaco disuelto.	Sistemas de liberación modificada, tipo osmótico, reservorio y matriciales
Primer Orden	La velocidad de la disolución es proporcional a la primera potencia de la concentración de fármaco disuelto.	Sistemas de liberación prolongada, fármacos solubles en matrices insolubles de distintas geometrías.
Modelo Hixson-Crowell o de la Raíz Cúbica	Este modelo asume que la forma del sólido es esférica, que la disolución ocurre de forma perpendicular a la superficie del sólido, y que debe haber agitación del medio.	Formas geométricas que se mantienen constantes, con una ligera disminución de la superficie.
Raíz Cuadrada o Higuchi	Éste se puede aplicar a matrices porosas donde el medio de disolución debe entrar a través de los poros, en la ecuación de este modelo se incluye el factor de tortuosidad.	Pomadas Matrices homogéneas y granulares Matrices porosas
Ley de la Potencia o Modelo de Peppas	Es un modelo semiempírico que surge cuando los modelos anteriores no terminaban de explicar el comportamiento de liberación. Este modelo presenta una desviación a la difusión Fickiana llamado anómalo.	Diversas matrices con diferentes exponentes de liberación (n). Matrices con poros (n<0.5), Matrices poliméricas hinchables (n=1). En la Tabla 2. se presentan los valores del exponente de liberación.

Tabla 2. Mecanismos de transporte de acuerdo al modelo semiempírico de Peppas^{1,2}

Exponente de liberación (n)	Mecanismo de transporte	Tipos de liberación
0.5	Difusión fickiana	Dependiente del tiempo (intervalos de tiempo cortos)
$0.5 < n < 1$	Transporte anómalo o no fickiano	Dependiente del tiempo
1	Transporte caso II	Independiente del tiempo (orden cero)
$n > 1$	Transporte super caso II	Dependiente del tiempo (tiempo de liberación muy elevado)

1.3 Sistemas de liberación modificada de fármacos

Diferentes investigadores han planteado una clasificación de los métodos o sistemas que permiten modificar la liberación de las formas farmacéuticas. En este sentido Ding y colaboradores proponen una clasificación usando como criterio principal, la liberación en función del tiempo y del espacio, a su vez, han desarrollado sub-categorías, sistemas y mecanismos que permiten alcanzar dichas modificaciones, dentro de esta clasificación en función del tiempo se encuentran los sistemas de liberación matriciales donde sus principales mecanismos de control son la difusión y disolución.⁵ En la Tabla 3 se puede apreciar la clasificación de Ding et.al.

Tabla 3. Clasificación de sistemas de liberación modificada según Ding et al.

Categoría	Mecanismo de Control	Sistema de Liberación
Control Temporal	Difusión	Sistemas de membrana
		Sistemas matriciales
		Reservorios
	Disolución	Reservorio
		Matriciales
	Presión Osmótica	Sistemas Push-Pull
	Hinchamiento	Hidrogeles
	Erosión	Implantes
	Estimulación o activación	pH dependientes
		Termosensibles
Activados magnéticamente		
Control espacial (mecanismos variados)		Micropartículas
		Nanopartículas
		Bioadhesivos
		Eritrocitos modificados

Por otra parte Chien y Lin agrupan los sistemas de liberación en cuatro categorías, sistemas de velocidad pre-programada, sistemas activables, sistemas retroalimentados y sistemas diana. Los autores clasifican a los sistemas matriciales dentro de la categoría de velocidad pre-programada, utilizando como mecanismo de control la difusión y disolución del fármaco.⁶

Tabla 4. Clasificación de sistemas de liberación modificada según Chien y Lin.

Categoría	Mecanismo de control	Sistema de liberación
Sistemas de velocidad pre-programada	Difusión/ Disolución	Reservorios
		Matrices poliméricas
Sistemas Activables	Activación física	Presión Osmótica
		Fuerza mecánica
		Fuerza magnética
		Sonoforesis
		Iontoforesis
	Activación química	pH
		Fuerza iónica
		Hidrólisis
	Activación Bioquímica	Enzimas
Sistemas retroalimentados	Retro-regulación	Bio-erosionables
		De respuesta a un estímulo bioquímico
Sistemas dirigidos a dianas	Unión específica a receptores de membrana	Reconocimiento y activación por receptores celulares

A su vez Costa y colaboradores agrupan a los sistemas matriciales en tres categorías matrices: hidrofílicas, lipofílicas e inertes, siendo las últimas las que presentan una red porosa.⁷

Tabla 5. Clasificación de sistemas de liberación modificada por Costa et. al

Tipo de Matriz	Características	Proceso de liberación	Cinética de liberación
Hidrofilicas	Son obtenidas por la compresión de una mezcla que contiene un principio activo relativamente soluble y un polímero no digerible que actúa como un agente gelificante.	Este polímero se hidrata e hincha cuando entra en contacto con los líquidos digestivos. De esta manera hay formación de una capa gelificada, cuyo espesor aumentará con el tiempo. El fármaco tiene que difundir progresivamente a través de dicha capa.	-Ecuación de Higuchi
Lipofílicas	Son a menudo llamadas matrices insolubles, ceras o erosionables. El principio activo se suspende en un excipiente lipídico; por lo general para la elaboración de estas matrices se utilizan glicéridos saturados, ácidos y alcoholes grasos, ésteres de ácidos grasos y ceras	La liberación de fármaco desde este tipo de matriz es controlada por la hidrólisis grasa pero también por un mecanismo de difusión o erosión.	-Ecuación de Higuchi -Liberación de acuerdo a cinética de primer orden. -Cinéticas de liberación de orden cero
Inertes	Comúnmente llamadas matrices plásticas o insolubles, forman una red sólida porosa compuesta de sustancias no tóxicas, no digeribles e insolubles en el tracto gastrointestinal. Ellas se eliminan en forma intacta junto con las heces.	La liberación del fármaco ocurre por difusión a través de los poros de la matriz y depende de la concentración del fármaco, su solubilidad, los aditivos, el tamaño de partícula del excipiente. La forma y área superficial del sistema matricial. Los líquidos penetran la red porosa del sistema por capilaridad. El fármaco se disuelve y luego difunde a través de los canalículos llenos de líquido.	Ecuación de Higuchi

Por otra parte también se encuentra la clasificación en función del tipo biomaterial, el cual es una sustancia farmacológicamente inerte diseñada para ser implantada o incorporada dentro un sistema vivo. Los biomateriales son

sintetizados y procesados en función de la aplicación a la cual serán destinados considerando su biocompatibilidad, propiedades mecánicas, adaptabilidad y biofuncionalidad, se dividen en tres tipos: poliméricos, metálicos y cerámicos.⁸

1.3.1 Biomateriales poliméricos

Existe una gran variedad de polímeros biocompatibles: naturales, como la celulosa y la goma guar; y sintéticos, como el polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE), el cloruro de polivinilo (PVC) y nylon. Entre las aplicaciones de los biopolímeros se incluyen prótesis faciales, partes de prótesis de oído, aplicaciones dentales, marcapasos, implantes en riñones, hígado y pulmones, Figura 2. Los polímeros más utilizados en el recubrimiento de película para fármacos son los derivados de la celulosa como metil celulosa (MC), etil celulosa (EC), hidroxipropil celulosa (HPC), hidroxipropil metil celulosa (HPMC) y acetofalato de celulosa (AC), también se utilizan los derivados de óxidos de etileno, además de los derivados vinílicos, tales como el alcohol polivinílico (PVA) y la polivinilpirrolidona (PVP), siendo este último el principal polímero utilizado para el recubrimiento de película; además se utilizan derivados de acrilatos que generalmente son polímeros derivados del ácido metacrílico, metil metacrilato y etil acrilato 9.

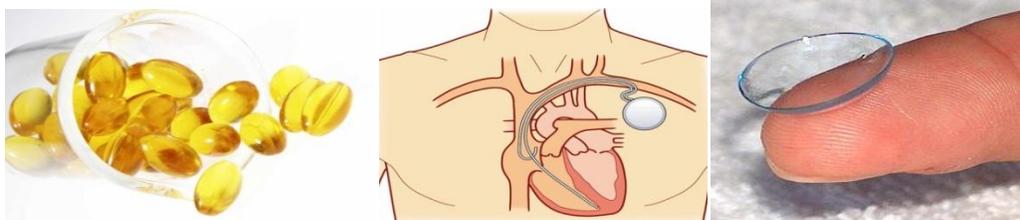


Figura 2. Ejemplos de aplicaciones de biomateriales poliméricos

1.3.2 Biomateriales metálicos

Los biomateriales metálicos se utilizan en menor medida comparados con los anteriores ya que su principal limitante radica en la corrosión que presentan frente a los líquidos corporales, a pesar de ello son muy utilizados en implantes donde se requiere soporte de carga (dentales o artroplastías) debido a su alta resistencia mecánica, Figura 3. Los principales metales biocompatibles son acero inoxidable y aleaciones basadas en cobalto y titanio. Estas últimas tienen una alta resistencia mecánica y un módulo elástico bajo que se asemeja más al hueso que otras aleaciones metálicas, y a su vez, tiene una alta resistencia a la corrosión, como consecuencia de la formación espontánea de una capa pasiva de óxido de titanio, lo que las ha convertido en las aleaciones más utilizadas para aplicaciones ortopédicas ^{9,10,11}.



Figura 3. Ejemplos de aplicaciones de biomateriales metálicos

1.3.3 Biomateriales cerámicos

Los biocerámicos son compuestos complejos que contienen elementos metálicos y no metálicos. Debido a sus enlaces iónicos o covalentes, son generalmente duros. Además de tener un alto punto de fusión y una baja conductividad térmica y eléctrica, los cerámicos se consideran resistentes al desgaste. Los principales biocerámicos son alúmina, zirconia, hidroxiapatita, porcelanas, vidrios bioactivos, dióxido de sílice, óxido de titanio, entre otros. Se emplean ampliamente en el sistema óseo como implantes y recubrimientos en prótesis articulares; también se utilizan en aplicaciones dentales, válvulas artificiales, cirugía de la espina dorsal y reparaciones craneales (Figura 4). Los métodos para la obtención de los biomateriales cerámicos incluyen el método cerámico tradicional que se lleva a cabo a altas temperaturas y el proceso sol-gel que se realiza a temperaturas bajas. Este último método permite además la incorporación de fármacos para la administración oral o a través de implantes, ya que forma redes tridimensionales en las que se deposita el fármaco, para posteriormente ser liberado de las mismas; la matriz cerámica más frecuentemente utilizada para este fin es la de SiO_2 , la cual tiene entre sus características ser inerte, biodegradable, no tóxica y biocompatible ^{12, 13, 14}.



Figura 4. Ejemplos de aplicaciones de biomateriales cerámicos

1.4 Proceso Sol-Gel

En los últimos años ha surgido un gran interés por la incorporación de fármacos en materiales cerámicos a través del método sol-gel; este proceso consiste en la formación de matrices inorgánicas a partir de la formación de una suspensión coloidal llamada sol (dispersión de partículas de diámetro aproximado de 100 Å en un líquido), la que posteriormente se transforma en un gel (sistema de dos componentes de naturaleza semisólida, rica en líquido), y tras un proceso de secado a temperatura ambiente se convierte en un xerogel cuando el tratamiento térmico se lleva a cabo con CO₂ supercrítico se forma un aerogel. Las características del producto final dependen de las condiciones específicas de temperatura, solvente, pH, catalizador, cantidad de agua y tiempo de agitación que sean utilizadas durante el proceso ^{13,15}.

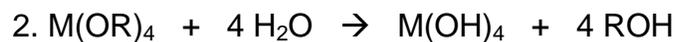
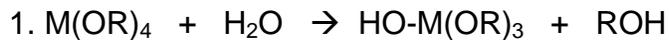
Las ventajas que ofrece este procedimiento para la incorporación de fármacos son: ^{16,17}

- ✓ Homogeneidad de la mezcla de precursores y de la microestructura (uniformidad y distribución de tamaño de partículas).
- ✓ Favorece la fabricación de formas y/o estructuras útiles no tradicionales.
- ✓ Permite la preparación o síntesis a bajas temperaturas.

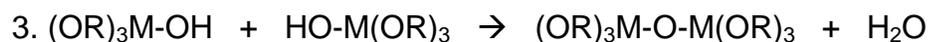
- ✓ La estructura de la matriz se forma con grupos que pueden interaccionar con determinadas especies químicas; lo que permite incorporar enzimas, anticuerpos, células, fármacos, colorantes, etc.
- ✓ Logra la incorporación de fármacos de diferentes tamaños, formas y usos terapéuticos, ya que es posible conseguir una distribución homogénea del principio activo dentro de la matriz.
- ✓ Estas matrices protegen al principio activo contra la degradación antes de ejercer su efecto terapéutico
- ✓

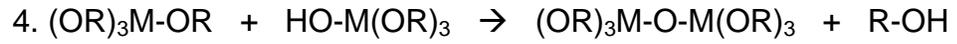
1.4.1 Etapas del proceso Sol-Gel (Figura 5)

a) Hidrólisis.- El proceso inicia con la mezcla de un alcóxido metálico $M(OR)_4$ y agua a temperatura ambiente.



b) Polimerización.- En esta etapa ocurren reacciones de condensación entre moléculas adyacentes con eliminación de moléculas de agua, alcohol y éter (H_2O , ROH y ROR) para formar los enlaces metal-oxígeno. Las cadenas del polímero inorgánico crecen en dimensiones coloidales en el líquido formando el sol.





c) Gelación.- Los polímeros se unen para formar cadenas en tres dimensiones a través del líquido. El sistema se vuelve rígido, dando lugar a la formación del gel. El solvente y el agua permanecen en los poros del gel.

d) Envejecimiento.- Esta etapa permite la maduración del gel, la polimerización y la transformación de fases.

e) Secado.- A través de este proceso se remueven el agua y los solventes a temperaturas menores a 100 °C, dejando un óxido metálico altamente hidroxilado que da como resultado el xerogel.^{18,19}

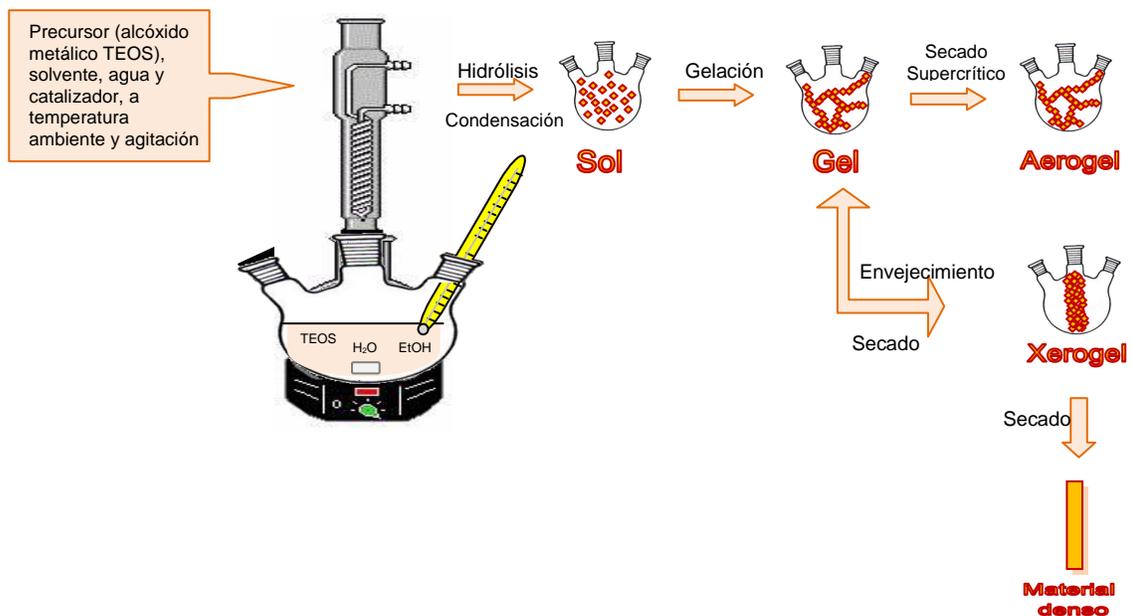


Figura 5. Esquema general del proceso Sol-Gel

1.5 FÁRMACO INCORPORADO: GABAPENTINA

1.5.1. Propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas.

La gabapentina (Figura 6) se conoce como ácido 1-(aminometil)ciclohexanoacético, con una fórmula molecular de $C_9H_{17}NO_2$ y un peso molecular de 171.24. Es un polvo de color blanco con un pK_{a1} de 3.7 y un pK_{a2} de 10.7 correspondientes al grupo carboxilo y amino respectivamente. Es soluble en agua así como en soluciones básicas y ácidas²⁰.

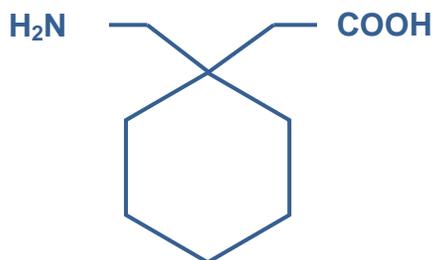


Figura 6. Estructura de la gabapentina

Las propiedades farmacocinéticas de la gabapentina (Tabla 6)^{21,20,22} indican que su biodisponibilidad aumenta al disminuir la dosis, debido a la saturación del transportador utilizado por el fármaco para atravesar las membranas, y que tiene una baja unión a proteínas. La gabapentina se absorbe en el tracto gastrointestinal, principalmente en el intestino delgado; los alimentos no afectan su absorción. La vida media de eliminación de la gabapentina oscila entre 5 y 7 horas. El fármaco se elimina principalmente a través de la orina sin sufrir modificaciones, ya que no es metabolizado en el organismo. La gabapentina presenta un índice terapéutico amplio y parece ser segura aún y cuando haya sobredosificación, esto debido a que la gabapentina se absorbe rápida y parcialmente por el sistema de transporte saturable L-aminoácido, conformado principalmente por L-fenilalanina y L-leucina; cuando la dosis se incrementa disminuye la biodisponibilidad.^{23,24}

Tabla 6. Propiedades farmacocinéticas de gabapentina.

Farmacocinética					
Dosis diaria/Biodisponibilidad	Unión a proteínas	(t ½)	Volumen de distribución	Sitio de absorción	Vía de eliminación
900mg/60% 1200mg/47% 2400mg/34% 3600mg/33% 4800mg/21%	Menor al 3%	5-7 h.	58 a 61 L	50% a 60% absorbido en el tracto gastro intestinal superior	76-81% se elimina vía renal y el 10-23% por vía fecal.

1.5.2 Usos terapéuticos

La gabapentina (Neurontin®) desde su comercialización en diciembre de 1993 fue aprobada por la FDA como tratamiento único de crisis convulsivas parciales, con o sin generalización secundaria, en adultos y en niños mayores de 12 años. Posteriormente en el año 2000 la FDA incrementó los usos del Neurontin® aprobando este medicamento como tratamiento adjunto en crisis convulsivas parciales, con o sin generalización secundaria, en adultos y en niños mayores de tres años²⁵.

Los primeros fármacos antiepilépticos utilizados para tratar el dolor neuropático fueron la fenitoína y la carbamazepina, el uso de la gabapentina para tratar este padecimiento se inició hasta finales de los 90's²⁶; siendo aprobado hasta febrero del 2005 por la FDA para tratar neuralgia postherpética²⁷, un tipo de dolor neuropático²⁸.

El dolor neuropático se define como aquel dolor iniciado o causado por la lesión o disfunción (enfermedad) del sistema nervioso, según la Asociación Internacional para el Estudio y Tratamiento del Dolor.^{29,30} Generalmente aparece como una sensación de hormigueo o quemazón, también puede ser punzante y de gran intensidad. En otras ocasiones puede producir una sensación de cosquilleo, dolor sin motivo o sensaciones que parecen ser más intensas que las normales. (Figura 7.)³¹

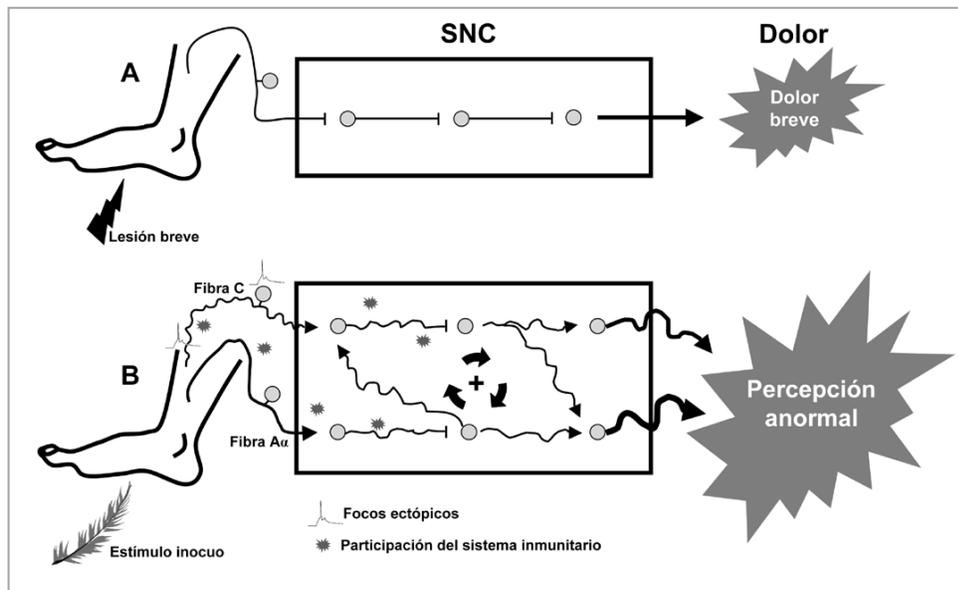


Figura 7. Dolor fisiológico (A) vs Dolor neuropático (B).³¹

La etiología del dolor neuropático comprende diversos procesos patológicos que lo originan: neuropatía diabética, dolor postherpético, neuralgia del trigémino, polineuropatía alcohólica, polineuropatía inducida por quimioterapia, neuropatía por VIH, dolor del miembro fantasma, entre muchos otros síndromes asociados al dolor.²⁹ La neuropatía diabética, que se presenta como complicación de la diabetes mellitus, es una de las principales causas relacionadas con el dolor neuropático.³⁰ Debido al exceso de glucosa en la sangre, las fibras nerviosas se modifican estructuralmente provocando la pérdida de su recubrimiento, la mielina. Lo que genera el retardo en la conducción nerviosa de estímulos eléctricos y en los vasos que irrigan los nervios generando un daño isquémico microvascular.³²

De acuerdo con las estadísticas reportadas en enero de 2011, la OMS estima que en el mundo hay más de 220 millones de personas con diabetes, y que muy probablemente, de no mediar intervención alguna, para 2030 la cifra

se habrá duplicado³³. Algunos estudios sugieren que la prevalencia del dolor neuropático asociada a la diabetes varía entre 13 y 24^{29,30}. En el año 2010 se determinó que existían entre 6.5 y 10 millones de diabéticos en México, si se considera la prevalencia de neuropatía diabética mencionada anteriormente, se puede decir que a esta cifra le corresponde un total de 845,000 a 2.400,000 personas que padecen dolor por esta causa³⁴.

A lo largo de dos décadas se han realizado una serie de estudios en los que se comparan los beneficios y efectos de los antidepresivos (estimulantes del SNC), analgésicos y anticonvulsivantes (depresores del SNC) en el dolor neuropático.^{29,30,35} Los datos revelan que los antidepresivos tricíclicos han sido los fármacos más utilizados para este fin, pero dada su limitada eficacia y efectos secundarios, se ha optado por otras alternativas farmacéuticas. Con respecto a los analgésicos, tanto los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como los opiodes tienen una baja eficacia, para aumentar la efectividad de estos últimos se requieren altas dosis, lo que se asocia al desarrollo de serias reacciones adversas³⁶, entre las que destacan, la depresión respiratoria y la dependencia, lo cual limita su uso. En relación a los fármacos anticonvulsivos, que actualmente se consideran el tratamiento de primera elección,³⁰ los que han presentado una buena respuesta son la carbamazepina y la gabapentina, ambos presentan efectos adversos similares tales como sueño y mareos principalmente³⁷; a pesar de contar con esta diversidad de opciones terapéuticas no existe un medicamento completamente eficaz para combatir el

dolor neuropático y en la mayoría de los casos se utilizan combinaciones de varios medicamentos.

Por lo anterior, desarrollar una forma farmacéutica de liberación prolongada a base de gabapentina representa una alternativa más para el tratamiento del dolor neuropático que permita reducir los efectos adversos al disminuir la concentración plasmática máxima alcanzada, consiguiendo mejorar la adherencia al tratamiento farmacológico por parte del paciente, logrando consecuentemente mayor efectividad terapéutica.

1.5.3 Reacciones adversas

Las reacciones adversas que con mayor frecuencia presentan los pacientes bajo tratamiento con gabapentina (Figura 7) son sueño en un 20%, mareos 17%, ataxia 13% y fatiga 11%^{21,20}. Estas reacciones adversas pueden imposibilitar de manera importante al paciente, impidiéndole realizar sus actividades diarias, por ello es necesario buscar, a través de la tecnología farmacéutica, nuevas formas de dosificación que reduzcan los efectos adversos.

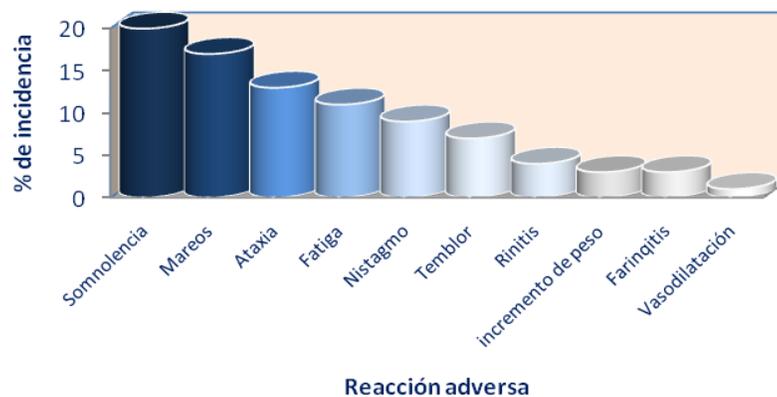


Figura 8. Principales reacciones adversas de la gabapentina

1.5.4 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de la gabapentina aun no es bien comprendido, a pesar de que estructuralmente es similar al neurotransmisor GABA, no se une a sus receptores ($GABA_A$ o $GABA_B$); además los efectos antinociceptivos en modelos de dolor neuropático no son revertidos con la administración de antagonistas de los receptores $GABA_A$ / $GABA_B$.

El mecanismo de acción más aceptado hasta el momento es la interacción con las subunidades de los canales de calcio α -2-6. Esta subunidad expresa 4 isoformas, de las cuales la 1 y la 2, expresan alta afinidad por la gabapentina, las otras dos formas no. Los mecanismos desencadenados son básicamente la reducción de la liberación de neurotransmisores resultando en una disminución de la hiperexcitabilidad neuronal. Estas acciones son llevadas a cabo de manera presináptica y por eso la disminución en el influjo de calcio a este nivel, reduce la presencia de glutamato, sustancia P y norepinefrina en la sinapsis. ^{38,39,40,41}

1.5.5 Marcas comerciales

La Tabla 7 muestra los diferentes medicamentos que contienen gabapentina que son comercializados actualmente en México, así como las diferentes presentaciones en las que se pueden encontrar⁴².

Es importante destacar que todos estos medicamentos son de liberación inmediata y que no existe en el mercado mexicano ningún medicamento de liberación prolongada que contenga gabapentina.

Tabla 7. Medicamentos que se comercializan en México que contienen como principio activo gabapentina.

Nombre comercial	Principio Activo	Indicación Farmacéutica	Laboratorio	Forma Farmacéutica	Presentación
Bapex	Gabapentina	Anticonvulsivo	Probiomed	Cápsulas	300 y 400 mg
Blugat	Gabapentina	Dolor neuropático	Landsteiner Scientific	Cápsulas	300 y 400 mg
Compulxine	Gabapentina	Anticonvulsivo y tratamiento del dolor neuropático	Amstrong	Cápsulas	300 y 400 mg
Gabantin	Gabapentina	Anticonvulsivo	Sun Pharma	Cápsulas	300 y 400 mg
Gapridol	Gabapentina	Anticonvulsivo	Psicofarma	Cápsulas	300 ó 400 mg
Neurontin	Gabapentina	Antiepiléptico	Pfizer	Cápsulas	300, 400 y 600 mg
Nopatic	Gabapentina	Tratamiento del dolor neuropático	Rayere	Cápsulas	300 mg

La Tabla 8 muestra los medicamentos que contienen gabapentina comercializados en E.U.A^{43,44,45}, en este mercado son distribuidas diferentes formas farmacéuticas así como distintas presentaciones a las comercializadas

en México; además recientemente se ha incorporado a la lista, Gralise® una presentación de gabapentina en forma de liberación extendida elaborada a base de una matriz polimérica, así como Horizant® un profármaco.

Tabla 8. Medicamentos que contienen gabapentina comercializados en E.U.A

Nombre comercial	Principio Activo	Indicación Farmacéutica	Laboratorio	Forma Farmacéutica	Presentación
Neurontin	Gabapentina	Antiepiléptico	Pfizer	Cápsulas Tabletas Solución Oral	100, 300, 400 mg 600, 800 mg 250 mg/5 mL
Gabapentin	Gabapentina	Antiepiléptico	Actavis Elizabeth, TEVA, Sandoz, Apotex Inc, Watson Labs, Sun Pharma.	Solución Oral Cápsulas Tabletas	250 mg/5 mL 100, 300, 400 mg 100, 300, 400, 600, 800 mg
Gralise	Gabapentina	Antiepiléptico	Abbott Prods	Tabletas de liberación extendida	300, 600mg
Horizant	Gabapentina Enacarbil	Antiepiléptico	GlaxoSmithKline Xenoport	Tabletas de liberación extendida	600 mg

1.6 Validación de métodos analíticos

Con el interés de desarrollar nuevas formas farmacéuticas y evaluar su comportamiento de liberación; resulta crucial contar con métodos analíticos validados para cuantificar el o los fármacos de interés. La validación es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos para la aplicación propuesta. Los parámetros analíticos que se utilizan son los siguientes: ^{46,47,48,49}

a) Estabilidad de la muestra: es la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

b) Exactitud: es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

c) Linealidad: es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.

d) Límite de detección: es la mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.

$$\text{LOD} = 3.3 \sigma / S$$

e) Límite de cuantificación: es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

$$\text{LOQ} = 10 \sigma / S$$

Donde: σ = desviación estándar de la respuesta.

S = La pendiente de la curva de calibración.

f) Precisión: es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

g) Repetibilidad: es la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

h) Selectividad: es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

Capítulo 2

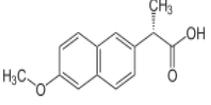
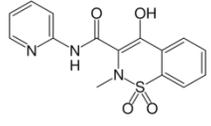
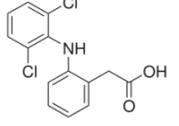
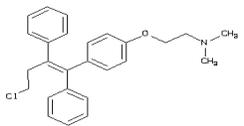
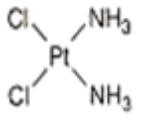
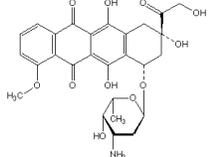
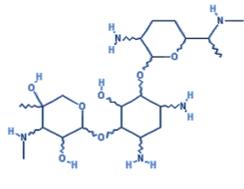
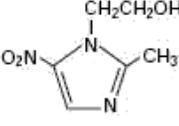
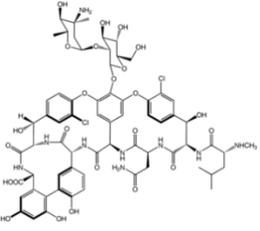
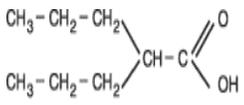
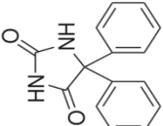
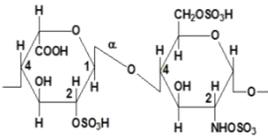
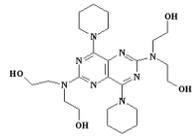
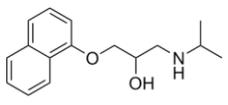
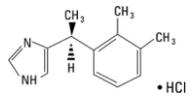
ANTECEDENTES

2.1 Análisis crítico de la literatura

El proceso sol-gel es un método muy versátil, las matrices inorgánicas formadas por este método son inertes, económicas y no causan ningún riesgo para la salud ni para el medio ambiente, se eliminan del organismo principalmente en orina en forma de Si(OH)_4 o son fagocitadas por los macrófagos^{50,51}; así mismo con esta técnica es posible incorporar en las matrices cerámicas una gran variedad de compuestos como vitaminas, minerales, enzimas, anticuerpos y fármacos entre otros.¹³ A continuación, dado el objetivo de este trabajo se consideraron estudios sobre diversos fármacos que han sido incorporados en matrices cerámicas en los últimos años (Tabla 9), así como algunos estudios relacionados con nuevas formas farmacéuticas de liberación prolongada de gabapentina y las técnicas analíticas para cuantificar dicho fármaco.

2.1.1 Fármacos incorporados en matrices cerámicas

Tabla 9. Fármacos incorporados en matrices cerámicas

Clasificación Terapéutica	Fármacos		
AINES	Ibuprofeno ⁵⁷ 	Piroxicam ⁵⁹ 	Diclofenaco ⁶³ 
Antineoplásicos	Toremifeno ¹² 	Cisplatino ¹⁷ 	Doxorrubicina ⁶⁰ 
Antibióticos	Gentamicina ⁵⁴ 	Metronidazol ⁶⁴ 	Vancomicina ⁵⁶ 
Antiepilépticos	Ácido Valproico ⁶² 	Fenitoína ⁶² 	
Anticoagulantes	Heparina ¹⁴ 	Dipiridamol ⁵⁸ 	
Antihipertensivos	Propranolol ⁶¹ 	Sedantes	Dexmedetomidina ⁵² 

En 1998, Pirjo Korteso y colaboradores sintetizaron xerogel de sílice para utilizarlo como implante, incorporando el fármaco toremifeno que se utiliza para tratar cáncer de mama. El grupo de investigación realizó estudios *in vitro* e *in vivo* en ratones, encontrando que la liberación del fármaco era controlada y que la degradación de la sílice implantada en los ratones no presentó efectos tóxicos.¹² El mismo grupo de investigación en el 2002 sintetizó, a distintas condiciones de pH y de relación agua/tetraetoxisilano (TEOS), micropartículas de gel de sílice en varias formulaciones, como una posibilidad en el control de liberación del fármaco dexmedetomidina, utilizado como sedante, encontrando que la incorporación del principio activo se ve afectada por el pH y por la relación agua/tetraetoxisilano y que el biomaterial no presenta efectos tóxicos en animales.⁵²

Santos y colaboradores, en 1999, lograron incorporar proteínas que actúan como factores de crecimiento a través del proceso sol-gel, demostrando que es viable la incorporación de moléculas biológicas en matrices cerámicas. La liberación de las mismas ocurrió de manera lenta y controlada tomando varias semanas.⁵³

En el año 2000 fue incorporada la heparina, un anticoagulante ampliamente utilizado, en una matriz de SiO₂ por el método sol-gel; el estudio logró demostrar que es posible incorporar el anticoagulante en el biomaterial para después ser liberado durante un tiempo prolongado. Se observó que la degradación del xerogel es lineal (orden zero) y que la concentración de

heparina no se ve afectada por dicha degradación; además se determinó que la liberación de la heparina fue más lenta cuando después de la síntesis, el biomaterial se sometió a un proceso de secado más intenso, en comparación con la matriz que contenía más humedad, también influyeron las condiciones de pH que se manejaron durante la síntesis, se observó una liberación más rápida (1 h) cuando se utilizó ácido nítrico (pH 2.5) que con la efectuada usando ácido acético (5 h a pH 4.5).¹⁴

En 2002, Meseguer-Olmo y colaboradores elaboraron un implante mediante la técnica sol-gel, donde se incorporó sulfato de gentamicina (antibiótico) en un material bioactivo formado de $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_2$. El biomaterial generado fue implantado en el fémur de conejos; durante la investigación observaron la liberación del antibiótico y determinaron la concentración en el hueso distal, hígado, riñones y pulmones a diferentes tiempos, así mismo se percataron del crecimiento del hueso debido a la reactividad del material vítreo con el ambiente biológico.⁵⁴ Este mismo grupo en el 2006 realizó un estudio muy similar al anterior, observando que los implantes promueven el crecimiento del hueso durante el proceso de reabsorción.⁵⁵ Dentro de esta línea de implantes óseos para combatir infecciones a nivel de hueso, Christopher Adams y colaboradores en 2009 incorporaron en una matriz de TiO_2 , vancomicina, evaluaron la osteomielitis en un modelo de ratas demostrando que el antibiótico inhibió significativamente al *S. aureus*, confirmando que el proceso sol-gel es una herramienta útil para la elaboración de matrices porosas que permiten la liberación de fármacos en el sitio de interés.⁵⁶

En el año 2005 otro grupo de investigación reportó un estudio relacionado con la preparación de microesferas de sílice encapsulando ibuprofeno y naproxeno; encontraron que se logró una mejor incorporación del ibuprofeno que del naproxeno sugiriendo que ésta depende de la solubilidad del fármaco en el TEOS.⁵⁷ Así mismo, Bgershausen y colaboradores demostraron que el principio activo del persantin (dipiridamol) puede ser incorporado en una matriz sintetizada por sol-gel y que la cinética de liberación depende fuertemente de los parámetros de síntesis (pH y composición de la matriz).⁵⁸

Hernández A. y colaboradores en el 2007 lograron incorporar en un material cerámico de sílice un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo, el piroxicam, a través del método sol-gel, variando diferentes parámetros de la síntesis, tales como el pH (3 y 5) y la relación alcóxido/agua (1:6 y 1:8); en dicho estudio la mejor incorporación del fármaco anti-inflamatorio se obtuvo a pH 5 y la relación molar 1:6.⁵⁹ En este mismo año, Prokopowicz y colaboradores incorporaron en matrices cerámicas mediante el proceso sol-gel, el fármaco doxorubicina que se utiliza para combatir algunos tipos de cáncer, este grupo de investigadores sintetizó diferentes xerogeles de SiO₂ variando el tiempo de envejecimiento de los mismos, posteriormente evaluaron la absorción y desorción del fármaco de la matriz, encontraron que el biomaterial con mayor tiempo de maduración presentaba una disminución en la tasa de liberación del fármaco, debido a que se reduce el tamaño de poro y se incrementa el área superficial, liberándose de forma sostenida.⁶⁰

El propranolol y persantin fueron encapsulados en el 2008 por Geo Paul y colaboradores a través del proceso sol-gel en una matriz híbrida *in situ*. Se determinó que el ensamblaje del fármaco, la estructura de los poros y los tipos de interacciones se deben principalmente a los parámetros de síntesis tales como pH, temperatura y composición de la matriz, en el estudio encontraron una tasa de liberación más lenta para el persantin que para el propranolol, esto debido a las propiedades fisicoquímicas características de cada fármaco: tamaño molecular, solubilidad y pKa.⁶¹

En 2009 Fidalgo A. y colaboradores sintetizaron matrices de SiO₂ producidas bajo diferentes condiciones de hidrólisis, utilizado como principio activo un fármaco antiepiléptico (fenitoína sódica). La cinética de liberación *in vitro* del principio activo se estudió a 37°C, en agua y en líquido cefalorraquídeo artificial. Las matrices con la porosidad total más baja y menor tamaño de poro promedio resultaron ser mejores para la liberación a largo plazo.⁶²

Czarnobaj K. y colaboradores en el 2007 incorporaron vía sol-gel cisplatino (fármaco antineoplásico) en tres matrices, SiO₂, SiO₂-PDMS, SiO₂-PEG, el resultado indicó que el uso de impurezas orgánicas (PEG) en el gel de sílice aumenta la liberación de cisplatino del biomaterial de un 62% a 97% en 7 días comparado con la matriz pura (SiO₂) y la matriz híbrida SiO₂-PDMS, que presentaron una liberación similar. La incorporación de PDMS y PEG durante la síntesis de TEOS, provoca un incremento en el tamaño de poro, en

comparación con la matriz pura, además que la sustitución con PEG aumenta la hidrofiliidad de la matriz y permite que el agua penetre dentro de la sílice y acelere la difusión del cisplatino. Aunque la matriz SiO₂-PDMS también tiene una porción orgánica, se explica su disminución en la liberación de cisplatino debido a su naturaleza hidrofóbica que le aportan los -CH₃ presentes en ella, dificultando así la interacción con las moléculas de H₂O. En este mismo estudio se probaron distintas temperaturas de secado y se encontró que el tratamiento térmico a 80 °C de las matrices híbridas con cisplatino dio como resultado la aceleración de la liberación del fármaco; en 2 días se liberó entre 89% y 98% de cisplatino. Debido a que se removi6 considerablemente el solvente de los poros, facilitando la difusión del fármaco. Sin embargo el incremento de la temperatura (120 °C) en la matriz pura tuvo como resultado la disminución de la liberación de cisplatino (40%) debido al cierre y contracción de los poros de la matriz. Dentro del estudio *in vitro* se observó que el cisplatino fue liberado en dos etapas, durante las primeras 3 h la liberación ocurri6 de forma rápida, el tiempo restante sucedi6 de manera lenta y controlada, esto indica que primero hubo una liberación de la superficie y posteriormente la liberación del cisplatino incorporado en los canales de los poros. La liberación de cisplatino de las matrices SiO₂ y SiO₂-PDMS ocurri6 principalmente por difusión, en el caso de SiO₂-PEG la liberación ocurri6 por difusión e hinchamiento de la matriz.¹⁷ Este mismo grupo en el 2008 utiliz6 la técnica sol-gel para incorporar el antiinflamatorio diclofenaco dietilamino, en el estudio se probaron diferentes condiciones de pH y temperatura de secado, se trabaj6 con matrices de SiO₂ sintetizadas en condiciones ácidas (HCl pH 4) y básicas (NH₃ pH 9); además se

observó el comportamiento de las matrices ácidas y básicas, cuando se secaron a temperatura ambiente (25 °C) y a 120 °C. Los resultados para diclofenaco mostraron que las matrices alcalinas presentaron una liberación más rápida debido a una mayor área superficial y mayor tamaño de poro, mientras que en las matrices sintetizadas en condiciones ácidas no fue posible la liberación del fármaco, esto se puede explicar debido a su baja porosidad, la cual no se pudo determinar, el diámetro de las matrices era tan pequeño que el equipo (BET) no pudo detectarlo. Con respecto a la temperatura de secado se encontró que a 120 °C disminuye la liberación de diclofenaco en las matrices alcalinas, debido a que los poros estaban demasiado cerrados. La liberación (matrices alcalinas) en las pruebas *in vitro* indicó que sucede en dos etapas primero se libera la capa superficial de forma rápida y posteriormente lo hace de forma lenta y controlada.⁶³ En el 2010 este grupo de investigadores mediante el proceso sol-gel sintetizaron xerogeles inorgánicos (SiO₂) e híbridos (inorgánico-orgánico SiO₂-PDMS, SiO₂-PDMS-CaO, SiO₂-CaO) en los cuales incorporaron metronidazol para comparar cómo afectan las propiedades físicas y morfológicas en la liberación del fármaco, el resultado del estudio concluyó que para metronidazol la matriz de SiO₂ logra el 100% de liberación del fármaco de forma rápida durante las primeras 4 h y posteriormente de forma sostenida, éste xerogel presentó mayor área superficial y mayor diámetro de poro comparado con los preparados híbridos, demostrando que las características físicas del biomaterial están directamente relacionadas con la tasa de liberación del fármaco.⁶⁴

2.1.2 Estudios de gabapentina de liberación sostenida

Recientemente, el encapsulamiento de fármacos se ha encaminado a encontrar formas farmacéuticas que puedan utilizarse como potenciales vectores, para sistemas de liberación controlada dirigidos al sitio de acción.⁶⁵

En 2007 Rhee Y. y colaboradores realizaron un estudio con la gabapentina, en el cual compararon la relación *in vitro/ in vivo* de una forma de liberación sostenida elaborada a base de polímeros contra la forma de liberación inmediata. Ambas formas farmacéuticas fueron sometidas a pruebas de disolución (*in vitro*), utilizando como medios de disolución jugo gástrico e intestinal sin enzimas. Los resultados de las pruebas *in vitro* indican que la gabapentina de liberación inmediata, se liberó transcurrida 1 h de la disolución, mientras que la gabapentina de liberación sostenida lo hizo a las 12 h. El estudio *in vivo* fue realizado con perros *beagle* a los cuales se les administraron el equivalente a 600 mg de gabapentina por vía oral, observando que la forma de liberación sostenida tuvo un comportamiento farmacocinético igual a la forma de liberación inmediata; concluyendo que la liberación *in vivo* no está correlacionada con la liberación *in vitro*. Cabe mencionar que la forma de preparación de la gabapentina de liberación sostenida en este trabajo fue por el método de granulación húmeda utilizando una solución de polivinilpirrolidona en etanol y mezclando posteriormente el granulado con óxido de polietileno y celulosa.⁶⁶ Este estudio muestra el interés por desarrollar una forma de liberación prolongada de gabapentina, sin embargo, el sistema estudiado no fue

adecuado ya que al parecer este polímero no le da la propiedad de liberación sostenida que se busca *in vivo*.

La compañía farmacéutica Depomed desarrolló la gabapentina en forma de liberación extendida mediante la tecnología AcuForm® a base de polímeros, la cual se encuentra patentada. En el 2006 la empresa farmacéutica publicó los resultados obtenidos de los estudios en fase III de la gabapentina para neuralgia postherpética y fase II para neuropatía diabética periférica; en los estudios se encontró que las principales reacciones adversas para ambos usos terapéuticos fueron principalmente mareos y somnolencia, sin embargo comparados con los efectos adversos reportados en la literatura para la gabapentina de liberación inmediata (Figura 7) se observó una disminución considerable; la incidencia de reacciones adversas para la neuralgia posherpética fueron mareos (10.1%, 14% y 3%) para una dosis de 1800 mg diarios administrada en una sola toma, dos veces diarias y placebo, respectivamente.

Para neuropatía diabética, la frecuencia de mareos como reacción adversa en la población expuesta fue de 17% para una dosis diaria en un sola administración y 12.2% para la misma dosis dividida en dos tomas; con respecto a la somnolencia los resultados fueron de 12.8% y 4.1% respectivamente. Por otra parte, la gabapentina de liberación extendida disminuyó el dolor con respecto a los usos terapéuticos mencionados de manera similar a la gabapentina de liberación inmediata.⁶⁷

Dados los resultados, el 28 de enero de 2011 fue aprobada esta forma farmacéutica por la FDA, bajo el nombre de Gralise®, para el tratamiento de la neuralgia postherpética, siendo el primer fármaco de gabapentina en forma de liberación extendida a base de polímeros.^{45,68}

Aunque los resultados reportados han sido satisfactorios, debido a la variabilidad de respuesta entre pacientes, es importante ampliar la investigación para obtener nuevas formas farmacéuticas de liberación sostenida de gabapentina. La incorporación de este fármaco en un material cerámico obtenido vía sol-gel, representa una alternativa más para el desarrollo de dichas formas farmacéuticas.

2.1.3 Métodos analíticos validados para cuantificar gabapentina.

Una parte muy importante para determinar la liberación del fármaco, lo representan las técnicas analíticas validadas que permiten identificar y cuantificar el analito de interés.^{48,49} A continuación se hace una revisión de algunos métodos analíticos reportados para la cuantificación de gabapentina en solución y en fluidos biológicos. Entre las técnicas analíticas reportadas se encuentran: la cromatografía de gases (GC-MS) acoplada a espectrometría de masas⁶⁹, cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS)^{70,71}, electroforesis capilar⁷², cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), así como espectrofotometría UV-Vis^{73,74,75,76}. Debido a que la estructura del fármaco sólo contiene un grupo cromóforo, presenta una

absorción baja en ultravioleta y nula en visible, esto ha generado el desarrollo de técnicas que incluyan una derivatización para formar un compuesto detectable por fluorescencia⁷⁷ o espectrofotometría visible⁷⁸.

En la Tabla 10 se muestra una comparación de los métodos analíticos utilizados para la cuantificación de gabapentina, se puede observar que la mayoría de las técnicas implican derivatización para cuantificar el principio activo, además que los equipos con detector de espectroscopia de masas (MS) tienen una mayor sensibilidad.

Tabla 10. Cuadro comparativo de métodos analíticos propuestos para gabapentina

Autor	Año	Instrumento Analítico	Detector	Rango de linealidad	Derivatización
Zhu, y col. ⁷³	2002	HPLC	UV	0.03-10µg/mL	Fenilisotiocianato
Ramakrishna, y col. ⁷⁰	2005	LC	MS/MS	40-10 000 ng/mL	No aplica
Bahrami y col. ⁷⁷	2006	HPLC	Fluorescencia	0.002 a 15 µg/mL	4-cloro-7-nitrobenzofurazan
Ojha y col. ⁷¹	2007	LC	MS	0.5-64 ng/L	No aplica
LaPorte y col. ⁷⁸	2007	Espectrofotometría	UV-Vis	0.13 mg/L-0.70 mg/L	Ninhidrina
Jalalizadeh ⁷⁴	2007	HPLC	Arreglo diodos	0.05- 5 µg/mL	1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno
Gujral y col. ⁷⁵	2009	HPLC	UV	0.1 a 3.8 mg/mL	No aplica
Amini y col. ⁷⁶	2010	HPLC	UV-Vis	0.12 a 6,0 µg /mL	4-nitrofenilisotiocianato

Analizar los diferentes métodos analíticos validados permite tener panorama de opciones en técnicas analíticas con las que se puede trabajar, además de poder comparar las ventajas y desventajas entre ellas, ayuda a evaluar la disponibilidad de equipos en las instalaciones de trabajo, aunado a los diferentes reactivos y materiales necesarios para lograr los resultados; así mismo, este análisis brinda la facilidad de elegir una metodología en función de las especificaciones requeridas para el proyecto, entre las que se destaca la sensibilidad de detección.

2.2 Hipótesis

La gabapentina incorporada en una matriz de SiO₂ sintetizada vía sol-gel se liberará de forma sostenida.

2.3 Objetivo General

Evaluar *in vitro*, a pH gástrico (1.2) e intestinal (6.8), e *in vivo* utilizando animales de experimentación, las características de liberación de la gabapentina incorporada en un biomaterial.

2.4 Objetivos Específicos

1.-Determinar el porcentaje de liberación de gabapentina a partir del biomaterial cerámico a pH gástrico *in vitro*.

2.-Determinar el porcentaje de liberación de gabapentina a partir del biomaterial cerámico a pH intestinal *in vitro*.

3.-Evaluar indirectamente, a través de la concentración plasmática, el grado de liberación de gabapentina de la matriz cerámica *in vivo* utilizando animales de experimentación.

4.- Comparar la liberación del fármaco incorporado en el biomaterial con la del fármaco de liberación inmediata actualmente disponible en el mercado.

Capítulo 3

MATERIALES Y MÉTODOS

1.4 Materiales

3.1.1. Reactivos

- ✓ Acetato de Amonio R.A. (CTR Scientific)
- ✓ Acetonitrilo (Grado HPLC, TEDIA)
- ✓ Ácido Clorhídrico A.C.S., HCl (J.T Baker)
- ✓ Agua (Grado HPLC, Tedia)
- ✓ Agua bidestilada (CTR Scientific)
- ✓ Agua desionizada (FCQ, UANL)
- ✓ Cloruro de Sodio, NaCl (CTR Scientific RA)
- ✓ Etanol RA (CTR Scientific)
- ✓ Fosfato diácido de potasio, KH_2PO_4 (Grado RA, CTR Scientific)
- ✓ Fosfato diácido de sodio monohidratdo, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich RA)
- ✓ Fosfato dibásico de sodio heptahidratado, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich)
- ✓ Gabapentina (Grado USP, Spectrum Laboratory Products Inc.)
- ✓ Hidróxido de Sodio A.C.S., NaOH (CTR Scientific)
- ✓ Metanol (Grado HPLC, J.T.Baker)
- ✓ Ninhidrina (FCQ, UANL)

3.1.2 Equipos

- ✓ Balanza analítica (AND, HR-200)
- ✓ Baño de ultrasonido (Branson 2510R- MTH)
- ✓ Centrífuga refrigerada (Thermo Electron, CentraCL 3R)
- ✓ Cromatógrafo de líquidos de Alta Resolución, HPLC (Waters, 2695), con detector de arreglo de diodos (Waters, 2996)
- ✓ Cromatógrafo de líquidos Agilent, Bomba Binaria 1200 (G1312A), con detector de masas (Agilent 6130)
- ✓ Disolutor Vankel (Modelo VK7000)
- ✓ Equipo de Infrarrojo (Thermo Scientific, Nicolet IR200)
- ✓ Espectrofotómetro UV-Vis (Perkin-Elmer, Lambda 2S)
- ✓ Incubadora con agitación (Barnstead-Labline SHK4000)
- ✓ Micropipetas 10-100 y 100-1000 μL (CTR Scientific)
- ✓ Microprocesador y sistema de circulación (Modelo VK650A)
- ✓ Placa de calentamiento y agitación (Cimarec, Barnstead/Thermolyne)
- ✓ Potenciómetro (Corning, Modelo 430)

3.1.3 Ubicación del Equipo

Pruebas *in vitro*: Laboratorio de Biofarmacia, Laboratorio de Biotecnología y Laboratorio de Síntesis Orgánica CELAES, FCQ, UANL.

Pruebas *in vivo*: Clínica Veterinaria Especializada.

3.2. Metodología General

El desarrollo de este proyecto se dividió en cuatro etapas:

- a) Validación de métodos analíticos
- b) Extracción de gabapentina de los biomateriales G5REL16 y G9REL18
- c) Estudios de liberación de gabapentina *in vitro*
- d) Estudios de liberación de gabapentina *in vivo*

3.2.1 Validación de los métodos analíticos

La validación de métodos analíticos consistió en evaluar experimentalmente los parámetros de linealidad, exactitud, precisión, LOD, LOQ, reproducibilidad y selectividad para asegurar que los procedimientos son aplicables para el objetivo que fueron diseñados. En esta sección se presentan algunos métodos analíticos propuestos para cuantificar gabapentina en solución o en plasma, haciendo uso de diferentes técnicas y equipos instrumentales.

3.2.1.1 Validación del método para cuantificar gabapentina por HPLC con detector de arreglo de diodos sin derivatización.

✓ Preparación de la Fase Móvil (FM)

Consistió en una mezcla de buffer de KH_2PO_4 (0.028 M; pH 5.2), metanol y acetonitrilo (65:25:10, v/v). A la solución buffer de KH_2PO_4 (3.81 g en 1 L de agua HPLC) se le ajustó el pH añadiendo NaOH al 10% (10 g. en 100 mL). Una vez realizada la mezcla se filtró a vacío con membranas de policarbonato, con tamaño de poro de 0.2 μm (Nuclepore™ track-etched Whatman) y se degasificó en ultrasonido por 15 minutos. Todos los solventes utilizados para la preparación de FM fueron grado HPLC.⁷⁵

✓ Preparación de estándares de gabapentina

Se preparó una solución stock de 100 mg/L de gabapentina (10 mg en 100 mL de Fase Móvil), a partir del stock se prepararon estándares en concentraciones de 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mg/L, utilizando Fase Móvil para aforar a 10 mL, (Tabla 11). El rango de trabajo se estableció en función a las concentraciones de gabapentina esperadas en las pruebas de liberación *in vitro*.

Tabla 11. Preparación de estándares de gabapentina en solución HPLC.

Estándar de gabapentina (mg/L)	Volumen solución <i>stock</i> 100 mg/L (µL)
1	100
5	500
10	1000
20	2000
30	3000
40	4000
50	5000

✓ Separación cromatográfica

Para llevar a cabo la separación cromatográfica se utilizó una columna con partículas de sílice (Hypersil) con octadecil silano (C18), con un tamaño de partícula de 5 µm y dimensiones de 250 x 4.50 mm (Phenomenex), además se colocó una precolumna (C18). Se inyectaron 100 µL de cada estándar de gabapentina, a una velocidad de flujo de 1.0 mL/min en el cromatógrafo de líquidos Waters (modelo 2695), con detector de arreglo de diodos a $\lambda = 210$ nm. Figura 8. El proceso se realizó por triplicado.

✓ Análisis de resultados

Mediante el software de datos cromatográficos Empower, se manipula el sistema completo del Cromatógrafo de Líquidos y permite la visualización de los cromatogramas. Para el análisis de los datos obtenidos por triplicado se utilizó hoja de cálculo Excel; donde se obtuvo el coeficiente de correlación, el porcentaje de error, LOD, LOQ.

✓ Manejo de residuos

Los residuos generados provenientes de la FM y los estándares de gabapentina se depositaron en el colector C, indicado para el manejo de tóxicos e inflamables, bases orgánicas y aminas, y solventes orgánicos no halogenados.



Figura 9. Cromatógrafo de líquidos. HPLC Waters 2695

3.2.1.2. Validación del método para determinar gabapentina mediante la reacción de derivatización con ninhidrina por espectrofotometría UV-Visible.

La ninhidrina es un oxidante fuerte que provoca la descarboxilación oxidativa y desaminación de los aminoácidos. Este método se basa precisamente en la reacción de la ninhidrina (hidrato de tricetohidrindeno) con las aminas primarias y secundarias de los α -aminoácidos a temperaturas elevadas, formándose amoniaco y anhídrido carbónico por reducción de la ninhidrina a hidrindantina. Los productos de la primera etapa reaccionan con otra molécula de ninhidrina generando un compuesto de coloración azul-púrpura, denominado púrpura de Rutherford. El cromóforo puede ser detectado a 402 nm y 568 nm. ^{78,}

79,80

La gabapentina a pesar no ser un aminoácido, posee un grupo amino primario por lo que puede reaccionar con la ninhidrina, como se muestra en la Figura 10.

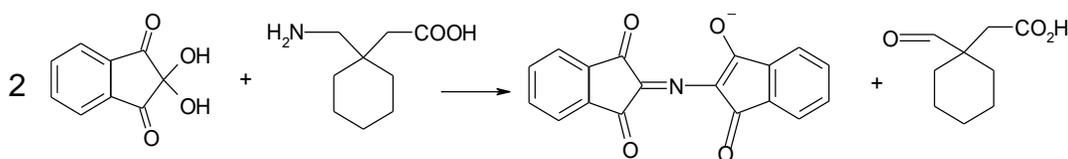


Figura 10. Reacción de derivatización de gabapentina con ninhidrina

✓ Preparación de estándares de gabapentina

Se pesaron 125 mg de gabapentina y se aforó a 250 mL con agua desionizada, para formar una solución stock de 500 mg/L. Partiendo de esta solución se prepararon estándares de gabapentina en agua desionizada, el volumen de solución *stock* correspondiente a la concentración del estándar se muestra en la Tabla 12, dichos estándares se elaboraron por triplicado en concentraciones de 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 mg/L y se colocaron en matraces de aforación correspondientes a la denominación de 50 mL.

Tabla 12. Preparación de estándares de gabapentina en solución UV-Vis

Estándar de gabapentina (mg/L)	Volumen solución <i>stock</i> 500 mg/L (mL)
120	12
180	18
240	24
300	30
360	36
420	42
480	48

✓ Reacción de derivatización

Para la formación del cromóforo se tomaron 5 mL de estándar, 1 mL de solución de ninhidrina al 0.8% y 0.5 mL de buffer de KH_2PO_4 0.2 M pH 6, posteriormente se colocaron en tubos con taparosca. La mezcla respectiva de cada estándar fue sometida a baño de temperatura a 85 °C durante 30 minutos; transcurrido este tiempo la reacción se detuvo al colocar en hielo, después se hizo una dilución 1:10 con agua desionizada. Posteriormente, se tomaron lecturas de absorbancia de las soluciones en un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin-Elmer, Lambda 2S) a $\lambda_{\text{max}}=568$ nm. El proceso se representa en la figura 11.

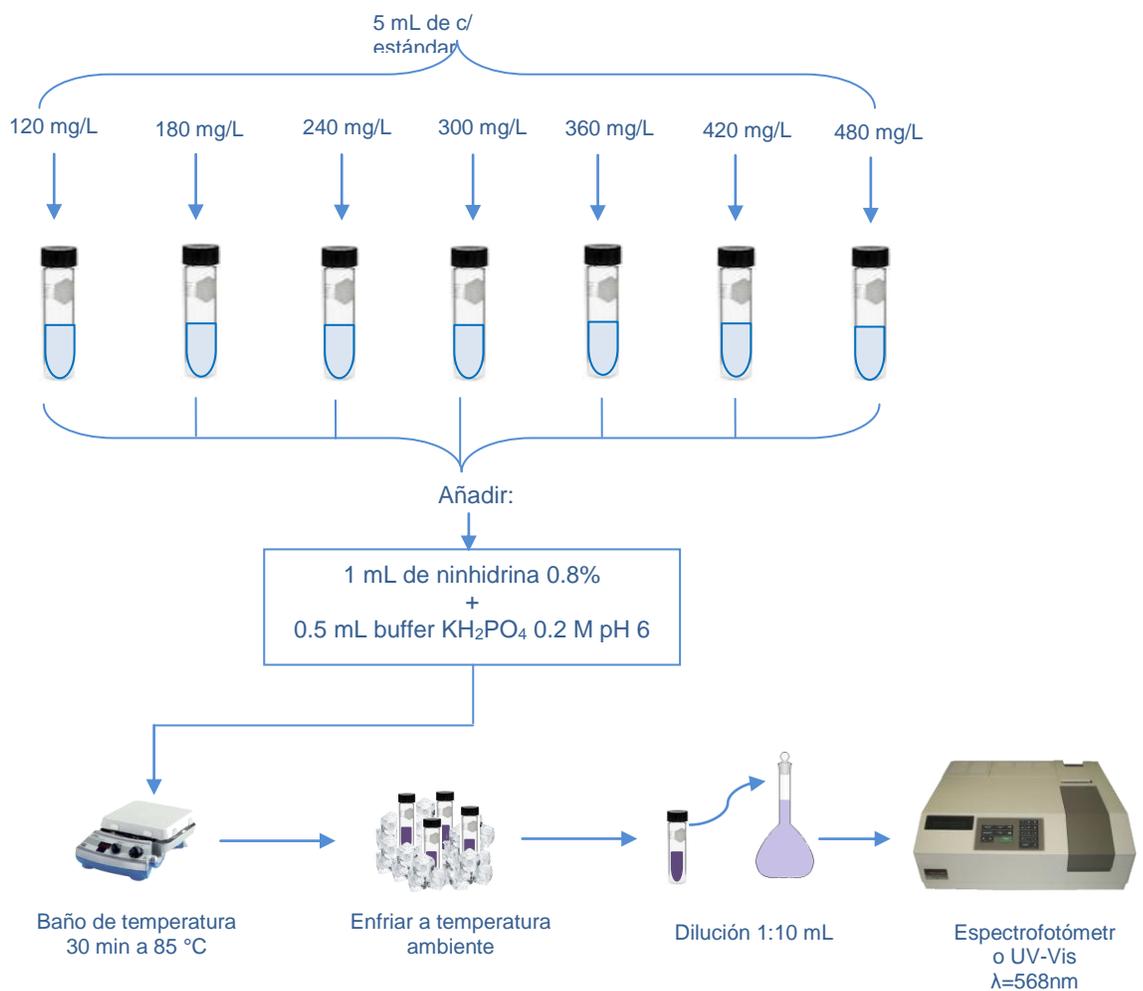


Figura 11. Esquema de reacción de derivatización con ninhidrina.

✓ Análisis de resultados

Los datos se analizaron a través del software Excel con el que se hicieron las curvas de calibración y los cálculos necesarios (coeficiente de correlación, porcentaje de error, LOD, LOQ) para determinar los parámetros analíticos de validación.

✓ Manejo de residuos

Los residuos generados fueron neutralizados y depositados en el contenedor A destinado para la colocación de soluciones salinas a pH 6-8, soluciones de sales inorgánicas, ácidos inorgánicos, ácidos orgánicos y bases inorgánicas.

3.2.1.3. Validación del método para cuantificar gabapentina mediante LC/MS

✓ Preparación de Fase Móvil (FM)

La fase móvil consistió en una mezcla de acetato de amonio 5mM y acetonitrilo (50:50 v/v). La solución de acetato de amonio 5mM se realizó pesando, 0.1927 g del reactivo y se disolvió en 500 mL de agua bidestilada; posteriormente se filtró con membranas de celulosa, tamaño de poro de 0.45 μm Millipore™, finalmente se sometió a ultrasonido por 15 minutos para degasificar.

✓ Preparación de estándares de gabapentina en plasma humano

Se pesaron 10 mg de gabapentina, los cuales se dispusieron en un matraz volumétrico de 10 mL y se completó a la marca con metanol grado HPLC, para tener una concentración de 1 mg/mL, de esta solución se tomaron 100 μL y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL para aforar con plasma, elaborando un *stock* de 10 $\mu\text{g/mL}$. A partir de esta solución *stock* se prepararon estándares de gabapentina en concentraciones de 5, 2.5, 1.0, 0.5, *0.25,* 0.1, *0.05 $\mu\text{g/mL}$ por quintuplicado. En la Tabla 13 se indica la preparación de los estándares; para preparar 1 mL de estándar de 5 $\mu\text{g/mL}$, se utilizó una micropipeta calibrada con la cual se tomaron 500 μL de plasma, se colocaron en un tubo *ependorf* y posteriormente se le adicionaron 500 μL de la solución *stock* (10 $\mu\text{g/mL}$). Este mismo procedimiento se repitió para todos los estándares en función de su concentración, excepto para el de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ del que se prepararon 2 mL y para los controles, los cuales se prepararon a

concentraciones de 0.175, 0.75, 3.5, 7.5 µg/mL. De igual manera se preparó el stock de 10 µg/mL y estándares de gabapentina en solución (metanol:H₂O, 50:50), a las mismas concentraciones. (Pruebas de extracción y liberación *in vitro* de gabapentina.)

Tabla 13. Preparación de estándares de gabapentina en plasma LC/MS

Estándar (µg/mL)	Volumen de plasma/ metanol:H₂O (50:50) (µL)	Volumen de stock (10 µg/mL)	Volumen final de estándar
5	500	500	1mL
2.5	750	250	1mL
1.0	900	100	1mL
0.5	1,900	100	2mL
*0.25	500	500	1mL
*0.1	800	200	1mL
*0.05	900	100	1mL
Controles (µg/ml)	Volumen de plasma/ metanol:H₂O (50:50) (µL)	Volumen de stock (10 µg/mL)	Volumen final de estándar
7.5	500	1500	2mL
3.5	1300	700	2mL
0.75	1850	150	2mL
0.175	1965	035	2mL

*Los estándares de gabapentina en plasma/metanol-H₂O de las concentraciones 0.25, 0.1, 0.05 µg/mL fueron preparados a partir del estándar de 0.5 µg/mL para evitar errores en la manipulación de volúmenes pequeños.

✓ Precipitación de proteínas

50 μL de cada estándar de gabapentina o muestra en plasma, se colocaron de manera independiente en tubos *ependorf*, el proceso de precipitación prosiguió con la adición de 300 μL de acetonitrilo; posteriormente se agitó en vortex por 4 minutos a 60 rpm y se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos a 10 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente se transfirieron 300 μL del sobrenadante de cada uno de los estándares/ muestras, a viales con inserto de polipropileno y se inyectaron en el cromatógrafo LC/MS Agilent G1312A. Figura 12.

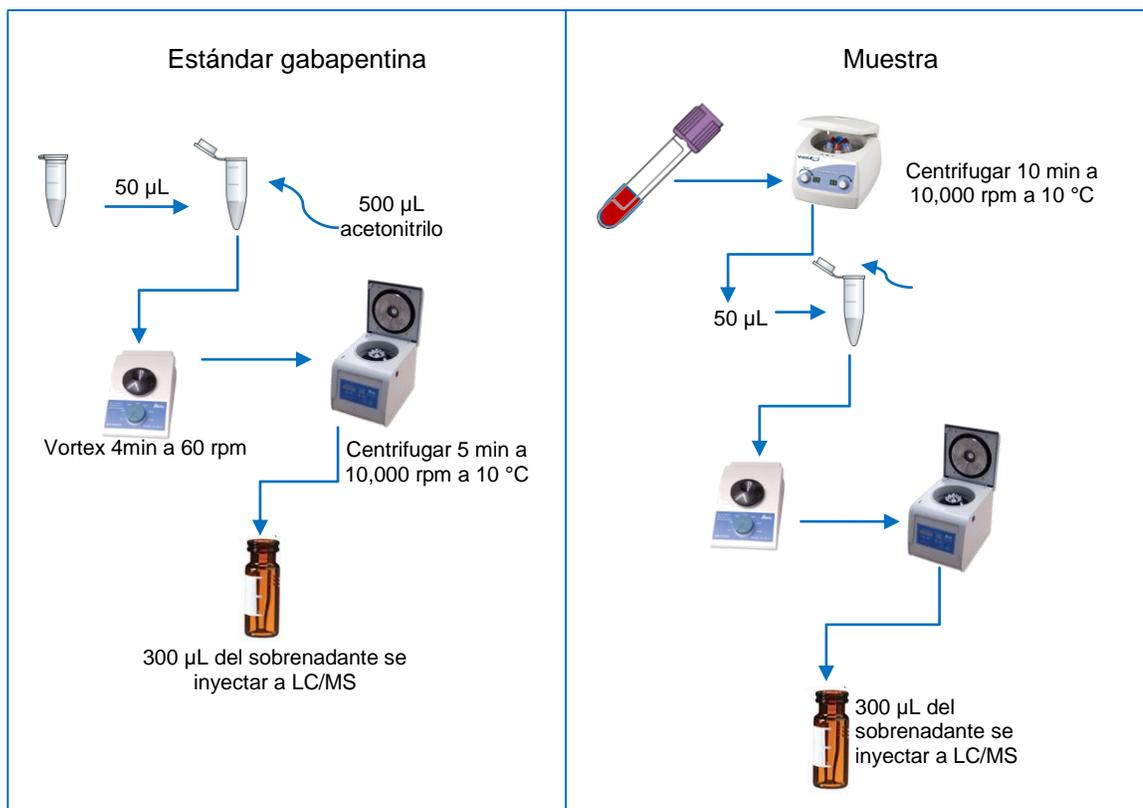


Figura 12. Esquema de precipitación de proteínas.

✓ Separación cromatográfica

Se realizó en un LC/MS Agilent con bomba binaria 1200, modelo G1312A, acoplado a un detector de masas Agilent modelo 6130 (Figura 13), además se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-CN, 4.6 X 150 mm, 5 μ m, la temperatura del gas fue de 250 °C y el flujo de 7 L/min, nebulizador de 45 psig. Para el método de ionización se emplearon las siguientes condiciones: ES, Polaridad Positiva, ion precursor 172.3 m/z, finalmente se inyectaron 300 μ L de estándar/ muestra.



Figura 13. LC/MS Agilent G1312A.

✓ Manejo de residuos

Los residuos de la FM fueron colocados en los contenedores de desechos químicos. Por su parte los tubos, puntillas, insertos y todo el material en contacto con plasma se depositó en contenedores RPBI para posterior confinamiento.

3.2.2 Extracción de gabapentina del biomaterial

Esta metodología fue planteada para evaluar la cantidad de gabapentina incorporada en los biomateriales sintetizados. Durante esta sección se detallan las características de los biomateriales además se describe el proceso de extracción.

✓ Síntesis del biomaterial

La síntesis de los biomateriales fue realizada por Albelardo Aldaba como parte del proyecto de tesis como requisito parcial para obtener el grado de LQI por la FCQ, UANL.⁸¹ . La gabapentina fue incorporada al 5% durante la síntesis de la matriz cerámica (SiO_2), variando en el proceso de síntesis, las condiciones de pH (5 y 9) y la relación alcóxido/agua (1:6 y 1:8) como se aprecia en la Tabla 14, para el tratamiento térmico se utilizó una temperatura de 120 °C. El resultado fueron cuatro productos denominados G5REL16, G5REL18, G9REL16, G9REL18, los cuales fueron caracterizados por espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), análisis térmico de TGA-DTA, microscopía electrónica de barrido (SEM) y difracción de rayos X (DRX), el área superficial específica y porosidad se calcularon a partir de la isoterma de adsorción de nitrógeno mediante el método BET (Brunauer-Emmett-Teller).⁸¹

Tabla 14. Nomenclatura de los biomateriales.

Biomaterial	pH de Síntesis	Relación alcóxido/H₂O
*G5REL16	5	1:6
*G5REL18	5	1:8
*G9REL16	9	1:6
*G9REL18	9	1:8

*G es en relación al nombre del fármaco utilizado (Gabapentina), el número siguiente corresponde al pH de la síntesis, REL indica la relación, los últimos dos dígitos hacen referencia a la relación utilizada de alcóxido/H₂O.

- ✓ Extracción de gabapentina del biomaterial

Para llevar a cabo la extracción de gabapentina de la matriz cerámica se utilizaron dos biomateriales G5REL16 y G9REL18; debido a que los datos reportados previamente por Aldaba⁸¹ indicaron que estos biomateriales presentaron la mayor y menor incorporación del fármaco añadido (90% y 72% respectivamente), correspondiente a un contenido de 4.5 y 3.6 gramos de gabapentina en cada 100 gramos de biomaterial. Con base en esta información se procedió a realizar la extracción de la gabapentina en agua desionizada, etanol, jugo gástrico simulado (pH 1.2) y jugo intestinal simulado (pH 6.8); para lo cual se pesaron 100 mg de cada biomaterial (G5REL16, G9REL18), lo que equivale a 10 mg de gabapentina, ya que los biomateriales con los que se realizaron estos experimentos fueron sintetizados añadiendo el fármaco en una proporción del 10%. Una vez pesados los biomateriales se colocaron en matraces erlenmeyer con 30 mL de los medios indicados. Los matraces se situaron en una incubadora con agitación (Barnstead-Labline SHK4000) a 150

rpm durante 48 h a 28 °C, transcurrido este tiempo se procedió a centrifugar a 3600 rpm durante 10 minutos, del decantado se tomaron 5 mL. Para la cuantificación de la gabapentina extraída de las matrices inorgánicas se siguió la metodología de derivatización con ninhidrina planteada en la Figura 11. Finalmente para ampliar el conocimiento sobre el comportamiento de la liberación de gabapentina se hizo una correlación entre la gabapentina extraída en los medios disolventes y la gabapentina incorporada en las matrices. Para este análisis las muestras se sometieron a baño temperatura (100 °C) con la finalidad de eliminar los solventes (Figura 14). Los residuos sólidos restantes de cada medio disolvente se analizaron por espectroscopia de infrarrojo. Se revisó principalmente la señal de 1650 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del carbonilo de la gabapentina

Para comparar los resultados obtenidos previamente con la técnica de derivatización con ninhidrina por espectrofotometría UV-Vis, se realizaron por triplicado en las mismas condiciones, las pruebas de extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en los diferentes solventes, incluyendo además el metanol. Posteriormente se hizo una dilución del sobrenadante y se analizaron las muestras por LC/MS bajo las condiciones cromatográficas que se establecen en la sección 3.2.1.3. Finalmente se eliminó el sobrenadante para dejar únicamente el residuo sólido del biomaterial del jugo gástrico simulado (pH 1.2) y del metanol para ser analizados por SEM para evaluar el procedimiento de extracción.

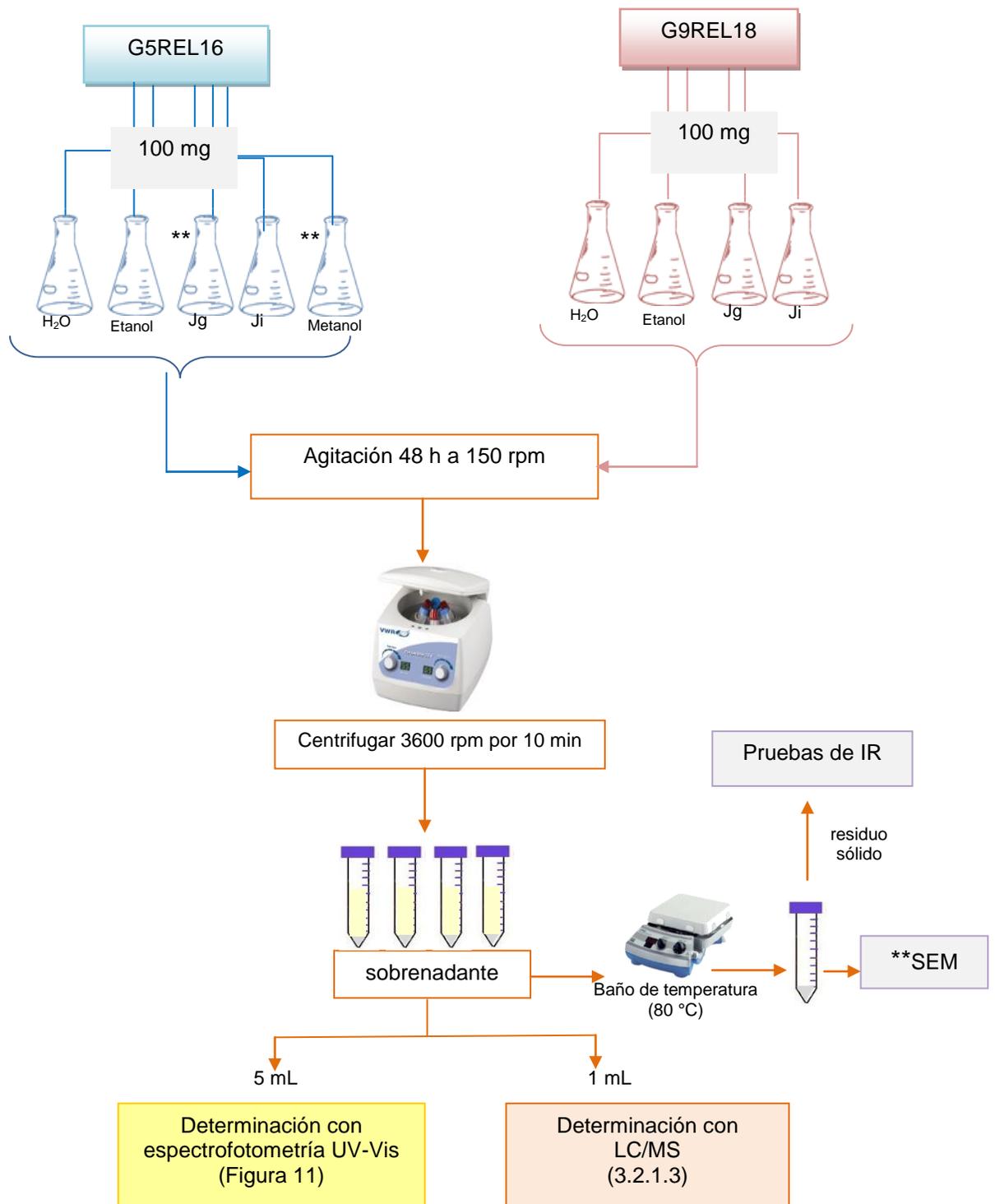


Figura 14. Proceso general de extracción de gabapentina incorporada en SiO₂.

1.3.1 Estudios de liberación de gabapentina *in vitro*

✓ Biomateriales G5REL16 y G9REL18

Las pruebas de liberación *in vitro* se realizaron con los biomateriales G5REL16 y G9REL18 en el disolutor Vankel (Modelo VK7000) controlado con microprocesador y sistema de circulación Modelo VK650A (Figura 15), utilizando el aparato I (canastillas) y el aparato II (paletas) a de 37 ± 0.5 °C, variando la velocidad de agitación entre 50 y 100 rpm. Se pesaron 500 mg de los biomateriales sintetizados al 10%, de igual manera para el biomaterial G5REL16 sintetizado al 5%; se colocaron en los vasos disolutores conteniendo 300 mL del medio de disolución (jugo gástrico pH 1.2 y jugo intestinal pH 6.8, ambos simulados sin enzimas) previamente filtrado a vacío utilizando membranas de policarbonato, tamaño de poro 0.2 μm (Nuclepore™ track-etched Whatman) y degasificado en ultrasonido por 15 minutos. Se tomaron alícuotas de 3 mL a diferentes tiempos, sin reposición del medio, sin exceder el 10% del volumen total (máximo 30 mL)⁴⁶. En la Tabla 15 se muestran las variables utilizadas en las pruebas *in vitro*. En la Figura 16 se observa la metodología.

✓ Pruebas *in vitro* en jugo gástrico simulado pH 1.2

Se tomaron alícuotas a los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 3, 12, 24 y 48 horas, las muestras recolectadas pasaron a través de filtros de nylon de 0.45 μm (GE Waters & Process Technologies), y se colocaron en matraces de

aforación de 10 mL para ajustar el pH entre 5-6 (esto para evitar la hidrólisis de la columna cromatográfica C18 por la acidez del medio) con 2 mL de solución de NaOH 1130 mg/L, finalmente se completó a la marca con FM (KH_2PO_4 (0.028 M; pH 5.2), metanol, acetonitrilo (65:25:10, v/v)) y se analizaron por HPLC bajo las condiciones establecidas en el método analítico de la sección 3.2.1.1.

✓ Pruebas *in vitro* en jugo intestinal simulado pH 6.8

Se recolectaron muestras a los tiempos: 0, 0.5, 1, 2, 3, 12, 24 y 48 horas, posteriormente pasaron a través de filtros de nylon de 0.45 μm (GE Waters & Process Technologies), y se colocaron en matraces de aforación de 10 mL. El pH se ajustó entre 6-7 al completar con fase móvil (KH_2PO_4 (0.028 M; pH 5.2), metanol, acetonitrilo (65:25:10, v/v)). El análisis cromatográfico se realizó siguiendo el método analítico presentando en la sección 3.2.1.1.

Tabla 15. Condiciones establecidas para las pruebas de disolución *in vitro* con los biomateriales (G5REL16, G9REL18).

Biomaterial	Jg	Ji	Gabapentina añadida	Aparato	Temperatura (°C)	Velocidad de agitación (rpm)	Alícuota	Técnica analítica
G5REL16	✓	✓	5%	I	37±0.5	50	3 mL	HPLC
G5REL16	✓	✓	10%	I	37±0.5	50	3 mL	HPLC
G9REL18	✓	✓	10%	I	37±0.5	50	3 mL	HPLC
G5REL16	✓	✓	10%	II	37±0.5	50	3 mL	HPLC
G9REL18	✓	✓	10%	II	37±0.5	50	3 mL	HPLC
G5REL16	✓	✓	10%	II	37±0.5	100	3 mL	HPLC
G9REL18	✓	✓	10%	II	37±0.5	100	3 mL	HPLC
G5REL16	✓	✓	10%	II	37±0.5	100	2 mL	LC/MS

Con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos mediante HPLC con detector de arreglo de diodos, se realizaron de nuevo por duplicado, pruebas de liberación del biomaterial G5REL16 al 10% utilizando la técnica LC/MS. Para ello se pesaron 500 mg de biomaterial en 200 mL de jugo gástrico (pH 1.2) y jugo intestinal (pH 6.8) ambos simulados (Tabla 15); se tomaron alícuotas de 2 mL a 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 5, 8, 24, 48 h, ulteriormente se filtraron (filtro de nylon de 0.45 μm , GE Waters & Process Technologies) y se analizaron en el cromatógrafo Agilent con bomba binaria 1200, modelo G1312A, acoplado a un detector de masas, siguiendo las condiciones cromatográficas de la sección 3.2.1.3. (Figura 17)

✓ Neurontin®

Para efectos comparativos de las pruebas *in vitro*, se incluyen perfiles de disolución de la forma comercial de gabapentina Neurontin®; para ello se pesaron 13.5 mg de gabapentina comercial y se colocaron 300 mL de jugo gástrico (pH 1.2) y jugo intestinal (pH 6.8) ambos simulados sin enzimas en los vasos del disolutor Vankel, utilizando el aparato I (canastillas) a 50 rpm y a una temperatura de 37 ± 0.5 °C. Se tomaron alícuotas de 3 mL a distintos tiempos 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3 horas para jugo gástrico, sin reposición del medio, se filtró cada muestra (filtro de nylon de 0.45 μm , GE Waters & Process Technologies) y se aforó a 10 mL ajustando el pH a 6 con NaOH 1130 mg/L y fase móvil. Para el jugo intestinal se tomaron alícuotas de 3 mL a los tiempos 0, 0.5, 1, 2, 3, 4 horas. Se siguió el procedimiento de igual forma que para Jg con la excepción

de que el pH se ajustó al aforar a 10 mL con fase móvil. (Se debe ajustar el pH en el caso de Jg para proteger a la columna cromatográfica, además de mantener condiciones similares de pH a la FM (pH 5-6) utilizada durante la validación de la técnica analítica, con el fin de evitar variabilidad en los resultados.) Finalmente se inyectaron 100 μ L de muestra en el HPLC Waters siguiendo el procedimiento establecido en la sección 3.2.1.1.



Figura 15. Disolutor Vankel VK700

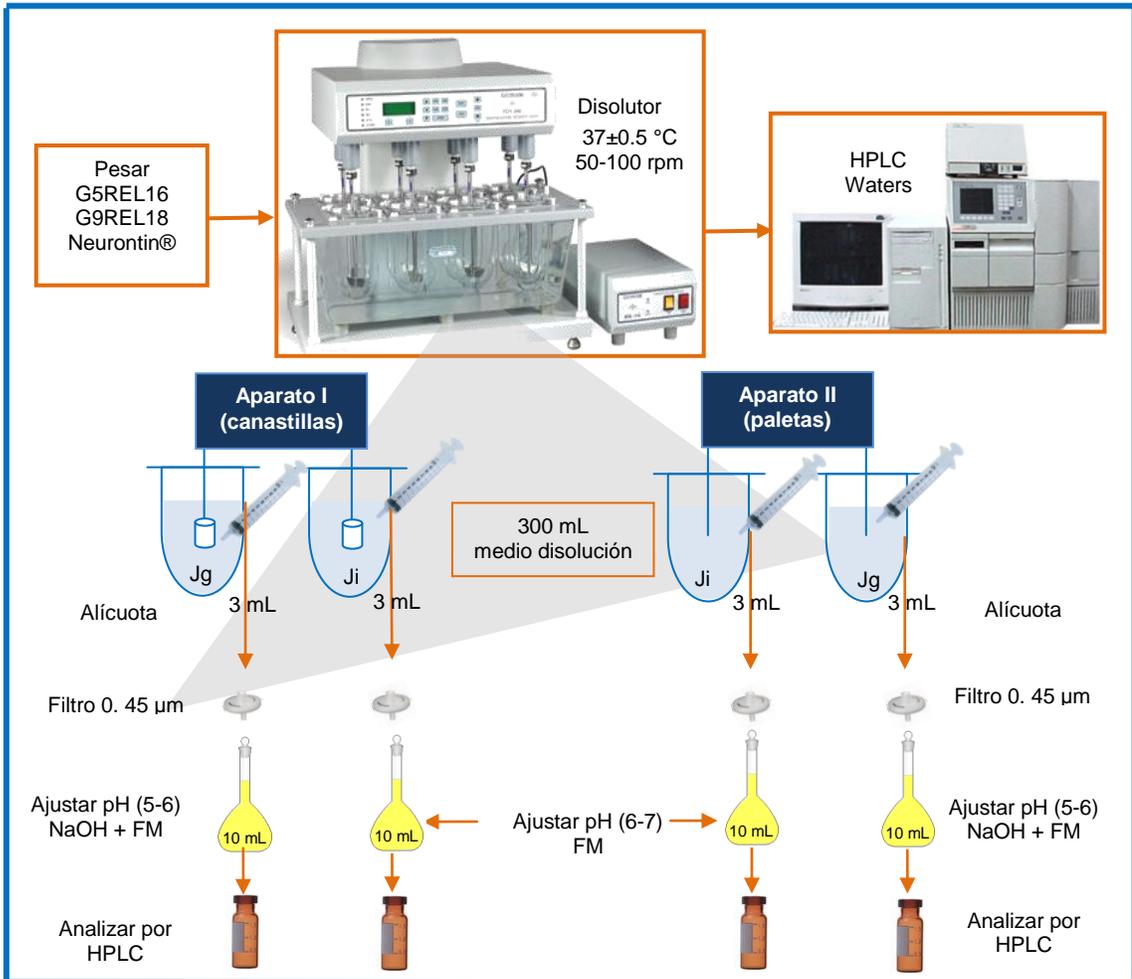


Figura 16. Esquema general de las pruebas de disolución *in vitro* por HPLC.

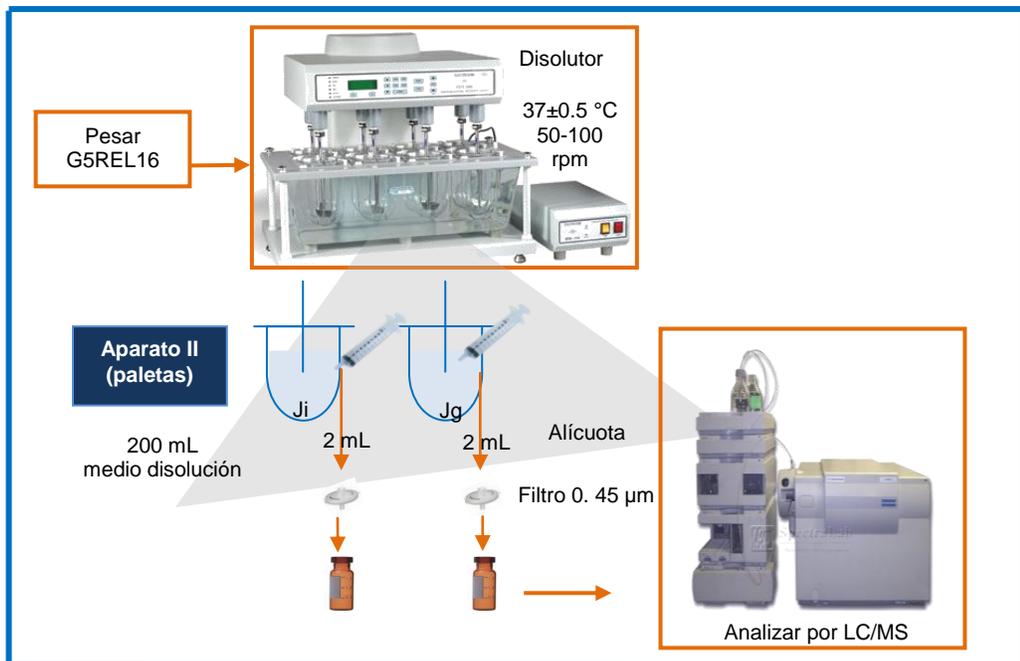


Figura 17. Esquema general de las pruebas de disolución *in vitro* por LC/MS.

3.2.4 Liberación de gabapentina *in vivo*

A un grupo de tres perros machos *beagle* de edad adulta con un peso entre 14-16 kg (Figura 18) y bajo condiciones de 10 h ayuno, se les administró el biomaterial G5REL16 sintetizado al 10% que contiene gabapentina correspondiente a una dosis única equivalente a 1200 mg, este mismo grupo de tres perros *beagle* después de tres días de lavado ($7t_{1/2}$)⁴⁶, bajo 10 horas de ayuno, recibió la dosis equivalente de gabapentina comercial (Neurontin®) vía oral (administrar el medicamento al mismo grupo de trabajo permite disminuir la variabilidad intrasujeto, Figura 19). Las muestras de sangre (3 mL c/u) se colectaron de la vena del antebrazo en tubos con anticoagulante EDTA a diferentes tiempos 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48 horas posteriores a la administración. El plasma de las muestras recolectadas se obtuvo centrifugando a 10,000 rpm durante 10 minutos, se tomaron 50 µL de plasma y se les añadieron 300 µL de acetonitrilo para precipitar las proteínas presentes (Figura 12). La determinación de gabapentina en plasma se llevó a cabo mediante la técnica analítica previamente validada por LC/MS (sección 3.2.1.3). Posteriormente se determinaron los parámetros farmacocinéticos C_{max} y t_{max}. Las muestras de plasma, puntillas, insertos, entre otros instrumentos que estuvieron en contacto con muestras biológicas fueron depositados en los contenedores RPBI.



Figura 18. Perro *beagle* utilizado en pruebas de liberación *in vivo*.

Previo a la dosificación del biomaterial (G5REL16), los perros se mantuvieron una semana bajo las mismas condiciones de temperatura, agua, luz así como horario y cantidad de alimento, esto con fines de adaptación y menor impacto en la variabilidad de los resultados. Todas las muestras se etiquetaron con las iniciales P de perro, seguido del número asignado a cada canino, el tiempo de muestreo con terminación –B haciendo énfasis al biomaterial G5REL16 (Período 1) o bien –N haciendo referencia al Neurontin® (Período 2) Figura 19. Una vez recolectadas las muestras se almacenaron a -70 ± 10 °C hasta posterior análisis.

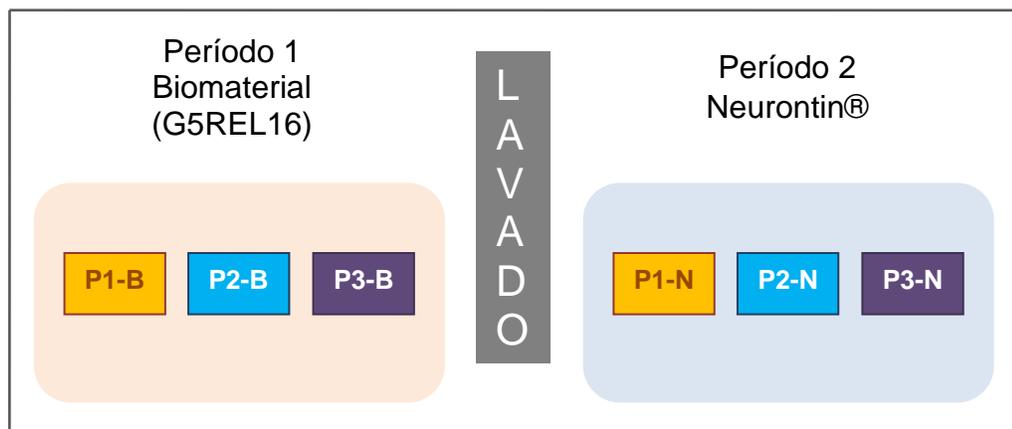


Figura 19. Diseño cruzado y aleatorizado del estudio *in vivo*.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se abordan los resultados obtenidos de la validación de los métodos analíticos probados:

- 1) Determinación de gabapentina por HPLC con detector de arreglo de diodos sin derivatización.
- 2) Determinación de gabapentina mediante la reacción de derivatización con ninhidrina por espectrofotometría UV-Vis.
- 3) Determinación de gabapentina en solución por LC/MS.
- 4) Determinación de gabapentina en plasma por LC/MS

Posteriormente, se incluyen los resultados de las extracciones de gabapentina de los biomateriales G5REL16 y G9REL18, en diferentes medios, cuantificándola por la técnica con ninhidrina. En el caso del biomaterial G5REL16 también se cuantificó con LC/MS.

Además, se muestran los resultados de la liberación de gabapentina de los biomateriales (G5REL16 y G9REL18) en las pruebas *in vitro*; así como las pruebas de disolución de gabapentina comercial por HPLC con detector de arreglo de diodos y las pruebas de liberación del biomaterial G5REL16 y cuantificación por LC/MS. Finalmente, se muestran los datos obtenidos de las pruebas *in vivo*. Durante el desarrollo de este capítulo se realiza además un análisis y discusión de los resultados obtenidos comparando con otros fármacos incorporados en matrices cerámicas.

4.1 Validación del método para determinar gabapentina por HPLC con detector arreglo de diodos sin derivatización

La validación de este método se realizó siguiendo lo establecido en la metodología sección 3.2.1.1. El experimento consistió en preparar y analizar por triplicado estándares de gabapentina USP en concentraciones de 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 mg/L, se encontró un tiempo de retención (*t_R*) de 3.7 minutos para cada estándar. La linealidad obtenida se encuentra en el rango de concentraciones de 6 – 50 mg/L, que brinda una amplia área de trabajo, el límite de cuantificación encontrado fue de 5.65 mg/L, siendo aceptable debido que se encuentra dentro de las concentraciones esperadas para las pruebas de extracción y liberación *in vitro*, el límite de detección obtenido fue 1.69 mg/L.

En los cromatogramas presentados en las figuras 20-26 se aprecia la correlación entre la concentración del estándar con respecto al área y altura del pico al tiempo de retención de 3.7 minutos.

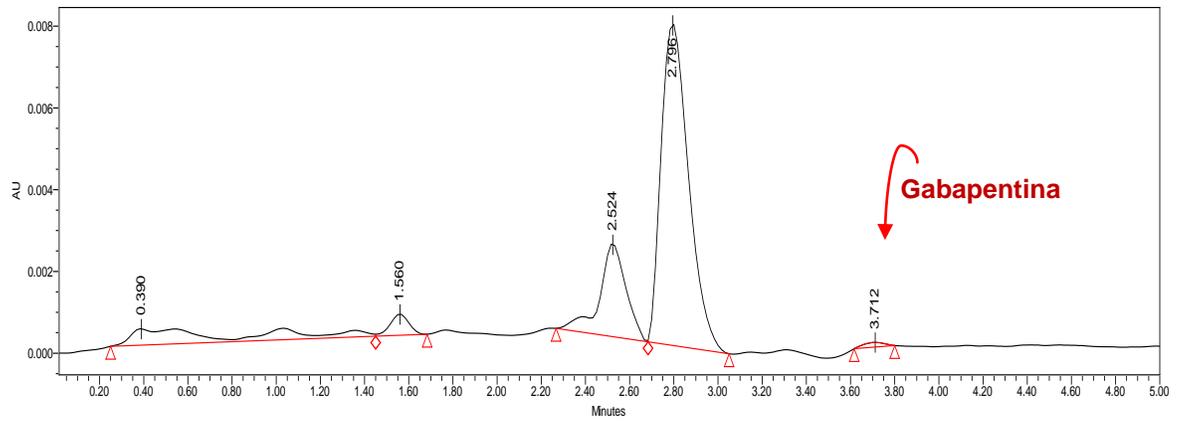


Figura 20. Cromatograma de gabapentina (1 mg/L)

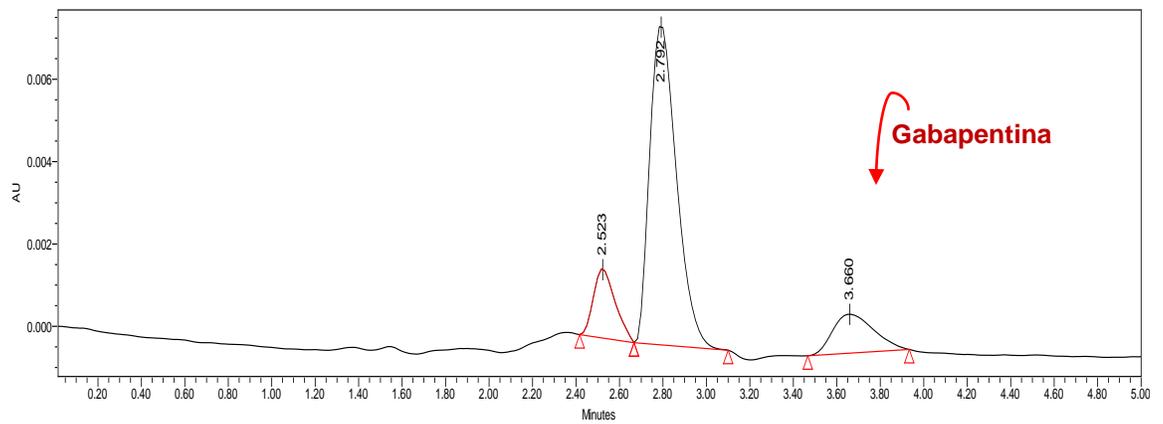


Figura 21. Cromatograma de gabapentina (5 mg/L)

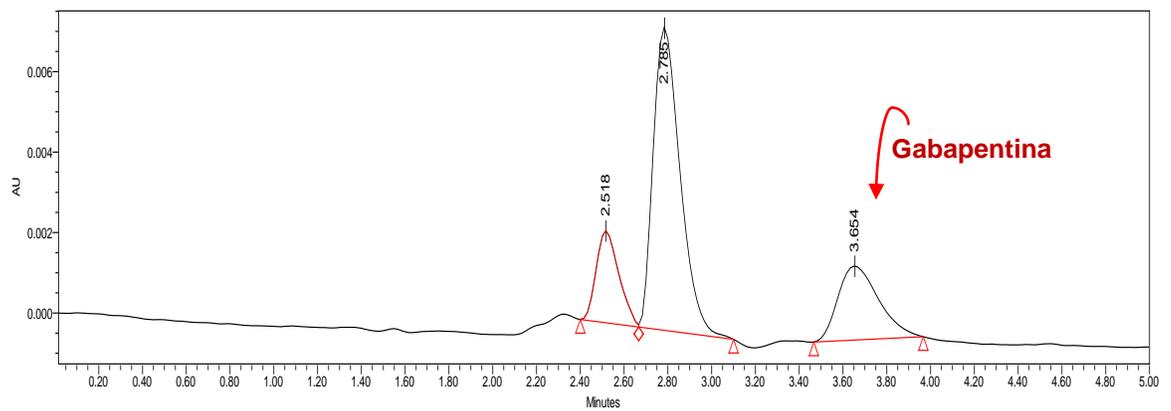


Figura 22. Cromatograma de gabapentina (10 mg/L)

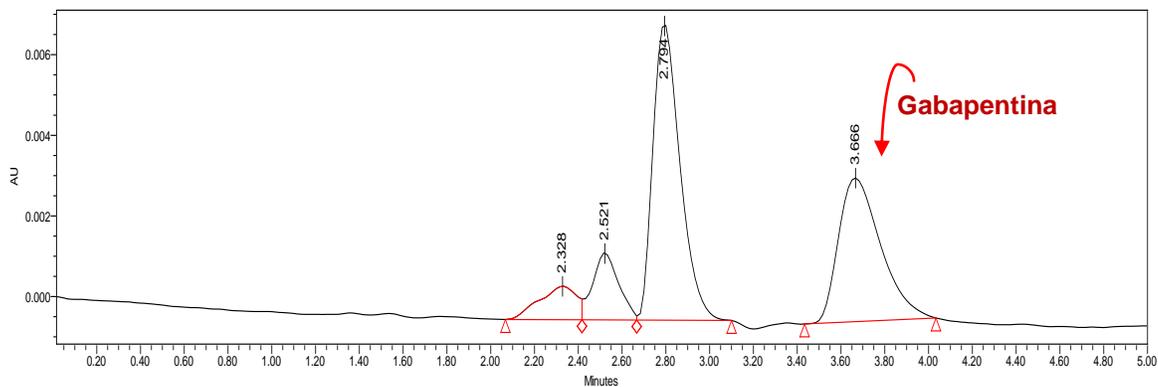


Figura 23. Cromatograma de gabapentina (20 mg/L)

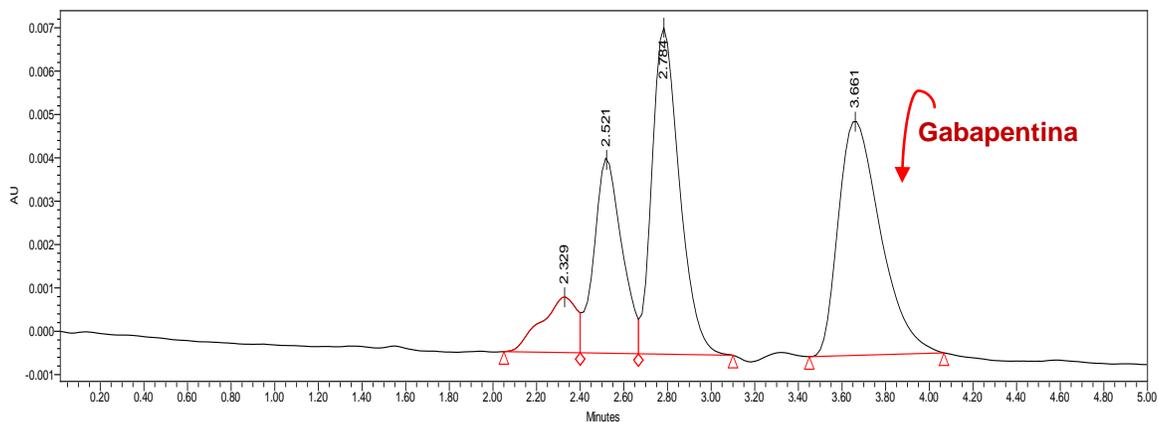


Figura 24. Cromatograma de gabapentina (30 mg/L)

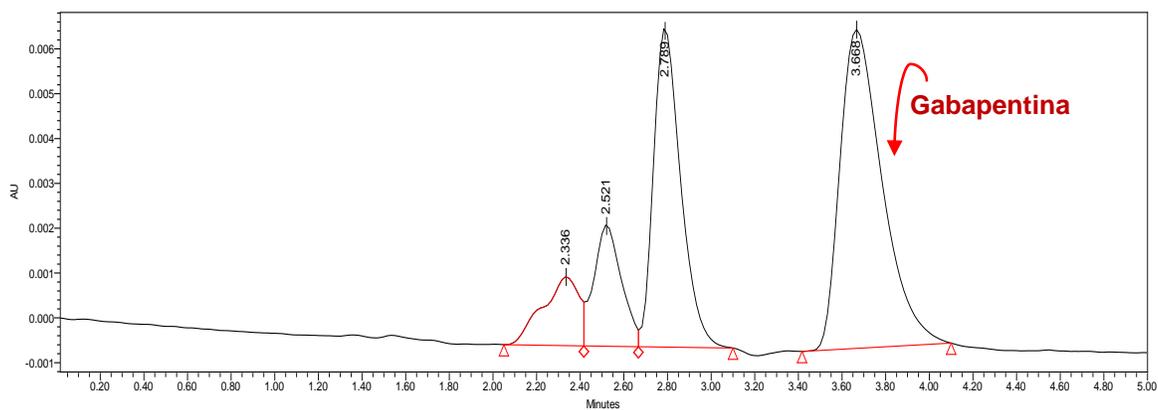


Figura 25. Cromatograma de gabapentina (40 mg/L)

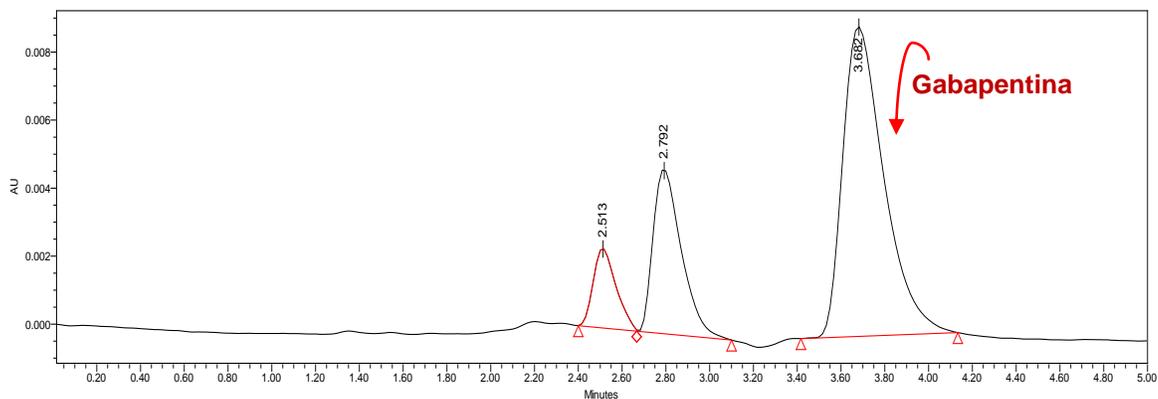


Figura 26. Cromatograma de gabapentina (50 mg/L)

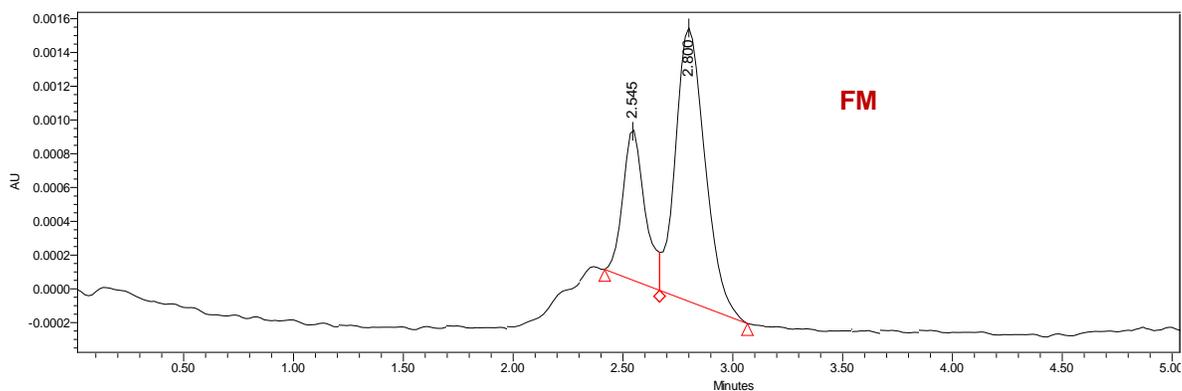


Figura 27. Cromatograma FM: mezcla tampón de KH_2PO_4 (0.028 M; pH 5.2), metanol, acetonitrilo (65:25:10, v/v)

En la Figura 27 se observan los picos correspondientes a los tR's de 2.5 y 2.8 minutos, que pertenecen a los componentes (metanol y acetonitrilo respectivamente) con los que se elaboró la FM. A partir de los datos obtenidos por triplicado (Tabla 16), en la figura 28 se presenta la curva de calibración correspondiente a dicho método cromatográfico.

Tabla 16. Datos obtenidos por triplicado (Validación del método por HPLC)

	<i>Corrida 1</i>	<i>Corrida 2</i>	<i>Corrida 3</i>	<i>Promedio</i>
Concentración (mg/L)	Área	Área	Área	Área
1	2018	3909	2546	2824.33333
5	12442	10770	10867	11359.6667
10	23714	25368	22729	23937
20	47685	46270	46173	46709.3333
30	72451	68986	67534	69657
40	95698	93595	92825	94039.3333
50	119515	115118	118946	117859.667

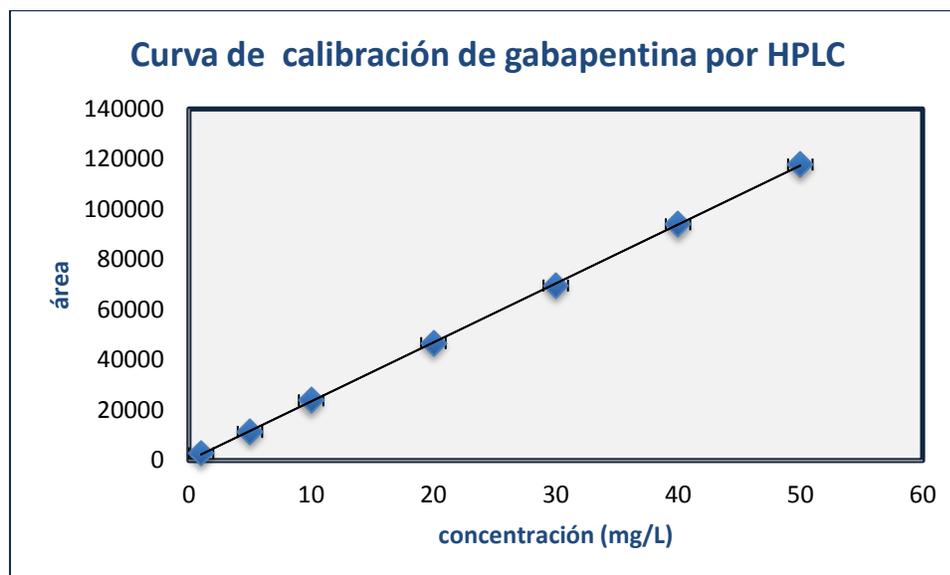


Figura 28. Curva de calibración de gabapentina por HPLC

El análisis estadístico se hizo considerando los valores del área. En la Tabla 17 se presentan los parámetros obtenidos para la validación parcial del método mediante HPLC.

Tabla 17. Parámetros generales de validación parcial del método por HPLC

<i>Datos estadísticos del método</i>	
Rango de linealidad	6-50 mg/L
Ecuación de la recta	*y=2348.1x + 11.801
Coefficiente de correlación	R ² = 0.9999
Porcentaje de error	3.81%
Límite de detección	1.69 mg/L
Límite de cuantificación	5.65 mg/L

*y=área

4.2 Validación del método para determinar gabapentina mediante la reacción de derivatización con ninhidrina por espectrofotometría UV-Vis.

La validación del método analítico utilizando la reacción de derivatización con ninhidrina se realizó por triplicado de acuerdo a lo planteado en la metodología de la sección 3.2.1.2, para ello se trabajó con siete estándares de gabapentina de 9.2, 13.8, 18.4, 23, 27, 32, 36 mg/L. Se obtuvo una linealidad en un rango de trabajo de 6.14-36mg/L; el límite de cuantificación encontrado fue 6.14 mg/L, el cual es aceptado para trabajar en las pruebas de extracción de gabapentina de los biomateriales, ya que las concentraciones alcanzadas en estos experimentos superan dicho valor; el límite de detección fue de 1.84 mg/L. En la Figura 29 se muestra la reacción de color que ocurre al realizar la derivatización con ninhidrina.



Figura 29. Reacción de derivatización con ninhidrina (120-480 mg/L)

Tabla 18. Datos obtenidos por triplicado (Validación del método por espectrofotometría UV-Vis)

	<i>Corrida 1</i>	<i>Corrida 2</i>	<i>Corrida 3</i>	<i>promedio</i>
Concentración (mg/L)	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia	Absorbancia
9.2	0.0499	0.0287	0.0304	0.0363
13.8	0.2023	0.1968	0.1837	0.1942
18.4	0.3666	0.3467	0.3513	0.3548
23	0.501	0.4931	0.4775	0.4905
27	0.6258	0.6579	0.6307	0.6381
32	0.789	0.7791	0.8019	0.7900
36	0.93	0.9318	0.9404	0.9340

En la Tabla 18 se presentan los datos obtenidos por triplicado con los cuales se construyó la curva de calibración.

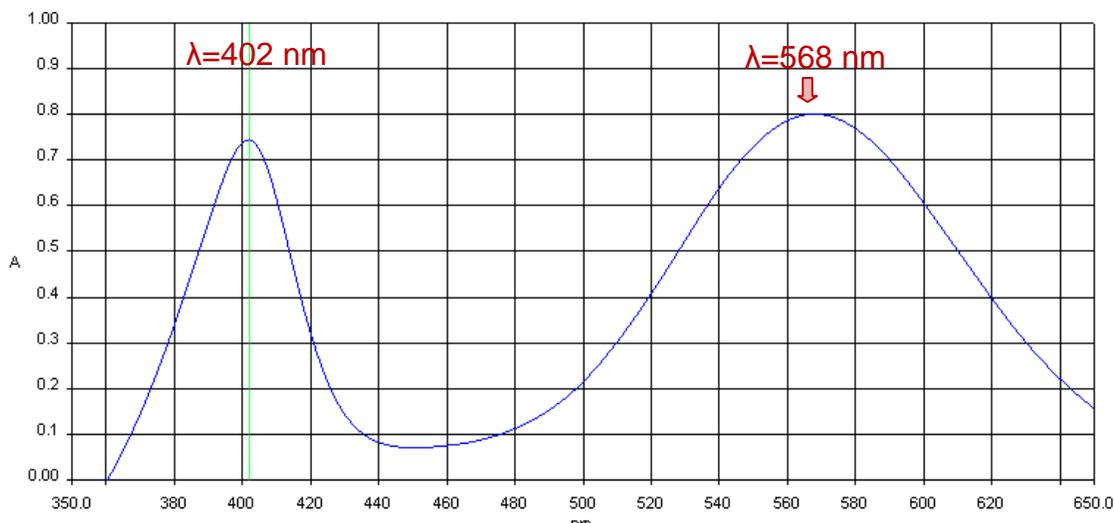


Figura 30. Espectro UV-Vis del producto de la derivatización de gabapentina con ninhidrina (Estándar de gabapentina de 300 mg/L)

En la Figura 30 se muestra el espectro UV-Vis de 350 a 650 nm, de un estándar de gabapentina de 23 mg/L registrado en el espectrofotómetro UV-Vis Perkin-Elmer, en el que se aprecia que el cromóforo formado tiene dos bandas

de absorción 402 y 568 nm, de las cuales se eligió la $\lambda_{\max}=568$ nm, por tener un poco más de intensidad. En la Figura 31 se muestra la curva de calibración obtenida para esta técnica analítica.

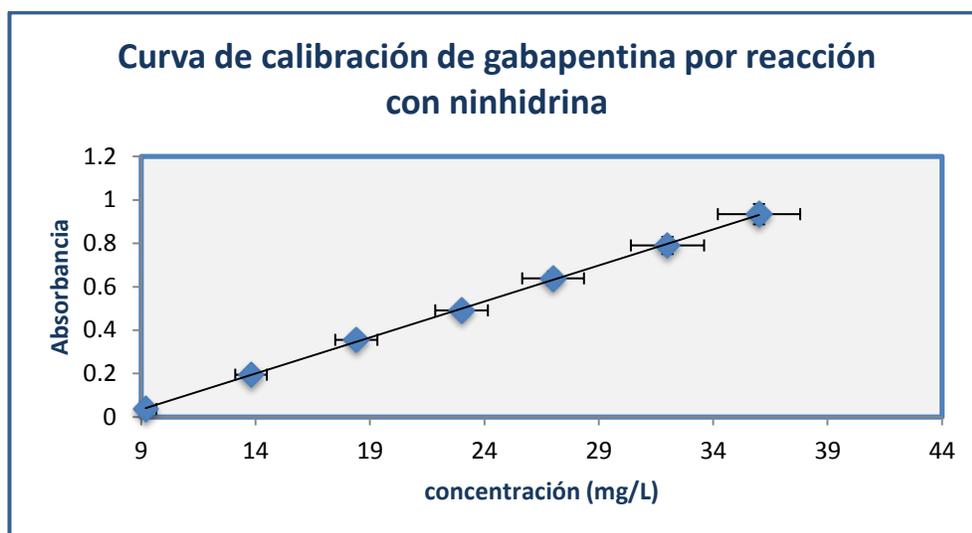


Figura 31. Curva de calibración de gabapentina por reacción con ninhidrina

Además se analizaron los datos y se obtuvieron los parámetros generales para la validación parcial del método (Tabla 19).

Tabla 19. Parámetros generales de validación parcial del método con la reacción de derivatización con ninhidrina

Datos estadísticos del método	
Rango de linealidad	6.14- 36 mg/L
Ecuación de la recta	$y=0.0332x-0.2655$
Coefficiente de correlación	$R^2= 0.9996$
Porcentaje de Error	3.6%
Límite de detección	1.84 mg/L
Límite de cuantificación	6.14 mg/L

4.3 Validación del método para cuantificar gabapentina en solución mediante LC/MS.

La validación de este método se realizó siguiendo lo establecido en la metodología de la sección 3.2.1.3. El experimento consistió en preparar y analizar por quintuplicado estándares de gabapentina USP en solución (metanol-agua, 50:50 v/v) a las siguientes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/L}$, además, se prepararon por quintuplicado controles en concentraciones de 0.175, 0.75, 3.5 y 7.5 $\mu\text{g/L}$, para determinar la exactitud y precisión del método; se encontró un tiempo de retención (t_R) de 3.06 minutos para cada estándar y control. La linealidad obtenida se encuentra en el rango de 0.01 – 10 $\mu\text{g/L}$, el LOD fue de 0.003 $\mu\text{g/L}$ y el LOQ fue 0.01 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 21). Debido a la alta sensibilidad de este método, se utilizó para las pruebas de extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 en distintos medios, además de las pruebas de liberación *in vitro* del biomaterial G5REL16 en Jg y Ji. Esto permitió comparar los resultados obtenidos por LC/MS *versus* los datos obtenidos con los anteriores métodos analíticos propuestos para cada estudio (pruebas de extracción- derivatización con ninhidrina por espectrofotometría UV-Vis), (pruebas de liberación *in vitro*-HPLC con arreglo de diodos sin derivatización).

En la Tabla 20 se presentan los datos obtenidos por quintuplicado del análisis de los estándares de gabapentina en solución.

Tabla 20. Datos obtenidos por quintuplicado, gabapentina en solución (Validación del método por LC/MS).

	<i>Corrida 1</i>	<i>Corrida 2</i>	<i>Corrida 3</i>	<i>Corrida 4</i>	<i>Corrida 5</i>	<i>Promedio</i>
Concentración (µg/mL)	Área	Área	Área	Área	Área	Área
0.05	1766.90	1661.60	1815.94	1730.27	1887.79	1772.50
0.1	3647.91	3254.49	3372.66	3269.69	3269.69	3362.89
0.25	7967.49	7909.77	7903.77	8046.14	7899.94	7945.42
0.5	16125	15059.8	15184.5	14990.3	15057.9	15283.5
1	30785.1	29066.1	29465.4	29718.8	29232.3	29653.54
2.5	75042.3	72290.3	74568.4	74279.2	78164.2	74868.88
5	138526	136920	139556	140501	139636	139027.8
10	285911	287092	288483	290938	281332	286751.2

Con esos datos se obtuvo la curva de calibración de la Figura 32. En la Figura 33 se observan los cromatogramas de diferentes estándares de gabapentina a concentraciones de 0.1 a 10 µg/mL, en ellos se observa el incremento del área y altura del pico a tR 3.06 min. al aumentar la concentración. En la Tabla 21 se presentan los parámetros generales de la validación del método.

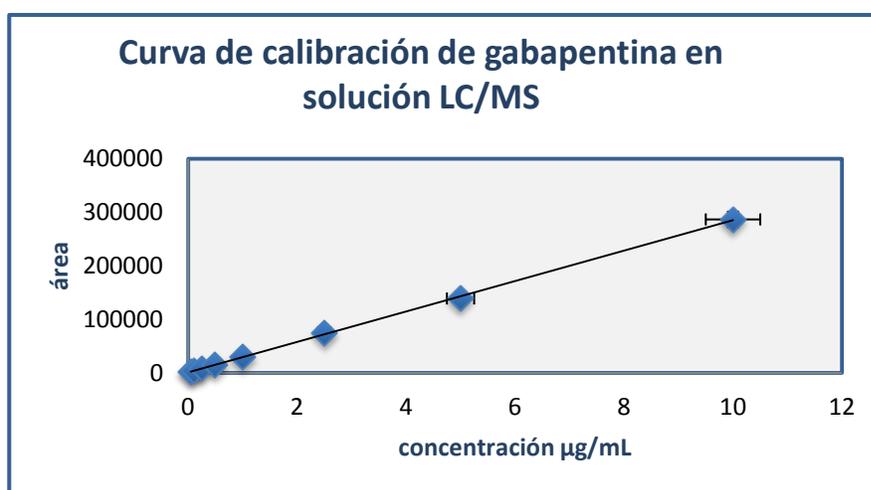


Figura 32. Curva de calibración de gabapentina en solución por LC/MS.

Tabla 21. Parámetros generales de validación parcial del método para gabapentina en solución por LC/MS.

Datos estadísticos del método	
Rango de linealidad	0.01 - 10 µg/L
Ecuación de la recta	$y=28467x- 801.23$
Coefficiente de correlación	$R^2= 0.9996$
Porcentaje de Error	1.07%
Límite de detección	0.003 µg/L
Límite de cuantificación	0.01 µg/L

La precisión del método se muestra en la Tabla 22 se obtuvo un %CV menor al 3%; para la exactitud se lograron valores ± 15 (Tabla 23).

Tabla 22. Precisión del método para cuantificar gabapentina en solución por LC/MS.

Precisión		
Control (µg/mL)	Promedio $(n=5) \pm SD$	%CV
0.175	0.1827 ± 0.00383	2.096
0.75	0.8285 ± 0.02298	2.768
3.5	3.8063 ± 0.06198	1.628
7.5	7.4728 ± 0.08580	1.148

Tabla 23. Exactitud del método para cuantificar gabapentina en solución por LC/MS.

Exactitud		
Control (µg/mL)	Promedio $(n=5)$	Exactitud
0.175	0.1827	4.4102
0.75	0.8285	10.4666
3.5	3.8063	8.7526
7.5	7.4728	-0.362

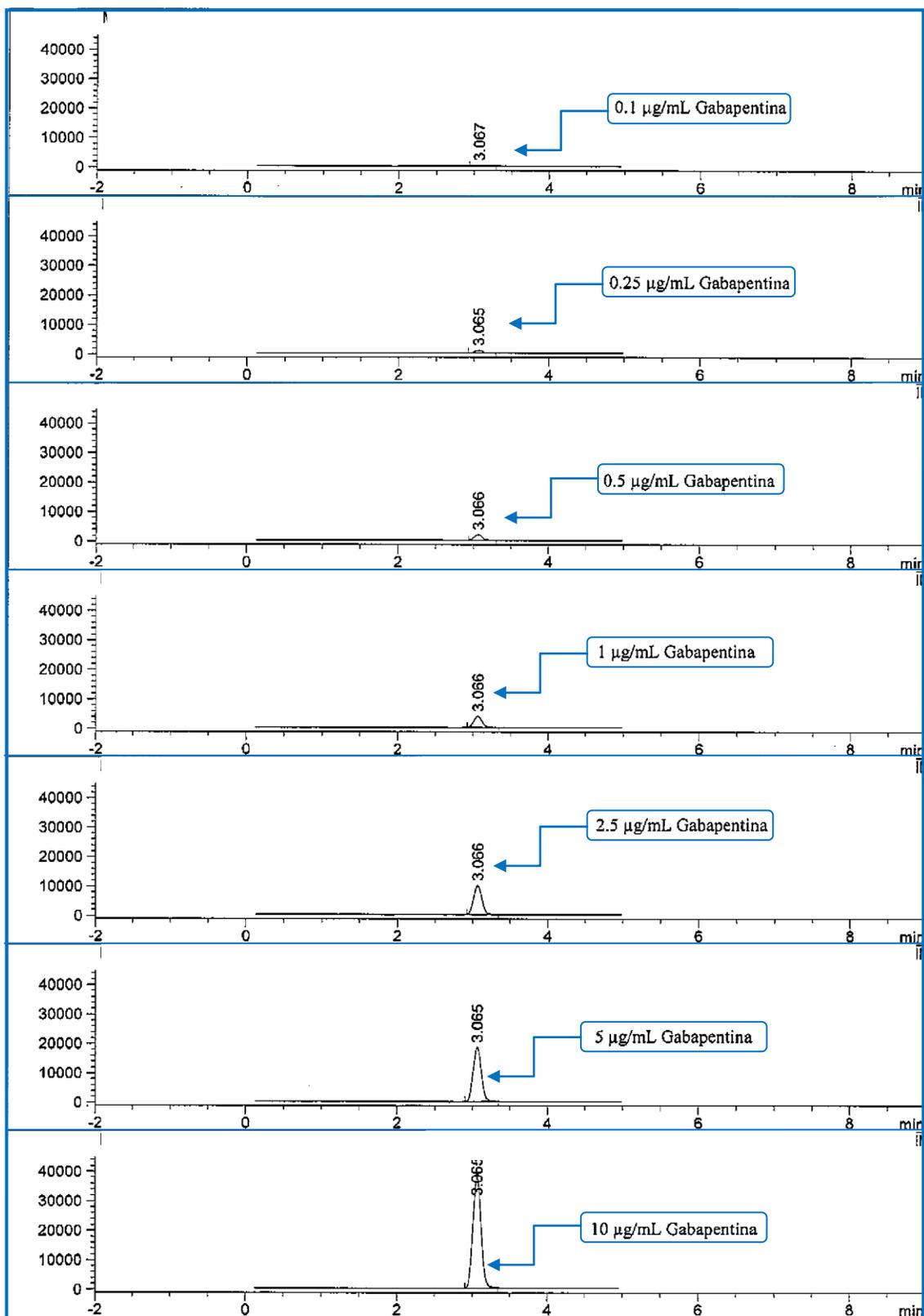


Figura 33. Cromatogramas de gabapentina en solución LC/MS (0.1-10 µg/mL).

4.4 Validación del método para cuantificar gabapentina en plasma humano mediante LC/MS.

Para la validación de este método cromatográfico se trabajó siguiendo lo establecido en la metodología de la sección 3.2.1.3. Se prepararon y analizaron por quintuplicado estándares de gabapentina USP en plasma humano a las siguientes concentraciones: 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10 $\mu\text{g/L}$, de igual manera se prepararon controles en concentraciones de 0.175, 0.75, 3.5 y 7.5 $\mu\text{g/L}$, con la finalidad de determinar la exactitud y precisión del método; se encontró un tiempo de retención (tR) de 3.23 minutos para cada estándar. La linealidad obtenida se encuentra en el rango de 0.075 – 10 $\mu\text{g/L}$, el LOD fue de 0.022 $\mu\text{g/L}$ y el LOQ fue 0.075 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 25). Debido a la alta sensibilidad de este método se utilizó en las pruebas de liberación de gabapentina *in vivo*, puesto que en estudios previos en humanos, se han reportado valores de C_{max} para gabapentina de liberación inmediata en distintas dosis (300, 400, 600, 900 mg), de 2 a 5 $\mu\text{g/L}$.⁷⁰

82, 83, 84, 85, 86

En la Tabla 24 se presentan los datos obtenidos por quintuplicado del análisis de los estándares de gabapentina en plasma.

Tabla 24. Datos obtenidos por quintuplicado, gabapentina en plasma (Validación del método por LC/MS)

	<i>Corrida 1</i>	<i>Corrida 2</i>	<i>Corrida 3</i>	<i>Corrida 4</i>	<i>Corrida 5</i>	<i>Promedio</i>
Concentración (µg/mL)	Área	Área	Área	Área	Área	Área
0.05	2876.29	2902.27	3352.46	3631.39	2664.15	3085.31
0.1	5445.16	5565.33	5847.69	5481.55	5825.20	5632.98
0.25	13718.29	13636.40	13666.32	13684.14	13256.38	13592.31
0.5	25536.06	26011.04	25907.44	25321.76	25007.88	25556.83
1	50656.73	50725.31	50379.98	48295.88	47623.34	49536.24
2.5	120738.29	121545.47	119976.51	119909	117906	120015.05
5	230818.03	229028.70	226494.76	230146.51	225233.95	228344.39
10	499006	470515.53	470186.87	469840.78	468568.25	475623.49

Con los datos anteriores se construyó la curva de calibración de la Figura 34. En la Figura 35 se observan los cromatogramas y la correlación entre la concentración de los estándares de 0.1-10 µg/L, con el área y altura del pico a tR 3.23 min. En la Tabla 25 se muestran los parámetros generales de la validación del método cromatográfico.

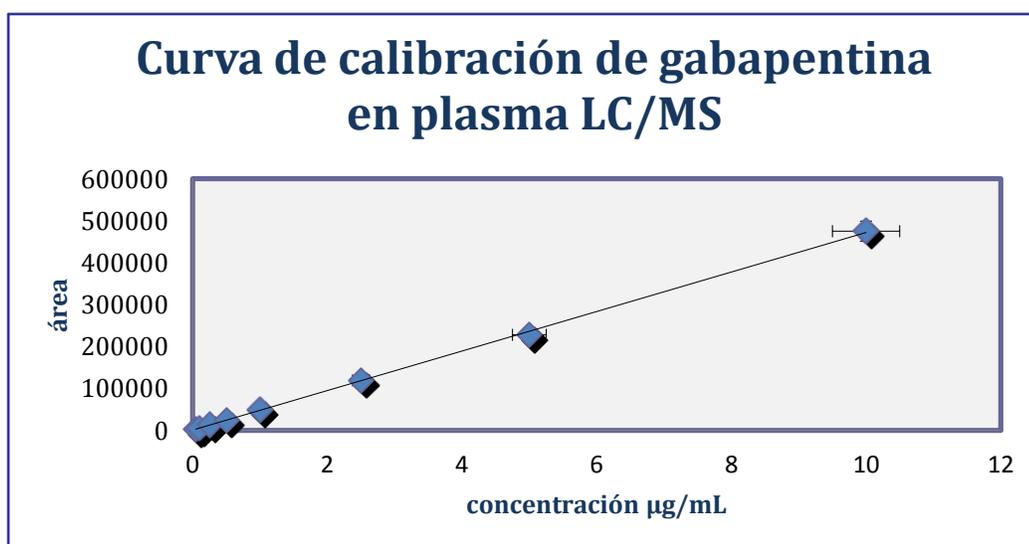


Figura 34. Curva de calibración de gabapentina en plasma por LC/MS

Tabla 25. Parámetros generales de validación del método para gabapentina en plasma por LC/MS

Datos estadísticos del método	
Rango de linealidad	0.20 - 10 µg/L
Ecuación de la recta	y=47119x- 910.49
Coefficiente de correlación	R ² = 0.99955
Porcentaje de Error	2.44%
Límite de detección	0.20 µg/L
Límite de cuantificación	0.65 µg/L

Para calcular la precisión del método en plasma se analizaron por quintuplicado controles de gabapentina en las concentraciones de 0.175, 0.75, 3.5, 7.5 µg/mL, finalmente se obtuvo el % de coeficiente de variación, el cual es menor al 15% (Tabla 26). En la Tabla 27 se presenta la exactitud del método, la cual se obtuvo al evaluar: $\left(\frac{\text{Valor obtenido}-\text{valor esperado}}{\text{valor esperado}}\right) \times 100$, la exactitud que se obtuvo para cada punto está dentro del rango ± 15 .

Tabla 26. Precisión del método para cuantificar gabapentina en plasma por LC/MS.

Precisión		
Control (µg/mL)	Promedio (n=5) ± SD	%CV
0.175	0.18851 ± 0.00703	3.72938
0.75	0.71295 ± 0.00560	0.78597
3.5	3.19035 ± 0.04081	1.27933
7.5	6.73877 ± 0.05926	0.87947

Tabla 27. Exactitud del método para cuantificar gabapentina en plasma por LC/MS.

Exactitud		
Control (µg/mL)	Promedio (n=5)	Exactitud
0.175	0.188518	7.724
0.75	0.712958	-4.938
3.5	3.190358	-8.846
7.5	6.738776	-10.149

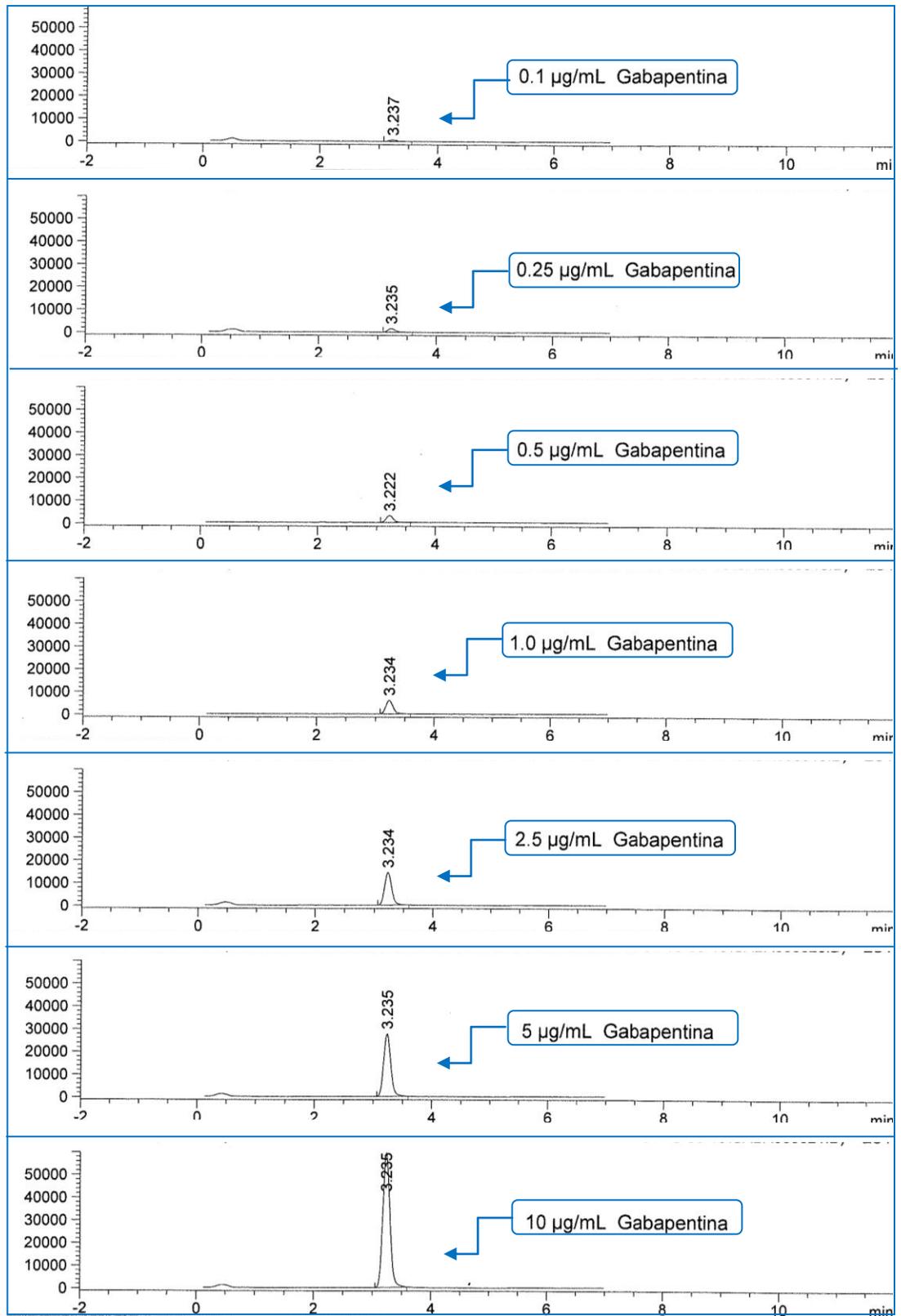


Figura 35. Cromatogramas de gabapentina en plasma humano LC/MS (0.1-10 µg/mL).

Debido a que los estándares y controles de gabapentina se prepararon en plasma humano, se realizaron pruebas para ver la posible variabilidad con las muestras de plasma canino. En la Figura 36 se presentan los cromatogramas, donde los primeros seis blancos corresponden al tiempo cero del modelo biológico (caninos), seguido de un pool de plasma humano, así como plasma humano hemolizado y quiloso. Mediante este análisis se precisa que la matriz biológica no causa interferencia para llevar a cabo el estudio.

Para evaluar la especificidad del método se analizaron estándares de otros fármacos: ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, diclofenaco, ketoprofeno, paracetamol, naproxeno y teobromina. El método mostró ser específico para gabapentina (Figura 37).

En la Figura 38 se presenta el espectro de masas correspondiente a gabapentina donde se observa la señal característica de gabapentina m/z 172.3, sobre la cual se trabajó para llevar a cabo la validación.

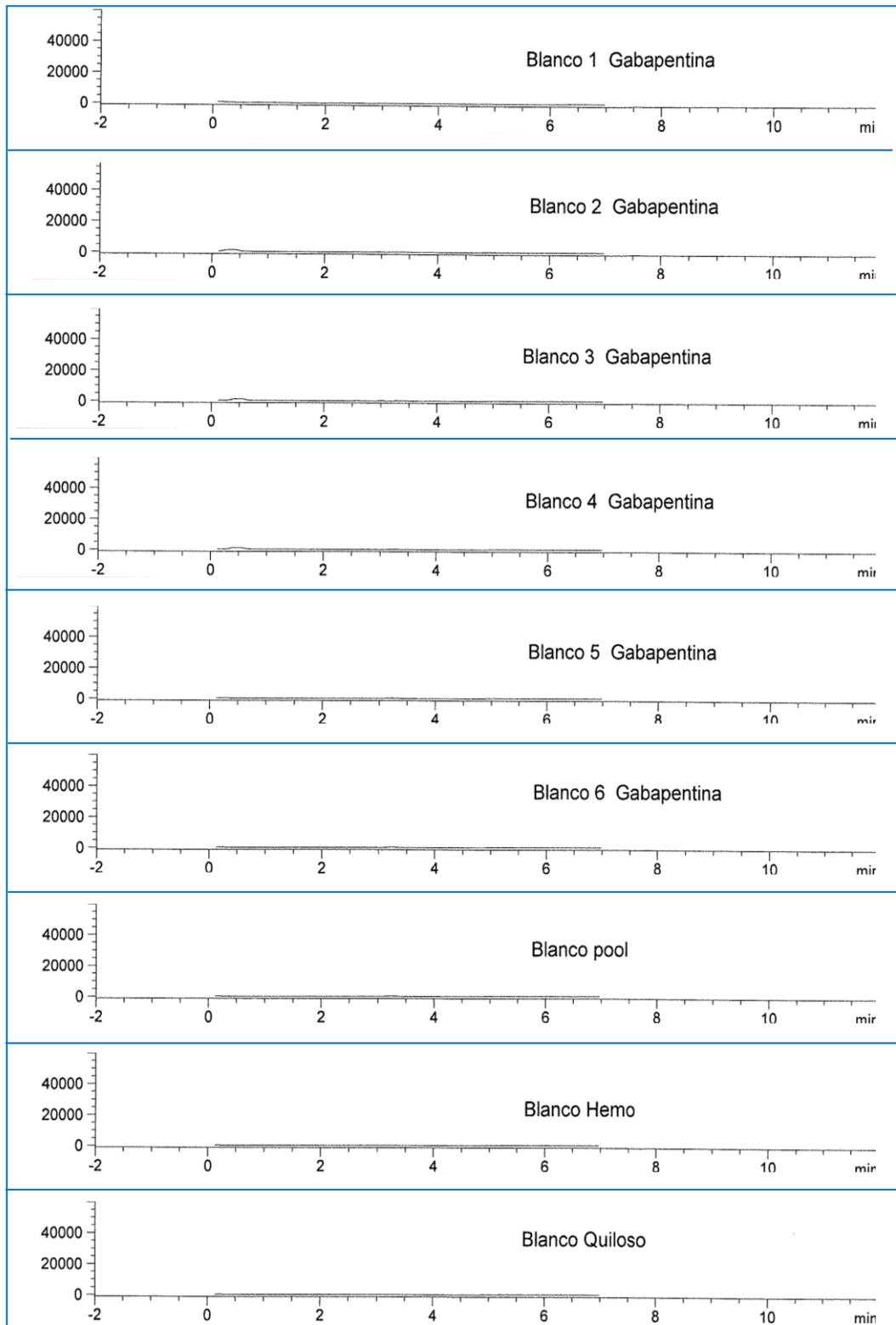


Figura 36. Efecto de la matriz biológica.

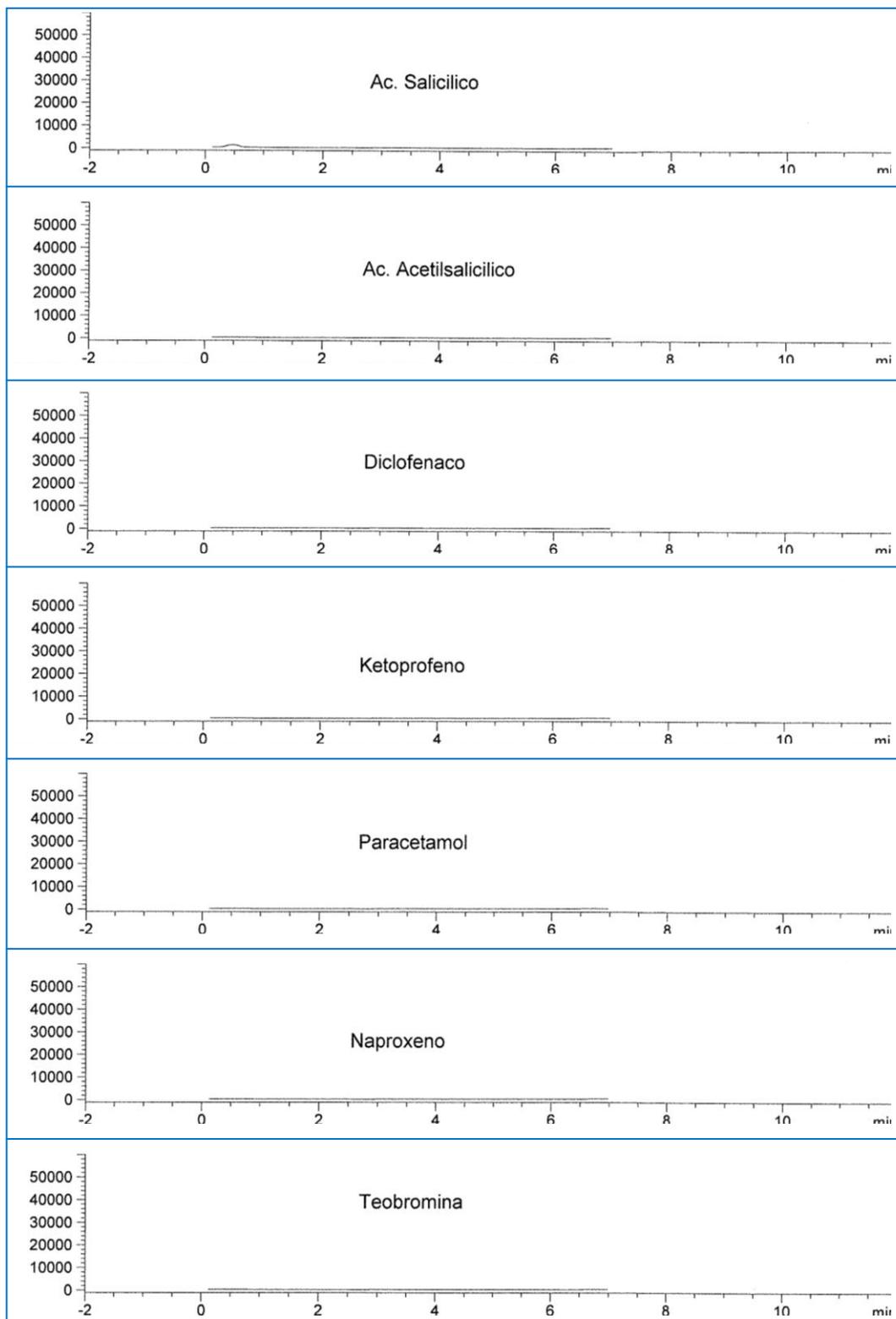


Figura 37. Especificidad del método cromatográfico para gabapentina por LC/MS

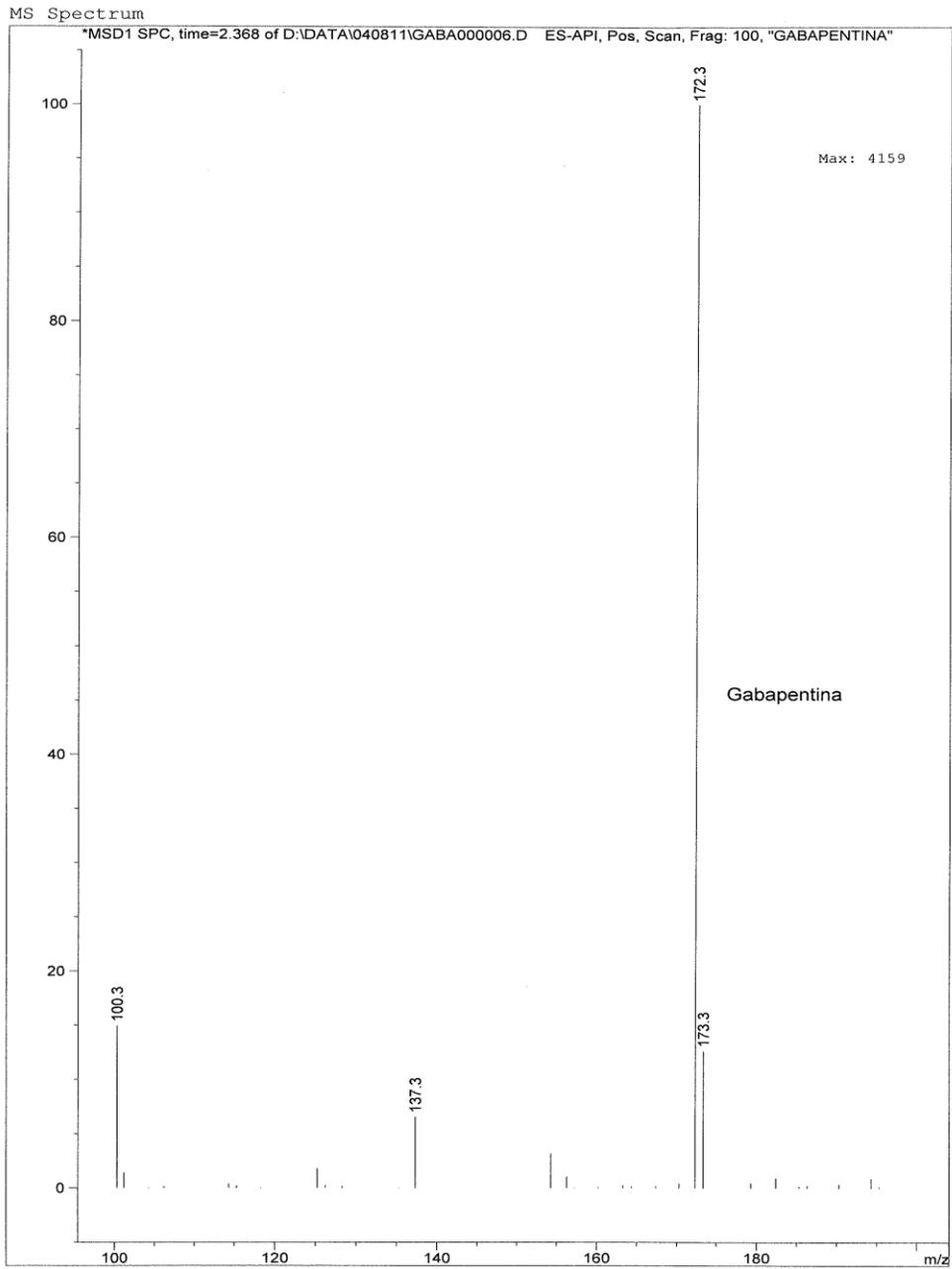


Figura 38. Espectro de masas para gabapentina.

4.5 Extracción de gabapentina de los biomateriales (G5REL16 y G9REL18).

4.5.1 Extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10%, cuantificación por derivatización con ninhidrina (UV-Vis)

Esta extracción fue realizada en agua desionizada, etanol, jugo gástrico simulado (pH 1.2) y jugo intestinal simulado (pH 6.8). Se siguió el tratamiento indicado previamente en la metodología (3.2.2) y se procedió a cuantificar las muestras mediante la reacción de derivatización con ninhidrina (3.2.1.1). Se encontró que del biomaterial G5REL16, el fármaco se libera principalmente en etanol; liberando el 63.6% de la gabapentina incorporada en la matriz cerámica, los resultados del proceso de extracción y cuantificación se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28. Porcentaje de extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 en los diferentes solventes (UV-Vis)

Biomaterial G5REL16	% de extracción de gabapentina
Agua	2.37
Jugo Intestinal Simulado	2.4
Jugo Gástrico Simulado	2.8
Etanol	63.6



Figura 39. Extracción Biomaterial G5REL16 y cuantificación por método de ninhidrina

En la Figura 39 se muestra el resultado de la reacción entre ninhidrina y la gabapentina, donde se observa la coloración púrpura en el matraz que contiene como medio de extracción etanol. A continuación en las figuras 40, 41 y 42 se muestran los espectros FTIR del residuo sólido (obtenido tras un proceso de secado establecido en la metodología 3.2.2) del biomaterial después de la extracción con diferentes solventes, donde se observa la banda característica de estiramiento del carbonilo del carboxilo a 1650 cm^{-1} correspondiente a la estructura de la gabapentina, lo que indica que el fármaco no se extrae completamente de la matriz cerámica en estos disolventes. Por otra parte en la figura 43 la señal del carbonilo es menos intensa en el residuo sólido de la extracción con etanol, lo cual confirma que en este medio se logra una mayor extracción de la gabapentina incorporada en la matriz. Las bandas a 3350 y 1060 cm^{-1} corresponden a los movimientos vibracionales de los enlaces OH y O-Si-O de la matriz cerámica (SiO_2).⁸¹

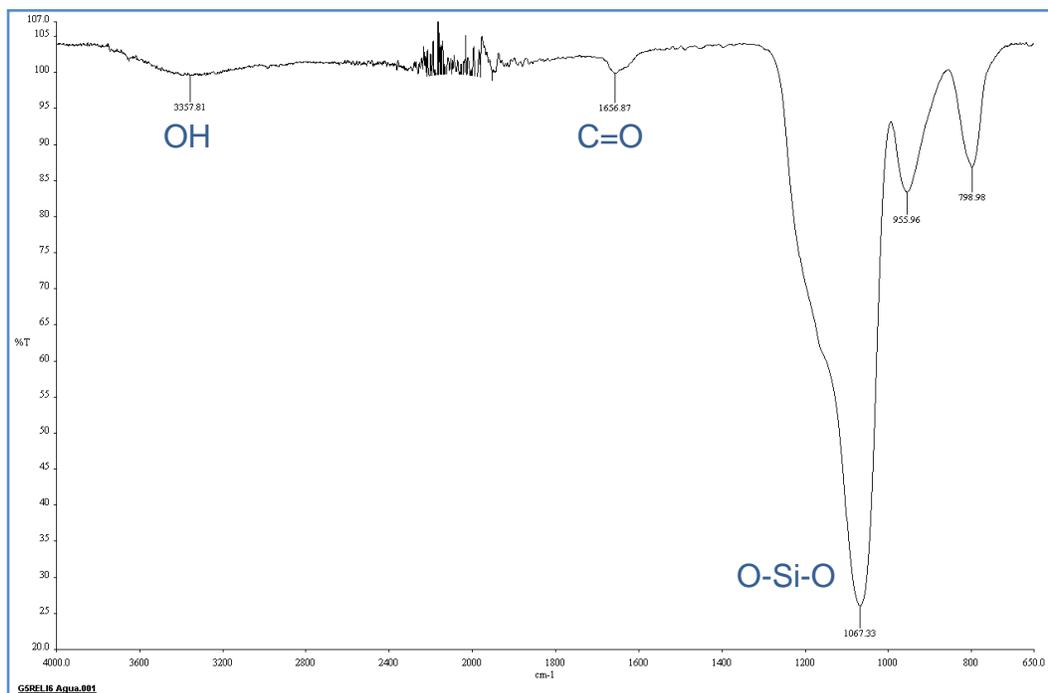


Figura 40. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción de la gabapentina en agua desionizada.

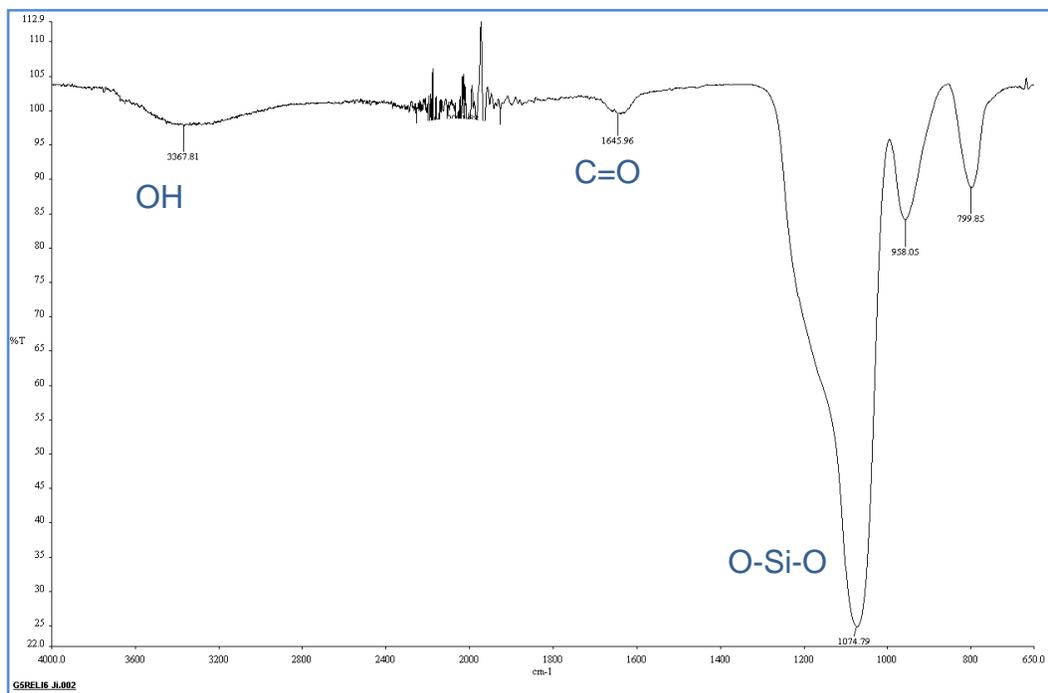


Figura 41. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción de gabapentina en Jugo intestinal simulado.

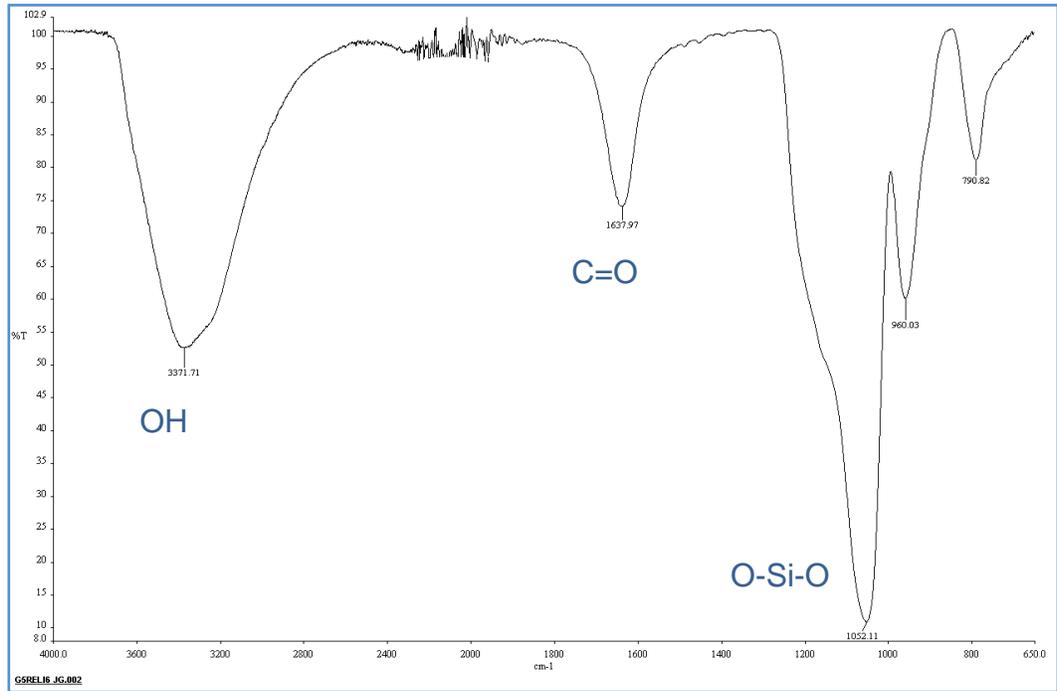


Figura 42. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción en Jugo gástrico simulado.

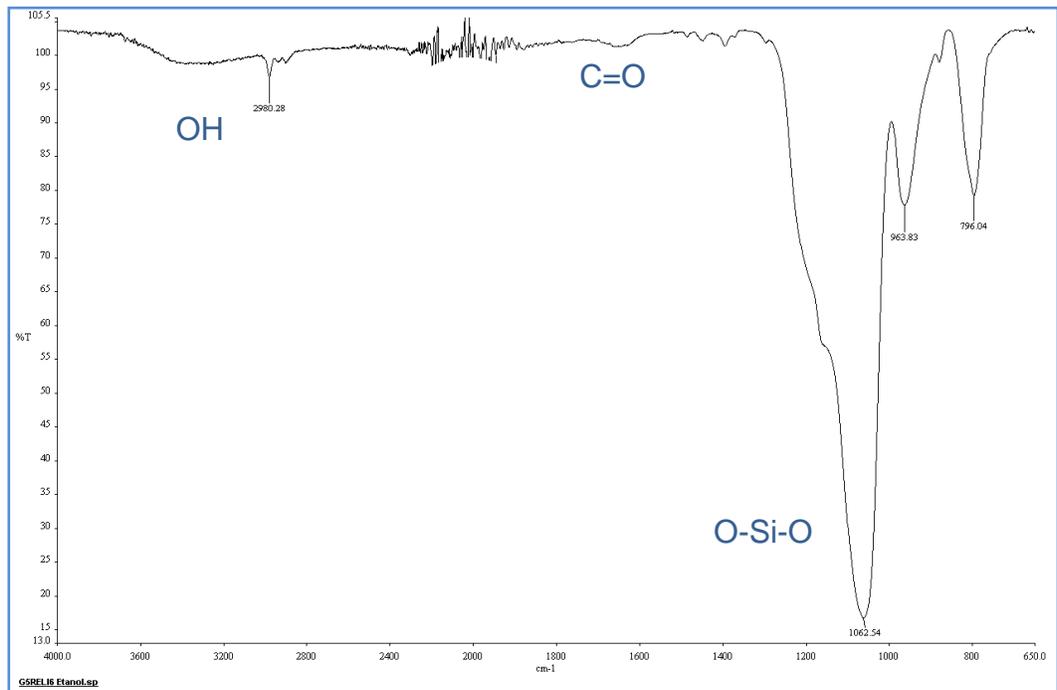


Figura 43. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción en etanol.

4.5.2 Extracción de gabapentina del biomaterial G9REL18 al 10% cuantificación por derivatización con ninhidrina (UV-Vis)

La extracción fue realizada de igual forma que para el biomaterial anterior siguiendo la metodología previamente establecida (3.2.2), en la Tabla 29 se muestran los resultados del proceso, de ellos se destaca que el biomaterial G9REL18 se extrae principalmente en solución etanólica; liberando el 31% de la gabapentina incorporada en la matriz cerámica.

Tabla 29. Porcentaje de extracción de gabapentina del biomaterial G9REL18 en los diferentes solventes

Biomaterial G9REL18	% de extracción de gabapentina
Agua	2.45
Jugo Intestinal Simulado	2.34
Jugo Gástrico Simulado	2.33
Etanol	31

En la Figura 44 se percibe una coloración púrpura en el matraz que contiene etanol utilizado como medio de extracción, esta tonalidad es originada cuando reacciona la ninhidrina con gabapentina.



Figura 44. Extracción Biomaterial G9REL18 y cuantificación por método ninhidrina

En los espectros de Infrarrojo (Figuras 45 a la 48) se observa la banda de estiramiento característica del carbonilo del carboxilo perteneciente a la gabapentina a 1650 cm^{-1} , la señal en cuestión se encuentra con menor intensidad en el biomaterial proveniente de la solución etanólica, comparado con el de los otros solventes de extracción, corroborando los resultados previos los cuales indican que la extracción de la gabapentina incorporada en la matriz cerámica ocurre principalmente en medio alcohólico. Este comportamiento se puede explicar por la atracción que se presenta entre las porciones hidrocarbonadas del solvente y el fármaco a través de fuerzas de *Van der Waals*, adicional a las comunes de tipo iónico (ó ion-dipolo) y puente de hidrógeno que ocurren tanto los jugos gastrointestinales simulados como en este solvente orgánico. En la Tabla 30 se muestran los resultados generales de las extracciones y cuantificación mediante derivatización con ninhidrina por UV-Vis.

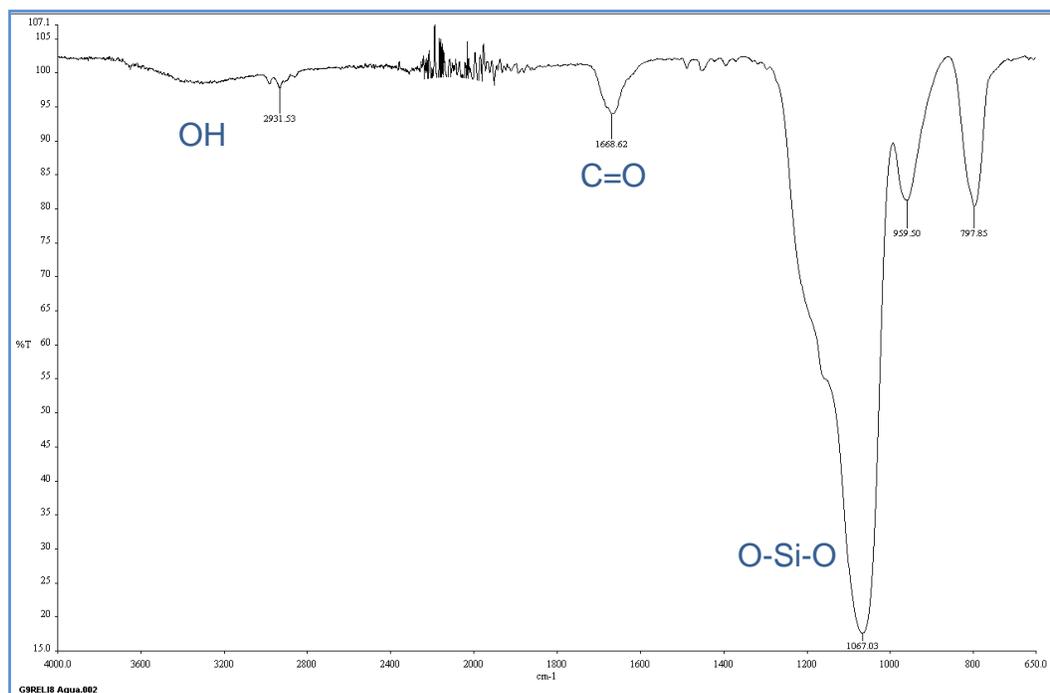


Figura 45. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G9REL18 después de la extracción de la gabapentina en agua desionizada.

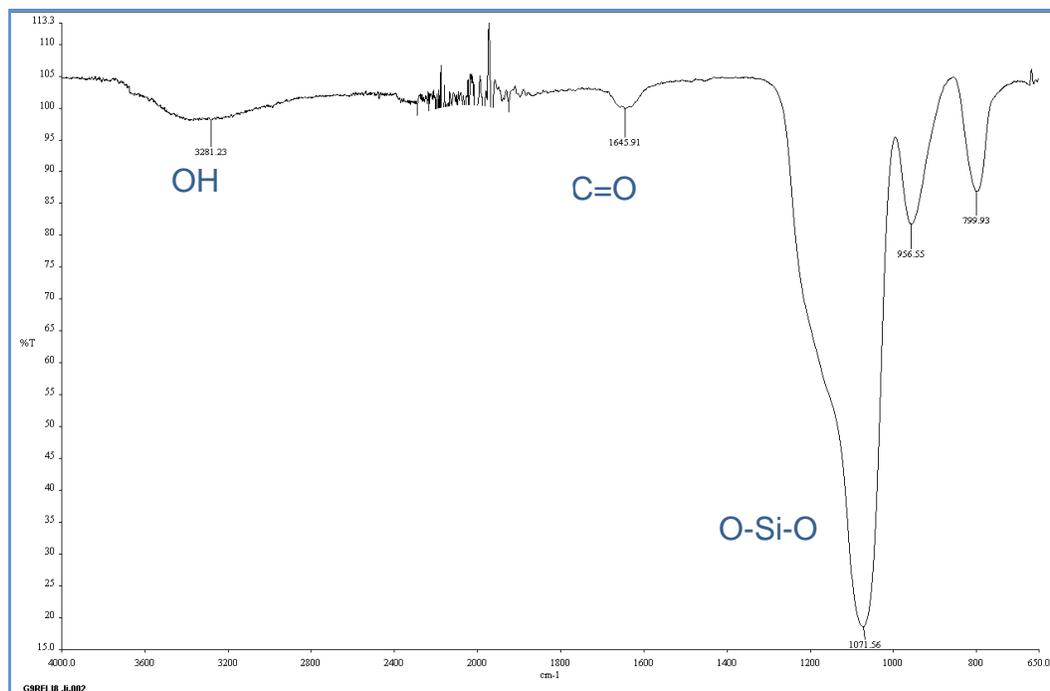


Figura 46. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G9REL18 después de la extracción de gabapentina en Jugo intestinal simulado.

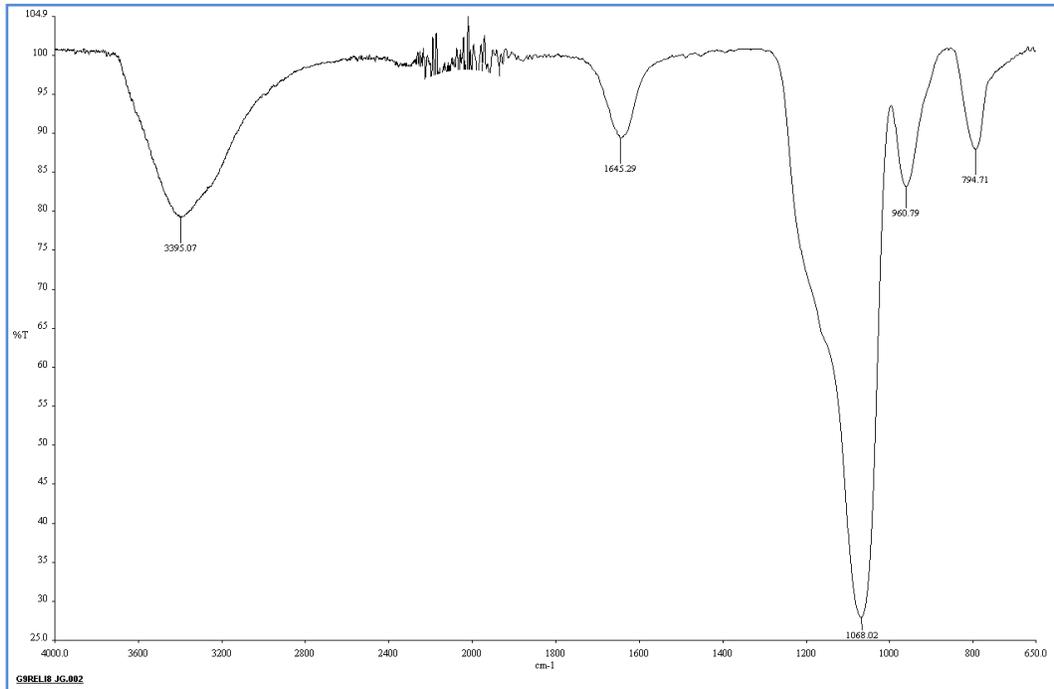


Figura 47. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G9REL18 después de la extracción en Jugo gástrico simulado.

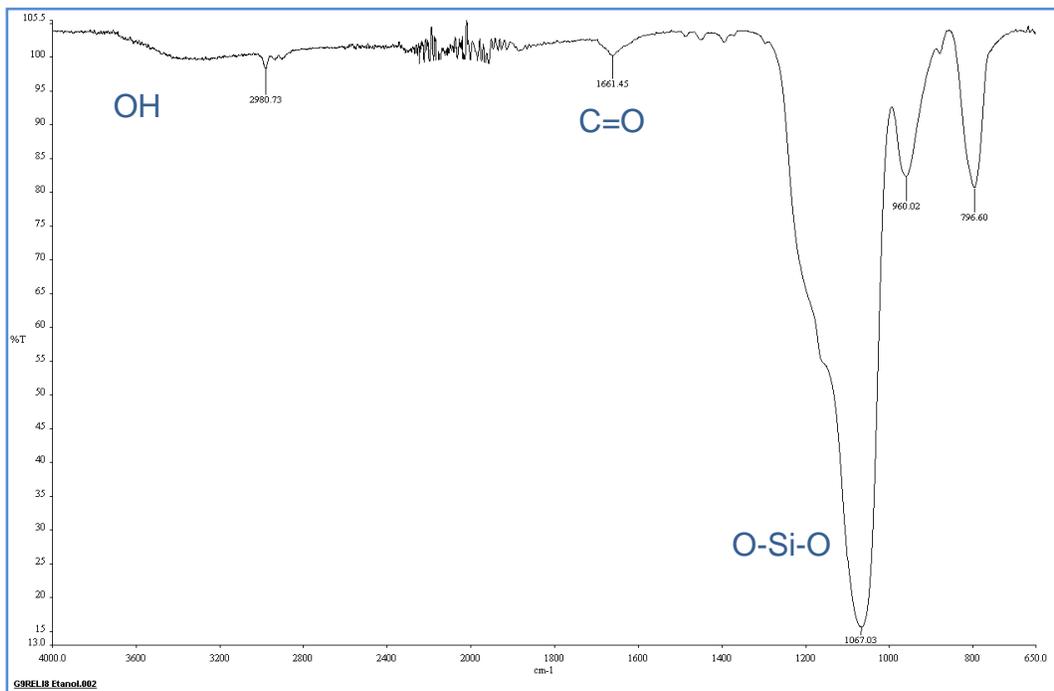


Figura 48. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G9REL18 después de la extracción en etanol.

Tabla 30. Tabla general de extracciones en distintos solventes (G5REL16 y G9REL18) cuantificado por espectrofotometría UV-Vis (derivatización con ninhidrina)

Resultados de extracciones		
Medios de extracción	G5REL16	G9REL18
Agua desionizada	2.37%	2.45%
Jugo Intestinal simulado	2.4%	2.34%
Jugo Gástrico simulado	2.8%	2.33%
Etanol	63.6%	31%

Como se mencionó en la tesis de Aldaba⁸¹ el biomaterial G5REL16 fue el que presentó la mayor incorporación de gabapentina y G9REL18 la menor. En la Tabla 30 se observa que la extracción en etanol mantiene el mismo comportamiento.

La liberación del fármaco incorporado en la matriz cerámica depende de muchos factores como se mencionó en los antecedentes, influyen las características del solvente, estructura y tamaño del fármaco, tamaño y distribución de los poros de la matriz y condiciones de la síntesis del biomaterial (pH, temperatura), entre otros.

Los resultados previos indican que la gabapentina se extrae en mayor proporción con solventes orgánicos polares, como el etanol, en comparación con su extracción en agua y los jugos gastrointestinales simulados a distintos valores de pH, esto sugiere la participación de las fuerzas de atracción intermoleculares de tipo *Van der Waals* entre las porciones hidrocarbonadas de la gabapentina y del solvente orgánico, logrando la desincorporación del fármaco de la matriz (Figura 49)

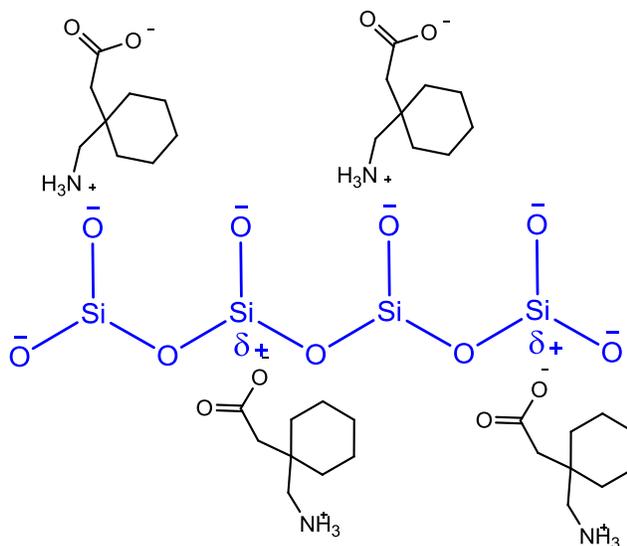
4.5.3 Extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en solventes hidrocarbonados; cuantificación por derivatización con ninhidrina (UV-Vis)

Para comprobar la suposición anterior, la cual se esquematiza en la Figura 49, se procedió a realizar extracciones con el biomaterial que incorporó más gabapentina (G5REL16 al 10%) en distintos solventes (Tabla 31). Éstos fueron seleccionados por su estructura química, modificando la cantidad de carbonos en la molécula y su polaridad. El procedimiento de extracción se siguió conforme a lo establecido en la sección 3.2.2, posteriormente se analizaron las muestras mediante la reacción de derivatización con ninhidrina por espectrofotometría UV-Vis establecida en la metodología y adicionalmente se evaporaron los solventes y se recuperó el sólido para ser analizado por FTIR.

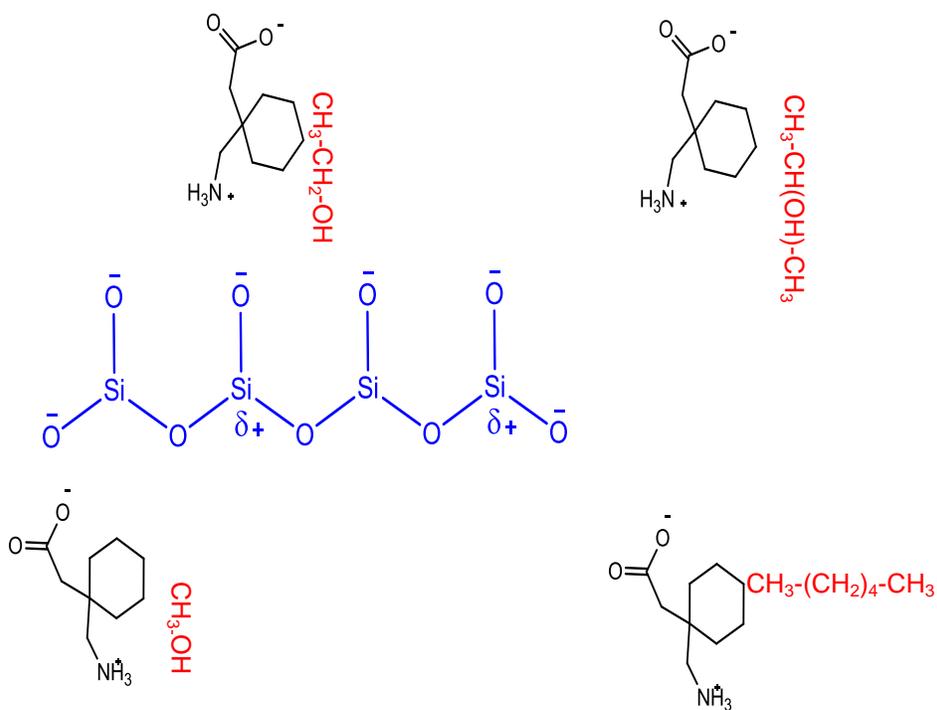
Tabla 31. Extracción de G5REL16 al 10% en distintos solventes para evaluar la polaridad.

<i>Solvente (hidrocarbonado)</i>	<i>Estructura Química</i>	<i>Índice Polaridad⁸⁷</i>
Metanol	CH ₃ -OH	6.6
Etanol	CH ₃ -CH ₂ -OH	5.2
Alcohol isopropílico	CH ₃ -CH(OH)-CH ₃	4.3
2-butanol	CH ₃ -CH(OH)-CH ₂ -CH ₃	3.9
Hexano	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ CH ₃	0.0





a) Gabapentina incorporada en la matriz cerámica (SiO_2)



b) Gabapentina desincorporada de la matriz cerámica (SiO_2) por la presencia de solventes orgánicos

Figura 49. Ejemplificación de liberación de gabapentina por la presencia de solventes orgánicos

Los resultados indican un mayor porcentaje de extracción de gabapentina en metanol (87.8 %), mientras que el menor porcentaje fue en hexano con un 24% de liberación. Tabla 32

Tabla 32. Porcentaje de extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 en solventes hidrocarbonados

Biomaterial G5REL16	% de extracción de gabapentina
Metanol	87.8
Etanol	63.6
Alcohol isopropílico	32.4
2-butanol	28.3
Hexano	24

En las Figuras 50-54 se presentan los espectros IR del residuo sólido del biomaterial en los distintos solventes utilizados. La banda más intensa que aparece a 1060 cm^{-1} está asociada al movimiento de estiramiento asimétrico de O-Si-O, también aparecen las bandas de tensión de Si-O⁻ a 960 y 790 cm^{-1} , aunado a estas bandas características de la matriz cerámica (SiO₂) se incluye la de 3290 cm^{-1} correspondiente a los movimientos vibracionales de los enlaces -OH. Con respecto a la gabapentina se observa la banda de estiramiento a 1650 cm^{-1} , perteneciente al enlace C=O del carboxilo, también aparecen las bandas de estiramiento del grupo -NH₂ a 2980 cm^{-1} . En todos los espectros se mantiene la banda de referencia (1650 cm^{-1}), que indica la presencia de gabapentina, lo cual está correlacionado con los datos de la Tabla 32, porque en ninguno de los solventes se logra extraer el 100% del fármaco.

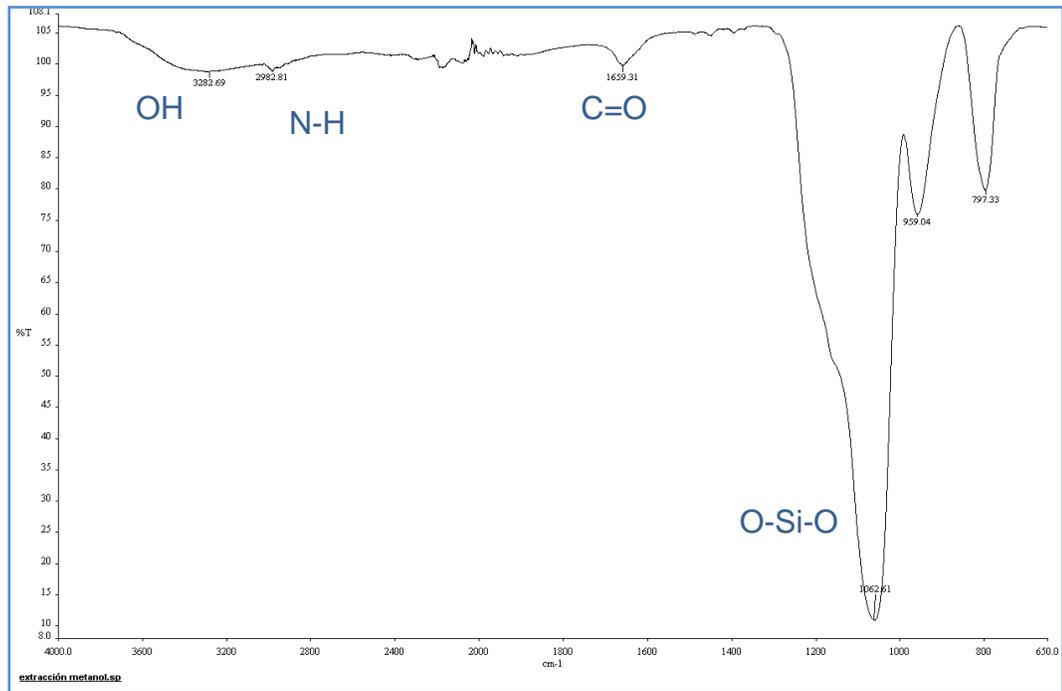


Figura 50. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción en metanol

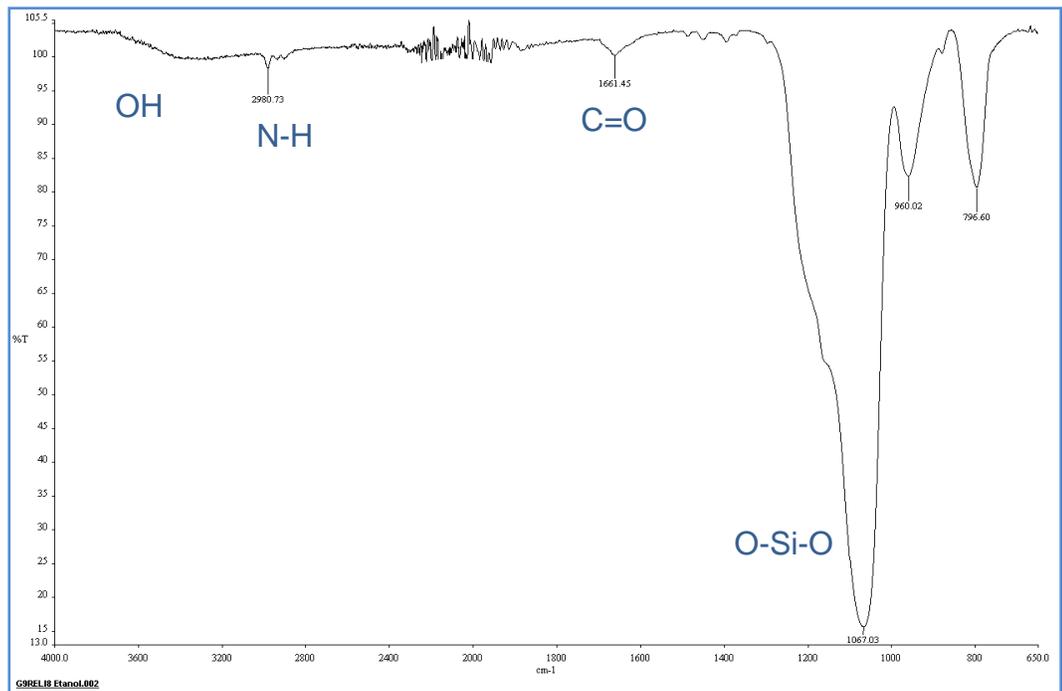


Figura 51. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción en etanol

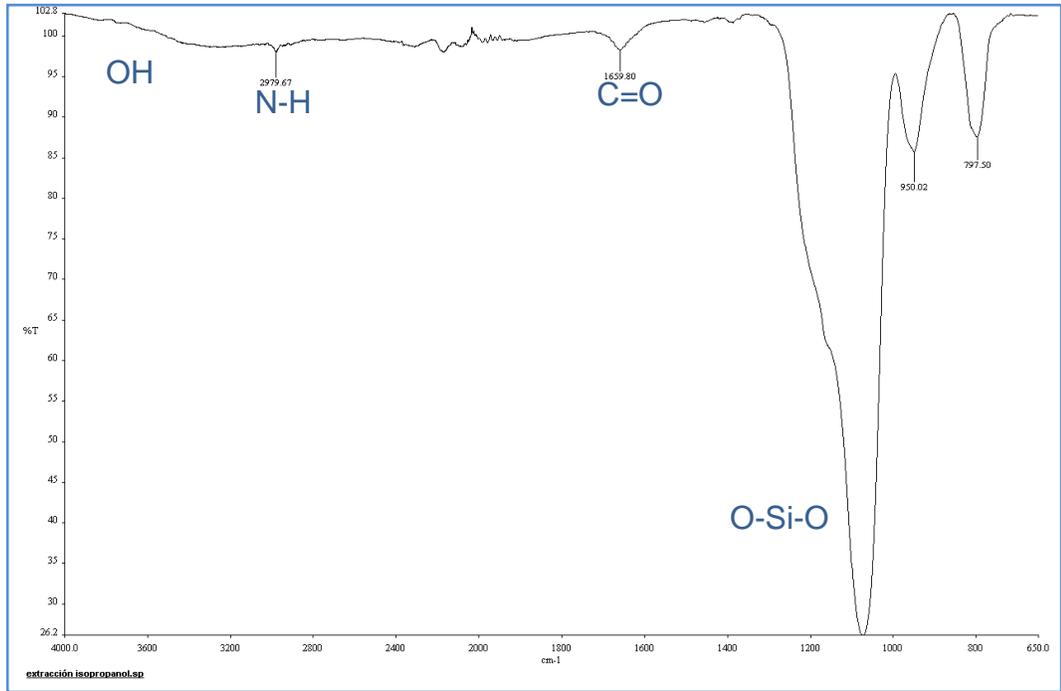


Figura 52. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción en alcohol isopropílico.

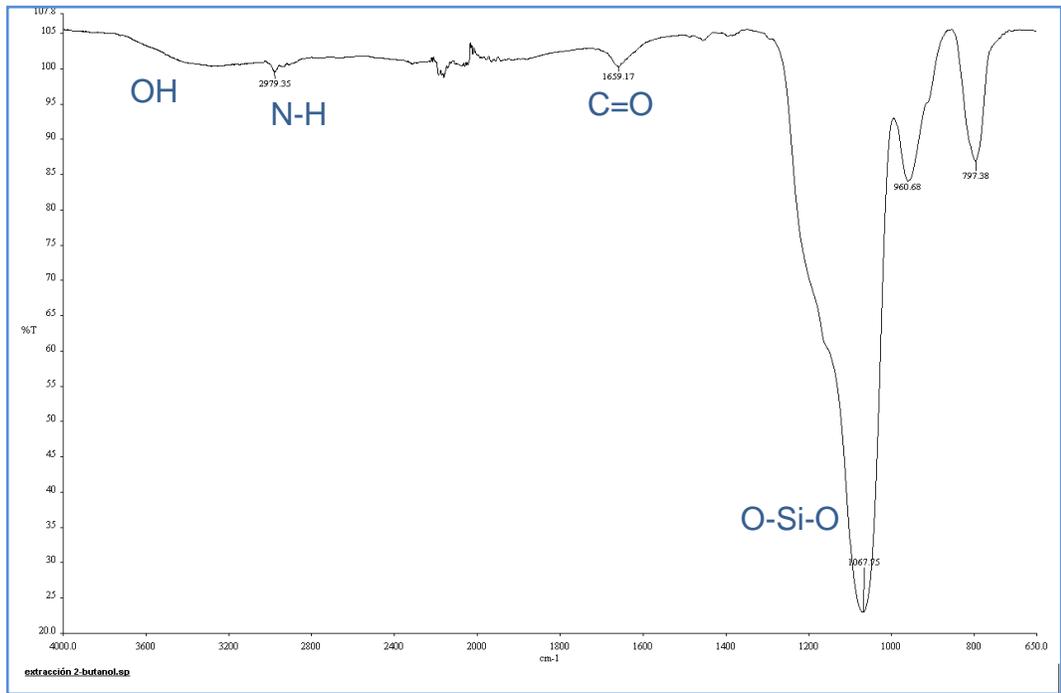


Figura 53. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción en 2-butanol.

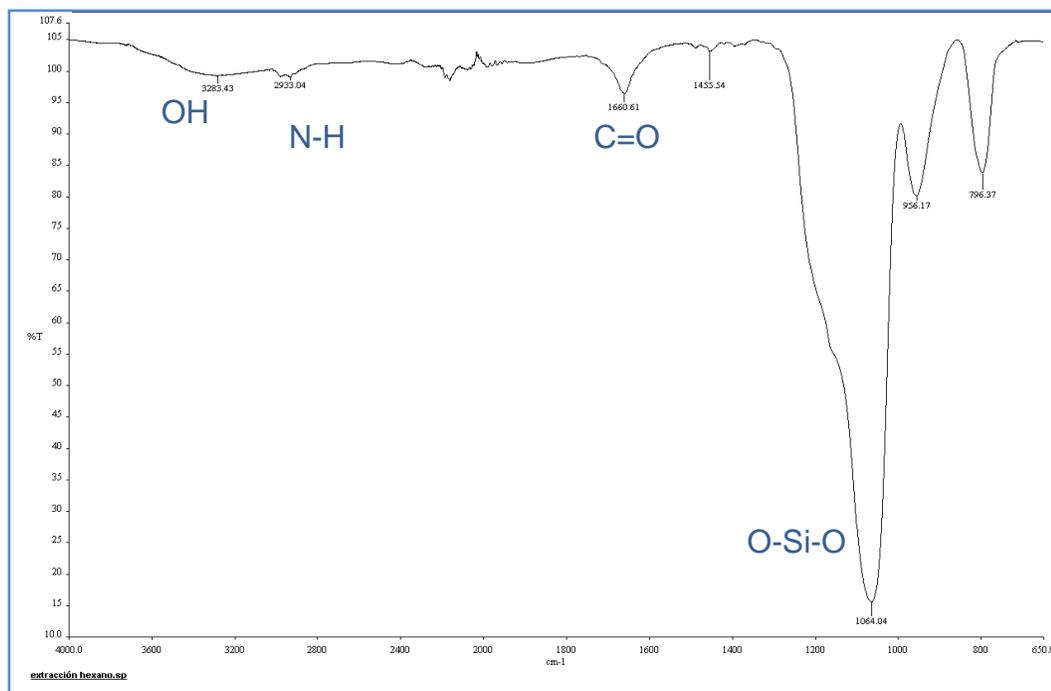


Figura 54. Espectro FTIR del residuo del biomaterial G5REL16 después de la extracción en hexano.

Los resultados de las extracciones en solventes hidrocarbonados muestran una mayor facilidad de desincorporar al fármaco presente en la matriz cuando incrementa la polaridad del solvente; comparando los resultados de la extracción con alcoholes con los obtenidos mediante la utilización del alcano se observa que la presencia del grupo hidroxilo, con el que el fármaco puede establecer fuerzas de atracción ion-dipolo o dipolo-dipolo, sin embargo, comparando estos resultados con los obtenidos de la extracción con agua se demuestra la participación de los átomos de carbono en la desincorporación del fármaco a través de fuerzas de *Van der Waals* puesto que es mayor la extracción en metanol (6.6) que en agua (9.1)⁸⁷

Para evaluar el efecto del pH en la extracción, debido a la presencia de grupos ionizables en la molécula y a las condiciones de síntesis del biomaterial se añadieron 100 mg del biomaterial G5REL16 en 30 mL de soluciones a diferente pH abarcando la zona ácida, neutra y alcalina (Tabla 33), posteriormente se trabajó conforme a las condiciones planteadas para las pruebas de extracción (3.2.2) y se cuantificó por medio de la derivatización con ninhidrina por espectrofotometría UV-Vis.

Tabla 33. Soluciones a diferente pH para evaluar la extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16.

Solvente	pH
Etanol-HCl	0.8
Jugo gástrico simulado	1.2
Jugo intestinal simulado	6.8
Agua desionizada	7.1
Na ₂ CO ₃ 0.1M	14.7

Los resultados se presentan en la Tabla 34, e indican que el pH no modifica los porcentajes de extracción de la gabapentina de la matriz cerámica.

Tabla 34. Extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16, efecto del pH del medio.

Solventes	% de extracción de gabapentina
Agua	2.67
Jg simulado	2.37
Ji simulado	2.36
Etanol-HCl	2.41
Na ₂ CO ₃ 0.1M	2.45

4.5.4 Extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en distintos solventes por triplicado y cuantificado por LC/MS.

A pesar de que no se observó ninguna variación en función del pH, para reducir la necesidad de ajustar el pH después de la extracción y reducir el efecto de la inactivación del grupo nucleófilo presente en la ninhidrina, aunado a la variabilidad de los resultados obtenidos se utilizó una técnica analítica de mayor sensibilidad, precisión y exactitud por medio de un cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector de masas; para esto se realizaron por triplicado pruebas de extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en metanol, etanol, agua, Jg, Ji bajo las condiciones de la sección 3.2.2 y se utilizó para la cuantificación de gabapentina por LC/MS a partir de la curva de calibración preparada en solución (Met:H₂O, 50:50 v/v).

En la Tabla 35 se presentan los resultados de la extracción de gabapentina en los distintos solventes, donde se observa un mayor porcentaje de extracción del fármaco en metanol (34.09%) y el menor en jugo gástrico simulado (13.89%).

Tabla 35. Porcentajes de extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en diferentes solventes, cuantificación por LC/MS

<i>Medio de Extracción</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>Promedio</i>	<i>% de Extracción</i>
Concentración	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	(µg/mL)	%
Jg	1.421	1.531	1.216	1.389	13.89
Etanol	1.799	1.597	1.342	1.580	15.8
Agua	1.874	1.956	1.672	1.834	18.34
Ji	1.998	3.010	1.078	2.029	20.29
Metanol	5.722	2.157	2.348	3.409	34.09

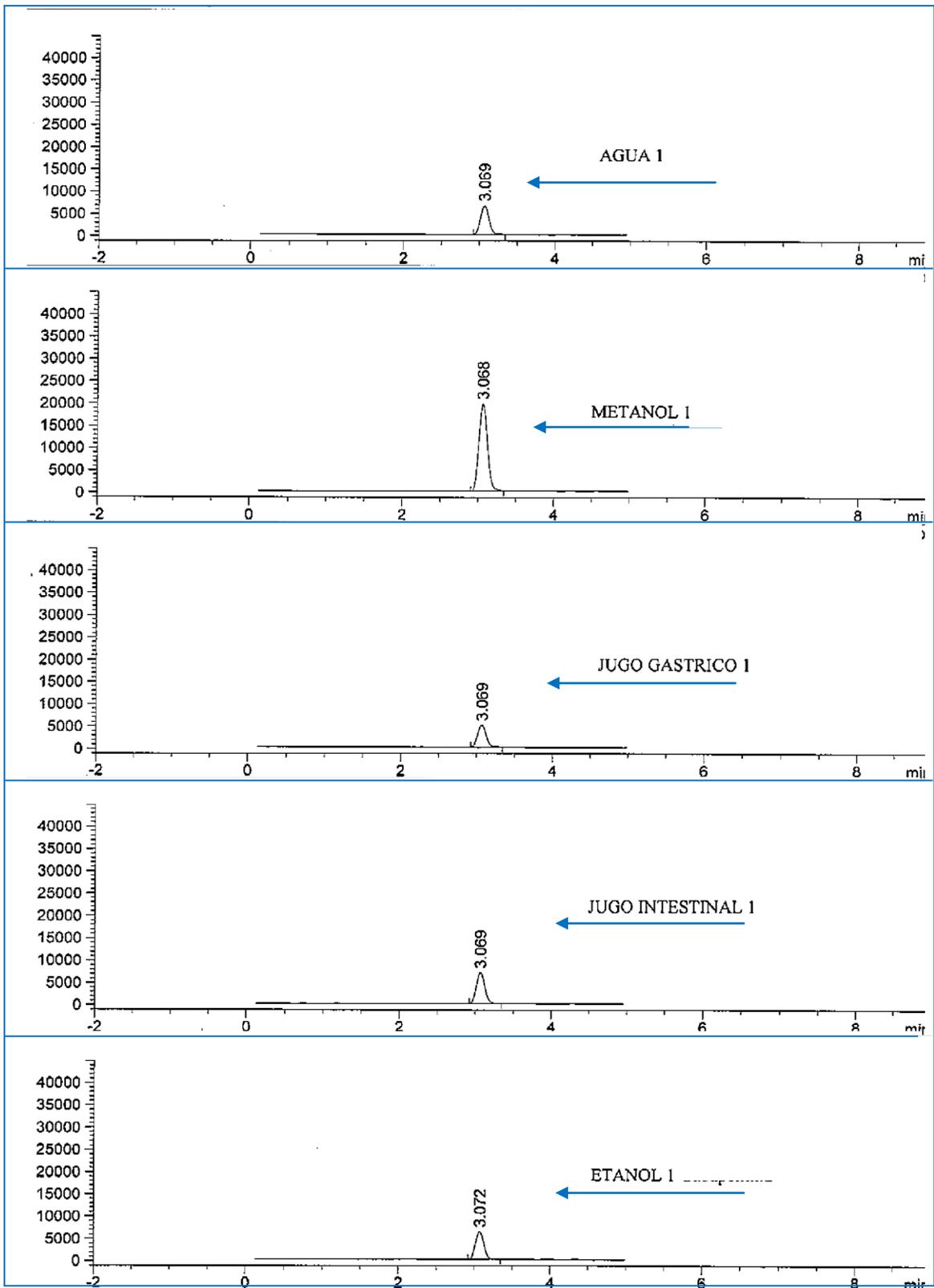
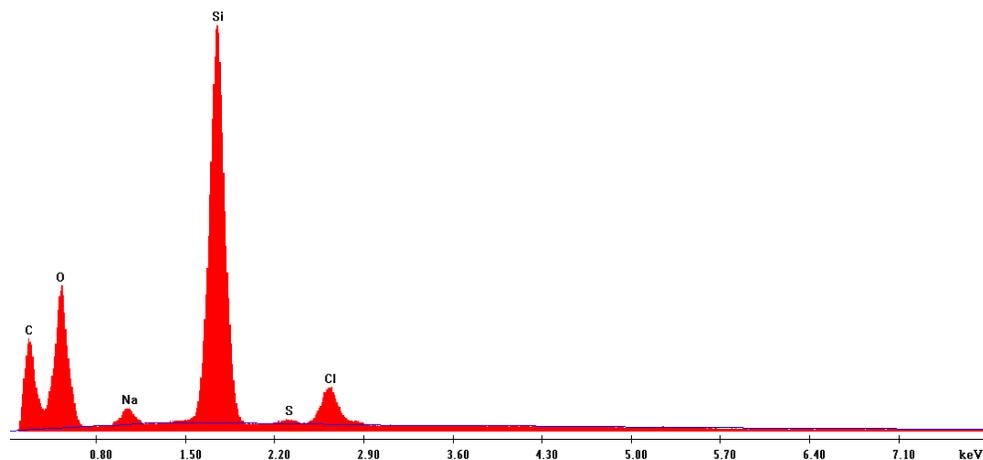


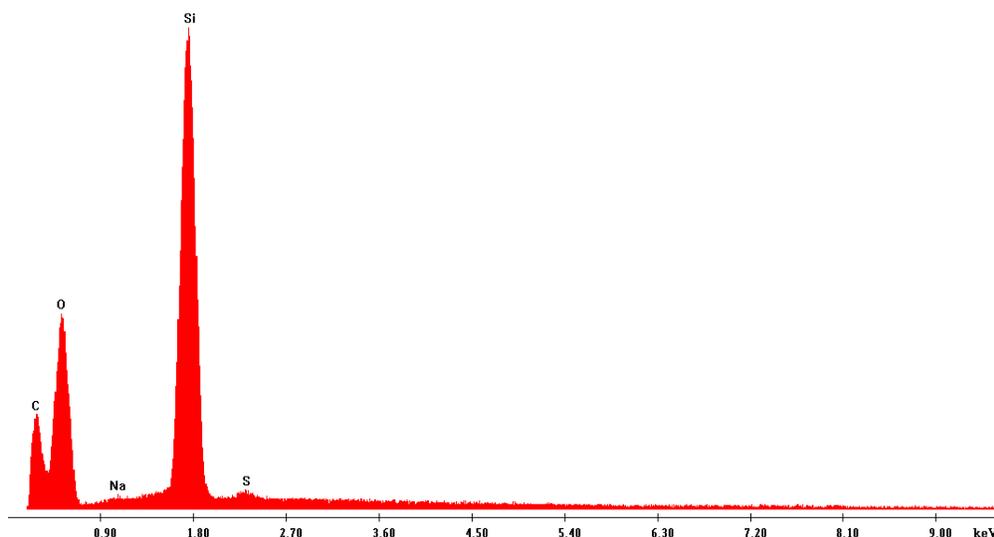
Figura 55. Cromatogramas de la extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% cuantificación por LC/MS

En la Figura 55 se presentan los cromatogramas de la extracción de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% y posterior análisis con LC/MS, se observa como el pico que se encuentra al tR de 3.06 minutos correspondiente a la gabapentina (previa validación del método) en metanol es más intenso comparado con las demás extracciones.

Adicionalmente, se registraron espectros de emisión obtenidos por EDX acoplado a la microscopía electrónica de barrido, donde se observan (espectro 1) las líneas correspondientes al análisis elemental del biomaterial, que muestran la presencia de oxígeno (35.51wt%), carbono (47.64wt%), proveniente de la gabapentina y silicio (13.55wt%), correspondiente a la composición de la matriz cerámica. En el espectro 2, obtenido del residuo sólido de la extracción con metanol la composición de carbono, el es utilizado como indicador de la presencia de gabapentina, es menor (42wt%).



Espectro 1. MEB biomaterial G5REL16 al 10% en JG. 47% C



Espectro 2. MEB biomaterial G5REL16 al 10% en Metanol. 42% C

Estos resultados confirman lo planteado anteriormente sobre la desincorporación en mayor proporción de la matriz cerámica en el solvente orgánico, debido presumiblemente a las interacciones de tipo *Van der Waals* que se presentan entre las porciones hidrocarbonadas del solvente y la gabapentina. Asociado a estos factores también influyen las características de la matriz cerámica (SiO_2) sintetizada; en la tesis de Aldaba⁸¹ se menciona que el biomaterial G5REL16 en base a los resultados del análisis textural tiene un tamaño de poro estrecho, el tamaño de poro promedio fue de 61.4 Å; el biomaterial G9REL18 es laminal y con poros en forma de raja con un diámetro menor de 36.3 Å. Esto explica por qué el mayor porcentaje de liberación se logra para el biomaterial G5REL16 comparado con el G9REL18, puesto que el diámetro de poro mayor favorece la liberación de la gabapentina.

4.6 Pruebas de liberación de gabapentina *in vitro*.

Los estudios fueron realizados siguiendo la metodología de la sección 3.2.3; se llevaron a cabo aproximadamente 70 perfiles de liberación modificando diferentes variables que se encuentran en la Tabla 15.

4.6.1 Pruebas de liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 y G9REL18 *in vitro*, cuantificación por HPLC con arreglo de diodos.

Se realizó el procedimiento para la liberación del fármaco a partir del biomaterial G5REL16 sintetizado con 5% de gabapentina utilizando el aparato I (canastillas) tanto para jugo gástrico como intestinal ambos simulados a los diferentes tiempos establecidos; sin embargo no se logró detectar el fármaco en la solución, ya que como se aprecia en las Figuras 56 y 57 no aparece ninguna señal al tiempo de retención para gabapentina (3.7 minutos), establecido en la validación del método por HPLC con arreglo de diodos.

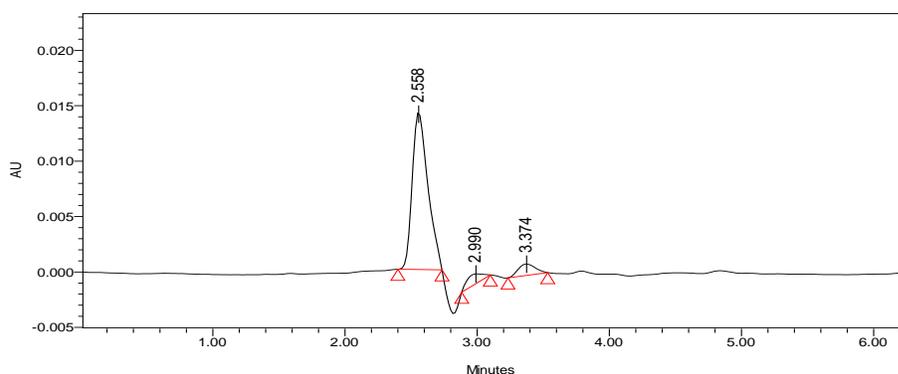


Figura 56. Cromatograma liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 5% en Jg al tiempo de 2 h. Aparato I

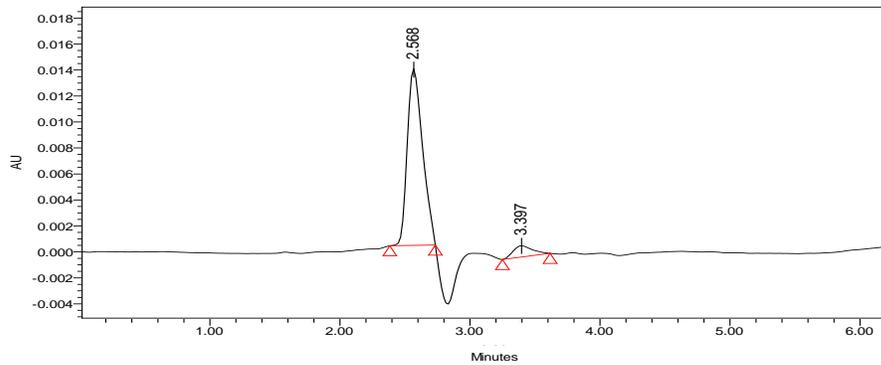


Figura 57. Cromatograma liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 5% en Ji al tiempo de 2 h. Aparato I

Por lo anterior, se optó por utilizar un biomaterial con las mismas características pero incorporando 10% de gabapentina, se realizaron las pruebas de liberación bajo el mismo criterio establecido por duplicado; se esperaba que al incrementar la cantidad de fármaco se alcanzaría una mayor concentración y se lograría detectar y cuantificar, pero no se obtuvo el resultado. (Figura 58 y 59)

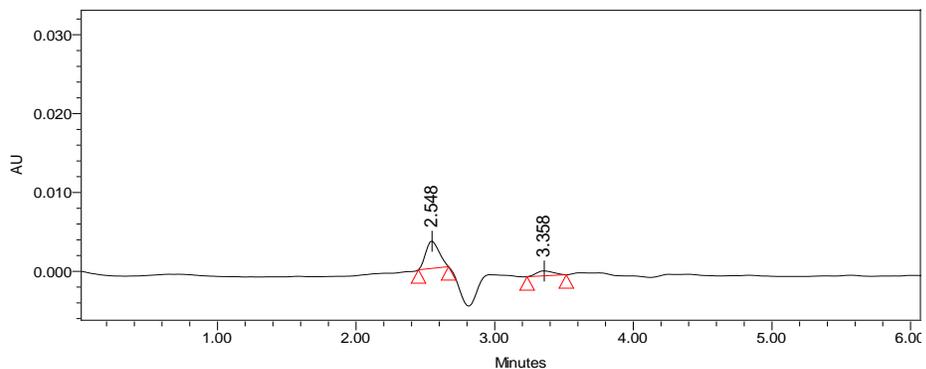


Figura 58. Cromatograma liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en Jg al tiempo de 2 h. Aparato I.

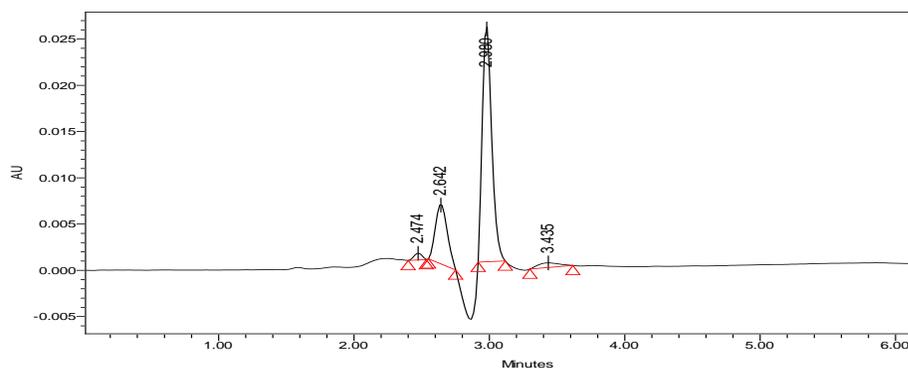


Figura 59. Cromatograma liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en Ji al tiempo de 2 h. Aparato I.

Se probó con otro aparato, el tipo II (paletas, Figura 60) con la finalidad de evaluar si este factor modificaba la liberación del fármaco, sin embargo ésta no fue una variable que influyera en la liberación de la gabapentina, puesto que no se presentó diferencia con respecto a los cromatogramas anteriores utilizando, el aparato I (canastillas, Figura 60).

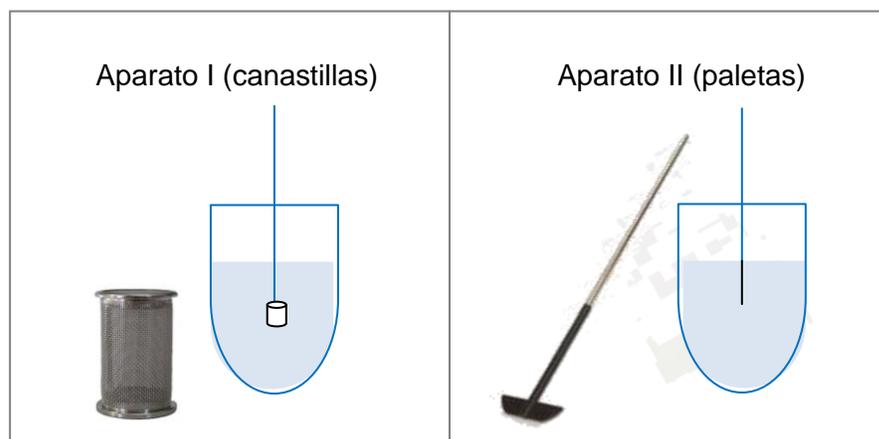


Figura 60. Aparato I (canastillas), Aparato II (paletas)

Posteriormente, se trabajó con el biomaterial que incorporó la menor cantidad de gabapentina según los reportes previos⁸¹, en este caso el biomaterial G9REL18 sintetizado al 10% de gabapentina. Se hicieron las pruebas de liberación establecidas a los distintos tiempos, bajos las diferentes condiciones en el aparato I y II, sin embargo no se detectó que el fármaco se haya liberado. (Figura 61 y 62)

Aunado a estas variables se realizaron pruebas de liberación con los biomateriales G5REL16 y G9REL18 al 10 % de gabapentina, aumentando la velocidad de agitación de 50 a 100 rpm y de igual manera no fue posible detectar y por ende, cuantificar el fármaco de interés.

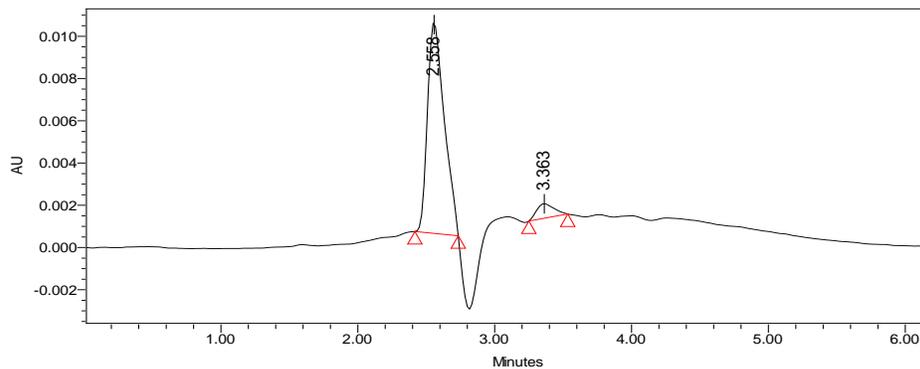


Figura 61. Cromatograma liberación de gabapentina del biomaterial G9REL18 al 10% en Jg al tiempo de 2 h. Aparato II.

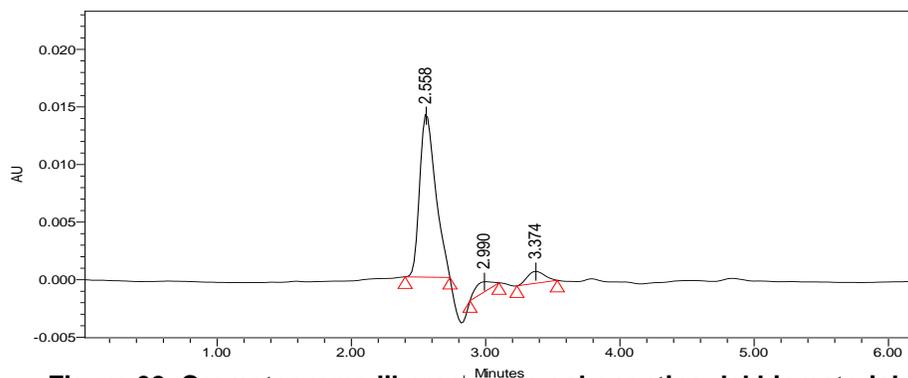


Figura 62. Cromatograma liberación de gabapentina del biomaterial G9REL18 al 10% en Ji al tiempo de 2 h. Aparato II.

4.6.2 Pruebas de disolución de gabapentina comercial (Neurontin®), cuantificación HPLC arreglo de diodos.

Como se mencionó en la metodología, para efectos comparativos se realizaron pruebas de disolución del medicamento de patente Neurontin®. En la Tabla 36 se reportan las concentraciones y porcentajes de disolución obtenidos, con estos datos se construyeron las curvas que aparecen en la Figura 63; se observa una disolución del 84.3% en jugo gástrico transcurridos 30 minutos de la prueba y en jugo intestinal se disuelve el 85% después de una hora de disolución, esto indica que efectivamente la forma farmacéutica tiene un comportamiento de liberación inmediata que conduce a variaciones en las concentraciones plasmáticas, lo cual se intenta modificar con una forma de liberación sostenida

Tabla 36. Concentraciones y porcentaje de disolución de Neurontin® en Jg y Ji.

tiempo (h)	<i>Jugo gástrico simulado</i>			<i>Jugo intestinal simulado</i>		
	Conc inicial (mg/L)	Conc promedio. (mg/L)	% disolución	Conc inicial (mg/L)	Conc promedio (mg/L)	%disolución
0.0	55.66	1.87	3.35	56.33	0	0
0.25	55.66	43.67	78.45	-	-	-
0.5	55.66	46.95	84.36	56.33	30.83	54.73
1	55.66	45.68	82.07	56.33	47.94	85.11
2	55.66	47.26	84.86	56.33	46.003	81.66
3	55.66	46.36	83.28	56.33	46.29	82.18
4	-	-	-	56.33	44.98	79.85

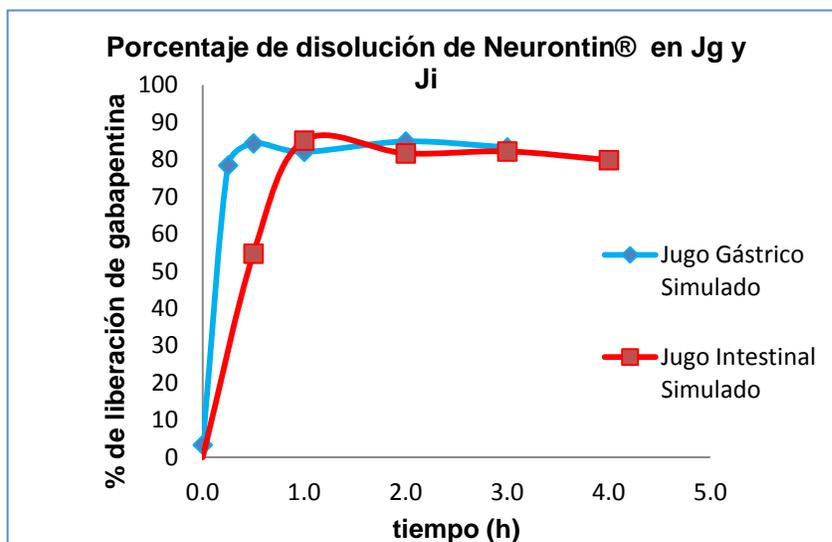


Figura 63. Perfil de Disolución de Neurontin® en jugo gástrico e intestinal ambos simulados

Con la intención de incrementar el conocimiento con respecto al comportamiento de liberación de la gabapentina desde la matriz cerámica y con base en los resultados anteriores, se realizó un perfil de liberación del biomaterial G5REL16 al 10% utilizando como solvente etanol, además se trabajó con el aparato II a 100 rpm y se tomaron alícuotas de 3 mL a los tiempos 0, 0.16, 0.5, 1, 3, 5 horas. En la Figura 64 se aprecia que se logra un 40% de liberación del fármaco en los primeros 10 minutos del proceso de liberación, manteniendo constante este comportamiento durante 5 horas. La cuantificación se hizo mediante la derivatización con ninhidrina.

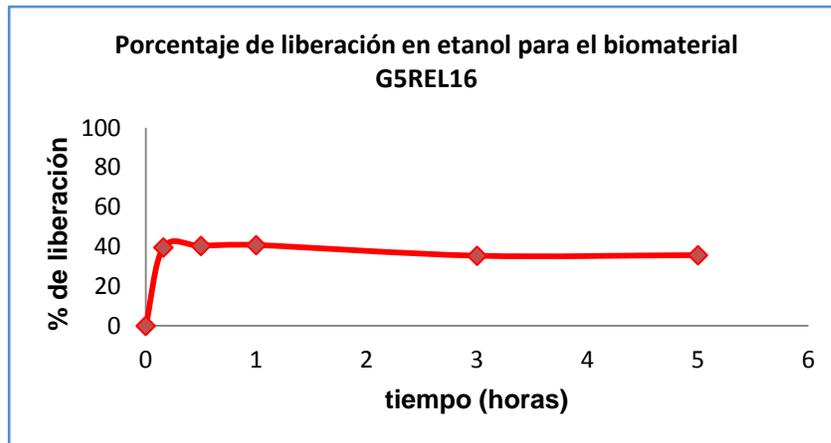


Figura 64. Porcentaje de liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% utilizando etanol como solvente.

Debido a que no fue posible determinar la liberación *in vitro* de los biomaterial haciendo uso de la técnica de HPLC con arreglo de diodos, y poder así comparar los resultados con los que presenta el medicamento de referencia, se procedió a utilizar la técnica LC/MS.

4.6.3 Pruebas de liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 *in vitro*, cuantificación por LC/MS

Con la finalidad de cuantificar la gabapentina del biomaterial (G5REL16 al 10%) *in vitro*, se trabajó según lo citado en la metodología, utilizando un equipo de mayor sensibilidad: cromatógrafo de líquidos acoplado a masas.

En la Tabla 37 se muestran los resultados donde se aprecia que las concentraciones encontradas del fármaco liberado son menores a 1 µg/L , con lo cual se explica por qué no pudo ser detectado por la técnica de HPLC con

arreglo de diodos. En la Figura 65 se observa que la mayor concentración en ambos jugos se obtiene a las 36 h posteriores al inicio del experimento.

Tabla 37. Concentraciones y porcentaje de disolución de biomaterial G5REL16 al 10% en Jg y Ji.

<i>Jugo gástrico simulado</i>				<i>Jugo intestinal simulado</i>		
tiempo	Conc. inicial	Conc. promedio	% liberado	Conc. inicial	Conc. promedio	% liberado
(h)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	%	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	%
0	10	0	0	10	0.0212	0.212
0.25	10	0.301	3.01	10	0.455	4.55
0.5	10	0.4915	4.915	10	0.482	4.82
1	10	0.503	5.03	10	0.504	5.04
2	10	0.5325	5.325	10	0.483	4.83
3	10	0.573	5.73	10	0.516	5.16
5	10	0.6395	6.395	10	0.548	5.48
8	10	0.629	6.29	10	0.622	6.22
24	10	0.805	8.05	10	0.7595	7.595
36	10	0.914	9.14	10	0.8605	8.605

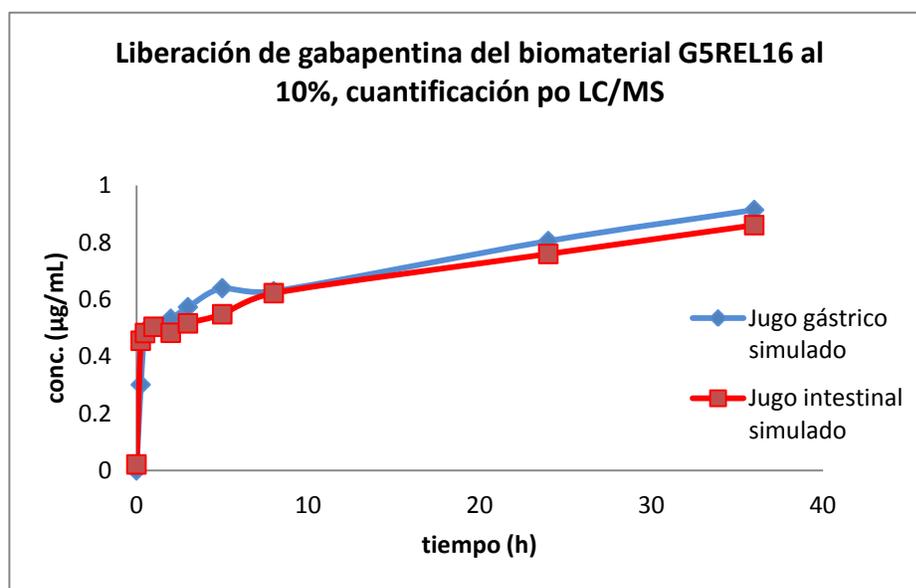


Figura 65. Perfil de liberación del biomaterial G5REL16 al 10% en jugo gástrico e intestinal ambos simulados

En las Figuras 66 a 69 se observa el comportamiento de la liberación de la gabapentina en los diferentes medios utilizados a distintos tiempos. En jugo gástrico simulado se observa a 0.25 h la presencia de gabapentina cuya concentración permanece constante y posteriormente se incrementa a las 36 horas. En jugo intestinal simulado el comportamiento es similar al antes descrito.

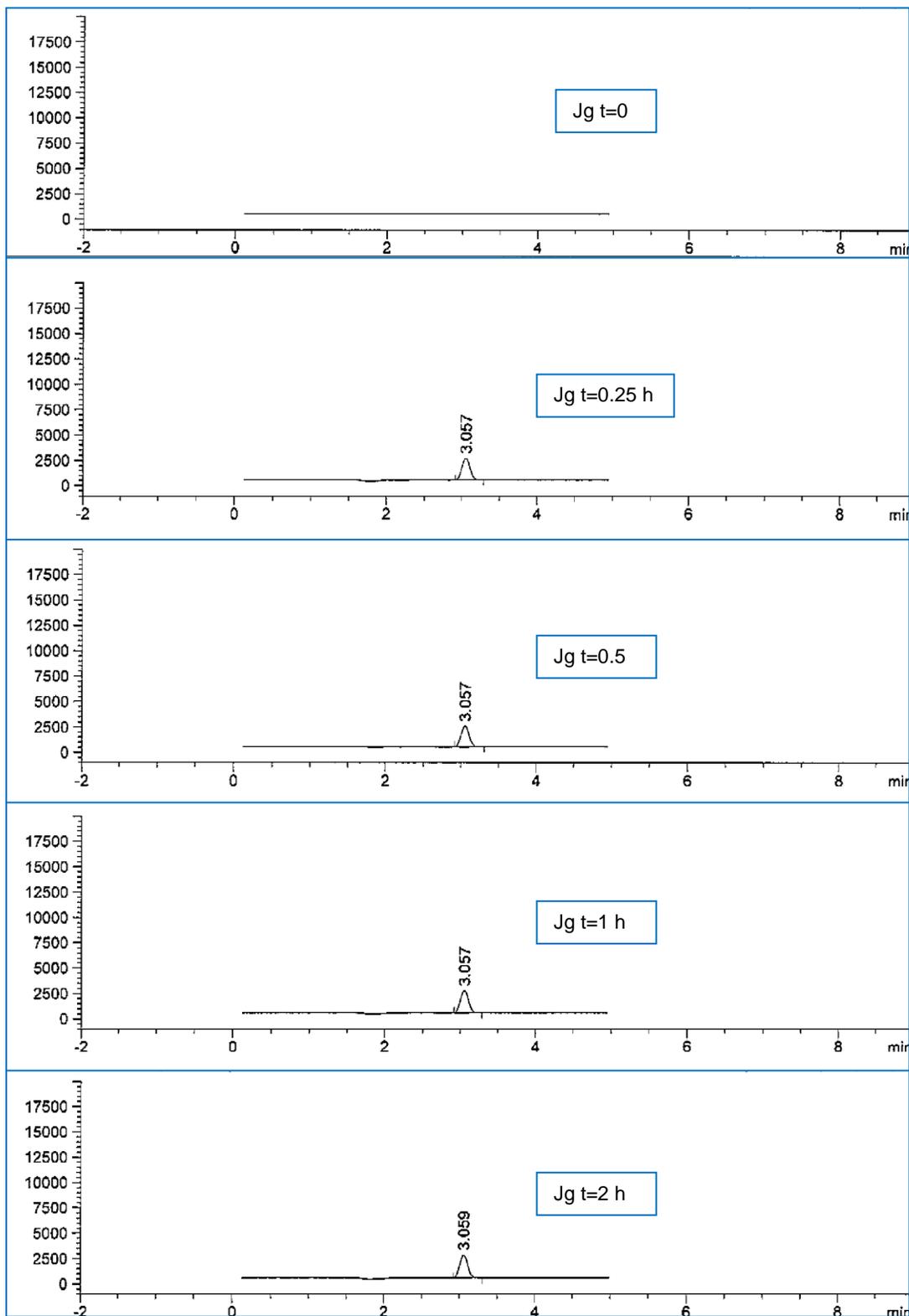


Figura 66. Cromatogramas de la liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en Jg, cuantificación por LC/MS.

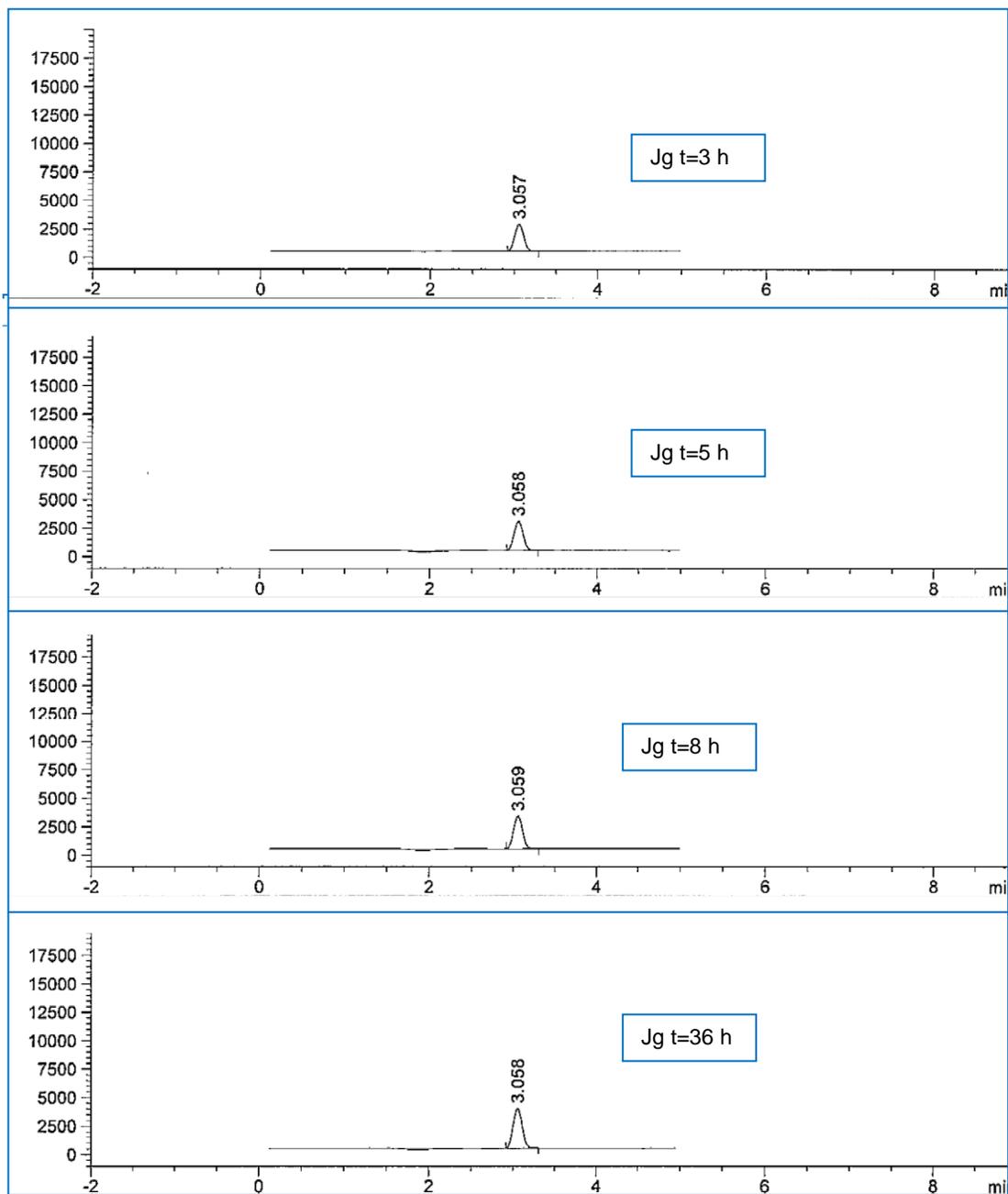


Figura 67. Cromatogramas de la liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en Jg, cuantificación por LC/MS.

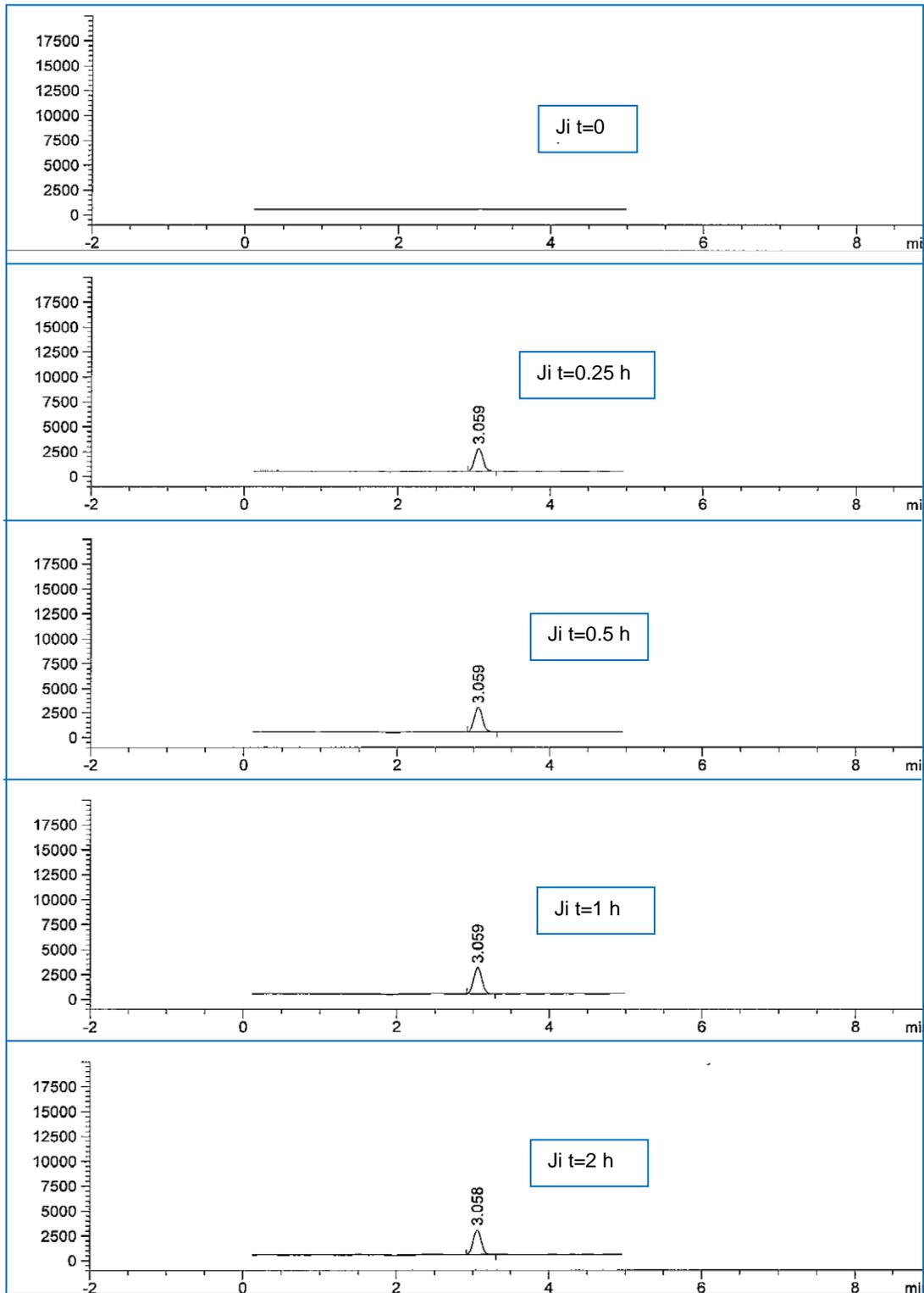


Figura 68. Cromatogramas de la liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en Ji, cuantificación por LC/MS.

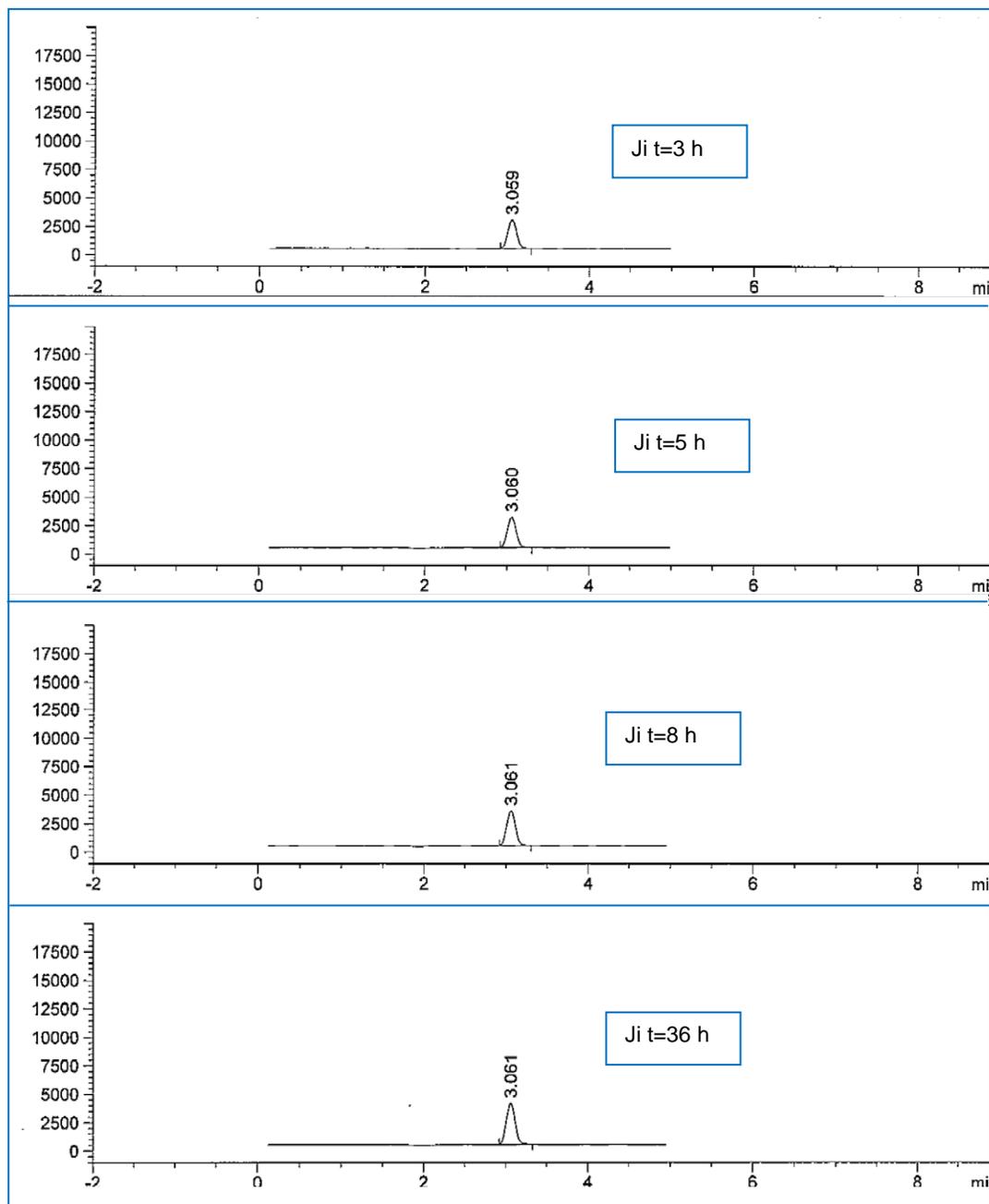


Figura 69. Cromatogramas de la liberación de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% en Ji, cuantificación por LC/MS.

La liberación del principio activo depende de la competencia entre las fuerzas de atracción intermoleculares de la gabapentina con el material cerámico y con el solvente, así como del tamaño de la molécula del fármaco y del poro del biomaterial.

En el caso del biomaterial G5REL16 al 10% observamos que presenta una liberación retardada en ambos jugos gastrointestinales simulados puesto que libera el máximo (menos del 10% del fármaco) a las 36 horas, contrario al Neurontin® que libera más del 80% a 0.5 h para jugo gástrico y 1 h para jugo intestinal. Para el biomaterial se observó que el pH no influye en la liberación; pues si se considera la naturaleza química de la gabapentina ácido (1-aminometil) ciclohexano acético, sus valores de pka y las condiciones de síntesis del biomaterial, a pH = 5 el fármaco se encuentra ionizado en el grupo amino en forma de catión, lo que conduce a atracción iónica con las porciones aniónicas de la sílice, se requiere entonces vencer dichas fuerzas, estableciendo atracciones con aniones presentes en el solvente del medio de liberación, cloruros en el caso de jugo gástrico y fosfatos para el jugo intestinal. De acuerdo a los resultados obtenidos, la afinidad del fármaco con estos iones no es suficiente para liberar a toda la gabapentina del biomaterial. Esto explica las concentraciones muy bajas de gabapentina que se liberan del biomaterial.

En este estudio resulta evidente que se requieren fuerzas de atracción adicionales que favorezcan la interacción con el solvente, tomando en cuenta que los jugos gastrointestinales biológicos tienen una composición compleja⁸⁸, que incluye sustancias orgánicas (enzimas, hormonas y mucosustancias) con

las que se pueden establecer además interacciones de tipo *van der Waals*, las cuales son factibles con la porción hidrocarbonada de la gabapentina, y considerando los resultados de la extracción, además de la prueba de liberación del biomaterial G5REL16 al 10% donde se incluyó un solvente orgánico (etanol), para investigar si este tipo de compuestos favorece la liberación de la gabapentina, se observa que la liberación del fármaco se incrementó a 40%. Como se indicó en la sección anterior (4.5.1) dentro de las pruebas de extracción se evaluaron diferentes solventes hidrocarbonados, con la finalidad de comprender su efecto, y en el estudio se encontró que a menor cantidad de carbonos hay una mayor extracción del fármaco, esto podría ser debido a la facilidad de penetración del solvente en los poros del material

Aunque para realizar perfiles de disolución y liberación, en muchos de los casos se utiliza una solución diluida de HCl conteniendo además NaCl para la preparación de jugo gástrico sintético, en otros se emplean diversos componentes de naturaleza orgánica para simular los diferentes fluidos gastrointestinales^{89,90,91} y la variedad de tipos de interacciones intermoleculares que ocurren *in vivo*, por lo que realizar las pruebas de liberación *in vivo* en este estudio permite evaluar la correlación *in vitro-in vivo* y analizar si la liberación del fármaco del biomaterial es retardada y en baja concentración como ocurren *in vitro* o cambia su comportamiento.

4.7 Pruebas de liberación de gabapentina *in vivo*

Las pruebas *in vivo* se realizaron con un modelo biológico conformado de tres perros *beagles*, a los cuales se les dosificó el equivalente a 1200 mg de gabapentina vía oral, utilizando en el primer periodo biomaterial G5REL16 al 10% y en el segundo Neurontin®, la dosis se determinó utilizando como base la establecida para el humano y ajustándola en función del peso del animal en estudio. (Tabla 38).

Tabla 38. Dosificación del biomaterial G5REL16 al 10% y Neurontin® en función del peso del animal.

<i>Perro</i>	<i>Peso del perro (kg)</i>	<i>Biomaterial G5REL16 al 10% (g)</i>	<i>Neurontin® (g)</i>
1	15	2.6	0.352
2	14.6	2.5	0.338
3	14.3	2.5	0.332

Posteriormente se trabajó con la ayuda de un médico veterinario, experto en el manejo de animales de experimentación para llevar a cabo la cateterización de los caninos, primero se desinfectó la zona de la punción (vena del antebrazo), se despejó el área con hojas de lámina, para remover el pelo presente, posteriormente se colocó el catéter intracath™ 20, se tomaron las muestras con jeringa para recolectar 3 mL de sangre en tubos vacutainer con EDTA, durante cada punción se colocó heparina en el catéter para evitar la coagulación y prevenir la atrofia de la vena, de esta manera se trató de proteger y evitar dolor a los caninos. (Figuras 70-72)



Figura 70. Perro beagle utilizado en las pruebas *in vivo*.



Figura 71. Proceso de colocación de catéter y toma de muestra.



Figura 72. Realización de estudio en clínica veterinaria especializada.

El modelo biológico se mantuvo en ayuno por 10 horas previo al inicio del estudio, trascurrido este tiempo se tomó la muestra al tiempo cero y posteriormente se administró el biomaterial G5REL16 al 10% o Neurontin® (para cada periodo) mezclado con alimento, asegurando que todo el fármaco fue administrado. Siguiendo con el protocolo planteado en la metodología, se tomaron las muestras de sangre a diferentes tiempos, después éstas se sometieron a centrifugación y precipitación de proteínas para recolectar solo el plasma de cada muestra, se guardaron en congelación de 70 ± 10 °C, para finalmente ser analizadas por LC/MS.

En las Tablas 39 a 41 se muestran las concentraciones plasmáticas de gabapentina alcanzadas *in vivo* comparando el biomaterial vs Neurontin® en cada perro y en la Tabla 42 el promedio de dichas concentraciones, además se muestran las Figuras 73 a 76 donde se observa que en todos los animales de experimentación las concentraciones plasmáticas máximas del fármaco (C_{max}) alcanzadas con Neurontin® son más altas que las obtenidas con el biomaterial, lo cual indica que una parte de la gabapentina contenida en la matriz no se libera en las condiciones fisiológicas estudiadas, el proceso de liberación depende del tamaño de poro del biomaterial, del tamaño del fármaco incorporado, de las condiciones de los fluidos biológicos y de la competencia entre las fuerzas de atracción intermoleculares que presenta el fármaco con la matriz y con los componentes de los jugos gastrointestinales. como se mencionó anteriormente en la tesis de Aldaba⁸¹ el biomaterial G5REL16

presenta un tamaño de poro estrecho, la distribución de los poros es extendida y va desde 25 a 150 Å, con un tamaño promedio de poro es 61.4 Å,

Tabla 39. Comparación entre la concentración plasmática de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% y Neurontin®. Perro 1 .

	Perro1 Biomaterial	Perro 1 Neurontin®
tiempo (h)	(µg/mL)	(µg/mL)
0	0	0
0.5	0.0351	0.199
1	0.0357	1.99816
1.5	0.0925	4.64118
2	1.656	6.05518
2.5	2.383	7.48874
3	2.583	7.49892
4	2.527	8.13856
6	1.963	7.48223
8	1.148	5.97467
12	0.0453	2.96758
24	0.00238	0.4722
48	0	0

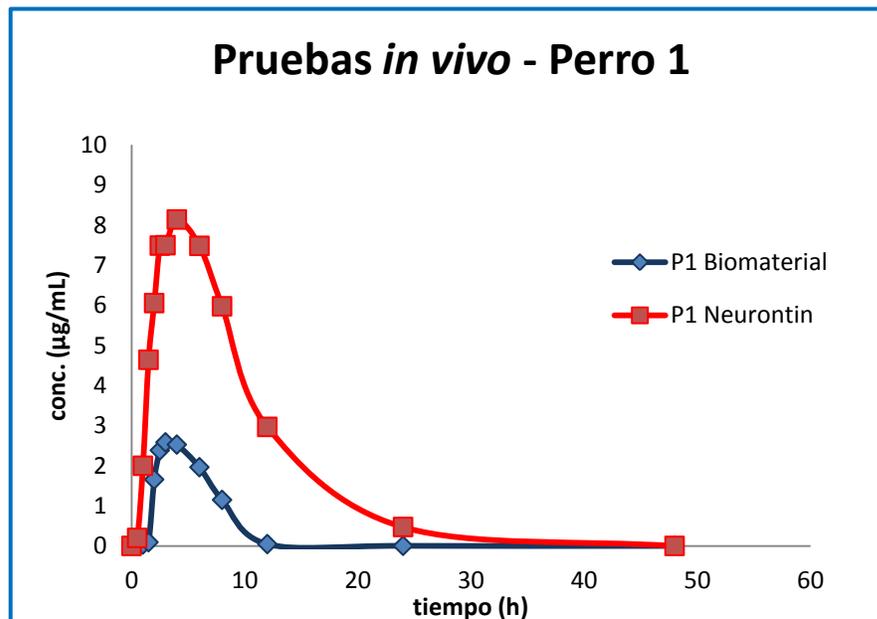


Figura 73. Comparación entre la concentración plasmática de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% y el Neurontin®. Perro 1

Tabla 40. Comparación entre las concentraciones plasmáticas de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% y del Neurontin®. Perro 2

	Perro 2 Biomaterial	Perro 2 Neurontin
tiempo (h)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
0	0	0
0.5	0	0.303087
1	0.193137	2.24746
1.5	0.4336	5.1905
2	0.831981	7.15293
2.5	0.967392	7.39353
3	1.0503	7.21188
4	1.07947	6.59679
6	0.787221	5.24117
8	0.511268	4.27797
12	0.21746	2.57324
24	0	0.553036
48	0	0.359409

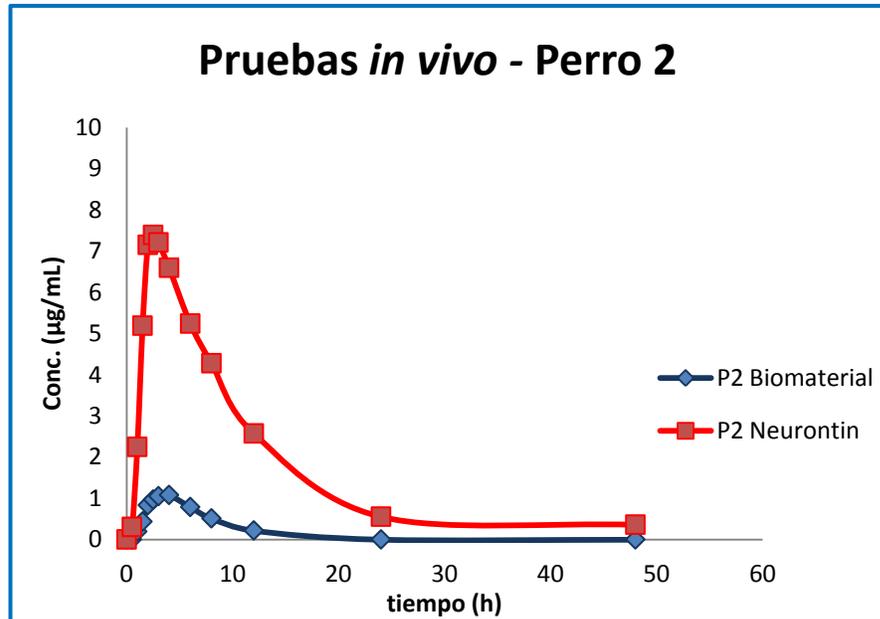


Figura 74. Comparación entre la concentración plasmática de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% y el Neurontin®. Perro 2

Tabla 381. Comparación entre las concentraciones plasmáticas de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% y del Neurontin®. Perro 3

	<i>Perro 3 Biomaterial</i>	<i>Perro 3 Neurontin</i>
tiempo (h)	($\mu\text{g}/\text{mL}$)	($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0	0	0
0.5	0	1.73617
1	0.0894522	8.00828
1.5	0.263116	10.79847
2	0.664796	11.12229
2.5	1.1584	10.77981
3	1.58841	10.90655
4	1.63632	9.04653
6	1.70249	6.55999
8	1.09539	4.95641
12	0.416376	1.88279
24	0	0.166432
48	0	0.0792195

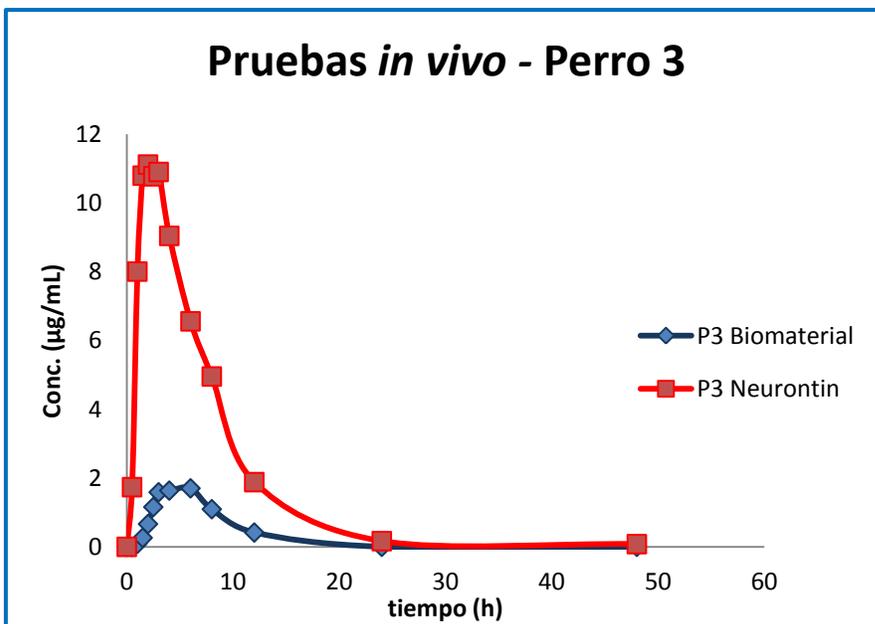


Figura 75. Comparación entre la concentración plasmática de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% y el Neurontin®. Perro 3

Tabla 42. Comparación promedio entre la concentración plasmática de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% y el Neurontin®.

	Promedio Biomaterial	Promedio Neurontin®
tiempo (h)	(µg/mL)	(µg/mL)
0	0	0
0.5	0.0117	0.746085667
1	0.1060964	4.084633333
1.5	0.263072	6.876716667
2	1.050925667	8.110133333
2.5	1.502930667	8.554026667
3	1.74057	8.539116667
4	1.747596667	7.927293333
6	1.484237	6.427796667
8	0.918219333	5.069683333
12	0.226378667	2.474536667
24	0.000793333	0.397222667
48	0	0.1462095

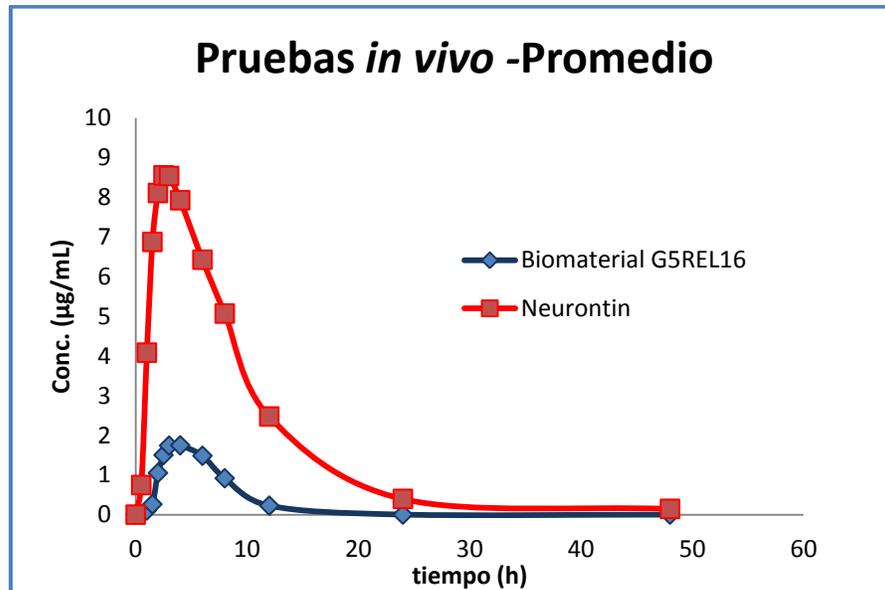


Figura 76. Comparación promedio entre la concentración plasmática de gabapentina del biomaterial G5REL16 al 10% y el Neurontin®.

Los parámetros farmacocinéticos se obtuvieron de forma visual: C_{max} (concentración plasmática máxima alcanzada) y t_{max} (tiempo en alcanzar C_{max}). En la Tabla 43 es posible apreciar las diferencias en los parámetros farmacocinéticos de la gabapentina de la forma de liberación inmediata (Neurontin®) y la incorporada en la matriz cerámica.

Tabla 43. Parámetros farmacocinéticos de la gabapentina

	Neurontin®	Biomaterial G5REL16 al 10%
C _{max} (µg/mL)	8.884 ± 0.222	1.788 ± 0.422
t _{max} (h)	2.833 ± 0.367	4.333 ± 0.352

Se calculó t_{máx} con una prueba no paramétrica (Kruskal Wallis)⁹² a través del programa R donde se encontró un valor-p de 0.1840.⁹³

Prueba de Kruskal Wallis para T _{máx} ***				
Medicamento	Mediana	G.L	χ ² C.	PR>H
R	2.5	1	1.7647	0.1840
P	4			

Figura 77. Prueba Kruskal Wallis para determinat t_{máx}

Además se con el programa R, haciendo uso de la prueba no paramétrica (Mood Median Test), se calculó C_{máx}, se encontró un valor-p de 0.014.

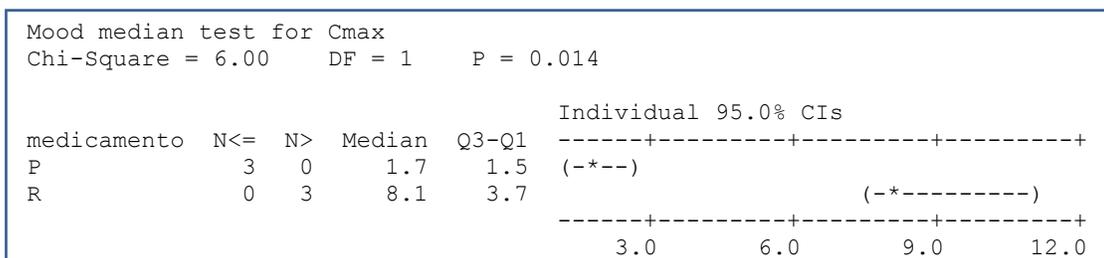


Figura 78. Prueba Mood para calculo de Cmax

La interpretación de estas pruebas es conforme al valor-p.

Si el valor-p es mayor o igual a 0.05, se dice que no hay diferencia significativa.

Si el valor-p es mayor o igual a 0.01 y menor a 0.05, entonces se dice que hay diferencia significativa.

Si el valor-p es menor a 0.01, se dice que hay una diferencia altamente significativa. Para $t_{m\acute{a}x}$ estadísticamente no hay diferencia significativa entre el biomaterial G5REL16 y el Neurontin®. En el caso de $C_{m\acute{a}x}$, si hay una diferencia significativa entre el biomaterial y Neurontin®, esto podría atribuirse a que el biomaterial incorpora solo el 10% de gabapentina y de este no se libera todo el fármaco; aunado a que se encuentra en un soporte con poros estrechos que retarda su liberación.

El biomaterial G5REL16 al 10% en las pruebas *in vitro* se liberó 0.9 µg/mL de la gabapentina a las 36 horas; por su parte *in vivo* se libera 1.788 µg/mL a las 4.3 horas, es decir hay un incremento en la concentración de gabapentina como una aceleración en el tiempo de liberación para las pruebas *in vivo*, parte de este fenómeno lo explican las características y composición de los jugos gastrointestinales fisiológicos; como se mencionó anteriormente estos

fluidos biológicos contienen además diversas enzimas (pepsina, renina, lipasas, sacarasa, maltasa, lactasa y nucleasa), así como cationes (Na^+ K^+ , Mg^{2+} , H^+) y aniones (Cl^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-}) . Si bien la actividad enzimática es específica para proteínas, lípidos, carbohidratos, entre otros. La estructura química de dichas enzimas de naturaleza proteica puede favorecer las interacciones intermoleculares, dipolo-dipolo. ion-dipolo, puente de hidrógeno e incluso fuerzas de atracción de tipo *Van de Waals* y acelerar la liberación del fármaco.

En el estudio realizado por Rhee en 2008, donde se intentó desarrollar gabapentina de liberación sostenida a base de polímeros, *in vitro* tuvo un comportamiento sostenido, pero *in vivo* presentó un comportamiento similar al fármaco de liberación inmediata, esto se atribuyó al tamaño de la forma farmacéutica (tableta oblonga 18.0 x 9.2 x 6.3 mm)⁶⁶ la cual se retenía en el estómago y según los datos de Stevenson y colaboradores donde evaluaron la absorción de fármacos antiepilépticos en perros, encontraron que la gabapentina se absorbe principalmente en la porción del duodeno y yeyuno del intestino delgado, siendo muy escasa en el colon; además de observar que el vaciamiento gástrico de los caninos sucede entre 2 a 3 horas⁹⁴. El tamaño de la forma farmacéutica no permitió el paso hacia el intestino delgado, evitando la absorción por lo que no se pudo encontrar la liberación en forma sostenida.

En el caso del biomaterial que G5REL16 al 10%, no presenta una forma farmacéutica, por lo que su comportamiento de liberación no se puede atribuir a ello; en este caso podemos hablar del diámetro de poro promedio que presenta la matriz cerámica que es de 61.4 Å, así como del tamaño de la gabapentina

que tiene valores entre 8 a 10 Å, siendo un fármaco muy pequeño que puede ser fácilmente atrapado entre las redes tridimensionales de la matriz, teniendo dificultad para desincorporarse, esto podría ser el factor por el cual el Cmax para el biomaterial es menor comparado con Neurontin®.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

La determinación y cuantificación de gabapentina se realizó con diferentes técnicas analíticas; utilizando cromatografía de líquidos con detector de arreglo de diodos (% error 3.81; 6- 50 mg/L), espectrofotometría con detector UV-Vis (% error 3.6; 6.14-36 mg/L) y cromatografía de líquidos acoplada a masas. Ésta última técnica se validó en solución (metanol:H₂O, 50:50) y plasma humano obteniendo porcentajes de error de 1.07% y 2.44%, respectivamente; ambas con LOQ menor a 1 µg/mL, debido a su alta sensibilidad fueron utilizadas para evaluar la liberación del biomaterial (G5REL16 10%) en las pruebas *in vitro* e *in vivo*. Además se utilizó LC/MS en solución para comparar la extracción del biomaterial (G5REL16 10%) en diferentes solventes, contra la técnica de espectrofotometría que implica la reacción de derivatización con ninhidrina, la cual se utilizó para las pruebas de extracción de los biomateriales (G5REL 16 10% y G9REL18 10%) en diferentes solventes. Por otra parte la técnica analítica de HPLC con detector de arreglo de diodos, no permitió la detección de gabapentina en las pruebas *in vitro* debido a que su LOD (1.69 mg/L) fue superior al encontrado.

La extracción y cuantificación de gabapentina de los biomateriales G5REL16 y G9REL18 en diferentes solventes mediante la derivatización con ninhidrina indican que la gabapentina se extrae en mayor proporción con

solventes orgánicos polares, como el etanol, en comparación con su extracción en agua y los jugos gastrointestinales simulados, esto sugiere la participación de las fuerzas de atracción intermoleculares de tipo *Van der Waals* entre las porciones hidrocarbonadas de la gabapentina y del solvente orgánico, logrando la desincorporación del fármaco de la matriz. Además se observa que las condiciones de síntesis de los biomateriales tales como pH, relación TEOS/H₂O, entre otras impactan en el diámetro de poro de cada uno de ellos siendo de 61.4 Å para G5REL16 y 36.3 Å para G9REL18; esto modifica el grado de desincorporación del fármaco, por ello en etanol se observa la mayor (63.6%) y menor (31%) liberación respectivamente.

Las extracciones del biomaterial G5REL16 en solventes hidrocarbonados muestran una mayor facilidad de desincorporar al fármaco presente en la matriz cuando incrementa la polaridad del solvente; sin embargo, comparando los resultados obtenidos de la extracción con agua que tiene el índice de polaridad mas alto (9.1), se demuestra que es necesaria la participación de los átomos de carbono en la desincorporación del fármaco a través de fuerzas de *Van der Waals* puesto que es mayor la extracción en metanol que en agua, tanto por la técnica de derivatización con ninhidrina como por LC/MS demostrando que el impedimento estérico también afecta el comportamiento de liberación del fármaco.

Las pruebas *in vitro* en jugo gástrico simulado (pH 1.2) para el biomaterial G5REL16 mostraron un porcentaje de liberación de 9.14% al tiempo

de 36 horas, con una concentración menor a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para Neurontin® en condiciones de pH gástrico se observa una disolución del 83% transcurridos 30 minutos de la prueba. Este último tiene el comportamiento propio de una forma farmacéutica de liberación inmediata, por su parte el biomaterial G5REL16 en jugo gástrico simulado presenta un comportamiento de liberación retardada.

En jugo intestinal simulado (pH 6.8) las pruebas *in vitro* para el biomaterial G5REL16 mostraron un porcentaje de liberación de 8.605% al tiempo de 36 horas, con una concentración menor a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para Neurontin® en condiciones de pH intestinal se observa una disolución del 85% después de 1 hora de la prueba. De igual manera que en jugo gástrico simulado Neurontin® en condiciones intestinales tiene el comportamiento de una forma farmacéutica de liberación inmediata, y el biomaterial G5REL16 presenta un comportamiento de liberación retardada.

Las pruebas *in vivo* indican que el biomaterial G5REL16 liberó 1.788 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 4.3 horas. Neurontin® presentó C_{max} 8.884 $\mu\text{g}/\text{mL}$ al t_{max} de 2.833 horas. Estadísticamente no hay diferencia significativa en el t_{max} de ambos, sin embargo la C_{max} presenta una amplia diferencia. La cantidad incorporada de gabapentina en la matriz es de 10%, aunado a que no se da una liberación completa, esto explica la diferencia en las concentraciones plasmáticas alcanzadas por el biomaterial.

In vivo el biomaterial G5REL16 y Neurontin® tienen un comportamiento de liberación inmediata.

La variación en el comportamiento de la liberación de la gabapentina incorporada en la matriz cerámica (G5REL16) *in vitro* - *in vivo*, esta en función de la composición del medio real que permite mas tipos de interacciones intermoleculares tales como fuerzas de atracción de tipo *Van de Waals* con las porciones hidrocarbonadas de los mucopéptidos presentes, además de interacción de puente de hidrógeno, ion-dipolo, entre otras, con los aniones y cationes de los jugos gastrointestinales fisiológicos.

El biomaterial G5REL16 que se sintetizó al 10% de gabapentina, no presentó el comportamiento de liberación sostenida propuesto.

Este estudio aporta aprendizaje en el desarrollo de nueva tecnología farmacéutica que permite la incorporación de fármacos a través de matrices cerámicas obtenidas mediante el proceso sol-gel. La información obtenida de gabapentina de liberación sostenida en esta tesis, es prometedora para el posterior avance en nuevas formas farmacéuticas tales como implantes que pueden ser obtenidos vía sol-gel.

RECOMENDACIONES

Dados los resultados de este proyecto, con la finalidad de incrementar el potencial uso de gabapentina de liberación sostenida incorporada en una matriz cerámica; se presentan algunas recomendaciones, entre ellas:

Modificar las condiciones de síntesis del biomaterial.-

En la tesis de Aldaba se observó que a pH 9, el diámetro de los poros es mayor y a pH 5 menor, además hay una relación con la cantidad de TEOS/ H₂O, entre mayor es la relación de TEOS disminuye el diámetro de poro, por otra parte cuando el biomaterial se sintetizó a menor porcentaje de H₂O (1:6), se encontró que disminuye el área superficial, mientras que el biomaterial sintetizado 1:8 (TEOS/H₂O) presentó mayor área superficial. En base a los resultados obtenidos en las pruebas de extracción del presente proyecto se trabajo con el biomaterial G9REL18 (un diámetro de poro de 31.3 Å), y el biomaterial G5REL16 (diámetro de 64.6 Å). Este último presentó la mayor liberación en metanol debido al tamaño de poro mayor que permite la interacción de la gabapentina con el solvente, por ello si se desarrolla una matriz a pH 9 relación 0.5:8 (TEOS/H₂O), probablemente incremente el diámetro de poro y esto permita *in vivo* mayores interacciones intermoleculares entre la gabapentina y el solvente, favoreciendo así su liberación.

Incrementar el porcentaje de fármaco incorporado.-

El aumento del porcentaje incorporado de gabapentina favorece a una mayor concentración del fármaco e incrementa la posibilidad de liberación, de detección y cuantificación del principio activo con técnicas analíticas mas sencillas. Lo cual impacta de forma positiva en los costos tanto de síntesis debido a que el volumen de matriz requerida sería menor, como en la instrumentación analítica.

Desarrollo de matrices híbridas.-

Czarnobaj en 2007 prepararon matrices híbridas para incorporar cisplatino, el uso de PEG y PDMS incrementan el tamaño de poro, además la temperatura de secado de 120°C retarda la liberación debido a que los poros se estrechan¹⁷. En 2011 este mismo grupo preparó matrices híbridas SiO₂-CaO, para incorporar metronidazol, se encontró que dicha matriz, presentó la mejor liberación sostenida, en este caso el CaO favorece a la disminución del tamaño de poro y logra un comportamiento sostenido⁶⁴. Estas podrían ser algunas alternativas para mejorar el comportamiento de liberación sostenida de la gabapentina. Esta tecnología permite además el desarrollo de implantes desarrollar gabapentina en esta forma farmacéutica es algo muy prometedor para tratar el dolor neuropático provocado por neuropátia diabética periférica.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Laura Yesenia Villarreal Salinas

Candidato para el Grado de

Maestra en Ciencias con Orientación en Farmacia

Tesis: EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LAS CARACTERÍSTICAS DE
LIBERACIÓN DE GABAPENTINA A PARTIR DE BIOMATERIALES
OBTENIDOS VIA SOL-GEL

Campo de estudio:

Tecnología Farmacéutica

Biografía:

Datos personales: Nacida en Sabinas Hidalgo Nuevo León, México, el 9 de febrero de 1987, hija del Ing. César O. Villarreal Garza y Sra. Laura L. Salinas Garza.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el grado de Químico Farmacéutico Biólogo en diciembre 2008,

BIBLIOGRAFÍA

¹ Bernard M., Ganem A., Melgoza L., Quintanar D. Sistemas de liberación controlada de activos farmacéuticos. Asociación Farmacéutica Mexicana, 1era. ed., 2003.

² Viseras Iborra María Teresa. Tesis Doctoral. Desarrollo Galénico de Preparados obtenidos por interacción del Ácido 5-Amino Salicílico con

Halloysita. Universidad de Granada. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. 2008.

³ Doménech J., Escribano E., Preparados orales de cesión modificada: cinética, in: J.Doménech, J. Martínez and J.M. Pla (Eds.), Biofarmacia y Farmacocinética. Vol II.Síntesis, Madrid, pp. 317-347, 1998.

⁴ Andreetta, H. Fármacos de Acción Prolongada: Mecanismos de Liberación. Usos de Distintos Modelos Lat. Am. J. Pharm. 22 (4): 355-64, 2003.

⁵ Ding X., Alani A.W.G., Robinson J.R. Extended-release and targeted drug delivery system, in: D.B. Troy (Ed.), The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Remington, Lippincott Williams & Wilkins, USA, pp. 939-964, 2002.

⁶ Chien, Y.W., Lin, S. Drug delivery: controlled release. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 2006, vol. 1, pp 1082-1103.

⁷ Costa E., Arancibia A., Aiache J., acta farmacéutica bonaerense - vol. 23 n°2 año 2004.

⁸ Rodil, S., Modificación Superficial de Biomateriales Metálicos. Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales, 2009; 29 (2): 67-83

⁹ Hernández E., Cruz R., Robledo F., Santoyo L. Caracterización del alcohol polivinílico usado en recubrimientos de base acuosa, Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 2007; 38:15-25

¹⁰ URL: www.aecientificos.es/empresas/aecientificos/.../Biomateriales.pdf

Fecha de último acceso: 3-Marzo-2010

¹¹ Geetha, M.; Singh, A.K.; Asokamani, R.; Gogia, A.K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants. *Progress in Materials Science*, 2009; 54 (3) 397-425

¹² Korteso P., Ahola M., Karlsson S., Kangasniemi I., Kiesvaara J., Yli-Urpo A. Sol-gel processed sintered silica xerogel as a carrier in controlled drug delivery. *Biomaterials*, 1998; 162-167.

¹³ Böttcher, H., Slowik, P., Suss, W. Sol - gel carrier systems for controlled drug delivery. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 1998; 13(1/2/3), 277-281.

¹⁴ Ahola M., Säilynoja E., Raitavuo M., Vaahtio M., Jukka I. Salonen J., Yli-Urpo A. *In vitro* release of heparin from silica xerogels. *Biomaterials*, 2001; 22:2163-2170

¹⁵ Czarnobaj K., Lukasiak J. *In vitro* release of cisplatin from sol-gel processed organically modified silica xerogels. *J Mater Sci Mater Med.*, 2007;18: 2041–2044

¹⁶ Radin, S., Falaize, S., Lee, M., Ducheyne, P. In vitro bioactivity and degradation behavior of silica xerogels intended as controlled release materials. *Biomaterials*, 2002, 15, 3113-3122.

¹⁷ Czarnobaj K., Lukasiak J. In vitro release of cisplatin from sol-gel processed organically modified silica xerogels. *J Mater Sci Mater Med.*, 2007;18: 2041–2044

¹⁸ URL: <http://www2.uca.es/grup-invest/geles/paginas/intro.html> Revisado 22 de septiembre 2011.

¹⁹

[http://www.etsimo.uniovi.es/usr/fblanco/Tema4.MaterialesCERAMICOS.Sintesis SOL.GEL.pdf](http://www.etsimo.uniovi.es/usr/fblanco/Tema4.MaterialesCERAMICOS.SintesisSOL.GEL.pdf) 22 de septiembre 2011

²⁰ Pfizer Inc, April 2009.

²¹ Drug Information Handbook, 15th ed 2007-2008

²² Vollmer K., von Hodenberg A., Kollé E. Pharmacokinetics and metabolism of gabapentin in rat, dog and man. *Arzneimittelforschung*, 1986; 36:830-9

²³ Schatzberg, A., Nemeroff, C. Tratado de psicofarmacología. Manson 2006 pag. 668

²⁴ Stewart, B., Kugler, A., Thompson, P., Bockbrader, H. A saturable transport mechanism in the intestinal absorption of gabapentin is the underlying cause of the lack of proportionality between increasing dose and drug levels in plasma. *Pharmaceutical Research*. 1993, Vol. 10 (2),pp 276

²⁵

URL:

http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2000/21216lbl.pdf

Fecha de acceso: 21-Marzo-2011

²⁶ Bennett, M., Simpson K. Gabapentin in the treatment of neuropathic pain. *Palliative Medicine*, 2004; 18:5-11

²⁷

URL:http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/20235s029,20882s015,21129s016lbl.pdf Fecha de último acceso: 10-Febrero-2011

²⁸ URL: <http://iasp.omnibooksonline.com/2010/>

Fecha de último acceso: 5-Enero-2011

²⁹ Guevara-López U., Covarrubias-Gómez A., García-Ramos G., Hernández-Jiménez. Parámetros de práctica para el manejo del dolor neuropático. *Revista de Investigación Clínica*, 2006; 58:126-138

³⁰ Vidal M.A., Martínez-Fernández E., Martínez-Vázquez de Castro J., Torres L.M. neuropatía diabética. Eficacia de la amitriptilina y de la gabapentina. Revista de la Sociedad Española del Dolor, 2004; 11: 490-504

³¹ Gómez, J., Tortorici, V. Mecanismo del dolor neuropático: del laboratorio a la clínica. Archivos venezolanos de farmacología y terapéutica. Vol 28, 1, pp 2-10, 2009.

³² URL: <http://www.tecnologiazerta.com/dolor-neuropatico.html> Fecha de último acceso: 24 de Septiembre 2011

³³ URL:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es/>
Fecha de último acceso: 16-Febrero-2011

³⁴ URL: <http://www.accu-chek.com.mx/mx/vida/diabetesenmexico.html>
Fecha de último acceso: 17-Febrero-2011

³⁵ Aguilera-Muñoz J., Arizaga-Cueta E., Carpio-Rodas A., Crump J., Díaz-Heredia F., Fernández C.F., Griego J.M., Guerrero D., Hincapié M., León M.X., Moyano J., Navarro-Chávez M., Rangel-Galvis C.E., Rodríguez R., Salazar-Bolaños E., Sarmiento A., Terán Saá-Jaramillo D., Tettamanti D., Valencia D., Vargas-Gómez J.J. Guías de práctica clínica del dolor neuropático (II), Revista de Neurología, 2005; 40:303-16

³⁶ Jadad AR, Carroll D, Glynn CJ, Moore RA and McQuay, HJ. Morphine responsiveness of chronic pain: double blind randomised crossover study with patient-controlled analgesia. *Lancet*, 339 (1992) 1367-1371.

³⁷ Serpell MG. Gabapentin in neuropathic pain syndromes: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pain*, 2003; 103(1-2):227

³⁸ Markman JD, Dworkin RH. Ion channel targets and treatment efficacy in neuropathic pain. *The J of Pain*. 2006; 7: 15: S 38-47

³⁹ Gilron I, Flatters SJL. Gabapentin and pregabalin for the treatment of neuropathic pain: A review of laboratory and clinical evidence. *Pain Res Manage*. 2006; 11: 16A-29A.

⁴⁰ Restrepo, C., Marrique, H., Botero, L. Gabapentina y Pregabalina: ¿cuál es su papel en el perioperatorio?. *Revista de la Sociedad Española del Dolor*. v.14 n.6. 2007

⁴¹ URL: <http://www.drugs.com/monograph/gabapentin.html> Fecha de último acceso: 22- Septiembre-2011

⁴² Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 2008

URL:<http://plm.wyeth.com.mx/> Fecha de último acceso: 29-Marzo-.2011

43

URL:<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Overview&DrugName=GABAPENTIN> Fecha de último acceso: 2-Abril-2011

44

URL:<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Overview&DrugName=NEURONTIN>
Fecha de último acceso 2-Abril-2011

45

URL:<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.DrugDetails> Fecha de último acceso: 2-Abril-2011

⁴⁶ Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

⁴⁷. Nilka M.G. de Solís, M.Phil. Validación y Desarrollo de Métodos. Instituto Especializado de Análisis. 2005.

⁴⁸ Aguilar G, Alcántara A, Chárvel A, García JL, Garzón A, Guerrero ME. Validación de métodos analíticos. Comité de Elaboración de Guías Oficiales de

Validación de la Dirección General de Control de Insumos para la Salud, SSA.
Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos. México AC, 1992

⁴⁹ Proyecto Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2008, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las Pruebas (Modifica a la NOM-177-SSA1-1998, publicada en El Diario Oficial de la Federación el 07 de mayo de 1999)

⁵⁰ Lai, W., Ducheyne, P., Garino, J., Flaitz, C. Removal pathway of bioactive glass resorption products from the body. Materials Research Society Symp. Proc. Vol. 599, 2000 (261-266)

⁵¹ Korteso, P., Sol-Gel derived silica gel monoliths and microparticles as carrier in controlled drug delivery in tissue administration. Academic Dissertation at Faculty of Science of the University of Helsinki, Finland, 2001

⁵² Korteso P., Ahola M., Kangas M., Jokinen M., Leino T., Vuorilehto L., Laakso S., Kiesvaara J., Yli-Urpo A., Marvola M. Effect of synthesis parameters of the sol– gel processed spray-dried silica gel microparticles on the release rate of dexmetomidine. Biomaterials, 2002; 23: 2795–2801.

⁵³ Santos E., Radin S., Ducheyne P. Sol-gel derived carrier for the controlled release of proteins. Biomaterials, 1999; 20:1695-1700

⁵⁴ Meseguer-Olmo, L.; Ros-Nicolas, M. J.; Clavel-Sainz, M.; Vicente-Ortega, V.; Alcaraz-Banos, M.; Lax-Perez, A.; Arcos, D.; Ragel, C. V.; Vallet-Regi, M.. Biocompatibility and *in vivo* gentamicin release from bioactive sol-gel glass implants. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002; 61: 458-465.

⁵⁵ Meseguer-Olmo, L.; Ros-Nicolas, M. J.; Vicente-Ortega, V.; Alcaraz-Banos, M.; Clavel-Sainz, M.; Arcos, D.; Ragel, C. V.; Vallet-Regi, M.; Meseguer-Ortiz, Cl. A bioactive sol-gel glass implant for *in vivo* gentamicin release. Experimental model in rabbit. *Journal of Orthopaedic* , 2006; 24: 454-460.

⁵⁶ Adams C., Antoci V., Harrison G., Patal P., Freeman T., Shapiro I., Parvizi J., Hickok N., Radin S., Ducheyne P. Controlled release of vancomycin from thin sol - gel films on implant surfaces successfully controls osteomyelitis. *Journal of Orthopaedic Research*; (2009), 27(6), 701-709.

⁵⁷ Yilmaz E., Bengisu M., Drug entrapment in silica microspheres through a single step sol-gel process and *in vitro* release behavior. Wiley Inter Science, Wiley Periodicals, Inc. J. 2005

⁵⁸ Bögershausen A., Pas S., Hill A. & Koller H. Drug release from self-assembled inorganic-organic hybrid gels and gated porosity detected by positron annihilation lifetime spectroscopy. *Chem. Mater.*, 2006; 18:664-672.

⁵⁹ Hernandez A., Esquivel P., Gomez I., y Cantu L., Effect of the sol-gel synthesis parameters on the incorporation of an anti-inflammatory drug in a ceramic material. Res. Soc. Symp. Proc., 2007; 1007:S08-02.

⁶⁰ Prokopowicz M., Przyjazny A. Synthesis of sol-gel mesoporous silica materials providing a slow release of doxorubicin Journal of Microencapsulation, 2007; 24(7): 694–713

⁶¹ Paul G., Heimink J., Koller H. Controlling drug release of sol-gel encapsulated persantin and propranolol by surface interactions. Chem. Mater., 2008; 20: 5083–5089

⁶² Fidalgo A., Lopez T., Ilharco L. Wet sol-gel silica matrices as delivery devices for phenytoin. Journal of Sol-Gel Science and Technology, 2009; 49:320–328

⁶³ Czarnobaj K., Czarnobaj J. Sol-gel processed porous silica carriers for the controlled release of diclofenac diethylamine. Biomed Mater Res B Appl Biomater., 2008; 87:114-20

⁶⁴ Czarnobaj K. Sol-gel-processed silica/polydimethylsiloxane/calcium xerogels as polymeric matrices for Metronidazole delivery system. Polym. Bull. (2011) 66:223–237

-
- ⁶⁵ Huang S., Fan J., Cheng Z., Kong D., Yang P., Quan Z., Zhang C. and Lin J. Magnetic mesoporous silica spheres for drug targeting and controlled release. *The Journal of Physical Chemistry C.*, 2009; 113:1775-1784
- ⁶⁶ Rhee Y., Park S., Lee T., Park C., Nam T., Oh T., Jeon J., Han S., Lee D., Park E. *In vitro/in vivo* relationship of gabapentin from a sustained- release tablet formulation: a pharmacokinetic study in the beagle dog. *Arch Pharm Res.*, 2008; 31: 911-917
- ⁶⁷ Depomed, Gabapentin Extended-Release. *Drugs RD*, 2007, 8:317-320
- ⁶⁸ URL: <http://www.drugs.com/gralise.html> Fecha de último acceso: 13-Marzo-2011
- ⁶⁹ Borrey, D., Godderis, K., Engelrelst, V.,Langlois, M. *Clin Chim.* 2005, *Acta* 354: 265
- ⁷⁰ Ramakrishna, N., Vishwottam, K., Koteswara, M., Manoj, S., Santosh, M., Chidambara, J., Sumatha, B., Varma, D., Rapid quantification of gabapentin in human plasma by liquid chromatography/tándem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Annaalysis.* 40, pp 360-368, 2006.
- ⁷¹ Ojha, A., Rathod, Rajeshwari., Patel, Chaula., Padh, H. LC-MS determination of gabapentin from human plasma. *Chromatographia.* 66, 853-857, 2007.

⁷² Chang, S., Wang, F. Journal of Chromatography B. 2004, (779): 265

⁷³ Zhu, Z., Neirinck, L. High-performance liquid chromatographic method for the determination of gabapentin in human plasma. Journal of Chromatography B. 2002, (779): 307-312

⁷⁴ Jalalizadeh, H., Souri, E., Barazandeh, M., Jahangiri, A. Validated HPLC method for the determination of gabapentin in human plasma using pre-column derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene and its application to pharmacokinetic study. 2007 Journal of Chromatography B, 854: 43-47.

⁷⁵ Gujral, R., Haque, M. A validated method without derivatization for the determination of gabapentin in bulk, pharmaceutical formulation and human urine samples. International Journal of Biomedical Science. 2009, 5(2): 169-174

⁷⁶ Amini M, Rouini MR, Asad-Paskeh A, Shafiee A. A new pre-column derivatization method for determination of gabapentin in human serum by HPLC using UV detection. Journal of Chromatographic Science. 2010, 48: 1-4

⁷⁷ Bahrami, G., Mohammadi, B. Sensitive microanalysis of gabapentin by high-performance liquid chromatography in human serum using pre-column derivatization with 4-chloro-7-nitrobenzofurazan: Application to a bioequivalence study. Journal of Chromatography B, 2006, (837) 24-28

⁷⁸ LaPorte, K., Turner, S., Hite, M., Brunelle, A., Zhang, H. Evaluation of the Ninhydrin Assay for Gabapentin Determination. 2007, SCOLR Pharma Inc.

⁷⁹ URL:

http://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/76488/1/DFV_Gutierrez_Martin_E_Efectos_de_los_aumentos.pdf Fecha de último acceso: 16- Marzo-2011

⁸⁰ Wu, Y., Hussain, M., Fassihi, R. Development of a simple analytical methodology for determination of glucosamine release from modified release matrix tablets. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2005, (38): 263-269

⁸¹ Aldaba Rodríguez Abelardo, incorporación de gabapentina en una matriz cerámica mesoporosa para preparar un biomaterial, tesis de licenciatura Universidad Autónoma de Nuevo León, Mayo 2010.

⁸² Park, A., Jhee, O., Park, S., Lee, J., Lee, M., Shaw, L., Kim, K., Lee, J., Kim, Y., Kang, J. Validated LC-MS/MS method for quantification of gabapentina in human plasma: application to pharmacokinetic and bioequivalence studies in Korean volunteers. Biomedical Chromatography. 2007, 21: 829- 835.

⁸³ Ojha, A., Rathod, R., Patel, C., Padh, H. LC-MS Determination of Gabapentin from Human Plasma. Chromatographia 2007, 66: 853- 857.

⁸⁴ MacDonald, C., Zavitsanos, P. Determination of Gabapentin in Human Serum by LC/MS. Agilent Technologies, 2001.

⁸⁵ Wittayalertpanya, S., Chompootawee, S., Thaworn, N. Khemsri, W., Intanil, N. Bioequivalence study of two different formulations of 300 mg gabapentin capsule in Thai healthy volunteers. Thai J. Pharm. Sci. 2008 32: 70-76

⁸⁶ Almeida, S., Filipe, A., Almeida, A., Antonijuan, R., García, C., Gich, I., Barbanj, M., Cruz, M. Comparative Study on the Bioequivalence of Two Different Gabapentin formulations. *Arzneim-Forsch./Drug Res.* 2006, 56 (2): 59-63.

⁸⁷ <http://www.cienytech.com/tablas/tabla-miscibilidades.pdf> Revisado 20 octubre 2011.

⁸⁸ Remington Farmacia, 20^a. Ed., Editorial Medica Panamericana, ISBN: 950-06-5081-9

⁸⁹ Sánchez S., Luna B. Modelo de Estudio y Técnicas de diagnóstico clínico, *Archivos de Medicina*, vol.2: 006, Madrid, España 2006.

⁹⁰ *Farmacocinética Clínica*, John Wagner, 1^a. ed., Editorial Reverte ISBN: 84-291-5602-X

⁹¹ Stefaniak A., Virji M., Harvey C., Sbarra D., Day G., Hoover M. Influence of artificial gastric juice composition on bioaccessibility of cobalt- and tungsten-containing powders, *Int J Hyg Environ Health.* 2010; 213(2):107-15

⁹² Cochran WG, Cox GM. Diseños Experimentales. 2da ed. México, DF: Trillas; 1995: 155-173

⁹³ R-Proyect: A language and environment for statistical computing. versión 2.8.0 (2008). R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Development Core Team

⁹⁴ Stevenson, C., Kim, J., Fleisher, D. Colonic absorption of antiepileptic agents. *Epilepsia*, 38, 63-67 (1997)