

Diseños de Experimentos en Tecnología y Control de los Medicamentos

Eutimio G. FERNÁNDEZ N. ¹, Mirna FERNÁNDEZ C. ^{2*}, Relma T. OLIVEIRA ³,
Biel BERMÚDEZ R. ¹, Irela PÉREZ S. ², Yohandro MORÓN G. ¹,
Viviana GARCÍA M. ², Israelio PERDOMO L. ¹ & Néstor PÉREZ S. ¹

¹ *Centro de Ingeniería e Investigaciones Química (CIQ). Departamento de Química Inorgánica.
Calle F N° 115 esquina a Calzada, Vedado. Ciudad de La Habana. C/P 10400. Cuba.*

² *Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL). Universidad de La Habana.
Calle 23 N° 21425 e7 214 y 222, La Coronela, La Lisa, Ciudad de La Habana. Cuba.*

³ *Escuela Latinoamericana de Medicina (ELAM), Carretera Panamericana Km 3 1/2,
Santa Fé, Playa, Ciudad de La Habana. Cuba.*

RESUMEN. En la presente revisión bibliográfica se esbozan los principales diseños de experimentos que encuentran aplicación en el campo de la tecnología y control de los medicamentos. Se muestran ejemplos de la literatura especializada donde se evidencian las posibilidades que brindan los mismos en el hallazgo de condiciones óptimas de operación de un proceso tecnológico o de una técnica analítica, así como en encontrar las proporciones idóneas de excipientes en una formulación farmacéutica, entre otras aplicaciones. El número de recursos utilizados en la experimentación será mínimo, si estas herramientas estadísticas son empleadas correctamente. En este trabajo se destaca el concepto de que los diseños de experimentos se vuelven ineficientes cuando no se conjugan bien con los conocimientos previos sobre los sistemas en estudio.

SUMMARY. "Experimental Designs in Pharmaceutical Technology and Control of Medicaments". In this review most of the experimental designs that have been used in technology and control of medicaments are discussed. Many examples extracted from literature are shown in order to demonstrate the possibilities of them for finding the optimal values of the independent variables in a pharmaceutical process or an analytical technique as well as the suitable excipient proportions in a dosage formulation. The amount of resources during experimentation will be minimum if these statistical tools are correctly applied. In this work is remarked the concept that experimental designs are not efficient when they are not well combined with previous knowledge about the systems under study.

INTRODUCCIÓN

Los diseños de experimentos, como parte de los conocimientos de estadística impartida en los centros universitarios, han recibido el rechazo por parte de los estudiantes que sólo sienten o recuerdan el peso de su complejidad matemática. Su utilidad es reconocida en el trabajo práctico cuando se necesita demostrar, con un alto grado de confiabilidad, un resultado científico. El modo de resolver el problema de la enseñanza de la estadística en especialidades donde esta se aplica ha sido entrenar a los alumnos en saber qué herramienta emplear y cómo analizar los resultados que de esta se generen ¹.

Cabe señalar que el diseño de experimentos se encarga de asegurar que los datos experimentales contengan el máximo de información ². Es considerado una de las dos ramas de la

Quimiometría, disciplina dentro de las ciencias químicas que tiene como objeto la aplicación de los métodos estadísticos y matemáticos, así como aquellos métodos basados en la lógica matemática, a la química ³. Una definición similar presenta la Biometría para las ciencias biológicas, por lo que todo parece indicar que cuando una ciencia toma las herramientas estadístico-matemáticas que requiere para resolver sus problemas científicos le adosa el sufijo -metría, por lo que podríamos definir el término Farmametría para las Ciencias Farmacéuticas. La otra rama de la Farmametría, por analogía con la Quimiometría, es el análisis de datos, ramas cada vez más relacionadas entre sí, por lo que el estudio de una conlleva a la otra.

Los diseños de experimentos no deben ser usados irracionalmente, sino que deben emple-

PALABRAS CLAVE: Diseños de experimentos, Métodos multivariados, Tecnología y control de medicamentos.
KEY WORDS: Experimental designs, Multivariate methods, Technology and control of medicaments.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: mirnafc@yahoo.com; mirnafc@ifal.uh.cu

arse cuando no existan modelos teóricos que describan los procesos o formulaciones en estudio. Ellos son métodos empíricos que permiten describir el sistema en estudio con el menor número de experimentos posibles. En algunas ocasiones los modelos teóricos son empleados como punto de partida para los diseños de experimentos ⁴.

El personal vinculado con la tecnología y control de los medicamentos debe conocer el gran número de diseños de experimentos que existen y sus utilidades. Muchos de ellos han sido desarrollados por los matemáticos hace varias décadas pero en el ámbito internacional aún son pobremente empleados, y muchas veces desconocidos. Conjuntamente con los diseños de experimentos resulta hoy imprescindible el conocimiento y la utilización de las técnicas multivariadas de análisis de datos.

El objetivo de esta revisión bibliográfica es mostrar una breve panorámica teórica de los distintos tipos de diseños de experimentos que pueden emplearse, y se han empleado, en la tecnología y control de los medicamentos (TCM), así como comentar el estado actual de los diseños de experimentos, ventajas y utilidad práctica a través de ejemplos publicados en la literatura especializada.

GENERALIDADES

Para su estudio, los diseños de experimentos han sido agrupados en tres categorías, atendiendo al tipo de problema que se pretende resolver con los mismos. En la Fig. 1 se observa que la primera categoría incluye los diseños basados en el análisis de varianza, la segunda incluye aquellos en los que se pretende encontrar un modelo matemático, por lo general polinomial,

que conecte los factores con las respuestas, y la tercera categoría incluye solamente a los diseños multivariados, los cuales permiten definir un modelo matemático similar al descrito para la segunda categoría, pero mas abarcador. En este último pueden incluirse variables cualitativas siendo llevadas a numéricas empleando la técnica de análisis de componentes principales ⁵.

Es importante señalar que la estadística no podrá sustituir jamás los conocimientos de la rama de la ciencia donde esta se aplica y que el éxito o fallo de un estudio experimental depende, en última instancia, de la habilidad y la experiencia del investigador responsable ⁶.

Especialistas en diseños de experimentos han definido ocho reglas para el desarrollo exitoso de éstos ⁷: 1) definir buenos objetivos; 2) medir respuestas cuantitativamente; 3) replicar para amortiguar la variación incontrolable (ruido); 4) aleatorizar el orden de las corridas; 5) bloquear las fuentes de variación conocidas; 6) conocer cuáles efectos pueden estar confundidos; 7) realizar una secuencia de diseños de experimentos; 8) confirmar siempre los resultados críticos.

La primera regla está relacionada con definir si en el diseño se pretende tamizar variables u optimizar las que se estudian. Se recomienda siempre tamizar para luego optimizar los factores que más influyen sobre la respuesta. En esta regla se considera también el buen uso del conocimiento previo para definir mejor el problema científico y no arribar a conclusiones ya conocidas, lo que desmotiva mucho al personal vinculado a la investigación. Este modo de proceder ahorrará tiempo y dinero. La segunda está relacionada con aquellas variables respuestas denominadas Si o No las cuales al ser emplea-

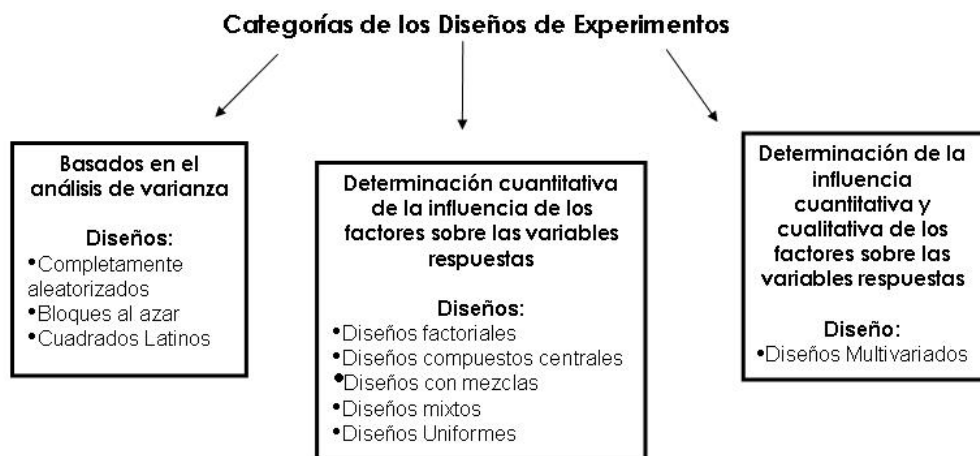


Figura 1. Categorías de los diseños de experimentos para su estudio.

das disminuyen grandemente la precisión de los resultados de un diseño de experimentos, por lo que se sugiere utilizar sistemas de escalas. Las reglas 3, 4 y 5 están muy relacionadas ya que estas garantizan realizar las experiencias en condiciones controladas, sin que las causas de variación, conocidas o desconocidas, influyan en las inferencias que se realizan a partir de los datos recogidos en la experimentación. La regla 6 se adecua a los diseños fraccionarios, Plackett-Burman y Taguchi que serán explicados posteriormente. La séptima regla está estrechamente vinculada con la primera. Por último se plantea que ningún resultado dado como apropiado u óptimo, proveniente de un diseño de experimentos, debe ser considerado como cierto y ser llevado a escalas superiores de producción sin antes confirmar experimentalmente el mismo. Se debe recordar que en la estadística jamás se trabaja con absolutos, siempre existe incertidumbre en los resultados ⁷. Estas reglas son aplicables principalmente a las dos últimas categorías de diseños definidas en este trabajo.

DISEÑOS BASADOS EN EL ANÁLISIS DE VARIANZA

Los diseños basados en el análisis de varianza son utilizados para encontrar diferencias entre varios tratamientos con un mismo objetivo, y en dependencia del número de causas conocidas de variación bloqueadas, pueden ser clasificados en: completamente aleatorizados (ninguna), bloques al azar (una) o cuadrados latinos (dos) ⁸.

Sobre estos diseños es necesario comentar con más detenimiento los diseños completamente aleatorizados. Los mismos deben ser aplicados a unidades experimentales homogéneas, los tratamientos se realizan aleatoriamente a las unidades experimentales y el análisis estadístico de los resultados se hace por el llamado método de análisis de varianza de clasificación simple. Debe demostrarse que los valores observados en las unidades experimentales, correspondientes a un mismo tratamiento, presentan una distribución normal y que las varianzas de los mismos son estadísticamente similares (homogeneidad de varianza). Estos dos requisitos deben cumplirse ya que los métodos de cálculo para demostrar las diferencias o no de los distintos tratamientos asume como cierto estas dos condiciones ⁹.

Estos diseños son muy aplicados en la validación de técnicas analíticas, específicamente en el parámetro de precisión intermedia. Además

tienen potencialidades para demostrar si existen diferencias entre alguna propiedad, de al menos dos excipientes que ejercen la misma función, estudiar varios tipos de fases móviles en cromatografía para encontrar diferencias entre los parámetros que describen la resolución de los analitos, entre muchos otros casos.

Si existen diferencias entre los tratamientos se debe realizar alguna prueba estadística de rangos múltiples que muestre cuáles son los que se diferencian y en que orden se encuentran estos. La prueba más común es la prueba de Duncan ¹⁰.

DISEÑOS FACTORIALES

Antes de comenzar a discutir las generalidades de estos diseños es necesario hacer un análisis crítico del modo de experimentar, que constituyó la antesala de los diseños factoriales pero que aún continúa siendo empleado por investigadores poco entrenados en los diseños de experimentos. La experimentación que se ejecuta estudiando cada factor a varios niveles para optimizar el mismo manteniendo constante los restantes, para así progresivamente continuar estudiando los demás y hallar las mejores condiciones para desarrollar un proceso tiene las siguientes limitaciones: no conduce al óptimo real; ineficiente, muchas corridas innecesarias; ignora las interacciones ¹¹; experimentos sin conexión; lento crecimiento del conocimiento y no se realiza un correcto mapeo del espacio experimental.

Las variables independientes con las cuales se trabaja en estos diseños son denominadas de procesos y son independientes entre sí. Estos factores pueden ser cuantitativos (pH, temperatura, velocidad de agitación, tiempo, etc.) o cualitativos (tipos de catalizador, tipos de proveedores, tipos de materia prima con igual fin). Dentro de los diseños factoriales los más empleados son los factoriales completos a dos niveles. En ellos todas las combinaciones de los niveles, de cada uno de los factores, son incluidas en el plan experimental. Si se están estudiando k factores el número de experimentos se define como 2^k . Para la validación estadística se realiza usualmente un experimento en el centro del área de muestreo, el cual se replica al menos tres veces ⁴.

Estos diseños permiten el ajuste de modelos polinomiales que incluyen la contribución de los factores de modo individual así como las diferentes combinaciones de los factores. El empleo de estos planes experimentales es adecua-

do para el tamizado de variables, jamás deben ser empleados en la optimización. Se recomienda su uso en problemas de hasta cinco factores que a partir de este número de variables independientes la cantidad de experimentos se puede volver económicamente prohibitiva. La literatura científica relacionada con TCM reporta un gran número de aplicaciones de estos planes experimentales ⁴.

A modo de ejemplo comentaremos una aplicación de un plan factorial 2^3 que se empleó para evaluar la permeabilidad aparente de la glucosa (Pag) en una emulsión de aceite en agua. Los factores incluidos en el estudio y sus niveles fueron: diámetro medio de las gotas (210-560 nm), gradiente osmótico (0-1250 mOsm/kg) y porcentaje de fase acuosa (30-50 % m/m). A los ocho puntos correspondientes al diseño se le adicionó un punto extra para validar estadísticamente el modelo polinomial para la Pag (significación de los términos del modelo así como comprobar la bondad y pérdida de ajuste del mismo) y los nueve puntos fueron replicados, por lo que el número total de experimentos fue 18. Tantos los factores independientes así como las interacciones resultaron significativas, excepto la interacción diámetro medio de las gotas - porcentaje de fase acuosa ¹².

Otras aplicaciones de estos diseños han sido referidas en las etapas iniciales de la experimentación cuando se desean optimizar las condiciones de operación de diferentes procesos tecnológicos farmacéuticos tales como: fabricación de pellets ¹³ y microencapsulación ¹⁴, entre otros.

Aunque han solucionado muchos problemas en las diferentes ramas de la investigación científica, los planes factoriales 2^k tienen la limitación de ser periféricos. El término periférico debe entenderse como que los puntos experimentales están situados en los límites de la zona de muestreo. De este modo el mapeo de la región de estudio resulta ineficiente. Estos diseños gradualmente irán desapareciendo debido a esta limitación, e irán cubriendo su espacio los que no incurran en la misma, con un número relativamente pequeño de experimentos.

DISEÑOS FACTORIALES FRACCIONARIOS

Cuando el número de factores en un diseño con variables de procesos a dos niveles es mayor de cinco, se suelen reducir los diseños factoriales. Los nuevos diseños que se originan se conocen como diseños factoriales fraccionarios, de modo que el número de corridas experimentales haga posible la realización de las mismas.

La limitación fundamental de estos diseños es la pérdida de información debido a la confusión de los efectos principales con las interacciones en dependencia de la resolución del diseño ⁴.

Sin entrar en definición alguna del concepto de resolución, explicaremos qué grado de confusión existe en los tres tipos de resolución más empleados. *Resolución III*: ningún factor individual se confunde con otro factor individual; por lo menos un factor individual se confunde con una interacción de dos factores. *Resolución IV*: ningún factor individual se confunde con otro factor individual o con una interacción de 2 factores; por lo menos una interacción de 2 variables se confunde con otra interacción de dos variables. *Resolución V*: ningún factor individual se confunde con otro factor individual o con una interacción de 2 factores.; ninguna interacción de 2 variables se confunde con otra interacción de dos variables; por lo menos una interacción de dos factores está confundida con una de tres ¹⁵.

Estos diseños aprovechan que raras veces las interacciones de tres o más factores son significativas. Son igualmente utilizados para el tamizado de variables. Los mismos han sido aplicados con mucha frecuencia en la tecnología farmacéutica ya que muchos de los procesos de esta rama de las Ciencias Farmacéuticas dependen de un número de factores relativamente elevado (mayor que 5).

Entre los problemas resueltos con esta clase de diseños se encuentra el tamizado de cinco variables que influyen en diferentes parámetros de calidad en el recubrimiento de pellets con una película entérica. Las variables estudiadas fueron: temperatura del aire, presión de atomización, velocidad de flujo de la solución de recubrimiento, velocidad de flujo de entrada de aire y altura de la boquilla de atomización. En esta situación se aplicó un diseño factorial fraccional de resolución V (2^{5-1}). Con solo 19 experimentos en los cuales se incluyen tres puntos centrales adicionales se puede ajustar a cada variable respuesta analizada un modelo como el siguiente:

$$y = a_0 + a_1 \cdot x_1 + a_2 \cdot x_2 + a_3 \cdot x_3 + a_4 \cdot x_4 + a_5 \cdot x_5 + a_6 \cdot x_1 \cdot x_2 + a_7 \cdot x_1 \cdot x_3 + a_8 \cdot x_1 \cdot x_4 + a_9 \cdot x_1 \cdot x_5 + a_{10} \cdot x_2 \cdot x_3 + a_{11} \cdot x_2 \cdot x_4 + a_{12} \cdot x_2 \cdot x_5 + a_{13} \cdot x_3 \cdot x_4 + a_{14} \cdot x_3 \cdot x_5 + a_{15} \cdot x_4 \cdot x_5$$

La temperatura de flujo de aire, la presión de atomización y la velocidad de flujo de la solución de recubrimiento resultaron los factores significativos ¹⁶.

Otro problema resuelto con un diseño fraccionario, en este caso de resolución IV fue el empleado para tamizar cuatro factores (2^{4+1}) que influyen en un proceso de granulación húmeda donde modelan tres respuestas. Este diseño corresponde a la etapa inicial en una secuencia de diseños que finalizó con la optimización de los factores empleando un diseño compuesto central ¹⁷. De igual forma se han aplicado en el diseño del ensayo de disolución para una formulación de liberación controlada de paracetamol ¹⁸.

Existen otros diseños que han sido empleados los cuales tienen una definición diferente a los fraccionarios, pero que pueden ser utilizados con el mismo objetivo que estos, denominados como diseños Plackett-Burman ⁴. Estos han sido empleados fundamentalmente para demostrar la robustez de diferentes métodos analíticos ¹⁹.

DISEÑOS ÚTILES PARA OPTIMIZAR VARIABLES DE PROCESOS

Dentro de los diseños que deben ser empleados en la tecnología y control de procesos para optimizar variables de procesos se encuentran ¹⁵: a) diferentes variantes de los diseños compuestos centrales: centrados en las caras, circunscritos e inscritos, b) los diseños factoriales completos a 3 niveles y c) los planes experimentales de Box-Behnken.

Estos diseños deben ser empleados en la fase final de una secuencia de experimentos, o de lo contrario si el conocimiento del sistema por parte del investigador es excelente puede atreverse a realizarlo desde un principio. A continuación mostraremos aplicaciones de algunos de estos diseños en la tecnología y control de los medicamentos.

Un diseño Doehler ha sido empleado en la optimización de una técnica analítica para la cuantificación de la nimesulida, donde el número de factores incluidos fueron cuatro y se realizaron 24 experimentos después de haber utilizado un Plackett-Burman para tamizar siete variables ²⁰.

La robustez y optimización de un método de electroforesis capilar, para el análisis del etambutol, fueron realizadas a través de dos diseños Box-Behnken. Se estudiaron tres factores: pH del buffer, concentración del buffer (mM) y el voltaje de la corrida (kV) y se analizaron tres respuestas: tiempo de retención, número de platos teóricos y factor de resolución. Se aplicó un método de optimización múltiple para determinar las condiciones experimentales óptimas ²¹.

Un diseño compuesto central centrado en las caras fue empleado en la etapa de optimización del trabajo comentado con anterioridad sobre el recubrimiento entérico de pellets ¹⁶.

Los planes experimentales referidos, útiles para optimizar variables de procesos presentan la misma limitación de los diseños 2^k , son periféricos. El aumento del número de niveles de cada variable permite apreciar curvatura en los factores, pero esta se estima con puntos que en su mayoría están en el perímetro de la zona de muestreo.

DISEÑOS UNIFORMES

La uniformidad en la distribución de los puntos experimentales en la zona de estudio es la característica más importante y esencial de los diseños uniformes (DU). Debido a esta característica, la eficiencia en el costo de la experimentación, su robustez y flexibilidad lo hacen muy útil en los diferentes campos de la química y la ingeniería química. Ejemplos de aplicaciones exitosas de los DU en el mejoramiento de tecnologías se han logrado en la industria textil, farmacéutica, de la fermentación y otras. Estos resultados han sido consistentemente reportados en China desde la década de los 80 ²².

Dentro de los méritos fundamentales que se le atribuyen a estos diseños pueden citarse: a) el modo de explorar la zona experimental, ya que es capaz de ubicar las muestras con una alta representatividad en el dominio de experimentación, b) la robustez, pues este diseño no impone asumir un modelo predefinido que vincule a los factores con la respuesta y c) la existencia de múltiples niveles: es el diseño que mejor acomoda a un número grande de niveles para cada factor entre todos los diseños experimentales conocidos.

Las tablas de los puntos experimentales para los diseños más comunes empleando el último de los métodos se pueden encontrar en el sitio web: <http://www.math.hkbu.edu.hk/Uniform-Design>. Este tipo de diseño no ha sido muy empleado en el campo de la tecnología y control de los medicamentos, pero todo parece indicar que la limitación fundamental para su utilización ha sido su desconocimiento. Casi todas las publicaciones encontradas son de grupos de investigación chinos, pues allí surgieron los mismos.

En 1997 fue publicado un interesante trabajo sobre cómo emplear una secuencia de DU para optimizar las condiciones operación de una electroforesis capilar para separar cinco ditiocar-

bamatos (DTC) que no pudieron ser separados empleando la antigua técnica experimental de sólo cambiar una variable en un grupo de experimentos. Como el conjunto de factores estudiados en la electroforesis capilar rara vez responde a un modelo de regresión lineal, incluso incorporando algunos términos de interacciones de variables, el procedimiento se hace complejo. Los autores propusieron una estrategia que incluía la utilización de dos DU de modo secuencial, aprovechando el modo de explorar la zona de estudio de estos diseños ²³.

El primer DU se realizó para estudiar la temperatura (15-35 °C), el pH del buffer (8,41 - 11,49) y el voltaje de corrida (10 - 30 kV), hallándose que altos valores de pH son adecuados para la separación así como bajos valores de temperatura, en tanto que bajos voltajes de corrida garantizan las mejores separaciones, aunque esta última condición aumenta el tiempo empleado para ejecutar una corrida electroforética.

En el segundo diseño uniforme se estudiaron la influencia del porcentaje de un modificador orgánico (metanol), el efecto de la concentración del buffer y el voltaje de corrida en un rango que incluye del valor medio al menor del anterior diseño (10 - 15 kV). La temperatura se mantuvo a 15 °C y el pH a 11,4. Aplicando esta estrategia experimental se obtuvo una excelente separación de los 5 compuestos con un menor tiempo de análisis ²³.

Este ejemplo puede servir de base para la aplicación de los DUs a muchos problemas analíticos similares dentro del control químico de los medicamentos. En la tecnología farmacéutica los DUs han sido empleados principalmente en la optimización de los procesos de microencapsulación, ejemplos de fármacos trabajados son la melatonina empleando la técnica de emulsificación-entrecruzamiento ²⁴ y cisplatina utilizando la técnica de evaporación de solvente ²⁵.

Antes de finalizar nuestros comentarios sobre las bases teóricas de los DUs así como sus aplicaciones, debemos resaltar que el uniforme mapeo de la zona de muestreo posibilita el empleo de la modalidad de inteligencia artificial denominada redes neuronales artificiales (RNA). Estos diseños solucionan la principal limitación de los diseños factoriales y los útiles para optimizar variables de procesos (periféricos). Ellos irán ganado espacio en la comunidad científica a medida que el personal de investigación se familiarice con las RNA. Algunos tipos de RNA constituyen una alternativa a los métodos de superficie

respuesta, en estas no se prueban modelos lineales preconcebidos, ya que las RNA permiten encontrar relaciones más complejas entre los factores y la respuesta ^{22,26}.

DISEÑOS CON MEZCLAS

Antes de adentrarnos en las generalidades de los diseños con mezclas es preciso aclarar que estos diseños de experimentos no son una nueva alternativa a los clásicos planes factoriales a dos niveles ²⁷. Estos últimos trabajan con variables que son totalmente independientes (variables de proceso), mientras los primeros están definidos para problemas de mezclas físicas de componentes donde no existe total independencia entre las variables, que en este caso son las proporciones de los ingredientes de una formulación dada. La dependencia entre las variables está condicionada por la restricción de unicidad, su representación matemática es la siguiente:

$$\sum_{i=1}^q x_i = 1$$

donde **q** es el número efectivo de variables y **xi** son los componentes de la mezcla física. La restricción de unicidad impone que el número efectivo de variables es **q-1** por lo que las áreas de muestreo difieren para un problema con mezclas a uno con variables de proceso (Fig. 2).

Número de variables Variables de proceso Variables de Mezcla

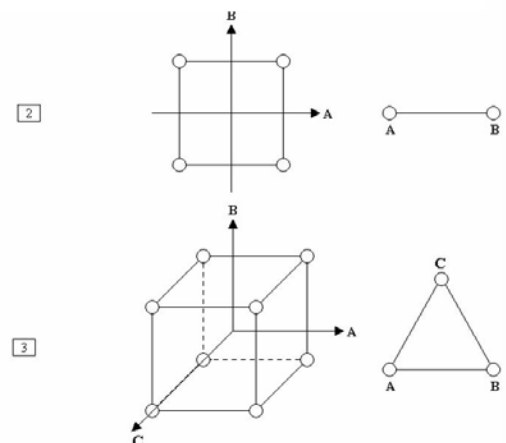


Figura 2. Áreas de experimentación para un mismo número de variables en un problema con variables de mezclas y otro con variables de proceso.

Los diseños con mezclas se emplean para explorar cómo los cambios en la composición de la mezcla pueden afectar las propiedades de éstas ²⁸. Hablando en términos de la tecnología farmacéutica: cómo la variación de las proporciones de los excipientes inciden sobre los índi-

ces de calidad de las formas terminadas o las variables de control, en procesos de más de una etapa. Estos diseños son muy útiles para cualquier tecnólogo de la industria farmacéutica, ya que este debe enfrentarse usualmente a la optimización de la composición de una mezcla de excipientes con el objetivo de preparar un medicamento con las características requeridas ².

Estos diseños se subdividen en dos grandes grupos. El primero de estos incluyen los diseños aplicables a problemas sin restricciones, los cuales deben entenderse como aquellos donde los ingredientes en la formulación pueden aparecer en un rango que va desde no aparecer hasta ocupar la totalidad de la mezcla estudiada. Los diseños incluidos en este grupo son el simplex-lattice, simplex centroide y axiales, los últimos encuentran poca aplicabilidad en la industria farmacéutica ya que se emplean para tamizar variables. El segundo grupo incluye los diseños

que resuelven problemas con restricciones, en estos los ingredientes están acotados entre valores de máximo y mínimo diferentes de 1 y 0 respectivamente, el diseño mayoritariamente empleado es el D-Optimal.

Los diseños D-Optimal se basan en un criterio de optimalidad, el cual garantiza que los puntos experimentales minimicen la varianza de los parámetros estimados para un modelo predefinido. Estos se pueden emplear en el estudio de espacios restringidos donde son imposibles utilizar los arreglos de puntos correspondientes a diseños para áreas regulares ¹⁵.

En los diseños con mezclas se distribuyen los puntos experimentales en el área de muestreo de modo que principalmente se puedan ajustar modelos polinomiales lineales, cuadráticos y especiales cúbicos ³⁰. A continuación se muestran sus ecuaciones matemáticas para un sistema de tres componentes.

$$y = \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_3 \cdot x_3 \quad (\text{Lineal})$$

$$y = \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_3 \cdot x_3 + \beta_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + \beta_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + \beta_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 \quad (\text{Cuadrático})$$

$$y = \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_3 \cdot x_3 + \beta_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + \beta_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + \beta_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 + \beta_{123} \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 \quad (\text{Especial Cúbico})$$

En la tecnología farmacéutica los diseños con mezclas sin restricciones han sido empleados para estudiar y optimizar mezclas de excipientes con una misma función. Como ejemplos podemos citar dos trabajos, uno de ellos realizado por investigadores del Departamento de Farmacia de la Universidad de Helsinki, donde se estudia el comportamiento de las propiedades de las mezclas de polvos de tres tipos de celulosa microcristalina, Avicel PH-101, PH-102 y PH-200 ³¹. Otro trabajo que ejemplifica la utilidad de este subgrupo de diseños es un diseño simplex-lattice desarrollado para conocer cuantitativamente cómo la composición de la fase oleosa de emulsiones parenterales, una vez definida el porcentaje de esta en la emulsión, influye sobre las propiedades de la emulsión. Se estudian dos mezclas ternarias de aceites, una compuesta por ácido oleico, aceite de castor y medio de cadenas de triglicéridos, la otra presenta alcohol oleico, aceite de castor y medio de cadenas de triglicéridos. Entre las propiedades modeladas a partir de los componentes de la fase oleosa se encuentran la viscosidad, el tamaño de gotícula medio y la tensión interfacial ³².

Los diseños con restricciones son los que más aplicación encuentran en la tecnología far-

macéutica, ya que son los que permiten encontrar las proporciones idóneas de los excipientes que se emplean en una forma galénica determinada. Como ejemplo de los diseños con restricciones en la tecnología farmacéutica se presenta un trabajo de preformulación donde se emplea un diseño D-Optimal, conjuntamente con la calorimetría diferencial de barrido, para optimizar la composición de una tableta de glibenclamida. Se modeló la variación de entalpía en función de cuatro excipientes, los cuales fueron estudiados en rangos bien definidos según su empleo en la formulación. Como el objetivo era la minimización de la variación de entalpía para garantizar la mayor estabilidad del principio activo en las tabletas, se optimizó bajo este criterio. La mezcla que resultó idónea fue ensayada para validar el resultado obtenido por los métodos estadísticos empleados demostrándose que no existían diferencias significativas para un 95 % de confiabilidad ³³.

Otra aplicación de los diseños con mezclas sin restricciones en la tecnología farmacéutica ha sido la optimización de un sistema matricial de liberación controlada de hidrocloreuro de nifedipino (20 mg). En éste las variables estudiadas fueron las proporciones de hidroxipropilme-

tilcelulosa (HPMC) (0,1-0,15 % m/m), Avicel (0,65-90 % m/m) y alginato sódico (0,0-0,20 % m/m), manteniendo constante en la formulación la proporción de estearato de magnesio (1 %). Las variables analizadas en este caso fueron los porcentos de fármaco liberado a las 3, 6 y 12 h. Los modelos de mejor ajuste fueron los cuadráticos para cada una de las respuestas. En este ejemplo se buscaba una liberación controlada del nifedipino por lo que los criterios de optimización fueron que la liberación del fármaco se encontrase en determinados rangos para cada uno de los tres tiempos muestreados. La mezcla óptima resultante fue validada experimentalmente, encontrándose que no existían diferencias significativas al realizar una prueba t-Student para un 95 % de confiabilidad ³⁰.

Antes de finalizar los comentarios sobre las aplicaciones farmacéuticas de los diseños con mezclas, es necesario aclarar que cuando se aplican todas las condiciones de operación deben permanecer constantes para que la estimación de los efectos de los factores se corresponda, inconfundiblemente, con la contribución de las proporciones de los componentes en estudio de la mezcla. Para que resulte más clara esta explicación pondremos el ejemplo de una limonada. De nada vale que ofertemos una mezcla con las proporciones de jugo de limón, agua y azúcar si la ofertamos caliente. Otras combinaciones peores serán mejor aceptadas si están frías, esto se debe a que el sabor de una limonada está influenciada por las proporciones de sus ingredientes así como de su temperatura.

DISEÑOS MIXTOS

Hasta ahora los diseños de experimentos discutidos emplean variables de procesos o variables de mezcla, sin embargo muchos procesos son dependientes de ambos tipos de variables. Para solucionar este problema surgieron los diseños mixtos ³⁴. Estos diseños permiten tener modelos que describen mejor los procesos. Quizás su aparición en la literatura relacionada con la tecnología y control de medicamentos este limitada por dos factores fundamentales: una es

el alto costo de la experimentación y la otra puede ser que mostrar los resultados de este tipo de diseño implique develar aspectos de propiedad intelectual relacionada con la elaboración de medicamentos.

En los modelos polinomiales de Scheffé asociados a estos diseños se tienen en cuenta las interacciones de las variables de proceso con las variables de mezcla, así como la contribución de cada término de los modelos definidos para las mezclas como promedio de todas las condiciones exploradas para las variables de proceso. Si se desea saber si alguna variable de proceso afecta del mismo modo a todas las mezclas estudiadas se debe realizar una transformación a los términos que incluyen a la variable de proceso y las variables de mezcla, la cual consiste en hacer desaparecer una variable de mezcla en virtud de la restricción de unicidad ($\mathbf{x}_1 + \mathbf{x}_2 + \mathbf{x}_3 = \mathbf{1}$). Para que se cumpla nuestra hipótesis el término que incluye la variable de proceso debe ser significativo, mientras las restantes asociadas a la transformación realizada no deben ser significativas.

Estos diseños pueden ser potencialmente empleados en la elaboración de distintas formas farmacéuticas. Como ejemplo podemos citar la optimización del proceso de fabricación de una tableta por compresión directa, donde se pueden determinar las proporciones óptimas de los excipientes de la formulación así como los valores idóneos de la velocidad de rotación de la máquina compresora, así como la fuerza de compresión.

Dentro de esta categoría se incluyen los diseños con mezclas y cantidades, estos constituyen una variante simple de los diseños mixtos ya que sólo se estudia una variable de proceso, la cantidad de la mezcla. En el campo de investigación que nos ocupa se sugieren por ejemplo para la optimización de la composición de un sistema de recubrimiento así como de la cantidad idónea de este para garantizar un perfil de liberación dado y un razonable tiempo de estabilidad. A continuación se muestra el modelo general para este tipo de diseño.

$$y = \beta_1 \cdot (A) \cdot x_1 + \beta_2 \cdot (A) \cdot x_2 + \beta_{12} \cdot (A) \cdot x_1 \cdot x_2 = \\ = \gamma_1^0 \cdot x_1 + \gamma_2^0 \cdot x_2 + \gamma_{12}^0 \cdot x_1 \cdot x_2 + \sum_{l=1}^2 (\gamma_1^l \cdot x_1 + \gamma_2^l \cdot x_2 + \gamma_{12}^l \cdot x_1 \cdot x_2) A^l$$

En la anterior ecuación, **A** representa la variable cantidad y **l** los niveles en los que se decide experimentar dicha variable. Quizás mu-

chos diseños mixtos hallan sido realizados pero los mismos se encuentran en el know - how de diferentes variantes de la propiedad intelectual.

Estos planes experimentales deben ser considerados por el investigador en TCM siempre y cuando la economía de la experimentación lo permita. A medida que la miniaturización tecnológica avanza, ellos irán ocupando más espacio entre los diseños de elección en TCM.

MÉTODOS MULTIVARIADOS

Aunque los métodos multivariados no constituyen un tipo de diseño de experimentos, deben ser incorporados en este trabajo para poder comprender los diseños multivariados y a la vez mostrar, las posibilidades que estos ofrecen al personal que está vinculado a la tecnología y control de los medicamentos. Estos métodos son necesarios conocerlos ya que el avance tecnológico actual ha generado grandes estructuras de datos mientras que los profesionales no han sido entrenados en los métodos que permiten una adecuada interpretación de las mismas. Los métodos multivariados constituyen los espejuelos a través de los cuales podemos ver mejor un gran volumen de datos.

Los métodos que serán abordados son los que permiten trabajar con grupos de datos de agrupación tabular o planares. El primer método que abordaremos es el análisis de componentes principales (ACP). Este método vectorial permite reducir las dimensiones de una tabla donde las columnas se corresponden con las variables descriptoras y las filas con las muestras caracterizadas, de modo que cada componente principal está formado por dos vectores: uno de marcas y otro de cargas. El primero correlaciona las muestras y el segundo las variables descriptoras. Por lo general con dos o tres componentes principales se explica un alto porcentaje de la variabilidad de una tabla de datos. El primer componente principal explica el mayor porcentaje de la variabilidad y así sucesivamente los restantes van decreciendo ³⁵.

El ACP ha sido aplicado, conjuntamente con la regresión lineal múltiple, en una técnica denominada regresión en componentes principales (RCP) para cuantificar compuestos que tienen una misma zona de absorción en el espectro ultravioleta. Dentro de estas aplicaciones está la validación de un método analítico para cuantificar ácido salicílico y ácido acetilsalicílico ³⁶, los cuales requieren ser analizados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) según la Farmacopea estadounidense ³⁷.

El último método multivariado que comentaremos es la regresión en mínimos cuadrados parciales (RMCP). Este se aplica cuando existe

una tabla cuyas columnas están divididas en variables descriptoras (**X**) y variables respuestas o dependientes (**Y**). El objetivo de este método es relacionar la data X con la Y garantizando una buena correlación y a la vez hacer una buena descripción de **X** y **Y**. En la Figura 3 se ilustra una representación gráfica del método de RMCP.

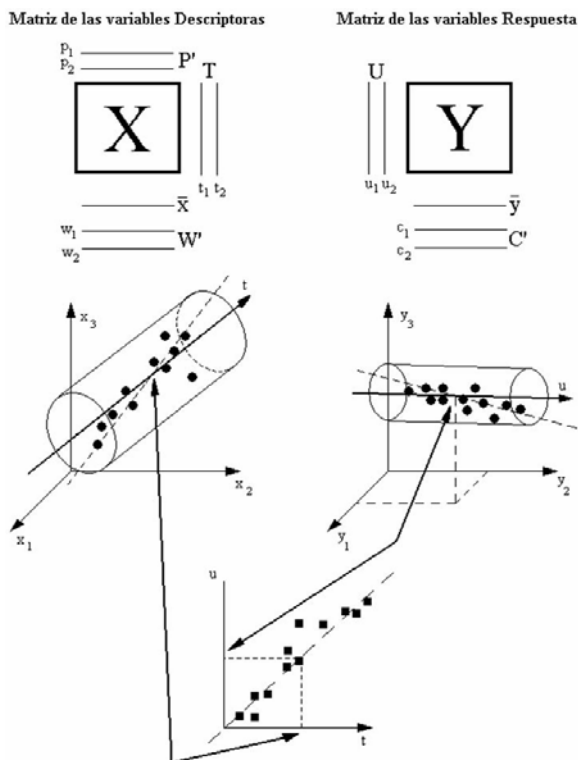


Figura 3. Método de RMCP. Un ACP es realizado para las variables descriptoras y respuesta, representadas por la línea sólida. La mejor correlación posible entre X y Y es calculada usando la técnica de los mínimos cuadrados. El modelo resultante de PEL no es siempre el que mejor describe a X y Y pero si el mejor que los correlaciona.

Los métodos multivariados en el contexto de esta revisión bibliográfica solo son tratados como elementos fundamentales para el entendimiento de los diseños multivariados. Ellos por si solos son de gran utilidad para los investigadores que se enfrentan a inmensas estructuras de datos. Si el número de publicaciones donde se emplean estas herramientas aún es relativamente bajo se debe al desconocimiento de las potencialidades de estas.

DISEÑOS MULTIVARIADOS

En los diseños multivariados convergen los métodos multivariados de análisis de datos (ACP, RMCP) y los clásicos diseños de experi-

mentos donde se buscan relaciones funcionales entre los factores y la respuesta. El modo de proceder es el siguiente: 1) formulación del problema (especificar el objetivo y el modelo, realizar una división conceptual del sistema estudiado en subsistemas); 2) colección de la información multivariada en un grupo de subsistemas; 3) estimación de la dimensionalidad práctica de la información para cada tipo de subsistema empleando ACP o RMCP; 4) uso de las marcas en CP o RMCP como variables de diseño en la combinación de subsistemas en el grupo de entrenamiento; 5) medición de las respuestas; 6) análisis de la información por ACP o RMCP; 7) interpretación de los resultados con posible reorientación a los pasos 1, 2 ó 3 ⁵.

La primera aplicación de este tipo de diseño en las ciencias químicas fue en la optimización de la reacción de Willgerodt-Kindler. Esta es una reacción heterogénea compleja, al menos hasta la fecha de publicación del trabajo, con un mecanismo no bien establecido donde una acetona aromática, en la presencia de azufre, reacciona con una amina y se convierte en una tioamida de ácido carboxílico. La reacción está influenciada por la temperatura, la cantidad de azufre y la relación amina/cetona. En este ejemplo los subsistemas establecidos fueron solvente, amina y substrato aplicando una caracterización de estos empleando ACP para luego trabajar con las marcas como variables de un diseño 2⁶⁻³. Las seis variables son las marcas en los dos componentes principales de los tres subsistemas y en cada punto experimental se optimizaron las condiciones de temperatura, cantidad de azufre y relación amino-cetona, empleando un diseño compuesto central ⁵.

Es importante resaltar que los diseños multivariados son la mejor opción para trabajar con las denominadas variables cualitativas o categóricas ya que hasta el momento en que surgen estos el trabajo con estas variables se solucionaba de dos modos: uno era trabajando con varios niveles de estas, si fuese un solvente se ensayaba con varios de estos, la otra opción fue asignándole un valor numérico a la variable empleando para esto los valores de alguna propiedad física. Pero esta última variante limita a una variable lo que en realidad es un conjunto de estas, cuando se varía un factor cualitativo se cambian a la vez muchas propiedades que tienen diferentes influencias sobre el sistema en estudio. Como se conoce las variables cualitativas encierran dentro de sí un conjunto de variables numéricas o medibles y estas pueden ser

mejor interpretadas empleando ACP y expresando la misma de forma numérica a partir de sus marcas.

Un ejemplo de la vida cotidiana, la belleza femenina de una muestra de mujeres puede ser medida con diferentes variables numéricas descriptivas: largo del cabello, simetría de la cara, relaciones ergonómicas, etc, y empleando PCA podemos reducir racionalmente la cantidad de variables numéricas que describan la belleza. Estos diseños en la industria farmacéutica han encontrado dos aplicaciones fundamentales. Una en la formulación de tabletas por compresión directa donde en un diseño de mezcla multivariado se optimizan las proporciones de los excipientes, así como el tipo de excipiente de acuerdo a su función en la formulación (relleno, aglutinante, etc.). Los excipientes correspondientes a cada función se describieron a partir de sus características físicas y espectrales (FT - IR), y se aplicó ACP para reducir las dimensiones y así tomar las marcas como variables numéricas o de proceso para un diseño mixto: variables latentes o de marcas con las variables de mezclas y así optimizar las tabletas por esta vía ³⁸. La otra aplicación fue la desarrollada por especialistas de la Empresa Pharmacia - Upjohn. Estos habían propuesto una metodología para el uso de estos diseños en la optimización de procesos biotécnicos ³⁹. Tres años después publicaron la aplicación de su estrategia a un problema farmacéutico. La optimización de un proceso biotécnico de granulación-compresión. La idea fundamental en esta estrategia es aplicar un ACP a todas las variables dependientes e independientes de las corridas experimentales correspondientes al proceso de granulación, para que las marcas de las muestras más representativas de este experimento sean empleadas como factores de estudio en el proceso de compresión conjuntamente con aquellos que están vinculados de modo directo con esta etapa. Así se logra tener un modelo con una apreciación más sistémica del proceso de elaboración de la tableta ⁴⁰.

Como se puede apreciar, los diseños multivariados actualmente apenas encuentran aplicación en la TCM. Su suerte es similar a la de otros planes experimentales, el desconocimiento por parte de una comunidad científica que aún continúa pobremente entrenada en las técnicas más recientes de experimentación. Corresponde principalmente a los centros universitarios actualizar la enseñanza de estas materias para lograr una formación más sólida de sus profesionales.

CONCLUSIONES

En este trabajo se demuestra que existe un gran número de diseños de experimentos que el farmacéutico dedicado a la tecnología y control de los medicamentos debe conocer sus bondades y limitaciones para realizar un uso correcto de los mismos, a la vez que le permita optimizar los recursos de los cuales dispone para experimentar al solucionar sus problemas.

Agradecimientos. Los autores desean agradecer a la Unión de Empresas, Quimefa (Cuba), por el apoyo financiero y espiritual recibido para concebir esta revisión bibliográfica, especialmente a su especialista de Ciencia y Técnica, Ing. Eduardo Martín.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fernández, E.G., Y. Morón & V. García (2005) "Diseños de Experimentos ¿Una herramienta o rigor mortis?" Memorias del Evento Natura-Síntesis. La Habana Vieja, Cuba, pág. 8.
2. Wold, S. (1995) *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **30**: 109-15.
3. Brown, S.D., S.T. Sum & F. Despange (1996) *Chemom. Anal. Chem.* **68**: 21R-61R.
4. Gabriellson, J., N.O. Lindberg & T. Lundstedt (2002) *J. Chemom.* **16**: 141-60.
5. Wold, S., M. Sjöstrom, R. Carlson, T. Lundstedt, S. Hellberg, B. Skagerberg, C. Wikström & J. Öhman (1986) *Anal. Chim. Acta* **191**: 17-32.
6. Carlson, R. (1992) *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **14**: 103-14.
7. Anderson, M.J. & S.L. Kraber (2005) Inc., Minneapolis, MN. <www.statease.com/pubs/doctypekeys.pdf>.
8. Ostle, B. (1981) "Diseño completamente azarizado", "Diseño en bloque completo amarizado", "Otros Diseños", en "Estadística Aplicada". Editorial Científico - Técnica, La Habana, págs. 311-452.
9. Freund, J.F. (1991) "Pruebas relacionadas con las medias de k", en "Estadística Elemental Moderna" (Edición Revolucionaria), La Habana, págs. 330-6.
10. López, R. (1988) "Finalidad del diseño de experimentos. Generalidades" en "Diseño estadístico de experimentos" (2da. Ed.) Editorial Científico-Técnica, La Habana, págs. 104-118
11. Lara, F.J., A.M. García-Campaña, F. Alés-Barreiro & J.M. Bosque-Sendra (2004) *Anal. Chim. Acta* **535**: 101-8.
12. Bjerregaard, S., I. Söderberg, C. Vermehren & S. Frokjaer (1999) *Int. J. Pharm.* **193**:1-11.
13. Thies, R. & P. Kleinebudde (1999) *Int. J. Pharm.* **188**: 131-43.
14. Jones, D.S., K.J. Pearce (1996) *Int. J. Pharm.* **131**: 25-31.
15. NIST/SEMATECH e-Handbook of Statistical Methods, <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook>.
16. Fernández, C.M., J. Heinämäki, R.E. Salgado, O. Antikainen, A. Iraizoz, & J. Yliruusi (2005) *Pharm. Ind.* **67**: 231-6.
17. Miyamoto, Y., S. Ogawa, M. Miyajima, M. Matsui, H. Sato, K. Takayama & T. Nagai (1997) *Int. J. Pharm.* **149**: 25-36.
18. Abuzarur-Aloul, R., K. Gjellan, M. Sjölund & C. Graffner (1998) *Drug Dev. Ind. Pharm.* **24**: 371-83.
19. Furlanetto, S., S. Orlandini, P. Mura, M. Sergent & S. Pinzauti (2003) *Anal. Bioanal. Chem.* **377**: 937-44.
20. Furnaletto, S., S. Orlandini, G. Aldini R. Gotti, E. Dreassi & S. Pinzauti (2000) *Anal. Chim. Acta* **413**: 229-39.
21. Ragonese, R., M. Macka, J. Hughes & P. Petcoz (2002) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **27**:995-1007.
22. Liang, Y., K. Fang & Q. Xu (2001) *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **58**: 43-57.
23. Lee, A., W. Chan, F. Yuen, K. Tse, Y. Liang & K. Fang. (1997) *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **39**: 11-8.
24. Mao, S., J. Chen, Z. Wei, H. Liu & D. Bi (2004) *Int. J. Pharm.* **272**: 37-43.
25. Huo, D., S. Deng, L. Li & J. Ji (2005) *Int. J. Pharm.* **289**: 63-7.
26. Agatonovic-Kustrin, S. & R. Beresford (2000) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **22**: 717-27.
27. Cafaggi, S., R. Leardi, B. Parodi, G. Caviglioli & G. Bignardi (2003) *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **65**: 139-47.
28. Ericsson L., E. Johansson & C. Wikström (1998) *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **43**: 1-24.
29. Campisi, B., D. Chicco, D. Vojnovic & R. Phan-Tan-Luu (1998) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **18**: 57-65.
30. Huang, B.Y., Y.H. Tsai, S.H. Lee, J. Chang & P. Wu (2005) *Int. J. Pharm.* **289**: 87-95.
31. Lahdenpää, E., M. Niskanen & J. Yliruusi (1996) *Eur. J. Pharm Biopharm.* **42**: 177-82.
32. Jumaa, M., P. Kleinebudde, B.W. (1998) *Eur. J. Pharm Biopharm.* **46**: 161-7.
33. Mura, P., S. Furnaletto, M. Cirri et al. (2004) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **37**: 65-71.
34. Cornel, J.A. (1990) "The inclusion of process variables in mixture experiments" en "Experiments with mixtures. Designs, Models and the Analysis of Mixtures Data" (2nd Ed.), John Wiley & Sons, New York, págs. 352-435.
35. Christie, O.H.J. (1995) *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **29**: 177-88.
36. Schmidt, P.C. & B.W. Glombitza (1995) *Trends in analytical chemistry* **14**: 45-9.
37. USP 27 (2004) "Aspirin Tablets". The United States Pharmacopeial Convention, Inc., Electronic version, pág. 174.
38. Gabriellson, J. (2004) "Multivariate methods in tablet formulation". Philosophic Doctor Degree Thesis, ISBN: 91-7305-653-7, Umea University. Printed in Sweden by VMC-KBC.
39. Lundsdedt, T. & B. Thelin (1995) *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **29**: 255-61.
40. Bergman, R., M.E. Johansson, T. Lundstedt, E. Seifert & J. Åberg (1998) *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **44**: 271-86.