

20563 /  
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

FARMACOCINETICA PRECLINICA DEL  
ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MAESTRIA EN FARMACIA  
(BIOFARMACIA)  
P R E S E N T A :

IBQ. ADRIANA MA. GRACIELA GOMEZ ZAMARRONI



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1990.



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# INDICE

RESUMEN

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

## UNIDAD I:

1. - INTRODUCCION..... 8

## UNIDAD II:

### 2. - GENERALIDADES

2.1 Descripción del ASAG..... 10

2.2 Propiedades fisicoquímicas del ASAG..... 11

2.3 Estructura química de los productos de  
Acetil salicilato de guayacol ..... 11

2.4 Propiedades farmacológicas del ASAG y sus  
metabolitos..... 14

2.5 Mecanismo de acción del ASAG..... 17

2.5.1 Etiología de la enfermedad..... 17

2.5.2 Efecto del ASAG..... 19

2.6 Posología del ASAG en Europa..... 21

2.7 Estudio Fase clínica del ASAG..... 22

2.8 Estudios preliminares para la formulación de  
Acetil salicilato de guayacol..... 31

2.9 Métodos de análisis en fluidos biológicos para el ASAG y sus metabolitos.....	36
2.9.1 Métodos para el análisis de ASAG.....	36
2.9.2 Métodos para el análisis de salicilato..	36
2.9.3 Métodos para el análisis de ASA, AS y G	37
2.10 Empleo del Dimetil sulfóxido como vehículo de un inyectable.....	43

### UNIDAD III:

#### 3. - PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Provisión de los compuestos en estudio.....	45
3.2 Caracterización fisicoquímica del fármaco.....	46
3.2.1 Solubilidad.....	46
3.2.2 Estabilidad del ASAG a diferentes pHs....	49
3.2.3 Determinación del pKa del ASAG.....	51
3.3 Desarrollo del método analítico para la cuantificación del ASAG y sus metabolitos.....	53
3.3.1 Determinación de las condiciones cromatográficas.....	53
3.3.2 Optimización del sistema analítico.....	57
3.4 Determinación del ASAG en plasma.....	59
3.4.1 Influencia del solvente extractor y del número de extracciones para el ASAG.....	59
3.4.2 Método analítico para cuantificar el acetyl salicilato de guayacol en plasma..	61

3.4.3 Estabilidad del ASAG en el proceso de extracción.....	62
3.5 Determinación de los metabolitos del ASAG en plasma.....	63
3.6 Validación de los métodos analíticos para la cuantificación del ASAG y sus metabolitos en plasma.....	65
3.6.1 Linealidad del sistema y del método analítico.....	65
3.6.2 Precisión del sistema y del método analítico.....	66
3.6.3 Tolerancia del sistema cromatográfico....	66
3.6.4 Repetibilidad del método analítico.....	67
3.6.5 Exactitud del método analítico.....	67
3.6.6 Selectividad ó especificidad del método analítico.....	67
3.6.7 Limite mínimo cuantificable.....	68
3.7 Metodo analítico para cuantificación de ASAG en orina.....	68
3.8 Métodos analíticos para la cuantificación de metabolitos del ASAG en orina.....	68
3.9 Validación de los métodos analíticos para la determinación de ASAG y sus metabolitos en orina.....	
3.10 Validación del metodo analítico para la determinación del ácido salicílicúrico en orina.....	70
3.11 Estabilidad de ASAG y sus metabolitos a dife-	

rentes tiempos y temperaturas en plasma y orina.	70
3.12 Características de Distribución. Determinación de unión a proteínas plasmáticas.....	71
3.13 Estudio Preliminar efectuado en perro.....	73
3.14 Estudio final en fase preclínica efectuado en perro beagle .....	73
3.14.1 Dosis administradas de ASAG y sus metabolitos.....	75

#### UNIDAD IV:

#### 4.- RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Caracterización fisicoquímica del ASAG y sus metabolitos .....	78
4.1.1 Solubilidad .....	78
4.1.2 Estabilidad del ASAG a diferentes pHs..	85
4.1.3 Determinación del pKa del ASAG.....	86
4.2 Desarrollo del método analítico para cuantificar el ASAG y sus metabolitos en solución....	86
4.2.1 Determinación de las condiciones cromatográficas.....	86
4.3 Optimización del sistema analítico .....	91
4.4 Determinación de ASAG en plasma.....	94
4.4.1 Selección del proceso de extracción....	94
4.4.2 Estabilidad del ASAG en el proceso de extracción.....	95

4.4.3 Estabilidad del ASAG después de ser extraído.....	96
4.4.4 Extracción del ASAG optimizada en plasma.....	97
4.5 Determinación de los metabolitos del ASAG en plasma .....	98
4.6 Validación de los métodos analíticos para cuantificación del ASAG y sus metabolitos en plasma.....	99
4.6.1 Linealidad del sistema analítico.....	99
4.6.2 Precisión del sistema analítico.....	100
4.6.3 Tolerancia del sistema analítico.....	101
4.6.4 Límite de cuantificación.....	102
4.6.5 Especificidad.....	102
4.6.6 Linealidad y precisión del método.....	104
4.6.7 Exactitud del método.....	105
4.6.8 Repetibilidad.....	107
4.6.9 Estabilidad.....	107
4.7 Método analítico para cuantificar el ASAG en orina.....	109
4.7.1 Determinación del Proceso de extracción en orina.....	109
4.7.2 Determinación de los metabolitos de ASAG en orina.....	111
4.8 Validación de los métodos analíticos para cuantificar el ASAG y sus metabolitos en orina....	112

4.8.1	Linearidad y Precisión del Método analítico.....	112
4.8.2	Exactitud del Método analítico.....	114
4.8.3	Repetibilidad del método analítico.....	116
4.8.4	Nivel mínimo cuantificable.....	116
4.8.5	Estabilidad.....	116
4.9	Estudio de diálisis del ASAG a proteínas plasmáticas.....	118
4.10	Estudio Preliminar en Fase Preclínica.....	120
4.11	Estudio final en fase preclínica.....	128
5.	CONCLUSIONES.....	187
6.	BIBLIOGRAFIA.....	208

APENDICES



## LISTA DE FIGURAS

1.- Estructura química del Acetil salicilato de guayacol.....	11
2.- Producto de degradación del ASAG.....	13
3.- Mecanismo de Acción del ASAG .....	20
4.- Comparación de la Actividad terapéutica del ASAG con el Fosfato de oxalamina .....	28
5.- Relieve clínico del ASAG comparado con el fosfato de Oxalamina .....	29
6.- Influencia de la presencia del algunos excipientes en la velocidad de disolución del fármaco.....	35
7.- Método de extracción de ASAG y SAG en plasma .....	64
8.- Curva Estandar de ASAG en metanol para cuantificar la solubilidad en diferentes vehículos (2 a 50 mcg/ml).....	81
9.- Curva estándar de ASAG en metanol para cuantificar la solubilidad en diferentes vehículos (100 i 1000 mcg/ml).....	82
10.- Solubilidad el ASAG en Dimetil sulfoxido. Diagrama binario	83
11.- Estabilidad del ASAG en muestras de plasma.....	85
12.- Curva estándar del ASAG en agua.....	92
13.- Cromatograma de la muestra plasmática en presencia de ASAG empleando butilparabeno como estándar interno .....	97
14.- Especificidad del método analítico en plasma.....	103
15.- Niveles plasmáticos de los metabolitos obtenidos en el estudio preliminar de la administración de ASAG por vía intravenosa a un perro de 8 Kg.....	123

16. - Modelo farmacocinetico obtenido de la administración de ASAG por vía intravenosa (Estudio preliminar).....	125
17. - Niveles plasmáticos del AS después de una admon. IV de una dosis de 72.64 mg a un perro de 12.8 Kg.....	129
18. - Niveles plasmáticos del AS después de una administración oral de una dosis de 72.64 mg a un perro de 12.8 Kg.....	130
19. - Niveles plasmáticos del guayacol después de una admon. IV de una dosis de 89.02 mg a un perro beagle de 13.6 kg .....	131
20. - Niveles plasmáticos del guayacol después de una admon. oral de una dosis de 89.02 mg a un perro de 13.6 kg.....	132
21. - Niveles plasmáticos del ASA y el metabolito producido (AS) después de una administración intravenosa de una dosis de 87.02 mg a un perro beagle de 11.8 Kg .....	133
22. - Niveles plasmáticos del metabolito producido (AS) después de una administración oral de ASA a un perro beagle de 11.8 Kg (Dosis 87.82 mg).....	134
23. - Niveles plasmáticos de los metabolitos obtenidos después de una administración de SAG por vía intravenosa a un perro de 11.8 Kg (Dosis 118.73 mg).....	135
24. - Niveles plasmáticos de los metabolitos obtenidos en el estudio de administración de SAG por vía oral a un perro beagle de 11.8 Kg (Dosis 118.73).....	136
25. - Niveles plasmáticos de los metabolitos obtenidos después de la administración intravenosa de ASAG de una dosis de 94.2 mg a un perro beagle de 8 Kg.....	137
26. - Niveles plasmáticos de los metabolitos obtenidos después	

de la administración de ASAG por vía oral a un perro beagle de 8 Kg (Dosis 84.2 mg) .....	138
27.- Modelos farmacocinéticos obtenidos del estudio de administración de AS por vía intravenosa y oral.....	139
28.- Modelos farmacocinéticos obtenidos del estudio de administración de G por vía intravenosa y oral.....	140
29.- Modelos farmacocinéticos obtenidos del estudio de admón. de ASA por vía IV y oral.....	141
30.- Modelo farmacocinético obtenido de una administración de SAG por vía intravenosa.....	142
31.- Modelo farmacocinético obtenido del estudio de admón. de SAG por vía oral.....	143
32.- Modelo farmacocinético obtenido del estudio de admón. de ASAG por vía intravenosa.....	144
33.- Modelo farmacocinético obtenido del estudio de admón. de ASAG por vía oral.....	145
34.- Curvas de concentración plasmática vs. tiempo en diferentes administraciones de guayacol (ASAG, G).....	180
35.- Sistema farmacocinético propuesto .....	184
36.- Modelo farmacocinético obtenido después de las administraciones de ASAG y sus metabolitos a perros beagle.....	185

## LISTA DE TABLAS

I.- Influencia de varios coadyuvantes en preparaciones de acetil salicilato de guayacol .....	33
II.- Formulaciones de las soluciones de ASAG y sus metabolitos para ser administrados por vía IV .....	76
III.- Dosis equimoleculares a administrar en el Hombre y en el perro considerando el peso corporal y una dosis de 500 mg de ASAG para un sujeto de 70 Kg.	76
IV.- Dosis y concentraciones necesarias para el ASAG y sus metabolitos en las formulaciones IV administradas en perros.....	77
V.- Determinación del vehículo más adecuado para la administración intravenosa de ASAG.	80
VI.- Caracterización fisicoquímica de los metabolitos propuestos.....	84
VII.- Estabilidad del ASAG en soluciones amortiguadoras a pHs diferentes.....	85
VIII.- Absorbancia al UV de los compuestos en estudio....	86
IX.- Factor de resolución en la columna cromatográfica.	87
X.- Estabilidad del ASAS y sus metabolitos en las fases móviles seleccionadas.....	89
XI.- Tiempos de retención de los compuestos a estudiar	90
XII.- Análisis de regresión del ASAG en agua .....	91

XIII.- Precisión del sistema analítico para la determi-- nación de ASAG en agua .....	93
XIV.- Repetibilidad del sistema analítico para la deter- minación de ASAG en agua .....	93
XV.- Influencia del solvente extractor y número de ex- tracciones del ASAG .....	95
XVI.- Estabilidad del ASAG en el Proceso de extracción.	96
XVII.- Estabilidad del ASAG después del proceso de ex- tracción .....	97
XVIII.- Extracción optimizada del ASAG en plasma a dife- rentes concentraciones .....	98
XIX.- Métodos de extracción y el porcentaje de recupe- ración de SAG, G, ASA y AS en plasma .....	98
XX.- Linearidad del sistema analítico para la cuanti- ficación de ASAG, SAG, ASA, AS y G .....	99
XXI.- Precisión del sistema .....	100
XXII.- Tolerancia del sistema para el ASAG y SAG al uti- lizar el butilparabeno como estándar interno (EII)	101
XXIII.- Tolerancia del sistema para el G, ASA y AS al uti- lizar el metilparabeno como estándar interno (EII).	102
XXIV.- Linearidad del método analítico para cuantificar el ASAG, SAG, ASA, AS y G en muestras plasmáticas	104
XXV.- Precisión del método analítico para el ASAG, SAG, ASA, AS y G en plasma .....	105
XXVI.- Exactitud del método analítico para ASAG, SAG, ASA AS y G en plasma.....	106

XXVII. - Estabilidad a diferentes temperaturas del ASAG, SAG, ASA, G y AS en plasma .....	108
XXVIII. - Recuperación obtenida del método de extracción de ASAG en orina variando el agente acidificante y el solvente extractor.....	110
XXIX. - Método de extracción y el porcentaje de recuperación de SAG, G, ASA, AS y ASu en orina .....	111
XXX. - Linealidad del método analítico para el ASAG, SAG, ASA, AS y G en muestras de orina .....	113
XXXI. - Precisión del método analítico de ASAG, SAG, ASA, AS, G y ASu en orina .....	114
XXXII. - Exactitud del método analítico para ASAG, SAG, ASA, AS, G y ASu en orina .....	115
XXXIII. - Estabilidad a diferentes temperaturas del ASAG, SAG, ASA, AS y G en orina.....	117
XXXIV. - Estudio de diálisis del ASAG a proteínas plasmáticas.....	119
XXXV. - Parámetros farmacocinéticos obtenidos después de la administración IV de ASAG.....	122
XXXVI. - Metabolitos encontrados en orina después de la administración de ASAG por vía intravenosa (Estudio preliminar).....	128
XXXVII. - Análisis de orina excretada después de la administración de AS por vía oral .....	148
XXXVIII. - Metabolitos obtenidos en orina después de la adm	

nistración del ASA por vía intravenosa.....	152
XXXIX.- Metabolitos obtenidos en la orina después de la administración de ASA por vía oral .....	154
XL.- Metabolitos obtenidos en orina después de la administración intravenosa de SAG .....	156
XLI.- Metabolitos obtenidos en orina después de la administración del SAG por vía oral .....	158
XLII.- Metabolitos analizados en orina después de la administración de ASAG por vía intravenosa .....	161
XLIII.- Metabolitos obtenidos en orina en la administración del ASAG por vía oral .....	163
XLIV.- Criterio para la selección del modelo farmacocinético en el estudio de la administración de ASAG, SAG, ASA, AS y G por vía IV y oral en perros beagle.....	164
XLV.- Resultados obtenidos en la orina en cada uno de los estudios.....	165
XLVI.- Parametros farmacocinéticos obtenidos por el método de los residuos.....	166
XLVII.- Parámetros farmacocinéticos obtenidos por el algoritmo de Marquard .....	167
XLVIII-A.-Parámetros farmacocinéticos obtenidos por las fórmulas correspondientes .....	168
XLVIII-B.-Parámetros farmacocinéticos obtenidos por las fórmulas correspondientes .....	169

XLIX. - Parámetros farmacocinéticos obtenidos como modelo independiente .....	170
L. - Determinación de la depuración intrínseca en las diferentes administraciones (Dependencia del flujo sanguíneo hepático).....	182



## RESUMEN

## FARMACOCINETICA PRECLINICA DEL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL

El Acetil salicilato de guayacol (ASAG) es un fármaco que terapéuticamente posee propiedades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas conjuntamente con la actividad espectorante, siendo éste fármaco poco estudiado, disponible para su uso en Europa.

En el presente trabajo se caracterizó fisicoquímicamente el fármaco determinando los siguientes parámetros: solubilidad, pKa, estabilidad a diferentes pH's y a diferentes temperaturas, espectro de absorción y unión a proteínas plasmáticas. Así mismo se desarrolló un método por CLAR para cuantificar este fármaco y sus metabolitos: ácido salicílico (AS), ácido acetil salicílico (ASA), salicilato de guayacol (SAG) y el guayacol (G), tanto en plasma como en orina.

El estudio farmacocinético preclínico se llevó a cabo en perros beagle de 5 años: 2 machos y 3 hembras con un peso corporal promedio de 12.5 Kg y en buen estado de salud; a los cuales se les administró el fármaco y cada uno de sus metabolitos en diferentes días por vía intravenosa y por vía oral, dejando al animal un tiempo mínimo de reposo de una semana entre cada estudio.

Se encontró que el acetil salicilato de guayacol se

metaboliza principalmente a ácido salicílico, guayacol, salicilato de guayacol y en una proporción pequeña a ácido acetil salicílico. En orina se detectaron el ácido salicílico, guayacol y el ácido salicilúrico. Los parámetros farmacocinéticos para el acetil salicilato de guayacol no pudieron ser determinados ya que se metaboliza rápidamente en guayacol, ácido salicílico y en una pequeña proporción de salicilato de guayacol. Los modelos farmacocinéticos son ajustados de la forma siguiente: Después de la administración IV de ASAG tanto el SAG como el G fueron ajustados a modelo abierto de dos compartimientos, este mismo ajuste se presenta para el AS cuando es administrado el ASA por vía IV, sin embargo en todas las demás administraciones los metabolitos analizados (AS y G) son ajustados a un modelo abierto de un compartimento.

Al administrar el acetil salicilato de guayacol la biodisponibilidad absoluta del guayacol fué mayor que la calculada después de la administración del salicilato de guayacol, pero igual cuando es administrado el guayacol solamente. En el caso del ácido salicílico su biodisponibilidad absoluta es la misma que al administrar el salicilato de guayacol, ácido acetil salicílico ó ácido salicílico.

## ABSTRACT

PRECLINIC PHARMACOKINETICS OF ACETYLSALICILIC ACID GUAIACOL  
ESTER

Acetylsalicylic acid guaiacol ester (ASAG), a drug that has shown anti-inflammatory, antipyretic and analgesic effects associated with an antitussive action, is a drug that has not been very well studied and available for its use in Europe.

The drug was characterized physicochemically determining the following parameters: solubility, pKa, stability at different pHs and temperatures; absorption spectrum and plasma protein binding. An HPLC method was developed to assay the drug and its metabolites: salicylic acid (AS), acetylsalicylic acid (ASA), guaiacol salicylate (SAG), guaiacol (G), in plasma and urine.

The preclinical pharmacokinetic study was performed in 5 beagle dogs of five years old: two males and three female with a average corporal weight of 12.5 kg and in good health. Which received the drug and one of its metabolites in different way intravenous and oral, at 7 days elapsed between each study.

The results showed that acetylsalicylic acid guaiacol ester, is metabolized mainly as salicylic acid (AS), guaiacol (G), guaiacol salicylate (SAG) and a little portion acetyl salicylic acid (ASA). In urine we detected salicylic acid

(AS), guaiacol (G) and the salicylic acid (ASu). The pharmacokinetic parameters of acetylsalicylic acid guaiacol ester could not be determined due because it quickly metabolizes in guaiacol (G), salicylic acid (AS) and in a portion of guaiacol salicylate (SAG). The pharmacokinetics model were adjusted in the following manner: After the IV administration of ASAG the SAG and G were adjusted to two compartment the same adjustment was made present when for the AS when ASA was administered by intravenous way, nevertheless in all other administrations the metabolites analysed (AS y G) were adjusted to a one compartment model.

When the Acetylsalicylic acid guaiacol ester was administered, the absolute bioavailability was greater for guaiacol than after the administration of guaiacol salicylate but similar to the administration of the guaiacol itself. In the case of the salicylic acid the absolute bioavailability was a than after the administration of the guaiacol salicylate Acetylsalicylic Acid or salicylic acid.

## UNIDAD 1

## INTRODUCCION

## INTRODUCCION

El acetil salicilato de guayacol es un profármaco binario que combina las propiedades farmacológicas del ácido acetil salicílico y el guayacol. Por lo tanto el acetil salicilato de guayacol presenta las propiedades antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas del ácido acetil salicílico conjuntamente con la actividad expectorante del guayacol, lo cual puede ser útil tanto en el tratamiento de enfermedades agudas ó crónicas del tracto respiratorio, así como en los padecimientos catarrales.

El acetil salicilato de guayacol actualmente es un fármaco poco estudiado pero disponible para su uso en Europa, por la compañía BAYER en Italia.

Por varias décadas se han estudiado profármacos del ácido acetil salicílico para disminuir ó eliminar algunos efectos colaterales. El acetil salicilato de guayacol aparentemente presenta menores efectos secundarios que el ácido acetil salicílico y al mismo tiempo presenta ventajas terapéuticas; sin embargo, no se tiene información acerca de su biodisponibilidad y disposición para asegurar las ventajas frente al ácido acetil salicílico y el guayacol. El acetil salicilato de guayacol se hidroliza en sangre y otros tejidos en ácido acetil salicílico, salicilato de guayacol, ácido salicílico y guayacol. Por lo tanto los estudios farmacocinéticos contribuirán a determinar las ventajas y

limitaciones farmacológicas que el acetil salicilato de guayacol posee frente al ácido acetil salicílico y guayacol.

El acetil salicilato de guayacol ha sido sintetizado por el Dr. Rafael Castillo Bocanegra, Profesor de la Facultad de Química de la UNAM (18), y puede ser escalado a nivel industrial en nuestro país.

Con la información de este trabajo se conocerá si las concentraciones plasmáticas del ácido salicílico y/o ácido acetil salicílico son equivalentes a un régimen de acetil salicilato de guayacol. La misma meta a alcanzar para el ácido acetil salicílico se aplica para el guayacol.

En base a lo anteriormente mencionado los objetivos del presente trabajo fueron:

a) Desarrollar métodos analíticos para cuantificar el acetil salicilato de guayacol, ácido salicílico, ácido acetil salicílico, salicilato de guayacol y guayacol en fluidos biológicos (plasma y orina).

b) Preparar formulaciones intravenosas y orales de ácido salicílico, ácido acetil salicílico, salicilato de guayacol, guayacol, y acetil salicilato de guayacol, para ser administrado en los animales de experimentación.

c) Determinar los parámetros de disposición del ácido salicílico, ácido acetil salicílico, guayacol, salicilato de guayacol y acetil salicilato de guayacol, después de una dosis intravenosa equimolar de los cinco compuestos en los animales.

d) Determinar la biodisponibilidad del ácido salicílico, ácido acetil salicílico, salicilato de guayacol, guayacol y acetil salicilato de guayacol, considerando que las dosis administradas a los perros fueron equimolar al ASAG.



## UNIDAD 2

### GENERALIDADES

## GENERALIDADES

El cuadro clínico de la bronconeumonía se caracteriza por hipersecreción bronquial y consecuentemente la estimulación del reflejo de la tos, que se acompaña de hipertemia y dolor difuso. La terapia recomendada es asociar agentes antitusivos, expectorantes, analgésicos y antibióticos, cuyo uso indiscriminado puede crear resistencia de las cepas (44).

El acetil salicilato de guayacol (ASAG) es un fármaco nuevo que clínicamente ha demostrado ser bien tolerado tanto por vía oral como por vía rectal (20). Es un fármaco broncomucotrópico que se utiliza como antiinflamatorio, antipirético, analgésico, expectorante, antiseptico, antitusivo, fluidificante, mucolítico, balsámico, antiasmático (52,51,74).

A continuación se presenta la información encontrada en la literatura acerca de este fármaco:

### 2.1 DESCRIPCION:

El acetil salicilato de guayacol es también conocido en Europa como guacetisalum o broncaspín. Es el éster guayacólico del ASA, siendo su estructura (44):

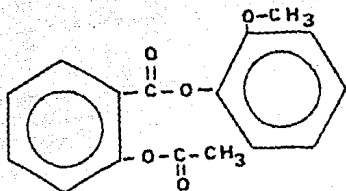


FIGURA 1- ESTRUCTURA QUIMICA DEL ACETIL  
SALICILATO DE GUAYACOL

Nombre químico: Ester 2-metoxifenilico del ácido  
2-acetiloxi benzoico.

Formula condensada:  $C_{16}H_{14}O_5$

Peso molecular: 288.29

## 2.2 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS DEL ASAG:

El acetyl salicilato de guayacol es un polvo blanco cristalino, punto de fusión 71-73°, con una pureza de 99.6%, soluble en benceno, cloroformo, eter etílico y dimetil sulfóxido (44).

### 2.3 ESTRUCTURA QUIMICA DE LOS PRODUCTOS DE DEGRADACION DEL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL.

Los principales productos de degradación del acetil salicilato de guayacol son: el ácido salicílico producto de la hidrólisis del ácido acetil salicílico y este a su vez de la hidrólisis del salicilato de guayacol y de acetil salicilato de guayacol, el guayacol que se forma bien del acetil salicilato de guayacol ó del salicilato de guayacol y este último se forma del acetil salicilato de guayacol.

En la figura 2 se presentan las estructuras químicas de los productos de degradación de acetil salicilato de guayacol los cuales fueron descritos por Papini y Bramanti (44).

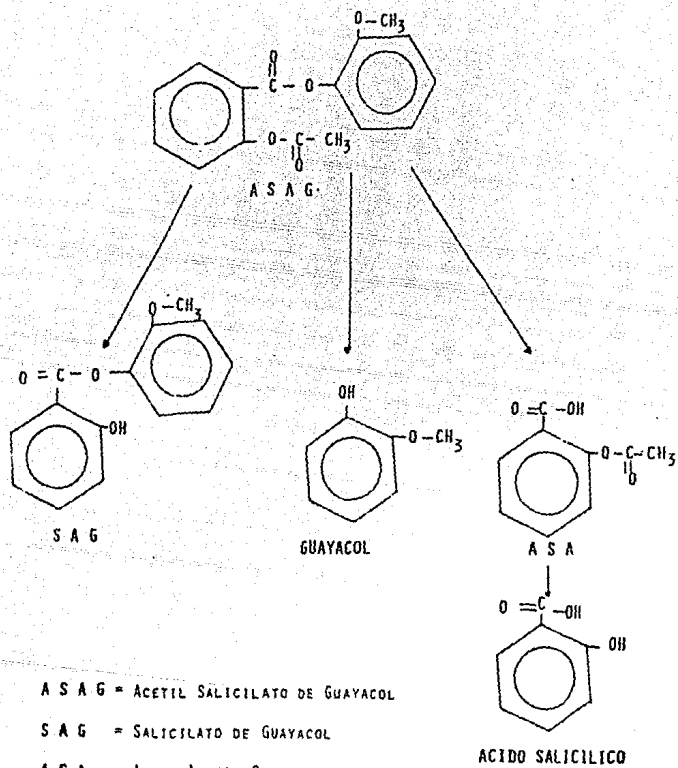


FIGURA 2- PRODUCTOS DE DEGRADACION DEL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL

## 2.4 PROPIEDADES FARMACOLOGICAS DEL ASAG Y SUS METABOLITOS.

La tos es un mecanismo de reflejo de protección muy útil a través del cual el organismo intenta limpiar las vías respiratorias del exceso de moco o partículas extrañas. A veces, la tos está asociada a enfermedades de tipo respiratorio. En tales casos, generalmente se calma después de unos cuantos días. También, en ocasiones indica una enfermedad orgánica subyacente cuya causa debe investigarse. Hay dos tipos comunes de tos: productiva (tos acompañada de expectoración: moco y flema) y no productiva (tos seca).

El guayacol es un expectorante local que aumenta el flujo de las vías respiratorias, lo cual reduce la viscosidad de las secreciones y facilita su expectoración. Este fármaco es más efectivo que el cloruro de amonio ó que el hidrato de terpina en el tratamiento de la tos tuberculosa, pero en el tratamiento de asma bronquial es menos efectivo que los yoduros, por lo que se emplea en el tratamiento de la tos productiva (30).

El ácido acetil salicílico es un analgésico no esterooidal que produce irritación gastrointestinal y en algunos casos hasta sangrado, lo cual puede disminuirse administrándolo en forma de profármacos, a los cuales se les realiza modificaciones químicas en la molécula de manera que el grupo carboxilo no quede libre, con el fin de lograr el mismo efecto farmacológico y eliminar los efectos colaterales. Esta idea fué la que se pretendió al sintetizar el ASAG presentándose algunas

ventajas sobre el guayacol y el ácido acetil salicílico siendo estos dos metabolitos obtenidos del ASAG.

Por tanto el ASAG es un profármaco que aparentemente presenta menores efectos secundarios que la aspirina y puede ser utilizado en padecimientos como:

- Broncopulmonía aguda o crónica.
- Bronquitis laringo-traquea.
- Congestión pulmonar.
- Bronquitis asmática.
- Bronquitis crónica enfisematosa.
- Bronquitis aguda o crónica.
- Bronquitis laringeo-faríngea.

El ASAG presenta las siguientes VENTAJAS farmacológicas:

- 1) Tolerancia local y general.
- 2) Se degrada rápidamente a AS por lo cual el fármaco no se acumula en el organismo.
- 3) No presenta reacciones anafilácticas (S3).
- 4) Presenta menores efectos secundarios que el ácido acetil salicílico.
- 5) Su efecto terapéutico se presenta rápidamente y es más persistente, más rápido que el del ASA solo.
- 6) Tiene propiedad antibroncopasmódica.
- 7) La toxicidad aguda es menor que al suministrar por separado el ASA y el G.

Su toxicidad cronica practicamente es nula (30).

- 8) El guayacol se ha utilizado por via oral ó por inhalación como expectorante, así mismo se ha demostrado que presenta propiedades antisépticas intestinales (18).

#### DESVENTAJAS DE LA ADMINISTRACION POR SEPARADO DE ASA, G Y SAG:

- 1) El guayacol inhibe la adhesión de las plaquetas, provocando la prolongación de tiempo de coagulación. Lo mismo sucede con el AS (Weiss y col., 1968; Suter y col., 1971; Miabke y col., 1973). El efecto dura varios dias.
- 2) La aspirina al ser administrada por un periodo prolongado altera la permeabilidad de la membrana gástrica provocando irritación, sangrado y posiblemente ulceración (33). Se ha encontrado que en algunos pacientes que usan aspirina se presenta sangrado gastrointestinal promedio diario de 5 ml y en algunas personas susceptibles hasta de 80 ml (3). por lo cual la busqueda de profármacos de aspirina que disminuyan este efecto colateral es de gran importancia farmacológica (10).
- 3) El ácido salicílico, el metabolito activo del ácido acetil salicílico, presenta metabolismo de



capacidad limitada (35).

- 4) Al ser administrado en forma de salicilato, este se une en un 72-90% a proteínas plasmáticas. Dado a que los pacientes con infecciones agudas y fiebre reumática presentan un contenido de albúmina disminuido, sería necesario realizar un ajuste de dosificación (35).
- 5) Se han reportado reacciones de hipersensibilidad a la aspirina y algunos de sus derivados (53,54).

## 2.5 MECANISMO DE ACCION DEL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL:

### 2.5.1 ETIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD:

El mecanismo de remoción de la secreción respiratoria es el siguiente:

La secreción de la vía aérea tiene diversos orígenes:

- 1) Las células globosas del epitelio superficial bronquial.
- 2) La glándula bronquial.
- 3) Vaso superficial pequeño.

Las células globosas producen un moco altamente viscoso. La glándula bronquial secreta un producto suero

mucinoso con un mayor contenido de agua.

Cuando existe un catarro crónico, se observa una proliferación marcada de las células globosas y una hipertrofia de la glándula bronquial. La secreción de la glándula bronquial es regulada por el sistema nervioso autónomo usando actividad de la estimulación del nervio vagal.

El moco está constituido de mucopolisacáridos de alto peso molecular, agua, carbohidratos, proteínas, lípidos, inmunoglobulina, lisozima.

El moco constituye la parte poco densa del manto mucoso que por tanto no es homogéneo y lo constituye una doble capa ó estrato.

1) Estrato ó capa periciliar en fase de sol, de un espesor de  $5 \mu\text{m}$  donde se encuentran los cilios a la base del epitelio fino y arriba de éste.

2) Estrato en fase de gel, a una mayor viscosidad que el de la secreción de las células globosas.

El moco por ser impermeable al agua protege de la deshidratación de las células del epitelio. Se muestra una correcta dinámica del estrato mucoso, manteniendo un reparto preciso entre lo que constituye la fase gel y fase sol. Los cilios giran a una frecuencia de 1000 a 1500 revol./min. La velocidad lineal del moco es de cerca de  $1 \text{ mm/min}$  y en la traquea de 5 a  $20 \text{ mm/min}$ .

### 2.5.2 EFECTO DEL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL.

El ASAG actúa directamente en la secreción de la glándula bronquial por una moderada estimulación del vago. Penetra en el torrente sanguíneo y es capaz de activar a la glándula bronquial y por lo tanto la acción por lo menos se duplica en cuanto a actuar directamente sobre la secreción glandular, como se observa en la figura 3 (51). Además la primera acción del fármaco producida por el guayacol, es reducir el grado de hiperviscosidad de la secreción bronquial mediante el estímulo del transporte mucociliar y modificación de las características reológicas del esputo controlando la secreción suero proteica vascular.

El efecto de este fármaco por lo tanto es combinar las propiedades del guayacol y ASA. También el ASAG estimula la mucoquimiosis (factor de contribución a la remoción del moco) actuando como expectorante (broncomúctotrópico) principalmente en forma de suspensión. Kendige establece que el agua contribuye a una mejor acción terapéutica lo cual fue corroborado por Boy y Boy (51).

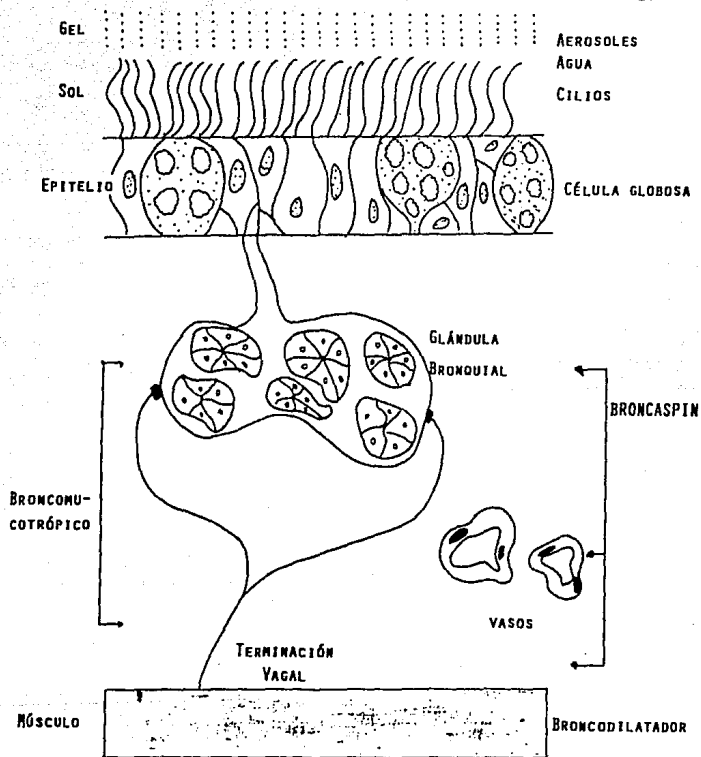


FIGURA 3.- MECANISMO DE ACCION DEL ACETIL SALICILATO DE QUAYACOL

## 2.6 POSICIÓN DEL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL EN EUROPA

### DOSIFICACION:

Adultos: CAPSULAS DE 500 MG DE ASAG: 2 ó 3 veces al día.

SUSPENSION AL 5% DE ASAG: 2 ó 3 cucharadas al día (10 ml por cucharada).

SUPOSITORIOS DE 1.2 G DE ASAG: 1 ó 2/día.

Niños: SUSPENSION DE 3.3 G DE ASAG/100 ML:

-Lactantes y niños menores de 3 años:

1/2 cucharadita (2.5 ml) 2 veces al día

-De 3 a 6 años:

1 cucharadita (5ml) 3 veces al día

-De 6 a 12 años:

2 cucharaditas 2 a 3 veces al día (18).

SUPOSITORIOS:

-De 2 a 6 años

1 ó 2 al día.

-De 6 a 12 años:

2 al día.

### CONTRAINDICACIONES:

No debe administrarse a pacientes que sean hipersensibles a los derivados del acetil salicilato de guayacol o a este producto.

### EFECTOS SECUNDARIOS:

Pueden presentarse trastornos gastrointestinales

como vómito y diarrea, y además reacciones cutáneas. En niños de 8 a 12 años de edad, si se usa una dosis superior de 880 mg al día provoca claramente un efecto emetizante.

#### ADVERTENCIAS:

Debe administrarse con precaución a pacientes con úlceras gástricas o duodenales, hemorragias, cirrosis hepática (especialmente cuando se emplean dosis elevadas) y a los sometidos a un tratamiento simultáneo con anticoagulantes. El acetil salicilato de guayacol deberá administrarse con alimentos especialmente si se administra a grandes dosis ó durante periodos prolongados.

#### 2.7 ESTUDIO FASE CLINICA DEL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL

Se efectuó un estudio en 40 pacientes ancianos que padecían bronconeumonía aguda y crónica con efisema, bronconeumonía crónica asmática y bronconeumonía crónica asmática enfisematosa, por lo que en algunos casos era necesario administrar además del ASAG un antibiótico o un broncolítico para pacientes con asma.

A los pacientes se les suministro una cucharada de una suspensión de ASAG a una concentración de 5 g 100 ml, 2 o 3 veces al día. La duración del tratamiento fue mínimo de 4 días y un máximo de 21 días. En 10 casos fue el único fármaco suministrado.

Se observó un mejoramiento evidente al término del tratamiento con el ASAG en un 55%. En 4 pacientes el resultado

fue parcial debido a la intolerancia gástrica que presentaron.

Además, el efecto antitusivo fue claro, reduciendo número de accesos de tos a partir del cuarto día de tratamiento.

Los parámetros que presentaron un valor de variación significativa observada al inicio y al término del tratamiento fueron: intensidad de la tos, dificultad de expectoración, temperatura y disnea.

Pelucco D., G. Bernarbo (47) realizaron un estudio con el fin de observar el efecto del ASAG en el tratamiento de la bronconeumopatía crónica obstructiva. En este estudio participaron 26 personas (21 de sexo masculino y 5 de sexo femenino) de 14 a 89 años de edad (edad promedio de 66 años), de los cuales 21 personas presentaban bronconeumopatía crónica obstructiva, 4 broncopulmonar aguda y una con bronquitis aguda.

Se administró una cucharada de suspensión al 5% (aproximadamente 0.5 g de ASAG) cada 8 horas durante un promedio de 8 días (7 días mínimo y 8 días máximo).

Los parámetros para evaluar la tolerabilidad y la eficacia del fármaco fueron: temperatura corporal (cada hora), frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, semiología torácica, número e intensidad de accesos de tos cada dos horas, disnea, dificultad de expectoración y sintomatología dolorosa. Así mismo se realizaron estudios hemogasométrico arterioso, espirométrico, radiográfico (radiografía del torax), electrocardiograma, examen del esputo (volumen y estudio macroscópico), hematológico (hemograma con fórmula

leucocitaria, azoemia, glicemia, mucoproteína, transaminasa glutámica oxalacética sérica (SGOT), volumen de electrolitos sérico (VES), título de antitreptolisina (ASLO), transaminasa glutámica pirúvica (SGPT), bilirrubinemia total, actividad protombinica y electroforesis proteica.

Se encontró que el ASAG en la mayoría de los casos fué bien tolerado. En el tratamiento se obtuvo un mejoramiento de la sintomatología subjetiva y objetiva, en el 90% de los casos tratados, siendo significativa la reducción de la frecuencia cardiaca y de la frecuencia respiratoria. También se presentó una disminución del número de accesos de tos como su intensidad evidente a los 4 ó 5 días del tratamiento. Su tolerabilidad óptima fué de 80.77%. Un porcentaje muy pequeño de pacientes presentaron manifestaciones secundarias como gastralgia, náusea, vómito y pirosis gástrica (47).

Cerquiat R. Trovillo (4), efectuó una prueba comparativa entre el ASAG y el fosfato de oxalamina en 30 pacientes de ambos sexos de edad premenil y senil a fin de verificar la actividad fluidificante, expectorante, antitusiva, antipirética y antiinflamatoria, así como su tolerabilidad local y sistémica.

En este estudio se administró una dosis oral de 500 mg de ASAG 3 veces al día en forma de suspensión conteniendo 5 g/100 ml, con una duración de tratamiento de 14 días por lo que la dosis total fué de 21 g. El fosfato de oxalamina se administró a una dosis de 140 mg 3 veces al día en



suspensión de 14 g/100 ml. con una duración del tratamiento de 14 días y su dosis total de 5.88 g. Los resultados se presentan en las figuras 4 y 5 observándose un mejoramiento en la sintomatología al inicio y al final del tratamiento.

En la figura 4 se observa como la intensidad de la tos se ve grandemente disminuida. Otros efectos que presentan ambos fármacos son:

	GUACETISAL	FOSFATO DE OXALAMINA
Disminución de la frecuencia respiratoria.	11.8%	10.95%
Disminución de la frecuencia de pulso.	11.4%	1.00%
Disminución de la intensidad de tos.	15.0%	14.38%
Disminución del No. de accesos tos.	19.2%	21.00%

En la figura 5 de acuerdo a las características reológicas del esputo se observa una mejor acción del ASAG que del fosfato de oxalamina, por lo tanto la dificultad de expectoración se ve disminuida al emplear el acetil salicilato de guayacol.

El ASAG no produce manifestación de tipo alérgico. En el examen hematológico que se realizó al inicio y al final del tratamiento, se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el VES (Índice de Katz.- volumen de electrolitos séricos) y el SGPT (transaminasa glutámica pirúvica) los cuales se ven disminuidos al final del

tratamiento. También se vio disminuida la frecuencia de pulso, frecuencia respiratoria, intensidad de la tos y número de accesos de tos. Al confrontarse la actividad de ambos fármacos se examinó la intensidad de la tos, dificultad de expectoración, características macroscópicas y reológicas del esputo, encontrándose que el ASAG aumenta el volumen expectorado en un 49%.

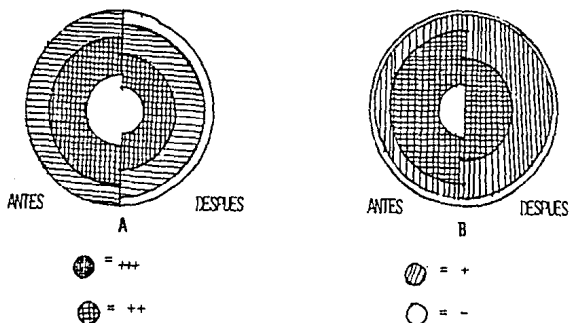
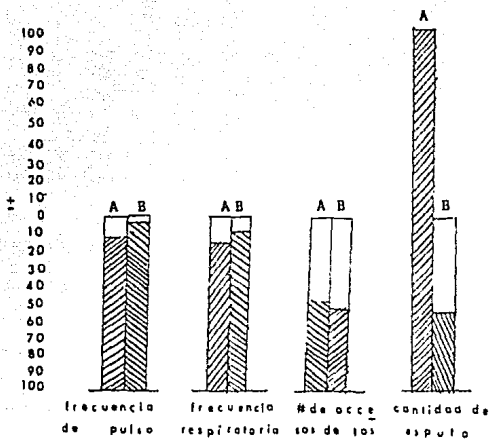
Mora P., Lui y Norastica (39) realizaron un estudio en bebés con afección respiratoria inflamatoria, fiebre y en la mayoría de los casos complicada con broncospasmo.

Este estudio se llevó a cabo en 42 niños de los cuales 6 casos presentaban laringeo-traqueo-bronquitis, 2 congestión pulmonar, 30 bronquitis asmática y 4 con asma bronquial.

Se les administraron de 1 a 2 supositorios de 0.5 g/día a niños de 1 a 6 años. A niños de 6 años en adelante 2 supositorios por día, durante 5 a 12 días el tratamiento. En la mayoría de los casos el tratamiento fué de 7 días.

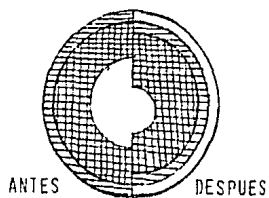
Se encontró una buena respuesta en 88.09% de los casos, con una variación significativa al final del tratamiento en el número de accesos de tos, temperatura corporal, frecuencia cardíaca/minuto, en la frecuencia respiratoria, en el hemogasanálisis ( $PAO_2$ ,  $SAO_2$ ,  $PAO_2$ ). Observándose un aumento al final del tratamiento del pH,  $HCO_3$ ,  $PACO_2$ ,  $PAO_2$  y  $SAO_2$ , una disminución en el espasmo, disminución del edema y disminución

en la hipersecreción bronquial. Además la tos se disminuye en el 75.27% de los casos al séptimo día del tratamiento.



INTENSIDAD DE LA TOS EN UN PACIENTE

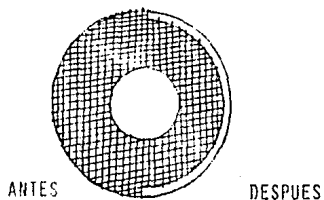
FIGURA 4.- COMPARACION DE LA ACTIVIDAD TERAPEUTICA DEL ASAG CON EL FOSFATO DE OXALAMINA (A=ASAG; B=FOSFATO DE OXALAMINA)



GUACETISAL

= +++

= ++

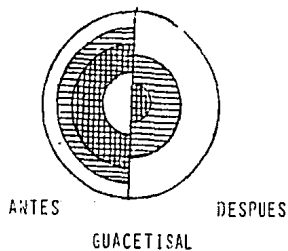


FOSFATO DE OXALAMINA

= +

= -

ESPUTO. CARACTERISTICAS REOLOGICAS



DIFICULTAD DE EXPECTORACION

FIGURA 5.- RELIEVE CLINICO DEL ASAG COMPARADO CON EL  
FOSFATO DE OXALAMINA

Saldi y col., (52) realizaron otro estudio en 32 niños de 2 a 12 años que presentaban infección respiratoria aguda con hiperpirexia.

Se suministró una suspensión pediátrica conteniendo 33g/100 ml, administrándolo de la manera siguiente: A niños de 0 a 3 años de edad 2.5 ml de la suspensión 2 veces al día correspondiendo a una dosis de 165 mg/día, a niños de 3 a 6 años se administró 5 ml 3 veces al día correspondiente a 495 mg diariamente y a niños de 6 a 12 años 10 ml 2 o 3 veces al día (660-990 mg al día). La duración del tratamiento varió de 7 a 14 días (promedio de 8-9 días).

Se encontró que el ASAG se tolera adecuadamente siendo capaz de eliminar rápidamente los síntomas de manera que el cuadro se vió evidentemente mejorado. La tolerabilidad optima fue de 96.8% tanto local y sistémica. Con monoterapia su eficacia fue de 77.8% y la terapia con antibióticos fue de 95.2%. Los síntomas que mejoraron fueron dolor, hiperproducción de moco denso y dificultad de expectoración.

Zuccali, Gherson y Parcotti (74) realizaron un estudio en pacientes afectados de bronconeumonía crónica. En el estudio participaron 40 pacientes de ambos sexos con una edad promedio de 54.9 años. Solo en 3 casos se administró monoterapia. A estos pacientes se les suministró un supositorio de 1.2 g de principio activo y una suspensión al 5%. Se administraron 2 supositorios, uno por la mañana y otro por la tarde en 28 pacientes y la suspensión fue administrada 3 veces

al día correspondiente a una dosis de 1.5 g de principio activo. La duración media del tratamiento fue de 10 días.

Los resultados demostraron que el fármaco presentó una marcada acción terapéutica en el 87.5% de los casos. La tolerabilidad del fármaco fue óptima (100%) tanto en supositorio como en suspensión. Con respecto a la intensidad de la tos fue evidente su reducción en un 80% y con respecto a la dificultad de expectoración se estabilizó en un 91.8% de los casos. En el análisis hematológico la mucoproteína, se ve alterada en un 73.2% de los casos, la prueba de funcionalidad respiratoria (hemogasanalítico) presenta un valor de variación significativa observada al inicio y final del tratamiento. La expectoración (estudio macroscópico) aparece densa antes de la terapia en 28 casos y posteriormente esta expectoración se presenta más fluidificada en 19 casos al término del tratamiento (87.8%) y existe además disminución de la frecuencia respiratoria.

## 2.8 ESTUDIOS PRELIMINARES PARA LA FORMULACION DE ASAG

Dundi G., A. Zamotit y Gerosa (12) analizaron la influencia ó efecto de los agentes estabilizantes coloidales sobre una suspensión de ASAG conteniendo CMC de viscosidad media, CMC de viscosidad alta, precipitado de sílica, silicato de aluminio y magnesio y sacarosa.

La suspensión con mejores propiedades reológicas y más estable se obtuvo empleando 0.5 g de CMC ya sea de

viscosidad media ó de viscosidad alta. 0.5 g de precipitado de sílice, 1 g de silicato de aluminio y magnesio y 50 g de sacarosa, adicionando además el conservador, edulcorante, aromatizante y agua a un volúmen de 100 ml conteniendo 5 g de acetyl salicilato de guayacol. El emplear el CMC de viscosidad alta presentó mejor estabilidad.

Mura P., Liguéri y Bramanti (43), estudiaron también la influencia de diversos coadyuvantes y el efecto de la micronización en suspensiones de acetyl salicilato de guayacol, dado a que el acetyl salicilato de guayacol presenta una baja solubilidad a 37°C estudiada en soluciones amortiguadoras, siendo de 48.94 mcg/ml a pH 1.1, de 39.79 mcg/ml a pH 6.5 y de 32.39 mcg/ml a pH 7.5, por lo que se requeriría aumentar la velocidad de disolución. Sartorius y Stricker, realizaron un estudio en el que mezclaron por agitación el principio activo del ASAG con el coadyuvante, analizando la cantidad de fármaco difundido. En la tabla I se presentan los resultados obtenidos por estos investigadores en los que se observa la influencia de los coadyuvantes.

En base a los resultados obtenidos, los autores concluyen que al emplear Tween 80, el fármaco es más difundido. La urea ó dietanolamina también dan buenos resultados y la influencia de la micronización ha demostrado aumentar la disponibilidad de principios activos poco solubles, siendo difundido el acetyl salicilato de guayacol en una proporción de 12.95 mcg/ml de este fármaco en aproximadamente 90 minutos.



TABLA I.- INFLUENCIA DE VARIOS COADYUVANTES EN PREPARACIONES DE ASAG

COADYUVANTE EXAMINADO	DOSIS (mg/100ml)	CANTIDAD DE FARMACO DIFUNDIR EN 90' (mcg/ml) (C*)
<b>SOLVENTE:</b>		
Aceite vegetal	400	1.62
Propilenglicol	400	3.50
Etolol	1000	6.70
Polietilenglicol 400	400	6.32
<b>TENSOACTIVOS NO IONICOS:</b>		
Span 80	500	0.46
Tween 20	400	6.24
Tween 60	400	9.60
Tween 80	500	6.29
<b>COMPLEJANTE:</b>		
Sorbitol 70%	400	3.50
Glicina	400	5.32
Urea	400	9.79
Dietanolamina	400	12.25

NOTA: (\*) Fármaco no micronizado difundido alrededor de 90' es de 5.18 mcg/ml.

Tanto la suspensión como los supositorios conteniendo el fármaco micronizado, mostraron un aumento notable en la velocidad de difusión del principio activo, encontrándose que se presenta el fenómeno opuesto si el principio activo se administra en cápsula, sin embargo el fármaco micronizado no se demostró aumento posterior en la velocidad de difusión de ASAG en presencia de algun coadyuvante y en algunos casos se ve disminuido por ejemplo con aceite vegetal donde tiende a permanecer en la fase oleosa produciéndose una saturación.

En la figura 6 se observa como se afecta la

velocidad de disolución en cápsulas en presencia de algunos excipientes, observando una mejor velocidad de disolución en presencia de Tween 60 y en segundo lugar el empleo de urea y dietanolamina. El emplear el principio activo micronizado produce una velocidad de disolución más baja que al utilizar los excipientes antes mencionados pero es mucho mayor la del principio activo sin micronizar. El Span 80 y el aceite vegetal producen una influencia negativa en la velocidad de disolución.

Se han realizado unas pruebas de cosolubilidad de acuerdo al método propuesto por Yalovsky (71) empleando etanol, propilenglicol, polietilenglicol y glicerina que son rutinariamente empleados para mejorar la solubilidad de los fármacos en vehículos acuosos, sin embargo en algunos casos la solubilidad del fármaco no se incrementa grandemente. Para incrementar la solubilidad deberán seleccionarse los cosolventes adecuados para evitar que ocurra alguna precipitación al diluirlo con el fluido sanguíneo (acuoso) si el fármaco es administrado por vía intravenosa, provocando una irritación o daños más graves como una trombosis.

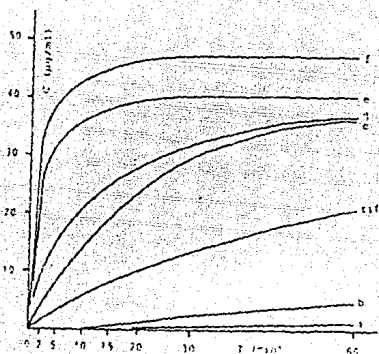


FIGURA 6.- INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE ALGUNOS EXCIPIENTES EN LA VELOCIDAD DE DISOLUCION DEL FARMACO

(a= aceite vegetal, b=Span 80, c= principio activo micronizado, - d=diatanolamina, e=urea, f=tween 60, ref=principio activo solo)

## 2.9 METODOS DE ANALISIS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS PARA EL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL Y SUS METABOLITOS.

### 2.9.1 METODOS PARA EL ANALISIS DEL ASAG:

Papini y Bramanti (44) reportaron un método analítico para cuantificar tanto el ASAG como los metabolitos por HPLC, a una longitud de onda de 254 nm empleando como fase móvil Metanol-agua (60:40) en operación isocrática a un flujo de 1 ml/min y empleando una columna ODS. Estos mismos autores sugirieron la cromatografía de capa delgada como otro método de cuantificación de ASAG y sus metabolitos, siendo el soporte sólido de la columna sílica gel, utilizando como eluente el toluol-acetato de etilo (90:10) y el ciclohexano-éter etílico-ácido acético (50:50:0.5), siendo su valoración cuantitativa con un espectrofotómetro cromatográfico ZEISS mod. PM Q III, sin embargo en ninguno de los casos reportan el proceso de extracción.

Hasta la fecha no se han reportado otros métodos, sin embargo existen referencias con respecto al análisis de cada uno de los metabolitos:

### 2.9.2 METODOS PARA EL ANALISIS DE SALICILATO:

#### METODOS COLORIMÉTRICOS:

Uno de los métodos para cuantificar el salicilato

es el colorimétrico de Trinder, el cual utiliza el nitrato ferrico para desarrollar el color y el HCl como agente acidificante. Otro método colorimétrico es el Dupont que a diferencia del anterior utiliza además el ácido nítrico antes del nitrato ferrico (14).

También existe otro método colorimétrico el Multistat III (14) en la que se emplea una microcentrifuga. Estos métodos han sido utilizados para suero y orina, pero presentan la desventaja de que el intercepto con la ordenada del origen es grande por lo que las concentraciones del salicilato se sobrestiman en el rango de 10 a 30 mg/ml.

## 2.9.3 METODOS PARA EL ANALISIS DE ASA, AS Y G:

### METODOS FLUOROMETRICOS:

Un método descrito por Kenneth (26), involucra la formación de fluoruro pudiendo separar el ácido salicílico y el ácido acetil salicílico mediante una reacción con el reactivo de fluoruro ferrico. Este método utiliza una longitud de onda de 325 nm de excitación y de 480 nm de emisión.

Winthrop Large y col., (70) realizaron un método para cuantificar el ASA y AS en sangre utilizando diclorometano y HCl 5N y trabajando a una longitud de onda de 318-327 nm de excitación y de 350-460 nm de emisión.

Otro método fluorométrico descrito por Saul L.

Kanter y col., (25) Para cuantificar el ASA utilizaron el nitrato de amonio con el que se eliminan las interferencias del AS y sus conjugados, obteniendo una recuperación de ASA hasta de 90% operando a una longitud de onda de 365 nm de excitación y de 455 nm de emisión.

#### MÉTODOS POR CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS:

Maulding L. Diana y Young F. (34), desarrollaron un método que puede detectar el ácido salicílico, ácido salicílico, el ácido genticico y los glucoronidos en fluidos biológicos por cromatografía líquida. Para sangre y orina emplea como solvente extractor el metanol-agua-ácido acético glacial (80:40:1) y además esta misma mezcla es empleada como fase móvil, es utilizado como agente acidificante el ácido tricloroacético al 10% y una columna  $\mu$ -Bondapak Cis. Para sangre solo se requieren 3  $\mu$ l de fluido biológico y en orina se requieren de 0.5 ml. El método es lineal en un rango de concentración de 0.5 a 2.5  $\mu$ g. Siendo su coeficiente de variación para cuantificar el AS en plasma de 3.9% con una exactitud de 96.5%. Para cuantificar el AS en orina su coeficiente de variación es de 2.1% y su exactitud de 100.3%.

Harrison y col., (22) desarrollaron un método para cromatografía de líquidos para analizar el ASA y AS en plasma y orina.

Para el plasma se emplea HCl 0.27N como agente acidificante y cloruro de metileno como agente extractor empleando una columna  $\mu$ -Bondapak Cis utilizando una longitud de

onda de 300 nm para el ASA y de 280 nm para el AS. La fase móvil empleada fue metanol-agua-acido acético (60:40:1).

Para la orina se emplea un volumen de 2 ml del fluido biológico, empleando hexano como solvente extractor. Las condiciones cromatográficas son las mismas que en plasma. En ambos métodos se obtuvo una respuesta lineal en el rango de concentración de 2 a 100 mcg/ml y con un coeficiente de variación de 1% para el ASA, y para el AS de 3%, por lo cual el método es exacto y preciso además de ser un método sensible.

B. Edgar, C. Bogentoftond y P.D. Lagerstrom (13) desarrollaron un método para cuantificar el ácido salicílico en plasma, adicionando como solvente extractor el acetonitrilo. La columna empleada es Lichrosorb RP B de 10  $\mu$ m y el detector operado a 314 nm, empleando como fase móvil acetonitrilo-agua-acido acético glacial (12:84:4). La concentración mínima detectable para el ácido salicílico en este método fue de 30  $\mu$ mol/l y para el ácido salicílico de 10  $\mu$ mol/l.

Otro método para cuantificar el ASA descrito por Pfeifferaed D. y Bankey (48), en plasma por HPLC, empleando como solvente extractor el cloruro de metileno y una columna de fase inversa Zorbax SIC de 6 $\mu$ m Dupont aca. La fase móvil ocupada fue hexano-cloroformo-acido acético (80:10:3) y a una longitud de onda del detector de 254 nm.

Un método por HPLC para cuantificar el AS en preparados farmacéuticos propuesto por Gupta (7) el cual

emplea el ácido fórmico al 98%, para liberar el AS. La columna utilizada es la  $\mu$ -Bondapack Cis y metanol-buffer de fosfato 0.01M (20:80) como fase móvil ajustando a un pH 2.4 con ácido fosfórico y operando a 300 nm el detector. Como estándar interno se puede utilizar cafeína, fenecina o salicilamida.

Kirchoefer (28) propuso otro método para cuantificar el AS y ASA, solo en el que para tabletas utiliza ácido fórmico al 98% para liberar el AS. Se emplea una columna de fase inversa Cis y como fase móvil metanol-agua (55:40) con 1.5% de ácido acético. El estándar interno empleado fue el propilparabeno. En este método puede emplearse un detector de fluorescencia o el de ultravioleta a 254 nm. Siendo un método preciso, exacto y libre de interferencia de excipientes.

Day y col., (8) encontraron que hay que tener cuidado en la cuantificación de ácido salicílico, ya que podría formarse un éster metílico del ácido salicílico causando valores bajos del ácido salicílico y valores altos del ácido salicílico ya que su tiempo de retención es el mismo. En este método se emplea el ácido *O*-metoxibenzoico y como agente acidificante el HCl 0.6M y el éter como solvente extractor. Se empleó una precolumna Perisorb RP-18 y una columna de fase reversa ultrasférica ODS. La fase móvil empleada es metanol-agua (15:85) con 1.5% de ácido acético glacial y un detector UV operando a una longitud de onda de 310 nm. Además de cuantificar el ácido salicílico, ácido salicílico se puede cuantificar el ácido genticico.



B. Edgar, C. Bogentofian and P.O. Lagerstrom (13), propusieron un método para cuantificar el ácido salicílico, ácido salicílico y el ácido genticónico por cromatografía de líquidos empleando una columna de fase inversa y un detector de fluorescencia operado a 315/420 nm.

A la orina se le adiciona HCl el cual es posteriormente neutralizado con NaOH en una solución amortiguadora de fosfato. La fase móvil empleada es el tetrabutilamonio (0.01 mol/l) en una solución amortiguadora de fosfato y acetonitrilo en una proporción de (78:22).

#### MÉTODOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES:

El método para estimar AS y ASA en plasma por cromatografía gas-líquido propuesto por Morris H. Clarence y col., (42) involucra el uso de fluoruro de potasio y enfriamiento para minimizar la hidrólisis del ácido acético salicílico en plasma. Como agente acidificante se emplea el bisulfato de potasio al 10% y el cloroformo como agente extractor. Como estándar interno se puede emplear el propilparabeno, *n*-butilbenzoato, etilacetato. Y además es adicionado el hexametildisiloxano como agente silanizante. El detector empleado fue de ionización de flama y una columna de vidrio de empaque OV-25 al 3% (60-80 mallas) Chromosorb G. La temperatura de operación del inyector y detector es de 240°C. Como gas acarreador se emplea el helio, también puede ser empleado un detector de conductividad térmica. Siendo el método sensible y específico.

Otro método descrito por Wikely y col., (68) para cuantificar ASA emplea una columna Carbowax. La columna es operada a 125°C. El método es preciso su coeficiente de variación no es mayor de 1%, el límite de detección es de 50 ppm por lo que el método es muy sensible. La respuesta es lineal en un rango de concentración de 2 a 34 mcg/ml.

El método para cuantificar AS y ASA en plasma descrito por Seeger (54). Se adiciona NaCl y una solución amortiguadora conteniendo 17.2 mmoles de sulfato de hierro en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2N. Como solvente extractor fue empleado éter. Se evaporó el éter y fue reconstituido el residuo con bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida. Se emplea un detector de ionización de flama y una columna de vidrio con un empaque de OV-17 a; 3% (80-100 mallas) GasChrom S. Programando la columna a 2 minutos hasta 105° aumentando de 4° por minuto hasta 130° y aumentando 30° por minuto hasta 195° y luego enfriando, siendo la temperatura del inyector de 220°. El gas acarreador es el argón y se emplea como estándar interno el ácido p-tolúico. La respuesta es lineal en un rango de concentración de 5 a 100 mmoles/ml. Este método es reproducible.

El método por cromatografía gas-líquido desarrollado por Maynard y col., (36) para la determinación del éter guayacol glicérico en sangre se basa en su extracción con cloruro de metileno siendo acidificado con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, empleando el detector de captura de electrones y usando como estándar interno el mefenesín. La columna empleada es de acero inoxidable

con un empaque de XE-60 al 3% sobre tierra de diatomeas. La temperatura de operación es de 144° de la columna, el inyector de 260°. Como gas acarreador se utiliza el nitrógeno.

## 2.10 EMPLEO DEL DIMETIL SULFOXIDO COMO VEHICULO DE UN INYECTABLE.

El dimetil sulfoxido (DMSO) presenta excelentes propiedades como disolvente de fármacos insolubles en agua. E. Willson y col., (70) han reportado que el DMSO puede emplearse como vehículo en la administración IV de agentes antineoplásicos que son insolubles en agua ya que este tiene una acción de preservación de las células rojas. Además también se ha observado que el DMSO incrementa la permeabilidad capilar a través de 60-70% v.v.

Thorstein Loftsson (63), utilizó el DMSO como vehículo de la administración IV de unos profármacos de la aspirina a perros beagle. Otro estudio efectuado por Taylor y Winfield (56) se observó que el DMSO a un 15% aumenta la absorción percutánea de un unguento hidrofílico conteniendo AS

Taylor (61) realizó un estudio de la presencia de DMSO en emulsiones grasosas al 10% y filtrada la mezcla en membranas donde el DMSO actúa como antibacteriano y antifúngico. El crecimiento bacteriano fue inhibido cuando se empleó el DMSO en un 20%. Floy (18) demostró que el DMSO en una concentración de 5 al 10% era bacteriostático y a una concentración de 20 a 80% actuaba como bactericida. Se reportó que al emplear el DMSO

al 25% causa inhibición del crecimiento bacteriano en casos de leucemia y pacientes con cancer.

Por lo que esto justifica el empleo del DMSO en este estudio, ya que el ASAG es un fármaco insoluble en agua y además es aplicado a dosis pequeñas en una proporción de 0.3 ml/kg de peso y menor cuando fue administrado el salicilato de guayacol, solo a concentraciones de 1 ml/kg de peso podría causar una profunda hipotensión y eventualmente falla de transmisión neuromuscular (89).

## UNIDAD 3

### PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 PROVISION DE LOS COMPUESTOS EN ESTUDIO:

El Acetil salicilato de guayacol así como el salicilato de guayacol utilizados en este estudio fueron sintetizados por el Dr. Rafael Castillo Bocanegra, profesor de la Facultad de Química de la UNAM, quien también proporciona el guayacol (grado industrial destilado) y el ácido salicílico (Lote 183-B), los cuales utilizó como materia prima para sintetizar los compuestos anteriores. El ácido acetil salicílico fue donado por los laboratorios Scheramex y el ácido salicílico fue donado por el Departamento de Farmacología del CINVESTAV.

### 3.2 CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DEL FARMACO:

Considerando que el acetil salicilato de guayacol es un fármaco del cual existe poca información se realizaron las determinaciones de los siguientes parámetros fisicoquímicos: SOLUBILIDAD, ESTABILIDAD A DIFERENTES pHs Y A DIFERENTES TEMPERATURAS, pKa Y EL ESPECTRO DE ABSORCION AL UV.

#### 3.2.1 SOLUBILIDAD:

Las pruebas de solubilidad fueron realizadas por cosolubilidad según Yalkowsky (71).

##### 3.2.1.1 INSTRUMENTOS:

Agitador mecánico Vortex Sybrin Thermolyne.

Centrifuga marca Damon IEC HN-SII.

Potenciómetro marca: Corning Modelo-7

### 3.2.1.2 REACTIVOS:

Agua destilada deionizada.

Alcohol etílico, Q.P. (Baker)

Benzato de benzilo Q.P. (Baker).

Dimetil formamida (Reagente Puro Carlo Erba Lote # 24691).

Dimetil sulfoxido (Baker Analysed React. Lote # 141627.

Glicerina U.S.P. Lote # 80625.

Oleato de etilo Q.P. (Baker).

Propilenglicol, Q.P. (Baker Lote # 38086).

### 3.2.1.3 PROCEDIMIENTO:

En tubos de ensaye con tapón de baquelita, se colocaron 4 ml de los solventes a probar, adicionando separadamente a saturación cada uno de los compuestos a analizar. Los tubos se colocaron en baño de agua a 37°C y en la obscuridad durante 1 hora, para dejar estabilizar la solución. Se sometieron a agitación constante durante 24 horas en la obscuridad. Esta agitación se realizó a temperatura ambiente a 65 r.p.m. Se centrifugaron los tubos a 2500 r.p.m. durante 5 minutos. El sobrenadante se separó y se inyectaron 20  $\mu$ l al cromatógrafo de líquidos, bajo las condiciones descritas en la

sección 3.2.1.4. Este procedimiento se realizó por quintuplicado.

#### 3.2.1.4 METODO ANALITICO:

##### 3.2.1.4.1 INSTRUMENTOS:

Cromatógrafo de Líquidos Waters Modelo 58K  
equipado con:

-Columna  $\mu$ -Bondapak Cis P/N 27324 (3.9mm x  
30cm).

-Detector UV 254 nm ( Waters Modelo 481  
Lamda-Max).

-Sistema de bombeo de solventes Waters  
Modelo M-45.

-Controlador automatizado Waters Modelo 580.

##### 3.2.1.4.2 REACTIVOS:

Acetil salicilato de guayacol

Acido acetil salicilico

Acido salicilico Lote 183-B

Agua destilada y deionizada.

Etanol absoluto R. A. , Baker Lote # A 46453

Metanol absoluto. R. A. , Baker Lote # 39195

Metanol HPLC, Merck, Lote # 90115 (filtrado  
por filtro 1.5  $\mu$ m).

Salicilato de guayacol



### 3.2.1.4.3 PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION EN LOS DIFERENTES COSOLVENTES:

#### PREPARACION DE LA SOLUCION PATRON:

Se pesaron 25 mg del compuesto a analizar y se transfirieron a un matraz volumétrico de 25 ml. Se disolvió antes de aforar y se llevó a la marca con metanol absoluto (99.8% pureza) obteniendo una concentración de 1 mg/ml.

#### PREPARACION DE LAS CURVAS ESTANDARES:

De la solución patrón se tomaron alícuotas para preparar las curvas de concentración de 2 a 50 mcg/ml y de 100 a 1000 mcg/ml para el ASAG, de 100 a 1000 mcg/ml para el AS, SAG, ASA.

#### METODOLOGIA:

Se inyectaron 20  $\mu$ l de cada una de las diluciones preparadas en el cromatógrafo empleando una longitud de onda de 254 nm para el ASAG y 280 nm para el AS, ASA y SAG utilizando como fase móvil Metanol-Agua (60:40) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La cuantificación se realizó en base a la altura del pico registrado cuyo valor en mm se interpoló en la curva estándar respectiva.

### 3.2.2 ESTABILIDAD DEL ASAG A DIFERENTE pH:

#### 3.2.2.1 INTPUMENTOS:

El mismo señalado en la sección 3.2.1.4.1

Potenciometro: Corning Modelo-7

Baño maria.

### 3.2.2.2 REACTIVOS:

Acetil salicilato de guayacol

Acido clorhídrico, R. A., Baker, Lote # A-40451

Acido bórico, R. A., Técnica Química, Lote # 22

Agua destilada y deionizada.

Biftalato de potasio, R. A., Baker, Lote # 613112

Cloruro de potasio, R. A., Química Dinámica, Lote B 135-6

Fosfato de potasio monobásico, R. A., Baker, Lote # 538909.

Hidroxido de sodio, R. A., Baker, Lote # 38721

Metanol absoluto, R. A., Baker Lote # 38887

Metanol HPLC, Merck, Lote # 90116

### 3.2.2.3 PROCEDIMIENTO:

Se prepararon soluciones amortiguadoras para obtener los siguientes pHs:

- a) 1.2: Tomar 25 ml de KCl 0.2M, adicionar 42.5 ml de HCl 0.2M y aforar con agua a 100 ml.
- b) 3.0: Tomar 25 ml de solución de biftalato de potasio 0.2M, agregar 22.3 ml de HCl 0.2M y aforar con agua a 100 ml.
- c) 5.0: Tomar 25 ml de biftalato de potasio 0.2M, adicionar 22.5 ml de NaOH 0.2M y aforar con

agua destilada a 100 ml.

d) 7.0: Tomar 25 ml de solución de fosfato de potasio monobásico 0.2M, adicionar 20.1 ml de NaOH 0.2M y aforar con agua a 100 ml.

e) 8.0: Tomar 25 ml de una solución de Acido bórico y cloruro de potasio al 0.2M, adicionar 20.8 ml de NaOH 0.2M y aforar a 100 ml. (Sol. de Acido bórico y cloruro de potasio: Disolver 12.37 g de Ac. bórico y 14.91 g KCl en agua y diluir a 1 lt.)

f) 11.0: Tomar 25 ml de una solución de ácido bórico y cloruro de potasio al 0.2M, agregar 54 ml de NaOH 0.2M y aforar con agua a 100 ml.

Se tomó 1 ml de cada una de las soluciones, se les adicionó 10 ml de la solución patrón del ASAG a una concentración de 1000 mcg/ml y se inyectaron 20  $\mu$ l al cromatógrafo. Se colocaron los tubos a baño maría a 37°C y en la obscuridad por 1 hr y se volvieron a inyectar 20  $\mu$ l de la solución al cromatógrafo a la hora, observando la diferencia de alturas y calculando así su porcentaje de degradación.

### 3.2.3 DETERMINACION DEL pKa DEL ASAG:

#### 3.2.3.1 INSTRUMENTOS:

El mismo de la sección 3.2.1.4.1

#### 3.2.3.2 REACTIVOS:

Acetil salicilato de guayacol

Agua destilada deionizada

Metanol HPLC, Merck, Lote # 9011

Solución amortiguadora pH 1.0 (cuya preparación  
fue descrita en la sección 3.2.2.3.

Solución amortiguadora pH 5.0 (preparación  
descrita en la sección 3.2.2.3.

### 3.2.3.3 PROCEDIMIENTO:

A 1 ml de la solución amortiguadora de pH 1.2 se le adicionaron 10  $\mu$ l de la solución patrón de ASAG a una concentración de 1000 mcg/ml, ya que se espera que a este pH el ASAG se encuentre en su forma protonada y se determinó la absorbancia máxima que presenta en el detector. Para asegurar que la molécula se ionizara se adiciono el ASAG a una solución amortiguadora de biftalato a pH 5.0 y se dejó transcurrir una hora para favorecer la ionización, inyectando 20  $\mu$ l al cromatógrafo, determinándose la absorbancia máxima antes y después de transcurrida la hora.

El pKa fue determinado por la fórmula siguiente (18):

$$pKa = pH - \log (a_{obs} - a_{HA}) / (a_A - a_{obs})$$

donde:  $a_{obs}$  = absorbancia de la solución de prueba.

(muestra leída inmediatamente después de  
preparada a pH 5.0)

$\alpha_{HA}$  = absorbancia de la especie protonada.

(muestra leída inmediatamente después de preparada a pH 1.2)

$\alpha_{A^-}$  = absorbancia de la especie ionizada.

(muestra leída 1 Hr después de preparada a pH 5.0).

Esta prueba fue realizada por duplicado.

También se determinó el pKa por medio de titulación, preparando una solución de ASAG en buffer de biftalato de potasio a pH 3.0 a una concentración de 10 mcg/ml y es titulando con NaOH 0.1M y determinando el punto de inflexión, dado a que en este momento el valor del pH es igual al pKa.

### 3.3 DESARROLLO DEL METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DEL ASAG Y SUS METABOLITOS

#### 3.3.1 DETERMINACION DE LAS CONDICIONES CROMATOGRAFICAS:

##### 3.3.1.1 DETERMINACION DEL ESPECTRO DE ABSORCION DEL ASAG Y SUS METABOLITOS.

###### 3.3.1.1.1 INSTRUMENTOS:

Espectrofotómetro Beckman Modelo DU-50

###### 3.3.1.1.2 REACTIVOS:

Acetil salicilato de guayacol.

Acido acetil salicilico, Scheramex, S.A. Lote # 71828.

Acido salicilico, Lote 183-B

Butilparabeno, Syntex Lab.

Guayacol, grado industrial destilado.

Metanol absoluto, R. A., Baker, Lote # 38567.

Metilparabeno, Armstrong Lab. Lote # 5830.

Propilparabeno, Armstrong Lab. Lote # 2387.

Salicilato de guayacol.

### 3.3.1.1.3 PROCEDIMIENTO:

Se preparon soluciones de ASAG, SAG, ASA, AS, y G en metanol aproximadamente a una concentración de 10 mcg/ml, y se obtuvieron los espectros de absorción en el rango de 200 a 400 nm para cada uno.

### 3.3.1.2 DETERMINACION DE LA EFICIENCIA DE LA COLUMNA:

Una vez obtenidos los parámetros fisicoquímicos se prosiguió a optimizar el método de para la cuantificación tanto del ASAG, así como del SAG, AS, G y ASA.

La eficiencia de la columna se determinó de la forma siguiente:

#### a) METODO DE LA TANGENTE (32):

$$N = 16 (W/EXP 2)/(CW/EXP 2)$$

donde: N= número total de platos.

V= volumen de elución (ml)

W= ancho del pico (ml) entre los puntos de intersección.

## b) METODO DE SIGMA:

$$N = 25 [V_i/W_i] \text{EXP } 2$$

Ademas se determinó la capacidad de retención que presentan los picos de respuesta.

## 3.3.1.3 ELECCION DE LA FASE MOVIL:

Se realizaron varias modificaciones de las fases moviles con el fin de obtener una buena resolución y un buen tiempo de retención tanto para el ASAG como para sus metabolitos.

## 3.3.1.3.1 INSTRUMENTACION:

El mismo de la sección 3.3.1.1.1.

## 3.3.1.3.2 REACTIVOS:

El mismo de la sección 3.2.1.4.2

Acido acético glacial, Lettz, S.A. Lote #  
3000883.

## 3.3.1.3.3 PROCEDIMIENTO:

Se pesaron 25 mg de ASAG, SAG, AS, ASA y G, se adicionó etanol hasta el aforo de 25 ml (concentración de 1000 mcg/ml). Se preparó una dilución de 10 mcg/ml y se inyectaron 20  $\mu$ l de esta solución al cromatógrafo utilizando las siguientes fases móviles a una velocidad de flujo de 1 ml/min:

## FASES MÓVILES A PROBAR

METANOL	AGUA	AC. ACETICO GLACIAL
60.0	40.0	-
55.0	44.0	1.0
60.0	39.0	1.0
60.0	39.5	0.5
50.0	49.5	0.5
40.0	59.5	0.5
70.0	29.9	0.1
60.0	39.9	0.1
50.0	49.9	0.1

-Para determinar la SOLUBILIDAD de ASAG y sus metabolitos en estas fases móviles se adiciono a cada mezcla unos mg de cada muestra en viales y observando visualmente si no presentaba precipitación.

Una vez seleccionada la fase móvil se determinó la ESTABILIDAD del ASAG y sus metabolitos, a una concentración de 10 mcg/ml.

## 3.3.1.4 SELECCION DEL ESTANDAR INTERNO:

Los estándares probados fueron: metilparabeno, butilparabeno, propilparabeno.

## 3.3.1.4.1 INSTRUMENTOS:

Los señalados en la sección 3.3.1.1.1



## 3.3.1.4.2 REACTIVOS:

Acido acético glacial, Leitz, S.A. Lote #  
3000889

Agua destilada y deionizada.

Butilparabeno, Syntex Lab.

Metanol HPLC, Merck, Lote # 90116

Metilparabeno, Armstrong Lab. Lote # 5830

Propilparabeno, Armstrong Lab. Lote # 2387

## 3.3.1.4.3 PROCEDIMIENTO:

Se pesaron 25 mg de metilparabeno, propilparabeno y butilparabeno aforando cada uno de estos a 25 ml con metanol. Se tomó una alícuota de 1 ml y se aforó a 100 ml con agua destilada empleando unas gotas de metanol para evitar la precipitación del compuesto. Se inyectaron 20 µl de las soluciones en las fases móviles seleccionadas que fueron: Metanol-agua-acido acético glacial (30:69:1) y de (55:44:1), realizandolo por duplicado.

## 3.3.2. OPTIMIZACION DEL SISTEMA ANALITICO

3.3.2.1 DETERMINACION DE LA LINEARIDAD Y  
REPRODUCIBILIDAD DEL SISTEMA PARA EL ASAG EN AGUA:

## 3.3.2.1.1 INSTRUMENTACION:

La misma empleada en la sección 3.3.1.1.1

**3.3.2.1.2 REACTIVOS:**

Acetil salicilato de guayacol

Acido acetico glacial, Leitz, S.A., Lote  
#3000893

Agua destilada y deionizada

Butilparabeno, Syntex Lab.

Metanol absoluto, R.A., Baker, Lote # 38887

Metanol HPLC, Merck, Lote # 90116

**3.3.2.1.3 PROCEDIMIENTO:**

Se preparó una solución patrón de ASAG a una concentración de 1000 mcg/ml pesando 25 mg y aforando con metanol a 25 ml. Se tomaron alícuotas de esta solución para obtener concentraciones de 1, 2, 5, 10 y 20 mcg/ml, adicionando a cada dilución 5 mcg/ml de butilparabeno como estándar interno. De cada dilución se inyectaron 20  $\mu$ l al cromatógrafo, empleando como fase móvil metanol-agua-ácido acético glacial (55:44:1) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Se determinó la relación de alturas del pico de respuesta del ASAG entre la del pico del estándar interno para cada concentración, calculando la pendiente, intercepto y coeficiente de correlación. Así mismo se prepararon tres curvas patrón durante 3 días diferentes calculando su coeficiente de variación para determinar si el sistema era repetible.

3.3.2.2 DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA  
DETECTABLE EN EL SISTEMA PARA EL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL,  
SALICILATO DE GUAYACOL, ACIDO ACETIL SALICILICO, ACIDO  
SALICILICO, GUAYACOL Y ACIDO SALICILURICO.

3.3.2.2.1 INSTRUMENTACION:

El mismo de la sección 3.3.1.1.1

3.3.2.2.2 REACTIVOS:

Los mismos empleados en la sección 3.3.1.3.2  
con excepción de los parabenos.

3.3.2.2.3 PROCEDIMIENTO:

Se prepararon diluciones de 0.1, 0.2, 0.5,  
0.8 y 1 mcg/ml de ASAG, SAG, ASA, AS, G, Acido salicilúrico en  
metanol inyectando 20 µl de cada dilución al cromatógrafo  
empleando las siguientes fases móviles:

\*Metanol-agua-ac. acético (55:44:1) para el ASAG y SAG

\*Metanol-agua-ac. acético (30:69:1) para el ASA, G, AS,  
y ASu.

A una velocidad de flujo de 1.5 ml/min.

3.4 DETERMINACION DEL ASAG EN PLASMA

3.4.1 INFLUENCIA DEL SOLVENTE EXTRACTOR Y DEL NUMERO DE  
EXTRACCIONES PARA EL ASAG

3.4.1.1 INSTRUMENTOS:

El mencionado en la sección 3.3.1.1.1

### 3.4.1.2 REACTIVOS:

Acetil salicilato de guayacol  
Acetato de etilo, R.A., Baker, Lote # 336906  
Acetonitrilo, R.A., Merck, Lote # I 893317  
Alcohol isoamilico, R.A., Baker, Lote # 050381  
Bisulfato de potasio, R.A., Baker, Lote M-33653  
Butilparabeno, Syntex Lab.  
Cloroformo R.A., Baker Lote # 38803  
Diclorometano (Q.P. Merck) Lote # 2342845  
Eter etilico (Q.P. Baker) Lote # 417903

### 3.4.1.3 PROCEDIMIENTO:

Se preparó una solución de ASAG a una concentración de 10 mcg/ml. En 24 tubos de ensaye se colocó 1 ml de esta solución, se les adicionaron 0.5 ml de una solución de butilparabeno (estándar interno) a una concentración de 10 mcg/ml. Se añadió 1 ml de bisulfato de potasio al 10% frío para obtener un pH aproximadamente de 1.0. Se dejó reposar por 30 minutos y se adicionaron 8 ml del solvente extractor para lo cual se probaron cloroformo, acetato de etilo, acetonitrilo, éter-diclorometano (70:30). Se agitaron por 1 minuto en un Vortex y se centrifugaron por 10 a 15 minutos a 2500 r.p.m.

La fase organica se separó (1° EXTRACCION) y a la fase acuosa se le adicionaron 8 ml del respectivo solvente extractor (2° EXTRACCION). Se repitió el procedimiento y a la

fase acuosa se le adicionaron nuevamente 8 ml del solvente extractor (3<sup>o</sup> EXTRACCION).

Los extractos orgánicos se reunieron, se le adicionaron dos gotas de alcohol isoamílico, se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 37°C. Se reconstituyó con 0.5 ml de la fase móvil metanol-agua-ácido acético (55:44:1) inyectándose 20 µl al cromatógrafo de líquidos. Cada prueba fue realizada por duplicado.

#### 3.4.2 METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR EL ASAG EN PLASMA

##### 3.4.2.1. INSTRUMENTOS:

El mencionado en la sección 3.3.1.1.1

##### 3.4.2.2. REACTIVOS:

Los mismo señalados en la sección 3.4.1.2 con excepción del acetato de etilo, acetonitrilo y cloroformo.

##### 3.4.2.3. PROCEDIMIENTO:

En un tubo de ensaye con tapón de rosca, se colocaron 0.5 ml de plasma, se adicionó 0.5 ml de una solución de butilparabeno a una concentración de 10 mcg/ml (estándar interno); se acidificó con 1 ml de bisulfato de potasio al 10% en frío para obtener un pH 1.0, (es necesario adicionarlo en frío para evitar la hidrólisis) (42). Se agitaron en vortex por un tiempo aproximado de 20 segundos y se adicionaron 8 ml de una mezcla de eter diclorometano (70:30) como solvente extractor, se agitó 1 minuto en Vortex y se centrifugó por 15

minutos a 2500 r.p.m. La fase orgánica se separó y a la fase acuosa se le adicionaron 8 ml del solvente extractor, se agitó un minuto en el vortex y se centrifugó por 20 minutos a 2500 r.p.m. Se recolectan todos los extractos de la fase orgánica y se adicionaron 2 gotas de alcohol isoamílico. Se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 37°C como temperatura máxima. Se reconstituyó con 0.5 ml de la fase móvil metanol-agua-ácido acético (65:44:1). Se inyectaron 20 µl al cromatógrafo empleando una velocidad de flujo de la fase móvil de 1.5 ml/min y la longitud de onda del detector a 280 nm.

En la figura 7 se presenta el diagrama final del Método de extracción utilizado.

### 3.4.3 ESTABILIDAD DEL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN.

#### 3.4.3.1 INSTRUMENTACION:

El mencionado en la sección 3.3.1.1.1

#### 3.4.3.2 REACTIVOS:

Los mencionados en la sección 3.4.1.2

#### 3.4.3.3 PROCEDIMIENTO:

Se preparó una solución de 10 mcg/ml de ASAG, se tomó 1 ml de esta solución y se extrajo de acuerdo al método descrito en la sección 3.4.2.3.

Las muestras se colocaron a diferentes temperaturas y se analizaron de la manera siguiente:

T	TEMPERATURA		
I	22°C	4°C	-20°C
E	1 Hr	12 Hr	12 Hr
M	3 Hr	24 Hr	24 Hr
P	8 Hr	48 Hr	48 Hr
O			

El porcentaje de degradación se calculó determinando la variación de relación de alturas de la respuesta ASAG/Estándar interno. Esta prueba fue realizada por duplicado.

### 3.5 DETERMINACION DE LOS METABOLITOS DEL ASAG EN PLASMA

Como los metabolitos también fueron administrados por separado, se estudiaron los procesos de extracción para cada uno de ellos a fin de obtener un método optimizado y estudiar así su farmacocinética.

#### 3.5.1 INSTRUMENTACION:

El descrito en la sección 3.3.1.1.1

#### 3.5.2 REACTIVOS:

Los mencionados en la sección 3.4.1.2 con excepción del acetato de etilo y el acetonitrilo.

Acido acetyl salicílico, Scheramex, S. A. Lote # 71828

Acido salicílico, Lote 183-B.

Guayacol, grado industrial destilado.

Salicilato de guayacol.

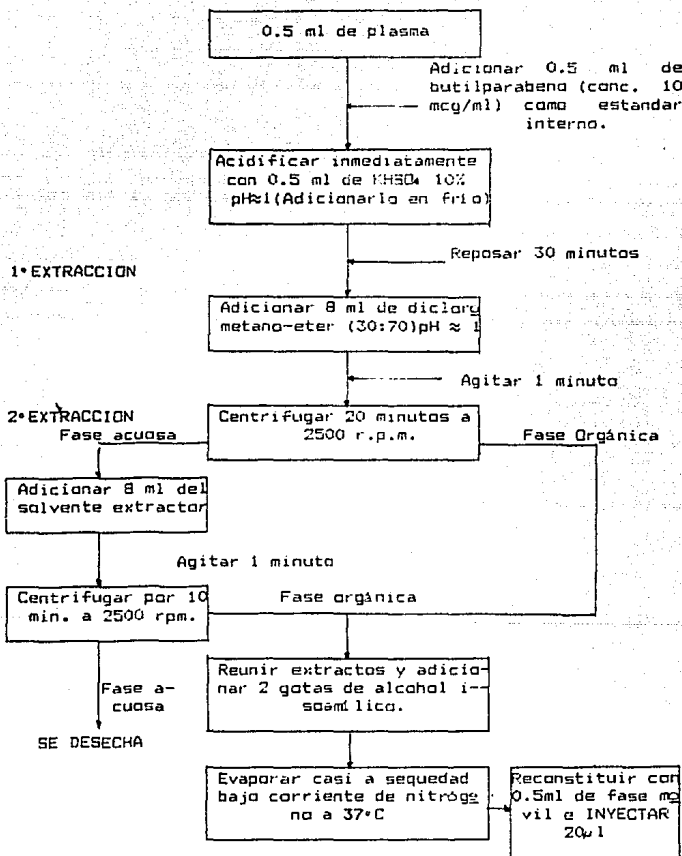


FIGURA 7. METODO DE EXTRACCION DE ASAG Y SAG EN PLASMA



### 3.5.3 PROCEDIMIENTO:

#### 3.5.3.1 METODOLOGIA PARA LA EXTRACCION DEL SAG:

El procedimiento empleado fue el mismo que el aplicado para el ASAG.

#### 3.5.3.2 METODOLOGIA PARA LA EXTRACCION DEL G, ASA Y AS:

La metodología utilizada para el G, ASA y AS presenta solo algunas variaciones en relación a la cuantificación del ASAG como el emplear el metilparabeno como estándar interno, a la misma concentración, y empleando como solvente el cloroformo. Además solo requiere de una etapa de extracción.

Como fase móvil se empleó la mezcla de metanol-agua-ácido acético (30:69:1) a una velocidad de flujo de 1.5 ml/min.

### 3.6 VALIDACION DE LOS METODOS ANALITICOS PARA LA CUANTIFICACION DEL ASAG Y SUS METABOLITOS EN PLASMA.

#### 3.6.1 LINEARIDAD:

La linealidad del sistema se llevó a cabo preparando 3 curvas de calibración de cada uno de los compuestos a analizar: ASAG, SAG, ASA, AS y G en el rango de concentración de 2 a 80 mcg/ml y para la linealidad del metodo

se prepararon cinco curvas de calibración en el rango de concentración de 1 a 20 mcg/ml, determinando la media (X), desviación estándar (DE), desviación estándar relativa (DER) ó coeficiente de variación (%CV), coeficiente de correlación (r), pendiente (m), intercepto (b).

### 3.6.2 PRECISION:

Para determinar la precisión del sistema se efectuaron 6 inyecciones de 20  $\mu$ l de cada uno de los compuestos a una concentración de 10 mcg/ml. Analizando su media, desviación estándar y su desviación estándar relativa.

También se determinó la precisión del método analítico preparando 5 curvas de estándar en el rango de concentración de 1 a 20 mcg/ml para cada uno de los compuestos.

### 3.6.3 TOLERANCIA DEL SISTEMA CROMATOGRAFICO:

Para determinar la tolerancia del sistema se varió la proporción de los solventes de la siguiente manera:

-Para el ASAG y SAG donde su fase móvil óptima es de Metanol-agua-ácido acético (55:44:1) se realizó una variación de  $\pm$  10% del contenido de metanol, ó sea que las fases móviles a probar fueron 53:46:1 y de 57:42:1.

-Dado que para el G, ASA y AS, la fase móvil más adecuada fué la de metanol-agua-ácido acético (30:69:1) se varió también el contenido de metanol en un 10% utilizando las de metanol-agua-ácido acético (30:69:1), realizando también una

variación del  $\pm 10\%$  utilizando las fases móviles de 27:69:1 y 33:69:1.

Para cada prueba se inyectaron 20  $\mu$ l de una solución conteniendo 10 mcg/ml determinando el factor de resolución.

#### 3.6.4 REPETIBILIDAD

Esta prueba fue determinada realizando 3 curvas patrón en el rango de concentración de 1 a 20 mcg/ml en dos días diferentes, determinando su media, desviación estandar y la desviación estandar relativa.

#### 3.6.5 EXACTITUD:

Este parametro fue valuado mediante 9 inyecciones de muestras extraidas conteniendo 10 mcg/ml y determinando su % de recuperación.

#### 3.6.6 SELECTIVIDAD O ESPECIFICIDAD:

Para determinar este parámetro se prepararon soluciones de fármaco y metabolitos en plasma, una solución de fármaco y estandar interno en plasma y una solución de plasma libre de fármaco, analizando por comparación la limpieza de las muestras. El ASAG y SAG se inyectaron utilizando como fase móvil metanol-agua-ácido acético (55:44:1), el AS, ASA y G en la fase móvil metanol-agua-ácido acético (30:69:1).

### 3.6.7 LIMITE MINIMO CUANTIFICABLE:

Se prepararon diluciones de 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1 y 2 mcg/ml utilizando el metodo analitico descrito en las secciones 3.4.2 y 3.5.3.2.

## 3.7 METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR EL ASAG EN LA ORINA

### 3.7.1 INSTRUMENTACION:

El descrito en la seccion 3.3.1.1.1

### 3.7.2 REACTIVOS:

Los mencionados en la seccion 3.4.1.2 con excepcion del acetato de etilo y el acetonitrilo.

### 3.7.3 PROCEDIMIENTO:

Se efectua el mismo procedimiento empleado para la extraccion de ASAG en plasma (figura 7). Para esta muestras el tiempo de centrifugacion puede ser recortado en ambas etapas de extraccion a un tiempo de 8 a 10 minutos.

## 3.8 METODOS ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE LOS METABOLITOS DEL ASAG EN ORINA.

Para poder optimizar el metodo de extraccion se realizaron las siguientes modificaciones:

- 1) Diferentes proporciones de  $H_2SO_4$  0.1N para obtener diferentes pHs.

- 2) Acido tictloroacetico al 20%.
- 3) Diferentes proporciones de HCl 0.6M.
- 4) Bisulfato de potasio al 10%.

Los agentes extractores a probar fueron: éter, cloroformo, acetato de etilo, éter-diclorometano (70:30).

Se prepararon soluciones estándar de ASAG a una orina a una concentración de 10 mcg/ml y se determinó su porcentaje de extracción. De los mejores valores obtenidos se prepararon curvas patrón a concentración de 4, 12 y 18 mcg/ml y se determinó su porcentaje de extracción, coeficiente de correlación, pendiente y el intercepto.

#### 3.8.1 INSTRUMENTACION:

El descrito en la sección 3.3.1.1.1

#### 3.8.2 REACTIVOS:

Los mencionados en la sección 3.5.2

#### 3.8.3 PROCEDIMIENTO:

##### 3.8.3.1 METODOLOGIA PARA LA EXTRACCION DE SAG:

Se empleó el mismo procedimiento que para la extracción de ASAG descrito en la sección 3.7.3.

##### 3.8.3.2 METODOLOGIA PARA LA EXTRACCION DE G, ASA Y AS:

Se sigue la misma metodología descrita en la sección 3.5.2 empleando 1 ml de orina para el análisis y disminuyendo el tiempo de centrifugación de 8 a 10 minutos. Es

necesario tener cuidado al efectuar la evaporación ya que estos compuestos se subliman fácilmente con la temperatura..

### 3.9 VALIDACION DE LOS METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DEL ASAG Y SUS METABOLITOS EN ORINA.

Se evaluaron los parametros de linealidad, precisión, repetibilidad, exactitud, especificidad y el limite de detección siguiendo los mismos lineamientos utilizados en plasma.

### 3.10 VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA LA DETERMINACION DEL ACIDO SALICILURICO EN ORINA.

Al realizar el analisis de orina en el estudio preliminar se observó un pico de respuesta muy notable que se identificó como ácido salicilurico, por lo que se validó el método para su cuantificación en un rango de concentración de 6.6 a 50 mcg/ml.

### 3.11 ESTABILIDAD DEL ASAG Y SUS METABOLITOS A DIFERENTES TIEMPOS Y TEMPERATURAS EN PLASMA Y ORINA.

#### 3.11.1 INSTRUMENTACION:

El descrito en la sección 3.3.1.1.1

#### 3.11.2 REACTIVOS:

Los mencionados en la sección 3.5.2

### 3.11.3 PROCEDIMIENTO:

Se prepararon soluciones patrón de ASAG, ASA, G, SAG y AS en plasma a una concentración de 10 mcg/ml.

Las muestras de plasma fueron colocadas a diferentes temperaturas: 22°C, 4°C y -20°C, se inyectaron 20 µl al cromatógrafo a los siguientes tiempos: 0, 0.5, 3, 6, 10, 24 Hr en el caso de los tubos que se encontraban a 4°C y -20°C y de 0, 0.5, 1, 3 y 6 hrs para las muestras a 22°C.

Las muestras de orina fueron analizadas a los siguientes tiempos: 0, 3, 6 y 25 Hrs para aquellas que se encontraban a 2°C y -20°C y de 0, 3, 6, 25 y 49 hrs para las para las muestras a 24°C.

El método analítico utilizado fue el descrito en las secciones 3.4.2 y 3.5 para muestras plasmáticas y en las secciones 3.7 y 3.8 para muestras urinarias.

El porcentaje de degradación se calculó mediante la variación en la relación de alturas del compuesto/estándar interno.

### 3.12 CARACTERISTICAS DE DISTRIBUCION. DETERMINACION DE UNION A PROTEINAS.

#### 3.12.1 INSTRUMENTACION:

Equipo de diálisis con celdas.

Membrana Spectropor \* 2 falthets (Corte de P.M.MWCO 12000-14000).

Y lo especificado en la seccion 3.3.1.1.1

### 3.12.2 REACTIVOS:

Los mencionados en la sección 3.5.2

Solución amortiguadora de fosfato a pH 7.4:

-En un matraz volumétrico de 200 ml se colocaron 50 ml de fosfato monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 2M (disolviendo 2.722 g de fosfato en agua y diluir a 100 ml) y se adicionó 39.1 ml de NaOH 0.2M (0.8g de NaOH en 100 ml de agua destilada), y es aforado con agua destilada.

### 3.12.3 PROCEDIMIENTO:

Las membranas se colocaron entre las celdas de teflón y la celda se llenó por el orificio con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. La otra media celda fue llenada con 1 ml de plasma conteniendo ASAG a una concentración de 1, 2, 4, 6, 8 y 10 mcg/ml.

Se dejó dializar a 37°C durante 4 hr con una agitación de 65 r.p.m.

Una vez transcurrido este tiempo, se analizó el tanto el plasma como la solución amortiguadora de cada celda por HPLC de acuerdo al método descrito en la sección 3.4.2.

Tomando en cuenta la degradación del acetyl salicilato de guayacol se analizaron también los metabolitos utilizando el método descrito en la sección 3.5.



### 3.13 ESTUDIO PRELIMINAR EN PERRO.

El estudio se realizó en un perro criollo de 10 kg de 3 años de edad, prestado por el Dr. Joaquín Cravioto del INCYTAS-DIF, al cual se le suministró una dosis IV de 8.95 mg/kg de ASAG. El vehículo empleado para ser administrado fue el DMSO, muy usado para la administración intravenosa de fármacos insolubles en agua (14,15).

El perro permaneció en ayuno durante 12 Hrs antes del estudio y hasta 24 Hrs. después de la administración, únicamente se le proporcionó agua. La orina fue recolectada sobre las charolas integradas a la jaula.

Se tomaron muestras sanguíneas de 5 ml a los tiempos de 0, 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 9 Hrs. Las muestras fueron analizadas inmediatamente después de ser recolectadas.

### 3.14 ESTUDIO FINAL EN FASE PRECLINICA.

El estudio se realizó en 5 perros beagle de 5 años de edad en buen estado de salud y con un peso corporal promedio de 12.5 Kg, los cuales fueron amablemente prestados por el Dr. Cravioto del INCYTAS-DIF.

Las administraciones se efectuaron de acuerdo a los lineamientos descritos en el Apéndice A.

A todos los perros se les colocó un catéter en la vena antecubital y se inyectaron 5 ml del fármaco y sus metabolitos de acuerdo a la dosificación descrita en el apéndice B por la otra pata delantera. Se tomaron las muestras sanguíneas a las 0, 0.08, 0.16, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5, 7 y 9 Hrs. Para la administración oral se utilizó una cápsula de gelatina sin adición de ningún excipiente. Los perros se dejaron en ayunas durante 12 Hrs. antes del estudio y hasta 24 o 48 Hrs después del estudio para la recolección de la orina.

Las formulaciones fueron preparadas en un área de asepsia, en algunas ocasiones con campana de flujo laminar.

El material utilizado en la preparación del inyectable como viales, membranas filtros millipore fueron esterilizados en autoclave a 15 lb por 20 minutos, y el matraz volumétrico de aforo, taradores, espátula y pipetas pasteur fueron enjuagadas con alcohol etílico y colocadas en una estufa a 100°C durante 4 Hrs. La metodología seguida para obtener cada formulación se describe en la tabla II:

TABLA II.- PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE ASAG Y SUS METABOLITOS PARA SER ADMINISTRADOS POR VIA INTRAVENOSA.

ASAG	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Pesar 375.8 mg de ASAG.</li> <li>2.- Transferir a un matraz volumétrico de 10 ml y aforar con DMSO.</li> <li>3.- Esterilizar mediante filtración a través de una membrana millipore de 0.45µm especial para soluciones orgánicas.</li> </ol>
SAG	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Pesar 237.46 mg de SAG.</li> <li>2.- Adicionar 0.5 ml de DMSO y 0.5 ml de alcohol etílico aforar con propilenglicol a un volumen de 10 ml.</li> <li>3.- Esterilizar filtrando por una membrana millipore de 0.45 µm.</li> </ol>
ASA	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Pesar 175.24 mg de ASA.</li> <li>2.- Disolver previamente en 1 ml de alcohol etílico.</li> <li>3.- Aforar a 10ml con propilenglicol.</li> <li>4.- Esterilizar filtrando por una membrana de 0.45µm.</li> </ol>
AS	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Pesar 145.28 mg de AS.</li> <li>2.- Disolver previamente en glicerina y aforar a 10 ml.</li> <li>3.- Esterilizar por filtración empleando una membrana millipore de 0.45 µm.</li> </ol>
G	<ol style="list-style-type: none"> <li>1.- Pesar 138.04 mg de G.</li> <li>2.- Aforar a 10 ml con agua destilada, deionizada y libre de pirógenos.</li> <li>3.- Filtrar para esterilizar en una membrana millipore de 0.2 µm para soluciones acuosas.</li> </ol>

NOTA: De todas las formulaciones se inyectaron 5ml con excepción del ASAG lo cual se inyectó un volumen de 2.5 ml.  
El pH para los inyectables fué de 6 a 6.5

3.14.1 DOSIS A ADMINISTRAR DEL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL Y SUS METABOLITOS.

En base a una dosis única de 500 mg en el humano se calculó la dosis equivalente para el perro en base a su peso

corporal (40), descrito en la tabla III:.

TABLA III.- DOSIS EQUIMOLECULARES A ADMINISTRAR EN EL HOMBRE Y EN EL PERRO CONSIDERANDO EL PESO CORPORAL Y UNA DOSIS DE 500 mg DE ASAG PARA UN SUJETO 70 Kg.

ESPECIE	PESO (Kg)	ASAG (mg)	ASA (mg)	AS (mg)	G (mg)	SAG (mg)
Hombre	70	500	315	241	217	425.6
Perro	8	57.1	36	275	24.8	46.8

La dosificación también se puede determinar asumiendo que el metabolismo regula la farmacocinética de estos compuestos. La ecuación alométrica que relaciona el consumo de oxígeno en cortes de hígado en ml/min es  $y = 3.3 * W * \text{Exp } 0.49$ ; la ecuación alométrica que relaciona la filtración glomerular de inulina en ml/Hr es  $y = 1.74 * W * \text{Exp } 0.77$  (Donde W= peso de la especie). Por lo que las dosis equimoleculares ajustadas bajo estas relaciones se describen en el apéndice B.

La dosis calculada como metabolismo basal o como depuración de inulina son idénticas.

Es importante indicar que estas relaciones de metabolismo basal y depuración de inulina justifican la dosis seleccionada ya que el ASA es un metabolito producido del ASAG y este se hidroliza a AS siendo su principal vía de eliminación la

renal, por lo que se consideran adecuadas estas relaciones seleccionadas.

La dosis calculadas para el ASAG y sus metabolitos de acuerdo a estas relaciones se describen en la tabla IV:

TABLA IV.- DOSIS Y CONCENTRACIONES NECESARIAS PARA EL ASAG Y SUS METABOLITOS EN LAS FORMULACIONES INTRAVENOSAS ADMINISTRADAS EN PERROS.

COMPUESTO	VOLUMEN (ml)	DOSIS (mg)	CONCENTRACION (mg/ml)
AS	5	45.4	9.8
NaAS	5	53.0	10.6
G	5	40.9	8.2
ASA	5	59.4	11.9
SAG	5	80.5	10.1
ASAG	5	94.1	18.8

## UNIDAD 4

## RESULTADOS Y DISCUSION

#### 4.1 CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DEL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL (ASAG) Y SUS METABOLITOS

##### 4.1.1 SOLUBILIDAD:

Dado a que el ASAG es un fármaco insoluble en agua, se realizaron pruebas de cosolvenencia de acuerdo al método de Yalwosky (71), en el cual la polaridad del disolvente es el concepto más importante. Como el equipo utilizado para determinar la solubilidad en los diferentes cosolventes fué adaptado para dicho fin, este se validó realizando dos pruebas de solubilidad en metanol en días diferentes y 5 muestras en cada día. Así mismo se determinó la precisión del método, determinando el coeficiente de variación entre las muestras, encontrándose que el método fué preciso y repetible. También se corroboró el funcionamiento del equipo utilizando el AS cuya solubilidad en metanol reportada es de 291.6  $\mu\text{g/ml}$  (48) y al realizar la prueba, el valor encontrado fué de 273.75  $\mu\text{g/ml}$  por lo que se puede decir que el método es exacto.

En las figuras 8 y 9 se presentan las curvas patrón utilizadas para cuantificar el ASAG en los diferentes cosolventes, una de ellas a concentraciones bajas (2-50  $\mu\text{g/ml}$ ) y la otra a concentraciones altas de (100 a 1000  $\mu\text{g/ml}$ ) debido a las diferencias de solubilidad en los diferentes cosolventes.

En la tabla V se presentan los resultados de solubilidad obtenidos en los diferentes disolventes, en la que se puede observar que:

Existen grandes diferencias de solubilidad en los

diferentes cosolventes; siendo el DMSO el vehiculo más apropiado para la administración intravenosa del ASAG ya que este disolvente alcanza una solubilidad de 53.1 mg/ml. Dado a que el inyectable contenía 37.6 mg/ml de ASAG, el volumen de inyección fué de 2.5 ml. Otra posibilidad para la preparación del inyectable hubiera sido utilizar el DMSO a una concentración de 84% en agua (lo cual se muestra en el diagrama binario representado en la figura 10), sin embargo el volumen a inyectar sería de 5 ml. Otro de los vehiculos que se podría emplear sería una mezcla de DMSO-alcohol etílico en una proporción (1:1), sin embargo al realizarse algunas pruebas in vitro se presentó hemólisis de las muestras, por lo que se decidió emplear el dimetilsulfóxido. Así mismo existen en el mercado fármacos para uso veterinario disueltos en DMSO para su administración por vía intravenosa.



TABLA V.- DETERMINACION DEL VEHICULO MAS ADECUADO PARA LA  
ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE ASAG

SOLVENTE	SOLUBILIDAD (mg/ml)
Agua destilada	0.077
Glicerina U.S.P Lote 80825	0.283
Propilenglicol Q.P. Baker Lote # 38088	4.550
Dimetil sulfoxido R.A., Baker Lote # 141877	53.100
Etanol absoluto. R.A., Baker Lote # A 45453	1.740
Propilenglicol-etanol (1:1)	4.254
Polietilenglicol 400	2.223
Dimetil sulfoxido-Alcohol etilico (1:3)	5.720
Dimetil sulfoxido-Alcohol etilico (1:1)	18.850
Oleato de etilo	0.069
Benzoato de benzilo	6.840
Dimetil formamida (Q.P. Carlo Erba Lote # 850628-24681)	17.848
Dimetil formamida-Etanol (1:1)	7.007

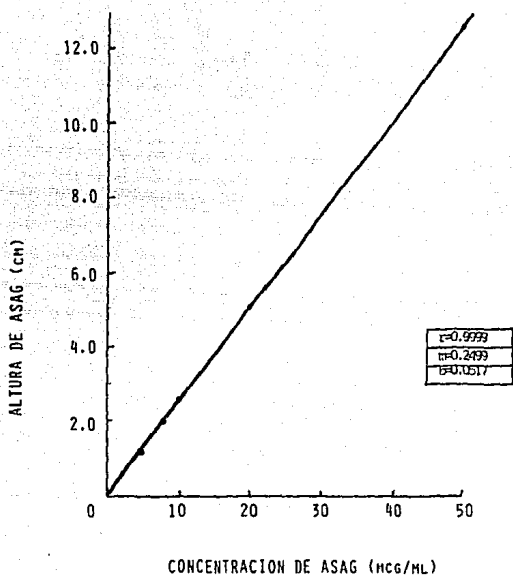


FIGURA 8.- CURVA ESTANDAR DE ASAG EN METANOL PARA CUANTIFICAR LA SOLUBILIDAD DE DIFERENTES VEHICULOS.

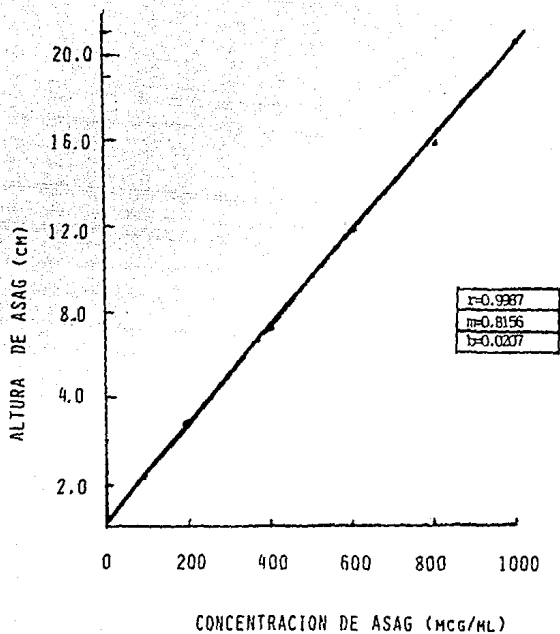


FIGURA 9.- CURVA ESTANDAR DE ASAG EN METANOL PARA  
CUANTIFICAR LA SOLUBILIDAD DE DIFERENTES VEHI  
CULOS.

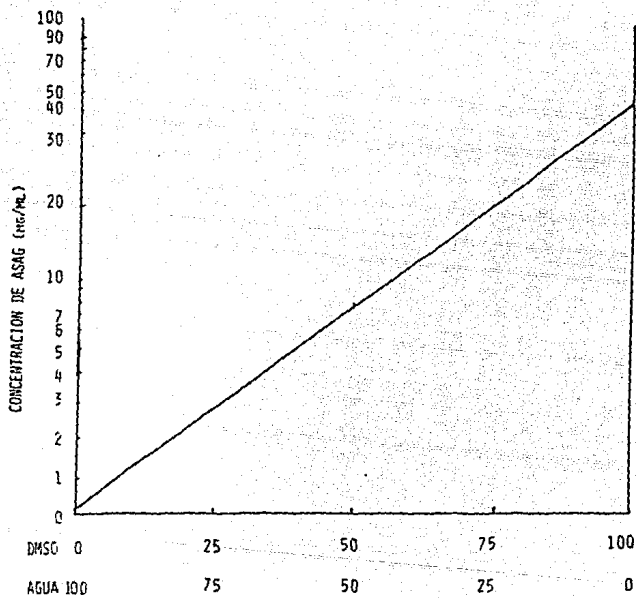


FIGURA 10.- SOLUBILIDAD DEL ASAG EN DIMETILSULFOXIDO  
(DIAGRAMA BINARIO)

0.4 g ASAG en 100 ml de solución de DMSO en Agua.

En la tabla VI se presentan los valores de solubilidad obtenidos para los metabolitos del ASAG; en base a los cuales se eligió como vehículo para los inyectables: el propilenglicol para el ASA y SAG (disolviendo previamente el ASA en 1 ml de etanol y el SAG en 3 ml de DMSO, afirmando con propilenglicol a 10 ml). Para el guayacol se eligió como vehículo el agua, y para el AS se empleó la glicerina.

TABLA VI.- CARACTERIZACION FISICOQUIMICA DE LOS METABOLITOS PROPUESTOS.

COMPUESTO	FORMULA CONDENSADA	PM g/mol	CARACTERISTICAS	SOLUBILIDAD mg/ml
SAG	$C_{14}H_{12}O_4$	244.6	Polvo blanco opaco. Ligero sabor y olor a guayacol	Agua 0.04 Glicerina 0.64 Propilenglicol 2.99 DMSO 80.16
ASA	$C_9H_8O_4$	180.2	Polvo blanco opaco. de forma irregular. Inodoro	Agua 3.33 Etanol 200.00 Glicerina 3.24 Propilenglicol 13.07 DMSO 29.64
G	$C_7H_8O_2$	124.1	Líquido rosa. Un poco viscoso. Olor característico	Agua 15.40 Glicerina 1000.00 Etanol 1000.00
AS	$C_7H_8O_3$	138.1	Polvo blanco cristalino. Sin olor. Cristales en forma de aguja.	Agua 2.17 Etanol 370.40 Glicerina 18.70

## 4.1.2 ESTABILIDAD DEL ASAG A DIFERENTES pHs

Dado a que existe poca información acerca de las propiedades fisicoquímicas del ASAG, fué necesario realizar pruebas de estabilidad a diferentes pH, cuyos resultados se presentan en la tabla VII, en la que se puede observar que el acetil salicilato de guayacol es muy estable en el rango de pH de 1.2 a 3.0, lo cual se corroboró analizando muestras a las 2, 3, 4 y 4.5 Hrs. Estos tiempos se seleccionaron tomando en cuenta el tiempo del análisis, no debiendo ser mayor de 1 Hr.

TABLA VII.- ESTABILIDAD DEL ASAG EN SOLUCIONES AMORTIGUADORES A PHs DIFERENTES.

pH	TIEMPO (Hr)	% DEGRADACION	PRODUCTOS DE DEGRADACION
1.2	1.0	0.00	--
1.2	4.0	0.00	--
3.0	1.0	0.00	--
4.0	1.0	11.50	SAG
7.0	1.0	6.23	SAG
9.0	1.0	30.20	SAG, AS, G
11.0	1.0	92.70	SAG, AS, G

#### 4.1.3 DETERMINACION DEL pKa DEL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL.

El pKa del ASAG fué determinado utilizando la ecuación descrita en la sección 3.2.3.3 encontrándose un valor de 4.5.

El pKa calculado por titulación, determinando el pH en el punto de inflexión fué de 5.0

#### 4.2 DESARROLLO DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR EL ASAG Y SUS METABOLITO EN SOLUCION

##### 4.2.1 DETERMINACION DE LAS CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.

##### 4.2.1.1 DETERMINACION DEL ESPECTRO DE ABSORCION DEL ASAG Y SUS METABOLITOS:

En la tabla VIII se presentan los valores de máxima absorción de los compuestos en metanol:

TABLA VIII.- ABSORBANCIA AL UV DE LOS COMPUESTOS EN ESTUDIO

COMPUESTO	LONGITUD DE ONDA (nm)
ASAG	270-275
SAG	308
ASA	303
AS	303
G	275
Propilparabeno	260
Metilparabeno	245
Butilparabeno	270

En base a estos resultados se eligió una longitud de onda de 280nm.

#### 4.2.1.2 ELECCION DE LA COLUMNA:

En la tabla IX se presenta el factor de resolución de los compuestos en estudio empleando una columna  $\mu$ -Bondapack C<sub>18</sub>.

TABLA IX.-FACTOR DE RESOLUCION EN LA COLUMNA CROMATOGRAFICA.

COMPUESTO	FASE MOVIL(M)	FLUJO	FACTOR DE RESOLUCION
ASAG	55:44:1	1 ml/min	3.70
SAG	55:44:1	1 ml/min	6.58
G	30:69:1	1 ml/min	3.01
ASA	30:69:1	1 ml/min	3.97
AS	30:69:1	1 ml/min	4.02

NOTA: (M) Fase móvil es: metanol-agua-ácido acético glacial.

El factor de resolución se calculó para el ASAG, relacionando el último pico del blanco de plasma con el pico del ASAG, para el SAG entre los picos de respuesta del ASAG y SAG, para el G relacionando el último pico del blanco de plasma con el pico del guayacol, para el ASA entre los picos del G y ASA, y para el AS relacionando los picos del ASA y AS. En todas ellas se obtuvo una buena resolución.



#### 4.2.1.3 ELECCION DE LA FASE MOVIL:

Inicialmente se probaron las siguientes fases móviles para el análisis de los metabolitos del ASAG (ASA, AS y G): una mezcla de Metanol-agua-ácido acético glacial en las proporciones siguientes: 40:60:0, 20:79:1, 40:58.5:1.5 y la 30:69:1 siendo esta última la más adecuada. Para el análisis del ASAG y SAG se probaron las siguientes proporciones: 40:58.5:0.5, 50:50:0, 72:27:1, 55:44:1., 60:39:1, 60:39.9:0.1 siendo la fase móvil más adecuada la de 55:44:1.

Se verificó la solubilidad en diferentes fases móviles encontrándose que el ASAG era soluble en todas ellas. Esta prueba se realizó por simple observación en las diferentes fases móviles en estudio.

##### 4.2.1.3.1 ESTABILIDAD EN LAS FASES MOVILES SELECCIONADAS:

En la tabla X se presentan los valores de estabilidad obtenidos; la pequeña diferencia encontrada en las alturas de los picos se debió a la inyección, por lo que el ASAG y SAG son estables en la fase móvil metanol-agua-ácido acético glacial (55:44:1) y el G, ASA y AS son estables al usar como fase móvil metanol-agua-ácido acético glacial en una proporción de (30:69:1).

TABLA X.- ESTABILIDAD DEL ASAG Y SUS METABOLITOS EN LA  
FASE MOVIL SELECCIONADA.

TIEMPO (min)	ALTURA DEL PICO (cm)				
	ASAG (MeOH-Agua-Acido acético) 55:44:1	SAG	G (MeOH-Agua-Acido acético)	ASA 30:69:1	AS
0	4.0	3.5	4.5	2.8	1.5
5	4.0	3.4	4.4	2.8	1.5
10	3.9	3.5	4.5	2.8	1.4
15	4.1	3.5	4.5	2.8	1.5
30	4.0	3.6	4.5	2.8	1.4

#### 4.2.1.4 ELECCION DEL ESTANDAR INTERNO:

Los tiempos de retención encontrados para los estándares internos probados y para los compuestos en estudio se presentan en la tabla XI, en la que se puede observar que el metilparabeno es el estándar adecuado para la cuantificación del ASA, AS y G con un tiempo de retención de 6 minutos y para la cuantificación del ASAG y SAG, el butilparabeno es el estándar interno más adecuado.

TABLA XI.- TIEMPOS DE RETENCION DE LOS COMPUESTOS A ESTUDIAR

COMPUESTOS	FASE MOVIL (Metanol-agua-ácido acético)	
	30:69:1	55:44:1
ASAG		6.75 min
SAG		13.75 min
G	7.5 min	
ASA	9.0 min	
AS	13.0 min	
Metilparabeno	6.0 min	
Etilparabeno	13.0 min	
Propilparabeno	18.0 min	5.00 min
Butilparabeno		8.00 min
Acetominofén	3.0 min	

En base a estos resultados se eligieron las siguientes condiciones cromatográficas:

- Columna:  $\mu$ -Bondapak  $C_{18}$  de 30 cm de longitud y 3.9 mm de diametro interno.
- Fase móvil: Metanol:Agua:Acido acético glacial
  - (A) 55:44:1 (pH 3.6) para ASAG, SAG, BP
  - (B) 30:69:1 (pH 3.0) para ASA, G, AS, MP
- Velocidad de flujo: 1.5 ml/min
- Detector: UV longitud de onda: 280 nm
  - Sensibilidad: 0.01
- Volumen de inyección: 20  $\mu$ l.

#### 4.3 OPTIMIZACION DEL SISTEMA ANALITICO:

Para optimizar el sistema analítico se prepararon curvas patrón en el rango de 1 a 20  $\mu\text{g/ml}$  de acuerdo a los lineamientos de la sección 3.3.2 y se determinó la linealidad, repetibilidad y la cantidad mínima detectable. Esto se realizó para cada uno de los metabolitos propuestos (SAG, ASA, AS, G y ASu). Los valores obtenidos se presentan en la tabla XII y en la figura 12 se presenta la gráfica obtenida ajustada por mínimos cuadrados, en la que se observa un coeficiente de correlación de 0.9996 y el intercepto obtenido es muy cercano a cero.

TABLA XII.- ANALISIS DE REGRESION DEL ASAG EN AGUA

CONCENTRACION DE ASAG ( $\text{mcg/ml}$ )	RELACION DE ALTURA ASAG/EI ( $\text{cm/cm}$ )	ANALISIS DE REGRESION
2	0.183	$r=0.9996$
4	0.325	$m=0.3292$
8	0.650	$b=0.0292$
10	0.825	

Los resultados de precisión para la cuantificación de ASAG en agua se presentan en la tabla XIII y la repetibilidad en la tabla XIV:

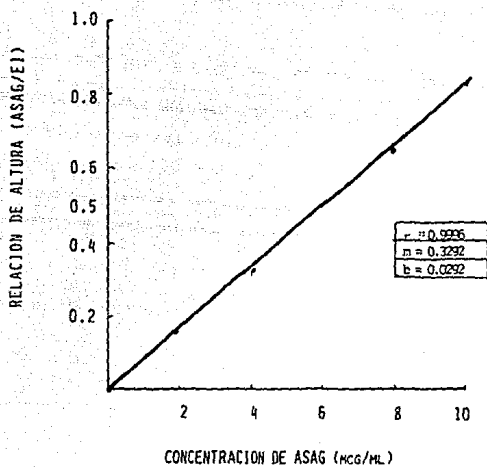


FIGURA 12.- CURVA ESTANDAR DEL ASAG EN AGUA.

TABLA XIII.- PRECISION DEL SISTEMA ANALITICO PARA  
LA DETERMINACION DE ASAG EN AGUA.

CONCENTRACION (mcg/ml)	RELACION DE ALTURAS			MEDIA	DS	%CV
	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3			
1	0.0976	0.0981	0.0988	0.0982	0.0020	2.01
5	0.1624	0.1610	0.1569	0.1601	0.0030	1.85
10	0.2930	0.2898	0.2983	0.2937	0.0023	0.78
20	0.5597	0.5705	0.5717	0.5673	0.0094	1.65

TABLA XIV.- REPETIBILIDAD DEL SISTEMA ANALITICO PARA LA  
DETERMINACION DE ASAG EN AGUA.

CONCENTRACION (µg/ml)	RELACION DE ALTURAS ASAG/EI			MEDIA	DS	%CV
	DIA I	DIA II	DIA III			
1	0.0982	0.0991	0.0974	0.0982	0.00069	0.71
5	0.1601	0.1622	0.1622	0.1615	0.00099	0.61
10	0.2937	0.3011	0.2998	0.2982	0.00323	1.08
20	0.5673	0.5585	0.5604	0.5633	0.00363	0.64

Como se puede observar en la tabla XIII los coeficientes de variación obtenidos fueron menores del 2.01% lo cual indica que el método es preciso.

En la tabla XIV se presenta la repetibilidad del método

encontrándose que el coeficiente de variación más alto obtenido en diferentes días fué de 1.08% lo cual indica que el método en agua es repetible.

#### 4.3.2 DETERMINACION DEL MINIMO DETECTABLE EN EL SISTEMA

Para el ASAG, SAG, ASA y AS la concentración mínima detectable del sistema fué de 0.5 mcg/ml; para el guayacol la concentración fué de 0.3 mcg/ml y en el caso del ácido salicílico de 1 mcg/ml.

#### 4.4 DETERMINACION DEL ASAG EN PLASMA

##### 4.4.1 SELECCION DEL PROCESO DE EXTRACCION:

Los resultados de porcentaje de recuperación obtenidos siguiendo los lineamientos de la sección 3.4.1 se presentan en la tabla XV, en la que se observa que el mejor solvente extractor es la mezcla de éter-diclorometano (70:30), ya que realizando dos extracciones el porcentaje de extracción fué de 98.5%.

TABLA XV.- INFLUENCIA DEL SOLVENTE EXTRACTOR Y NUMERO DE EXTRACCIONES DEL ASAG.

SOLVENTE	NUMERO DE EXTRACCIONES	RELACIONES DE ALTURAS DE ASAG:EI	%RECUPERACION
Cloroformo	1	0.1093	28.2
	2	0.2057	53.3
	3	0.2306	59.5
Acetato de etilo	1	0.2593	40.8
	2	0.2688	42.3
	3	0.2860	45.0
Acetonitrilo	1	0.2564	38.2
	2	0.2830	42.2
	3	0.2987	44.5
Eter-dicloro metano (70:30)	1	0.5778	85.0
	2	0.6696	98.5
	3	0.6699	98.6

#### 4.4.2 ESTABILIDAD DEL ASAG DURANTE EL PROCESO DE EXTRACCION:

Los resultados de estabilidad se presentan en la tabla XVI. Al efectuar una prueba de t se encontró que el ASAG es estable bajo las condiciones de extracción.



TABLA XVI.- ESTABILIDAD DEL ASAG EN EL PROCESO DE EXTRACCION.

TUBO	TIEMPO (min)	RELACION DE ALTURA ASAG/EI	MEDIA	SD	VALOR SIG NIFICANCIA
1	0	0.3377			
2	0	0.3390	0.3440	0.0080	
3	0	0.3553			NS
4	60	0.3423			
5	60	0.4127	0.3725	0.0298	
6	60	0.3625			

## 4.4.3 ESTABILIDAD DEL ASAG DESPUES DE SER EXTRAIDO:

Los resultados de estabilidad del ASAG despues de efectuar el proceso de extracción se presentan en la tabla XVII en la que se puede observar que una vez extraido el ASAG, NO ES ESTABLE por lo que es necesario analizarlo de inmediato. También se encontró que a temperatura de 4°C y -20°C a las 24 horas se presenta un 25.8% de degradación.

TABLA XVII.- ESTABILIDAD DEL ASAG DESPUES DEL PROCESO DE EXTRACCION

TEMPERATURA	TIEMPO (Hr.)	RELACION DE ALTURA ASAG-EI	% DEGRADADO
22°C	0	0.6242	0.0
	1	0.6310	0.0
	3	0.5081	2.6
	8	0.3433	45.0
4°C	12	0.3521	43.8
	24	0.3009	51.8
	48	0.2717	58.5
-20°C	12	0.5837	6.5
	24	0.4632	25.8
	48	0.0408	95.0

#### 4.4.4 EXTRACCION DEL ASAG OPTIMIZADA EN PLASMA

A continuacion se presenta el cromatograma obtenido de la extraccion de ASAG en plasma con el metodo optimizado.

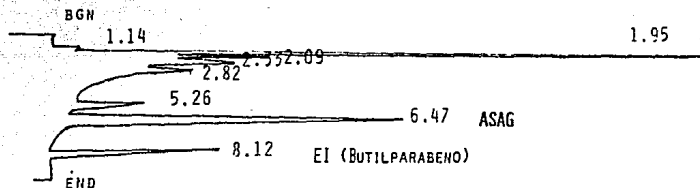


FIGURA 13.- CROMATOGRAMA DE LA MUESTRA PLASMATICA ADICIONADA DE ASAG EMPLEANDO BUTILPARABENO COMO ESTANDAR INTERNO.

En la tabla XVIII se observa que el porcentaje de extracción por el método optimizado a tres diferentes concentraciones (5, 10 y 20 mcg/ml) es bueno.

TABLA XVIII.- EXTRACCION OPTIMIZADA DEL ASAG EN PLASMA A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

AGENTE A- CIDIFICAN TE	SOLVENTE EXTRACTOR	CONCENTRACION (mcg/ml)	RELACION ALTURA ASAG/EI	%EXTRACCION
Bisulfato	Eter-di-	5.0	0.6940	93.0
de pota-	clorome-	10.0	1.4166	98.0
sio	tano	20.0	3.3611	93.0
	(70:30)			

#### 4.5 DETERMINACION DE LOS METABOLITOS DEL ASAG EN PLASMA.

En la tabla XIX se observa el porcentaje de recuperación empleando los métodos de extracción descritos en las secciones 3.4.2 y 3.5.3.

TABLA XIX.- METODOS DE EXTRACCION Y EL PORCENTAJE DE RECUPERACION DE SAG, G, ASA Y AS EN PLASMA.

COMPUESTO	METODO DE EXTRACCION	% RECUPERACION
SAG	Descrito en la sección 3.4.2	65.0
G	Descrito en la sección 3.4.2	92.0
ASA	Descrito en la sección 3.5.3	99.0
AS	Descrito en la sección 3.5.3	95.0

Se observa que el porcentaje de extracción para el SAG es bajo sin embargo para los demás componentes es mayor del 90%.

4.6 VALIDACION DE LOS METODOS ANALITICOS PARA LA CUANTIFICACION DEL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL Y SUS METABOLITOS EN PLASMA.

4.6.1 LINEARIDAD DEL SISTEMA ANALITICO:

En la tabla XX se presentan los resultados obtenidos al preparar cinco curvas patrón de cada uno de los compuestos en el rango de concentración de 10 a 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , observándose que en el sistema se obtiene un buen coeficiente de correlación para cada uno de los compuestos.

TABLA XX.- LINEARIDAD DEL SISTEMA ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE ASAG, SAG, ASA, AS Y G.

COMPUESTO	r	m	b
ASAG	0.9983	1.0000	-0.00003
SAG	0.9988	1.0004	-0.03190
ASA	0.9988	0.9999	-0.00002
AS	0.9992	1.0000	-0.00017
G	0.9989	1.0000	-0.00004

## 4.6.2 PRECISION DEL SISTEMA ANALITICO:

En la tabla XXI, se presenta el analisis estadistico de los valores de relacion de alturas de 6 muestras tratadas. Se seleccionó esta medida ya que la relacion de areas daba coeficientes de variación muy altos para cada uno de los compuestos. Dado a que el coeficiente de variación fue menor del 2%, el sistema es preciso para todos los compuestos.

TABLA XXI.- PRECISION DEL SISTEMA

COMPUESTO	CONCENTRACION (mcg/ml)	RELACION DE ALTURAS COMP/EI	
ASA3	2.0	0.1550	X=0.1517
		0.1550	
		0.1560	DS=0.06672
		0.1560	
		0.1550	%CV=1.2456
		0.1540	
SAG	5.0	0.3286	X=0.3229
		0.3214	
		0.3288	DS=0.0054
		0.3280	
		0.3188	%CV=1.6085
		0.3140	
ASA	5.0	0.2637	X=0.2724
		0.2738	
		0.2716	DS=0.0032
		0.2733	
		0.2692	%CV=1.1800
		0.2724	
AS	1.0	0.0681	X=0.0686
		0.0697	
		0.0691	DS=0.000767
		0.0673	
		0.0684	%CV=1.1150
		0.0689	
G	1.0	1.0100	X=1.0048
		1.0219	
		1.0000	DS=0.0119
		1.0086	
		0.9959	%CV=1.1900
		1.0192	

## 4.6.3 TOLERANCIA DEL SISTEMA:

En las tablas XXII y XXIII, se presentan los valores de los factores de resolución al efectuar un cambio de  $\pm 10\%$  de metanol en la fase móvil a emplear, observándose una gran variación al aumentar el contenido de metanol, por lo que hay que tener cuidado al preparar la fase móvil metanol-agua-ácido acético (55:44:1), empleada para cuantificar el acetil salicilato de guayacol y el salicilato de guayacol, sin embargo la disminución del contenido de metanol no afecta a la resolución. Al preparar la fase móvil metanol-agua-ácido acético (30:69:1) empleada para cuantificar el ASA, AS y G, al aumentar o disminuir el contenido de metanol se ve afectada la resolución de los compuestos.

TABLA XXII.- TOLERANCIA DEL SISTEMA PARA EL ASAG Y SAG AL UTILIZAR BUTILPARABENO COMO ESTANDAR INTERNO (EI).

FASE (MeOH-H <sub>2</sub> O-Ac. acético)	TIEMPO DE RETENCION			FACTOR DE RESOLUCION		
	ASAG	EI (min)	SAG	ASAG/solv	EI/ASAG	SAG/EI
55:44:1	9.75	11.0	16.75	3.32	3.24	6.04
50:44:1	11.32	13.0	18.40	3.51	3.40	5.75
30:44:1	6.10	9.3	13.37	3.80	2.12	4.50

TABLA XXIII.- TOLERANCIA DEL SISTEMA PARA EL G. ASA, AS AL UTILIZAR METILPARABENO COMO ESTANDAR INTERNO (EI)

FASE (MeOH-H <sub>2</sub> O-Ac. acético)	TIEMPO DE RETENCION				FACTOR DE RESOLUCION			
	EI	G	ASA	AS	EI/SOL	G/EI	ASA/G	AS/ASA
	(min)							
30:89:1	7.5	9.61	10.73	15.54	3.01	2.89	4.11	7.22
27:89:1	15.2	17.20	19.07	26.12	3.23	2.90	2.89	9.71
33:89:1	6.10	6.24	8.33	11.27	2.89	0.23	3.27	5.60

#### 4.6.4 LIMITE DE CUANTIFICACION:

El nivel mínimo cuantificable para el ASAG fue de 0.5 mcg/ml tomando como referencia el valor de altura de pico del 3 % en relación al nivel del ruido. Y el nivel mínimo cuantificable para los metabolitos del ASAG fue: para el SAG y G de 0.5 mcg/ml, para el ASA de 0.8 mcg/ml y para el AS de 0.7 mcg/ml.

#### 4.6.5 ESPECIFICIDAD:

En la figura 14 se presentan los cromatogramas para el blanco de plasma, plasma conteniendo guayacol, ácido salicílico, ácido acetil salicílico y metilparabeno como estándar interno y un cromatograma más para el acetil salilato de guayacol, butilparabeno y salicilato de guayacol, en su fase móvil correspondiente, observandose que no presenta picos de interferencia.

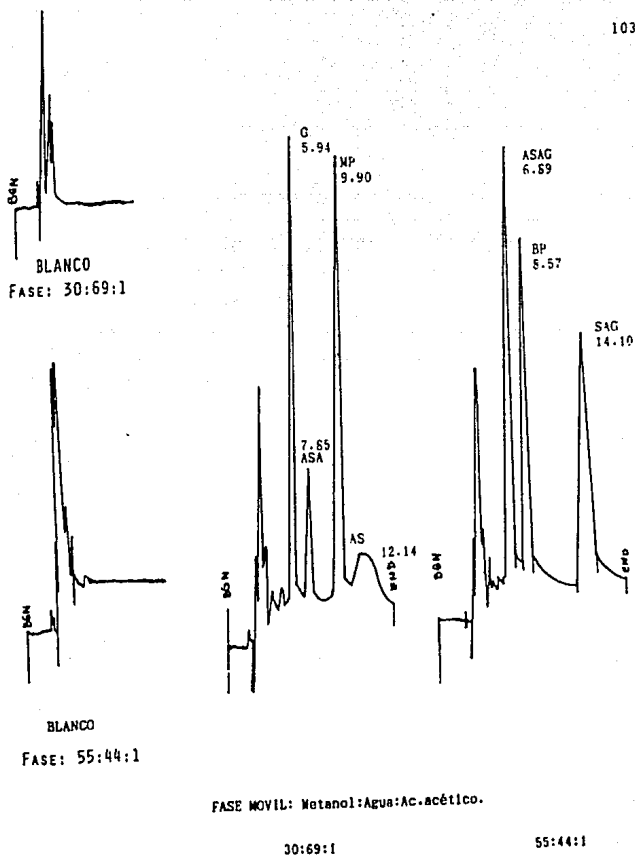


FIGURA 14.- ESPECIFICIDAD DEL METODO ANALITICO EN PLASMA



## METODO PARA CUANTIFICAR ASAG Y SUS METABOLITOS EN PLASMA

## 4.8.6 LINEARIDAD Y PRECISION DEL METODO:

En la tabla XXIV se presenta la linealidad del método analítico para la cuantificación del ASAG, SAG, ASA, AS y G en plasma con sus respectivos coeficientes de correlación, pendiente e intercepto en un rango de concentración de 1 a 20mcg/ml.

En la tabla XXV, se presenta la media, la desviación estandar y el coeficiente de variación para cada uno de los compuestos a analizar obteniéndose una variación no mayor de 9% para el ASAG y G, y de 4.8% para el SAG; para el ASA y AS su coeficiente de variación no es mayor del 10 y 12% respectivamente, por lo que el método puede considerarse preciso.

TABLA XXIV.- LINEARIDAD DEL METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR EL ASAG, SAG, ASA, AS Y G EN MUESTRAS PLASMATICAS.

COMPUESTO	r	m	b
ASAG	0.9974	0.9999	0.000000
SAG	0.9990	1.0000	-0.000003
ASA	0.9927	0.9989	0.004859
AS	0.9971	0.9917	0.260125
G	0.9953	0.9992	-0.000009

TABLA XXV.- PRECISION DEL METODO ANALITICO DE ASAG, SAG, ASA, AS Y G EN PLASMA.

n (No. deter- minacio- nes)	CONCENTRACION DEL COMPUESTO EN ESTUDIO ( $\mu\text{g/ml}$ )	COMPUESTO	MEDIA	DS	%CV
5	1	ASAG	0.0983	0.0006	0.62
5	2		0.1302	0.0126	9.18
5	5		0.1759	0.0031	1.73
5	10		0.2758	0.0135	4.49
5	20		0.5011	0.0314	5.58
5	1	SAG	0.1006	0.0043	4.32
5	2		0.1354	0.0035	2.64
5	5		0.2882	0.0080	2.08
5	10		0.5397	0.0228	4.23
5	20		1.1180	0.0546	4.88
5	1	ASA	0.0711	0.0059	8.38
5	2		0.1106	0.0122	11.01
5	5		0.2026	0.0161	7.93
5	10		0.3564	0.0156	4.36
5	20		0.8521	0.0373	4.32
5	1	G	0.1503	0.0125	8.38
5	2		0.1838	0.0084	4.57
5	5		0.3050	0.0138	2.28
5	10		1.2775	0.0898	7.03
5	20		3.1261	0.0889	2.84
5	1	AS	0.0364	0.0037	10.21
5	2		0.0763	0.0082	10.77
5	5		0.1053	0.0063	7.89
5	10		0.1786	0.0098	5.51
5	20		0.3534	0.0433	12.25

#### 4.6.7 EXACTITUD DEL METODO:

En la tabla XXVI, se observa que la recuperación es buena para todos los metabolitos en estudio, obteniéndose un valor entre 96.44% a 98.6% con un coeficiente de variación no mayor de 2.09%. Al efectuar la prueba de t, se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas con respecto al % de extracción por lo que el método se consideró exacto.

TABLA No. XXVI. EXACTITUD DEL METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE ASAG, SAG, ASA, AS Y G EN PLASMA

MUESTRA	ASAG		SAG		COMPLEJOS ASA		G		AS	
	RELACION DE ALT.	% REC.	RELACION DE ALT.	% REC.	RELACION DE ALT.	% REC.	RELACION DE ALT.	% REC.	RELACION DE ALT.	% REC.
ESTANDAR	1.2227	101.00	0.4445	100.00	0.4444	100.00	4.2200	100.00	0.8295	100.00
1	1.2141	99.59	0.4487	101.12	0.4404	101.10	4.2780	101.55	0.8004	96.44
2	1.2107	98.37	0.4660	102.95	0.4436	101.94	4.2500	100.93	0.7983	96.74
3	1.2123	100.79	0.4418	98.10	0.4412	98.32	4.2500	100.93	0.8332	100.46
4	1.2192	99.70	0.4453	97.65	0.4453	100.24	4.2095	99.67	0.8100	97.65
5	1.2056	98.60	0.4576	100.55	0.4451	98.80	4.2400	101.17	1.4290	98.85
6	1.2530	101.50	0.4611	101.57	0.4672	97.65	4.1500	97.35	0.8271	99.71
7	1.2166	99.60	0.4540	101.95	0.4400	98.13	4.2000	98.8	0.8106	93.44
8	1.2606	105.10	0.4515	100.00	0.4350	97.92	4.2150	99.40	0.8461	102.00
9	1.2166	99.50	0.4414	97.53	0.4410	97.97	4.3446	105.11	0.8200	96.44
Y DE RCV		100.217 1.5323 1.49		100.51 1.5047 1.41		99.26 1.4937 1.401		100.65 4.1646 1.63		98.47 1.3687 1.05
COEFICIENTE DE VARIACION		0.4101		0.7394		0.2040		0.9769		2.2553
	2.330	NS		NS		NS		NS		NS

#### 4.6.8 REPETIBILIDAD DEL METODO EN DIFERENTES DIAS:

Al efectuar una prueba t de Student para verificar si existian diferencia entre dias no se encontraron diferencias estadisticamente significativas entre las 3 curvas estandar preparadas en dos dias diferentes, por lo que se considera que el metodo es repetible.

#### 4.6.9 ESTABILIDAD:

En la tabla XXVII, se presentan los resultados de las pruebas de estabilidad a diferentes temperaturas efectuadas para el ASAG, SAG, ASA, G, y AS en plasma. Se observa que el ASAG es rápidamente hidrolizado a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  ya que su porcentaje de degradación es de 39.5% en 24 Hr, para el SAG a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  se degrada un 74.5% en 24 Hrs, para el ASA se obtuvo un porcentaje de degradacion de 55.3% a temperatura de congelacion y para el AS y G de 9.12% y 16% respectivamente a las 24 Hrs. Debido a estos resultados se fué necesario analizar las muestras de plasma inmediatamente de ser obtenidas.

TABLA No. XXVII. ESTABILIDAD DEL ASAG Y SUS METABOLITOS EN PLASMA

TEMPERATURA	TIEMPO (hrs)	% DE RECUPERACION				
		ASAG	ASG	ASA	AG	G
22°C	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.5	37.94	37.94	37.94	37.94	37.94
	1	51.12	51.12	51.12	51.12	51.12
	3	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	6	-	84.84	-	19.24	58.74
	10	-	-	-	-	39.06
24	-	-	-	-	19.49	
4°C	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.5	5.92	5.92	5.92	5.92	5.92
	1	14.44	14.44	14.44	14.44	14.44
	3	51.50	51.50	51.50	51.50	51.50
	6	58.14	58.14	58.14	58.14	58.14
	10	58.9	58.15	58.15	58.15	58.15
24	79.34	79.34	-	15.65	29.10	
-20°C	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.5	6.50	6.50	6.50	6.50	6.50
	1	17.75	17.75	17.75	17.75	17.75
	3	24.76	24.76	24.76	24.76	24.76
	6	27.14	27.25	27.25	27.25	27.25
	10	31.97	37.12	37.12	37.12	37.12
24	69.62	74.45	-	9.12	16.07	

#### 4.7 METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR EL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL EN ORINA.

##### 4.7.1 DETERMINACION DEL PROCESO DE EXTRACCION EN ORINA:

En la tabla XXVIII se presentan los resultados obtenidos con diferentes solventes extractores y agentes acidificantes. En base a los resultados se encontró que para la orina el mejor solvente extractor es la mezcla de éter-diclorometano 70:30 y como agente acidificante el bisulfato de potasio al 10%, también es bueno el emplear éter, sin embargo el pico de respuesta para el ASAG es menor, además que la limpieza de la muestra es mejor con el primer método descrito.

TABLA XXVIII.- RECUPERACION OBTENIDA DEL METODO DE EXTRACCION DE ASAG EN ORINA MODIFICANDO EL AGENTE ACIDIFICANTE Y EL DISOLVENTE DE EXTRACCION.

SOLVENTE	AGENTE ACIDIFICANTE (volumen empleado)	ALTURA PICO DE ASAG (cm)	%EXTRACCION DE ASAG
ETER	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1N (1ml) pH ≈ 3	2.3	33.8
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1N (2ml) pH ≈ 1	1.9	28.0
	Ac. tricloroacético al 20% (1 ml) pH ≈ 1	3.9	57.3
	HCl 0.6M (2ml) pH ≈ 1	5.2	80.7
	HCl 0.6M (1 ml) pH ≈ 4	1.3	19.0
	KHSO <sub>4</sub> al 10% (1ml) pH ≈ 1	6.1	94.1
CLOROFORMO	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1N (2ml) pH ≈ 1		Se aglutina
	KHSO <sub>4</sub> 0.1N (2ml)	5.6	86.5
	Ac. tricloroacético al 20% (1ml) pH ≈ 1	0.4	6.4
	HCl 0.6M (1ml) pH ≈ 4	5.2	81.5
ACETATO DE ETILO	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.1N (2ml) pH ≈ 1	2.1	33.0
	Ac. tricloroacético al 20% (1ml) pH ≈ 1	0.9	14.3
	KHSO <sub>4</sub> al 10% (1 ml) pH ≈ 1	4.2	64.7
	HCl 0.6M (1ml) pH ≈ 4	4.6	70.6
ETER-DICLO METANO (70:30)	Ac. tricloroacético al 20% (1ml) pH ≈ 1	1.3	38.7
	KHSO <sub>4</sub> al 10% (1 ml) pH ≈ 1	6.1	94.1

#### 4.7.2 DETERMINACION DE LOS METABOLITOS DEL ASAG EN ORINA:

En la tabla XXIX se presentan los porcentajes de recuperación de los metabolitos del ASAG empleando los métodos de extracción descritos en la sección 3.4.2 en las que se observa que el porcentaje de recuperación para el guayacol, el ácido salicílico (ASu) y el ácido salicílico es bajo, sin embargo para los demás metabolitos es bueno por lo que se optó cambiar el solvente extractor a cloroformo de acuerdo a lo descrito en la sección 3.5.3 obteniéndose un buen porcentaje de recuperación para todos ellos.

TABLA XXIX.- METODOS DE EXTRACCION Y PORCENTAJE DE RECUPERACION DE SAG, G, ASA, AS Y ASU EN ORINA

COMPUESTO	METODO DE EXTRACCION	% RECUPERACION
SAG	Descrito en la sección 3.4.2	98.0
G	Descrito en la sección 3.4.2	49.0
ASA	Descrito en la sección 3.4.2	100.0
AS	Descrito en la sección 3.4.2	22.0
ASu	Descrito en la sección 3.4.2	45.0
G	Descrito en la sección 3.5.3	99.0
ASA	Descrito en la sección 3.5.3	99.0
AS	Descrito en la sección 3.5.3	99.0
ASu	Descrito en la sección 3.5.3	96.0



#### 4.8 VALIDACION DE LOS METODOS ANALITICOS PARA CUANTIFICAR EL ASAG Y SUS METABOLITOS EN ORINA.

Al analizar muestras de orina apareció un pico notable de respuesta el cual fue identificado como ácido salicílico por lo que fue necesario validarlo junto con los demás metabolitos.

##### 4.8.1 LINEARIDAD Y PRECISION DE LOS METODOS:

En la tabla XXX se presentan los resultados de la regresión lineal para cada uno de los compuestos en estudio en muestras urinarias en un rango de concentración de 1 a 20 mcg/ml, obtenidos de cinco curvas de cada uno de los compuestos a analizar (ASAG, SAG, ASA, AS, G y ASu), observando que el método presenta un buen coeficiente de correlación para cada uno de ellos.

TABLA XXX.- LINEARIDAD DEL METODO ANALITICO PARA EL ASAG,  
SAG, ASA, AS Y G EN MUESTRAS DE ORINA

COMPUESTO	r	m	b
ASAG	0.9988	1.0000	-0.00001
SAG	0.9987	1.0000	0.00000
ASA	0.9951	0.9999	0.00000
AS	0.9979	0.9999	0.00000
G	0.9996	1.0000	0.00000
ASu	0.9916	0.9999	0.00001

En la tabla XXXI se presentan los coeficientes de variación siendo los valores no mayores de 8.70%, lo cual indica que el método es preciso.

TABLA XXXI.- PRECISION DEL METODO ANALITICO PARA  
EL ASAG, SAG, ASA, AS, G Y ASU EN ORINA.

n	CONCENTRACION (mcg/ml)	COMPUESTO	RELACION ALTURAS COMP/EI	DE	%CV
5	1	ASAG	0.1112	0.0095	8.58
5	2		0.2098	0.0098	4.59
5	5		0.4509	0.0042	0.94
5	10		0.8278	0.0042	1.38
5	20		1.7366	0.0371	2.14
5	1	SAG	0.0588	0.0007	1.23
5	2		0.0794	0.0009	1.19
5	5		0.1479	0.0048	3.28
5	10		0.3218	0.0058	1.83
5	20		0.5984	0.0127	2.12
5	1	ASA	0.0713	0.0008	1.16
5	2		0.0985	0.0008	0.84
5	5		0.2210	0.0004	2.17
5	10		0.4788	0.0069	1.44
5	20		0.7959	0.0039	0.49
5	1	AS	0.1108	0.0098	8.70
5	2		0.2049	0.0075	3.70
5	5		0.3158	0.0183	5.17
5	10		0.5301	0.0413	7.80
5	20		1.0577	0.0429	4.06
5	1	G	0.3019	0.0087	2.21
5	2		0.4734	0.0034	0.73
5	5		1.1192	0.0181	1.44
5	10		2.0220	0.0758	3.74
5	20		4.1208	0.0885	1.61
5	5.7	ASu	0.1270	0.0075	5.93
5	10.0		0.2894	0.0184	7.20
5	20.0		0.4719	0.0279	5.92
5	33.3		0.8774	0.0146	1.68
5	50.0		1.5929	0.0183	1.14

NOTA: ASu= ácido salicílico

La relación de alturas es la media de las cinco curvas.

COMP/EI= compuesto en estudio/estándar interno (Mp ó Bp)

DE= desviación estándar.

#### 4.8.2 EXACTITUD DE METODO:

En la tabla XXXII se presentan los porcentajes de recuperación de los compuestos en estudio al analizar 9 muestras de la misma concentración, obteniéndose valores entre 87.73% y



100.25% con coeficientes de variación entre 1.36 a 2.08% y el valor de te calculada menor a tabla por lo que no existe diferencia estadísticamente significativa por lo que se considera que el método es exácto. En caso del ASu si es significativa pero por su coeficiente de extracción de 87.73%, solo que si se optimizaba la extracción para este metabolito sería necesario aumentar otro método de análisis y no es conveniente pero si se tomaba en cuenta el porcentaje de recuperación en los cálculos.

#### 4.8.3 REPETIBILIDAD:

Al realizar la prueba t de Student para el análisis en días diferentes, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, por lo que el método se consideró repetible.

#### 4.8.4 NIVEL MINIMO CUANTIFICABLE:

El nivel mínimo cuantificable fué de 0.6  $\mu\text{g/ml}$  para el ASAG, de 0.5  $\mu\text{g/ml}$  para el SAG y G, 0.8  $\mu\text{g/ml}$  para el ASA, 1.0  $\mu\text{g/ml}$  para el AS y 6  $\mu\text{g/ml}$  para el ASu.

#### 4.8.5 ESTABILIDAD:

En la tabla XXXIII se presenta los resultados de la prueba de estabilidad para el ASAG, ASA, AS, G y SAG en orina a diferentes temperaturas. Se puede observar que el ASAG presenta un porcentaje de degradación muy alto en orina ya que a

TABLA No. XXXIII. ESTABILIDAD DEL ASAG Y SUS METABOLITOS EN ORUGA

TEMPERATURA	TIEMPO (Horas)	% DEGRADACION				
		ASA	SAT	ASA	AS	G
22°C	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3	27.50	0.00	42.00	4.76	19.29
	6	46.40	0.00	47.77	14.76	52.57
	25	100.00	10.50	53.70	27.80	65.41
	49	-	15.80	-	-	67.25
4°C	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3	44.30	0.00	0.00	12.28	24.74
	6	47.00	0.00	0.00	14.28	49.88
	25	67.00	7.20	15.04	19.19	55.44
	49	-	-	-	-	-
-20°C	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	3	35.50	0.00	0.00	0.00	21.30
	6	35.50	0.00	0.00	0.00	26.52
	25	47.00	0.00	3.29	13.40	52.71
	49	-	-	8.20	-	-

temperatura de congelación se degrada un 42% a las 25 Hrs. Para el caso del SAG se encontró que se degrada en un 15.5% a temperatura de 24°C a las 48 Hrs. Tanto el ASA y el AS presentan un porcentaje de degradación pequeño de 8.2% para el ASA a las 49 Hrs y de 13.4% para el AS a las 25 Hrs a temperatura de -20°C mientras que para el G se puede observar una degradación de 32.7% a esta misma temperatura.

#### 4.9 ESTUDIO DE DIALISIS DEL ASAG.

El estudio se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos de la sección 3.12.3, utilizando el método de diálisis al equilibrio (8,9). El grado de unión del ASAG a proteínas plasmáticas no pudo ser determinado ya que se degrada rápidamente a AS y G. Esto concuerda con los resultados obtenidos en la estabilidad (tabla XXVII), que demuestran la rápida hidrólisis de este profármaco. En la tabla XXXIV se presenta la proporción de cada uno de los metabolitos en plasma y en la solución reguladora de fosfatos.

TABLA No. XXIV. ESTUDIO DE DIALISIS DEL ASAG EN PROTEINAS PLASMATICAS

CONCENTRACION ESTIMADA DE ASAG (MG/ML)	CANTIDAD ESTIMADA DE ASAG (MG/ML)	POLES EN PLASMA			POLES EN SOLUCION AMORTIGUADA		
		ASAG	G	AS	ASAG	G	AS
1.325	$12.75 \times 10^{-2}$	-	$1.996 \times 10^{-2}$	$6.456 \times 10^{-3}$	-	$1.512 \times 10^{-2}$	$0.305 \times 10^{-2}$
2.650	$19.12 \times 10^{-2}$	-	$1.707 \times 10^{-2}$	$5.175 \times 10^{-3}$	$1.100 \times 10^{-2}$	$1.561 \times 10^{-2}$	$0.326 \times 10^{-2}$
4.997	$91.06 \times 10^{-2}$	-	$1.917 \times 10^{-2}$	$1.980 \times 10^{-2}$	$1.069 \times 10^{-2}$	$1.216 \times 10^{-2}$	$0.372 \times 10^{-2}$
5.226	$96.51 \times 10^{-2}$	-	$1.454 \times 10^{-2}$	$1.625 \times 10^{-2}$	$1.177 \times 10^{-2}$	$9.172 \times 10^{-3}$	$1.351 \times 10^{-2}$
6.408	$114.75 \times 10^{-2}$	-	$1.017 \times 10^{-2}$	$1.226 \times 10^{-2}$	$1.709 \times 10^{-2}$	$6.961 \times 10^{-3}$	$1.051 \times 10^{-2}$
7.708	$140.95 \times 10^{-2}$	-	$1.266 \times 10^{-2}$	$12.23 \times 10^{-3}$	$0.919 \times 10^{-2}$	$10.776 \times 10^{-3}$	$1.206 \times 10^{-2}$



#### 4.10 ESTUDIO PRELIMINAR EN FASE PRECLINICA

En esta primera fase se administró a un perro criollo de 10 Kg una dosis por vía intravenosa de 89.5 mg de ASAG disuelto en 5 ml de dimetil sulfóxido. El volumen inyectado de DMSO fué de 0.3 ml/Kg. Este vehículo provocó hemólisis en las muestras sobre todo en los primeros minutos de muestreo y fué disminuyendo conforme pasó el tiempo, por lo que se determinó in vitro el efecto de la hemólisis sobre el porcentaje de recuperación, encontrándose que la hemólisis no interfiere en el análisis. Therstein y col. (62) administraron a perros beagle profármacos de la aspirina en este disolvente. En prueba de toxicidad se ha observado que la DL<sub>50</sub> del DMSO en rata vía IV es de 1.2 g/Kg, aunque en algunas ocasiones puede presentarse inflamación perivascular, trombosis local o anemia hemolítica reversible, cuando el DMSO se administra en forma repetida (69). Esta reacción puede evitarse si el DMSO se diluye al 10 ó 25% utilizando dextrosa al 5% como disolvente.

El estudio preliminar se llevó a cabo con el fin de seleccionar los tiempos de muestreo y así poder caracterizar farmacocinéticamente los metabolitos producidos al administrar el acetil salicilato de guayacol (ASAG). Los parámetros que pudieron ser determinados fueron:

PARAMETROS DE INTRODUCCION	PARAMETROS DE FORMACION	PARAMETROS DE DISTRIBUCION	PARAMETROS DE ELIMINACION
FD/V			
$k_a$	$k_f$	$t_0$	$t_{1/2}$
$t_{1/2}$	$t_{1/2}$	$t_{1/2}$	$k_{10}$
ABC <sup>o</sup>		$k_{12}$	
		$k_{21}$	
		$C_{m\acute{a}x}$	
		$t_{m\acute{a}x}$	

NOTA: \* si la administración es IV estos parámetros no proceden.

El modelo farmacocinético se seleccionó utilizando el programa de ESTRIP, criterio de información de Akaike (AIC) y la prueba estadística de F (2). Los estimados iniciales de las constantes de formación, distribución, eliminación y en la administración oral las constantes de absorción, tiempo de retardo e interceptos, fueron calculados utilizando un programa de regresión no lineal, el cual utiliza el algoritmo de Marquardt como método numérico (59); empleando un criterio de convergencia de 0.005 al determinar la menor suma de cuadrados.

En este estudio no se pudo detectar el acetil salicilato de guayacol, lo cual pudo deberse a que se hidroliza rápidamente en el organismo. El salicilato de guayacol no pudo ser detectado después de una hora, mientras que el guayacol y el

ácido salicílico fueron detectados hasta 2 y 9 horas respectivamente. El ácido salicílico fue el metabolito que se encontró en mayor proporción seguido del guayacol; el SAG se encontró a concentración muy baja.

Los metabolitos: salicilato de guayacol y guayacol se ajustaron a un modelo abierto de dos compartimentos y el AS a un modelo abierto de un compartimento (Figura 15). Los niveles de concentración plasmática vs. tiempo de los metabolitos se presentan en el apéndice C.

Los parámetros farmacocinéticos calculados son descritos en la tabla XXXV:

TABLA XXXV.- PARAMETROS FARMACOCINETICOS OBTENIDOS DESPUES DE LA ADMINSTRACION INTRAVENOSA DE ASAG.

COMPUESTO	PARAMETROS DE DISTRIBUCION	PARAMETROS DE ELIMINACION
GUAYACOL	A=79.854 α= 8.5402	B= 11.2435 μ= 0.7245Hr <sup>-1</sup>
SALICILATO DE GUAYACOL	A= 6.8958 α=13.8346	B= 0.7355 μ= 0.7842Hr <sup>-1</sup>
ACIDO SALICILICO		B= 99.3570 μ= 0.2016Hr <sup>-1</sup>

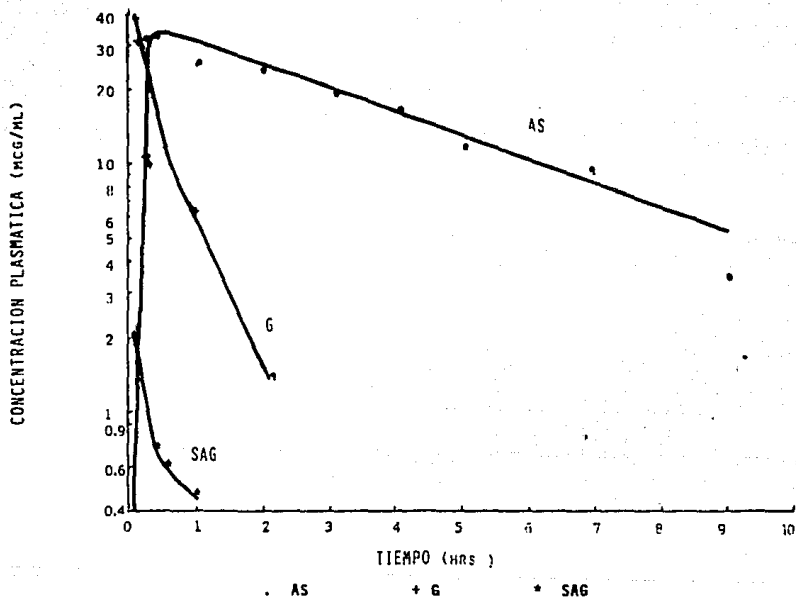


FIGURA 15.- NIVELES PLASMATICOS DE LOS METABOLITOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO PRELIMINAR DE LA ADMINISTRACION DE ASAG POR VIA IV A UN PERRO

En la figura 16 se representa esquemáticamente el modelo farmacocinético ajustado con los valores de las constantes obtenidas al administrar el acetyl salicilate de guayacol. La constante de formación de los metabolitos no pudo ser detectada en ninguno de los casos ya que es muy rápida. El tiempo de vida media de eliminación para el G fue de 59 minutos y para el SAG de 0.907 Hr mientras que para el AS su vida media de eliminación fue de 3.43 Hr.

Las ecuaciones a las que se ajustaron cada uno de los metabolitos fueron:

-GUAYACOL:

$$Cp = 79.8542 * \text{Exp}(-8.5402t) - 11.2435 * \text{Exp}(0.7245t)$$

-SALICILATO DE GUAYACOL:

$$Cp = 6.8958 * \text{Exp}(-13.8348t) - 0.7355 * \text{Exp}(0.7642t)$$

-ACIDO SALICILICO:

$$Cp = 39.357 [( \text{Exp}(-0.2016 * t) - \text{Exp}(5.3849 * t) )]$$

En base a lo anteriormente mencionado se establecieron los tiempos de muestreo descritos en la sección 3.6.

En la tabla XXXVI se presentan los resultados obtenidos al analizar la orina recolectada durante las 48 Hrs después de la administración de ASAG:

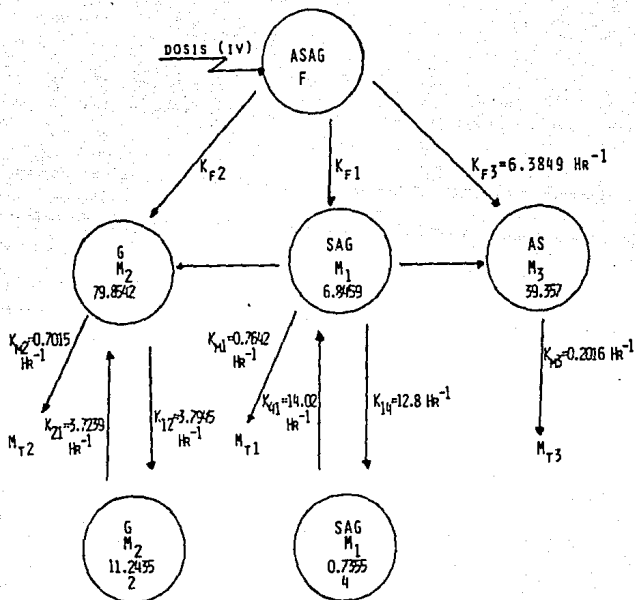


FIGURA 16.- MODELO FARMACOCINETICO OBTENIDO DE LA ADMINISTRACION DE ASAG POR VIA INTRAVENOSA (ESTUDIO PRELIMINAR)

TABLA XXXVI.- METABOLITOS ENCONTRADOS EN ORINA DESPUES DE LA ADMINISTRACION DEL ASAG POR VIA INTRAVENOSA (ESTUDIO PRELIMINAR)

METABOLITO	CONCENTRACION (mcg/ml)	CANTIDAD EXCRETADA 0- 48 Hrs (mg)	% EXCRETADO CON RESPECTO A LA DOSIS
AS	45.214	12.56	14.00
ASA	0.000	---	---
G	108.080	30.26	34.00
ASu	72.890	20.40	23.00

En orina además de guayacol y el ácido salicílico se elimina el ácido salicílico en un 23%. Se ha demostrado que este compuesto es un metabolito del AS (30, 31, 5, 27, 12). El guayacol en un 34% con respecto a la dosis y un 14% en forma de ácido salicílico. El ácido salicílico solo fue detectado en orina, en las muestras de plasma este metabolito no fue detectado. Este metabolito se excretó en menor proporción que cuando es administrado el ASA por vía oral. Manson y col. (33) reportaron en un estudio realizado en humanos que el ácido salicílico era eliminado en un 64 a 69% por vía renal. Los resultados obtenidos en el presente estudio son menores que al administrar el ASA a humanos, lo cual puede deberse a que fue administrado como acetil salicilato de guayacol o bien a que el metabolismo es diferente en humanos y perros, ya que ha sido reportado por Thorstein Loftsson y col. (63) que la aspirina es

realmente metabolizado tres veces más rápido en perros que en humanos.

En las muestras de orina se tuvo gran precaución al cuantificar el ácido salicílico dado a que se pueden presentar diferentes problemas. Day y col (6), encontraron que durante el tratamiento de la muestra se puede formar un éster metilado y además al evaporar se puede sublimar el ácido salicílico, o bien el ácido salicílico puede descomponerse en ácido salicílico por microorganismos.



#### 4.11 ESTUDIO FINAL EN FASE PRECLINICA

De acuerdo a lo descrito en la sección 3.14. en el estudio se efectuaron diez administraciones:

-Administración intravenosa y oral del acetil salicilato de guayacol, salicilato de guayacol, ácido acetil salicílico y ácido salicílico, cuyas dosis se encuentran especificadas en la misma sección. Las muestras de plasma se analizaron inmediatamente después de obtenidas y las muestras de orina fueron analizadas durante las primeras 24 a 48 Hrs después de la administración. Los metabolitos fueron administrados con el fin de obtener un sistema farmacocinético global de ASAG y poder determinar el valor de las microconstantes.

Los niveles plasmáticos de cada administración se presentan en el Apéndice D. Los programas utilizados para el análisis farmacocinético fueron los mismos que en el estudio preliminar.

En las figuras 17 a 26 se presentan las gráficas de concentración plasmática vs. tiempo y en las figuras 27 a 33 se encuentran las representaciones esquemáticas de los modelos farmacocinéticos obtenidos. En el apéndice D se presentan los valores de concentración plasmática vs. tiempo después de la administración de cada uno de los fármacos.

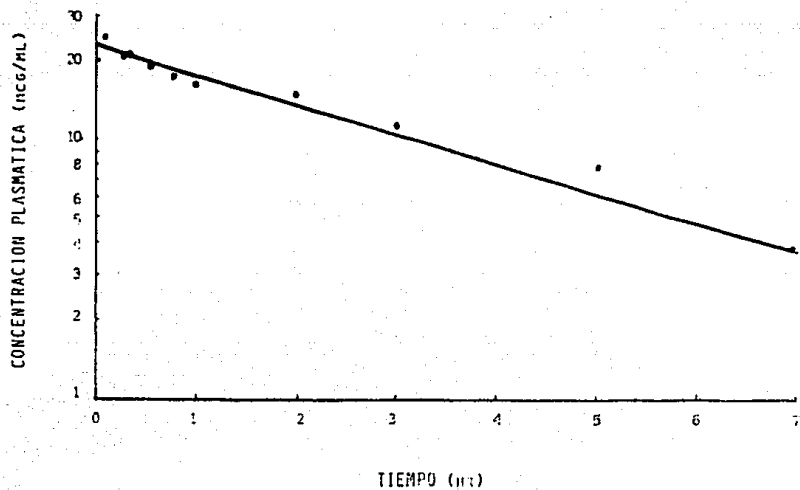


FIGURA 17.- NIVELES PLASMATICOS DEL ACIDO SALICILICO DESPUES DE UNA ADON. IV DE UNA DOSIS DE 72.64 MG A UN PERRO DE 12.8 KG.

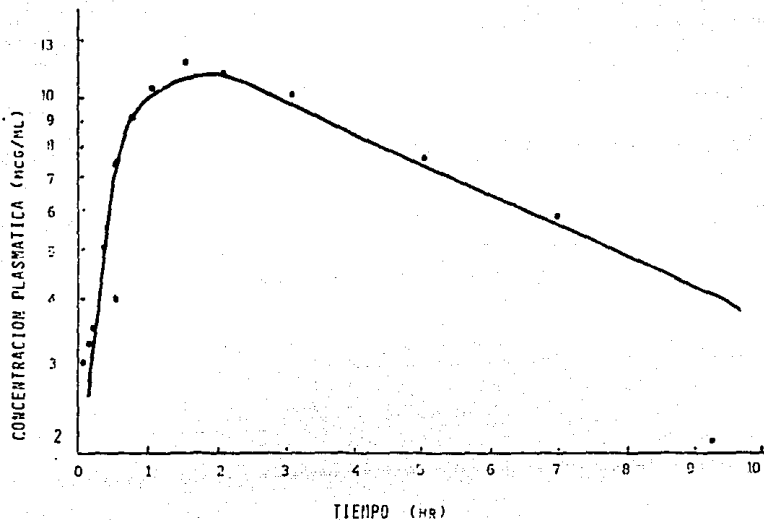


FIGURA 18.- NIVELES PLASMATICOS DEL ACIDO SALICILICO DESPUES DE UNA ADMON. ORAL DE UNA DOSIS DE 72.64 MG A UN PERRO DE 12.8 KG.

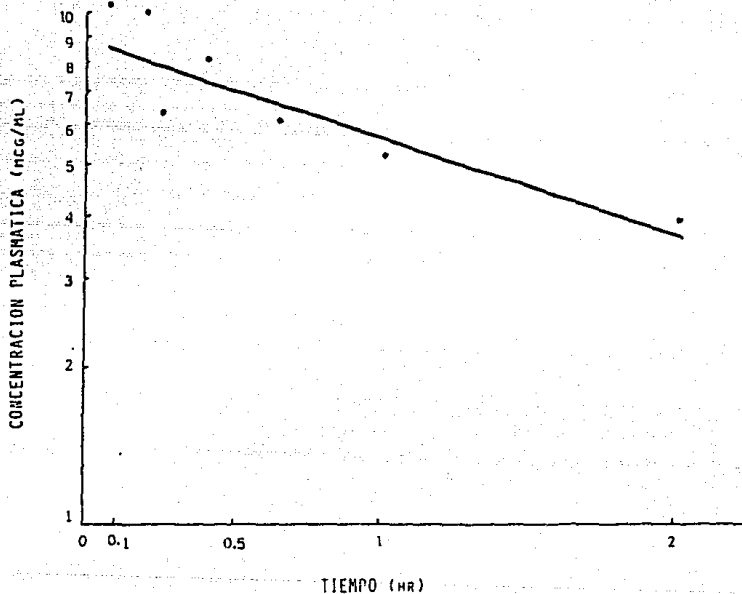


FIGURA 19.- NIVELES PLASMATICOS DEL GUAYACOL DESPUES DE UNA ADMON. INTRAVENOSA DE UNA DOSIS DE 69.02 MG A UN PERRO DE 13.5 Kg.

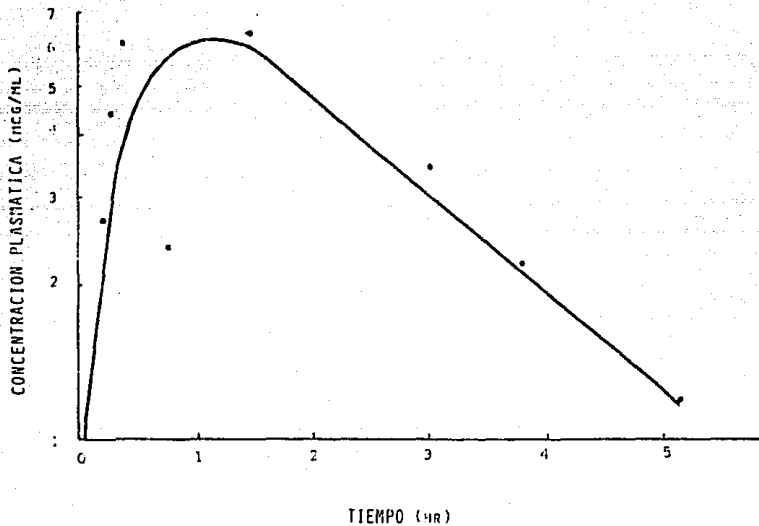


FIGURA 20.- NIVELES PLASMATICOS DEL GUAYACOL DESPUES DE UNA ADMINISTRACION ORAL DE UNA DOSIS DE 69.02 MG A UN PERRO DE 13.5 KG.

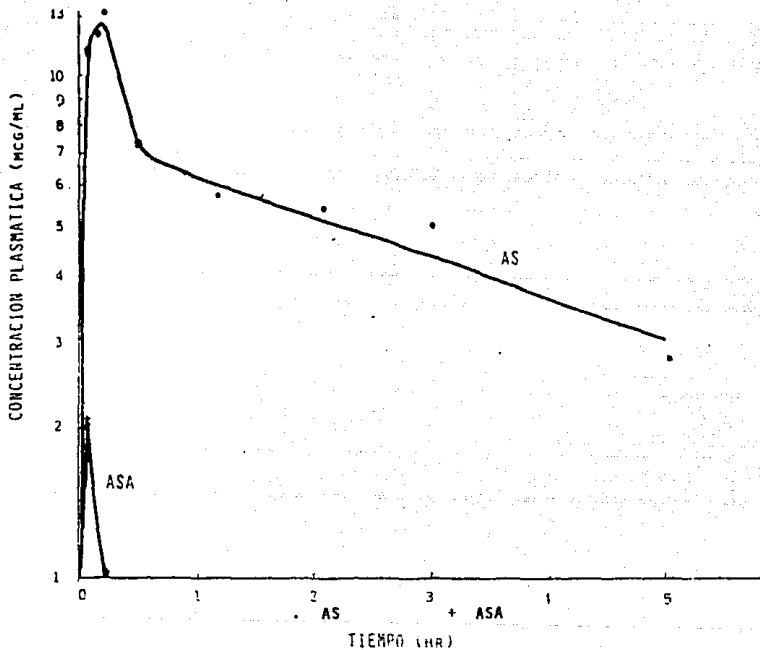


FIGURA 21.- NIVELES PLASMATICOS DEL ASA Y EL METABOLITO PRODUCIDO AS DESPUES DE UNA ADMON. INTRAVENOSA DE UNA DOSIS 87.62 MG A UN PERRO DE 11.8 Kg.

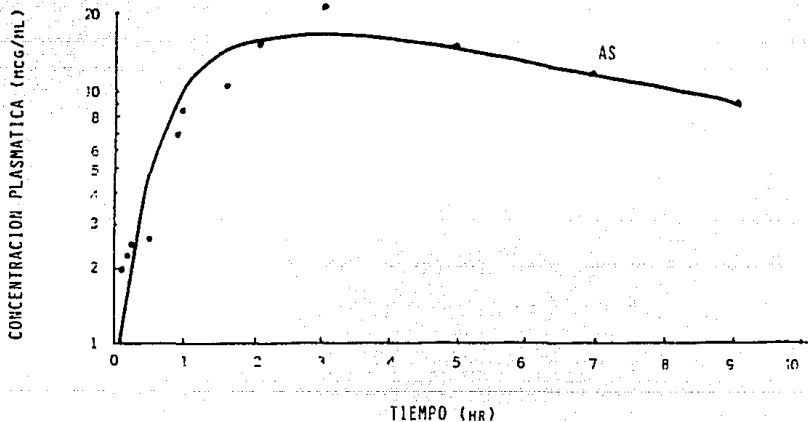


FIG. 22.- NIVELES PLASMATICOS DEL METABOLITO PRODUCIDO (AS) DESPUES DE UNA ADMON. ORAL DE ASA A UN PERRO DE 11.8 KG. (DOSIS 87.62 MG)

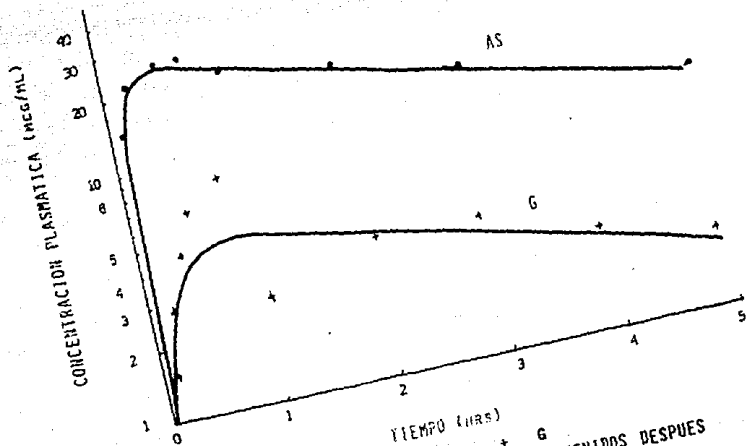


FIG. 23.- NIVELES PLASMATICOS DE LOS METABOLITOS OBTENIDOS DESPUES DE ADMIN. DE SAG POR VIA IV A UN PERRO DE 11.8 KG. (DOSIS 118.75 MG)



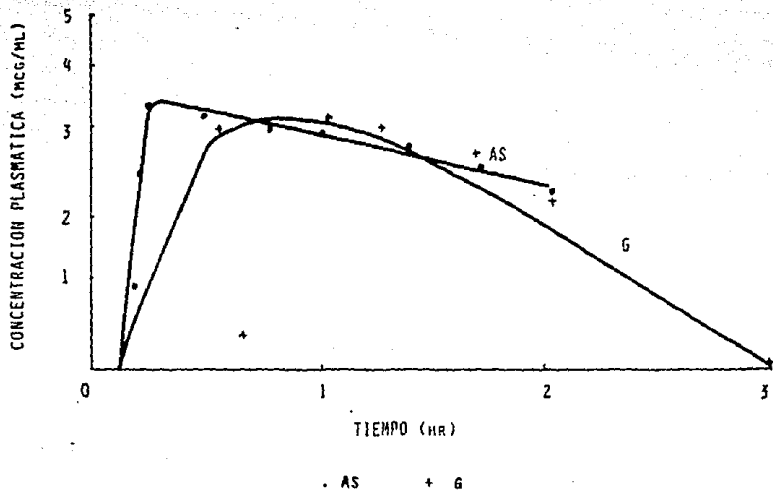


FIG. 24.- NIVELES PLASMATICOS DE LOS METABOLITOS OBTENIDOS DESPUES DE ADMON. DE SAG POR VIA ORAL A UN PERRO DE 11.8 Kg. (DOSIS 118.73 MG)

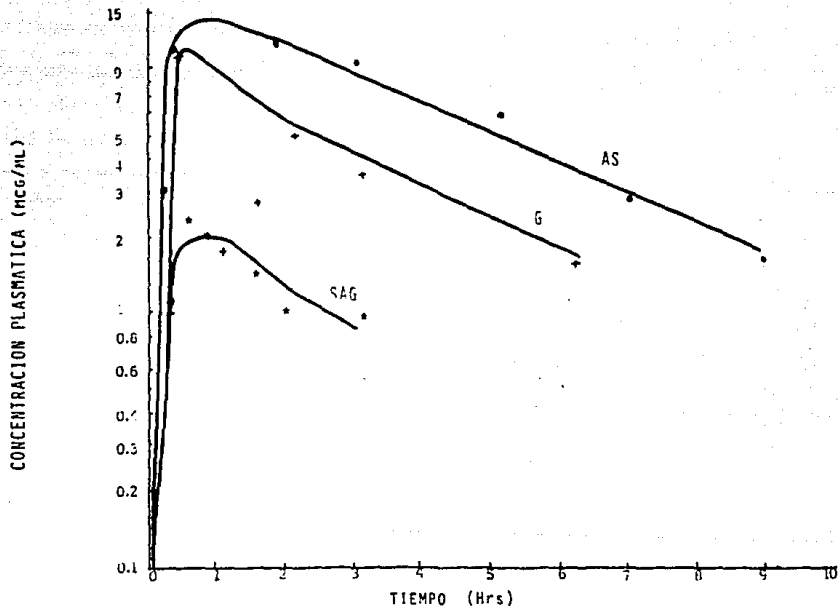
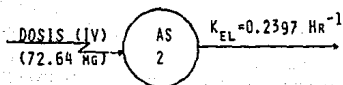


FIGURA 25.- NIVELES PLASMATICOS DE LOS METABOLITOS OBTENIDOS DESPUES DE LA ADMON. INTRAVENOSA DE ASAG DE UNA DOSIS DE 94.2 MG A UN PERRO DE 8 KG

. AS + G \* SAG

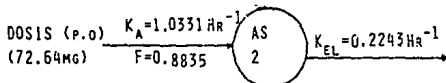


## POR VIA INTRAVENOSA



MODELO ABIERTO DE UN COMPARTIMIENTO CON INYECCION  
ENDOVENOSA RAPIDA

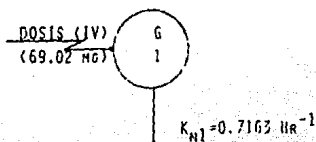
## POR VIA DRAL



MODELO ABIERTO DE UN COMPARTIMIENTO CON AD-  
MINISTRACION DE PRIMER ORDEN

FIGURA 27.

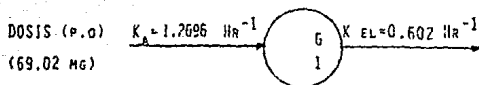
MODELOS FARMACOCINETICOS Y ECUACIONES PARAMETRICAS  
OBTENIDOS DEL ESTUDIO DE ADMINISTRACION DEL ACIDO  
SALICILICO



MODELO ABIERTO DE UN COMPARTIMIENTO CON INYECCION

ENDOVENOSA RAPIDA

POR VIA ORAL



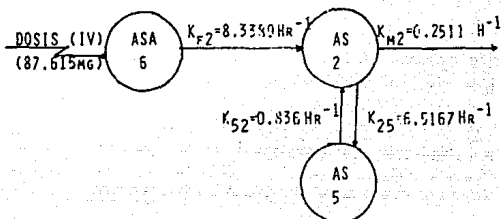
MODELO ABIERTO DE UN COMPARTIMIENTO CON ADMINISTRACION  
DE PRIMER ORDEN

FIGURA 28

MODELOS FARMACOCINETICOS Y ECUACIONES PARAMETRICAS  
OBTENIDOS DEL ESTUDIO DE ADMINISTRACION DE GUAYACOL

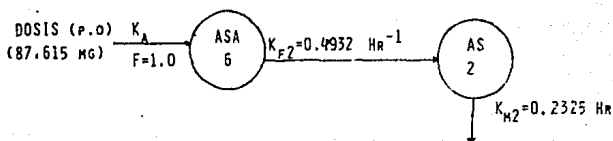
POR VIA INTRAVENOSA

141



MODELO ABIERTO DE DOS COMPARTIMIENTOS CON INYECCION ENDOVENOSA RAPIDA Y FORMACION DE METABOLITO

POR VIA ORAL



MODELO ABIERTO DE UN COMPARTIMIENTO CON ADMINISTRACION DE PRIMER ORDEN Y FORMACION DE METABOLITO.

FIGURA 29

MODELOS FARMACOCINETICOS Y ECUACIONES PARAMETRICAS OBTENIDOS DEL ESTUDIO DE ADMINISTRACION DE ACIDO A CETIL SALICILICO

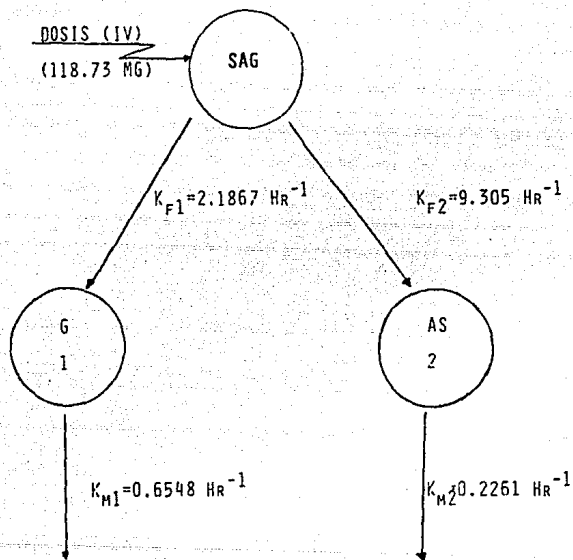


FIGURA 30.- MODELO FARMACOCINETICO PARA UNA ADMON. DE SALICILATO DE GUAYACOL POR VIA INTRAVENOSA.

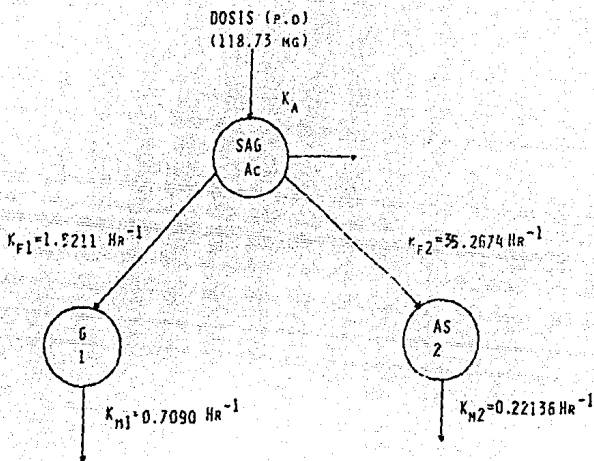


FIGURA 31.- MODELO FARMACOCINETICO PARA UNA ADMINISTRACION DEL SALICILATO DE GUAYACOL POR VIA ORAL



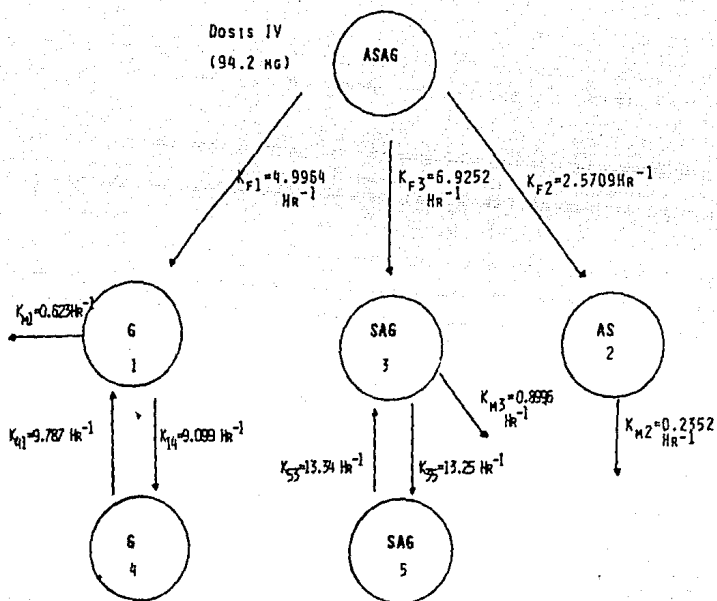


FIGURA 32. \_ MODELO FARMACOCINETICO PARA UNA ADMINISTRACION DEL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL POR VIA IV.

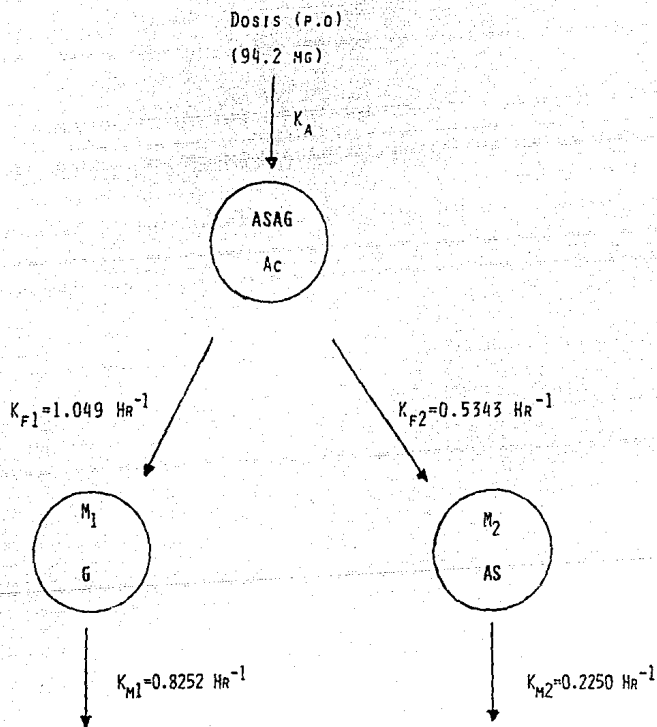


FIGURA 33.- MODELO FARMACOCINETICO PARA UNA ADMINISTRACION DEL ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL POR VIA ORAL

## ADMINISTRACION DEL ACIDO SALICILICO:

### a) VIA INTRAVENOSA.

Esta administración fue necesaria debido que es uno de los principales metabolitos activos obtenidos a partir del acetil salicilato de guayacol.

En la figura 17 se presenta el perfil concentración vs. tiempo del AS el cual se ajusta a un modelo abierto de un compartimento. El modelo farmacocinético de esta administración se presenta en la figura 26 ajustado de acuerdo a la siguiente ecuación paramétrica:

$$C_m = 22.8639 e^{-0.2397t}$$

La vida media de eliminación obtenida de 2.35 Hr es muy semejante a la obtenida en humanos. Stebert y col. (58) reportaron el tiempo de vida media de eliminación del AS al administrar ASA en diferente presentación de  $3.62 \pm 0.98$  Hr y  $2.68 \pm 0.63$  Hr a dosis de 8.8 y 9.6 mg/Kg respectivamente. Harrisson y col. (21) analizaron el AS y encontraron que su tiempo de vida media de eliminación es de 3.5 Hr.

Al analizar la orina excretada durante las primeras 24 Hrs después de la administración intravenosa se encontró que la cantidad total excretada fue de 50.009 mg de lo cual equivale a un 68.8% y un 6.5% de ASu excretada con

respecto a la dosis administrada. El AS fue excretado en esta proporción probablemente dado a que se transforma en ácido genticico, glicina y otros glucoronidos excretados por vía renal (83) que no pudieron ser detectados por el método de análisis empleado.

b) VIA ORAL.

En la figura 18 se presenta la gráfica de la concentración plasmática vs. tiempo después de la administración oral de ácido salicílico. Los valores de concentración plasmática obtenidos (Apendice D-J) se ajustaron a un modelo abierto de un compartimento cuyo modelo farmacocinético se presenta en la figura 26, con la siguiente ecuación paramétrica:

$$C_m = 23.2533 (e^{-0.2243t} - e^{-1.0331t})$$

Siebert y col. (58) realizaron un estudio en humanos donde encontraron que el ácido salicílico se ajusta a un modelo abierto de un compartimento.

De la figura 26 se observa que la velocidad de absorción es muy rápida con una vida media de 40.2 min. La constante de velocidad de eliminación obtenida es de  $0.2243 \text{ Hr}^{-1}$  muy semejante a la obtenida al administrarlo intravenosamente. La biodisponibilidad absoluta obtenida fue de 0.8485.

En la tabla XXXVII se presentan los valores de la cantidad excretada después de 48 Hrs de la administración, en la que se observa que el ácido salicílico se elimina un 53.8% por vía renal, encontrándose además que el ácido salicílico es excretado en un 23% con respecto a la dosis administrada.

TABLA XXXVII.- ANALISIS DE ORINA EXCRETADA DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE ACIDO SALICILICO POR VIA ORAL.

METABOLITO	CONCENTRACION (mcg/ml)	CANTIDAD EXCRETADA 0-48 Hrs (mg)
ACIDO SALICILICO	102.5	38.85
ACIDO SALICILURICO	45.4	17.26

## ADMINISTRACION DE GUAYACOL

### a) VIA INTRAVENOSA

En la figura 19 se observa que los valores se ajustan a un modelo abierto de un compartimento. En la figura 27 se esquematiza el modelo farmacocinético donde se observa que el tiempo de vida media del guayacol es aproximadamente de 1.1349 Hr. Al hacer una revisión de la literatura, no se encontraron reportes sobre este fármaco, sin embargo la vida media del guafenesin un derivado del guayacol, presenta un valor de  $1.2 \pm 0.201$  Hr (24) muy semejante al obtenido en este estudio. La ecuación paramétrica que describe el curso temporal es:

$$C_m = 10.5117 e^{-0.7163t}$$

Al analizar la orina excretada durante las 24 Hrs después de la administración intravenosa de guayacol se encontro que un 80.75% se excretó por vía renal.

### b) VIA ORAL

Como se puede observar en la figura 20 al administrarel guayacol por vía oral los valores se ajustan a un

modelo abierto de un compartimento. En la figura 27 se esquematiza el modelo farmacocinético donde se observa que la ecuación paramétrica obtenida:

$$C_m = 23.6805 (e^{-0.602t} + e^{-1.2696t})$$

encontrándose que la absorción es rápida, con un tiempo de vida media de absorción de 0.55 Hr, y el tiempo de vida media de eliminación es de 1.11 Hr cuyo valor es muy semejante a la administración intravenosa. La biodisponibilidad absoluta fue de 1.13, lo que indica que todo el fármaco llega a la circulación sistémica.

El análisis de orina recolectada durante las primeras 48 Hrs demostró que se excreta un 47.17% con respecto a la dosis administrada, lo cual pudiera deberse a que no todo es eliminado por vía renal.

## ADMINISTRACION DE ACIDO ACETIL SALICILICO

## a) VIA INTRAVENOSA.

Otro de los fármacos importantes a analizar era el ácido acetil salicílico, ya que es de esperarse que sea uno de los principales productos de degradación del ASAG. En el presente estudio el ASA no pudo ser detectado. Existen reportes en la literatura que indican que se hidroliza en sangre por las esterasas en un tiempo no mayor de 15 minutos, distribuyéndose inicialmente en tejidos y es rápidamente eliminado dando un tiempo de vida media de 15 a 20 minutos (33, 50). Dado que no se tomaron muestras antes de los 5 minutos esto pudo haber sucedido también en el perro.

Dado que el ASA no pudo ser detectado, se efectuó el análisis farmacocinético para el AS. En la figura 21 se presenta el perfil de concentración plasmática vs. tiempo cuyos valores se ajustaron a un modelo abierto de dos compartimentos, cuyo modelo se esquematiza en la figura 29, obteniéndose la siguiente ecuación paramétrica:

$$C_m = 7.02625 e^{-7.4022(t-0.0143)} + 6.788 e^{-0.2013(t-0.0143)} - 63.5712 e^{-8.3389(t-0.0143)}$$

Se puede observar que se obtiene un valor alto de la constante de formación de 8.3389 lo que indica que el



metabolismo del ácido acetil salicílico ocurre extremadamente rápido. El valor del tiempo de vida media de eliminación encontrado fue de 3.443 Hr siendo un valor muy semejante al encontrado por Siebert (57) en humanos.

En la tabla XXXVIII se presentan los resultados obtenidos en orina, en la que se puede observar que se elimina un 34.37% de ácido salicílico y un 6% de ácido salicílico por vía renal. Levy y col. (29) demostraron que al aumentar la dosis de ASA el porcentaje de ácido salicílico excretado por vía renal se veía disminuido, lo cual pudo haber sucedido también en los perros, ó bien pudo ocurrir la formación de glucoronidos (13) los cuales son excretados por esta vía pero no detectados por este método. En el presente estudio los resultados muestran que se excreta en mayor cantidad en forma de ácido salicílico que en ácido salicílico.

TABLA XXXVIII.- METABOLITOS OBTENIDOS EN ORINA DESPUES DE LA ADMINISTRACION DEL ASA POR VIA INTRAVENOSA.

METABOLITO	CONCENTRACION (mcg/ml)	CANTIDAD EXCRETADA 0-24 Hrs (mg)
ACIDO SALICILICO	64.06	30.11
ACIDO SALICILURICO	11.13	5.23

## b) VIA ORAL

Al administrar el ASA por vía oral, éste no pudo ser detectado. Rowland (50) cita un trabajo de Levy donde demostró la presencia de enzimas en el intestino delgado del hamster, rata y conejo, las cuales pueden hidrolizar al ASA. Esto mismo podría presentarse también en los perros beagle. El AS como producto metabólico, fue ajustado a un modelo abierto de un compartimento (figura 22). El modelo farmacocinético se presenta en la figura 29, cuya ecuación paramétrica es:

$$C_m = 69.9383(e^{-0.2325(t-0.4923)}) - 53.384(e^{-0.4932(t-0.4923)})$$

Se puede observar que el tiempo de vida media de formación es mayor al obtenido por vía intravenosa, lo cual puede deberse al proceso de absorción, ó bien a la forma de administración ya que en la formulación no se emplearon excipientes. La constante de eliminación de  $0.2325 \text{ Hr}^{-1}$  es muy semejante a la obtenida por vía IV. La biodisponibilidad absoluta dio un valor mayor de 1, lo cual podría deberse a que no se tomaron las suficientes muestras sanguíneas para caracterizar adecuadamente el ABC, ó bien una recirculación enterohepática para el ASA (50), existiendo reportes que si se presenta este fenómeno en dicho fármaco y en este caso la disponibilidad oral se vería incrementada.

Los resultados del análisis de la orina

recolectada durante las 48 Hrs después de la administración oral de ASA se presentan en la tabla XXXIX, en la que se puede observar que el AS se excreta en un 48% por vía renal y un 14% en forma de ácido salicílico. Estos valores son muy semejantes a los obtenidos después de la administración intravenosa de ASA, sin embargo un poco menores que al administrar el AS. Esto se debe a que probablemente son formados otros metabolitos que no pudieron ser cuantificados por HPLC. De acuerdo a un estudio descrito por Manson y col. (33) indican que al administrar el ASA a humanos este es absorbido completamente y que un 80% llega a la circulación general en forma no hidrolizada, excretándose un  $5.4 \pm 4.6\%$  de ácido salicílico en orina y un  $56.3\% \pm 13.8\%$  como ácido salicílico, en los perros sucedió lo contrario ya que se excreta una mayor proporción en forma de AS en comparación del ASu.

TABLA XXXIX.- METABOLITOS OBTENIDOS EN LA ORINA DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE ASA POR VIA ORAL.

METABOLITOS	CONCENTRACION (mcg/ml)	CANTIDAD EXCRETADA 0-48 Hrs (mg)
ACIDO SALICILICO	93.55	42.10
ACIDO SALICILURICO	26.80	12.05

## ADMINISTRACION DEL SALICILATO DE GUAYACOL

## a) VIA INTRAVENOSA.

En la figura 23 se observa que tanto el guayacol como el acido salicilico se ajustaron a un modelo abierto de un compartimento. En la figura 30 se presenta el modelo farmacocinético obtenido para cada uno de ellos, cuyas ecuaciones paramétricas son:

-GUAYACOL:

$$C_m = 14.426 * \exp(-0.6548(t - 0.2843)) - 9.9495 * \exp(-2.1868(t - 0.2843))$$

-ACIDO SALICILICO:

$$C_m = 28.1971 * \exp(-0.2261(t - 0.0209)) - 28.196 * \exp(-9.305(t - 0.0209))$$

Como se puede observar, ambos metabolitos se forman rápidamente ( $t_{1/2}$  guayacol: 19.2 min y  $t_{1/2}$  ácido salicilico: 6.4 min), por lo que probablemente el SAG se hidrize muy rápidamente in vivo. Las constantes de eliminación obtenidas son muy similares a las obtenidas en las administraciones anteriores, siendo para el AS de  $0.2261 \text{ Hr}^{-1}$  y para el G de  $0.6548 \text{ Hr}^{-1}$ .

Los resultados urinarios después de la administración intravenosa de salicilato de guayacol se presentan en la tabla XL, en la que se puede observar que se

excreta un 51% de guayacol, un 40% en forma de AS y un 1% en forma de ASu, por lo que se puede observar que la proporción de guayacol excretado es mayor que al administrarlo en forma de SAG.

TABLA XL- METABOLITOS OBTENIDOS EN ORINA DESPUES DE LA ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE SAG.

METABOLITO	CONCENTRACION (mcg/ml)	CANTIDAD EXCRETADA 0-24 Hrs (mg)
SALICILATO DE GUAYACOL	1.463	0.64
ACIDO SALICILURICO	2.797	1.23
ACIDO SALICILICO	138.430	60.91
GUAYACOL	107.773	47.42

b) VIA ORAL

El perfil de concentración plasmática vs. tiempo obtenido se presenta en la figura 24 donde se puede observar que tanto el ácido salicílico como el guayacol se ajustaron a un modelo abierto de un compartimento. En la figura 31 se presenta el modelo farmacocinético de dicha administración, cuyas ecuaciones paramétricas son las siguientes:

-GUAYACOL:

$$C_{m1} = 13.7446 (\text{Exp}(-0.709*t) - \text{Exp}(-1.3211*t))$$

-ACIDO SALICILICO:

$$C_{m2} = 3.5 * \text{Exp}(-0.2213*(t-0.015)) - 3.5992 * \text{Exp}(-35.2674*(t-0.015))$$

Se puede observar que las constantes de velocidad de formación obtenidas son muy grandes, lo que indica que la formación de estos metabolitos también por vía oral es muy rápida. En cuanto a las constantes de velocidad de eliminación:  $0.2213 \text{ Hr}^{-1}$  para el AS y de  $0.709 \text{ Hr}^{-1}$  para el guayacol son similares a las anteriores administraciones.

Después de la administración oral la biodisponibilidad absoluta para el G fue de 0.4598 y para el AS es de 0.1007 observando que son valores bajos por lo que probablemente en forma de salicilato la absorción se vea disminuida. Al hacer la determinación de la biodisponibilidad con los datos urinarios se encontró que para el AS presenta un valor de 1.0 y para el guayacol de 0.58.

Los metabolitos obtenidos en la orina recolectada a las 48 Hrs después de la administración se presentan en la tabla XLI:

TABLA XLI.- METABOLITOS OBTENIDOS EN ORINA DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE SAG POR VIA ORAL.

METABOLITO	CONCENTRACION (mcg/ml)	CANTIDAD EXCRETADA 0-48 Hrs (mg)
GUAYACOL	169.13	65.66
ACIDO SALICILICO	61.55	27.70

Los valores de la cantidad excretada de G representan un 55% con respecto a la dosis administrada y un 23% para el AS. Estos resultados concuerdan con los obtenidos después de la administración intravenosa de SAG, solo el ASu no fue excretado.

## ADMINISTRACION DE ACETIL SALICILATO DE GUAYACOL.

### a) VIA INTRAVENOSA.

En la figura 25 se presentan los perfiles de concentración plasmática vs. tiempo obtenidos después de la administración intravenosa de ASAG los cuales muestran que el salicilato de guayacol y el guayacol se ajustaron a un modelo abierto de dos compartimentos y el AS a un modelo abierto de un compartimento. En la figura 32 se presenta el modelo farmacocinético ajustado cuyas ecuaciones paramétricas son:

-GUAYACOL:

$$C_{m1} = 9.7867 * \text{Exp}(-18.7379(t-0.0333)) + 9.858 * \text{Exp}(-0.8931(t-0.0333)) - 12.899 * \text{Exp}(-4.9984(t-0.0333))$$

-SALICILATO DE GUAYACOL:

$$C_{m2} = 4.1425 * \text{Exp}(-30.4779(t-0.0922)) + 3.0104 * \text{Exp}(-0.897(t-0.0922)) - 3.4522 * \text{Exp}(-6.9252(t-0.0922))$$

-ACIDO SALICILICO:

$$C_{m2} = 19.896 (\text{Exp}(0.2319*mt) - \text{Exp}(2.5709*mt))$$

Se observa que las constantes de velocidad de formación de todos los metabolitos son grandes y principalmente



el guayacol, por lo que su tiempo de vida media de formación para el SAG es de 0.1006 Hr, para el G de 0.1387 Hr y para el AS de 0.2695 Hr, y con lo que respecta al tiempo de vida media de eliminación para el SAG es de 0.7708 Hr, para el G de 1.1119 Hr y para el AS de 2.9454 Hr.

En la figura 15 y 32 se puede observar que los modelos no son iguales lo cual puede deberse a la variabilidad interindividual, dado que en el estudio preliminar se utilizó un perro criollo, y se administró una dosis de 89.5 mg y en el segundo animal la dosis fué de 94.2 mg lo cual pudo haber influido en la determinación de las constantes de formación, sin embargo tanto el G, como el AS y SAG se ajustaron al mismo modelo y sus constantes de eliminación son muy semejantes. Al comparar la administración del ASAG con la del ASA se encontró que los niveles plasmáticos son equivalentes para la administración intravenosa y por lo tanto se tendría los efectos farmacológicos esperados.

En la tabla XLII se presentan los resultados obtenidos al analizar la orina recolectada a las 24 Hrs. excretándose un 33.3% en forma de AS y un 33.5% en forma de G y el ASu en un 25.9%, comparando con los resultados del estudio preliminar se elimina un 14% de AS, en cambio el G y ASu son excretados en cantidades muy similares.

TABLA XLII.- METABOLITOS ANALIZADOS EN ORINA DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE ASAG POR VIA IV.

METABOLITOS	CONCENTRACION (mcg/ml)	CANTIDAD EXCRETADA 0-24 Hrs (mg)
GUAYACOL	131.70	35.56
ACIDO SALICILICO	131.04	35.38
ACIDO SALICILURICO	90.26	24.36

b) VIA ORAL.

Al administrar el ASAG por vía oral se obtuvieron los niveles plasmáticos del AS y G, se ajustaron a un modelo abierto de un compartimento donde es presentado el perfil de concentración plasmática vs. tiempo en la figura 28. El modelo farmacocinético es esquematizado en la figura 33. Como resultado se obtuvieron las siguientes ecuaciones paramétricas:

-GUAYACOL:

$$C_{m1} = 3.5849 (\text{Exp}(-0.7374t)) - \text{Exp}(-1.0496t)$$

-ACIDO SALICILICO:

$$C_{m2} = 10.051 \text{Exp}(-0.225(t-0.4617)) - 6.4452 \text{Exp}(-0.5343(t-0.4617))$$

En esta administración el salicilato de guayacol y el ácido acetyl salicílico no pudieron ser detectados quizá debido a que la velocidad de formación del AS se ve incrementada, o bien el SAG y AS probablemente son rápidamente metabolizados en perro. Los tiempos de velocidad de formación para el G es de 0.6603 Hr y para el AS es de 1.297 Hr, siendo elevado este último valor en AS debido probablemente al proceso de absorción.

De los resultados obtenidos se encontró que el fármaco se hidroliza rápidamente, siendo sus principales productos metabólicos el AS y G, los cuales se encuentran en mayor proporción, siendo estos los metabolitos que ejercen la actividad farmacológica. Los niveles plasmáticos alcanzados no son equivalentes a los encontrados al administrar cada uno de ellos por separado, por lo que sería necesario realizar un ajuste de dosificación en la administración oral de ASAG aumentando la dosis de 169.5 mg aproximadamente a un perro de 8 Kg. Dado a que en esta administración el ASA no pudo ser detectado, es probable que el efecto analgésico no sea tan pronunciado, sin embargo para corroborarlo sería necesario administrar el fármaco en humanos, ya que en perros metabolizan el ASA tres veces más rápido que el humano (62). El modelo farmacocinético obtenido fue más sencillo que al administrar el ASAG intravenosamente, lo cual puede deberse al efecto del primer paso. Las constantes de velocidad de eliminación dieron valores muy semejantes a los obtenidos en las anteriores

administraciones, siendo para el AS de  $0.2250 \text{ Hr}^{-1}$  y para el guayacol de  $0.7374 \text{ Hr}^{-1}$ .

Al analizarla orina recolectada a las 24 primeras horas después de la administración del ASAG por vía oral, se observa en la tabla XLIII que los metabolitos excretados son G, AS y ASu, siendo tanto el guayacol y ácido salicílico eliminados en igual proporción en un 26% con respecto a la dosis administrada y el ASu en un 22% cantidad muy semejante a la excretada al administrar el ASAG por vía intravenosa. Con estos datos de orina se corrobora lo que se obtiene en las concentraciones plasmáticas por lo que no es equivalente la dosificación administrada oralmente de ASAG.

TABLA XLIII.- METABOLITOS OBTENIDOS EN ORINA DESPUES DE LA ADMINISTRACION DEL ASAG POR VIA ORAL.

METABOLITOS	CONCENTRACION (mcg/ml)	CANTIDAD EXCRETADA 0-24 Hrs (mg)
GUAYACOL	114.71	24.30
ACIDO SALICILICO	114.13	24.15
ACIDO SALICILURICO	78.58	21.08

ANEXO. CRITERIO PARA LA SELECCION DEL MODELO FARMACOCINETICO EN EL ESTUDIO DE LA ADMINISTRACION DE ASAG, SAG, ASA, AS, Y G POR VIA IV Y ORAL EN PERROS BEAGLE.

FARMACO ADMINIS- TRACION	VIA DE ADMINIS- TRACION	FARMACOS ENCUENTRA- DOS	CRITERIO DE A-RIFE				COEFICIENTE DE VARIACION			COEFICIENTE DE REGRESION			
			(a)	(b)	(c)	(d)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	
ASAG	IV	SAG	2.111	0.92	-	-	9	-	-	0.070	0.989	-	-
		G	-	0.76	0.8	-	-	0.7	-	-	0.962	0.905	-
ASAG	ORAL	G	-	0.021	0.001	-	-	0.07	-	-	0.992	0.950	-
		AS	-	0.011	-	-	-	-	-	-	0.990	-	-
SAG	IV	G	-	0.110	0.001	-	-	0.070	-	-	0.992	0.992	-
		AS	-	0.021	0.001	-	-	0.140	-	-	0.997	0.998	-
SAG	ORAL	G	-	0.020	-	-	-	-	-	-	0.992	-	-
		AS	-	0.011	-	-	-	-	-	-	0.992	-	-
ASA	IV	AS	-	0.072	0.001	-	-	0.01	-	-	1.000	0.999	-
		AS	-	0.011	-	-	-	-	-	-	0.992	-	-
G	IV	G	0.925	0.011	-	-	0.024	-	-	0.046	0.993	-	-
		G	-	0.011	-	-	-	-	-	-	0.992	-	-
AS	IV	AS	0.047	0.001	-	-	0.002	-	-	0.995	0.995	-	-
		AS	-	0.002	-	-	-	-	-	-	0.992	-	-

\* SIMPLICIDAD AL SER DE CONFANZA

\*\* NO SIMPLICIDAD AL SER DE CONFANZA

(1), (2), (3), (4) & DE COMPLEMENTOS EN LA FLECHA LA PULSA EN F  
ECONOM LOS DOS MODELOS QUE DE VALORES

TABLA XLV.- RESULTADOS OBTENIDOS EN URINA EN CADA UNO DE LOS ESTUDIOS

PARADIGMA ADMINISTRATIVO	VIA DE ADMINISTRACION	DOSIS (mg)	TIEMPO DE MUESTREO (hrs)	VOLUMEN DE URINA RECOLECTADA (ml)	pH DE URINA	PROMEDIOS RECOLECTADOS (mg)				EXCRETADO (CON RESPECTO A LA DOSIS ADMINISTRADA)			
						SA	AS	G	ASU	SAG	AS	G	ASU
1146	IV	50.0	24	270	5.5	-	80.0	70.0	70.0	-	31.80	59.50	25.80
AS16	ORAL	20.0	72	420	5.5	-	70.0	70.0	70.0	-	5.67	25.40	22.00
1147	IV	100.0	24	270	6.0	70.0	60.0	70.0	70.0	5.50	31.80	59.50	1.00
1148	ORAL	100.0	72	420	6.5	-	70.0	70.0	-	-	55.50	25.50	-
1149	IV	50.0	24	270	6.5	-	70.0	-	5.00	-	50.00	-	5.00
1150	ORAL	20.0	72	420	6.5	-	70.0	-	12.00	-	40.00	-	11.70
1151	IV	60.00	24	400	6.0	-	-	80.00	-	-	-	60.00	-
1152	ORAL	60.00	72	400	6.0	-	-	12.00	-	-	-	42.00	-
1153	IV	32.00	24	270	6.0	-	60.00	-	-	-	62.00	-	6.5
1154	ORAL	32.00	72	420	6.5	-	70.00	-	12.00	-	58.00	-	25.0

\*\* al final del estudio  
ADU: dosis administrada.

TABLA No. XI.VI.-PARAMETROS FARMACOCINETICOS OBTENIDOS POR EL METODO DE LOS RESIDUOS

FARMACO ADMINIS TRADO	VIA DE ADMINIS TRACION	FARMACOS ENCONTRADOS	COEFICIENTES DE LA ECUACION PARAMETRICA	$k_{12}$ (hr <sup>-1</sup> )	$k_{21}$ (hr <sup>-1</sup> )	$k_{10}$ (hr <sup>-1</sup> )	$t_{1/2}$ (hr)	$t_{1/2}$ (hr)	$t_{1/2}$ (hr)	$t_D$ (hr)	DOSIS Mg (mg/Kg)	PESO DEL RESACA (Kg) (300)	MODELO FARMA COCINETICO
ASAG	IV	SAG	A=5.5235	-	0.432	0.000	-	1.98	0.192	-	94.2 (11.78)	9.0 (M)	MUC
		G	A=2.1751	-	0.000	0.298	-	1.98	0.210	-			MUC
		AS	A=10.5960	-	0.432	0.000	-	2.59	0.225	-			MUC
ASAG	ORAL	G	A=6.4174	-	0.408	0.000	-	1.81	0.174	0.0768	94.2 (11.78)	9.0 (M)	MUC
		AS	A=10.9808	-	0.279	0.000	-	3.19	1.007	0.1817			MUC
SAG	IV	G	A=2.0977	-	0.256	0.000	-	2.40	0.109	-	118.75 (10.05)	11.5 (M)	MUC
		AS	A=20.0590	-	0.256	0.000	-	2.59	0.225	0.0020			MUC
SAG	ORAL	G	A=0.5821	-	0.000	0.000	-	1.01	0.165	-	118.75 (10.06)	11.5 (M)	MUC
		AC	A=0.5821	-	0.259	0.000	-	2.99	0.156	0.0008			MUC
ASA	IV	AC	A=10.1511	-	0.000	0.000	-	0.00	0.000	-	27.57 (7.24)	11.5 (M)	MUC
		AS	A=52.4010	-	0.000	0.000	-	0.62	1.074	0.1194			MUC
G	IV	G	A=8.4447	-	0.000	-	-	1.69	-	-	69.02 (5.13)	13.5 (M)	MUC
		G	A=23.0871	-	0.000	0.000	-	1.68	6.505	-			MUC
AS	IV	AS	A=23.8425	-	0.000	-	-	2.73	-	-	72.64 (5.68)	12.9 (M)	MUC
		AS	A=23.4440	-	0.000	0.000	-	2.47	0.788	-			MUC

TABLA No. XLVII.-PARAMETROS FARMACOCINETICOS OBTENIDOS POR EL ALGORITMO DE MARQUARD

FARMACO ADMINIS- TRADO	VIA DE ADMINIS- TRACION	FARMACOS ENCONTRA- DOS	COEFICIENTES DE LA ECUACION PARAMETRICA	$k$ (hr <sup>-1</sup> )	$k_1$ (hr <sup>-1</sup> )	$k_2$ (hr <sup>-1</sup> )	$T_{1/2}^1$ (HR)	$T_{1/2}^2$ (HR)	$T_{1/2}^3$ (HR)	$T_0$ (HR)	DOSIS MG (MG/KG)	PESO DEL PERRO (KG) (SEVO)	MODELO FARMACOCINE- TICO
ASAG	IV	SAG	$A=9.125$ $k=3.657$	50.079	0.899	5.952	0.077	0.701	0.106	0.030	94.2 (11.78)	8.0 (M)	MDC
		G	$A=9.705$ $k=3.657$	12.759	0.899	5.952	0.077	0.701	0.106	0.030			
		AS	$A=19.769$ $k=3.657$	-	0.899	5.952	-	0.701	0.106	0.030			
ASAG	ORAL	G	$A=3.5-9$	-	0.774	1.046	-	0.997	0.602	-	94.2 (11.78)	8.0 (M)	MUC
		AS	$A=4.462$ $k=10.064$	-	0.774	0.594	-	0.997	0.602	0.467			
SAG	IV	G	$A=9.945$ $k=11.470$	-	0.668	2.186	-	1.565	0.319	0.765	119.73 (10.06)	11.8 (M)	MUC
		AS	$A=29.195$ $k=29.195$	-	0.751	3.520	-	1.041	0.474	0.029			
SAG	ORAL	G	$A=13.746$	-	0.706	1.511	-	0.974	0.525	-	119.73 (10.06)	11.8 (M)	MUC
		AS	$A=3.592$ $k=5.517$	-	0.774	0.594	-	1.187	0.096	0.550			
ASA	IV	AC	$A=2.702$ $k=63.573$	2.402	0.577	1.189	0.067	3.467	0.291	0.043	27.62 (7.43)	11.8 (M)	MDC
		AS	$A=1.879$ $k=69.959$	-	0.273	0.967	-	2.183	1.050	0.422			
G	ORAL	G	$A=10.517$	-	0.716	-	-	0.973	-	-	59.92 (5.15)	3.5 (M)	MUC
		G	$A=23.685$	-	0.600	1.296	-	1.151	0.569	-			
AS	IV	AS	$A=2.463$	-	0.257	-	-	0.801	-	-	72.54 (5.68)	12.8 (M)	MUC
		AS	$A=23.685$	-	0.743	1.047	-	0.996	0.076	-			



TABLA XLVIII-A. PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS OBTENIDOS POR LAS FORMULAS CORRESPONDIENTES

FARMACO ADMINISTRADO	VIA DE ADMINISTRACION	FARMACO ENCONTRADO	AEC (mg/ml)	C <sub>p</sub> máx (mg/ml)	T <sub>1/2α</sub> (h)	T <sub>1/2β</sub> (h)	T <sub>1/2γ</sub> (h)	F <sub>p</sub> (biológico)	F <sub>p</sub> (analítico)	F <sub>r</sub> <sup>c</sup> (con respecto al recubrimiento)	k <sub>12</sub> (h <sup>-1</sup> )	k <sub>21</sub> (h <sup>-1</sup> )
ASAG	IV	SAG	3.2445	6.76	0.2155 (0.157)	0.8350	0.7768				15.25	13.34
		G	11.5840	10.76	0.757 (0.57)	0.6242	1.1119		0.5341		9.69	9.79
		AS	72.8295	11.40	1.0250 (0.82)	0.2457	2.5454		0.6502			
ASAG	ORAL	G	15.2162	8.70	1.1720 (1.1)	0.6275	1.0154	1.0003	0.7589			
		AS	43.8150	4.19	2.6470 (2.475)	0.2453	2.6870	0.5165	0.4679			
SAG	IV	G	19.4178	4.67	0.7850 (0.729)	0.6787	1.0520		0.8567			
		AS	150.664	25.60	0.9054 (0.49)	0.2544	2.9507		1.1824			
SAG	ORAL	G	3.1105	3.00	1.0113 (0.531)	0.7165	0.9671	0.4593	0.9606			
		AS	15.1643	3.24	2.4200 (1.5)	0.2577	2.7422	0.1007	0.1191			
ASA	IV	AS	38.2095	15.60	2.4330 (0.4)	0.2511	2.7594		0.3521		3.613	3.740
		AS	121.2537	13.60	0.2257 (0.3)	0.2457	2.9392	3.1733	1.1827			
G	ORAL	G	19.2500			0.5137	1.1346					
		G	21.7773	6.36	1.0000 (1.0)	0.5636	1.0342	1.1512				
AS	ORAL	AS	49.3030			0.7042	2.3114					
		AS	75.1025	11.54	1.7250 (1.3)	0.2832	2.4571	0.4165				

de las ecuaciones E. Fórmulas 14  
de las ecuaciones E. Fórmulas 11  
de las ecuaciones E. Fórmulas 12

TABLA XLVIII-2. PARAMETROS OBTENIDOS POR LAS FORMULAS CORRESPONDIENTES

FARMACO ADMINISTRADO	VIA DE ADMINISTRACION	FARMACOS EN CONTRA	a (%)	b (Lc)	c Veloc. (Lc)	d Veloc. (Lc)	e (Lc)	Velocidad (Lc/Hr)	f (Lc/Hr)	g (Lc/Hr)	h (Lc/Hr)	i (Lc/Hr)
ASAG	IV	SAJ		37.95	29.880	12.89	12.45		15.930	0.000	11.439	11.45
		G	0.4551	13.94	11.355	8.28	6.62	4.9	8.275	3.124	5.151	5.16
		AS	0.5246	5.26	4.558	5.49	3.08		1.245	0.485	0.807	0.82
ASAG	ORAL	G				3.51	0.98			1.499		5.81
		AS				3.05	3.01	4.2		0.666		0.75
SAG	IV	G	0.5862	11.07	11.950	2.13	6.99		6.115	3.137	2.577	6.11
		AS	1.0250	5.32	4.210	3.35	1.92	7.08	0.788	0.078	0.703	0.78
SAG	ORAL	G				8.53	8.45			7.176		5.62
		AS				5.17	1.30	7.08		0.508		0.79
ASA	IV	AS	0.3575	6.10	6.344	3.20	3.04		7.295	0.994	1.299	0.80
		ORAL	AS	1.3201	6.99		5.06	3.66	7.08		0.347	
G	IV	G			7.566	6.97	5.51		3.595	2.178	1.407	5.15
		ORAL	G		10.17		6.28	6.21	8.1		1.495	
AS	IV	AS			5.177	2.74	2.57		7.68	0.808	0.556	0.252
		ORAL	AS		5.88		2.85	2.85			0.510	

a\* Ver apéndice E. Fórmula 12  
 b\* Ver apéndice E. Fórmula 9  
 c\* Ver apéndice E. Fórmula 4  
 d\* Ver apéndice E. Fórmula 7

e\* Ver apéndice E. Fórmula 10  
 f\* Ver apéndice E. Fórmula 15  
 g\* Ver apéndice E. Fórmula 16

TABLA XLIX. PARAMETROS FARMACOCINETICOS OBTENIDOS COMO MODELO INDEPENDIENTE

FARMACO ADMINIS TRADO	VIA DE ADMINIS TRACION	FARMACOS ENCONTRA DOS	AUC $\frac{(\mu\text{g}\cdot\text{hr})}{\text{ml}}$	AUMC $\frac{(\mu\text{g}\cdot\text{hr})^2}{\text{ml}}$	TMR <sup>a</sup> (Hr)	VPT <sup>b</sup>	TMR <sup>c</sup> (Hr)	VRT <sup>d</sup> g	$\frac{\text{TMR}_g}{\text{TMR}(\%P)}$	$\frac{\text{VRT}_g}{\text{VRT}(\%P)}$	F <sup>e</sup>	TMR <sup>c</sup> (Hr)
ASAG	IV	SAG	5.4412	8.8797	1.6060	3.602						1.1048 1.4810
		G	16.1767	31.1623	1.9261	4.809						
		AS	72.8278	270.5462	3.7149	20.511						
ASAG	ORAL	G	15.5003	40.5964	2.6191	9.874	0.7649	5.0653	29.20	51.27	0.95	
		AS	56.1390	194.1154	5.3714	37.330	1.6561	16.7250	30.80	49.92	0.49	
SAG	IV	G	18.7061	48.8876	2.0125	9.341						
		AS	121.1748	548.8945	5.0359	12.279						
SAG	ORAL	G	8.4175	14.1344	1.0797	3.594					0.45	
		AS	15.1563	24.9901	1.6488	5.049					0.12	
ASA	IV	AS	40.8229	121.8214	2.9344	12.417						2.8470
		AS	162.9643	938.1268	5.7566	40.709	2.7222	28.2921	48.15	69.49	3.99	
E	IV	G	16.4157	21.5325	1.3114	2.246						
		G	21.9555	50.3821	2.2946	2.553	0.9837	5.3069	42.84	20.25	1.33	
AS	ORAL	AS	33.8772	278.0285	3.1284	14.826						
		AS	75.9559	331.3566	4.3623	26.4548	0.8359	11.6283	27.50	43.21	0.86	

a- De acuerdo a fórmula 1  
b- Ver apéndice E: fórmula 1  
c- Ver apéndice E: fórmula 1

d- Ver apéndice E: fórmula 3  
e- Ver apéndice E: fórmula 3

En base a los resultados obtenidos se encontró que el ASAG (donde el grupo carboxilo libre del ASA se encuentra unido al guayacol), no pudo ser cuantificado y esto se debe a que es rápidamente metabolizado a, SAG, el cual a su vez es rápidamente hidrolizado en AS y G. Esto representa una ventaja ya que el AS presenta actividad antiinflamatoria y antipirética y el G la actividad expectorante. Es probable que la propiedad analgésica se vea disminuida ya que no pudo ser cuantificado el ASA, lo cual puede deberse a la falta de estabilidad del fármaco ó que no se tomaron muestras suficientes al inicio del estudio; así mismo se ha encontrado que el ASA es más rápidamente metabolizado en perros que en humanos. Para poder corroborar todos los resultados al administrar el ASAG sería conveniente buscar un estabilizador, ya que en este estudio al ser preparado el inyectable, este se hidrolizaba rápidamente. Por vía oral también sería necesario adicionar un excipiente adecuado para incrementar la solubilidad, teniendo cuidado en evitar una interacción potencial con el fármaco.

En la tabla XLIV se presentan los parámetros empleados para la selección del modelo farmacocinético en cada una de las administraciones los cuales fueron: el criterio de Akaike, la prueba de F y el coeficiente de regresión en la que se puede observar que todos los metabolitos se ajustaron a un modelo abierto de un compartimento a excepción del G y SAG después de la administración intravenosa de ASAG y el AS después de la administración intravenosa de ASA. Sería conveniente

utilizar el programa de NON-LIN (38) con el fin de corroborar los valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos.

En la tabla XLV se reportan los metabolitos excretados por vía renal, en la que se puede observar que en las diferentes administraciones no se excretaron el 100% con respecto a la dosis administrada, lo cual puede deberse a que se eliminaron por otras vías ó bien a que se excreten en forma de metabolitos ó conjugados. También se puede observar que el porcentaje de excreción por vía renal del ASu no puede ser despreciado, ya que da valores de excreción altos. Además se observa que tanto el guayacol como el AS se eliminan aproximadamente en un 25% de cada uno después de la administración del ASAG por vía oral, valores diferentes de los obtenidos después de la administración del AS (88%) y el G (60%), lo que se puede deber a que la dosis no sea equivalente, por lo que sería necesario administrar una dosis más alta. Al administrar el SAG se excreta en mayor cantidad en forma de AS que después de la administración del ASAG, sin embargo, el ácido salicílicúrico se excreta en pequeña cantidad y el guayacol es eliminado en cantidades semejantes que las obtenidas con el guayacol solo.

Los parámetros farmacocinéticos calculados utilizando el método de los residuos se presentan en la tabla XLVI, siendo estos los estimados iniciales, y en la tabla XLVII se presentan los calculados por el algoritmo de Marquard, en los que se puede observar que la constante de velocidad de formación

del G es muy semejante después de la administración del ASAG que la constante de velocidad de absorción al administrar el G solo, sin embargo el AS presenta un valor de  $T_{m\acute{a}x}$  prolongado al administrar el ASAG por vía oral dando un valor de 2.7 Hr mientras que al administrar el AS presenta un valor de 1.7 Hr, para el G no se ve alterado. Esto puede deberse probablemente a que el AS presenta problemas de absorción, lo mismo ocurre al administrar el SAG por vía oral. En todos los casos la velocidad de eliminación es la misma. Se puede observar que el guayacol presenta un tiempo de vida de eliminación de 0.99 Hr mientras que el AS es de 2.9 Hr aproximadamente. En base a estos resultados se postula que la eliminación del guayacol depende de la velocidad de hidrólisis del ASAG.

En la tabla XLVIII-A y XLVIII-B se presentan algunos de los parámetros obtenidos como el  $ABC_0$ , el  $Cp_{m\acute{a}x}$  observado,  $T_{m\acute{a}x}$  observado, la constante de velocidad de eliminación, el tiempo de vida media biológico, la biodisponibilidad absoluta, el volumen de distribución extrapolado, volumen de distribución de área, volumen de distribución en estado estacionario y la depuración renal. Los volúmenes de distribución sobrepasan el valor del volumen de agua corporal total de perro (599 ml/Kg) (11), ya que el guayacol presenta un valor de 8.28 lt y el SAG de 1.89 lt, por lo que el fármaco se encuentra localizado en tejidos ó en compartimento más profundo como lípidos, ó bien es secuestrado en un sitio extravascular. El valor encontrado para el AS fué de

3 lt aproximadamente lo que indica que se encuentra en el agua corporal total y liquido extracelular. Se puede observar que en el volumen de distribución del AS existe una pequeña variación del valor, lo cual puede deberse a que al administrar el ASAG, SAG, ASA estos son metabolizados e hidrolizados para posteriormente para obtener el AS; además de que estos estudios fueron realizados en diferentes perros (un estudio por animal) y puede existir alguna variación interespecie, siendo que en estudios anteriores (23) se ha observado que profarmacos del ácido acetyl salicílico presentan gran variabilidad interespecie.

En la misma tabla (XLVIII-B) se observa que la depuración sistémica del G (calculada mediante la ecuación  $Vd \cdot \beta$ ) es de 5.16 lt/Hr y de 5.81 lt/Hr después de la administración oral de ASAG siendo ambos valores muy semejantes a los obtenidos al administrar el G solo tanto por vía IV y oral (5.2 lt/Hr), sin embargo para el SAG su valor es más elevado de 11.5 lt/Hr aproximadamente después de la administración IV de ASAG. Para el AS el valor de la depuración es menor: 1 lt/Hr (0.8 lt/Hr aprox.). Goldstein y col. (19) han relacionado la depuración sistémica, el tiempo de vida media de los metabolitos y el volumen de distribución, con el fin de determinar el mecanismo de eliminación. En el presente trabajo se tiene que para el SAG su depuración se lleva a cabo por secreción tubular, mientras que el G que presenta una depuración de 5.16 lt/Hr con una vida media de 1.1 Hr y un volumen de distribución alto su mecanismo

sería por filtración glomerular y secreción tubular. En el caso del AS la depuración se lleva a cabo por filtración glomerular. Mediante estos valores se puede saber si la depuración corporal total va a depender del flujo sanguíneo hepático y así establecer si es probable que exista recirculación enterohepática, estableciendo una depuración intrínseca.

Con lo que respecta a la biodisponibilidad para cada uno de los metabolitos producidos, al administrar el ASAG se encontró que es un poco baja, ya que al administrarlo como ASAG por vía intravenosa el  $C_{pmax}$  es igual al alcanzado al administrar el AS; además sus niveles plasmáticos son muy semejantes, siendo corroborados estos resultados con los metabolitos eliminados por orina, observando que son excretados en poca proporción al ser administrado el ASAG por vía oral, por lo que sería necesario realizar un ajuste de dosificación para que los niveles sean muy semejantes a los obtenidos después de la administración de AS y G.

Al comparar los valores de  $C_{pmax}$  (tabla XLVIII-A) se observa que al administrar el ASAG por vía oral los niveles del AS alcanzados no son iguales que al administrarlo solo, lo que puede deberse a que la dosificación no es equivalente ó bien a la baja solubilidad del ASAG, lo cual afectan la biodisponibilidad.

En el caso de la administración del SAG, los valores de  $C_{pmax}$  tanto para el G como el AS se ven disminuidos en comparación al AS y G solos, lo que indica que su



biodisponibilidad es baja, por lo que no sería adecuado administrarlo en esta forma.

Al determinar la biodisponibilidad relativa del ASAG con respecto a sus metabolitos administrados por separado, se encontró que para el G solo se obtiene un valor de 0.753 y para el AS de 0.4674 lo que indica que sería conveniente además de ajuste de dosificación, si fuera problema de absorción al administrarlo en forma oral mediante una suspensión adicionarle un tensoactivo como el Tween 60 (12) ó micronizando el principio activo con el fin de favorecer la solubilidad del fármaco. Sin embargo, dado a que también la administración IV presenta una biodisponibilidad relativa baja el problema podría deberse a que la dosificación no es equivalente.

Al analizar los resultados en orina se puede ver que el AS y G se excreta aproximadamente en un 50% al administrar los metabolitos por separado, por lo que a pesar de que fue equimolar en relación a ambos fármacos la dosificación no es equivalente.

Con lo que respecta al  $T_{max}$  para el G se ve alcanzado en un tiempo muy semejante al administrar el G solo, mientras que para el AS se ve modificado en un 36% aproximadamente, lo cual puede deberse al proceso de metabolismo.

Pang y col. (45) realizaron un estudio en el que demostraron el efecto de la vía de administración sobre el ABC del metabolito cuando el intestino, hígado, pulmón y riñón son órganos de formación de los metabolitos y eliminación del fármaco

y metabolitos, indicando que si las ABC de los metabolitos producidos para la administración IV y oral son iguales esto demuestra que el fármaco es eliminado por medio del metabolismo en uno de los siguientes órganos: intestino, hígado, pulmón o riñón y además es independiente de la vía de eliminación del metabolito. En el caso del presente trabajo se encontró que al administrar el ASAG el metabolismo podría ocurrir tanto en el intestino como hígado, analizando los valores del G. Al efectuar el análisis del AS dado a que el ABC es mas pequeña al administrar el ASAG por vía oral que por vía IV, por lo que el ASAG puede ser metabolizado en intestino e hígado, lo cual concuerda con los datos obtenidos con el G. Sin embargo para conocer con mayor precisión el fenómeno sería necesario administrar el ASAG por vía intraportal y por vía intraarterial, y poder así deducir en que órgano esta ocurriendo la eliminación del fármaco por metabolismo.

Los parametros farmacocinéticos calculados como modelo independiente utilizando momentos estadísticos de acuerdo a Yamaoka (73), se encuentran en la tabla XLIX, observándose que el TMR del G al administrar el ASAG por vía IV fue de 1.92 Hr. Al administrar el guayacol por vía oral su TMR es de 2.29 Hr el cual es muy semejante al determinado al administrar el ASAG por vía oral de 2.61 Hr. Este mismo valor se obtuvo al administrar intravensamente el SAG. Para el caso del análisis del AS como metabolito, el TMR al administrar el ASAG por vía oral fue de 5.37 Hr y al administrar el ASA oral es de 5.75 Hr mientras que

al administrar el AS solo es de 4.47 Hr. De acuerdo a los valores reportados por McNamara y col. (37) el TMR para el AS es de 8.4 y un TMR<sub>periférico</sub> de 2.54 Hr. En el presente estudio, el valor del TMR<sub>periférico</sub> calculado de acuerdo a la ecuación 5 del apéndice E es de 1.48 Hr. por lo que los valores encontrados son un poco más bajos que los reportados.

Al calcular la biodisponibilidad de acuerdo a Yamaoka (73), se observa para el guayacol un valor de 0.95 y para el AS de 0.498 cuyos valores son muy semejantes a los reportados en la tabla XLVIII-A, lo que indica que el cálculo de biodisponibilidad como modelo independiente es adecuado.

Cabe mencionar que en el perfil de concentración plasmática vs. tiempo del guayacol, en todas las administraciones se presentó un doble pico, el cual se presentaba entre los 0.5 y 0.75 Hr. lo cual puede deberse a una recirculación enterohepática, o bien a que queda atrapado en tejido (5), o bien a la posibilidad de formación de otro metabolito que se detectara al mismo tiempo que el guayacol.

Existen reportes en la literatura indicando que el guaifenesin que es derivado del guayacol presenta un doble pico entre los 30 ó 59 minutos al ser administrado a caballos (17); o bien, debido a que el guayacol puede sufrir una metilación (31) y podría ser que existiera una interferencia en el tiempo de retención. Schun-Ichiwato y col. (86) administraron por vía oral el mononicotinato del éter glicérico del guayacol encontrando una disminución de la concentración

después de una hora de ser administrado. Con respecto a otros fármacos, la morfina presenta un doble pico después de la administración intravenosa, en este estudio los autores concluyen que se debió a recirculación enterohepática; por lo que sería conveniente realizar un estudio para corroborar estas hipótesis propuestas.

En la figura 34 se presentan algunos de los perfiles de Cp-tiempo donde se observa claramente el doble pico para el guayacol, el cual se presentó en todas las administraciones.

Para determinar la posibilidad de la presencia de recirculación enterohepática, Cloter y col. (5) proponen calcular la depuración intrínseca mediante la siguiente ecuación:

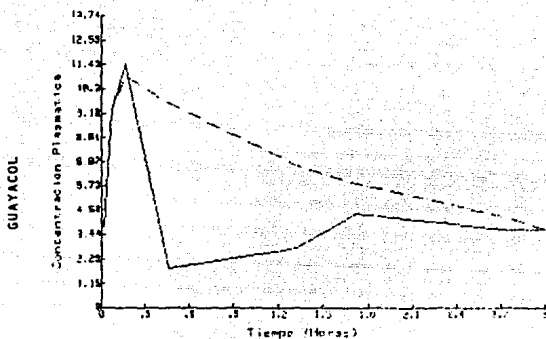
$$Cl_r = \frac{HBF \times Cl_{tr}}{HBF - Cl_{tr}}$$

donde HBF = el flujo sanguíneo hepático = 40ml/min/Kg(C110).

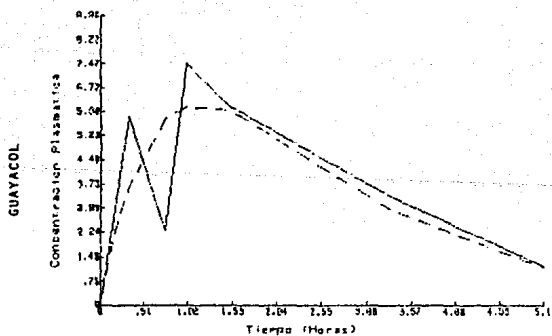
$Cl_{tr}$  = depuración corporal total.

Si el valor de la depuración intrínseca es mayor que el de la depuración sistémica teórica obtenida con los resultados del experimento, la depuración corporal total va a depender del flujo sanguíneo hepático.

El cociente de extracción hepática se calculó utilizando la siguiente fórmula:



#### ADMINISTRACION INTRAVENOSA DE ASAG



#### ADMINISTRACION DE GUAYACOL POR VIA ORAL

FIGURA 34. CURVAS DE CONCENTRACION PLASMATICA VS. TIEMPO DE GUAYACOL DESPUES DE DIFERENTES ADMINISTRACIONES (ASAG Y G)

$$ER = \frac{Cl_i}{HBF + Cl_i}$$

Si ER es muy grande entonces el fármaco se elimina por vía hepática y se extrae por hígado. Si E=1.0 la eliminación depende del flujo sanguíneo hepático y si E=0.5 es variable su dependencia.

Los valores obtenidos en las diferentes administraciones se describen en la tabla L donde se observa que el valor de la depuración intrínseca obtenido para el SAG es de 28.36 lt/Hr y su depuración sistémica es de 11.45 lt/Hr por lo que la depuración corporal total depende del flujo sanguíneo hepático. Para el guayacol la depuración intrínseca fue de 7.8 lt/Hr aproximadamente en las diferentes administraciones, siendo este valor, mayor que el de la depuración sistémica que es de 5.2 lt/Hr aproximadamente, por lo que es posible que la depuración del guayacol sea dependiente del flujo sanguíneo hepático. Para el AS el valor de la depuración intrínseca fue igual al de la depuración sistémica concluyéndose que la depuración de este fármaco no es dependiente del flujo sanguíneo hepático. Los cocientes de extracción para el SAG y el G fueron de 0.6 y 0.13 respectivamente, lo cual indica que este último fármaco requeriría de más estudios para evidenciar la dependencia del flujo sanguíneo hepático. En base a estos resultados se postula la probabilidad de recirculación enterohepática tanto para el

**TABLA L.- DETERMINACION DE LA DEPURACION INTRINSECA EN LAS DIFERENTES ADMINISTRACIONES**  
**(DEFECTOS DEL FLUJO SANGUINICO HEPATICO)**

FARMACO ADMINIS- TRACION	VIA DE ADMINIS- TRACION	FARMACOS ENCONTRA- DOS	$AUC_{0-\infty}$ (MCG-HR)	$V_d^b$ (LT)	$t_{1/2}^a$ (H)	$f_e \cdot V_d$ (%)	$Cl_{TH}$ (LT/HR)	$Cl_T$ (LT/HR)	EP
ASAG	IV	SAG	8.2345	12.890	15.570	100.0	11.450	28.360	0.556
		G	11.3940	8.280	2.554	23.5	5.160	7.056	0.269
		AS	22.8276	3.402	2.674	100.0	0.621	0.658	0.042
ASAG	ORAL	S	16.2161	8.511	19.576	100.0	5.806	8.327	0.303
		AS	39.8140	4.065	4.872	100.0	0.347	0.777	0.031
SAG	IV	S	19.4142	9.294	14.719	100.0	6.115	7.259	0.216
		AS	150.6649	3.360	3.546	100.0	0.748	0.810	0.078
SAG	ORAL	G	9.1505	8.540	8.658	100.0	5.019	7.009	0.203
		AS	15.1689	5.119	3.576	100.0	0.788	0.811	0.028
ASA	IV	AS	38.2095	3.045	2.657	83.8	0.806	0.829	0.028
		AS	121.2533	3.061	3.215	100.0	0.723	0.741	0.025
G	IV	G	19.2500	6.175	6.566	100.0	4.185	3.206	0.258
		G	71.7759	6.120	6.107	100.0	4.295	7.832	0.259
AS	IV	AS	89.9329	2.907	2.117	100.0	0.895	0.828	0.026
		AS	76.1096	3.106	2.174	100.0	0.807	0.829	0.026

a- Ver apéndice E. Fórmula 7.

b- Ver apéndice E. Fórmula 6.

guayacol como para el SAG. El valor obtenido para el AS fue de 0.03 aproximadamente, lo cual concuerda con lo reportado por Rowland (50) que indica que el AS presenta una depuración hepática muy baja.

En la misma tabla se puede observar que la eliminación del guayacol por el comportamiento central solo es de 23.46% al ser administrado por vía IV en forma de ASAG siendo ajustado a un modelo abierto de dos compartimientos, para el AS cuando se administra en forma de ASA por vía intravenosa se obtiene un valor de 83.8% eliminado por el compartimento central. En los demás compuestos se observa claramente que son eliminados en un 100%.

La posibilidad de que los metabolitos se encuentren atrapados en tejidos podría ser verificado mediante la siguiente fórmula (5):

$$F_t = \frac{V_t * F_b}{V_d - V_s}$$

donde

$V_t$  = volumen del espacio extracelular= 681 ml/Kg para un perro.

$F_b$  = fracción de fármaco unido en sangre.

$V_s$  = volumen sanguíneo de 82 ml/Kg (1).

$F_t$  = fracción de fármaco unido al tejido.

Por lo que sería muy conveniente determinar el grado de unión del guayacol y verificar el porcentaje unido a



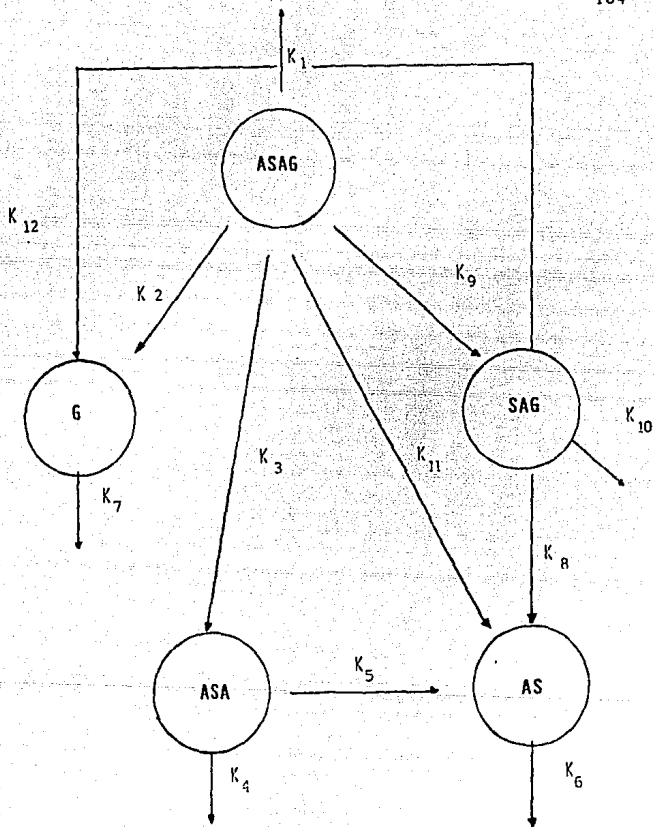
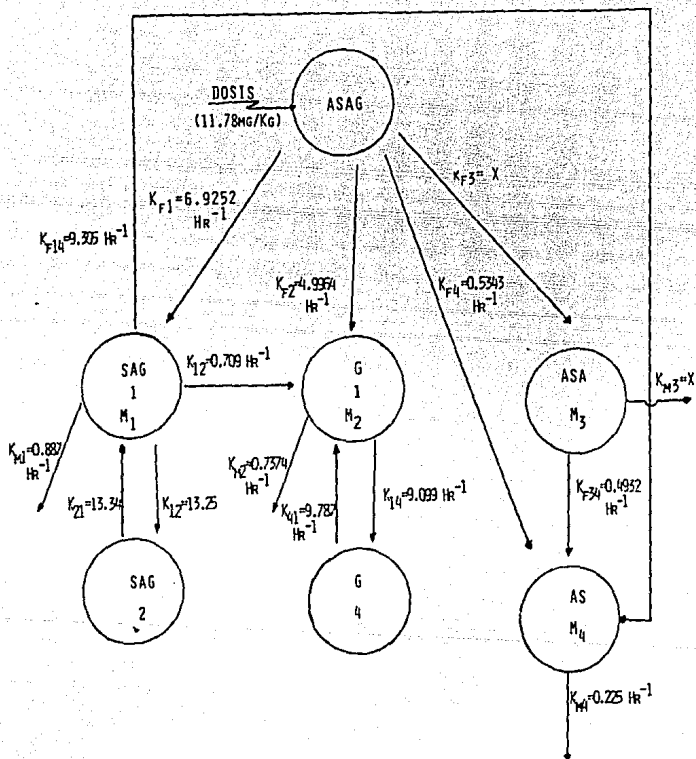


FIGURA 35 . SISTEMA FARMACOCINETICO PROPUESTO



X= PARÁMETROS QUE NO SE PUDIERON DETERMINAR

FIGURA 36- MODELO FARMACOCINETICO OBTENIDO DESPUES DE LAS ADMINISTRACIONES A PERROS BEAGLE.

tejidos.

El modelo farmacocinético propuesto inicialmente se describe en la figura 35; en él, se asume que las constantes de velocidad de formación, distribución y eliminación se ajustan a una cinética de primer orden. Los resultados obtenidos demuestran que el modelo obtenido fue muy semejante (figura 36); sin embargo, el ASA no pudo ser detectado, por lo que las constantes  $k_3$  y  $k_4$  no pudieron ser calculadas, así mismo el SAG y G se ajustaron a un modelo abierto de dos compartimientos. No se puede determinar si el ASA es un factor limitante para la formación del AS ya que su constante de formación no pudo ser calculada a partir del ASA. La constante de eliminación del ASA en el sistema farmacocinético tampoco pudo ser determinada, sin embargo, si esta constante hubiera sido mucho más pequeña que la constante de formación entonces se podría concluir que era el paso limitante para la formación del AS.

El AS en todas las administraciones se comporta como un modelo abierto de un compartimiento al administrar el ASAG, SAG, AS y ASA, excepto al administrar el ASA por vía intravenosa en el cual se ajusta a un modelo abierto de dos compartimientos.

## CONCLUSIONES

- 1.- Se desarrollaron métodos analíticos en plasma y orina para el acetil salicilato de guayacol y para los metabolitos reportados, los cuales fueron específicos, lineales, exactos, precisos y repetibles.
- 2.- Los parámetros farmacocinéticos del Acetil salicilato de guayacol no se lograron determinar, dado a que es un fármaco que se transforma rápidamente en salicilato de guayacol, el cual es rápidamente metabolizado dando ácido salicílico y guayacol. Para poder determinar el ASA sería conveniente tomar muestras a intervalos más pequeños inmediatamente después de su administración.
- 3.- Después de la administración intravenosa del acetil salicilato de guayacol, los metabolitos se ajustaron a los siguientes modelos farmacocinéticos: El ácido salicílico: modelo abierto de un compartimento. El salicilato de guayacol y guayacol: modelo abierto de dos compartimientos.
- 4.- Después de la administración oral del acetil

salicilato de guayacol, la biodisponibilidad absoluta calculada para el guayacol fue de 1.00 y para el ácido salicílico de 0.5466. Sin embargo al ser administrado el salicilato de guayacol la biodisponibilidad absoluta para el guayacol fue de 0.4598 y para el ácido salicílico de 0.1007.

- 5.- En el perfil de Cp-tiempo del guayacol se encontró un doble pico, lo cual puede deberse a que presenta el efecto de primer paso.
- 6.- Al comparar la biodisponibilidad relativa del ASAG por vía oral con respecto al metabolito administrado para el guayacol presenta un valor de 0.745 y para el AS de un 0.5231.
- 7.- Se encontró que el ASAG es un profármaco ya que libera rápidamente al AS y al G. Respecto a sus niveles plasmáticos alcanzados al administrar el ASAG por vía oral, los niveles del guayacol si son equivalentes comparados al administrar solo el metabolito, pero los alcanzados por el AS no son equivalentes comparados al administrar el AS ó ASA, por lo que sería necesario un ajuste de dosificación.

APENDICE A

CARACTERISTICAS DE LOS PERROS EN ESTUDIO Y SUS  
ADMINISTRACIONES

PERRO No.	SEXO	PESO (Kg)	ADMINISTRACION
1	H	13.5	Intravenosa de guayacol Oral de guayacol
2	H	11.8	Intravenosa de SAG. Oral de SAG.
3	H	11.8	Intravenosa de ASA. Oral de ASA.
4	M	12.8	Intravenosa de AS Oral de AS.
5	M	8.0	Intravenosa de ASAG. Oral de ASAG.

## APENDICE B

La cantidad de farmaco a ser administrado en una formulación para perros está basada en la dosis administrada a los humanos. La relación que describe los parámetros de dosificación en función del peso obedece a una ecuación alométrica:  $Y = a W^b$  (42). Donde Y es la dosis deseada para obtener cierto efecto farmacológico, y a y b son constantes y W es el peso del perro. Sin embargo en nuestro caso los parámetros a y b no están disponibles para los compuestos de interés y para un cierto efecto farmacológico, por lo que la dosificación también puede determinarse asumiendo que el metabolismo ó la excreción renal regula la farmacocinética de estos compuestos. La ecuación alométrica que relaciona el consumo de oxígeno en cortes de hígado en ml/min es:  $Y = 3.3 W^{0.49}$  y relaciona la filtración glomerular de inulina en ml/Hr es de  $1.74 W^{0.77}$ , por lo que el ajuste se realizó con estas dos últimas formulaciones considerando que la eliminación del ácido acetil salicílico es por metabolismo ocurriendo una hidrólisis a ácido salicílico, y la principal vía de eliminación del ácido salicílico es la renal por lo que es conveniente utilizarlos como ajuste de dosis.

DOSIS EQUIMOLECULARES A ADMINISTRAR EN EL HOMBRE Y EN EL PERRO  
 CONSIDERANDO EL METABOLISMO BASAL Y LA DEPURACION DE  
 INULINA

ESPECIE	PESO (kg)	ASAG METABOLISMO (mg)	ASAG DEPURACION (mg)	% INCREME TO POR P SO (A)
HOMBRE	70	500	500	0
PERRO	8	94.2	94.2	65



APENDICE C

NIVELES PLASMATICOS DE LOS METABOLITOS OBTENIDOS DEPUES DE UNA ADMINISTRACION DE 89.5 MG DE ASAG POR VIA INTRAVENOSA A UN PERRO DE 10 Kg.  
ESTUDIO PRELIMINAR.

TIEMPO (Hrs)	CONCENTRACION PLASMATICA (mcg/ml)		
	SALICILATO DE GUAYACOL	GUAYACOL	ACIDO SA- LICILICO
0.000	0.000	0.000	0.000
0.117	2.058	38.150	-
0.183	-	31.196	-
0.283	0.771	11.253	32.062
0.500	0.565	10.286	31.518
1.000	0.434	6.350	25.040
2.000	-	1.332	24.660
3.000	-	-	21.274
4.000	-	-	20.443
5.000	-	-	15.950
7.000	-	-	11.150
9.000	-	-	3.436

## APENDICE D

TABLA A

NIVELES PLASMATICOS DE METABOLITOS DEL ACETIL SALICILATO DE  
 GUAYACOL DESPUES DE UNA ADMINISTRACION DE 94.2 MG POR VIA  
 INTRAVENOSA A UN PERRO DE 8 Kg.

TIEMPO (Hr)	CONCENTRACION PLASMATICA (mcg/ml)		
	SALICILATO DE GUAYACOL	GUAYACOL	ACIDO SALICILICO
0.000	0.000	0.000	0.000
0.250	nd	nd	7.283
0.300	1.498	3.749	10.812
0.350	4.748	9.263	-
0.450	2.721	11.450	12.323
0.750	2.039	1.849	12.189
1.616	1.456	2.804	12.092
2.000	1.069	4.438	11.542
3.000	1.019	3.694	11.216
5.000	-	-	7.508
7.000	-	-	2.710
9.000	-	-	1.497

NOTA: nd= no detectada.

TABLA B

NIVELES PLASMATICOS DE METABOLITOS DE ACETIL SALICILATO  
DE GUAYACOL DESPUES DE UNA ADMINISTRACION DE 94.2 Mg  
POR VIA ORAL A UN PERRO DE 8 Kg.

TIEMPO (Hr)	CONCENTRACION PLASMATICA (MCG/ML)	
	GUAYACOL	ACIDO SALICILICO
0.000	0.000	0.000
0.250	2.326	nd
0.417	2.787	1.898
0.587	6.242	1.807
0.750	8.731	1.925
1.000	2.108	2.551
1.250	3.200	3.395
1.500	2.336	4.052
2.116	2.322	4.323
3.250	2.280	4.274
5.183	1.845	3.246
7.000	-	2.420
9.117	-	1.958

TABLA C

NIVELES PLASMATICOS DE METABOLITOS DEL SALICILATO DE GUAYACOL  
 DESPUES DE UNA ADMINISTRACION DE 118.73 Mg POR VIA  
 INTRAVENOSA A UN PERRO DE 11.8 Kg.

TIEMPO (Hr)	CONCENTRACION PLASMATICA (MCG/ML)	
	GUAYACOL	ACIDO SALICILICO
0.000	0.000	0.000
0.083	-	11.983
0.166	2.837	-
0.250	2.864	23.429
0.500	6.928	25.576
0.750	8.297	24.655
1.000	2.987	21.497
2.000	3.044	18.149
3.000	2.892	14.382
4.917	2.280	9.334
7.016	-	-
9.033	-	-

TABLA D

NIVELES PLASMATICOS DE METABOLITOS DEL SALICILATO DE  
 GUAYACOL DESPUES DE UNA ADMINISTRACION DE 118.73 MG POR  
 VIA ORAL A UN PERRO DE 11.8 Kg.

TIEMPO (Hr)	CONCENTRACION PLASMATICA (MG/ML)	
	GUAYACOL	ACIDO SALICILICO
0.000	0.000	0.000
0.165	-	1.441
0.250	-	3.338
0.333	-	3.327
0.500	4.139	3.162
0.750	1.205	3.077
1.000	3.149	3.005
1.250	3.066	2.962
1.750	2.819	-
2.000	2.643	2.171
3.000	1.004	-
5.000	-	-
7.000	-	-
9.000	-	-

TABLA E

NIVELES PLASMATICOS DEL ACIDO ACETIL SALICILICO Y SU METABOLITO  
(AS) DESPUES DE UNA ADMINISTRACION DE 87.6<sup>15</sup> Mg. POR VIA  
INTRAVENOSA A UN PERRO DE 11.8 Kg.

TIEMPO (HR)	CONCENTRACION PLASMATICA (MCG/ML)	
	ACIDO ACETIL SALICILICO	ACIDO SALICILICO
0.000	0.000	0.000
0.083	2.045	11.548
0.200	0.931	12.444
0.250	0.000	13.625
0.500	-	7.358
1.000	-	5.633
3.000	-	5.332
5.000	-	2.701
7.000	-	-
9.000	-	-

TABLA F

NIVELES PLASMATICOS DEL METABOLITO (AS) DEL ACIDO ACETIL  
SALICILICO DESPUES DE UNA ADMINISTRACION DE 87.615 Mg POR VIA  
ORAL A UN PERRO DE 11.8 Kg.

TIEMPO (Hr)	CONCENTRACION PLASMATICA DEL ACIDO SALICILICO (MCG/ML)
0.000	0.000
0.083	1.993
0.166	2.193
0.250	2.429
0.333	2.614
0.500	2.617
1.000	6.982
1.250	8.236
1.500	10.601
2.000	15.834
3.000	21.111
5.000	14.594
7.000	14.211
9.000	9.698

TABLA G

NIVELES PLASMATICOS DE GUAYACOL DE UNA ADMINISTRACION DE  
69.02 Mg POR VIA INTRAVENOSA A UN PERRO DE 13.5 Kg.

TIEMPO (Hr)	CONCENTRACION PLASMATICA DE GUAYACOL (MCG/ML)
0.083	11.593
0.200	11.221
0.250	6.177
0.500	4.881
1.000	5.271
2.000	4.269
3.000	-
5.000	-
7.000	-
9.000	-



TABLA H

NIVELES PLASMATICOS DE GUAYACOL DE UNA ADMINISTRACION  
69.02 Mg POR VIA ORAL A UN PERRO DE 13.5 Kg.

TIEMPO (Hr)	CONCENTRACION PLASMATICA DE GUAYACOL (MCG/ML)
0.000	0.000
0.167	2.700
0.250	4.320
0.333	5.804
0.750	2.303
1.000	7.489
1.500	6.138
3.350	3.332
5.100	1.188
7.000	-
9.930	-

TABLA I

NIVELES PLASMATICOS DE ACIDO SALICILICO DE UNA ADMINISTRACION  
DE 72.64 Mg POR VIA INTRAVENOSA A UN PERRO DE 12.8 Kg.

TIEMPO (Hr)	CONCENTRACION PLASMATICA DE ACIDO SALICILICO (MCG/ML)
0.083	24.988
0.200	21.429
0.250	21.932
0.500	18.835
0.750	17.518
1.000	16.439
2.000	15.442
3.000	12.161
5.000	7.448
7.000	3.271
9.000	-

TABLA J

NIVELES PLASMATICOS DE ACIDO SALICILICO DE UNA ADMINISTRACION  
DE 72.64 Mg POR VIA ORAL A UN PERRO DE 12.8 Kg.

TIEMPO (Hr)	CONCENTRACION PLASMATICA DE ACIDO SALICILICO (MCG/ML)
0.000	0.000
0.133	3.267
0.183	3.517
0.258	3.988
0.333	4.993
0.500	7.496
0.750	9.104
1.000	10.428
1.500	12.074
2.000	11.162
3.000	9.677
5.000	7.732
7.066	6.023
9.167	2.095

## APENDICE E

## CALCULO DE LOS PARAMETROS FARMACOCINETICOS

Se calculó el TMR (tiempo medio de residencia) y la varianza del tiempo medio de residencia de acuerdo a Yamaoka (73), donde:

$$\text{TMR} = \frac{\text{AUMC}_0^{\infty}}{\text{AUC}_0^{\infty}} \quad (1)$$

$$\text{VRT} = \int_0^{\infty} \frac{(t - \text{MRT})^2 C_p dt}{\text{ABC}_0} \quad (2)$$

Además puede ser calculado el  $\text{MRT}_g$  y  $\text{VRT}_g$  en el tracto gastrointestinal de la manera siguiente:

$$\text{MRT}_g = \text{MRT}_i - \text{MRT}_{iv} \quad (3)$$

$$\text{VRT}_g = \text{VRT}_i - \text{VRT}_{iv} \quad (4)$$

Para aquellos metabolitos que fueron ajustados a un

modelo abierto de dos compartimentos se puede calcular  $MRT_p$  (tiempo medio de residencia en el compartimento periférico), mediante la fórmula siguiente (37):

$$MRT_p = \frac{k_{12}}{k_{10} k_{21}} \quad (5)$$

El cálculo del volumen de distribución extrapolado del compartimento central, se determinó de la manera siguiente (57):

$$V_c = \frac{DOSIS}{\sum_{i=1}^n A_i} \quad (6)$$

El volumen de distribución de área se determinó por definición:

$$V_d = \frac{F * DOSIS}{K_d * ABC_o} \quad (7)$$

Además se calculó el volumen de distribución extrapolado:

$$V_{ext} = \frac{D^{iv}}{C_p} \quad (8)$$

Y el volumen de distribución calculado para cada metabolito, descrito por Pang (45) se realizó de la siguiente manera:

$$V_{d_{ml}} = \frac{K_f D F}{B(K_{f_{ml}} - K_{d_{ml}})} \quad (9)$$

El volumen de distribución aparente en el estado estacionario calculado como modelo independiente se realiza de la forma siguiente:

$$V_{ss} = \frac{\text{DOSIS} * \text{CAUMC}}{\text{CAUC}^2} \quad (10)$$

También se determinó la biodisponibilidad absoluta de cada metabolito formado:

$$F = \frac{\text{ABC}_{po} * \text{DOSIS}_{iv}}{\text{ABC}_{iv} * \text{DOSIS}_{po}} \quad (11)$$

Así la biodisponibilidad relativa de acuerdo al metabolito administrado:

$$F = \frac{\text{ABC}_x * \text{Cl}_x / D_x}{\text{ABC}_{ml} * \text{Cl}_{ml} / D_{ml}} \quad (12)$$

donde x= parámetros del metabolito al administrar el fármaco.

Además para calcular la fracción de fármaco que es metabolizado de acuerdo a Pang (45) es calculado de la forma siguiente:

$$f_{ml} = \frac{\text{AUC}_{ml}^{iv} / D^{iv}}{\text{AUC}_{ml}^{Mi.iv} / M_i^{iv}} \quad (13)$$

Así mismo fué calculado el  $T_{\max}$  de acuerdo a Pidgeon y Fitlich (49) como sigue:

$$t_{\max} = \ln(C_{ka}/k_e) / (C_{ka} - k_e) \quad (14)$$

También se calculó la depuración plasmática siendo calculada mediante la fórmula siguiente:

$$Cl_p = \frac{\text{DOSIS}}{ABC_o \text{ (plasmática)}} \quad (15)$$

y la depuración renal fué calculada de la siguiente manera:

$$Cl_r = \frac{Q}{ABC_o \text{ (plasmática)}} \quad (16)$$

donde Q= cantidad total excretada de orina.

## BIBLIOGRAFIA

1. - Andersen C. Allen, The Beagle. AS an Experimental Dog.  
The Iowa State University Press, Ames, IOWA, USA (1970)
2. - Boxenbaum H.G., S. Biegelman R. M. Elashoff.  
Statistical Estimations in Pharmacokinetics.  
Journal Pharmacok. & Biopharm. 2(2):123-148; (1974).
3. - Branche, P. G., Grui G; Fuccella L. M., Goldaniga G. C.,  
Valzelli G. Gastrointestinal blood level during  
administration odindoprofen, aspirina and ibuprofen.  
J. Int. Med. Res. 5:155-160; (1977).
4. - Cerqua R., C. Trovello, G. Infante, S. Ricciardi.  
L'impiego del guacetisal nella broncopneumopatia cronica  
ostruttiva. Minerva Medica 72:355-361 (1981).
5. - Cotler S. J., J. H. Gustafson and W. I. Colburn.  
Pharmacokinetics of Diazepam and Nordiazepam in the cat.  
J. Pharm. Sci. 73(3):348-351; (1984).
6. - Day R.O., S. H. Dromgoole, D. E. Furst, C. Hignite and  
H. E. Paulus. Formation of Methylester of Salicylic Acid  
during quantitation of Salicylic Acid in Urine by  
High-Pressure Liquid Chromatography.



- J. Pharm. Sci. 70(9):1090-1092; (1981).
- 7.- Das Gupta.  
High-Pressure Liquid Chromatographic determination of Salicylic Acid in Aspirine Powder and Pharmaceutical Dosage Form.  
J. Pharm. Sci. 69(1):113-115; (1980).
- 8.- Davison Clarke.  
Protein Binding. Cap. IV. Drug. Distribution and Excretion. 63-74 (1970).
- 9.- Dennis Dell Hoechst.  
Pharmaceutical Research, Walton;  
Milton Keynes, Bucks MK7 7A5, UK.
- 10.- Dittert L.W., Laldweel H.C., Ellison T, Irwina G.M., Rivard D.E., and Swintosky J. V.  
Carbonate ester prodrugs of salicylic acid.  
J. Pharm. Sci. 57:828-831; (1968).
- 11.- Dittmer S. Dorothy.  
Blood and other Fluids. Biological Handbooks.  
Federation of American Sociates for Experimental Biology. pag. 352 (1961).
- 12.- Dundi G., A. Zamotti Gerosa.  
Influenza dell Aggiunta di sustanze stabilizzanti  
Colloid dell suele Proprieta Reologiche Di una

suspensione.

Boll. Chim. Farm., 120:606-617; (1981).

13. - B. Edgar, C. Bogentoft and and P.O. Lagerstrom.

Comparasion of two Enteric-Coated Acetylsalicylic Acid Preparations by monitoring-Steady-State levels of Salicylic Acid and its metabolites in plasma and urine. Biopharm. & Drug Disposition. 5:251-260;(1984).

14. - Exfeldt H. John and Nelson M. Gig.

Salicylate determined with a microcentrifugal analyzer and compared with Du Pont aca. Trinder and Liquid Chromatographics Method. Clin. Chem. 29(5):839-841; (1983).

15. - Floyd R. Domar, David M. Chihal, and H. Cecil Charles.

Cardiovascular and Neuromuscular Effects of Dimethyl Sulphoxide in Anesthetized Rabbists. J. Pharm. Sci. 66(2):269-270; (1977).

16. - Gaceta de la Facultad de Química.

Número 67, Octubre de 1984.

17. - Gibaldi M. Ferrer.

Pharmacokinetics. 2a. Edición.  
Marcel Dekker,  
Inc. New York, USA (1982).

## 18.- Gisudd O. Phenols and their derivatives.

En textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. Editado por Wilson C.O., Gisudd, O. y Doerge R.F., J.B. Lippincot Co. U.S.A. Sexta Edición 268(1971).

## 19.- Goldstein Avram, Aronow Lewis and Sumnern Kelman.

Farmacologia (1979) pag. 251.

Editorial: Limusa.

## 20.- Guacetisalum.

Drugs of Today.

J. Med. Actual. Vol. XVI No. 3:80-81 (1980).

## 21.- Harrison L.I., Ph. D. Mary C. Funk, R.J. Ozwaldo N. RE.,

M.D. andd Roberte Ober, Ph. D.

Absorption, Biotransformation and Pharmacokinetics of Salicylsalicylic Acid in Humans.

J. Clin. Pharmacol. 21(10); 401-404; (1981).

## 22.- Harrison L.I., M.C. Fuwk and R.E. Ober.

High-Pressure Liquid Chromatography Determination of Salicylsalicylic Acid, Aspirin and Salicylic Acid in Human Plasma and Urine. J. Pharm. Sci. 69(11):1268-1271; (1980).

## 23.- Henry F. Smyth, Jr. Charles P. Carpenter and C. Boyd

Shaffer. The Toxicity of High Molecular Weight Polyethylene Glycols' Chronic Oral and Parenteral

- Administration. J. Am. Pharm. Assoc. 157-160; (1946).
24. - Hubell J.A. E., DUM; W. Muir, DUM; R.A. Soms pH. D.  
"Guaifenesin: Cardiopulmonary Effects and Plasma  
Concentrations in Horses."  
Am. J. Vet. Res. 41(11):1751-1755; (1980).
25. - Kanter L. Saul and William R. Korbaly "Direct  
Measurements of Aspirin." J. Pharm. Sci.  
60(12):1898-1900 (1971).
26. - Kenneth W. Street Jr. and George H. Schenk.  
Spectrofluorometric Determination of Acetyl Salicylic  
Acid, Salicylamide and Salicylic Acid as an Impurity in  
Pharmaceutical Preparations. J. Pharm. Sci.  
70(6):641-645; (June 1981).
27. - Kettelars H.C.J. and J.G. P. Peters.  
Determination of guaifenesin and its metabolite,  
-(2-methoxyphenoxy)-lactic acid, in plasma by  
high-pressure Liquid Chromatography.  
J. Chromatography 224:133-148; (1981).
28. - Kirchhoefer D. Ross.  
Simultaneous Determination of Aspirin and Salicylic Acid  
in Bulk Aspirin and in Plain, Buffered and Enteric  
Coated tablets by High-Pressure Liquid Chromatography  
with UV and fluorescence Detectors. J. Pharm. Sci.

69C10): 1188-1191; (1980).

29.- Levy Gerhard.

Pharmacokinetics of Salicylate Elimination in Man.

J. Pharm. Sci. 54(7):959-966 (1965).

30.- Loebel, Spratto, Heckheimer.

Manual de Farmacologia 740-744 (1986).

Editorial: Limusa.

31.- MacFarlane John O., Lee W. John and C.C.Cheny.

Colorimetric Assay for guaiacol O-Methyltransferase.

J. Pharm. Sci. 65(11):1689-1696; (1976).

32.- The  $\mu$ -Bondapack Series (Care and use Manual).

Waters. Division Millipore Junio (1980).

33.- Manson D. William and Nathaniel Winer.

Kinetic of Aspirin, Salicylic Acid and Salicylic Acid following oral Administration of Aspirin as a tablet and two buffered solutions.

J. Pharm. Sci. 70(3):262-264; (1981).

34.- Maulding L. Diana and Young F. John.

High-Pressure Liquid Chromatographic Analysis of Salicylic Acid, Salicylic Acid, and Gentisic Acid in Biological matrixes.

J. Pharm. Sci. 69C10):1224-1225; (1980).

35. - Mayersohn Michael, Ph. D.  
Monograph of Aspirin.  
Journal of the American Pharmaceutical Association NS  
17(2):107-112; (Feb. 1977).
36. - Maynard R. William, Jr. and Robert B. Bruce.  
GLC Determination of Guaiacol Glyceryl Ether in Blood.  
J. Pharm. Sci. 59(9):1348-1348; (1970).
37. - McNamara . Patrick, Fleishaker C. Joseph and Floyd  
L. Thomas.  
Mean Residence Time in Peripheral Tissue.  
J. Pharmacok. & Biopharm. 15(4):439-450, (1987).
38. - Metzler C.M.  
Nonlin. A Computer program for parameters estimation in  
nonlinear situations. The Upjohn Co., Kalamazoo Michigan  
(1989).
39. - Mora P., P. Lui, G. Marostica.  
Il Broncospin nelle affezioni respiratorie in  
pediatrica.  
Minerva Medica 72:417-422 (1981).
40. - Mordenti J.  
Dosage Regimen design for Pharmaceutical studies  
conducted in animals.

- J. Pharm. Sci. 75:852-857; (1986).
- 41.- Morgan M. Ann, Edward B. Truitt Jr. and Maxwell Little.  
Plasma Levels of Mephesisin, Mephesisin Carbamate,  
Guaicol-Glyceryl Ether, and Methocarbamol (AHR-85).  
After oral and Intravenous Administration in the Dogs.  
J. Am. Pharm. Assoc. Vol XLVI (6):374-377; (1957).
- 42.- Morris H. Clarence, Christian E. John, Robert R. Londolt  
and Watren G. Hansen.  
Gas-Liquid Chromatography of Salicylate Metabolites.  
J. Pharm. Sci. 59(2): 270-271 (1970).
- 43.- Mura P., A. Liguori, G. Bramanti  
Studio del Assorbimento in vitro del Guaicolilacetil-  
Salicilato. I'Farmaco. ED. Pr. 41(Fasc. 7):226-236;  
(1985).
- 44.- Papini P., G. Bramanti.  
Guaicolilacetil Salicilato: Nuave Sintesi e  
Caratteristiche Chimica Fisiche.  
Boll. Chim. Farm. 119:197-202; (1980).
- 45.- Pang K. Sandy.  
A Review of Metabolite Kinetics.  
J. Pharmacok. & Biopharm. 13(6):633-662, (1985).
- 46.- Parate N. Anthony and Manyer John.  
Solubility of Sodium Salicylate in Mixed Solvent

- Systems. J. Pharm. Sci. 60(3):432-437;(1971).
47. - Pelucco D., G. Bernarbo D., Negro C. Ravazzoni.  
Impiego del B. I. 10701P " (Guacetisal) nelle  
bronicopneumopatie flogistiche in fase oculta."  
Minerva Medica 72:423-427 (1981).
48. - Pfeiferaed C. D., J. W. Bankey.  
Determination of Related Compounds in Aspirin by Liquid  
Chomatography.  
J. Pharm. Sci. 71(5):511-513; (1982).
49. - Pidgeon L. and Wilt Pitlick.  
Unique Approach for Calculation of First-Order  
Absorption Rate Constans from Blood or Urine Date.  
Journal Pharm. and Biopharmaceutics 8(2):203-214;(1980)
50. - Rowland Malcon, Sidney Rigelman, Phillip A. Harris and  
Stephen D. Shokoff.  
Absortion Kinetics of Aspirin in Man following oral  
Administration of on Aqueous solution.  
J. Pharm. Sci. 61(3); 379-382; (1972).
51. - Rubegni M., G. DoMauro  
Studio Clinico di un preparato and activita  
bronicomucotropica: il guacetisal.  
Minerva Medica 42:429-433; (1981).
52. - Saldi M.



Il Broncospin nella Terapia della malattie pediatriche dell'apparato respiratorio. Min. Med. 42:435-442; (1981).

53. - Schlumberger H. D.

Immunogenicidad of Arylesters of Salicylic or Acetylsalicylic acid in guinea pigs. Im. Archs. Allergy Appl. Immun. 48:467-479; (1975).

54. - Seeger AD J.M., Marison Olling, Lowire P. Jayer and Jacobus Van Noordwijk.

Interations of Aspirin with Acetominophen and Caffeine in Rat Stomach.

Pharmacokinetics of Absortion and Accumulation in Gastric Mucosa. J. Pharm. Sci. 69:8; (1980).

55. - Sum-Ichi Naito, Mitsuo Mizutanie, Seimen Osumi, Kazuko Umetzu, Tadahiro Mikous, Yeshiko Nishimura, and Noboyoshi Yamamoto. Biopharmaceutical Studies on Guaiacol Glyceril Ether and Related Compounds IV: Drug in Blood and Bile.

J. Pharm. Sci. 59(12):1742-1745; (1970).

56. - Shun-Ichei Naito, Mitsuo Mizutani, Seimei-Osomi, Todohiro Mikawa, Kyoko Sakishiro, Keido Naka and Hidyoke Nakita. Biopharmaceutical Studies on Guaiacol Glyceryl Ether and Related Compounds V.

J. Pharm. Sci. 61: 1212-1215; (1972).

57.- Sidney Riegelman and Raul Collier.

The applications of Statistical Moment Theory to the Evolution of in vivo Disolution time and Absorption Time. Journal of Pharm. and Biopharm. 8(5)509-534; (1980).

58.- Stebert J. David B. SC., Felix Bochner, M. D., Debra M. Imhoff, B. Sc., y col.

Aspirin kinetics and platelet agregation in man. Clin. Pharmacol. and Ther. 33(3); 367-374 (1983).

59.- Statistical Library.

Sección de Análisis de Regresión de la Computadora HP-9133.(Programas de regresión no lineal de Marquardt, 1981).

60.- Stelzer M. Joseph, Colaizz I. John and Raul J. Wundak.

Influence of Dimethyl Sulphoxide (DMSO) on the percutaneous Absorption of Salicylic Acid and Sodium Salicylate from ointments.

J. Pharm. Sci. 57(10):1732-1737; (1968).

61.- Taylor P.M. and A. J. Winfield.

The Effects of Dimethyl sulphoxide concentration on the Penetration of Hexanol throung Neovital Rat and Human Stratum Cornoum.

Int. J. Pharm. 25:17-26 (1984).

62.- Thorsteinm Loftson and Nichales Budor.

- Improved Delivery through Biological Membranes IX  
Kinetics and Mechanism of Hydrolysis of Methyl  
12-Acetoxy benzoate and Related Aspirin Prodrugs.  
J. Pharm. Sci. 70(7):750-755; (1981).
63. - Thorsteinm Loftson, Janes J. Kamisskid and Nichales  
Bodar. Improved Delivery through Biological Membranes  
VIII: Design, Synthesis, and in vivo testing of true  
Prodrugs of Aspirin.  
J. Pharm. Sci. 70(7):743-758 (1981).
64. - U.S.P. XXI.  
Soluciones buffer. pag. 1420.
65. - Wagner John G.  
Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics.  
Edited by Drug Intelligence Publications, Inc.  
Hamilton, Illinois (1975).
66. - Walter L. J., Biggs D.F. and Coutte R. T.  
Simultaneous GLC Estimation of Salicylic Acid and  
Aspirin in Plasma.  
J. Pharm. Sci. 63(11):1754-1758; (1974).
67. - White L. Roger, William R, Garbett, Weesly J. Paynor.  
Clin. Pharm. 3:396-401; (Jul-Aug. 1984).
68. - Wikely J. . Gas Chromatographic Determination of Acetyl

- salicylic Acid. Anal. Chem. 36(12):2248-2250 (1964).
69. - Willson J.E., Brown D.E., Timmey E.K.  
A Toxicologic Study of Dimethyl sulphoxide.  
Toxicol. & Applied Pharm. 7:104-112; (1965).
70. - Winthrop E. Lonmge and Saul A. Bell.  
Fluorometric Determination of Acetylsalicylic Acid and  
Salicylic Acid in Blood.  
J. Pharm. Sci. 55(4):380-389; (1966).
71. - Yalkowsky, S. Rosewan T. J.  
Solubilization of drugs by cosolvents. In technique of  
solubilization of drugs.  
Copyright Marcel Dekker, Inc (1981).
72. - Yamaoka K.; T. Nakagawa; T. Uno.  
Application of Akaike's Information Criteri (AIC) in  
the Evaluation of Linear Pharmacokinetic Equations.  
J. Pharmacok. & Biopharm. 8(2):165-175; (1978).
73. - Yamaoka Kiyeshi, Tofomich Najagena and Toyoko Uno.  
Statistical Moments in Pharmaceutics.  
J. Pharmacok. & Biopharm. 8(6); (1978).
74. - Zuccali G. Ghorson G., Parenti M.  
Sperimentazione Clinica di un nuovo preparato nelle  
bronicopneumopatie croniche. Min. Med. 72: 451-462; (1981).