



4
215
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE
POLIETILENGLICOLES SOBRE LA ABSORCION
DEL ACIDO ACETIL SALICILICO EN
INTESTINO INVERTIDO DE RATA (IN VITRO)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :

María del Socorro Verónica Aguilar Morales

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MEXICO, D. F.

1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA. EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

PRESIDENTE: M. en C. Inés Fuentes Noriega.

VOCAL: M. A. Gabriel René Gúzman Martínez

SECRETARIO: Q.F.B. María Teresa Buentello Rodríguez.

1er. SUPLENTE: Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez.

2º. SUPLENTE: M. en C. Sofia Margarita Rodríguez Alvarado.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO. DEPARTAMENTO DE FARMACIA
DIVISION DE BIOQUIMICA Y FARMACIA. LABORATORIO DE
BIOFARMACIA.**

FACULTAD DE QUIMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

María del Socorro Verónica Aguilar Morales.
SUSTENTANTE

M. en C. Inés Fuentes Noriega.
ASESOR DEL TEMA.

M. en C. Benjamin E. Sandoval Guzmán
ASESOR TECNICO.

GRACIAS A DIOS.

Por haberme brindado la capacidad de
razonamiento, la inteligencia
y la sabiduría para seguir este camino
y por haberme permitido lograr muchos anhelos
durante esta primera etapa de mi vida
y por cuidarme con su presencia
en todo momento

GRACIAS A MIS PADRES.

Josefina y L. Guadalupe.

Con todo mi amor para ellos por su gran cariño
y amor que me han dado, ya que
sin ellos no hubiera sido posible lograr este gran anhelo
y muchos otros más en mi vida.

A MIS HERMANOS.

Alejandro, Fabian, Arturo y Antonio

Por su apoyo incondicional, consejos, regaños, peleas y
por su interés en mi superación
ya que son un ejemplo a seguir.

Danny:

Por todo tu cariño, paciencia y comprensión,
por tu apoyo y ayuda desinteresada,
por tus consejos y por tu interés en mi
realización profesional.

Gracias.

A MI ASESORA.

M en C. Inés Fuentes Noriega.

**Por su apoyo desinteresado para la realización de este trabajo,
por su amistad, sus consejos, su paciencia, su comprensión,
su guía profesional y sus enseñanzas en todo momento
para la culminación de este
trabajo.**

Gracias.

A MIS ASESORES TECNICOS.

M. en C. Benjamin E. Sandoval Guzmán
M. en C. Sofia Margarita Rodríguez Alvarado.

Por el apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A la

M. en C. Helgi Jung Cook.

**Por haberme brindado su amistad y apoyo desinteresado
en mi superación profesional.
Gracias.**

**Al bioterio de la Facultad de Medicina de la
Universidad Nacional Autónoma de México.
Gracias por su apoyo.**

**En memoria muy especial
a todos los animales de laboratorio sacrificados
durante la realización de este trabajo
en bien de la investigación.**

A mis compañeros:

Los Farmacéuticos:

Martha, Susy, Dea, Liz y Agustín gracias por todos esos momentos buenos y malos que compartimos juntos, y por su apoyo en todo momento.

Los Bioquímicos.

Euclides, Pily, Lupita, y Paty, gracias por todas esas aventuras en clases y por todo su apoyo

Al Q.F.B. Ramón Rodríguez
por su gran ayuda para la realización de este trabajo escrito, por su paciencia, consejos y sobre todo por su valioso tiempo

Al Ing. Joaquín Pérez Ruelas
responsable del Lab. de Tecnología Farmacéutica en la Facultad de Química por el apoyo brindado y por su valiosa cooperación.

Al la Q. Margarita Portilla B. responsable del Laboratorio de Físicoquímica de la División de Estudios de Pg. de la Facultad de Química por el apoyo prestado en la realización de este trabajo

A los Laboratorios Schering Plough S.A. de C.V.
por su valiosa cooperación.

A todos aquellos que me brindaron su apoyo y su ayuda para que este trabajo fuera finalizado y cumpliera sus objetivos

A todos Uds. Gracias

INDICE GENERAL

INDICE GENERAL

Pag.

1. Introducción	1
2. Objetivos	2
3. Generalidades	3
3.1. Monografía. Acido acetil salicilico	3
3.1.1. Descripción.....	3
3.1.2. Propiedades.....	4
3.1.3. Propiedades de los sólidos.....	4
3.1.4. Propiedades en solución.....	4
3.1.5. Categoría terapéutica.....	5
3.1.6. Incompatibilidad Farmacéutica.....	5
3.1.7. Estabilidad.....	5
3.1.8. Almacenamiento.....	5
3.2. Polietilenglicoles	5
3.2.1. Nombre común.....	5
3.2.2. Categoría funcional.....	6
3.2.3. Nombre químico.....	6
3.2.4. Sinónimos.....	6
3.2.5. Fórmula empírica y peso molecular.....	6
3.2.6. Fórmula estructural y Promedio de peso molecular.....	6
3.2.7. Método de manufactura.....	6

	Pag.
3.2.8. Descripción	6
3.2.9. Especificaciones farmacopeicas	7
3.2.10. Especificaciones para viscosidad NF.....	8
3.2.11. Propiedades típicas	8
3.2.12. Estabilidad y condiciones de almacenamiento.....	9
3.2.13. Incompatibilidades	10
3.2.14. Seguridad	10
3.2.15. Precaución de manejo.....	10
3.2.16. Aplicaciones en Tecnología y Fórmulaciones Farmacéuticas.....	11
3.2.17. Sustancias relacionadas	12
3.2.18. Usos	12
3.3. Absorción de fármacos.....	15
3.3.1. Difusión pasiva de membranas.....	17
3.3.2. Transporte activo de las membranas.....	17
3.3.3. Métodos de estudio.....	18
3.4. Métodos <i>In Vitro</i> , <i>In Situ</i> e <i>In Vivo</i> para el estudio de los factores fisiológicos que afectan la absorción de fármacos.....	21
3.4.1. Modelos <i>In Vitro</i> para probar la absorción de nuevos fármacos.....	23
3.4.2. Estudios <i>In Vitro</i>	27
3.4.2.1. Técnica del saco invertido	27
3.4.2.2. Simulador de absorción Sartorius	31
3.4.3. Otros sistemas intestinales <i>In Vitro</i>	31
3.4.4. Estudios <i>In Situ</i>	31
3.4.5. Estudios <i>In Vivo</i>	32

	Pag.
3.5. Influencia de los adyuvantes Farmacéuticos en la permeabilidad de Farmacos.....	32
3.6. Estudios realizados para determinar la integridad funcional y estructural del intestino invertido de rata.....	34
3.7. Metabolismo no microbiano de los fármacos en el tracto gastrointestinal.....	37
3.8 Elección de un modelo animal.....	38
4. Parte experimental.....	39
4.1. Material y equipo.....	39
4.2. Materias primas.....	40
4.2.1. Estándares.....	40
4.2.2. Excipientes.....	40
4.2.3. Reactivos.....	40
4.2.4. Animales de laboratorio.....	40
4.3. Preparación de soluciones.....	41
4.3.1. Solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.....	41
4.3.2. Solución de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4 (1 mg/ml).....	41
4.3.3. Solución de naranja de metilo en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4 (1 mg/ml).....	41
4.3.4. Solución de ácido acetil salicílico en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4 (1 mg/ml).....	41
4.3.5. Soluciones de ácido acetil salicílico y Polietilenglicol 1500 en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.....	42
4.3.6. Soluciones de ácido acetil salicílico y Polietilenglicol 4000 en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.....	42

4.3.7. Soluciones de ácido acetil salicílico y Polietilenglicol 6000 en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.....	42
4.3.8. Soluciones estándar.....	43
4.3.8.1. Solución estándar de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4. (1 mg/ml).....	43
4.3.8.2. Solución estándar de naranja de metilo en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4. (250 µg/ml).....	43
4.3.8.3. Solución estándar de naranja de metilo en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.(50 µg/ml).....	43
4.3.8.4. Solución estándar de ácido salicílico en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4. (1 mg/ml).....	43
4.3.9. Reactivos para desarrollar color.....	43
4.3.9.1 Reactivo de o-toluidina.....	43
4.3.9.2. Reactivo de Trinder.....	43
4.4. Control de calidad de excipientes. (PEG 1500, PEG 4000 y PEG 6000) y del Estándar de Acido Acetil Salicílico.....	44
4.4.1. Apariencia.....	44
4.4.2. Fluidez.....	44
4.4.3. Densidad aparente y real.....	44
4.4.4. Tamaño de partícula.....	44
4.4.5. Punto de fusión.....	44
4.4.6. Análisis Térmico Diferencial.....	45
4.5. Estudio de la permeación de la glucosa para determinar la integridad funcional en intestino invertido de rata.....	45
4.5.1. Método analítico.....	45
4.5.2. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4.....	46
4.5.2.1. Linealidad.....	46
4.5.2.2. Repetibilidad.....	46
4.5.3. Técnica de intestino invertido de rata (<i>In Vitro</i>).....	46

	Pag.
4.6. Estudio de la permeación del naranja de metilo para determinar la integridad estructural del intestino invertido de rata.	51
4.6.1. Prueba para determinar el máximo de absorción del naranja de metilo.....	51
4.6.2. Método analítico.....	51
4.6.3. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de naranja de metilo en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4.	52
4.6.3.1. Linearidad.....	52
4.6.3.2. Repetibilidad.....	52
4.6.4. Técnica de intestino invertido de rata (<i>In Vitro</i>).....	52
4.7. Estudio del efecto de Polietilenglicoles sobre la absorción del ácido acetil salicílico en intestino invertido de rata (<i>In Vitro</i>).	53
4.7.1 Método analítico.....	53
4.7.2. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de salicilatos en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4.	54
4.7.2.1. Linearidad.....	54
4.7.2.2. Repetibilidad.....	54
4.7.3. Técnica de intestino invertido de rata (<i>In Vitro</i>).....	55
4.8. Procedimiento para secado de intestinos.	56

	Pag.
5. Resultados.	57
5.1. Control de calidad de excipientes. (PEG 1500, PEG 4000 y PEG 6000) y del Estándar de Ácido Acetil salicílico.	57
5.1.1. Apariencia.	57
5.1.2. Fluidez.	57
5.1.3. Densidad aparente y real.	57
5.1.4. Tamaño de partícula.	58
5.1.5. Punto de fusión.	60
5.1.6. Análisis Térmico Diferencial.	60
5.2. Estudio de la permeación de la glucosa para determinar la integridad funcional en intestino invertido de rata.	64
5.2.1. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4.	64
5.2.1.1. Linealidad.	64
5.2.1.2. Repetibilidad.	65
5.2.2. Técnica de intestino invertido de rata (<i>In Vitro</i>).....	66
5.3. Estudio de la permeación del naranja de metilo para determinar la integridad estructural del intestino invertido de rata.	67
5.3.1. Prueba para determinar el máximo de absorción del naranja de metilo.	67
5.3.2. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de naranja de metilo. en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4.	68
5.3.2.1. Linealidad.	68
5.3.2.2. Repetibilidad.	69
5.3.3. Técnica de intestino invertido de rata (<i>In Vitro</i>).....	70

5.4. Estudio del efecto de Polietilenglicoles sobre la absorción del ácido acetil salicílico en intestino invertido de rata (<i>In Vitro</i>).....	71
5.4.1. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de salicilatos. en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4.).....	71
5.4.1.1. Linealidad.....	71
5.4.1.2. Repetibilidad.....	72
5.4.2. Técnica de intestino invertido de rata (<i>In Vitro</i>).....	73
5.5. Procedimiento para calcular el peso de los intestinos secos.....	78
6. Discusión de resultados.....	79
6.1. Control de calidad de excipientes. (PEG 1500, PEG 4000 y PEG 6000) y del Estándar de Ácido Acetil Salicílico.....	79
6.1.1. Apariencia.	79
6.1.2. Fluidez.	79
6.1.3. Densidad aparente y real.	79
6.1.4. Tamaño de partícula.....	79
6.1.5. Punto de fusión.....	80
6.1.6. Análisis Térmico Diferencial.....	80
6.2. Estudio de la permeación de la glucosa para determinar la integridad funcional en intestino invertido de rata.	79
6.2.1. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4.....	80
6.2.1.1. Linealidad.....	80
6.2.1.2. Repetibilidad.....	81
6.2.2. Técnica de intestino invertido de rata (<i>In Vitro</i>).....	81

6.3. Estudio de la permeación del naranja de metilo para determinar la integridad estructural del intestino invertido de rata.....	81
6.3.1. Prueba para determinar el máximo de absorción del naranja de metilo.....	81
6.3.2. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de naranja de metilo en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4.).....	82
6.3.2.1. Linealidad.....	82
6.3.2.2. Repetibilidad.....	82
6.3.3. Técnica de intestino invertido de rata (<i>In Vitro</i>).....	82
6.4. Estudio del efecto de Polietilenglicoles sobre la absorción del ácido acetil salicílico en intestino invertido de rata (<i>In Vitro</i>).....	83
6.4.1. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de salicilatos. en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4.....	83
6.4.1.1. Linealidad.....	83
6.4.1.2. Repetibilidad.....	83
6.4.2. Técnica de intestino invertido de rata (<i>In Vitro</i>).....	83
6.5 Procedimiento para calcular el peso de los intestinos secos.....	84
7. Conclusiones.....	85
8. Bibliografía.....	86

INDICE DE FIGURAS-

1. Termograma del PEG 1500.....	61
2. Termograma del PEG 4000.....	62
3. Termograma del PEG 6000.....	63
4. Linealidad del método analítico. Cuantificación de glucosa.....	65
5. Promedio del perfil de permeación de glucosa.....	66

	Pag.
6. Espectro del Máximo de absorción del Naranja de metilo.....	67
7. Linealidad del método analítico. Cuantificación de naranja de metilo.....	69
8. Promedio del perfil de permeación del Naranja de metilo.....	70
9. Linealidad del método analítico. Cuantificación de Salicilatos.....	72
10. Promedio del perfil de permeación del Ácido Acetil Salicílico.....	73
11. Promedio del perfil de permeación del Ácido Acetil Salicílico y AAS + PEG (0.5%).....	74
12. Promedio del perfil de permeación del Ácido Acetil Salicílico y AAS + PEG (1.0%).....	74
13. Promedio del perfil de permeación del Ácido Acetil Salicílico y AAS + PEG (2.0%).....	75
14. Comparación de la absorción de ácido acetil salicílico con la absorción promedio de las tres concentraciones 0.5, 1.0, 2.0 % v/v estudiadas para cada tipo de PEG.....	76
15. Comparación de la absorción del ácido acetil salicílico con la absorción de cada tipo de PEG en las concentraciones analizadas.....	77
16. Comparación de la absorción del ácido acetil salicílico con el promedio de los tres tipos de PEG a cada una de las concentraciones analizadas.....	77

INDICE DE TABLAS.

I. Fórmula estructural y Promedio de peso molecular de PEGs.....	6
II. Especificaciones farmacopeicas.....	7
III. Especificaciones de viscosidad NF.....	8
IV. Métodos <i>In Vitro</i> , <i>In Situ</i> e <i>In Vivo</i>	23
V. Preparación de soluciones para la solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4.....	41
VI. Diluciones del estándar de Glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH (7.4).....	45
VII Diluciones del estándar de Naranja de Metilo en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH (7.4).....	51
VIII. Diluciones del estándar de Ácido salicílico en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH (7.4).....	53
IX. Apariencia de PEGs Características.....	57
X. Densidad aparente y real, y fluidez de los PEGs.....	58
XI. Analisis de tamaño de partícula por malla, % retenido.....	58
XII. Punto de fusión de PEGs (1500, 4000 y 6000).....	60
XIII. Linealidad del método analítico. Cuantificación de glucosa.....	64
XIV. Repetibilidad del método analítico. Cuantificación de glucosa.....	65
XV. Linealidad del método analítico. Cuantificación de naranja de metilo.....	68

	Pag.
XVI. Repetibilidad del método analítico. Cuantificación de naranja de metilo.....	69
XVII. Linealidad del método analítico. Cuantificación de salicilatos.....	71
XVIII. Repetibilidad del método analítico. Cuantificación de salicilatos.....	72
XIX. Análisis de varianza de los PEGs (1500, 4000 y 6000).....	76

INDICE DE ESQUEMAS.

3.1. Fórmula desarrollada del Ácido Acetil Salicílico.....	3
4.2. Equipo de permeación.....	48

INDICE DE DIAGRAMAS

A. Montaje del equipo del modelo de intestino invertido (<i>in vitro</i>).....	49
B. Procedimiento experimental para la prueba de permeación.....	50

APENDICE DE TABLAS

a. Perfiles de permeación y Promedio del perfil de permeación de la Glucosa.....	89
b. Perfiles de permeación y Promedio del perfil de permeación del Naranja de metilo.....	90
c. Promedio del perfil de permeación del Ácido Acetil Salicílico y AAS + PEGs (1500, 4000 y 6000).....	91
d. y d.1. Perfiles de permeación del Ácido Acetil Salicílico y AAS + PEGs (1500, 4000 y 6000).....	92

APENDICE DE FIGURAS.

i. Perfiles de permeación de Glucosa.....	94
ii. Perfiles de permeación del Naranja de metilo.....	94
iii. Perfiles de permeación del Ácido Acetil Salicílico.....	95
iv. Perfiles de permeación del AAS + PEG 1500 (0.5%).....	95
v. Perfiles de permeación del AAS + PEG 1500 (1.0%).....	96
vi. Perfiles de permeación del AAS + PEG 1500(2.0%).....	96
vii. Perfiles de permeación del AAS + PEG 4000 (0.5%).....	97
viii. Perfiles de permeación del AAS + PEG 4000 (1.0%).....	97
ix. Perfiles de permeación del AAS + PEG 4000 (2.0%).....	98
x. Perfiles de permeación del AAS + PEG 6000 (0.5%).....	98
xi. Perfiles de permeación del AAS + PEG 6000 (1.0%).....	99
xii. Perfiles de permeación del AAS + PEG 6000 (2.0%).....	99

1. INTRODUCCION.

En la preparación de tabletas y grageas un número de ingredientes inertes son usados como excipientes. Estos excipientes son usados como agentes aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, diluentes, o materiales para recubrir. Los excipientes constituyen una porción considerable de la tableta (en algunos casos tanto como un 30% o más), lo cual es una buena razón para creer que estos puedan influir en la disponibilidad del fármaco y en la absorción en aquellos casos en donde ocurren interacciones entre el fármaco y el excipiente. ⁽¹⁸⁾

La búsqueda de la formulación óptima de un principio activo precisa de un estudio de absorción "*in vivo*" largo y costoso. Con la finalidad de simplificar dicha búsqueda mediante una solución previa de las formulaciones propuestas, se han diseñado modelos que permiten estudiar simultáneamente la disolución del principio activo y su paso a través de la membrana, un ejemplo de estos modelos "*in vitro*" es el que utiliza porciones de intestino invertido de rata en forma de sacos que son evaluados para probar la absorción de sustancias análogas de fármacos antes del trabajo de formulación y de investigación clínica. ⁽¹⁸⁾

Este modelo no es sólo una herramienta cualitativa usada para medir la absorción de compuestos estructuralmente relacionados, sino que también da una idea acerca del proceso involucrado en la absorción del fármaco. ⁽¹⁸⁾

Una aplicación interesante de esta técnica es el estudio de las variables en la forma de dosificación y el efecto de los excipientes y aditivos en la permeación del fármaco. ⁽¹⁸⁾

2. OBJETIVOS.

Determinar el grado de absorción del ácido acetil salicílico en la porción del duodeno utilizando la técnica de intestino invertido (*"in vitro"*).

Determinar la influencia del tipo y concentración de polietilenglicoles en la absorción del ácido acetil salicílico.

3. GENERALIDADES.

ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO.

3.1. Monografía.

3.1.1 Descripción:

Nombre químico. ⁽⁴³³⁾

acetato de ácido salicílico; ácido 2 - (acetiloxi)- benzoico; ácido o-acetil salicílico, ácido 2 acetoxi benzoico.

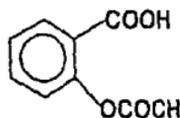
Sinónimos. ⁽⁴³⁾

El uso del nombre aspirina es limitado, en algunas ciudades es una marca registrada, otros nombres bajo los cuales se le conocen son: ácido acetil salicílico; ácido acetil salicilid; ácido acetil salicilicum, polopirina, Acetulum, Acidulatum, Acenterine, Aceticil, Acetofen, Acetosal, Acido acetosalico, Acetosalin, Acetilin, Acetil-SAL, Acimetten, Acilpirin, A.S.A.; Asatard; Aspro; Asteric; Caprin; Colfarit; Contrheuma retard; Delgesic, Duramax; Ecotrin; Empirin; ECM; Endidol; Entrofen; Enterosarine; Helicon, Neuronika, Rhodine, Salacetin, Salcetogen, Saletin, Solpiron Xaxa.

Fórmula condensada. ⁽⁴³³⁾



Fórmula semidesarrollada. ⁽⁴³³⁾



Esquema.3.1.

Peso molecular. ⁽⁴³³⁾

180.15

3.1.2. Propiedades.

Apariencia. ⁽⁴¹¹⁾

Polvo blanco cristalino ó sin color, comunmente rectangulares o como agujas, sin olor o casi sin olor pero puede tener un débil olor a ácido acético.

3.1.3. Propiedades de los sólidos.

Intervalo de fusión. ⁽⁴¹¹⁾

La aspirina funde a 135°C pero la temperatura de fusión varia en las condiciones de fusión de la prueba, aunque su punto de fusión no es muy definido teniendo varios, siendo los que se han dado entre 118 - 144°C.

La Farmacopea Europea da un punto de fusión de 141°C a 144°C como una determinación del método instantáneo.

Análisis térmico diferencial. ⁽⁴⁾

Cuando la aspirina (estándar de referencia USP) se calienta a una velocidad de 15°/min en presencia de aire, sólo se observa una endoterma con un Temp. inicial= 134° y Temp. pico=139°

3.1.4. Propiedades en solución.

Solubilidad. ⁽⁴¹¹⁾

En agua a 25°C · 0.0033 g/ml; en agua a 37°C· 0.01 g/ml; en agua a 100°C, 0.03 g/ml; etanol de 0.2 - 0.4 g/ml; cloroformo, 0.025 - 0.06 g/ml; tetracloruro de carbono, 0.0004 g/ml; éter, 0.1 - 0.2 g/ml; benceno, 0.0033 g/ml; éter de petróleo, insoluble; menos soluble en éter absoluto; se disuelve con descomposición en las soluciones acuosas de hidróxidos alcalinos y carbonatos.

Constante de disociación (pka). ⁽⁴¹¹⁾

A 25°C $K_d = 2.8 \times 10^{-4}$ (pka= 3.55). El Merck Index da un valor de 3.27×10^{-4} (pka = 3.49).

Coefficiente de partición. ⁽⁴⁾

Cuando se hace la partición de la aspirina entre el buffer pH 1-7 y alcohol octílico, se obtienen coeficientes de partición que van de $K = 17.7$ (pH=1) a $K = 0.025$ (pH=7). Se determinó el coeficiente de partición en tolueno : agua $K = 0.35$ y en cloroformo : agua, $K = 1.81$.

Dosis letal 50.⁽²³⁾

DL₅₀ oral en ratas y ratones: 1.1, 1.5 g/Kg.

3.1.5. Categoría terapéutica.⁽²¹⁾

Analgésico, antipirético, antiinflamatorio.

En veterinaria: Analgésico, antipirético, antirreumático, anticoagulante.

3.1.6. Incompatibilidades Farmacéuticas.⁽²²⁾

La aspirina forma una masa pastosa cuando es triturada con acetanilida, fenacetina, antipirina, aminopirina, metenammina, fenol o salicilato de fenilo. Los polvos que contienen aspirina con una sal alcalina tal como el bicarbonato de sodio llegan a ser gomosas con el contacto de la humedad atmosférica. La hidrólisis ocurre en una mezcla con sales que contienen agua de cristalización. Soluciones de acetatos y citratos alcalinos, así como álcalis por si solos disuelven a la aspirina, pero las soluciones resultantes hidrolizan rápidamente para formar sales de ácido salicílico y ácido acético. La glucosa y el glicerol se ha mostrado que impiden esta descomposición. La aspirina libera muy lentamente ácido yodhídrico del yoduro de potasio o de sodio. Una oxidación subsecuente por aire produce yodo libre.

3.1.7. Estabilidad.⁽²²⁾

Es estable en aire seco, pero en aire húmedo se hidroliza gradualmente a ácido salicílico y ácido acético siendo el olor del último notorio; su hidrólisis depende del pH; tiene una constante de hidrólisis en agua a 100°C de 0.17 la cual depende de las condiciones experimentales.

Se encontró que la descomposición es en parte debida a la trans esterificación y esta sustitución incrementa la estabilidad. Se han realizado estudios de la estabilidad de la aspirina en PEGs (sustituídos, no sustituidos y esterificados) así como con otros alcoholes polihídricos.

3.1.8. Almacenamiento.⁽²²⁾

En contenedores herméticos

3.2. POLIETILENGLICOL.

3.2.1. Nombre común.⁽⁴⁾

NF: Polietilenglicol.

BP: Macrogol.

3.2.2. Categoría funcional.⁽¹⁾

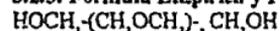
De acuerdo a la United States Pharmacopeia (USP) como base para supositorio, disolvente, lubricante en tabletas y/o cápsulas, base para ungüento. La British Pharmacopeia (BP) le da categoría de coadyuvante farmacéutico.

3.2.3. Nombre químico.⁽¹⁾

- α -Hydro ω - hidroxipoli- (oxi - 1, 2 - etanodiyil).

3.2.4. Sinónimos.^(1,11)

Macrogol; PEG; Carbowax; Jeffox; Nicoline; Pluracol E; Poli G; Poliglicol E; Sol base, Polioxietilen glicol.

3.2.5. Fórmula Empírica y Peso molecular.^(1,12)

En donde n es mayor o igual a 4 y representa el promedio del número de grupos oxietileno. El número el cual sigue al nombre indica el promedio del peso molecular del compuesto.

3.2.6. Fórmula Estructural y Promedio de Peso molecular.⁽¹⁾

Tabla No. I.

Grado	n	Promedio de Peso molecular
1500	30-36	1400 - 1600
4000	69 - 84	3000 - 4800
6000	-	5400 - 6600

3.2.7. Método de manufactura.^(1,13)

Son progresivamente formados por condensación de polímeros de óxido de etileno y agua, bajo presión (cerca de 4 atm), a temperaturas en el intervalo de 120 a 135°C y en la presencia de un catalizador, o de hidróxido de sodio.

3.2.8. Descripción.^(1,13)

Polietilenglicoles (PEGs) líquidos. (grados 200 - 600).

Son claros, sin color o ligeramente amarillentos, líquidos viscosos. El olor es ligero pero característico, y el sabor es amargo. El PEG 600 puede ser sólido a temperatura ambiente.

PEGs sólidos. (grados 1000 - 2000).

Los grados sólido son blancos o de color no blanco (transparente), y tienen un rango de consistencia entre pasta y cera en forma de hojuelas. Su olor es suave y dulce. Los grado 6000 y arriba se encuentran como mezclas de polvos de fluidez libre.

Se disuelven en agua formando soluciones transparentes. No sufren hidrólisis o se deterioran en condiciones normales.

3.2.9. Especificaciones Farmacopeicas.⁽¹⁾
National Formulary. (NF).

Tabla No. II.

Prueba	Polietilenglicol.
Apariencia y/o color de solución.	+
Viscosidad.	De acuerdo al grado de PEG.
pH (5% en solución).	4.5 - 7.5.
Acidez o alcalinidad.	-
Residuo de ignición.	≤ 0.1%.
Arsénico.	≤ 3 ppm.
Metales pesados.	≤ 5 ppm.
Límite de etilenglicol y dietilenglicol.	≤ 0.25% (combinado).
Oxido de etileno.	≤ 0.02%.
Promedio de peso molecular (MM).	95.0 - 105% de valor nominal (cuando MM < 1000). 90.0 - 110.0% del valor nominal. (cuando MM = 1000 - 7000). 87.5 - 112.5% del valor nominal. (cuando MM > 7000).
Valor de hidroxilo.	-
Índice de refracción.	-
Densidad.	-
Cenizas sulfatadas.	-
Agua.	-
Punto de enfriamiento.	-
Color de solución.	-

3.2.10. Especificación para Viscosidad NF (a $98.9 \pm -0.3^{\circ}\text{C}$).⁽¹⁾

Tabla No. III.

Promedio nominal. Peso molecular.	Rango de viscosidad (cSt).
1500	26 a 33
4000	110 a 158
6000	250 a 390

3.2.11. Propiedades típicas.

Densidad.⁽¹⁾

PEGs líquidos 1.11 - 1.14 g/ml (25°C); PEGs sólidos 1.15 - 1.21 g/ml.

Punto de fusión.⁽¹⁾

PEG 1500: 44 - 48 °C

PEG 4000: 50 - 58°C

PEG 6000: 55 - 63°C

Contenido de humedad.⁽¹⁾

≤ 1.0% (Karl Fisher).

Higroscopicidad.⁽¹⁾

PEGs líquidos son muy higroscópicos, pero la higroscopicidad decrece con incremento en el peso molecular. Grados sólidos de 4000 y arriba de este tienen baja higroscopicidad.

Solubilidad/Miscibilidad.⁽¹⁾

Todos los grados son solubles en agua y miscibles en todas las proporciones con otros PEGs (después de fundirse, si es necesario). Soluciones acuosas de grados de PEG de alto peso molecular pueden formar geles.

PEGs líquidos son solubles en alcohol, glicoles, acetona, glicerol y benceno.

PEGs sólidos son solubles en metanol, etanol, acetona y cloruro de metileno. Estos son ligeramente solubles en éter y en hidrocarburos alifáticos, pero insolubles en parafina líquida, grasas y aceites compuestos.

Tensión superficial.⁽¹⁾

PEGs líquidos: aprox 44 mN/m; PEGs sólidos aprox 55 mN/m (10% en solución acuosa).

Viscosidad.⁽¹⁾

Medido con un viscosímetro capilar (mm²/s).

A 25°C el PEG 1500, PEG 4000, PEG 6000 se encuentran en forma sólida.

A 99°C el PEG 1500: 15(mm²/s); PEG 4000: 180(mm²/s); PEG 6000: 580 (mm²/s).

Conforme el peso molecular de los PEGs incrementa, su solubilidad en agua, presión de vapor, higroscopicidad y solubilidad en disolventes orgánicos disminuye, al mismo tiempo, su rango de fusión o enfriamiento, densidad, punto de ignición y viscosidad aumenta.

3.2.12. Estabilidad y Condiciones de Almacenamiento.⁽¹⁾

Químicamente estables en aire y en solución. Los PEGs no soportan el crecimiento microbiano, no se hacen rancios. El acero inoxidable, aluminio y vidrio son preferidos para el almacenamiento de productos líquidos de bajo peso molecular.

Pueden absorber humedad, especialmente los grados de peso molecular menor de 2000. Estos deben ser almacenados en contenedores bien cerrados. Soluciones acuosas de PEGs pueden ser esterilizados por filtración o en autoclave y la esterilización de los grados sólidos, por calor seco a 150 °C por 1 hora pueden inducir a oxidación, oscurecimiento y a la formación de productos de degradación ácida.

Idealmente la esterilización debe ser llevada a cabo en una atmósfera inerte, o la oxidación puede ser inhibida por la inclusión de un anti-oxidante adecuado.

Si se usan tanques de calentamiento para mantener los PEGs sólidos en un estado fundido, se debe tener cuidado para evitar la contaminación con hierro, el cual puede causar decoloración. La temperatura debe ser mantenida al mínimo necesario para asegurar la fluidez. Puede ocurrir oxidación si los PEGs son expuestos por períodos largos a temperaturas que exceden los 50°C. El almacenamiento con nitrógeno reduce la posibilidad de oxidación.

3.2.13. Incompatibilidades.⁽⁴¹⁾

La reactividad química de los PEGs es principalmente confinada a los grupos hidroxilo terminales, los cuales pueden ser esterificados. Sin embargo, todos los grados pueden exhibir una actividad oxidante debido a la presencia de impurezas de peróxidos y de productos secundarios formados por autooxidación.

Incompatibilidades químicas pueden ocurrir con aspirina, ácido carbónico, bismuto, sales de mercurio y de plata, yodo, yoduro de potasio y derivados de teofilina.

Los PEGs grados sólidos son incompatibles con el rojo No. 3 y el amarillo No. 5 de la FD&C. Adicionalmente, los grados sólidos interactúan con el azul No. 1 y los rojos No. 1,2 y 4 de la FD&C. No ocurre reacción con las lacas de los colorantes antes mencionados.

La actividad antibacteriana de ciertos antibióticos, particularmente la penicilina y la bacitracina, es reducida con las bases de PEG. La actividad conservadora de los ésteres de hidroxibenzoato puede ser afectada debido a su unión con los PEGs.

El sorbitol puede precipitar a partir de mezclas. Plásticos tales como el polietileno, fenol, formaldehído, cloruro de polivinilo y membranas de ésteres de celulosa pueden ser reblandecidos o disueltos por PEGs.

Puede ocurrir migración del PEG de tabletas recubiertas por capa delgada, permitiendo la interacción con los componentes de la cubierta.

3.2.14. Seguridad.⁽⁴²⁾

La toxicidad es baja. El PEG es permitido para alimentos de animales y en agua para beber. La irritación en la piel es mínima, pero los PEGs pueden causar un efecto local de comezón cuando es usado como base para supositorios debido a su hipertonidad.

La actividad de los fármacos disueltos en PEGs puede ser potenciada.

PEG 4000: DL₅₀ oral en ratas 59 g/Kg (dosis divididas).

PEG 6000: DL₅₀ oral en ratas menor de 50 g/Kg.

Pruebas realizadas en placa han mostrado que esos compuestos son inocuos y su uso continuo ha confirmado su disminución en la irritación.

3.2.15. Precauciones de manejo.⁽⁴³⁾

Incendia ligeramente, evitar calentamiento y sustancias de oxidación. Si estos compuestos se encienden, los pequeños fuegos deben ser extinguidos con dióxido de carbono o extinguidores químicos secos y los fuegos grandes con extinguidores de espuma tipo "alcohol".

3.2.16. Aplicaciones en Tecnología y Formulaciones Farmacéuticas. (4)

Agente aglutinante. (4)

Los PEGs sólidos son útiles como bases solubles en agua en los ungüentos. La consistencia puede ser ajustada por una mezcla con PEGs de bajo peso molecular (ej: macrogol para ungüentos BP). Como base para supositorios, mezclas de PEG ofrecen las ventajas siguientes sobre las grasas.

a) El punto de fusión es alto, así estos pueden soportar la exposición a climas templados.

b) La liberación del fármaco no es dependiente del punto de fusión

c) La estabilidad física en almacenamiento es mejor.

d) Estos son fácilmente miscibles con fluidos rectales.

La desventaja es que los PEGs son más reactivos químicamente que las grasas. Es necesario tener un mayor cuidado en el proceso para evitar la formación de agujeros en los supositorios. La velocidad de liberación de los medicamentos solubles en agua disminuye con el incremento en el peso molecular del PEG.

Los PEG también tienden a ser más irritantes para las membranas mucosas que las grasas.

Agente suspensor. (4)

En vehículos acuosos, los PEGs han sido usados para ajustar la viscosidad y la consistencia. Cuando son usados en conjunto con otros emulsificantes los PEGs pueden actuar como estabilizantes de las emulsiones.

Disolvente. (4)

Los PEGs líquidos son usados como vehículos miscibles en agua para los contenedores de las cápsulas de gelatina blanda. Sin embargo pueden causar endurecimiento de la cubierta por absorción preferencial de la humedad a partir de la cubierta de gelatina.

En concentraciones arriba del 30 %, los PEG 300 y 400 han sido usados como vehículos en formas de dosificación parenteral.

La solubilidad en agua de los vehículos de PEG no asegura la disponibilidad de los fármacos contenidos en los vehículos.

Solubilizante. ⁽¹⁾

La solubilidad acuosa y las características de disolución de los compuestos poco solubles puede ser incrementada haciendo dispersiones sólidas con un PEG adecuado. También se han realizado estudios en animales sobre el uso de los PEG como disolventes de esteroides en bombas osmóticas.

Aglutinante. ⁽¹⁾

Los PEG de alto peso molecular pueden aumentar la efectividad de los aglutinantes para tabletas e imparten plasticidad a los gránulos. Sin embargo estos tienen una acción aglutinante limitada, y pueden prolongar la desintegración, si se encuentran presentes en concentraciones mayores de 5%.

Cuando son usados para granulaciones termoplásticas una mezcla en polvo de los constituyentes con 10 a 15% de PEG 6000 se calienta a 70-75°C. La masa llega a ser como una pasta y se forman gránulos cuando es agitada mientras se enfría. La técnica es útil para formas de dosificación tales como las tabletas cuando se requiere una desintegración prolongada.

Plastificantes en cubierta de película. ⁽¹⁾

Los PEGs grados sólidos pueden ser usados solo para tabletas con recubrimiento de cubierta de película. Estos son ampliamente usados como plastificantes en conjunto con polímeros formadores de películas. La presencia de PEGs en cubiertas de película especialmente los grados líquidos tienden a incrementar la permeabilidad al agua y pueden reducir la protección de la cubierta de película entérica contra los pHs bajos.

Los PEGs son útiles como plastificantes en los productos microencapsulados para evitar la ruptura de la cubierta de película cuando las microcápsulas son comprimidas en tabletas.

Lubricante. ⁽¹⁾

Los PEGs grado 6000 y los que están arriba de este peso molecular pueden ser usados como lubricantes, particularmente solubles. La acción lubricante no es tan buena como la del estearato de magnesio y puede desarrollar adherencia, si el material llega a calentarse durante la compresión. Un efecto antiadherente es también ejercido para evitar un sobre calentamiento.

3.2.17. Sustancias relacionadas. ⁽¹⁾

Ésteres de polioxietileno, alquil éteres de polioxietileno, ésteres de los ácidos grasos de polioxietileno de sorbitan.

3.2.18. Usos. ^(10,11)

Debido al amplio rango de solubilidad y compatibilidad, lo cual los hace usuales en preparaciones farmacéuticas y cosméticas, su suavidad los hace altamente aceptables en preparaciones para el arreglo del cabello, en cosméticos en general y en cremas para bronceado, lociones para las piernas, cremas para afeitar, y cremas para la piel. Como lubricantes solubles en agua para moldes de goma, fibras textiles y en operaciones para la formación de metales. En alimentos y empaques para alimentos. También en pinturas de agua, recubrimientos de papel, pulidores y en la industria cerámica.

En tabletas como lubricante.

Los lubricantes son usados para reducir la fricción durante la eyección y la compresión de entre las paredes de la tableta y las paredes de la cavidad de la matriz en la cual la tableta es formada. Los lubricantes también poseen propiedades antiadherentes y deslizantes. ⁽¹²⁾

La lubricación se considera que puede ocurrir por dos mecanismos. La primera se nombra lubricación fluida (o hidrodinámica), porque las dos superficies en movimiento se ven como si estuvieran separadas por una capa fina y continua de lubricante fluido. El segundo mecanismo, una lubricación de recubrimiento, resulta de la adherencia de las porciones polares de la molécula con cadenas largas de carbón a las superficies de metal de la pared de la matriz. ⁽⁴⁾

Lubricantes del tipo de recubrimiento son mejores que los lubricantes de tipo fluido a partir de que la adherencia del lubricante de recubrimiento a la pared de la matriz es mayor que la del tipo fluido. ⁽⁶⁾

Conforme el tamaño de partícula de la granulación disminuye, las fórmulas requieren un mayor porcentaje de lubricante. ⁽⁴⁾

El lubricante más ampliamente usado ha sido el ácido esteárico y varias sales de ácido esteárico y derivados. El estearato de calcio y de magnesio son las sales más comúnmente empleadas. El ácido esteárico es un lubricante menos efectivo que esas sales y también tiene un bajo punto de fusión. El talco es probablemente el segundo más comúnmente usado como lubricante de tabletas. ⁽¹³⁾

Los Polietilenglicoles de alto peso molecular y ciertos surfactantes poliméricos han sido usados como lubricantes solubles en agua. Estos materiales son mucho menos efectivos como lubricantes, que los materiales previamente citados. ⁽¹²⁾

3. Generalidades.

Como se anotó previamente, la mayoría de los materiales listados como lubricantes, con la posible excepción de aquellos que son solubles en agua, también funcionan como antiadherentes.⁽¹³⁾

La lubricación es básicamente un proceso de cobertura y entre más fino es el tamaño de partícula del lubricante, la acción del lubricante se espera que sea más efectiva.⁽¹⁴⁾

Los lubricantes son divididos en dos categorías: 1) los lubricantes de tipo hidrofóbico tales como las grasas y aceites, los cuales son más ampliamente usados y 2) los lubricantes solubles, los cuales son grandemente usados para tabletas que se van a disolver por efervescencia. La elección del lubricante depende en parte del modo de administración y el tipo de tableta que se esta produciendo.⁽¹⁵⁾

El tipo de lubricante, su concentración y el método de incorporación debe ser optimizado durante el desarrollo de la formulación.⁽¹⁶⁾

Muchos lubricantes de tabletas eficientes son hidrofóbicos pero pueden retardar la desintegración y la disolución del fármaco. El método de incorporación del lubricante puede influenciar la penetración en la tableta por el medio disolvente.⁽¹⁷⁾

El efecto del lubricante en la velocidad de disolución del fármaco de las tabletas depende de las propiedades de los gránulos y del lubricante y además de la cantidad de lubricante usado. Si los gránulos de las partículas son hidrofílicas y de desintegración rápida, un agente activo de la superficie puede tener un pequeño efecto. Sin embargo cuando los gránulos son menos hidrofílicos y lentos para desintegrarse, un lubricante activo de la superficie tal como el lauril sulfato de magnesio puede incrementar la disolución.⁽¹⁸⁾

Lubricantes solubles en agua.

Usados sólo cuando la tableta debe ser completamente soluble en agua o cuando son deseadas una desintegración única o más comúnmente unas características de disolución. En situaciones en donde lubricantes solubles en agua son requeridos, se ha encontrado aplicación del Polietilenglicol 4000 y Polietilenglicol 6000.⁽¹⁹⁾

Estos deben ser usados con ingredientes activos como ácido ascórbico, aspirina, clorhidrato de tiamina y otras vitaminas solubles en agua; así como con otros lubricantes entre más pequeño es el tamaño de partícula, mayor es la distribución de los gránulos y más eficiente es el efecto del lubricante.⁽²⁰⁾

3. Generalidades.

Sin embargo, Polietilenglicoles sólidos de un tamaño de partícula extremadamente pequeño no son disponibles comercialmente. Tamaños de partícula de 50 μm o menos pueden ser obtenidos solo por micronización de Polietilenglicoles que han sido enfriados.⁽⁴⁾

Se ha encontrado que las tabletas solubles en agua pueden ser preparadas por compresión directa empleando como lubricante polvo de Polietilenglicol de un pequeño tamaño de partícula (menos de 50 μm) y preferentemente de 1 a 5 μ como lubricante.⁽⁴⁾

Los principales ingredientes solubles en agua que son usados pueden ser, por ejemplo, medicinas solubles en agua tales como el ácido ascórbico, clorhidrato de tiamina, aminoácidos, cafeína, maleato de clorofenilamina, y los aditivos solubles en agua para comida tales como los endulzantes, por ejemplo dextrosa, sucrosa y los ácidos orgánicos tales como el ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico y los colorantes, saborizantes y conservadores tales como el perborato de sodio, cloruro de potasio, y los químicos solubles en agua para agricultura tales como el pentacloro fenilamato de sodio, kasugamicina y el gel glastacidina S.⁽¹⁸⁾

El polvo de PEG de super partícula que tiene un tamaño de partícula menor de 50 micras puede ser solamente obtenido por pulverización del PEG con un mezclador de aire supersónico con corriente a chorro o impactando la corriente de la partícula mezclada empleando una corriente de aire supersónico.⁽¹⁹⁾

Usando un molino convencional tal como el molino de pelota, pulverizador, o el micro molino es difícil de obtener polvo de PEG de super micro partículas, y es igual si es usado un método especial para pulverizar, el PEG obtenido es en su mayoría solo en un nivel cerca de un No. de malla 100 (cerca de 140 micras).⁽¹⁹⁾

El excelente efecto lubricante del polvo de PEG en super micro partícula tiene un tamaño de partícula menor de 50 micras comparando con el polvo grueso de PEG.⁽¹⁹⁾

Usando PEG el cual tiene un tamaño de partícula de 1 a 10 micrones, y preferentemente de 1 a 5 micrones, como lubricante, pueden prepararse unas tabletas solubles en agua excelentes sobre períodos largos de tiempo usando sólo pequeñas cantidades de PEG.⁽¹⁹⁾

Los polvos de PEG de super micropartícula (tamaño de partícula menor de 50 micras), son particularmente excelentes en su efecto lubricante en métodos de compresión directa comparados con el polvo de PEG.⁽¹⁹⁾

3.3. ABSORCIÓN DE FÁRMACOS.

La absorción de los fármacos está usualmente definida como el paso del fármaco de su sitio de administración a la circulación.⁽¹⁾

Un fármaco debe atravesar varias membranas biológicas antes de que alcance su sitio de acción independientemente de la ruta de administración. En la cavidad oral existen dos regiones, bucal y sublingual, donde las membranas son muy delgadas tienen un suministro de sangre abundante. La administración sublingual del fármaco involucra colocar el fármaco en su forma de dosificación debajo de la lengua para que se lleve a cabo la absorción en el sistema circulatorio. La administración bucal del fármaco es ordinariamente llevada a cabo colocando el fármaco entre la mejilla y las encías.⁽²⁾

Los fármacos administrados oralmente y probablemente rectalmente, pasan directamente a través del hígado a la circulación. Si el fármaco es fácilmente biotransformado en el hígado, este paso inicial por vía de la ruta hepática puede resultar en un metabolismo considerable del fármaco antes de que este llegue a la circulación periférica. Esta pérdida de fármaco en su primer paso por el hígado es llamada el efecto de primer paso. Los fármacos administrados intravenosamente, intramuscularmente, subcutáneamente, sublingualmente y bucalmente, por otro lado, entran a la circulación directamente y son llevados a los tejidos del cuerpo antes de su paso por el hígado donde probablemente sean descompuestos. Las tabletas sublinguales y bucales son por lo tanto ideales para fármacos potentes en dosis pequeñas.⁽³⁾

La irrigación venosa de la cavidad oral va directamente al corazón, la cual la hace una excelente ruta para el tratamiento de ciertos padecimientos del corazón.⁽⁴⁾

El transporte o paso del fármaco a través de las membranas en varias partes del cuerpo depende del amplio intervalo en la selectividad y las características de las membranas. El tamaño del poro, la composición de la membrana y la presencia de acarreadores dependientes de energía pueden afectar la absorción del fármaco, sin embargo, la mayoría de los fármacos pasan a través de las membranas biológicas por difusión simple o pasiva.⁽⁵⁾

Los fármacos pueden ser administrados oralmente en una variedad de formas de dosificación, las cuales incluyen cápsulas, tabletas, soluciones, emulsiones y suspensiones, estas son administradas sublingualmente como tabletas, rectalmente como supositorios o soluciones, tópicamente como ungüentos, linimentos, soluciones, cremas o soluciones por inhalación como gases, vapores, aerosoles o polvos, y por inyección; como soluciones o suspensiones. La velocidad de absorción a partir de estos sitios es determinada por las propiedades fisicoquímicas del fármaco, la forma de dosificación del fármaco, y por un número de factores anatómicos y fisiológicos.⁽⁶⁾

Ordinariamente cuando un fármaco se administra por acción sistémica, se desea una velocidad de absorción rápida. Por otro lado, una velocidad de absorción lenta puede ser de gran ventaja cuando es necesaria una acción farmacológica prolongada a partir de una sola dosificación del fármaco. Además una velocidad de absorción lenta es un requerimiento definido para las medicinas aplicadas a la piel o las membranas mucosas para una acción local. ⁽¹⁾

3.3.1. Difusión pasiva de membranas.

La difusión ocurre cuando las moléculas del fármaco existen a una alta concentración en un lado de la membrana y una concentración pequeña en el otro lado de esta. La difusión ocurre en una fuerza para igualar la concentración del fármaco en ambos lados de la membrana, en donde la velocidad de transporte es proporcional al gradiente de concentración a través de la membrana. La Primera Ley de Fick's establece que la velocidad de difusión o transporte a través de la membrana es directamente proporcional al área superficial de la membrana y al gradiente de concentración, y es indirectamente proporcional a la adherencia de la membrana. ⁽¹⁾

Un cambio en cualquiera de estas variables puede alterar la velocidad de transporte del fármaco a la sangre. El valor del coeficiente de difusión es dependiente de la naturaleza química del fármaco y, en particular, de su grado de lipofilicidad, el cuál puede ser evaluado aproximadamente a partir del coeficiente de partición en disolvente acuoso-disolvente orgánico. La difusión puede ser también influenciada por la temperatura, la presión, y por la naturaleza del disolvente. Una absorción más rápida ocurre en el intestino delgado más que en el estómago debido al área superficial alta provista por vellos y microvellos encontrados en el intestino delgado. ⁽⁷⁾

3.3.2. Transporte activo de las membranas.

Los fármacos que se absorben vía un mecanismo de transporte activo pueden pasar de áreas de menor concentración a áreas de alta concentración. Se piensa que la transferencia es mediada vía un "acarreador", en contraste con la difusión pasiva, en donde la energía química expedida por el cuerpo es requerida para que el transporte activo ocurra. El sistema de acarreador puede consistir de una enzima o de otra sustancia en la pared gastrointestinal. El acarreador se combina con el fármaco y lo acompaña a través de la membrana para ser descargado en el otro lado de la membrana. El complejo acarreador-fármaco se considera que contiene una alta permeabilidad a través de la membrana del intestino más que el fármaco solo. El transporte activo de los fármacos es específico de un sitio, y la mayor absorción ocurre en lugares del tracto gastrointestinal, donde la concentración del acarreador es mayor. ⁽⁷⁾

A bajas concentraciones, la velocidad de absorción del fármaco por transporte activo es proporcional a la concentración del fármaco en el intestino. A niveles altos de fármaco el sistema de acarreadores eventualmente se vuelve saturado y los niveles de absorción se detienen a una velocidad máxima determinada.⁽⁷⁾

Por lo tanto la velocidad de absorción de las sustancias que se absorben vía transporte activo no se incrementan a medida que la dosis se aumenta, una vez que el mecanismo de acarreadores se satura.⁽⁷⁾

La difusión facilitada es una forma especial de transporte por acarreadores la cual tiene varias características del transporte activo, pero el sustrato no se mueve contra un gradiente de concentración. La glucosa que las células toman es un ejemplo de la difusión facilitada. La difusión facilitada es mediada por una molécula de acarreador en la mucosa, la cual es selectiva, saturable, y la cual puede ser inhibida por ciertos electrolitos., pero la difusión facilitada no necesita de la energía liberada por el cuerpo para que este proceso ocurra.⁽⁷⁾

Otros mecanismos de absorción incluyen la pinocitosis y la absorción par iónico. La pinocitosis literalmente significa "célula bebiendo" y es un proceso en el cual la superficie de la célula se invagina y toma la pequeña vacuola de líquido que contiene el soluto o el fármaco.⁽⁷⁾

3.3.3. Métodos de estudio.

Por muchos años, la absorción del tracto gastrointestinal fue analizada simplemente sobre las bases de como un fármaco era efectivo o no cuando era administrado por vía oral. Posteriormente este método fue desarrollado por comparación de la respuesta farmacológica vista después de la administración oral con la obtenida después de una inyección intravenosa. Con el advenimiento de métodos químicos específicos para la estimación de fármacos en material biológico, el estudio de los fármacos fue puesto en bases cuantitativas. Las velocidades de absorción pueden ser medidas exactamente, y los mecanismos de absorción pueden ser investigados para obtener datos cinéticos detallados. Puede ser posible determinar como una absorción pobre es debida a la inhabilidad de las moléculas del fármaco para penetrar las membranas gastrointestinales o por destrucción del fármaco por las enzimas intestinales o el ácido gástrico.⁽¹⁾

Manteniendo la definición de la absorción de un fármaco, el camino más directo para demostrar que la absorción ha ocurrido debe ser por la detección del fármaco en la sangre o en la orina después de la administración en el tracto alimentario. Desafortunadamente, excepto bajo circunstancias especiales, la forma de detección que nos da una idea de la velocidad o completa absorción, en tal método no es cuantitativo.⁽¹⁾

Además, las velocidades relativas de absorción de dos o más fármacos no pueden ser probadas debido a diferencias en el metabolismo, distribución y excreción de los fármacos. Algunas veces es posible hacer el método cuantitativo obteniendo una comparación detallada de la cinética en sangre o de niveles urinarios del fármaco después de una administración intravenosa y oral. Sin embargo si un fármaco es rápidamente metabolizado por el hígado, sus niveles sanguíneos pueden diferir después de una administración intravenosa y oral, porque el fármaco absorbido del intestino va directamente al hígado antes de ser distribuido en el cuerpo. Las principales aplicaciones del método son en estudios realizados en el humano y en estudios en los cuales es importante conocer los niveles sanguíneos del fármaco a varias dosis y formas de dosificación.⁽¹⁾

Otro método directo para proveer la absorción involucra la medición de la cantidad de fármaco en todo el cuerpo y recolectar las excreciones después de remover el tracto gastrointestinal. Este método es limitado a animales pequeños, aquellos que se pueden introducir en un homogeneizador. Además, el método puede ser cuantitativo sólo en instancias raras de un fármaco que no es metabolizado. Por otra parte usando un fármaco marcado radioactivamente y midiendo el isótopo en el aire expirado también en el cuerpo como en la excreción, es posible sobrellevar el problema de los fármacos que son metabolizados.⁽¹⁾

El método cuantitativo más usual para medir la absorción es indirecto en el cual se involucra una estimación de la cantidad de fármaco que ha desaparecido del canal gastrointestinal. Por supuesto antes de desaparecer para ser igualado con la absorción, debe ser probado que el fármaco no es destruido el lumen del canal. Numerosas variaciones de este método han sido aplicadas en estudios de absorción de fármacos, azúcares, aminoácidos, lípidos, e iones inorgánicos. Este tipo de experimento es más fisiológico, un fármaco se administra oralmente a animales sin anestesiarse, los animales no se sacrifican hasta después de un tiempo determinado después del cual todo el tracto gastrointestinal y su contenido se remueven y se analiza el fármaco remanente. Si sólo el contenido luminal y los lavados son analizados, debe ser probado que el fármaco no desapareció por unión o adsorción al tejido gastrointestinal. Sin embargo este tipo de experimento es altamente fisiológico, tiene la desventaja de una alta variabilidad. Debido a las variaciones en la velocidad de vaciado gastrointestinal, un fármaco puede permanecer en el estómago por periodos indefinidos de tiempo. Diferentes grados de motilidad intestinal resultan en varias velocidades de movimiento del fármaco a lo largo del canal intestinal también como en diferentes grados de mezclado del fármaco y de exposición a la superficie de absorción.⁽¹⁾

Además, a menos que los animales hayan sido alimentados, la cantidad y el tipo de alimento y su estado de digestión pueden influir la absorción del fármaco, en vista de que muchos fármacos se unen a componentes de los alimentos y el bolo alimenticio interfiere con el mezclado del fármaco. ⁽¹⁾

Para eliminar muchas de las variables descritas anteriormente, muchos investigadores han buscado condiciones experimentales menos fisiológicas. Para estudiar la absorción gástrica, los fármacos se introducen en el estómago, el cual es ligado al final del piloro y la región cardiaca. ⁽¹⁾

En el intestino, los fármacos se colocan en un segmento de intestino aislado por ligamentos, o en una porción de intestino ligado (loop) preparado quirúrgicamente, el cual abre al exterior del animal para facilitar la introducción repetida y obtención de solución del fármaco. Adicionalmente para reducir la variabilidad, las soluciones de fármaco pueden ser adicionadas a una velocidad constante a través de los segmentos intestinales o de las porciones de intestino ligadas (loops). Con estos métodos de perfusión, es posible reducir la variabilidad de la motilidad y mantener una presión hidrostática constante y un volumen de fluido constante a través del lumen del segmento. Las técnicas de perfusión proveen un alto grado de reproducibilidad de todos los métodos de absorción. ⁽¹⁾

Una aproximación radicalmente diferente para el estudio de la absorción involucra la medición del paso de una sustancia a través de la totalidad de la pared del intestino in vitro, esto es, movimiento de la región mucosal hacia la región serosal. (Wilson). Por definición dicho movimiento no constituye la absorción, tomando en cuenta que no hay un suministro sanguíneo en el tejido. ⁽¹⁾

En un tipo de experimento, un segmento de intestino es perfundido con solución amortiguadora salina oxigenada conteniendo la sustancia a ser estudiada, y la superficie exterior del segmento es colocada en un baño en una solución similar que no contiene la sustancia a estudiar. La velocidad de paso de la sustancia de una solución a la otra es fácilmente medible. Hasta aquí el método más popular de las preparaciones in vitro es el saco invertido de intestino de rata o de hámster, en el cual un segmento corto de intestino se llena con una solución, se liga en ambos extremos y se suspende en un baño que contiene una solución similar. (Wilson y Wiseman). Una importante desventaja del uso de intestino en las preparaciones in vitro es la disminución de la vida del tejido. Debido al inusual grado de permeabilidad, la velocidad de absorción del fármaco determinada a partir de estudios con intestino in vitro no tienen una relación significativa con las velocidades de absorción medidas in vivo. ⁽¹⁾

El valor principal de las preparaciones *in vitro* del intestino es su utilidad en el estudio de los mecanismos de transporte activo de las sustancias tales como monosacáridos, aminocidos y pirimidinas. La difusión de las sustancias es exagerada debido a la disminución de vida del tejido (leakiness), esto es posible de demostrar con el aumento de la solución serosal a una concentración mayor. Además, el intestino se puede exponer en una preparación *in vitro* a venenos del metabolismo, condiciones anaeróbicas o inhibidores competitivos del transporte para determinar la naturaleza cuantitativa del proceso de transporte. ⁽¹⁾

3.4. MÉTODOS *In Vitro*, *In Situ*, e *In Vivo* PARA EL ESTUDIO DE LOS FACTORES FISIOLÓGICOS QUE AFECTAN LA ABSORCIÓN DE FÁRMACOS.

La caracterización del comportamiento de la absorción de un fármaco permite el desarrollo y/o mejoramiento de las formas de dosificación. Las técnicas *In Vitro*, *In Situ*, y las más nuevas y recientes técnicas *In Vivo* han ayudado al investigador en el examen de las características de absorción de los fármacos ya que varios factores fisiológicos pueden afectar la absorción de los fármacos a través del tracto gastrointestinal. ⁽²⁾

Los estudios de absorción incluyen el examen de la región máxima de absorción en el tracto gastrointestinal, la investigación del proceso por la cual los fármacos son absorbidos (ejem: difusión pasiva y transporte activo), y la elucidación de factores fisicoquímicos que afectan el comportamiento de la forma de dosificación (ejem: ingrediente activo/ relación de excipientes, tabletas recubiertas contra tabletas recubiertas por capa fina, y parámetros de solubilidad). ⁽³⁾

Los métodos *In Vitro* e *In Situ* son simples y reproducibles. Los modelos *In Vivo* con animales usualmente consisten de animales de experimentación pequeños, tales como ratas, hámsters, conejos, y en algunas ocasiones perros y monos. Esto provee una guía en la absorción y acción de los fármacos, pero debe ser usada con precaución cuando se ha realizado una comparación con estudios clínicos. La experimentación *In Vivo* con humanos provee la información más útil, pero el trabajo es más caro, difícil de interpretar, y limitado por restricciones severas, tales como el consentimiento del paciente, particularmente en el caso de procesos pediátricos y geriátricos. Los estudios *In Vitro* e *In Situ* son por lo tanto de gran valor, así como son estudios más directos y económicos de la absorción y acción de los fármacos ⁽⁴⁾ y recientemente normalizado. ⁽¹¹⁾

Los estudios preclínicos de biodisponibilidad basados en la comparación de perfiles de administración intravenosa con perfiles que resultan de otras rutas de administración proveen un índice de la biodisponibilidad absoluta del compuesto administrado. Comparaciones similares sin un estándar usualmente permite solo una evaluación relativa de la biodisponibilidad. ⁽¹¹⁾.

Existen una variedad de factores fisicoquímicos que afectan toda la biodisponibilidad del fármaco, incluyendo la estabilidad, el tamaño de partícula, el tamaño de cristal, polimorfismo, el pka y el coeficiente de partición. Estos factores permiten la predicción de los problemas potenciales de biodisponibilidad como una función de las propiedades fisicoquímicas del fármaco en sí. ⁽¹²⁾

Los parámetros primarios de absorción del fármaco son sus características de solubilidad y de disolución. Un fármaco sólido administrado oralmente se debe disolver en el tracto gastrointestinal antes de su absorción a través de la mucosa gastrointestinal. ⁽²⁾

Otros factores que deben considerarse son la solubilidad y la velocidad de disolución intrínseca como una función del pH entre el intervalo de pH fisiológico de 1 a 8. Si la solubilidad disminuye con un incremento en el pH, el potencial por una incompleta absorción es mayor, especialmente si la disolución no se lleva a cabo rápidamente en el medio ambiente ácido del estómago. La solubilidad y la velocidad de disolución deben ser consideradas también como una función del tamaño que se piensa de la dosis terapéutica. El uso de los modelos de animales *in vitro*, *in situ*, e *in vivo* para evaluar la absorción de los fármacos a través del mucosa gastrointestinal y su relación con la biodisponibilidad, son de gran utilidad, aunque se enfatiza más sobre los parámetros fisiológicos más que los fisicoquímicos asociados con la evaluación de la biodisponibilidad. ⁽¹³⁾.

En la Tabla No. IV se mencionan las principales técnicas empleadas para el estudio de la absorción de formas farmacéuticas y de fármacos.

Tabla No. IV. (7)

In Vitro	In Situ	In Vivo
Técnica de saco invertido (Weisman and Wilson).	Técnica de perfusión (Schanker et al.)	Métodos directos: niveles de sangre, niveles urinarios.
Modificación de la técnica de saco invertido (Crane y Wilson).	Técnica de intestino de rata (Doluisio et al)	Métodos indirectos: respuesta farmacológica (Irwin et. al. De Cato et. al., Levy).
Técnica de recirculación (Fisher y Parsons, Wiseman, Darlington y Quastel).	Técnica de intestino en circuito cerrado (Levine y Pelikan).	Métodos con isótopos de vida corta. (Digenis et. al.)
Técnica del anillo invertido o de la rodaja (Crane y Mandelstam)	Técnica del estómago de rata (Schanker et. al., Doluisio et. al.)	
Técnica del flujo a través del saco invertido (Newburger y Stavehansky).		

3.4.1. Modelos In Vitro para probar la absorción de nuevos fármacos.

Un número de métodos in vitro para el estudio de la absorción intestinal han sido legados en los pasados 60 años. En 1899 Reid describió experimentos con pedazos de intestino aislado el cual separaba dos fluidos compartamentales. Posteriormente Auchinachie, MacLeod y Magee usaron porciones de intestino de conejo y los suspendían en un baño de solución salina oxigenada. (8)

El primer método para asegurar una oxigenación adecuada del tejido fue descrita en 1949 por Fisher y Parsons y subsecuentemente modificada por otros. En este método una porción de intestino de rata, fue montado de tal manera que la solución salina oxigenada podía ser circulada en ambos lados del tejido. Un último desarrollo fue el uso de sacos de intestino invertido amarrados, los cuales eran incubados con agitación en pequeños matraces gasificados con oxígeno. (9) Posteriormente un método en donde el uso de segmentos aislados de intestino invertido fue descrito por Wilson y Wiseman. En su método el fluido serosal podía ser solo muestreado al final del procedimiento de experimentación. Crane y Wilson posteriormente legaron un sistema de sacos invertidos el cual permitía un muestreo en serie del fluido en el lado serosal del intestino. (10)

En el desarrollo de formas de dosificación y regímenes de dosificación para nuevos fármacos antes del trabajo de formulación y de la investigación clínica, es muy importante evaluar la absorción de varios análogos de sustancias potenciales de fármacos. Para este ensayo, se han usado varios métodos de prueba simples, relativamente rápidos, baratos y reproducibles. A partir de que el fármaco se debe disolver y después permear a través de las membranas del tracto gastrointestinal, ambos parámetros deben ser evaluados. ⁽²⁷⁾

Así también tomando en cuenta que la administración oral es la ruta de elección para la administración de los fármacos los procesos *in vitro* que simulan a los procesos *in vivo* son útiles en la identificación de los problemas potenciales de biodisponibilidad durante el desarrollo de un fármaco. En donde uno de los principales factores que afectan la absorción del fármaco es la permeabilidad del fármaco a través de la mucosa gastrointestinal. ⁽²²⁾

Para estudios de permeación, un procedimiento *in vitro* el cual utiliza sacos de intestino invertido fue de valor para la predicción de las características de permeación de varias clases de fármacos. Una aplicación interesante de esta técnica fue el estudio de las variables de dosificación y los efectos de los excipientes y aditivos en la permeación de los fármacos. Este modelo fue empleado para estudiar el efecto de la formación de complejos en la absorción de fármacos y el efecto de los surfactantes fisiológicos y no fisiológicos en el transporte de los fármacos. ⁽²⁷⁾

Con este mismo método fue establecida la existencia de varios sistemas de enzimas que metabolizan los fármacos, los cuales juegan un papel muy importante en la absorción de los fármacos. La transferencia de ácido salicílico a través de los sacos de intestino invertido de rata disminuye por la presencia de potasio y varios electrolitos y azúcares tales como la glucosa. ⁽²⁷⁾

Usando una preparación de intestino aislado (intestino invertido de rata), Mayersohn y Gibaldi mostraron que la transferencia pasiva de varios fármacos puede estar influenciada significativamente por el contenido iónico de la solución amortiguadora que contiene el fármaco disuelto. ⁽¹³⁾ La transferencia de varios fármacos disminuye cuando el catión principal de la solución amortiguadora es K^+ o NH_4^+ . Parece existir una relación entre el grado en el cual estos cationes inhiben la transferencia y la habilidad para incrementar la cantidad de agua retenida por el tejido. ⁽¹³⁾

Así también dependiendo del azúcar (monosacárido) presente en la solución amortiguadora de (Krebs bicarbonato isotónica pH 7.4), se puede alterar efectivamente la transferencia de varios fármacos a través del intestino invertido de rata. Se encontró un estudio donde la transferencia de riboflavina, salicilato y sulfanilamida disminuye significativamente con la presencia de glucosa, y en la presencia de Phlorizin sustancia de la cual se conoce que inhibe el transporte activo de la glucosa, elimina la inhibición estimulada de la glucosa en la transferencia de riboflavina. Una inhibición similar de la transferencia de riboflavina se encontró en la presencia de xilosa. El manitol por otra parte, un azúcar que no penetra, no tuvo efecto en la transferencia acumulada de estos compuestos en donde parece existir una buena correlación entre el grado de fluido tomado por el tejido bajo varias condiciones experimentales y en la inhibición de la transferencia de riboflavina. De esta forma existen materiales que causan que el tejido tome fluido como la glucosa y xilosa, los cuales inhiben la transferencia y materiales que no causan que el tejido tome fluido como el manitol y glucosa + phlorizin que no tienen efecto en la transferencia del fármaco. ⁽¹¹⁾

Existen varios mecanismos sugeridos para explicar los efectos de los cationes y los azúcares en el transporte de fármacos. Uno de estos considera la concentración efectiva de fármaco en el tejido intestinal (ejem el compartimento epitelial celular). Existe indudablemente un incremento en el volumen compartimental celular del tejido del intestino en la presencia de varios inhibidores. Si este incremento en el volumen celular resulta en una disminución en la concentración del fármaco en la célula, uno esperaría que el gradiente de concentración existente entre este compartimento y la solución serosal fuera disminuido. Si la transferencia del tejido al compartimento serosal es limitante de la velocidad, existiría una disminución en la fuerza que conduce y una disminución en la velocidad de aparición del fármaco en el compartimento serosal. ⁽¹²⁾

El movimiento del azúcar de la región mucosal al lado serosal siempre ocurre contra un gradiente de concentración, y la velocidad de transporte se incrementa con incremento en la concentración del azúcar y disminuye a una velocidad original cuando la concentración original es restablecida. Así se obtuvieron velocidades reproducibles de transporte por un periodo de 80 minutos a 30°C. A 37°C este tiempo fue reducido a 40 minutos, sin embargo la velocidad de transporte del azúcar fue aproximadamente el doble. ^(11, 13)

Se disponen de dos vías para la difusión de fármacos a través del intestino invertido, una ruta celular la cual es asociada con una barrera lipoidal y una extracelular o ruta de poros la cual existe entre las células y el tejido. Si este es el caso, por lo tanto el grado de inhibición de la transferencia causada por la hinchazón de las células es dependiente de la vía de absorción. ⁽¹⁴⁾

El método del saco de intestino invertido de rata ha sido usado para entender los mecanismos de absorción. La introducción de la hipótesis de la teoría del pH-partición estimuló el interés en el mecanismo de absorción de los fármacos. Varios estudios consideran la pregunta de un transporte activo o pasivo. Las interrelaciones acerca de la velocidad de absorción de los fármacos, la constante de disociación (pK_a), y el pH del sitio de absorción es conocido como la hipótesis del pH-partición. Esta hipótesis establece que el paso de los fármacos a través de la barrera gastrointestinal (GI) esta restringida a la forma sin disociar del fármaco, por lo tanto, la velocidad de absorción depende de la proporción de fármaco presente en esta forma. En otras palabras, la velocidad de absorción depende no sólo de la solubilidad a los lípidos del fármaco sino también de su grado de ionización, que es una función del pK_a y del pH de la superficie de absorción. La validez de la hipótesis del pH-partición fue probada usando el método del saco de intestino invertido de rata. El no cumplimiento con la teoría del pH-partición fue descrita en términos de la teoría general del efecto del pH.⁽¹⁷⁾

La investigación encontrada analizó la utilidad y limitaciones del método del saco de intestino invertido de rata como un método para probar la absorción de análogos de fármacos nuevos.⁽¹⁷⁾

Se consideran varios factores que afectan tales como el metabolismo antes y durante la absorción, acumulación en las membranas del intestino, y la influencia del pH en la solución de perfusión en la permeación del fármaco, el metabolismo y la acumulación.⁽¹⁷⁾

Este modelo es una herramienta cualitativa para probar la absorción a través de las membranas GI durante las fases tempranas del programa de desarrollo de un fármaco.⁽¹⁷⁾

Con fármacos relativamente insolubles, la velocidad de disolución generalmente es un paso determinante en la velocidad de todos los procesos de absorción que siguen a una administración oral. Considerando fármacos relativamente solubles, la permeabilidad puede ser un paso determinante. La velocidad de absorción también depende de un número de factores fisicoquímicos tales como la solubilidad, la velocidad de disolución, el tamaño de partícula, estabilidad en medio acuoso, pK_a , coeficiente de partición, y permeabilidad del fármaco. La evaluación de estos parámetros pueden proveer información vital en la parte final del desarrollo de un compuesto para su aplicación clínica.⁽¹²⁾

Se ha puesto énfasis en la evaluación de las propiedades de disolución pero muy poco trabajo se ha realizado en la evaluación de las características de permeabilidad.⁽¹²⁾

Obviamente este tipo de procedimiento debe estar disponible en los estados iniciales del desarrollo de un fármaco y usado en conjunto con una prueba de disolución para escoger la forma del compuesto que muestre el mayor potencial de absorción. Por consiguiente, se debe de determinar cual parámetro asociado con el proceso de absorción es el paso limitante de la velocidad. Así también, de una indicación de como un problema de absorción puede sobrevenir. Una prueba de absorción o de permeación puede reducir el tiempo de desarrollo de un nuevo fármaco si es realizado antes del desarrollo de los estados de formulación y clínicos.⁽¹¹⁾

3.4.2. Estudios In Vitro. (4)

En el análisis de la absorción potencial de los fármacos, además de la determinación de parámetros físicos, los experimentos in vitro usando membranas biológicas están ganando mayor aceptación dentro de los científicos preformuladores. Estas técnicas miden la velocidad de permeación de los fármacos en solución a través del intestino de ratón o de rata y proveen una información perteneciente a las características de absorción de los fármacos.

La técnica del saco de intestino invertido puede proveer información útil concerniente con las características de permeación de un fármaco. Basado en los datos del estudio in vitro e in vivo obtenidos con compuestos que exhiben ya sea buena o mala permeación del compuesto.

Además de su utilidad en la prueba de permeación, la técnica del saco invertido puede ser de valor en el estudio de la velocidad de desaparición del fármaco del lumen intestinal, la acumulación del fármaco en la pared intestinal, absorción de un fármaco a partir de diferentes regiones del tracto gastrointestinal, efecto de otras sustancias adicionadas y la posible biotransformación del fármaco por el intestino.

3.4.2.1. Técnica del saco invertido.

El método de saco invertido involucra el aislamiento de un segmento de intestino de rata o de hamster, invertir el intestino y llenar el saco con solución amortiguadora libre de fármaco. Ambos extremos del segmento se amarran y los sacos se sumergen en un matraz Erlenmeyer que contienen un volumen de solución amortiguadora que contiene el fármaco, después son oxigenados y agitados a 37°C por un periodo específico de tiempo y los fluidos son analizados para conocer su contenido de fármaco.⁽¹¹⁾

La principal desventaja de este método es la dificultad de obtener más de una muestra por segmento intestinal.⁽¹¹⁾

Una modificación principal de la técnica original del saco invertido introducida por Crane y Wilson y posteriormente modificada por Kaplan y Cotler, para permitir el análisis de diferentes soluciones con un sólo segmento intestinal⁽²²⁾ fue la unión del intestino a una cánula a partir de la cual se obtienen muestras frecuentes. La técnica utiliza un segmento aislado de intestino de un animal de laboratorio tal como la rata o el ratón. El animal no se alimenta la noche anterior al estudio pero se le deja acceso para tomar agua, se anestesia usando éter o cloroformo, y se remueve el intestino delgado mediante una incisión en la línea media del abdomen. Después de descartar aproximadamente una porción de 10 a 15 cm a partir del final del píloro, todo el intestino es invertido, usando una varilla de vidrio o de acero con punta redonda. El intestino se lava con solución salina fría. Un segmento preparado de esta forma se liga en la porción final distal y se une la porción final proximal a la porción final del tubo de vidrio. Un contrapeso se une en la ligadura final distal del intestino para mantener el saco en posición vertical. El segmento se suspende dentro de 80 ml de solución de fármaco disuelto en un solución amortiguadora fisiológica aceptable, tal como la solución amortiguadora de Krebs-bicarbonato.⁽⁶⁾

La solución que contiene el fármaco se preequilibra a 37°C y se mantiene a esa temperatura durante el experimento. La solución que contiene el fármaco se refiere como la solución serosal, y es introducida al saco por un tubo de vidrio. Una mezcla de 95:5 de O₂/CO₂ se burbujea continuamente a través de la solución mucosal a una velocidad constante. La solución serosal se muestra a intervalos predeterminados y se reemplaza con solución amortiguadora fresca libre de fármaco. La concentración de fármaco en las muestras de fluido serosal se determina usando un ensayo adecuado.⁽⁶⁾

Una cantidad transferida por unidad de tiempo por unidad de concentración constante en un amplio intervalo de concentraciones de solución mucosal, es indicativo de una transferencia pasiva del fármaco. La transferencia pasiva se refiere a una difusión libre a través de la barrera la cual esta compuesta de canales de varios tamaños, en donde no se encuentra involucrado procesos activos biológicos y/o electroquímicos. A medida que el gradiente de concentración se incrementa a través de la barrera, el flujo a través de la barrera también incrementa en proporción directa. (1a ley de Fick).⁽⁶⁾

Aplicaciones de este tipo de técnica:

Usualmente estos experimentos se llevan a cabo a diferentes concentraciones mucosales de fármaco.

La técnica de intestino invertido de rata también es útil en la investigación del sitio de absorción del intestino y en la determinación de los mecanismos de transporte.⁽⁶⁾

Precauciones en la técnica:

No obstante la utilidad de la técnica del intestino invertido de rata, se debe tener cuidado en la interpretación de los datos derivados de ésta.⁽⁶⁾

La inversión del intestino permite que las células epiteliales de la superficie mucosal sean expuestas directamente al fluido mucosal oxigenado. Esta precaución de acuerdo con Wiseman es necesaria por el alto requerimiento de oxígeno de las células epiteliales. De aquí que se sugiere la inversión con el propósito de prolongar la viabilidad y la integridad de la preparación después de removerla del animal. Tidball y colaboradores encontraron que el uso de oxígeno en los segmentos orientados normalmente del intestino de rata no diferían significativamente de los segmentos invertidos. ⁽¹¹⁾

Ventajas de la técnica:

El volumen serosal pequeño resulta en grandes cambios en la concentración aún cuando una pequeña cantidad de fármaco es transportado de la solución mucosal a la serosal lo cual permite un análisis más fácil de los procesos de absorción debido a la pequeña porción analizada. ⁽¹¹⁾

Ventajas de la técnica del saco invertido modificada por Crane y Wilson : 1) la técnica es relativamente simple y reproducible y es particularmente adecuada para el trabajo de exploración y de evaluación. 2) distingue fácilmente entre un proceso de absorción pasiva y activa. 3) puede ser empleada para determinar la región donde la absorción es óptima en el intestino, particularmente en el caso del transporte activo. ⁽¹¹⁾

Desventajas de la técnica:

La técnica también presenta problemas cuando se trabaja con compuestos polares, los cuales aparentemente causan que el intestino vaya incrementando su permeabilidad con el tiempo. La técnica se debe usar juiciosamente. ⁽⁶⁾

La principal es que la preparación intestinal es removida del animal al igual que de su suministro sanguíneo normal. ⁽¹¹⁾

Las críticas al procedimiento dicen que bajo esas condiciones las características de permeabilidad de la membrana han sido alteradas significativamente. Además en la preparación del intestino invertido de rata, el fármaco debe atravesar la total adherencia de la pared intestinal, mientras que en el animal intacto esto no es cierto, a partir de que los vasos que suministran la sangre a todo el intestino están esparcidas entre las células epiteliales y la musculatura. ⁽¹¹⁾

Como resultado, la velocidad de transporte del fármaco, como una determinación de la técnica del saco invertido debe ser más lenta que en el animal intacto. Un segundo nivel mayor crítico de la técnica del saco invertido, es concierne a los efectos de la permeabilidad en la inversión. Feldman y colaboradores (1970) reportaron que el intestino invertido de rata es anormalmente permeable. Por consiguiente parece ser que la inversión tenía una influencia significativa en la permeación del intestino a los solutos transportados pasivamente. Esta anomalía debe ser considerada en la interpretación de los datos obtenidos con la técnica del saco invertido. ⁽²⁹⁾

Si la velocidad del transporte del fármaco a través de los segmentos intestinales obtenidos de diferentes animales de la misma especie muestra alguna variación, es importante que las gráficas acumulativas, se construyan por cada preparación de saco intestinal y que la velocidad de transporte sea determinada individualmente antes de que sea aplicado cualquier procedimiento para promediar a las diferentes corridas experimentales. ⁽¹¹⁾

Se han realizado estudios de las características de permeación de fármacos a través de las preparaciones del saco invertido en donde los parámetros de permeabilidad *in vitro* que se determinaron para cada fármaco fueron: a) el tiempo lag en minutos, b) su depuración, la cantidad acumulada de fármaco transferido en 60 min/unidad de concentración del fármaco en la solución mucosal reducida a sus unidades de mililitros por minuto. En la magnitud del parámetro de depuración se encontró una relación directa con el grado de no disociación del compuesto en el pH 7.4 del sistema de solución amortiguadora *in vitro*. Algunos compuestos mostraron tiempos "lag" grande y una depuración pequeña o no medible. ⁽¹²⁾

Al realizar la comparación con perros al administrarles el fármaco por vía oral y por vía intravenosa se mostró que los resultados *in vivo* muestran que estos compuestos que *in vitro* exhibieron unas características de permeabilidad consistentes con buena absorción, fueron de hecho poco absorbidas. ⁽¹³⁾

Así un compuesto que exhibía características de solubilidad consistentes con una buena absorción y por lo tanto su administración no era limitada por la solubilidad, después de administración intravenosa y oral los datos de nivel sanguíneo indicaron que la administración oral del fármaco fue de absorción errática, lenta e incompleta. ⁽¹⁴⁾

Así uno de los compuestos que se estudio exhibió características de permeación y solubilidad consistentes con una buena absorción y resultaron en niveles sanguíneos buenos seguidos de la administración oral e intravenosa. Y un compuesto el cual exhibía características de disolución pobres pero características de permeabilidad satisfactorias, seguidas de administraciones intravenosas. La administración de sólidos orales, líquidos orales simples a perros, los niveles sanguíneos indicaron una absorción completa cuando el fármaco se administro por vía oral en solución y una absorción incompleta cuando se administró como sólido oral. ⁽¹⁵⁾

Con lo anterior parece obvio que la inclusión de la técnica del saco de intestino invertido como parte de un programa de evaluación *in vitro* de la biodisponibilidad de un fármaco puede proveer una información muy útil. La evaluación de los datos *in vivo* solamente nos permite concluir sobre la razón de la absorción limitada de un fármaco. ⁽¹⁶⁾

3.4.2.2. Simulador de absorción Sartorius.

El simulador de absorción consiste en una bomba peristáltica con agitador magnético, un termostato, dos contenedores para el jugo artificial gástrico o intestinal, un cambiador de difusión con una barrera lipídica artificial. La barrera lipídica consiste de una membrana inerte, los poros de la cual se llenan con una fase líquida, y pueden utilizarse dos barreras diferentes, una barrera artificial de pared de estómago y una barrera artificial de pared intestinal. El gradiente de pH entre las fases acuosas puede ser mantenido constante en un periodo grande de tiempo. Se encontró una relación muy parecida entre las características de absorción medidas con el simulador de absorción y estudios análogos "in vivo" en humanos. Toveraud investigó la permeabilidad del fenobarbital con o sin la adición de PEG 6000 usando el simulador de absorción. Los resultados mostraron que la velocidad de permeación no cambio con la adición de PEG 6000, de acuerdo con lo encontrado con Singh y colaboradores y Solvang y Finholt. ^(7,14)

3.4.3. Otros sistemas intestinales "In vitro". ⁽⁷⁾

Técnica de circulación. ⁽⁷⁾

Técnica del anillo invertido o de rebanada. ^(7,22)

Técnica del saco invertido con sistema de flujo. ⁽⁷⁾

3.4.4. Estudios In Situ. (sistemas). ⁽²²⁾

En muchos casos, las predicciones y/o conclusiones basadas en los estudios de absorción de fármacos requieren de más información. Los sistemas in situ, los cuales simulan mejor los procesos fisiológicos, pueden proveer condiciones experimentales más realistas.

Segmentos gastrointestinales ligados. ⁽²²⁾

Técnica de perfusión. ⁽⁷⁾

Técnica del intestino de rata. ⁽⁷⁾

Técnica del asa intestinal de intestino de rata. ⁽⁷⁾

Técnica del estómago de rata. ⁽⁷⁾

3.4.5. Estudios In Vivo. ^(6,7)

En algunos casos las pruebas in vivo de las formulaciones de tabletas involucran estudios en animales antes de los estudios en humanos, en otros casos las formulaciones de tabletas son estudiadas directamente en humanos. Los estudios en animales son a menudo llevados a cabo en nuevas formas de dosificación antes de llevar a cabo estudios más costosos en humanos, por una o más de las siguientes razones: para establecer al menos la factibilidad preliminar de la forma, de acuerdo con la función que se propone o el modo de operación, verificación o establecimiento preliminar de la seguridad, estudios de toxicidad (particularmente irritación), o estudios farmacocinéticos en un modelo animal.

Cuando estudios en humanos son realizados, especialmente para un nuevo fármaco del cual no existe un producto estándar o para un fármaco con problemas obvios de biodisponibilidad, es deseable o esencial conducir tales estudios con más de una formulación. Esto es particularmente verdadero si la meta del diseño del producto es una optimización y el objetivo primario es maximizar la biodisponibilidad o lograr un nivel sanguíneo dado o un perfil de respuesta contra el tiempo.

Los métodos in vivo han sido empleados con éxito en la caracterización de las características de absorción de los fármacos. Los métodos directos emplean datos urinarios o sanguíneos para calcular las velocidades de absorción. Los métodos indirectos utilizan datos de la respuesta farmacológica con el propósito de examinar factores fisiológicos y físico químicos que influyen en la absorción de los fármacos.

Estimación de la absorción del fármaco por comparación con los valores de DL_{50} . ⁽²²⁾

Procedimiento del asa Thiry-Vella. ⁽²²⁾

3.5. INFLUENCIA DE LOS COADYUVANTES FARMACÉUTICOS EN LA PERMEABILIDAD DE LOS FÁRMACOS.

En años recientes ha crecido el interés en el área de la investigación farmacéutica la cual involucra factores que influyen en la absorción de los fármacos. Ciertas teorías o conceptos concernientes con la absorción también han avanzado. ⁽¹⁾

Los coadyuvantes pueden influenciar la efectividad terapéutica del medicamento en la tableta modificando sus características de absorción, y pueden causar cambios en el color de la tableta y afectar otras propiedades físicas tales como la friabilidad. ⁽⁷⁾

En la preparación de tabletas y grageas se usa un número de ingredientes inertes como excipientes. Estos excipientes se usan como agentes aglutinantes, desintegrantes, lubricantes, diluentes, o materiales para recubrir, y estos son necesarios para la preparación de un producto con fármaco de buena calidad. ⁽⁷⁾

A partir de que los excipientes constituyen una porción considerable de la tableta (en algunos casos tanto como un 30% o más), la posibilidad de que exista interacciones entre el fármaco y el excipiente las cuales pueden influenciar la disponibilidad del fármaco, la velocidad de disolución y en la absorción del fármaco, pero una interacción física o química entre el fármaco y el coadyuvante puede resultar en una modificación del estado físico, del tamaño de partícula y/o del área superficial del fármaco disponible para el sitio de absorción. Además, la formación de un complejo superficial o cambios en la estabilidad química del constituyente activo pueden originar manifestaciones tóxicas. ⁽⁷⁾

La búsqueda de la formulación óptima de un principio activo precisa de un estudio de absorción "in vivo" largo y costoso. Con la finalidad de simplificar dicha búsqueda mediante una solución previa de las formulaciones propuestas, se han diseñado modelos que permiten estudiar simultáneamente la disolución del principio activo y su paso a través de la membrana. ⁽⁷⁾

En la determinación de la absorción de fármacos se puede utilizar el modelo de intestino invertido de rata siendo una aplicación interesante de esta técnica es el estudio de las variables en la forma de dosificación y el efecto de los excipientes y aditivos en la permeación del fármaco. ⁽²²⁾

La técnica del saco de intestino invertido puede ser usada para identificar problemas de permeabilidad de los fármacos asociados con variables de formulación. En un estudio realizado con cloranfenicol, se observaron diferencias in vitro en la permeabilidad del cloranfenicol a través del saco de intestino invertido causado por los excipientes en las cápsulas y fueron consistentes con los datos de niveles sanguíneos obtenidos de voluntarios humanos. ⁽²²⁾

Esta técnica también se ha usado exitosamente para demostrar los efectos de los surfactantes no fisiológicos en la permeabilidad de los corticosteroides con poca solubilidad, los efectos de los agentes fisiológicos de actividad superficial en la permeabilidad del salicilato, y los efectos de la formación de complejos en la permeabilidad de la salicilamida. ⁽²²⁾

En otro estudio se determinó la influencia de 8 coadyuvantes seleccionados y un grupo de fármacos seleccionados con respecto a i) la ocurrencia de interacciones entre los coadyuvantes y los fármacos, ii) el efecto de las interacción en las velocidades de disolución de los fármacos, y iii) el efecto de la interacciones en la velocidad de absorción de los fármacos. ⁽¹⁶⁾

Los coadyuvantes se seleccionaron por su uso frecuente en la manufactura de tabletas, y por que como grupo estas proveen un amplio intervalo de propiedades físicas útiles para este estudio, incluyendo solubilidad, coeficiente de partición y pka. En este reporte describen los métodos, procedimientos y el estudio del efecto del coadyuvante: PEG 4000, en la absorción y disolución de 4 barbitúricos: barbital, fenobarbital, pentobarbital y ácido barbitúrico, en donde se encontró que la absorción del fenobarbital en la presencia del PEG se disminuye marcadamente y que esa disminución es probablemente función de la formación del complejo PEG-FENOBARBITAL(PB), el cual disminuye la eficacia terapéutica del fenobarbital en ambos niveles de velocidad de disponibilidad (disolución) y al nivel de máxima disponibilidad alcanzable (solubilidad), lo cual no sucede con el pentobarbital, barbital y el ácido barbitúrico que no interactuaron con el PEG 4000. Así este trabajo soporta lejanamente la validez de la hipótesis que los coadyuvantes en las tabletas quizás no son tan inertes en su efecto como se ha asumido tradicionalmente. ⁽¹¹⁾

Además se demostró que en el caso del fenobarbital, y la disolución y las velocidades de absorción no se vieron afectadas. ⁽¹²⁾

El fenobarbital fue absorbido a través del intestino aún cuando se formaba el complejo PEG-PB, y la velocidad de absorción fue independiente del grado de disociación del complejo en el fluido mucosal, al parecer la membrana tiene un efecto disociante sobre el complejo, permitiendo que el fenobarbital sea absorbido, pero previniendo la absorción del PEG, esto es, que el PEG 4000 no atraviesa la membrana biológica. ⁽¹³⁾

3.6. ESTUDIOS REALIZADOS PARA DETERMINAR LA INTEGRIDAD FUNCIONAL Y ESTRUCTURAL DEL INTESTINO INVERTIDO DE RATA.

La técnica de intestino invertido para estudiar la absorción intestinal se comenzó en 1954 y desde ese tiempo se le ha encontrado una amplia aplicación, particularmente en la elucidación de los mecanismos de transporte de varios nutrientes y substratos fisiológicos. Recientemente esta técnica se ha empleado para estudiar la influencia de varios factores en la absorción de los fármacos. A pesar del continuo y extenso interés en esta preparación de aislamiento, existe poca información comparativa en relación con su integridad estructural y funcional. ⁽¹⁴⁾

Existe fuerte evidencia de que la preparación intestinal es "viable" con respecto a ciertos procesos metabólicos y mecanismos de transporte activo por varias horas después de removerlo de un suministro sanguíneo intacto. ⁽¹⁵⁾

Bramford encontró que la velocidad de consumo de oxígeno de segmentos aislados de yeyuno y de ileon de ratas de 18 días de edad fue esencialmente invariable después de 3 hr. Jordan y Ponz encontraron resultados similares usando segmentos intestinales utilizando ratas adultas. Estos investigadores observaron una actividad substancial respiratoria por más de 7 hrs. después de la excisión del intestino. ⁽¹⁴⁾

A pesar de la controversia acerca de la "viabilidad" de la preparación de intestino invertido, la utilidad de esta técnica en los estudios de absorción de fármacos (en donde los mecanismos pasivos parecen predominar) probablemente se considera más dependiente de su integridad estructural que de su integridad metabólica. ⁽¹⁵⁾

Ningún estudio sistemático o evidencia de la integridad estructural de la preparación del saco invertido de rata bajo estas condiciones de uso ha sido reportado. En 1970, Levine y colaboradores observaron que los sacos intestinales de rata son morfológicamente intactos después de la inversión, en donde se indica que la manipulación mecánica no produce cambios morfológicos en el tejido. Las células epiteliales y la vellosidad intestinal en los especímenes al tiempo cero, mostraban una arquitectura normal sin importar de donde se tomaba el tejido. ^(16,17)

Cambios en el tejido epitelial de animales sacrificados por decapitación fueron aparentes en los 15 min de su incubación a 37°C en solución amortiguadora oxigenada. Al tiempo "0" el espécimen tenía una consistencia normal, a los 5 min de incubación el espécimen era de consistencia suave y pálida, a los 10 min el tejido aparecía todavía suave y las líneas epiteliales eran menos evidentes, a los 15 min el espécimen estaba muy pálido y lamoso. A los 30 min el 50-75% del epitelio normal había desaparecido, a 1 hr existe una total ruptura del borde epitelial. El daño al tejido fue menor en tejidos de animales sacrificados bajo anestesia. Aún después de 60 min de incubación, se encontró solo el 10-15% de la destrucción y ruptura de las células epiteliales. Y a los 90 min, habían partes del epitelio todavía intactas, pero las porciones interiores estaban extremadamente edematosas, y mostraban mucha vacuolización y destrucción. Es importante notar que cuando se realizan los estudios a una temperatura de 23°C también el daño al tejido es menor o igual que el caso de los animales sacrificados con anestesia. ^(14,17)

En un estudio para probar la integridad funcional del intestino invertido de rata con respecto a la transferencia pasiva se analizaron algunos compuestos, dentro de los cuales algunos tuvieron una depuración igual a una velocidad substancialmente lenta, tal como la pralidoxima, la riboflavina, el anaranjado de metilo, la eosina azul y el azul de bromo tímolo. Su depuración fue incrementando marcadamente y continuamente durante el experimento. ⁽¹⁸⁾

Sin embargo se encontró que la velocidad de transferencia de un número de otros compuestos aumentaba con el tiempo, y fue necesario determinar si esos cambios eran debidos a un tiempo lag en consecuencia de un estado estacionario o pérdida de la integridad, antes de que una conclusión general pudiera ser hecha con respecto a una limitante de velocidad. ⁽¹⁴⁾

El incremento marcado en la depuración de la riboflavina, el anaranjado de metilo, la eosina azul y el azul de bromo timol como una función del tiempo puede ser explicado considerando: a) la acumulación del fármaco en el tejido requiere de tiempo finito antes de llegar al estado estacionario ó, b) pérdida de la integridad funcional de la preparación con respecto al transporte de esos compuestos, ó c) una combinación de estos mecanismos. De estos compuestos, se seleccionaron la riboflavina y el anaranjado de metilo y se llevaron a cabo estudios de incubación en solución amortiguadora para evaluar el mecanismo. ⁽¹⁴⁾

Los datos muestran que la permeabilidad del intestino invertido con respecto a estas sustancias aumentaba en un factor de dos después de sólo 30 min de incubación en una solución amortiguadora libre de fármaco. Posteriores incrementos en la permeabilidad fueron aparentes después de 60 min de incubación. ⁽¹⁴⁾

El incremento en la velocidad de transferencia del naranja de metilo con el tiempo fue debido a la acumulación en el tejido, y la pérdida en la integridad funcional contribuyó significativamente con estos cambios. También se encontró que la incubación en solución amortiguadora de iones K incrementaba la permeabilidad del tejido al naranja de metilo en la misma medida que al incubarlo en solución amortiguadora de iones Na. El efecto inhibitor del K en la transferencia del naranja de metilo a través del intestino invertido fue evidente en ambos tejidos incubado y no incubado. ⁽¹⁴⁾

En conclusión los cambios en la integridad funcional del intestino invertido aparecen con respecto a la transferencia mucosal-serosal de la riboflavina y del naranja de metilo en paralelo con los cambios en la integridad estructural del epitelio mucosal del intestino aislado como reporta Levine y colaboradores. ⁽¹⁴⁾

La aparente falta de efecto en la velocidad de transferencia en la pérdida de la integridad estructural de compuestos no polares, solubles en lípidos sugiere de acuerdo con Benet y col., que el borde epitelial no es la barrera limitante de la velocidad a la transferencia de estos compuestos a través del intestino invertido de rata. ⁽¹⁴⁾

En un estudio realizado con glucosa y metionina en donde se utilizan condiciones anaeróbicas y aeróbicas se estudió como la transferencia de la glucosa y la metionina se realiza en contra de un gradiente de concentración y la transferencia cuantitativa es del mismo orden en magnitud que en otras preparaciones de intestino aislado. ⁽¹⁴⁾

Lo anterior permite analizar, cómo al disminuir la actividad fisiológica del intestino al incluir condiciones de anaerobiosis, la transferencia de estas sustancias se ve disminuida (no ocurre una transferencia activa) y en condiciones aeróbicas la concentración de glucosa en el lado serosal incrementa al doble de la concentración inicial y se encontró que esta transferencia ocurría con un pequeño movimiento de agua, mientras que anaerobicamente el fluido se perdía del tejido. ⁽¹⁴⁾

Una condición esencial para una completa actividad del tejido es una oxigenación adecuada, pero la alta glicolisis aeróbica del intestino de rata hace surgir la pregunta si la oxigenación es de hecho satisfactoria. ⁽¹⁴⁾

En otros estudios se ha encontrado que en el intestino se tienen gradientes osmóticos, hidrostáticos y eléctricos los cuales pueden inducir movimiento de agua en estudios in vitro. Esto sugiere una variabilidad en el transporte de agua que contribuye a una variabilidad en la absorción intestinal de los fármacos administrados, particularmente cuando son administrados con nutrientes. El impacto del transporte de agua en el intestino en la absorción de varios fármacos in vivo, es significativo sólo en el caso de ser una función de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y de los nutrientes que influyan en los parámetros fisiológicos gastrointestinales. ⁽¹⁵⁾

Se debe tener cuidado cuando al analizar un fármaco o varios fármacos uno de ellos puede ejercer un efecto para inducir el paso de agua ya que si esta además combinado con una solución fisiológica que contenga glucosa, el efecto del paso de agua no sólo va ser atribuido a la glucosa sino que un fármaco presente en el estudio de otro fármaco de interés puede estar afectando o puede ser que el mismo fármaco que se está analizando induzca el paso de agua a través de las membranas. ⁽¹⁶⁾

3.7. METABOLISMO NO MICROBIANO DE LOS FÁRMACOS EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL.

Si un fármaco es metabolizado en los fluidos o mucosa gastrointestinal, toda la biodisponibilidad del fármaco se ve reducida. El saco de intestino invertido de rata ha sido usado con éxito como un modelo in vitro para indicar la potencialidad del metabolismo gastrointestinal de "primer paso" de un fármaco antes de llegar a la circulación sistémica. Aunque algunas conversiones metabólicas gastrointestinales son atribuidas a la acción bacteriana, las células de la mucosa gastrointestinal poseen en si muchos sistemas enzimáticos. ⁽¹⁷⁾

Levi y Angelino han demostrado que la hidrólisis de la aspirina se realiza por un proceso enzimático usando sacos de intestino invertido de ratas y sugieren que la hidrólisis ocurre en la pared intestinal. Evidencia posterior sugiere que la hidrólisis de la aspirina ocurre en la pared gastrointestinal de acuerdo con lo reportado por Rowland y col.⁽²²⁾

3.8. ELECCIÓN DE UN MODELO ANIMAL.

Idealmente, uno espera elegir una especie animal que mejor simule al hombre en la absorción y disposición de un fármaco. Sin embargo en los estados preclínicos del desarrollo del fármaco, uno no puede administrar el fármaco al hombre. La elección del animal va a depender de la experiencia previa con compuestos relacionados, y la naturaleza del diseño del estudio.⁽²²⁾

El perro parece ser adecuado para los estudios biofarmacéuticos tomando en cuenta de que es capaz de ingerir varios tipos de formas de dosificación. Pueden ser dosificados repetidamente, además de que hay similitudes fisiológicas del tracto gastrointestinal en el perro y el hombre en que ambos no secretan continuamente ácido clorhídrico en el lumen gástrico o bilis en el intestino delgado. El mono puede ser adecuado para estudios biofarmacéuticos, pero es difícil de manipular. El puerco puede ser una excelente elección para un modelo animal por su dieta, morfología gastrointestinal y fisiológica, y su fisiología cardiovascular y renal simula muy estrechamente al hombre. El puerco miniatura es un modelo de animal porque es adecuado para un muestreo repetido de sangre y su estructura anatómica y su función fisiológica de la mayoría de sus sistemas biológicos se parecen a los del hombre.⁽²²⁾

Los animales pequeños, tales como el ratón, la rata, y el hamster, son elecciones muy pobres para estudios de biodisponibilidad in vivo, tomando en cuenta que no pueden ingerir la mayoría de las formas farmacéuticas intactas, y que no se pueden obtener varios especímenes biológicos de un mismo animal. En algunos casos donde se designa un protocolo para evaluar la excreción urinaria solamente, estos animales pueden usarse en estudios preliminares. El conejo es una elección pobre para estudios de absorción debido al tiempo de vaciado tan grande de su estómago, y la dificultad para obtener un estómago limpio por métodos convencionales de alimentación.⁽²²⁾

En muchos casos, las diferencias observadas entre los animales y el hombre son una función de las velocidades a las cuales ocurren los eventos fisiológicos y no en sí las vías metabólicas. La inclusión de tales sistemas minimiza mucho el error de los experimentos usualmente encontrados en las fases preclínicas y en el inicio de la fase clínica del desarrollo de un fármaco.⁽²²⁾

4. PARTE EXPERIMENTAL.

Debido a que se cuenta con poca información relacionada sobre el efecto de los excipientes en la permeación de los fármacos se decidió como paso inicial validar los métodos para la cuantificación de las sustancias de interés y posteriormente realizar las pruebas de permeación para determinar el perfil de permeación y el efecto de los excipientes en la permeación del fármaco en cuestión.

La parte experimental se dividió en cuatro etapas siendo estas:

Primera etapa: Control de Calidad de excipientes.

Segunda etapa: Estudio de permeación de la glucosa para determinar la integridad funcional del intestino invertido de rata.

Tercera etapa: Estudio de permeación del naranja de metilo para determinar la integridad estructural del intestino invertido de rata.

Cuarta etapa: Estudio del efecto de Polietilenglicoles sobre la absorción del ácido acetil salicílico en intestino invertido de rata (*In vitro*)

4.1.MATERIAL Y EQUIPO.

- Espectrofotómetro Beckman DU-68.
- Balanza analítica. Sartorius analytic.
- Agitador Vortex. Thermolyne Sybrone.
- Centrifuga Damon/IEC Division. IEC HN - SII Centrifuge.
- Parrilla de calentamiento Thermolyne. (muova II stir plate).
- Potenciometro Conductronic pH 10. (digital pHmeter).
- Agitador magnético Pyro - magnestir No. 1266. Lab Line Instruments, Inc.
- Equipos oxigenadores. Elite 801. Air pump. (tensile flex).
- Balanza granataria OHAUS. Harvard Trip Balance.
- Estufa Felisa. Mod. 293 A. Serie 179.
- Estufa. Lab. Line. Instruments Inc. Cat. No. 3620. Serie 0175.
- Equipo para determinar punto de fusión. BÜCHI 530 Meltig Point.
- Equipo para tamizar.

4.2. MATERIAS PRIMAS.

4.2.1. Estándares:

-Estándar secundario de Acido acetil salicílico (AAS), pureza 100.13%, proporcionado por los Laboratorios Schering Ploug.S.A. de C.V. México.

-Estándar secundario de Acido salicílico (AS), proporcionado por el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química.

4.2.2. Excipientes:

-Polietilenglicol 1500 (PEG 1500), Polietilenglicol 4000 (PEG 4000) y Polietilenglicol 6000 (PEG 6000); proporcionados por el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química.

4.2.3. Reactivos.

- Cloruro de sodio cristales. RA.
- Cloruro de potasio. RA.
- Cloruro de calcio anhidro. RA.
- Fosfato monobásico de potasio. RA.
- Sulfato de magnesio heptahidratado. RA.
- Bicarbonato de sodio. RA.
- Glucosa. RA.
- Hidróxido de sodio. RA.
- Nitrato ferrico cristales. RA.
- Cloruro mercurico. RA.
- o-toluidina. RA.
- Tiourea. R.A.
- Naranja de metilo. RA.

- Eter etílico. RA.
- Etanol. RA.
- Acido clorhídrico. RA.
- Ácido acético glacial. RA.

4.2.4. Animales de laboratorio.

- 100 Ratas Wistar Macho de 300 - 350 gramos.

4.3. PREPARACION DE SOLUCIONES.

4.3.1. Solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

Preparar las siguientes soluciones y mezclarlas en las proporciones que se indican y en el mismo orden manteniendo agitación constante:

Tabla No. V. Soluciones para la Solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

Sales.	Concentración (%)	Concentración (M).	Proporciones (ml).
NaCl	0.90	0.154	100
KCl	1.15	0.154	4
CaCl ₂	1.22	0.110	3
KH ₂ PO ₄	2.11	0.154	1
MgSO ₄ 7 H ₂ O	3.82	0.154	1
NaHCO ₃	1.30	0.154	21

-Gasificar la solución por 10 min con CO₂ (hielo seco), sin agitación.

-Adicionar 2g de glucosa por litro de solución.

-Ajustar el pH a 7.4 con NaOH 0.5N.

4.3.2. Solución de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4 (1 mg/ml).

Pesar 100 mg de glucosa, disolver y llevar a 100 ml con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

4.3.3. Solución de naranja de metilo en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4 (1 mg/ml).

Pesar 100 mg de naranja de metilo, disolver y llevar a 100 ml con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

4.3.4. Solución de ácido acetil salicílico en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4 (1 mg/ml).

Pesar 100 mg de AAS y llevarla 100 ml con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

4.3.5. Soluciones de ácido acetil salicílico y Polietilenglicol 1500 en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

Solución de PEG 1500. (1 mg/ml).

Pesar 25 mg de PEG 1500 y llevar a 25 ml con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

Solución de AAS (1 mg/ml) y PEG 1500 (0.5% v/v).

Pesar 100 mg de AAS y disolver con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4, adicionar 0.5 ml de la solución de PEG 1500. (1 mg/ml) y llevar a 100ml con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

Solución de AAS (1 mg/ml) y PEG 1500 (1.0% v/v).

Pesar 100 mg de AAS y disolver con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4, adicionar 1.0 ml de la solución de PEG 1500. (1 mg/ml) y llevar a 100ml con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

Solución de AAS (1 mg/ml) y PEG 1500 (2.0% v/v).

Pesar 100 mg de AAS y disolver con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4, adicionar 2.0 ml de la solución de PEG 1500. (1 mg/ml) y llevar a 100ml con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

4.3.6. Soluciones de ácido acetil salicílico (1 mg/ml) y Polietilenglicol 4000 al 0.5, 1.0 y 2.0 % v/v en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

Solución de PEG 4000. (1 mg/ml).

Pesar 25 mg de PEG 4000 y llevar a 25 ml con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

Se preparan las soluciones para este tipo de PEG de igual forma que en el caso del PEG 1500 en sus tres concentraciones.

4.3.7. Soluciones de ácido acetil salicílico(1 mg/ml) y Polietilenglicol 6000 al 0.5, 1.0 y 2.0 % v/v en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

Solución de PEG 6000. (1 mg/ml).

Pesar 25 mg de PEG 6000 y llevar a 25 ml con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

Se preparan las soluciones para este tipo de PEG de igual forma que en el caso del PEG 1500 en sus tres concentraciones.

4.3.8 Soluciones estándar.

4.3.8.1 Solución estándar de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4. (1 mg/ml).

Pesar 25 mg de glucosa previamente desecada a 80-90°C durante dos horas cuando menos, disolver y llevar a 25ml con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

4.3.8.2. Solución estándar de naranja de metilo en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4. (250 µg/ml).

Pesar 25 mg de naranja de metilo, disolver y llevar a 100ml con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

4.3.8.3. Solución estándar de naranja de metilo en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.(50 µg/ml).

De la solución de naranja de metilo 250 µg/ml tomar una alícuota de 5 ml y llevarla a 25 ml con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

4.3.8.4 Solución estándar de ácido salicílico en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4. (1 mg/ml).

Pesar 25 mg de AS, disolver y llevar a 25ml con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

4.3.9. Reactivos para desarrollar color.

4.3.9.1.Reactivo de o-toluidina. ⁽¹⁹⁾

En un matraz aforado de 100 ml colocar aproximadamente 90 ml. de ácido acético glacial, adicionar 0.15g. de tiourea y agitar hasta disolver. Adicionar 6 ml. de o-toluidina, ajustar el volumen con ácido acético glacial.

4.3.9.2. Reactivo de Trinder.⁽¹⁷⁾

-Transferir 4g de Cloruro mercurico a un matraz volumétrico de 100 ml y adicionar 12 ml de HCl 0.1N, disolver y adicionar 4g de Nitrato férrico, agitar hasta disolución, llevar a volumen con agua destilada y mezclar.

Las soluciones se prepararon cada día de análisis con el fin de evitar problemas de degradación.

4.4. CONTROL DE CALIDAD DE EXCIPIENTES (PEG 1500, PEG 4000 Y PEG 6000) Y DEL ESTANDAR DE ACIDO ACETIL SALICILICO.

4.4.1. Apariencia. ⁽¹²⁾

Colocar en un papel blanco limpio, una pequeña cantidad de la materia prima a analizar y observar sus características como color, tamaño, forma, estado físico, etc.

4.4.2. Fluidez. ⁽¹²⁾

Pesar aproximadamente 5 g. de la materia prima a analizar y colocarla en un embudo que tiene un tallo de 6 cm de largo y un diámetro de 1cm. Tomar el tiempo a partir de que la materia prima sale por el tallo del embudo y medir el tiempo que tarda en salir todo el material.

4.4.3. Densidad aparente y real. ⁽¹²⁾

En una probeta de 25 ml colocar de 8 a 9 g. de la materia prima a analizar y medir el volumen ocupado. Después, llevar a cabo la caída libre en forma continua de la probeta por 100 veces desde una altura de 1 cm y al finalizar se mide el volumen ocupado.

4.4.4. Tamaño de partícula. ⁽¹²⁾

Pesar aproximadamente 10 g de la materia prima a analizar y colocarla en la malla superior del equipo para tamizar, al cual se la ha colocado en orden superior a inferior los tamices y por último una base, tamizar por 3 minutos, al final de los cuales pesar el contenido de materia prima retenida en cada uno de los tamices y de esta forma calcular la cantidad retenida y el porcentaje retenido. Realizar este procedimiento para cada tipo de polietilenglicol y ácido acetyl salicilico.

4.4.5. Punto de fusión.

Tomar una pequeña cantidad de muestra de la materia prima a analizar e introducirla en un tubo capilar de 6 cm aproximadamente, después colocar el capilar en el aceite que contiene la cámara del equipo para determinar el punto de fusión, el cual se puso a un calentamiento de 20°C por minuto y además el cual fue previamente calentado antes de realizar la determinación, y se observó por el vidrio que tiene la cámara de aceite el momento del inicio de fundición de la materia prima hasta el final de ella, registrando de esta forma su intervalo de fusión.

4.4.6. Análisis térmico diferencial.

Las muestras de las materias primas fueron enviadas al Laboratorio de Físicoquímica de la División de Estudios de Posgrado en la Facultad de Química en donde fueron analizadas en un Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC 7) Perkin Elmer a una tasa de calentamiento de 20°C/min bajo atmósfera de nitrógeno y para lo cual se emplearon muestras de 2 mg

4.5 ESTUDIO DE PERMEACION DE LA GLUCOSA PARA DETERMINAR LA INTEGRIDAD FUNCIONAL DEL INTESTINO INVERTIDO DE RATA.

4.5.1. Metodo analítico.

El método analítico utilizado para la cuantificación de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4, es el reportado por Huitman y Dubowski. Modificado por Hyvärinen y Nikkilä.^(1,2)

En la Tabla No.VI. se presenta la forma de preparar las diluciones del estándar de glucosa (preparada de acuerdo a la sección 4.3.8.1.), para la curva de calibración en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

Tabla No.VI.

Dilución	Glucosa. (1 mg/ml)	Volum de aforo. (ml).	Concentración Glucosa. (μ g/ml).
1	0.5ml	25	20
2	1.0ml	25	40
3	0.5ml	10	50
4	1.0ml	10	100
5	4.0ml	25	160

ANALISIS DE MUESTRAS.

Cuantificación de glucosa.

-De las diluciones anteriores tomar 1 ml de cada una y colocarlas en un tubo de ensayo por separado.

-Adicionar a cada tubo 5 ml de reactivo de o-toluidina. (Preparado de acuerdo al procedimiento de la sección 4.3.9.1).

-Tapar los tubos con tapones de plástico con rosca.

-Agitar en vortex por 10 segundos.

-Colocar en baño maría a ebullición por 10 min. cada una de las muestras contenidas en los tubos.

-Enfriar las muestras contenidas en los tubos en un baño de agua fría.

-Determinar la absorbancia de cada una de las soluciones de la curva estándar a 630 nm, tomando como blanco un solución que contiene 1 ml de solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4). y 5 ml de solución reactivo de o- toluidina contenido en un tubo de ensayo.

4.5.2. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de glucosa en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4).

4.5.2.1. Linealidad.

Para determinar si los resultados de absorbancia presentan un comportamiento lineal con respecto a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado se prepararon en un día tres curvas estándar en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) en diferentes días en un intervalo de 20 a 160 $\mu\text{g/ml}$, se determinó el coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto para cada una de ellas.

4.5.2.2. Repetibilidad.

Para determinar la concentración obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, aparatos, tiempo y laboratorios), se prepararon tres curvas estándar de glucosa en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) en el intervalo de 20 a 160 $\mu\text{g/ml}$, calculando la media, la desviación estándar, y el coeficiente de variación para cada una de las concentraciones estudiadas.

4.5.3. Técnica de intestino invertido de rata ("*in vitro*")

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de 300 - 350 gramos, las cuales fueron mantenidas sin alimento con acceso libre al agua en forma de "*ad libitum*" las 24 horas previas al experimento. La rata se anestesió con éter etílico, y se removió el intestino delgado vía una incisión en la línea media del abdomen del animal, se obtuvieron dos porciones de intestino como sigue: se realizó un corte después del píloro y otro corte en donde cruza la porción mesentérica (3.2 a 3.5 cm aprox) para obtener la porción del duodeno que sirvió como muestra y después se cortaron los siguientes 3.5 cm de intestino que sirvieron como control, las porciones de intestino se colocaron y se lavaron con solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) mantenida a una temperatura de 37°C y con una atmósfera de 95% de oxígeno; los intestinos fueron ligados en la porción final distal y se invirtieron con la ayuda de una varilla de vidrio.

Una vez que se tienen los intestinos invertidos se les sujetó un contrapeso en la porción final distal del intestino para mantener en posición vertical el saco y la porción final proximal se introdujo en el tubo de plástico que sirvió para muestrear (Esquema No. 4.1.), y fueron sujetados. Los segmentos fueron suspendidos en 70 ml de solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) a 37°C para el control y en 70 ml de solución de glucosa en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) (1 mg/ml) a 37°C para la porción del duodeno; temperatura que es mantenida durante el transcurso del experimento, contenidos en un tubo de 20 a 22.5 cm de longitud y 2.5 cm de diámetro.

La solución mucosal es la que se encuentra fuera del saco del intestino. Una alícuota de 1 ml de solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) a 37°C es introducida al saco por medio del dispositivo para muestrear (Esquema No. 4.1.), siendo la solución serosal, la que está dentro del saco. Una atmósfera de 95% de oxígeno es burbujeada a través de la solución mucosal a una velocidad constante por medio de un tubo de plástico que sirve como entrada de aire (Esquema No. 4.1.).

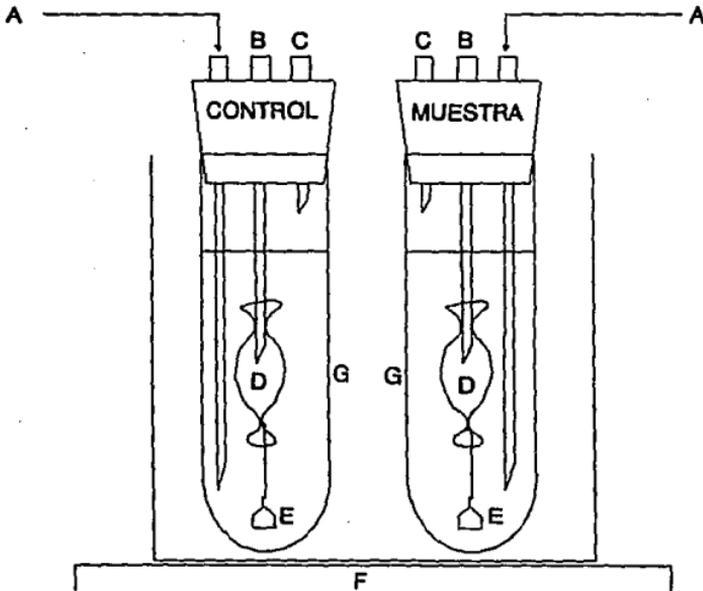
Se tomaron muestras del volumen introducido en el saco, o el contenido que se pudo extraer, a los 10, 20, 30, 40, 60 y 90 minutos, después de cada una de las muestras se volvió a llenar el saco con 1 ml de solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) para continuar con el proceso de muestreo, las muestras se diluyeron a 1 ml (con solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH 7.4) cuando el volumen fue menor a 1 ml); y se les adicionó 5 ml de reactivo de o-toluidina, se taparon los tubos con tapones de plástico con rosca, se agitaron en vortex por 10 segundos, se colocaron en baño maría a ebullición por 10 min. cada una de las muestras contenidas en los tubos, se enfriaron las muestras contenidas en los tubos en un baño de agua fría y por último se determinó la absorbancia de las muestras a 630 nm, utilizando como blanco la muestra control correspondiente a cada tiempo de muestreo.

Se construyó una curva de calibración de glucosa de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 4.5.1., en solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH 7.4), y con reactivo de o-toluidina, y se determinaron las concentraciones de glucosa que se absorbió en $\mu\text{g/ml}$ por interpolación de cada una de las muestras obtenidas a cada tiempo.

NOTA:

Al preparar la solución amortiguadora de Krebs - Ringer (pH=7.4) no se adiciona glucosa, para llevar a cabo este experimento.

Solamente la glucosa se adicionó para la solución que se empleó para el tubo muestra en la prueba de permeación y la empleada en las diluciones estándar de la curva de calibración.



Esquema 4.1. Equipo de permeación.

A. Dispositivo para entrada de oxígeno; B. Dispositivo muestreador; C. Dispositivo para salida de oxígeno; D. Intestino invertido E. Pesa de 10g; F. Parrilla de calentamiento, G. Tubo de vidrio de 20.0 a 22.5 cm de longitud por 2.5 cm de diámetro.

**Diagrama A. Montaje del equipo del modelo de
intestino invertido (*in vitro*)**

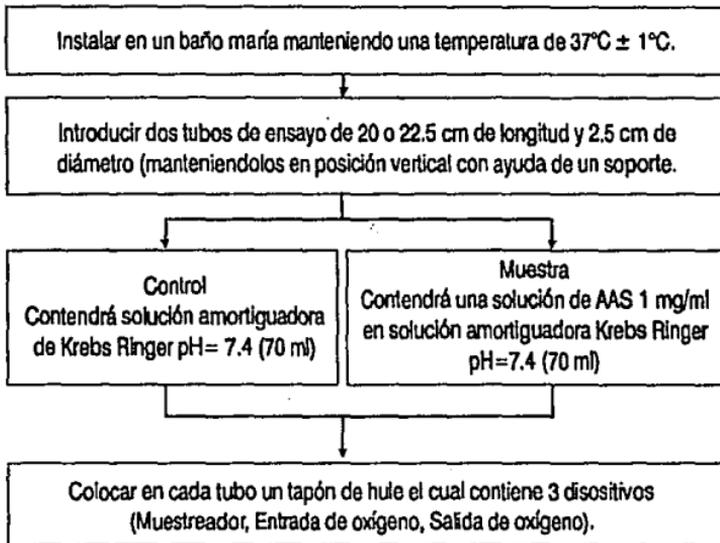
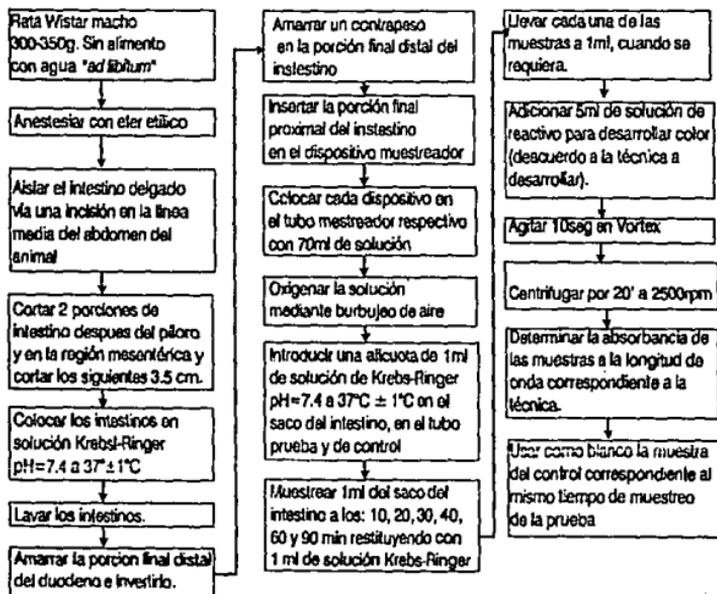


Diagrama B. Procedimiento experimental para la prueba de permeación

Diagrama de Flujo



4.6. ESTUDIO DE PERMEACION DE NARANJA DE METILO PARA DETERMINAR LA INTEGRIDAD ESTRUCTURAL DEL INTESTINO INVERTIDO DE RATA.

4.6.1. Prueba para determinar el máximo de absorción del naranja de metilo.

-Pesar 25 mg de naranja de metilo y llevar a un matraz volumétrico de 50 ml, disolver y aforar con solución amortiguadora de Krebs - Ringer (pH=7.4). Solución con concentración de 500 µg/ml.

Tomar una alícuota de 1 ml con una pipeta volumétrica de la solución de 500 µg/ml. de naranja de metilo, transferirla a un matraz volumétrico de 10 ml y llevarlo al aforo con solución amortiguadora de Krebs - Ringer (pH=7.4). Solución con concentración de 50 µg/ml:

Se ajustó el espectrofotómetro con la solución amortiguadora de Krebs - Ringer (pH=7.4).

Se hizo el barrido desde una longitud de onda de 380nm a 620 nm con la solución de 50 µg/ml de naranja de metilo; esto es, en toda la región del visible ya que no se contaba con algún dato reportado de máximos de absorción de esta sustancia.

4.6.2. Método analítico.

Se utilizó un método espectrofotométrico el cual fue desarrollado para la cuantificación de naranja de metilo en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4., preparando una curva estándar tomando en cuenta la absorción de la solución de naranja de metilo a una concentración de 50 (µg/ml), la cual se presenta a continuación:

En la Tabla No. VII. se presenta la forma de preparar las diluciones estándar de naranja de metilo (preparada de acuerdo a la sección 4.3.8.3.), para la curva de calibración en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

Tabla No. VII

Dilución	Naranja de metilo (50 µg/ml)	Volumen de aforo (ml).	Concentración Naranja de metilo (µg/ml).
1	0.5ml	50	0.5
2	0.5ml	25	1.0
3	0.5ml	10	2.5
4	1.0ml	10	5.0
5	2.0ml	10	10

ANÁLISIS DE MUESTRAS.

Cuantificación de naranja de metilo.

-Se determinó la absorbancia de cada una de las soluciones de la curva de calibración del estándar de naranja de metilo a una longitud de onda de 463 nm, máximo que fue encontrado al hacer el barrido de esta sustancia, tomando como blanco solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4), contenidos en un tubo de ensayo.

4.6.3. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de naranja de metilo en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4).

4.6.3.1. Linealidad.

Para determinar si los resultados de absorbancia presentan un comportamiento lineal con respecto a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado se prepararon tres curvas estándar en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) en diferentes días en un intervalo de 0.5 a 10 µg/ml, se determinó el coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto para cada una de ellas.

4.6.3.2. Repetibilidad.

Para determinar la concentración obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, aparatos, tiempo y laboratorios), se prepararon tres curvas estándar de naranja de metilo en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) en el intervalo de 0.5 a 10 µg/ml, calculando la media, la desviación estándar, y el coeficiente de variación para cada una de las concentraciones estudiadas.

4.6.4. Técnica de intestino invertido de rata (*"in vitro"*)

Se procedió como se indica en la sección 4.5.3 y los segmentos aislados fueron suspendidos en 70 ml de solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) a 37°C para el intestino (control) y en 70 ml de solución de naranja de metilo en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4 ; 1 mg/ml) a 37°C para la porción del duodeno (muestra); la temperatura se mantuvo durante el transcurso del experimento a 37°C.

La solución que contiene naranja de metilo es referida como la solución mucosal. Una alícuota de 1 ml de solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) a 37°C es introducida al saco por medio del dispositivo para muestrear (Esquema No. 4.1) y es referida como la solución serosal, y se mantiene una atmósfera de 95% de oxígeno.

Se tomaron muestras del volumen introducido en el saco, o el contenido que se pudo extraer, a los 10, 20, 30, 40, 60 y 90 minutos, después de cada una de las muestras se volvió a llenar el saco con 1 ml de solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) para continuar con el proceso de muestreo, las muestras se diluyeron a 1 ml (con solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH 7.4) cuando el volumen fue menor a 1ml); y se les adicionó 3 ml de solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) fría, se agitaron en vortex por 10 segundos, se centrifugaron a 2500 rpm por 20 minutos y por último se determinó la absorbancia de las muestras a 463 nm, utilizando como blanco la muestra control correspondiente a cada tiempo de muestreo.

Se construyó una curva de calibración del estándar de naranja de metilo, de acuerdo con el procedimiento de la sección 4.6.2., y se obtuvieron las concentraciones de naranja de metilo en $\mu\text{g/ml}$ que se absorbió por interpolación de cada una de las muestras obtenidas a cada tiempo.

4.7. ESTUDIO DEL EFECTO DE POLIETILENGLICOLAS SOBRE LA ABSORCIÓN DEL ACIDO ACETIL SALICILICO EN INTESTINO INVERTIDO DE RATA (*in vitro*).

4.7.1. Método analítico.

El método analítico utilizado para la cuantificación de salicilatos en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4. es el reportado por Trinder.⁽¹⁷⁾

En la Tabla No VIII se presenta la forma de preparar las diluciones del estándar de AS (preparada de acuerdo a la sección 4.3.8.4.), para la curva de calibración en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=7.4.

Tabla No. VIII

Dilución	Acido salicilico. (1 mg/ml)	Volumen de aforo (ml).	Acido salicilico (100 $\mu\text{g/ml}$)	Volumen de aforo (ml).	Concentración Acido salicilico ($\mu\text{g/ml}$).
1			0.5ml	10	5
2			1.0ml	10	10
3			3.0ml	10	30
4			5.0ml	10	50
5	5.0ml	50			100

ANÁLISIS DE MUESTRAS.

Cuantificación de salicilatos

-Tomar 1 ml de muestra de cada una de las diluciones de la curva y colocarlas en un tubo de ensayo.

-Adicionar a cada tubo 5 ml de solución reactivo de Trinder.(Preparado de acuerdo al procedimiento de la sección 4.3.9.2), agitar en vortex por 10 seg.

-Determinar la absorbancia de cada una de las soluciones de la curva estándar a 540 nm, tomando como blanco un solución que contiene 1 ml de solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4). y 5 ml de solución reactivo de Trinder contenido en un tubo de ensayo.

4.7.2. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de salicilatos en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4).

4.7.2.1. Linealidad.

Para determinar si los resultados de absorbancia presentan un comportamiento lineal con respecto a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado se prepararon en un día tres curvas estándar en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) en diferentes días en un intervalo de 5 a 100 $\mu\text{g/ml}$, se determinó el coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto para cada una de ellas.

4.7.2.2. Repetibilidad.

Para determinar la concentración obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, aparatos, tiempo y laboratorios), se prepararon el mismo día tres curvas del estándar de ácido salicílico en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) en el intervalo de 5 a 100 $\mu\text{g/ml}$, calculando la media, la desviación estándar, y el coeficiente de variación para cada una de las concentraciones estudiadas.

4.7.3. Técnica de intestino invertido de rata ("in vitro")

Se procedió como se indica en la sección 4.5.3 y los segmentos aislados fueron suspendidos en 70 ml de solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) a 37°C para el control y en 70 ml de solución de ácido acetil salicílico (1 mg/ml) ó AAS (1 mg/ml) + PEG 1500 (0.5, 1.0, 2.0 %, v/v); AAS (1 mg/ml) + PEG 4000 (0.5, 1.0, 2.0 %, v/v); AAS (1 mg/ml) + PEG 6000 (0.5, 1.0, 2.0 %, v/v) en solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH 7.4) a 37°C; temperatura que es mantenida durante el transcurso del experimento.

La solución que contiene el fármaco y/o fármaco + PEG es referida como la solución mucosal. Una alícuota de 1 ml de solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) a 37°C es introducida al saco por medio del dispositivo para muestrear (Esquema No.4.1.) y es referida como la solución serosal. Una atmósfera de 95% de oxígeno.

Se tomaron muestras del volumen introducido en el saco, o el contenido que se pudo extraer, a los 10, 20, 30 40, 60 y 90 minutos, después de cada una de las muestras se volvió a llenar el saco con 1 ml de solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4) para continuar con el proceso de muestreo, las muestras se diluyeron a 1 ml (con solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH 7.4)) cuando el volumen fue menor a 1ml; y se les adicionó 5 ml de reactivo de Trinder, se agitaron en vortex por 10 seg, se centrifugaron a 2500 rpm por 20 min y por último se determinó la absorbancia de las muestras a 540 nm, utilizando como blanco la muestra control correspondiente a cada tiempo de muestreo.

Se construyó una curva de calibración estándar de ácido salicílico, de acuerdo al procedimiento de la sección 4.7.1., y se obtuvieron las concentraciones de fármaco en µg/ml que se absorbió de cada una de las muestras obtenidas a cada tiempo.

Para realizar estos estudios se empleó un diseño de bloques y parcelas para tener un orden en la experimentación del principio activo y de los excipientes en las diferentes concentraciones a analizar, el diseño que se encuentra representado en la Tabla No. (d y d.I) del Apéndice de Tablas, donde se anotaron los resultados de todos los experimentos realizados.

4.8. PROCEDIMIENTO PARA EL SECADO DE LOS INTESTINOS.

Los intestinos una vez terminado el experimento se someten a un secado para hacer corrección debido a la variabilidad entre individuos y la variación que existe al realizar el corte de los segmentos de intestino; y el procedimiento que se siguió fue el siguiente:

-Retirar el segmento de intestino correspondiente a la porción del duodeno (muestra y control) de los dispositivos muestreadores quitando el amarre del contrapeso y de la región para sujetar al intestino al dispositivo muestreador.

-Colocarlo en una charola de aluminio.

-Secar en el horno a 20-25°C durante toda la noche siguiente al experimento aproximadamente de 16 a 18 hrs.

-Pasado este tiempo transferir el intestino a otra charola de aluminio la cual se debe mantener a peso constante.

-Introducir la charola en otra estufa la cual se encuentra en condiciones de vacío a (20-25 pulgadas de Hg) y a una temperatura de (60°C).

-Dejar secar el intestino por cuatro horas, sacarlo de la estufa y colocarlo en un desecador.

-Pesar el intestino en una balanza analítica.

-Si no existe un cambio muy significativo en el peso (esto es no debe existir variación alguna en la tercera cifra después del punto en las cifras registradas al pesar), se registra el peso; de existir cambio,

-El intestino se somete a 1 hora más de secado hasta obtener un peso casi constante (esto es, aunque exista ligera variación en la cifra cuarta registrada al pesar).

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

5.1. CONTROL DE CALIDAD DE EXCIPIENTES (PEG 1500, PEG 4000 Y PEG 6000) Y DEL ESTANDAR DE ACIDO ACETIL SALICILICO.

5.1.1. Apariencia.

Las características que presentaron los Polietilenglicoles después de observación visual fue la siguiente:

Tabla No. IX.

Polietilenglicol.	Características.
1500	Hojuelas blancas medianas.
4000	Gránulos pequeños y polvo blanco cremoso.
6000	Polvo fino blanco cremoso.
AAS.	Cristales blancos pequeños, en forma de agujas.

5.1.2. Fluidéz.

En la Tabla No. X se muestra la velocidad de flujo en segundos para el Polietilenglicol 1500, 4000, 6000 y el AAS, de acuerdo con el procedimiento establecido en la sección (4.4.2.).

5.1.3. Densidad aparente y real.

En la Tabla No. X se muestran los datos de densidad aparente y de densidad real obtenidos para cada polietilenglicol estudiado y del AAS, obtenidos de acuerdo al procedimiento de la sección (4.4.3.)

Tabla No. X.

Especificación	POLIETILENGLICOL			AAS
	1500	4000	6000	
masa. (g)	8.4	8.05	8.7	12.0
vol. ocupado.(ml)	20.0	11.5	16.0	16.5
densidad aparente (g/ml).	0.42	0.70	0.5437	0.727
vol. (ml)(100 veces).	18.5	10.5	12.0	15.5
densidad real (g/ml).	0.4540	0.766	0.725	0.7742
veloc. de flujo. (seg.).	9.6	5.93	6.2	2.93

5.1.4. Tamaño de partícula.

La determinación del tamaño de partícula se realizó de acuerdo al procedimiento de la sección (4.4.4.) y los datos de cantidad retenida en cada malla en porciento, se presentan en la Tabla No. X.I.1 a XI.4.

Tabla No. X.I.1.

AAS		
Malla No.	Diámetro (mm)	% retenido.
18	>1.0	7.13
20	1.0	8.15
30	0.8	57.07
35	0.59	6.28
60	0.50	6.19
Base.	≤0.250	15.18
Porciento total.		100

Tabla No. X.I. 2.

POLIETILENGLICOL 1500		
Malla No.	Diámetro (mm)	% retenido.
6	>3.36	54.17
8	3.36	18.73
10	2.38	10.14
14	1.58	9.43
Base.	≤1.41	7.52
Porcentaje total.		99.99

Tabla No. X.I.3.

POLIETILENGLICOL 4000		
Malla No.	Diámetro (mm)	% retenido.
20	>0.8	16.54
35	0.8	26.46
40	0.5	9.92
Base.	≤0.42	47.07
Porcentaje total.		99.99

Tabla No. X.I.4.

POLIETILENGLICOL 6000		
Malla No.	Diámetro (mm)	% retenido.
60	>0.250	11.39
80	0.250	12.15
100	0.177	9.75
150	0.149	18.86
Base.	≤0.105	47.85
Porcentaje total.		100

5.1.5. Punto de fusión.

El punto de fusión se determinó de acuerdo a lo establecido en la sección (4.4.5.) y en la Tabla No. XII. se presentan los datos del intervalo de fusión obtenido para cada Polietilenglicol.

Tabla No. XII

Polietilenglicol.	Intervalo de fusión. (°C).
1500	43 - 46
4000	57 - 60
6000	59 - 62

5.1.6. Análisis térmico diferencial.

De la (Fig.No. 1 a la No. 3.) se presentan las gráficas del comportamiento de cada uno de los Polietilenglicoles estudiados; en donde se observan picos endotérmicos bien definidos de las sustancias estudiadas, siendo de 48.43°C, 58.85°C, y 62.29°C para el PEG 1500, PEG 4000 y el PEG 6000 respectivamente.

Fig. No. 1 Analisis térmico diferencial del Polietilenglicol 1500.

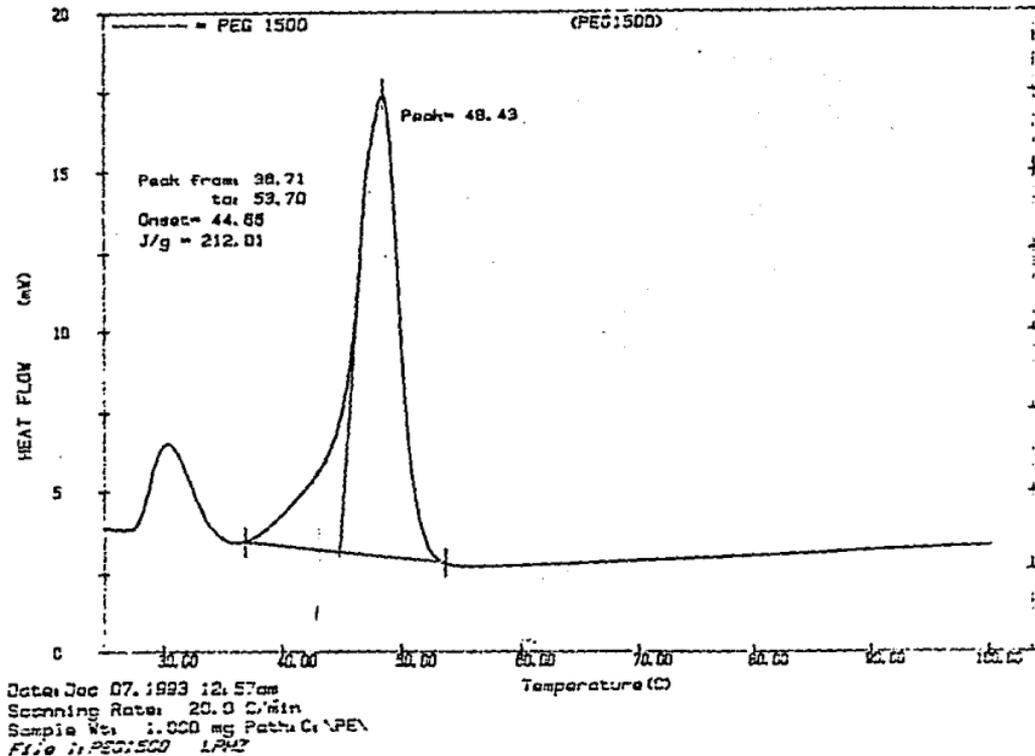


Fig. No. 2 Analisis térmico diferencial del Poli(etilenglicol) 4000

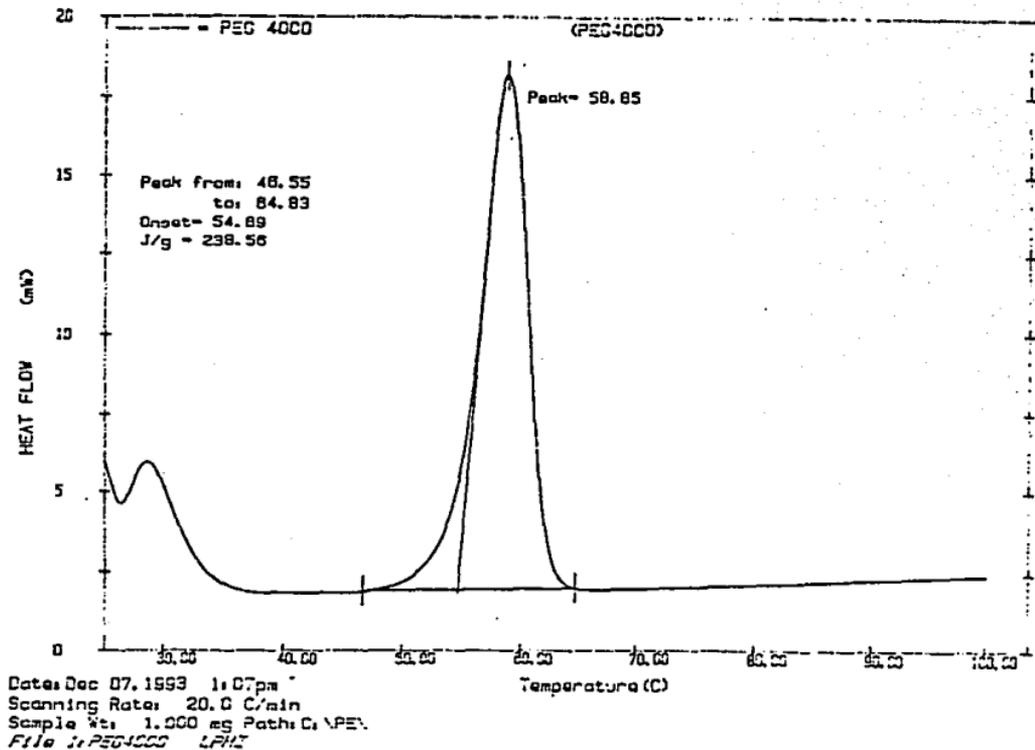
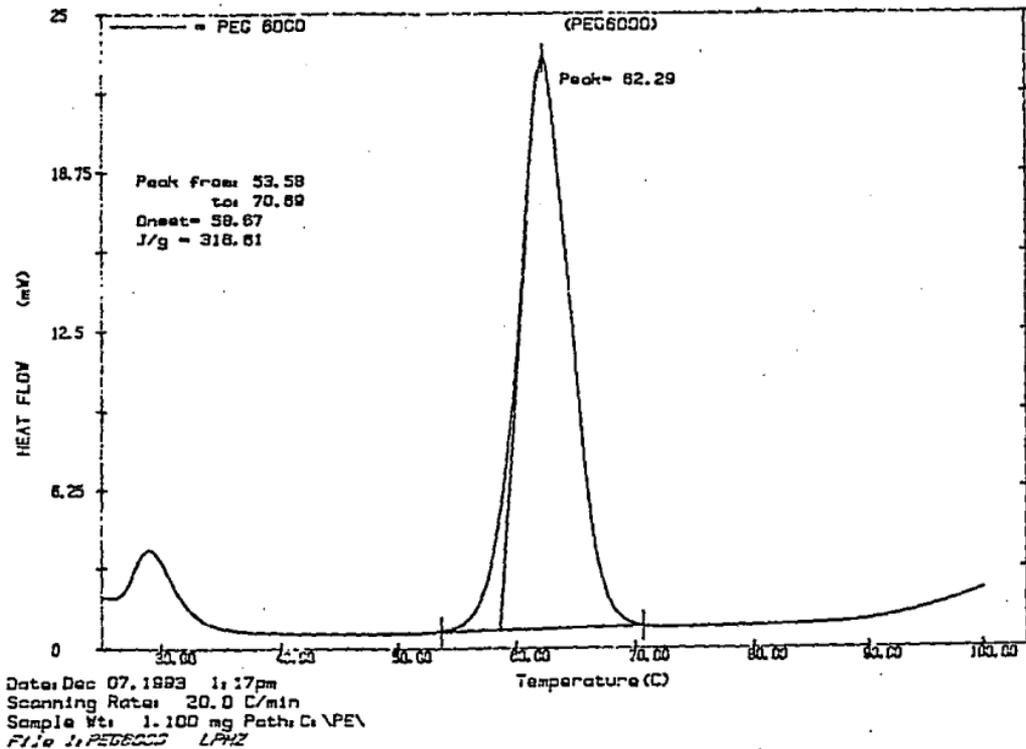


Fig. No. 3 Analisis térmico diferencial del Polietilenglicol 6000.



5.2. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DE LA GLUCOSA PARA DETERMINAR LA INTEGRIDAD FUNCIONAL DEL INTESTINO INVERTIDO DE RATA.

5.2.1. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de glucosa en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4).

5.2.1.1. Linealidad.

En la Tabla No.XIII se presentan los resultados obtenidos de las tres curvas del estándar de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4 y en la Fig. No. 4 se presenta la gráfica en la que se observa la linealidad del método en un rango de 20 a 160 µg/ml con un coeficiente de correlación de 0.9999.

Tabla No. XIII. Linealidad del método analítico.
Cuantificación de glucosa.

Conc. (µg/ml)	Absorbancia. Curva			Promedio	Desv. estándar	C.V.(%)
	Día 1	Día 2	Día 3			
20	0.061	0.062	0.062	0.061	5.77x10-4	0.94
40	0.117	0.112	0.116	0.115	2.64x10-3	2.30
50	0.148	0.148	0.151	0.149	1.73x10-3	1.16
100	0.282	0.280	0.285	0.282	2.51x10-3	0.89
160	0.452	0.439	0.449	0.447	6.80x10-3	1.52
b	6.17x10-3	8.50x10-3	8.35x10-3			
m	2.78x10-3	2.70x10-3	2.16x10-3			
r	0.9999	0.9997	0.9998			

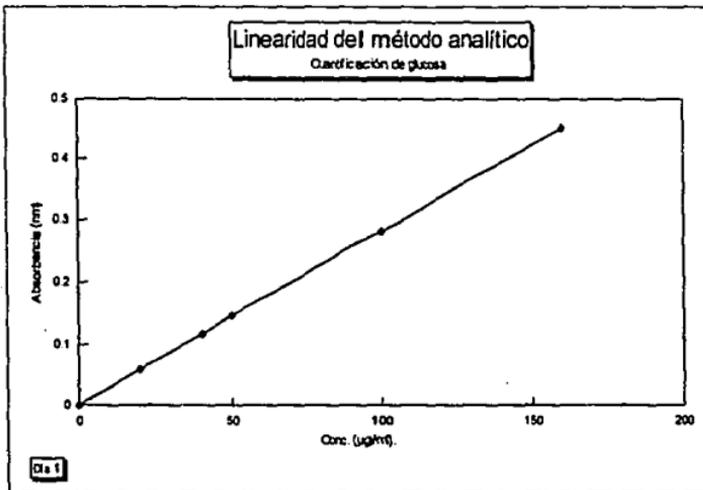


Fig. No. 4.

5.2.1.2. Repetibilidad.

En la Tabla No. XIV se presentan los resultados de las tres curvas de estándar de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4, en donde se puede observar que el coeficiente de variación más alto fue de 9.44% el cual cae dentro de las especificaciones para fluidos biológicos con un coeficiente menor al 15%.⁽¹⁴⁾

Tabla No. XIV. Repetibilidad del método analítico.
Cuantificación de glucosa.

Conc (µg/ml)	Absorbancia Curva.			Promedio	Desv. estándar	C.V.(%)
	Día 1	Día 2	Día 3			
20	0.052	0.061	0.052	0.055	5.19x10-3	9.44
40	0.104	0.106	0.106	0.1053	1.15x10-3	1.10
50	0.148	0.147	0.140	0.145	4.35x10-3	3.00
100	0.235	0.279	0.269	0.261	2.3x10-2	8.83
160	0.379	0.438	0.406	0.4076	2.95x10-2	7.24
b	1.6x 10-2	5.51x10-3	7.63x10-5			
m	2.26 x 10-3	2.71x10-3	2.53x10-3			
r	0.9961	0.9994	0.9988			

5.2.2. Técnica de intestino invertido de rata ("in vitro").

Para determinar si el intestino una vez invertido era integro funcionalmente durante el tiempo de permeación del fármaco en cuestión, se llevaron a cabo 4 determinaciones individuales de la permeación de la glucosa. En el Apéndice de Tablas en la Tabla (a.) se presentan los perfiles de permeación individuales de la glucosa y el promedio de estos; y en el Apéndice de Figuras en la Fig. No. 1. se muestran los perfiles de permeación individuales para la glucosa.

En la Fig. No.5. se presentan los promedios de los perfiles de permeación para las 4 repeticiones efectuadas en μg de glucosa acumulada / g de intestino.

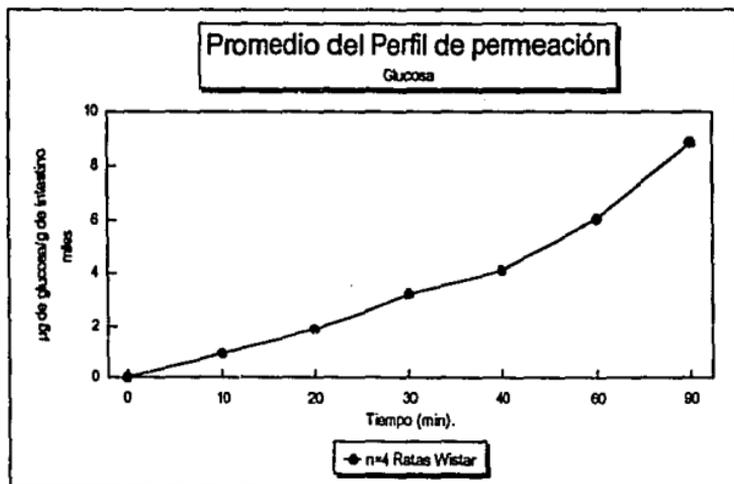


Fig. No. 5.

5.3. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DE NARANJA DE METILO PARA DETERMINAR LA INTEGRIDAD ESTRUCTURAL DEL INTESTINO INVERTIDO DE RATA.

5.3.1. Prueba para determinar el máximo de absorción del naranja de metilo.

En la Fig. No. 6. se presenta el pico máximo de absorción del naranja de metilo, el cual se localiza a una longitud de onda de 463 nm con una absorbancia de 1.723 a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en celdilla de 1 cm.

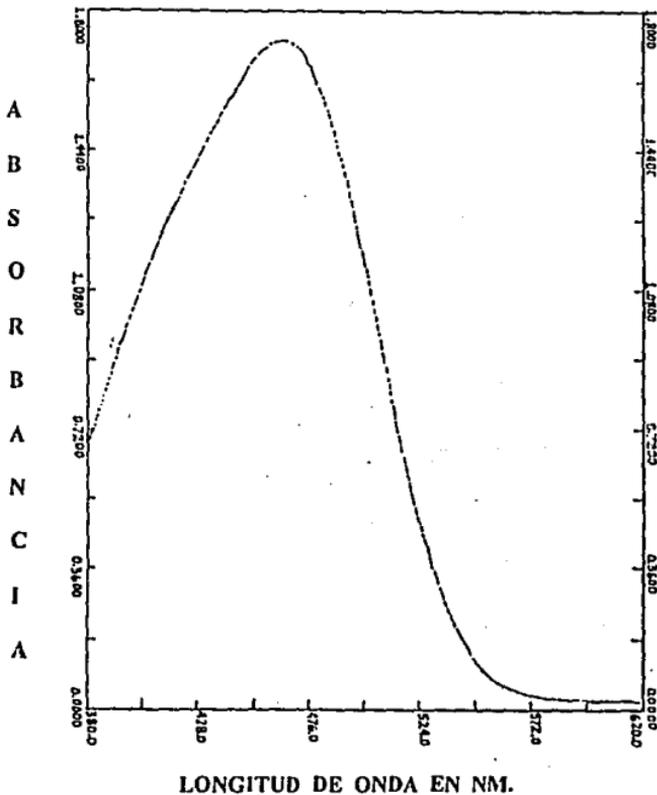


Fig. No. 6. Máximo de absorción del Naranja de Metilo.

5.3.2. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de naranja de metilo en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4).

5.3.2.1. Linearidad.

En la Tabla No. XV. se presentan los resultados obtenidos de las tres curvas de estándar de naranja de metilo en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4 y en la Fig. No. 7 se presenta la gráfica en la que se observa la linearidad del método en un intervalo de 0.5 a 10 µg/ml con un coeficiente de correlación de 0.9998.

Tabla No. XV. Linearidad del método analítico.
Cuantificación de naranja de metilo.

Conc. (µg/ml)	Absorbancia. Curva			Promedio	Desv. estándar	C.V.(%)
	Día 1	Día 2	Día 3			
0.5	0.031	0.031	0.029	0.030	1.15x10-3	3.80
1.0	0.061	0.063	0.061	0.062	1.15x10-3	1.87
2.5	0.156	0.159	0.152	0.156	3.51x10-3	2.25
5.0	0.293	0.301	0.287	0.294	7.02x10-3	2.39
10.0	0.573	0.589	0.561	0.574	0.0140	2.44
b	6.75x10-3	6.29x10-3	6.35x10-3			
m	5.68x10-2	5.85x10-2	5.56x10-2			
r	0.9997	0.9998	0.9997			

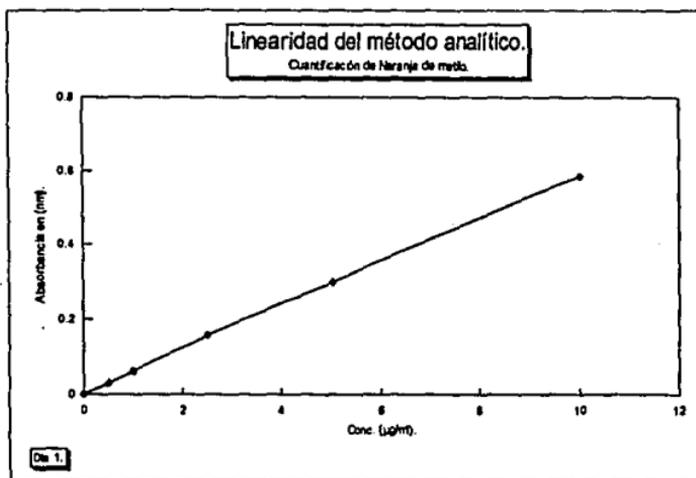


Fig. No. 7.

5.3.2.2. Repetibilidad.

En la Tabla No. XVI. se presentan los resultados de las tres curvas de estándar. de naranja de metilo en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4, en donde se puede observar que el coeficiente de variación más alto fue de 1.82% el cual cae dentro de las especificaciones antes mencionadas para fluidos biológicos.⁽³⁴⁾

Tabla No. XVI. Repetibilidad del método analítico.
Cuantificación de naranja de metilo.

Conc (µg/ml)	Absorbancia Curva.			Promedio	Desv. estándar	C.V.(%)
	Día 1	Día 2	Día 3			
0.5	0.031	0.032	0.032	0.0316	5.77×10^{-4}	1.82
1.0	0.062	0.063	0.063	0.0626	5.77×10^{-4}	0.92
2.5	0.159	0.163	0.163	0.1616	2.30×10^{-3}	1.42
5.0	0.301	0.308	0.305	0.3046	3.51×10^{-3}	1.15
10.0	0.593	0.611	0.602	0.602	9.0×10^{-3}	1.49
b	5.16×10^{-3}	4.5×10^{-3}	5.85×10^{-3}			
m	5.89×10^{-2}	6.07×10^{-2}	5.97×10^{-2}			
r	0.9996	0.9997	0.9996			

5.3.3. Técnica de intestino invertido de rata ("in vitro").

Para determinar si el intestino una vez invertido era integro estructuralmente durante el tiempo de permeación del fármaco en cuestión, se llevaron a cabo 4 determinaciones individuales de la permeación del naranja de metilo. En el Apéndice de Tablas en la Tabla (b) se presentan los perfiles de permeación individuales del naranja de metilo y el promedio de estos; y en el Apéndice de Figuras en la Fig. No. 11 se muestran los perfiles de permeación individuales para el naranja de metilo y en la Fig. No. 8. se presentan los promedios de los perfiles de permeación para las 4 repeticiones efectuadas en μg de naranja de metilo acumulado / g de intestino, encontrándose una buena relación entre estos parámetros.

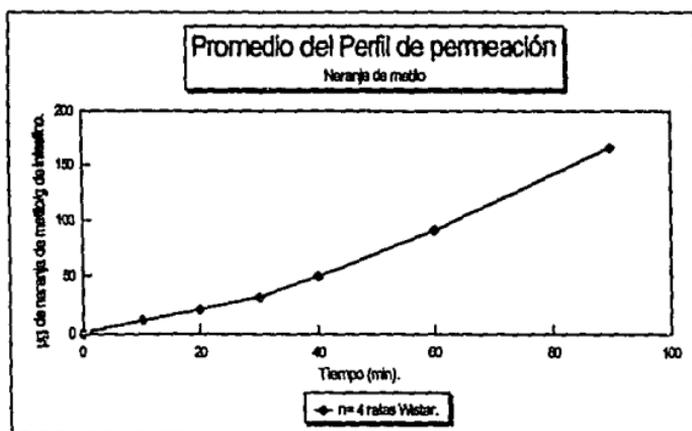


Fig. No. 8.

5.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE POLIETILENGLICOLAS SOBRE LA ABSORCIÓN DEL ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO EN INTESTINO INVERTIDO DE RATA (*in vitro*).

5.4.1. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de salicilatos en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4).

5.4.1.1. Linearidad.

En la Tabla No. XVII se presentan los resultados obtenidos de las tres curvas de estándar de ácido salicílico en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4 y en la Fig. No. 9 se presenta la gráfica en la que se observa la linealidad del método en un rango de 5 a 100 $\mu\text{g/ml}$ con un coeficiente de correlación de 0.9999.

Tabla No. XVII Linearidad del método analítico.
Cuantificación de salicilatos.

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia. Curva			Promedio	Desv. estándar	C.V.(%)
	Día 1	Día 2	Día 3			
5	0.011	0.009	0.012	0.011	1.52×10^{-3}	14.32
10	0.020	0.018	0.019	0.019	1×10^{-3}	5.26
30	0.058	0.057	0.059	0.058	1×10^{-3}	1.72
50	0.097	0.096	0.098	0.097	1×10^{-3}	1.03
100	0.195	0.196	0.196	0.196	5.77×10^{-4}	0.29
b	1.31×10^{-3}	-1.68×10^{-3}	7.5×10^{-4}			
m	1.93×10^{-3}	1.97×10^{-3}	1.95×10^{-3}			
r	0.9998	0.9999	0.9999			

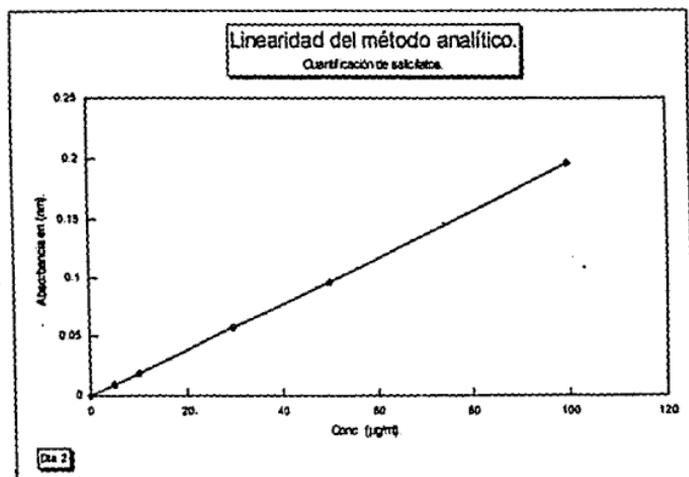


Fig. No. 9.

5.4.1.2. Repetibilidad.

En la Tabla No. XVIII se presentan los resultados de las tres curvas estándar de ácido salicílico en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4, en donde se puede observar que el coeficiente de variación más alto fue de 6.29% el cual cae dentro de las especificaciones antes mencionadas para fluidos biológicos. ⁽²⁴⁾

Tabla No. XVIII. Repetibilidad del método analítico.
Cuantificación de salicilatos.

Conc (µg/ml)	Absorbancia Curva.			Promedio	Desv. estándar	C.V.(%)
	Día 1	Día 2	Día 3			
5	0.009	0.009	0.010	0.0093	5.77×10^{-4}	6.18
10	0.019	0.017	0.019	0.0183	1.15×10^{-3}	6.29
300	0.060	0.057	0.060	0.059	1.73×10^{-3}	2.93
50	0.099	0.097	0.100	0.0986	1.52×10^{-3}	1.54
100	0.198	0.196	0.198	0.1973	1.15×10^{-3}	0.58
b	-5.38×10^{-4}	-1.95×10^{-3}	1.26×10^{-5}			
m	1.98×10^{-3}	1.97×10^{-3}	1.98×10^{-3}			
r	0.9999	0.9999	0.9999			

5.4.2. Técnica de intestino invertido de rata ("in vitro").

Para conocer como influye la presencia de Polietilenglicoles en la Permeación del AAS se realizaron 6 determinaciones individuales de la permeación del AAS, así también se realizaron 5 determinaciones para el AAS con PEG 1500, PEG 4000 y el PEG 6000 cada uno de los cuales se analizó a tres diferentes concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0 (%v/v), de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección (4.7.3.).

En el apéndice de Tablas se encuentra la Tabla (d y d.1) donde se presentan los resultados de los perfiles de permeación individuales en μg de fármaco acumulado/g de intestino y en el Apéndice de Figuras de la Fig. (i. a la xii.) se observan los comportamientos de la permeación del AAS y del AAS en presencia de los diferentes tipos de Polietilenglicoles en μg de fármaco acumulado /g de intestino, a las concentraciones ya mencionadas; así también se presentan en el Apéndice de Tablas en la Tabla (e) y en la Fig. (10 a la 13.) los resultados de los promedios de los perfiles de permeación en μg de fármaco acumulado /g de intestino de los 5 experimentos realizados para cada tratamiento.

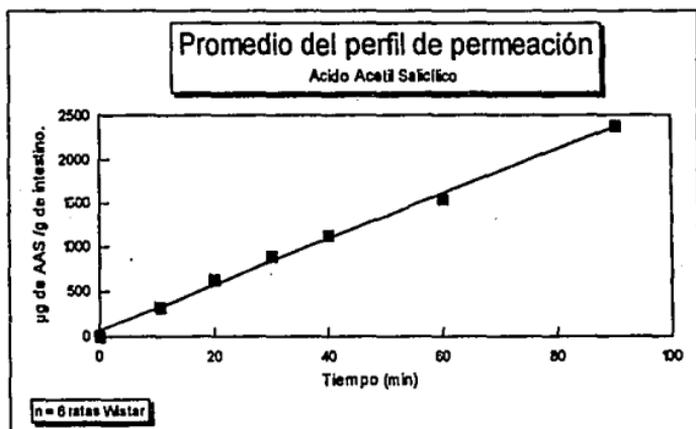


Fig. No. 10.

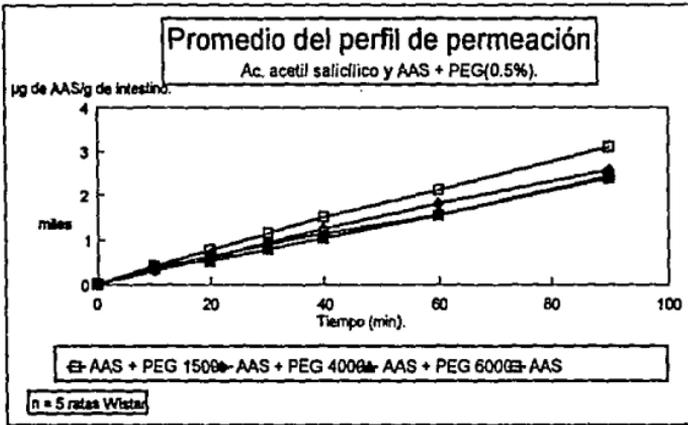


Fig. No. 11.

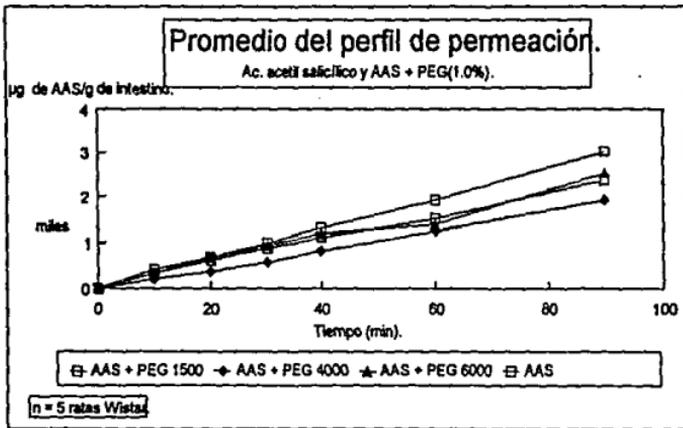


Fig. No. 12.

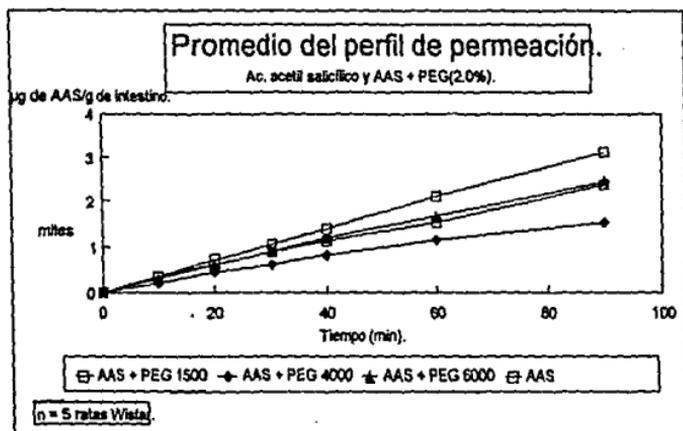


Fig. No. 13.

El modelo estadístico que se utilizó para analizar los datos obtenidos de los experimentos fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + CP_{ij} + R_k(j).$$

$i = 1, 2, 3$

$C =$ Concentración.

$j = 1, 2, 3$

$P =$ Tipo de PEG.

$k = 1, 2, 3, 4, 5, 6$

$R =$ Repetición.

Los datos que se analizaron se encuentran en la Tabla (d y d.I), a partir de los cuales se obtuvo la Tabla No. XIX y las gráficas representadas en la Fig No. 14, No. 15 y No. 16 de los resultados del análisis de varianza efectuado a los datos obtenidos de los experimentos realizados, en donde se encontró diferencia significativa para el tipo de polietilenglicol y la interacción entre el tipo de PEG y la concentración de los PEGs estudiados, y no existió tal diferencia significativa en el caso de las concentraciones de PEGs empleadas.

Tabla No. XIX. Análisis de varianza de los PEG's (1500, 4000 y 6000), y del AAS.

F.V.	S.C.	g.l.	M.C.	Fexp.	Ftablas. ⁽¹¹⁾
Cl.	1132748	2	566374.23	1.5948	3.23
Pj.	15381908	2	7690954.03	21.6566	3.23
CPij	4309286	4	1077321.62	3.0335	2.61
Rk(ij).	12784722	36	355131.18		
TOTAL	33608664	44			

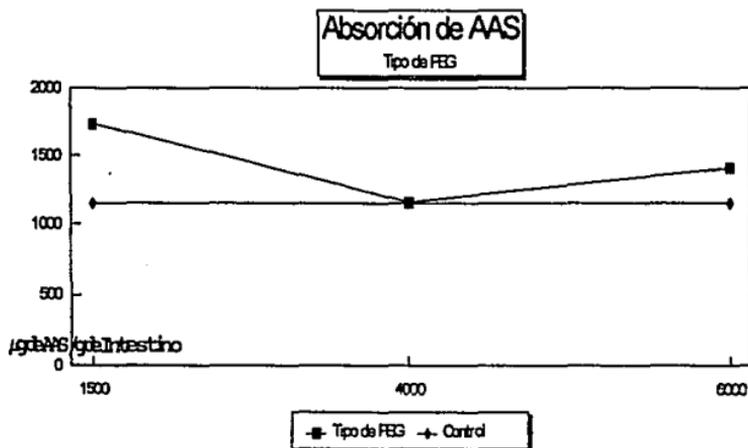


Fig. No. 14. Comparación de la absorción de ácido acetil salicílico con la absorción promedio de las tres concentraciones 0.5, 1.0, 2.0 (% v/v) estudiadas para cada tipo de PEG.

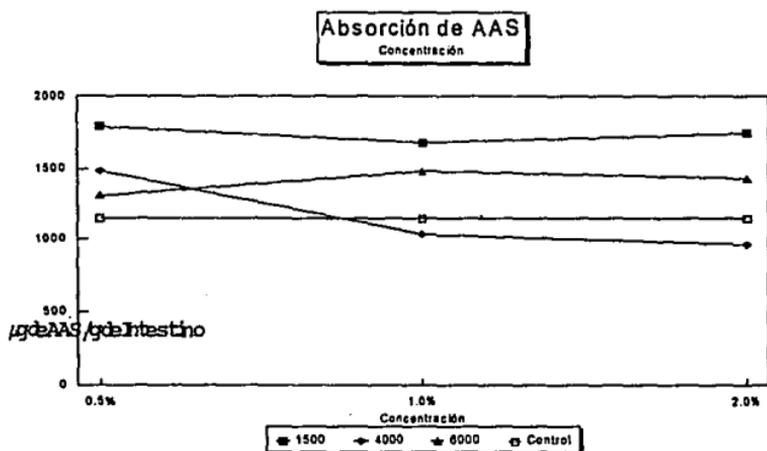


Fig. No. 15. Comparación de la absorción del ácido acetil salicílico con la absorción de cada tipo de PEG en las concentraciones analizadas.

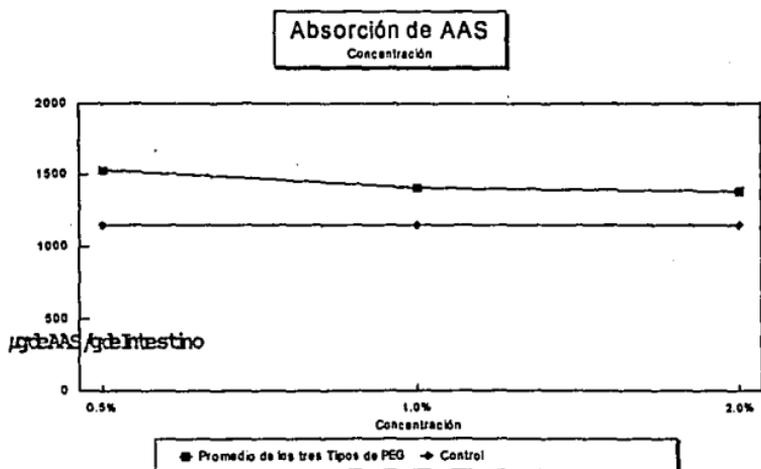


Fig. No. 16. Comparación de la absorción del ácido acetil salicílico con el promedio de los tres tipos de PEG a cada una de las concentraciones analizadas.

**5.5. PROCEDIMIENTO PARA CALCULAR EL PESO DE LOS
INTESTINOS SECOS.**

Para conocer el peso seco en gramos del intestino empleado en el experimento se procedió de acuerdo con lo establecido en la sección (4.8.), y se obtuvo el valor como sigue:

Peso del intestino seco= Peso en gramos de la charola con el intestino seco - Peso de la charola de aluminio a peso constante.

6. DISCUSION DE RESULTADOS.

6.1. CONTROL DE CALIDAD DE EXCIPIENTES (PEG 1500, PEG 4000 Y PEG 6000) Y EL ESTANDAR DE ACIDO ACETIL SALICILICO.

6.1.1. Apariencia.

De acuerdo con lo reportado en la literatura encontramos que el PEG 1500 que se estudió fue el único que presentó una apariencia diferente, el PEG 4000 y el PEG 6000 y el AAS presentan una apariencia que va de acuerdo con lo que se reporta en la literatura.

6.1.2. Fluidéz.

De acuerdo con los datos de la Tabla No. X se encontró que la velocidad de flujo en orden de mayor a menor la presenta el PEG 1500, el PEG 6000, el PEG 4000 y el AAS, esto debido a la apariencia que presentaban cada tipo de Polietilenglicol y el AAS.

6.1.3. Densidad aparente y real.

A partir de los datos presentados en la Tabla No. X se encontró que el volumen ocupado inicial y el volumen ocupado final fue en orden de mayor a menor, primero el PEG 1500, AAS, PEG 6000 y el PEG 4000 respectivamente y en el caso de la densidad aparente y real el orden fue del AAS, PEG 4000, PEG 6000 al PEG 1500 respectivamente, lo cual es atribuido a la apariencia que presentan estas materias primas.

6.1.4. Tamaño de partícula.

De acuerdo con los datos de la Tabla No. XI. se encontró que el PEG 1500 presenta en mayor proporción un tamaño de partícula arriba de un diámetro de 3.36 y le sigue en cantidad un diámetro de partícula igual a 3.36(mm), para el PEG 4000 la mayor proporción de partículas es menor e igual a un diámetro de 0.42(mm) y le sigue en proporción un tamaño de partícula con un diámetro de 0.8 (mm). El PEG 6000 el cual presenta en mayor cantidad un tamaño de partícula de diámetro menor e igual a 0.105 (mm) siguiendole en cantidad un diámetro de partícula mayor a los 0.149 (mm) y menor a los 0.177 (mm) y por último el AAS tiene una mayor cantidad de tamaño de partícula de diámetro menor de 1.0 (mm) y mayor de 0.8 (mm) y le sigue en cantidad un tamaño de partícula con diámetro menor e igual a 0.250 (mm).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

6.1.5. Punto de fusión.

Los datos de punto de fusión obtenidos se encuentran dentro de los intervalos reportados en la literatura.

6.1.6. Análisis térmico diferencial.

De acuerdo con las gráficas que se muestran de la Fig. No. (1 a la 3), se encontraron los valores para la transición de fusión de estos excipientes, dando un valor definido de temperatura a la cual la molécula de la sustancia sufre un cambio en debido a la cantidad de calor aplicado, siendo de 48.43°C, 58.85°C y 62.29°C para el PEG 1500, PEG 4000 y el PEG 6000 respectivamente.

Además suponemos que son sustancias que no presentan impurezas y degradación ya que sus picos son definidos, debido a que estos excipientes se fundieron y no existieron picos coleados, encimados o varios picos que estuvieran mostrando el comportamiento de otras sustancias, y en cuanto al primer pico pequeño que aparece es debido al comienzo de la corrida de la sustancia que se está analizando. Aunque no se puede dar un resultado en cuanto a la pureza y a la caracterización real de los excipientes debido a que no contamos con la información si el análisis se realizó haciendo las pesadas de las muestras en una balanza microanalítica, y además el análisis se debería de haber hecho a una tasa de calentamiento de 1 °C/min de acuerdo a la literatura, para que nosotros pudiéramos decir algo en cuanto a la pureza y además no podemos decir nada en cuanto a la estabilización de la línea base ya que al parecer no se logró su completa estabilización y por lo tanto no tendríamos un buen resultado en cuanto a la caracterización por que además no sabemos de esta forma si realmente el pico se debe a la materia prima unicamente o si quizás existe alguna otra sustancia que interfiera, debido a que la tasa a la que se corrió la muestra no fue la más adecuada.

6.2. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DE LA GLUCOSA PARA DETERMINAR LA INTEGRIDAD FUNCIONAL DEL INTESTINO INVERTIDO DE RATA.

6.2.1. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de glucosa en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4).

6.2.1.1. Linearidad.

En la Tabla No. XIII. se presentan los resultados obtenidos de las tres curvas de estándar de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4 y en la Fig. No. 4 se presenta la gráfica en la que se observa la linealidad del método en un intervalo de 20 a 160 µg/ml con un coeficiente de correlación de 0.9999.

6.2.1.2. Repetibilidad.

En la Tabla No. XIV se presentan los resultados de las tres curvas de estándar de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4, en donde se puede observar que el coeficiente de variación más alto fue de 9.44% el cual cae dentro de las especificaciones para fluidos biológicos, el cual debe ser menor de 15%.⁽¹⁶⁾

6.2.2. Técnica de intestino invertido de rata ("in vitro").

Se encontró que el intestino después de ser invertido y durante tiempo del proceso de permeación de la glucosa se encuentra integro funcionalmente hasta los 90 minutos y existiendo una buena correlación entre la cantidad permeada y el tiempo, lo cual se observa en los resultados en el Apéndice de Tablas en la Tabla (a.) donde se presentan los perfiles de permeación individuales de la glucosa y el promedio de estos; y en el Apéndice de Figuras en la Fig. No. i muestra los perfiles de permeación individuales para la glucosa y en la Fig. No. 5 presenta los promedios de los perfiles de permeación para las 4 repeticiones efectuadas en μg de glucosa acumulada / g de intestino.

Por otra parte se encontró que los perfiles de permeación muestran un proceso con una cinética de orden cero.

6.3. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DE NARANJA DE METILO PARA DETERMINAR LA INTEGRIDAD ESTRUCTURAL DEL INTESTINO INVERTIDO DE RATA.

6.3.1. Prueba para determinar el máximo de absorción del naranja de metilo.

De acuerdo con los resultados el pico máximo de absorción del naranja de metilo el cual se localiza a una longitud de onda de 463 nm con una absorbancia de 1.723 a la concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, en celdillas de 1 cm; esto permitió realizar la cuantificación de esta sustancia para las curvas estándar y en las muestras de permeación empleando concentraciones con una absorción menor a 0.7.

6.3.2. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de naranja de metilo en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4).

6.3.2.1. Linealidad.

En la Tabla No. XV se presentan los resultados obtenidos de las tres curvas estándar de naranja de metilo en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4 y en la Fig. No. 7 se presenta la gráfica en la que se observa la linealidad del método en un intervalo de 0.5 a 10 µg/ml con un coeficiente de correlación de 0.9998.

6.3.2.2. Repetibilidad.

En la Tabla No. XVI se presentan los resultados de las tres curvas de estándar. de naranja de metilo en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 7.4, en donde se puede observar que el coeficiente de variación más alto fue de 1.82% el cual cae dentro de las especificaciones para fluidos biológicos, el cual debe ser menor de 15%.⁽²⁶⁾

6.3.3. Técnica de intestino invertido de rata ("in vitro").

Teniendo en consideración que el naranja de metilo es una sustancia que se absorbe muy poco debido a sus características hidrofílicas nos permite saber si el intestino ha sufrido algún daño al llevar a cabo el proceso de inversión de este, y durante el tiempo del proceso de permeación del fármaco, esto es, para determinar si el intestino es íntegro estructuralmente.

De acuerdo con los datos del Apéndice de Tablas en la Tabla (b) y en el Apéndice de Figuras en la Fig. No. ii se encontró que el intestino no sufre daño durante el proceso de inversión y no sufre ninguna alteración hasta los 60 minutos de estudio ya que los perfiles de permeación del naranja de metilo muestran patrones semejantes y existe una correlación entre la cantidad acumulada de sustancia y el tiempo hasta los 60 minutos. Después de los 60 minutos existe un cambio de pendiente que sugiere un cambio en la velocidad de transferencia del anaranjado de metilo.

A partir de los perfiles de permeación individuales de la cantidad acumulada de naranja de metilo contra el tiempo se encontró que este proceso de permeación presenta una cinética de orden cero hasta antes de los 60 minutos.

6.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE POLIETILENGLICOLES SOBRE LA ABSORCIÓN DEL ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO EN INTESTINO INVERTIDO DE RATA (*in vitro*).

6.4.1. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de salicilatos en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 7.4).

6.4.1.1. Linearidad.

En la Tabla No. XVII. se puede observar que los coeficiente de correlación de las tres curvas estándar en el intervalo de 5 a 100 $\mu\text{g/ml}$ se encuentran entre 0.9998 y 0.9999 por lo que el método cumple con el criterio de linearidad en el intervalo de concentraciones estudiadas.

6.4.1.2. Repetibilidad.

En la Tabla No. XVIII se puede observar que el coeficiente de variación más alto fue de 6.29% para la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$, por lo que el método se consideró repetible en el intervalo de concentraciones estudiadas, además tomando en consideración que cae dentro del intervalo permitido para un estudio con una sustancia que simula un fluido biológico, el cual debe ser menor del 15%.⁽²⁶⁾

6.4.2. Técnica de intestino invertido de rata (*"in vitro"*).

Apartir de los perfiles de permeación individuales para el AAS, el PEG 1500, PEG 4000 y PEG 6000 encontramos que todos presentan una cinética de permeación de orden cero.

De acuerdo con el análisis estadístico realizado y de los resultados que se derivaron de este, Tabla No. XIX, se encontró que la permeación del ácido acetil salicílico en presencia de cada tipo de PEG tiene un orden de mayor a menor cantidad permeada del PEG 1500, al PEG 6000 y por último el PEG 4000, lo cual se encuentra representado en la Fig No. 14, y la permeación del control (fármaco de AAS) es menor comparada con la de los tres PEGs analizados.

En la Fig. No. 15 se observa como si hay interacción entre el tipo de PEG y la concentración sobre todo por el PEG 4000 ya que se encontró que el PEG 4000 al aumentar la concentración, disminuye la permeación y puede ser menor que la permeación del control (fármaco AAS) observándose claramente en la más alta concentración estudiada para este tipo de PEG, lo cual no se observa con el PEG 1500 y el PEG 6000.

En cuanto al incremento de la concentración de PEG adicionado no se encontraron diferencias significativas, lo cual se encontró tanto en el resultado del análisis estadístico y se observa claramente al esquematizar los resultados que se muestran en la Fig. No. 16 en donde se comparó con la permeación del control (fármaco AAS) y se encontró casi una línea recta que nos indica que el promedio de los resultados de cada tipo de PEG a una misma concentración no muestran diferencias grandes en cuanto a la cantidad de fármaco permeado al aumentar la concentración de PEG adicionado.

6.5. PROCEDIMIENTO PARA CALCULAR EL PESO DE LOS INTESTINOS SECOS.

Los valores que se obtuvieron se emplearon para corregir la cantidad de sustancia o fármaco permeado en cantidad acumulada con respecto al tiempo, para que de esta forma se eliminara la variable del tamaño de intestino empleado y de la variabilidad entre individuo.

7. CONCLUSIONES.

El Control de Calidad realizado a los excipientes en apariencia, fluidez, densidad aparente y densidad real, tamaño de partícula, son parámetros que nos permiten conocer sus características reológicas, y el análisis por calorimetría no nos puede dar un resultado en cuanto a la caracterización de las materias primas y su pureza debido al desconocimiento del control efectuado durante el análisis, por lo cual se sugiere que el análisis de materias primas para caracterizarlas se realice siguiendo los lineamientos ya mencionados, ya que de esta forma la caracterización y los estudios de compatibilidad de materias primas que se pueden realizar por medio de la calorimetría diferencial de barrido son técnicas que permiten un análisis más eficiente y menos costoso para la industria farmacéutica.

Los métodos fueron validados de acuerdo con las especificaciones reportadas en la literatura para estudios con fluidos biológicos, obteniendo buenos resultados en los parámetros medidos.

Las pruebas realizadas de permeación con glucosa nos demuestran que el intestino invertido de rata es viable metabólicamente hasta los 90 minutos.

Las pruebas de permeación realizadas con naranja de metilo nos indican que el intestino invertido de rata es integro estructuralmente hasta los 60 minutos, ya que después de este tiempo existe un cambio en la pendiente que es indicativo de un cambio en la velocidad de transferencia de esta sustancia, y posible pérdida de la viabilidad estructural y metabólica del intestino.

Se encontró que el PEG 1500, 4000 y 6000 influyen en la permeación del ácido acetil salicílico.

No existe influencia en la permeación del AAS por parte de los PEG's al aumentar su concentración, de acuerdo con el modelo estadístico empleado para el análisis de los datos de los estudios de permeación.

Los factores analizados que fueron el tipo y concentración de PEG, estos en el estudio ejercen una influencia en conjunto en el comportamiento de la permeación del AAS, por lo que se recomienda hacer un estudio para conocer realmente cual de estos factores es que está influyendo realmente en la permeación del fármaco.

Se encontró que los tipos de PEGs que se estudiaron tiene una influencia sobre la permeación del AAS. Se recomienda el uso del PEG 1500 y el 6000 si se quiere lograr una mayor permeación del AAS, pero es importante notar que se requiere de un uso cuidadoso de estas materias primas debido a su bajo punto de fusión, sobre todo del PEG 1500 esto al momento de mezclar y de comprimir para lo cual se tendrían que usar sistemas de enfriamiento. El PEG 4000, es recomendable también su uso ya que se encontró que influye en la permeación del AAS en un menor grado que los otros PEGs, pero se recomienda también un manejo adecuado de esta materia prima.

8. BIBLIOGRAFIA.

1. B.N. LaDu, M.D., Ph.D.; H.G. Mandel, Ph.D.; E.L. Way, Ph.D. Chapter 2. Drug Absorption. The Williams and Wilkins Company. U.S.A. Baltimore. 1971. Pags. 22-25.
2. Clyde W. Whitworth; Loudon D. Yantis. Ability of Certain Additives to Influence the Absorption of Salicylic Acid from Solutions in an In Vivo Study. Preliminary Report. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 56. No. 12. December 1967; Pag. 1661-1663.
3. Dubowski, K.M.; An o-toluidine method for body-fluid glucose determination. *Clin Chem*; 1962; 8: Pags. 215-235.
4. Florey Klaus;. Analytical Profiles of Drug Substances V. 8 Academic Press. New York. U.S.A. 1979. Pags. 6,7,17,20-21,30-31.
5. Handbook of Pharmaceutical Excipients. *The Pharmaceutical Society of Great Britain*; Published by *American Pharmaceutical Association*; Washington D.C. Pags. 209-213.
6. Hebert A. Lieberman; Leon Lachman. Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets. Vol 1. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. U.S.A . 1980. Pags. 24-26, 66-67, 88-91, 113-161, 129-135, 88-91.
7. Hebert A. Lieberman; Leon Lachman. Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets. Vol 2. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. U.S.A . 1981. Pags. 294-297, 332-335, 338-340, 362-365, 428-439
8. Hsiao-Hwa Lu, James Thomas, David Fleisher. Influence of D-Glucose - Induced Water Absorption on Rat Jejunal Uptake of Two Passively Absorbed Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol 81. No. 1. January 1992. Pags. 21-25.
9. Hyvärinen, A.; E.A. Nikkila. Specific determination of blood glucose with o-toluidine. *Clin Chim Acta.*; 1962; 7: Pags: 140-143.
10. J.C. Johnson; Tablet Manufacture. Ed. Noyes Data Corporation; U.S.A. 1974. Pags. 148-149.
11. James Swarbrick; Ph. D. Current Concepts in the Pharmaceutical Sciences Biopharmaceutics. Gastrointestinal Absorption. Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. 1970 Pags. 80-85.
12. L.A. Underhill; et al. Alternatives to Animal Testing in the USP-NF Present and Future.; *Drug Development and Industrial Pharmacy*; Marcel Dekker, Inc. 20(2), 1994. Pags. 165-216.

13. Leon Lachman; Hebert A. Lieberman; Joseph L. Kaning. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. Third edition. Lea and Febiger. Philadelphia U.S.A. 1986. Pags. 27, 67-71; 183-184; 315-317; 328
14. M.A. Ma. José Marques de Cantu; Probabilidad y estadística para Ciencias Químico Biológicas; ENEP-Zaragoza; U.N.A.M.; México; 1988. Pags. 561-574.
15. Michael Meyerson; Milo Gibaldi. Drug Transport III: Influence of Various Sugars on Passive Transfer of Several Drug Across the Everted Rat Intestine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 60. No. 2.. February 1971. Pags. 225-230
16. Milo Gibaldi, Barbara Grundhofer. Drug Transport VI: Functional Integrity of the Rat Everted Small Intestine with Respect to the Passive Transfer. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol 61; No. 1.; January 1972. Pags. 116-119
17. P. Trinder. Rapid Determination of Salicylate in Biological Fluids. *Biochem J*. Vol. 57, 1954. Pags. 301-303
18. Parvinder Singh, J. Keith Guillory, Theodore D. Sokoloski; Leslie Z. Benet; V.N. Bhatia. Effect of Inert Tablet Ingredients on Drug Absorption I: Effect of Polyethylene Glycol 4000 on the Intestinal Absorption of Four Barbiturates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol 55. No. 1.; January 1966. Pag. 63-68.
19. Remington's Pharmaceutical Sciences. 17th edition. Mack Publishing Company. Easton, Pennsylvania. 1985. Pags. 1522-1523; 1252-1253.
20. Robert K. Crane, T Hastings Wilson. In Vitro for the Study of the Rate of Intestinal Absorption of Sugars. *J. Appl. Physiol*. Vol 12; 1958. Pags. 145-146.
21. Ruth. R. Levine; William F. McNary, Phyllips J. Kornguth; Raymond LeBlanc. Histological Reevaluation of Everted Gut Technique for Studying Intestinal Absorption. *European J. Pharmacol*. 9 (1970) North Holland Publishing Comp, Amsterdam. Pags. 211-219.
22. Stanley A. Kaplan; Margaret L. Jack. Principles and Perspectives in Drug Bioavailability. Chapter 6. In Vitro, In Situ and In Vivo Models in Bioavailability Assessment. Karger and Basel 1979. Pags. 156-191.
23. Stanley A. Kaplan; Stanley Cotler. Use of Canulated Everted Intestinal Sac for Serial Sampling as Drug Absorbability (Permeability Screen). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol 61. No. 9. September 1972. Pags. 1361-1365.
24. T.H. Wilson; G. Wiseman. The Use of Sacs of Everted Small Intestine for the Study of the Transference of Substances from the Mucosal to the Serosal Surface. *J. Physiol*. 123.(1954). Pags. 116-125.

25. The Merck Index an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. Tenth edition. Rahway N.J. U.S.A. 1983. Pags. 123; 1092.

26. Vinod P. Shah; Kamal K. Midha, et al. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 81, No. 3, March 1992. Pags. 309-312.

27. Z.T. Chowhan and A. A. Amaro. Everted Rat Intestinal Sacs as an In Vitro Model for Assessing Absorptivity of New Drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66. No. 9., September 1977. Pags. 1249-1253.

APENDICE DE TABLAS.

Tabla (a). Perfiles de permeación y Promedio del perfil de permeación de Glucosa.

Tiempo. (min).	Glucosa. Concentración acumulada (μg de glucosa/g de intestino).				
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Promedio
0	0	0	0	0	0
10	1325.77	940.48	983.60	616.97	966.715
20	2116.20	2115.95	2077.53	1139.05	1862.18
30	2793.52	5080.93	3201.60	1814.40	3222.61
40	3440.68	6075.64	4415.85	2497.06	4107.31
60	5211.32	7992.21	6583.03	4289.08	6018.91
90	8195.92	10478.20	9452.35	7460.53	8896.75

Tabla (b). Perfiles de permeación y Promedio del perfil de permeación de Naranja de Metilo.

Tiempo. (min).	Naranja de metilo. Concentración acumulada (μg de naranja de metilo/g de intestino).				
	Exp. 1	Exp. 2.	Exp. 3	Exp 4.	Promedio
0	0	0	0	0	0
10	13.2035	6.8052	13.1533	12.3644	11.38
20	21.3499	17.0202	25.7687	19.7059	20.96
30	33.5902	28.3720	37.0394	29.5588	32.14
40	51.3692	50.4073	54.2269	44.9370	50.24
60	93.2294	94.2654	91.0473	83.9225	90.62
90	165.4319	162.4470	171.7057	165.6030	166.30

**Tabla (c) Promedios del Perfil de permeación del AAS y del AAS+ PEGs (1500, 4000 y 6000).
n= 5 ratas Wistar.**

Tiempo. (min).	AAS. (Control) µg de AAS/g de intestino.	AAS + PEG 1500 µg de AAS/g de intestino			AAS +PEG 4000 µg de AAS/g de intestino			AAS +PEG 6000 µg de AAS/g de intestino		
		0.5%.	1.0%	2.0%	0.5%	1.0%	2.0%	0.5%	1.0%	2.0%
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	329.01	367.78	426.12	334.08	299.64	213.86	207.43	408.45	355.94	300.64
20	626.18	760.23	695.14	710.10	596.85	374.25	441.08	523.19	674.97	604.08
30	890.32	112.86	987.81	1042.79	911.23	564.99	630.81	772.65	944.01	904.67
40	1128.83	1486.25	1331.52	1410.15	1230.56	830.60	833.49	1033.31	1206.73	1179.49
60	1537.92	2121.67	1958.16	2114.47	1805.89	1260.77	1158.56	1548.61	1410.51	1689.39
90	2379.85	3120.35	3024.06	3124.82	2561.75	1942.04	1534.17	2405.66	2534.36	2473.41

Tabla (d). Perfiles de permeación del AAS y AAS + PEGs (1500, 4000 y 6000).

Exp. No.	Tiempo (min)	AAS. (Control) μg de AAS/g de intestino.	PEG 1500 μg de AAS/g de intestino			PEG 4000 μg de AAS/g de intestino			PEG 6000 μg de AAS/g de intestino		
			0.5%	1.0%	2.0%	0.5%	1.0%	2.0%	0.5%	1.0%	2.0%
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	314.90	513.4	590.2	380.8	333.9	213.4	99.8	260.2	354.1	349.0
	20	755.79	980.3	1020.3	739.0	622.2	435.7	304.5	494.2	668.6	705.3
	30	1169.68	1470.4	1541.8	1127.3	1001.7	737.6	421.9	745.7	1032.7	1083.0
	40	1547.57	1995.4	1937.6	1553.3	1362.9	1004.0	626.5	927.5	1297.6	1446.5
	60	2177.44	2915.9	2630.7	2325.6	2161.9	1677.1	796.3	1431.6	1802.1	1989.5
	90	3383.22	4197.1	3964.5	3391.5	3134.0	2093.8	1167.0	2397.6	2603.0	3222.1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	211.26	547.79	539.6	391.2	255.5	292.5	178.6	182.6	528.0	199.7
	20	388.20	1106.7	937.3	934.2	613.0	453.4	374.4	629.4	869.7	525.5
	30	479.31	1554.6	1284.9	1306.4	1007.7	553.0	553.0	953.5	1090.3	763.6
	40	682.00	2124.6	1615.8	1782.9	1458.1	1020.9	697.3	1324.8	1301.6	1067.4
	60	893.26	2783.4	2297.3	2677.1	1973.5	1506.2	1081.9	1950.8	1727.1	1552.1
	90	1602.28	4152.4	3354.5	3970.0	2460.9	2307.3	1397.8	3284.3	2497.3	2316.2
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	452.09	510.9	586.6	366.6	473.6	350.7	220.7	395.4	367.6	316.1
	20	804.56	1083.0	726.6	725.9	973.2	648.2	405.8	823.1	759.0	667.2
	30	1057.41	1512.2	919.1	1099.8	1403.5	919.2	559.7	1210.5	1126.7	983.3
	40	1201.59	1900.6	1418.1	1415.6	1781.7	1252.2	784.8	1573.6	1494.3	1360.6
	60	1454.44	2595.3	2153.5	2058.1	2593.4	1523.2	1085.7	2243.3	2226.3	2061.6
	90	2268.79	3964.0	3423.2	3165.1	3890.6	2697.4	1395.4	3122.7	3085.1	2806.4

Tabla (d.1). Perfiles de permeación del AAS y AAS + PEGs (1500, 4000 y 6000).

Exp. No.	Tiempo (min)	AAS. (Control) μg de AAS/g de intestino.	PEG 1500 μg de AAS/g de intestino			PEG 4000 μg de AAS/g de intestino			PEG 6000 μg de AAS/g de intestino		
			0.5%	1.0%	2.0%	0.5%	1.0%	2.0%	0.5%	1.0%	2.0%
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	398.36	285.7	465.24	538.0	366.1	128.9	390.8	261.4	398.7	423.7
	20	751.53	693.6	861.2	1020.0	687.7	148.9	826.2	547.2	788.5	797.0
	30	1041.46	1136.3	1257.1	1436.6	1027.0	359.4	1181.3	767.9	1097.4	1254.3
	40	1331.38	1561.7	1757.0	1996.8	1393.2	597.1	1464.8	1045.6	1487.2	1535.2
	60	1973.72	2371.1	2542.8	2989.6	2027.0	1243.0	1855.6	1616.5	2218.4	2169.0
	90	2715.46	3433.6	4030.2	4270.8	2981.9	2342.3	2049.9	2488.7	3623.5	3273.0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	298.57	348.9	375.1	327.9	368.7	297.7	354.7	351.1	487.1	515.3
	20	554.00	697.9	625.5	841.5	685.0	559.2	735.6	645.2	963.9	929.5
	30	800.81	1003.6	923.9	1286.6	1027.5	820.8	1029.0	958.3	1317.0	1343.8
	40	1021.74	1335.2	1260.7	1712.2	1387.4	1109.4	1427.4	1328.3	1659.7	1667.2
	60	1458.34	2064.4	2124.6	2636.4	2079.7	1615.2	2131.9	2049.5	2291.2	2364.2
	90	2438.44	2975.0	3371.9	3951.5	2903.1	2211.5	3195.0	3140.6	3397.3	3222.8
6	0	0									
	10	298.88									
	20	502.95									
	30	793.22									
	40	988.67									
	60	1270.31									
	90	1870.89									

APENDICE DE FIGURAS.

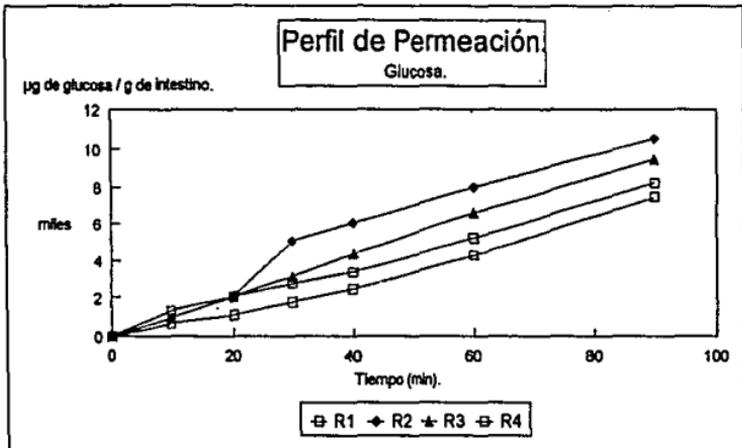


Fig. No. (i).

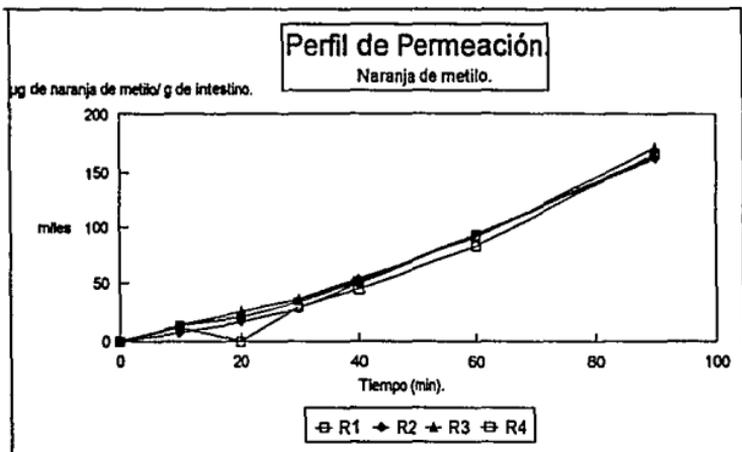


Fig. No. (ii).

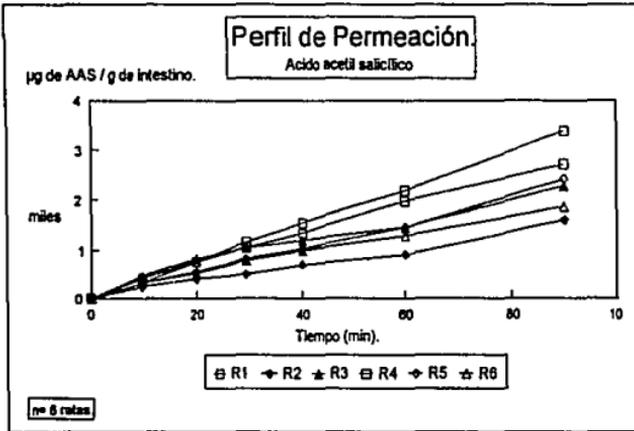


Fig. No. (iii).

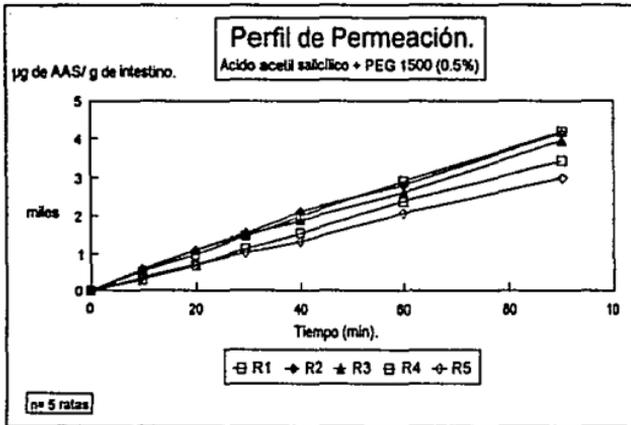


Fig No. (iv).

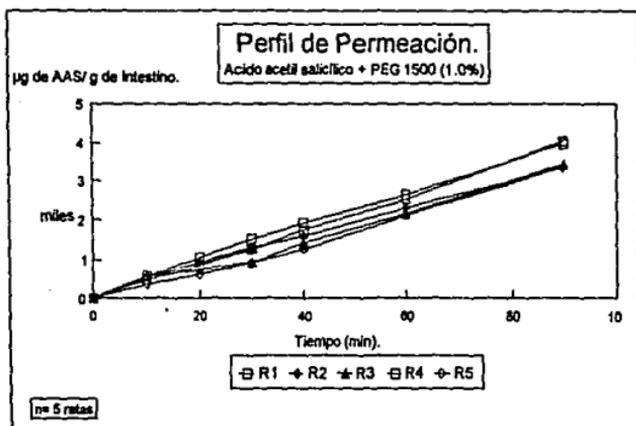


Fig. No. (v).

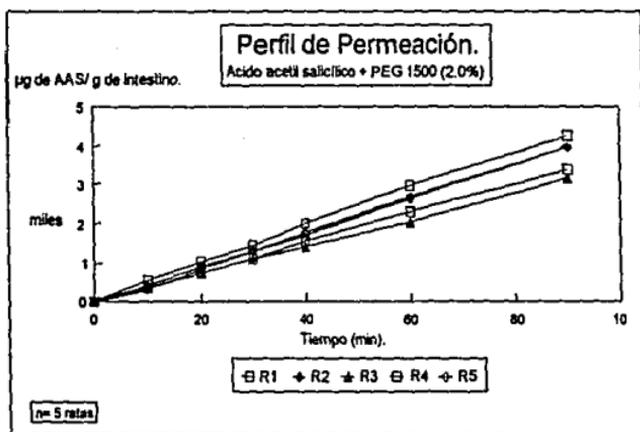


Fig. No. (vi).

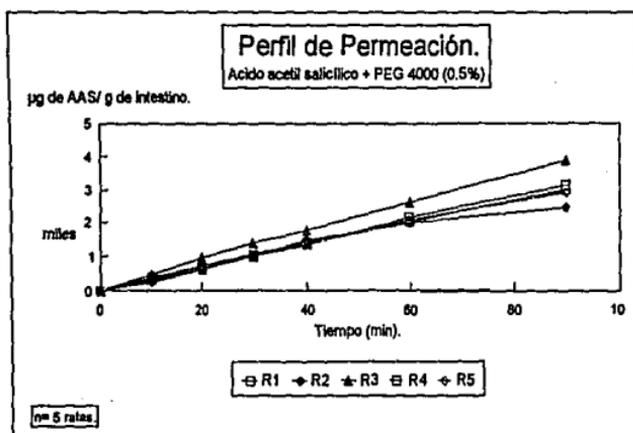


Fig. No. (vii).

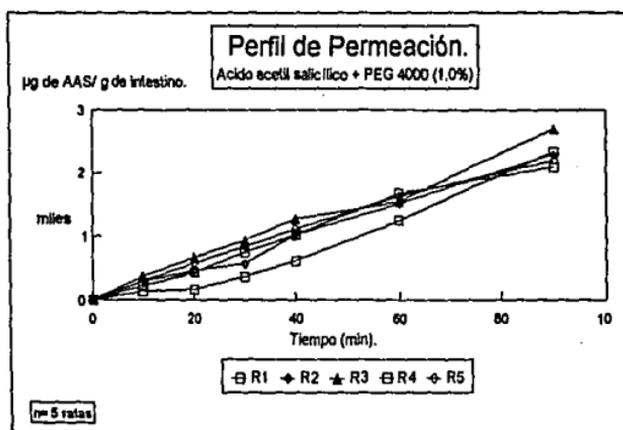


Fig. No. (viii).

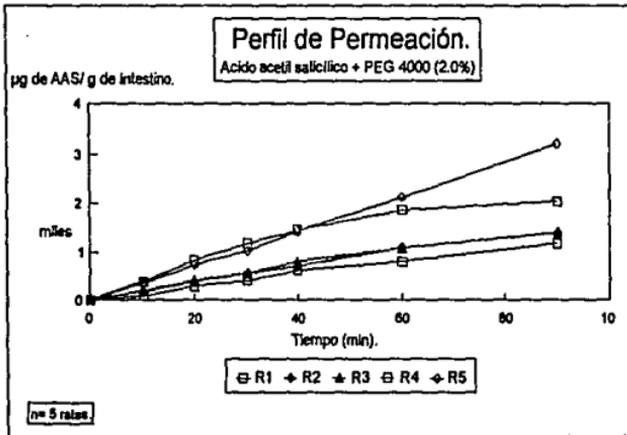


Fig. No. (ix).

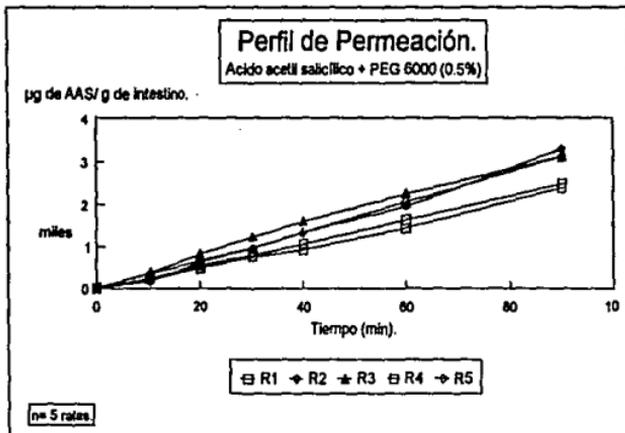


Fig. No. (x).

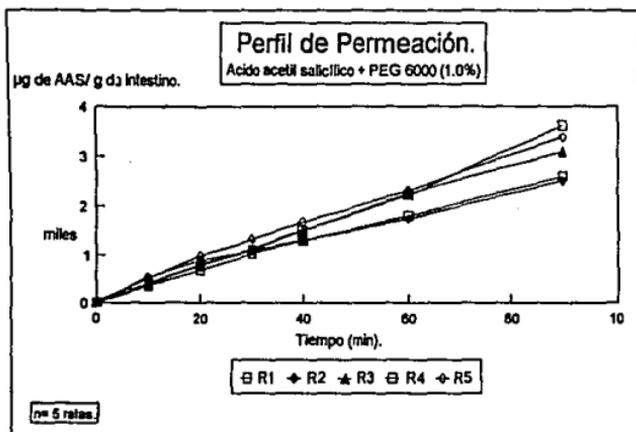


Fig. No. (xi).

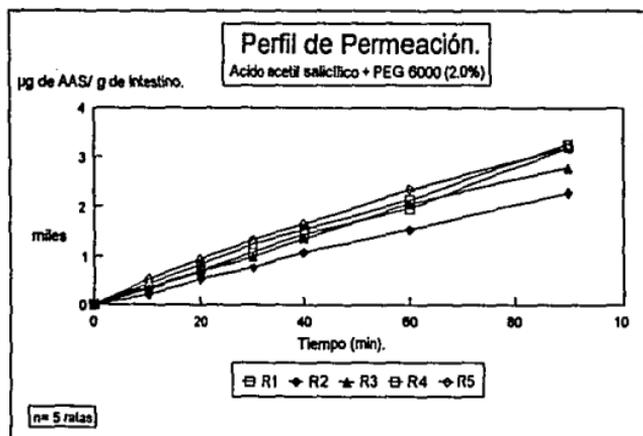


Fig. No. (xii).