

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**INTERACCIÓN DEL EXTRACTO METANÓLICO DE *Amphipterygium adstringens* SOBRE LAS
PROPIEDADES ANALGÉSICAS, ANTIINFLAMATORIAS Y FARMACOCINÉTICAS DEL
IBUPROFENO**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. ELIZABETH GUADALUPE SANCHEZ GONZALEZ



**Ciencias
Químicas**

TUTOR: DR. ANDRES NAVARRETE CASTRO
AÑO: 2004



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 esta 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.

ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	4
2.1 Analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINE'S)	4
2.2 Ibuprofeno	8
2.2.1 Propiedades físicas y químicas	10
2.2.2 Propiedades farmacodinámicas	11
2.2.3 Farmacocinética del Ibuprofeno	14
2.2.4. Propiedades toxicológicas	19
2.3 <i>Amphipterygium adstringens</i>	20
2.3.1 Descripción	20
2.3.2 Importancia biológica	20
2.3.3 Composición química	21
2.4 Interacciones entre plantas y fármacos	26
3. Planteamiento del problema	30
4. Hipótesis	32
5. Objetivos	33
6. Metodología	34

Contenido	Página
6.1 Desarrollo y validación de un método bioanalítico para cuantificar ibuprofeno en plasma.	34
6.1.1 Desarrollo de un método analítico para cuantificar ibuprofeno en plasma.	34
6.1.2 Validación del método por CLAR para cuantificar ibuprofeno en plasma de rata.	36
6.2 Modelo de inflamación inducida por carragenina en ratas para la evaluación del efecto antiinflamatorio y analgésico	39
6.2.1 Determinación de la actividad antiinflamatoria del ibuprofeno con extracto metanólico de <i>A. adstringens</i>	40
6.2.2 Determinación de la actividad analgésica del ibuprofeno con extracto metanólico de <i>A. adstringens</i> por el método de Randall y Selitto.	42
6.3 Determinación de la interacción farmacocinética del Ibuprofeno con extracto metanólico de <i>A. adstringens</i>	44
7. Resultados y análisis de resultados	47
7.1 Desarrollo y validación de un método bioanalítico para cuantificar ibuprofeno en plasma	47

Contenido	Página
7.1.1 Desarrollo y validación del método analítico por el diseño de Box-Behnken	48
7.1.2 Validación del método bioanalítico.	51
7.1.2.1 Validación del sistema.	51
7.1.2.2 Validación del método.	53
7.1.2.3 Validación cruzada.	57
7.2 Estudio del efecto de <i>A. adstringens</i> en las propiedades antiinflamatorias, analgésicas y farmacocinéticas del ibuprofeno	58
7.2.1 Evaluación del efecto antiinflamatorio	58
7.2.2 Evaluación del efecto analgésico	60
7.2.3 Interacción farmacocinética del ibuprofeno con extracto de <i>A. adstringens</i> .	62
8. Conclusiones	68
9. Bibliografía	69
Anexo I	I
Anexo II	II

PRESENTACIÓN.

Parte de este trabajo fue presentado en el marco del XXXV Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas (5 de Noviembre, Los Cabos, Baja California Sur): Navarrete, A., Sánchez, E., Hernández, V., Oliva, I., Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa para cuantificar ibuprofeno en plasma de rata, *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, Vol. 33, No Especial Octubre 2002, Pp. 14.

Este trabajo fue financiado por el programa IN203902 de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM y por el proyecto 41231-M del Consejo de Ciencia y Tecnología, así como por el proyecto PAIP 6390-18 de la Facultad de Química de la UNAM.

Se realizó en el Laboratorio L-126 del Conjunto "E" de Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

RESUMEN.

Las posibilidades de interacción entre plantas medicinales y farmoquímicos, con algunas excepciones, sólo se basa en supuestos considerándose los efectos atribuidos y/o su composición química, sin embargo en la mayoría de los casos no existen las evidencias experimentales que demuestren tales interacciones.

En el presente trabajo se reporta el estudio de interacción del extracto metanólico de *Amphipteryngium adstringens* sobre las propiedades analgésicas, antiinflamatorias y farmacocinéticas del ibuprofeno. La investigación abarca el desarrollo y validación de un método para cuantificar ibuprofeno en plasma de rata, la evaluación del extracto metanólico de *A. adstringens* sobre el efecto analgésico del ibuprofeno por un método basado en el modelo de Randall y Selitto, la evaluación del extracto sobre el efecto antiinflamatorio del ibuprofeno en el modelo de inflamación plantar de la rata, así como el estudio de interacción farmacocinético en ratas wistar macho del extracto de la planta e ibuprofeno. El estudio fue realizado con las recomendaciones internacionales. Los datos obtenidos permitieron observar que el extracto metanólico de *A. adstringens* a dosis mayores de 30 mg/Kg disminuye el efecto analgésico y antiinflamatorio de ibuprofeno. A dosis altas del extracto (100 y 300 mg/Kg), administrado conjunta con el fármaco, la concentración plasmática del ibuprofeno no fue detectable, mientras que a la dosis de 30 mg/Kg, la concentración plasmática se disminuyó significativamente, esto debido tal vez a la inhibición de la absorción. Sin embargo, a la dosis de 10 mg/Kg de extracto metanólico de *A. adstringens* el perfil farmacocinético del ibuprofeno no se ve modificado, por lo que se puede concluir que existe una interacción dependiente de la dosis del extracto metanólico de *A. adstringens* en las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del ibuprofeno.

ABSTRACT.

The possibility of interactions between medicinal plants and drugs, with some exceptions, is only based on assumptions the attributed effects and/or their chemical composition, nevertheless in most of the cases do not there are not experimental evidences that demonstrate such interactions. In this work the interaction between of the methanolic extract of *A mphipterygium adstringens* on the analgesic, antiinflammatory and pharmacokinetics properties of ibuprofen is reported. The investigation includes development and validation of an analytical chromatographic method for the aasay of ibuprofen in plasma, the evaluation of methanolic extract of *A. adstringens* on the analgesic effect of ibuprofen using a method based on the Randall and Selitto methodology, evaluation of the extract on the antiinflammatory effect of ibuprofen, as well as the pharmacokinetic study in wistar rats. The study was carried out according to international recommendations. The collected data shows that the methanolic extract of *A. adstringens* when administrated in doses greater than 30 mg/Kg, reduced the analgesic and antiinflammatory effect of the drug. When high doses of extract, (100 and 300 mg/Kg), were administered jointly with the extract the plasmatic concentration of ibuprofen were not detectable, whereas for the 30 mg/Kg, the plasmatic concentration was significantly reduced. At 10 mg/Kg of methanolic extract of *A. adstringens* the effect and pharmacokinetics parameters of ibuprofen were not modified. It was possible to observe that there is dose-dependent interaction of the methanolic extract of *A. adstringens* in the antiinflamatory, analgesic and pharmacokinetic properties of the ibuprofen.

1. INTRODUCCIÓN.

El ibuprofeno es un fármaco empleado en el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide y algunos padecimientos relacionados con dolor e inflamación. Los tratamientos con Ibuprofeno se indican durante períodos prolongados, durante los cuales puede causar daño a la mucosa gastrointestinal por la disminución del nivel citoprotector de las prostaglandinas, estos se manifiestan por dispepsia, ulceración gastrointestinal y hemorragia gástrica. Debido a ello, algunos pacientes que sufren molestias relacionadas con el tracto gastrointestinal ingieren decocciones o infusiones de plantas a fin de disminuir las molestias causadas por el fármaco.

En México, desde la antigüedad, se ha usado el *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate) para el tratamiento de la dispepsia, úlcera gástrica y cáncer de estómago. La decocción preparada a partir de la corteza, ha demostrado actividad antiulcerosa (Navarrete *et al.*, 1989, 1998). Por lo regular el uso de remedios o productos herbolarios no es manifestado al médico (Psiciteli y Burnstein, 2002). Debido a las múltiples interacciones potenciales entre los productos naturales y los fármacos, se reconoció la necesidad de establecer estudios de interacción que permitan elucidar las posibles interacciones, pues de lo contrario, permanecerán como especulaciones. Este estudio se realizó para conocer las interacciones existentes entre el extracto metanólico de *A. adstringens* y el ibuprofeno en rata.

2. ANTECEDENTES

2.1 ANALGESICOS ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDEOS (AINE'S)

Estos fármacos constituyen un grupo heterogéneo donde la única relación química es que muchos de ellos son ácidos orgánicos.

Desde fines del siglo XIX hasta la actualidad no han cesado de introducirse en terapéutica muchos fármacos con acciones analgésicas, antipiréticas o antiinflamatorias semejantes a la aspirina y que comparten su mecanismo de acción aun siendo de estructura química muy diversa.

El grupo de los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos esta integrado por compuestos de naturaleza química diferente, y de acuerdo a esto se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Derivados del ácido salicílico.
- Derivados del para-aminofenol.
- Derivados de la fenilpirazolona.
- Fenamatos o ácido N-arilantranílico.
- Derivados del ácido fenilpropiónico (Velasco *et al.*, 1993).

Entre algunos de los derivados de ácido fenil-propiónico podemos mencionar al indoprofeno, ketoprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, fenoprofeno, ibuprofeno, etc. (Evans, 1996)

Los profenos se han hecho cada vez más populares en el tratamiento de la artritis y se indican en pacientes con dolor persistente debido a la inflamación sinovial. (Walske, 1987; Gridwood y Petrie, 1992).

La artritis reumatoide es un daño inflamatorio crónico que afecta al 1% de la población mundial y se presenta tres veces más en mujeres que en hombres. En Gran Bretaña, durante un período de siete años consecutivos, el número de días de trabajo perdidos al año, como resultado de enfermedad por las diversas formas de artritis fue de 26,110,000 días de trabajo efectivo. En Estados Unidos de Norteamérica el daño reumático se presenta en 37 millones de individuos, lo cual significa un gasto de 35,000 millones de dólares al año en el tratamiento de estos pacientes (Bresler y Katz., 1993; Vander, 1994). Datos estadísticos del Centro de prevención y control de las enfermedades de Estados Unidos de Norteamérica (Center for disease control and prevention), reportan que:

- Más de 40 millones de personas en padecen de alguna forma de artritis (una de cada seis personas).
- Se considera que para el año 2020, 59 millones de personas en padecerán artritis.
- Las enfermedades reumáticas son la principal causa de discapacidad en la población de personas mayores de 65 años.
- La artritis reumatoide, la forma más incapacitante de artritis, afecta aproximadamente a 2, 100,000 estadounidenses y ataca a las mujeres dos a tres veces más que a los hombres. Además la edad media de aparición de la artritis reumatoide está comprendida entre los 20 y los 45 años de edad (Martin Memorial Health System, 2003).

El ibuprofeno ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la artritis, además irrita menos la mucosa gástrica que la aspirina. En una escala de toxicidad y seguridad (Figura 1) el ibuprofeno se encuentra dentro de los tres primeros, además en cuanto a costo por dosis diarias es de los menos caros (Cuadro 1) (Bradley *et al.*, 1991). Es el segundo fármaco más popular de venta libre en Estados Unidos, en 1998 registró ventas anuales por más de \$400 millones de dólares (Poortinga y Hungerford, 1998).

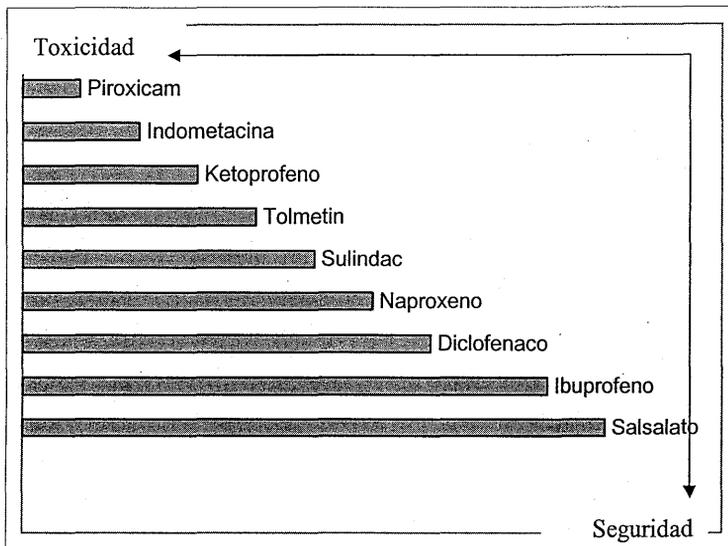


Figura 1. Relación de seguridad y toxicidad de algunos AINE'S

Cuadro 1. Dosis y costo de algunos AINE'S

Fármaco	Nombre Comercial	Rango de Dosis (mg)	Costo diario (dls)
Ácido acetilsalicílico	ASA cubierta entérica	325-975 QID	\$0.07-0.44
Diclofenaco	Voltaren	25-50 TID	\$0.62-1.25
Diflusalol	Dolobid	250-500 BID	\$0.93-1.41
Fenoprofeno	Nalfon	300-600 TID	\$0.97-1.76
Floctafenina	Idarac	200-400 TID	\$0.97-1.76
Flurbiprofeno	Ansiad, Froben	50-100 TID	\$0.88-1.18
Ibuprofeno	Advil, Motrin	200-600 TID	\$0.09-0.15
Indometacina	Indocid	25-50 TID	\$0.34-0.58
Ketoprofeno	Rhodus, Orudis	50-100 TID	\$0.53-1.14
Ketorolaco	Toradol	10 QID	\$2.55
Naproxen	Naprosyn	125-500 BID	\$0.12-0.46
Piroxicam	Feldene	10-20 diarios	\$0.45-0.74
Sulindac	Clinoril	150-200 BID	\$0.73-1.46
Salsalate	Disalcid	750-1750 BID	\$0.83-1.04
Tolmetín	Tolectim	200-600 TID	\$1.33-2.69

* QID: cuatro veces al día, TID: tres veces al día, BID: dos veces al día.

2.2 IBUPROFENO

Es un AINE que puede emplearse en individuos que no toleran la aspirina. (Falconer, 1981). Fue uno de los primeros inhibidores de la síntesis de prostaglandinas, derivados del ácido propiónico, que fueron introducidos en el mercado. Si bien los efectos colaterales son comunes (incluyendo la úlcera péptica), se informa que aparecen con menor frecuencia que con la aspirina y con la indometacina. Es efectivo para el tratamiento sintomático de la artritis reumatoide y como un analgésico para el alivio del dolor del músculo esquelético; como los salicilatos, el efecto analgésico se observa en dosis menores que el efecto antiinflamatorio (Liso *et al.*, 1996).

El ibuprofeno, cuyo nombre químico es ácido α -metil-4-(2-metilpropilbencenacético), fue desarrollado en 1964 en Inglaterra por los Laboratorios UpJohn y comercializado en 1969. En Estados Unidos se introdujo en 1974 (Boudavary, 1997; Larios, 1988).

Actualmente se comercializa en las presentaciones comerciales descritas en el Cuadro 2 (Rosenstein, 2001).

Cuadro 2. Presentaciones comerciales en México de Ibuprofeno

Nombre Comercial	Forma farmacéutica	Dosis (mg)
Advil	Gragea	200
Advil	Suspensión	2, 000 en 100 mL
Bestafen	Tabletas	400
Citalgan	Tabletas	400, 600 y 800
Days	Tabletas	200
Diprodol	Tabletas	400
Dolval	Tabletas	200
Febratic	Suspensión	2, 000 en 100 mL
Ibuflam	Tabletas	400
Motrin	Gragea	400, 600, 800
Motrin retard	Tableta de liberación prolongada	800
Motrin	Suspensión	2, 000 en 100 mL
Proartinol	Tabletas	400
Quadrax	Tabletas	200
Tabalon.400	Tabletas	400

2.2.1 Propiedades Físicas y Químicas

El ibuprofeno es un sólido incoloro, cristalino, estable, el cual presenta dos isómeros (Figura 2), debido a la presencia de un carbono quiral.

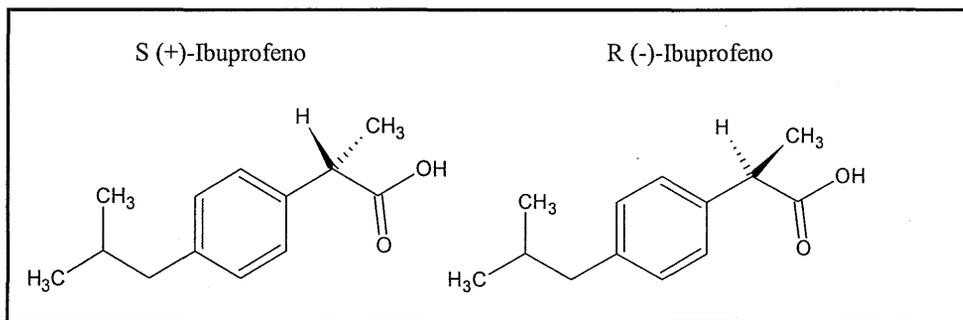


Figura 2. Estructura química de los isómeros del ibuprofeno.

Su pKa reportado es de 3.6. La mezcla racémica de ibuprofeno es relativamente insoluble en agua. En un estudio realizado por Leising y colaboradores en 1996, se encontró que la solubilidad de la mezcla racémica en agua es de 4.65 mg/100 mL, mientras que para el S(+)-ibuprofeno fue de 9.61 mg/100 mL, y el R(-)-ibuprofeno fue de 9.51 mg/100 mL (Leising *et al.*, 1996; Boudavary, 1999).

Debido a las características ácidas que presenta el ibuprofeno, es soluble en soluciones alcalinas; por otra parte también es soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos (Boudavary, 1999).

Pese a que las características de cada uno de los isómeros son distintas, las presentaciones comerciales normalmente contienen la mezcla racémica.

2.2.2 Propiedades Farmacodinámicas

El ibuprofeno tiene acción analgésica, produce una inhibición irreversible de las ciclooxigenasas y la subsiguiente inhibición de la síntesis de prostaglandinas (Figura 3) la ciclooxigenasa es una enzima necesaria para que se lleve a cabo la formación de los precursores de las prostaglandinas y el tromboxano; si el ibuprofeno interfiere con la formación de prostaglandinas, es posible entonces evitar una serie de reacciones que pueden ser desencadenadas por estas moléculas y que son causantes del dolor, la inflamación y la fiebre. La acción del ibuprofeno sobre la ciclooxigenasa evita que se de una serie de reacciones que son las responsables del dolor, inflamación y fiebre (Goodwin, 1984; Kauffman y Nelson, 1992). Se emplea en el tratamiento de artritis reumatoide y trastornos periarticulares, dismenorrea, analgesia dental, analgesia postparto y de lesiones de tejido suave (Gridwood y Petrie, 1992; Bresler y Katz, 1993). Se han realizado estudios en los cuales se demuestra que el ibuprofeno es superior como analgésico y antiinflamatorio al compararlo con otros AINE'S (Bradley *et al.*, 1991; Evans, 1996).

El ibuprofeno está aprobado para su uso en niños, ya que es efectivo en el tratamiento de artritis juvenil, al estar disponible en suspensiones, presenta la ventaja de poder administrarse en niños y aunque causa irritación gástrica es bien tolerado en infantes. Es el fármaco de primera elección por pediatras reumatólogos. (Siegel, 1998).

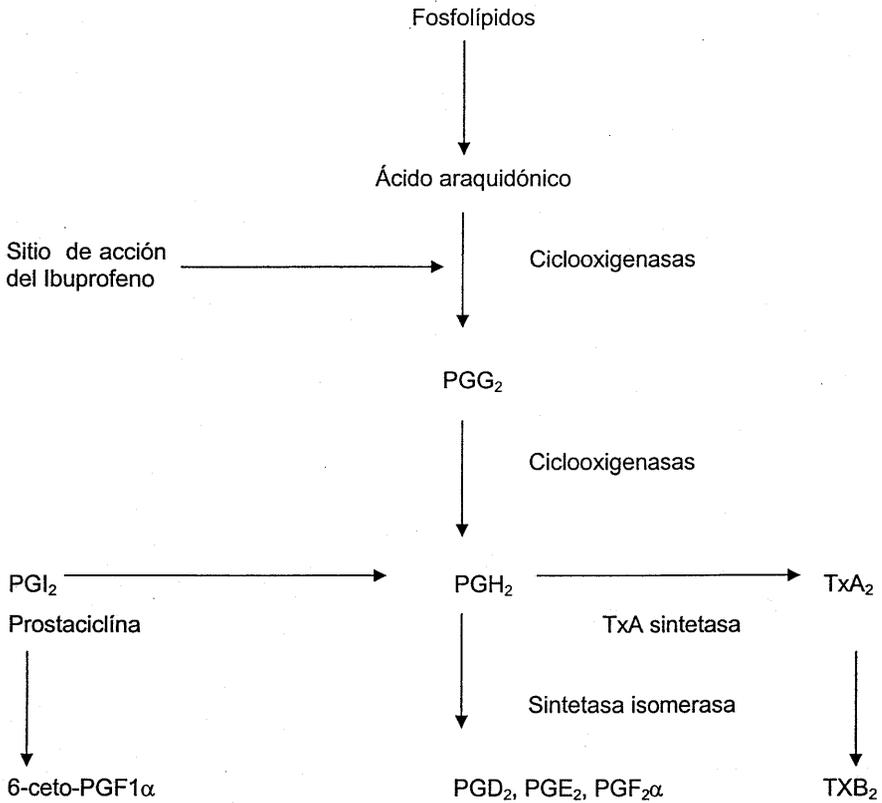


Figura 3. Formación de prostanoides a partir del ácido araquidónico. Sitio de acción del ibuprofeno (Botting, 1999).

En el caso de la artritis reumatoide, existen diferencias en cuanto a su uso, ya que si sólo actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, sólo existe un efecto paliativo, por la disminución del dolor y la inflamación. Se ha encontrado que el ibuprofeno puede actuar a varios niveles durante el desarrollo de la artritis reumatoide, dentro de los cuales puede mencionarse la disminución de la producción de IgM a partir de los linfocitos en un 74%, debido a que el factor que desencadena su síntesis son las prostaglandinas; los factores supresores de las células T favorecido por el uso de ibuprofeno, evitan que estos asistan a las células B en la formación de factores reumatoides, además interfiere con la migración de los leucocitos a los lugares inflamados, entre otras (Goodwin, 1984).

Mediante estudios *in vitro*, se ha demostrado que el S(+)-ibuprofeno es un mejor inhibidor de la Ciclooxygenasa-1 (COX-1) y Ciclooxygenasa-2 (COX-2) que el R(-)-ibuprofeno. Esta marcada actividad enantioselectiva ha sido la fuente de un gran debate en cuanto a que el ibuprofeno se comercializa en la actualidad en medicamentos que contienen la mezcla racémica y no al enantiómero S(+) puro, lo cual implicaría una disminución en el potencial terapéutico del medicamento y, como se verá más adelante, un posible aumento en la toxicidad provocada por la mezcla racémica, al encontrarse presente el enantiómero R(-) (Boneberg *et al.*, 1996).

Se ha encontrado que a altas concentraciones plasmáticas del ibuprofeno se inhibe la migración, adherencia y agregación de neutrófilos y se favorece la inhibición de la liberación de enzimas lisosomales; se ha observado que la administración de dosis altas en períodos prolongados disminuye la declinación de la función pulmonar en pacientes con fibrosis quística y daño pulmonar moderado (Rifai *et al.*, 1993).

También se observó que la administración periódica del ibuprofeno disminuye los niveles de tromboxano en sangre en pacientes con isquemia miocárdial, lo que puede ser benéfico en la prevención de infarto al miocardio (Kantor, 1984).

De Graves *et al.*, en 1993, mencionan la utilidad del ibuprofeno en el tratamiento del shock séptico y endotóxico en animales de laboratorio y domésticos. Se encontró que disminuye el progreso de la permeabilidad de los edemas

provocados por la endotoxina de la *Pasteurella hemolytica* en ovejas, además de ser efectivo en el tratamiento de la mastitis conforme aguda (De Graves *et al.*, 1993).

2.2.3 Farmacocinética del Ibuprofeno

La farmacocinética del ibuprofeno en humanos se describe adecuadamente mediante un Modelo Abierto de Dos Compartimientos –MADC– (Figura 4), con un proceso pasivo de absorción de primer orden para las soluciones orales de ibuprofeno, aunque Wagner *et al.* (1984) discuten la posibilidad de una cinética de absorción de orden cero después de dosis elevadas de ibuprofeno (1200 mg o mayores) administradas por vía oral (Wagner *et al.*, 1984; Albert y Gernaat, 1984).

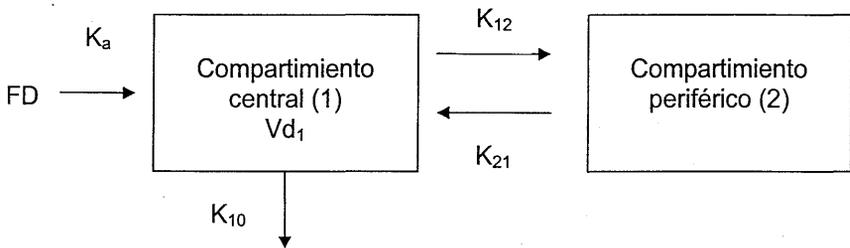


Figura 4. Representación esquemática del modelo abierto de dos compartimientos con administración por vía oral. FD es la fracción de dosis absorbida (Rodríguez y Cortés, 1996).

Como reportan Martin *et al.*, (1990) el ibuprofeno presenta una biodisponibilidad absoluta cercana al 100% tras la administración oral e intravenosa de la sal de lisina del ibuprofeno a voluntarios sanos.

En un estudio realizado en el que se llevó a cabo la administración de tabletas recubiertas de 200 mg de ibuprofeno y tabletas efervescentes del mismo fármaco

con la misma dosificación. En un estudio posterior en el cual se disolvieron tabletas de ibuprofeno en jugo de cereza, en refresco sabor cola o en jugo de naranja antes de ser administradas, se encontró una menor velocidad de absorción en los dos primeros casos en comparación con la solución de jugo de naranja, lo que indica que el factor limitante de la velocidad de absorción es la rapidez con que el ibuprofeno se disuelve en el tracto gastrointestinal, así como la proporción del fármaco ionizado presente en la solución, siendo que estos dos factores son dependientes del pH del entorno (Saano *et al*, 1992).

La absorción del fármaco es limitada también por la presencia de alimentos. Al revisar el efecto de una dieta vegetariana con un alto contenido calórico (3093 Kcal) en la biodisponibilidad del ibuprofeno administrado por vía oral en tabletas de liberación modificada en voluntarios sanos hindúes, se encontró que este tipo de dieta produce picos múltiples en los perfiles farmacocinéticos del ibuprofeno en plasma y, aunque el valor de C_p de uno de los picos máximos es mayor debido al efecto de los alimentos, no existe una diferencia significativa en los valores de ABC o t_{max} (Pargal *et al.*, 1996).

La distribución del ibuprofeno es explicada en humanos de manera general, mediante un modelo bicompartimental, con un bajo volumen de distribución -12 a 15 litros- (Evans, 1996).

En uno de los primeros estudios realizados para estudiar la unión del ibuprofeno a las proteínas plasmáticas, Whitlam *et al.* (1979) reportan porcentajes de fármaco unido a albúmina sérica humana y albúmina sérica bovina mayores al 99%, cuando se utiliza la técnica de diálisis al equilibrio y el experimento se realiza con la mezcla racémica del ibuprofeno, lo que explica su bajo volumen de distribución. Los autores mencionan que existe una fuerte dependencia entre el porcentaje de fármaco unido y la concentración de proteínas en el plasma, además de que la unión es dependiente de la temperatura y de que sustancias endógenas como el palmitato, la bilirrubina, el colesterol y el urato compiten por los sitios de unión con el ibuprofeno (Whitlam *et al*, 1979).

Más recientemente, en un estudio de la unión a proteínas del ibuprofeno *in vivo*, administrado a voluntarios sanos como mezcla racémica o como los isómeros S(+) y R(-) de manera separada, se corroboró que no existe un segundo sitio de unión para el ibuprofeno, y se concluye que el enlace a proteínas ocurre de manera mutuamente competitiva, enantioselectiva y no lineal, ya que: a) un estereoisómero desplaza al otro de los sitios de unión; b) la fracción no unida del S(+) ibuprofeno es mayor que la del R(-)-ibuprofeno ($S_{fu}=0.006\%$ vs. $R_{fu}=0.004\%$) y c) el desplazamiento de un enantiómero con respecto al otro en el enlace a proteínas ocurre de manera dosis dependiente (Paliwal *et al.*, 1993).

En cuanto a la eliminación del ibuprofeno, se lleva a cabo por diferentes vías metabólicas. El ibuprofeno se biotransforma principalmente en el hígado. Los enantiómeros tienen una ruta de biotransformación común y son metabolizados a hidroxibuprofeno, carboxibuprofeno o glucurónido del ibuprofeno. Entre el 50 y el 60% de una dosis de ibuprofeno administrado por vía oral aparece en la orina como metabolitos y menos de un 10% de manera inalterada; la cantidad restante, se elimina como glucurónido. En la Figura 5 se muestra la ruta de biotransformación del ibuprofeno (Wetcher, 1996; Kaiser *et al.*, 1976).

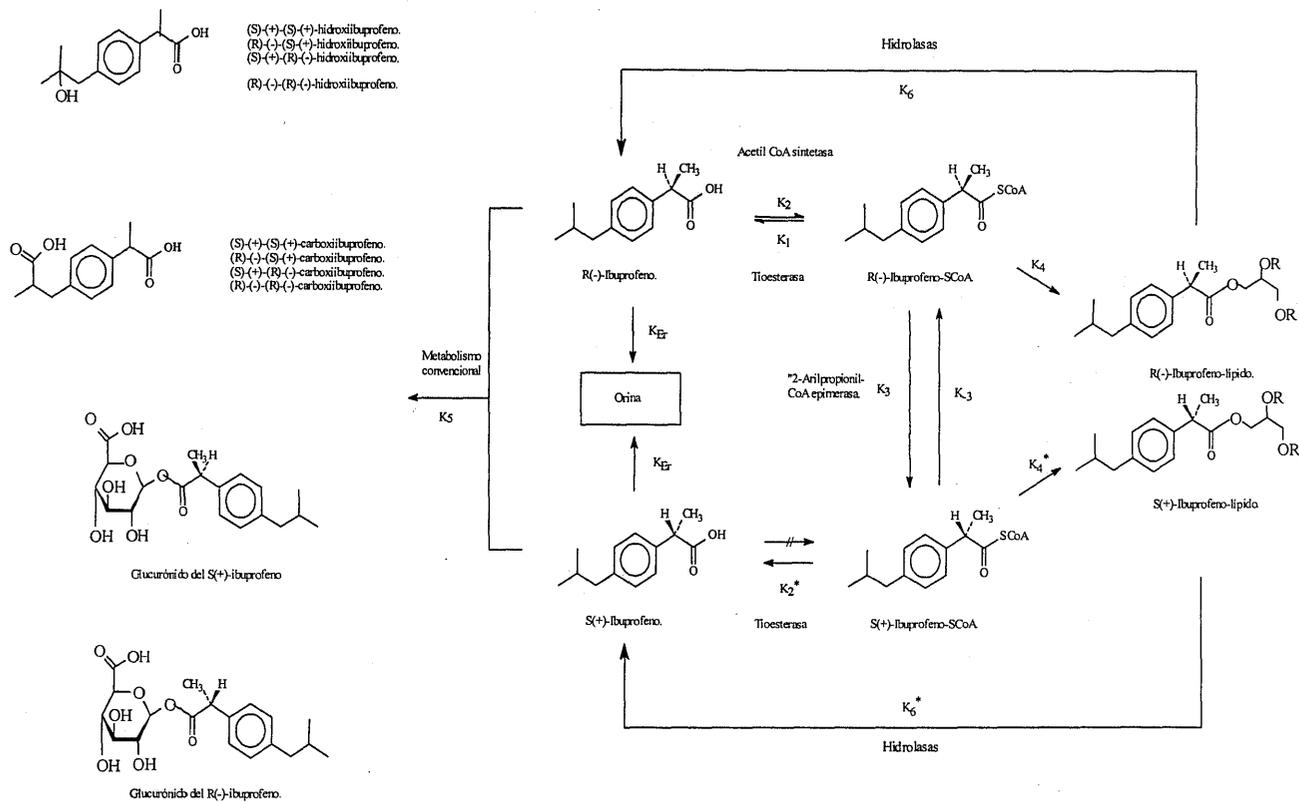


Figura 5. Biotransformación de los enantiómeros del ibuprofeno.

La glucuronidación del ibuprofeno se realiza tanto en el hígado, como en otros órganos en el ser humano, incluido el tracto gastrointestinal. En la rata se han encontrado pequeñas cantidades de ibuprofeno conjugado y no conjugado en bilis (Jamali *et al.*, 1992; Cox *et al.*, 1985).

La biotransformación enantioselectiva del ibuprofeno tiene repercusión en su farmacodinamia, farmacocinética y toxicología. La Acetil-CoA actúa en el isómero R(-) del ibuprofeno, lo que da como resultado la formación de tioéster del R(-)-ibuprofeno con la Acetil-CoA (esta reacción no sucede con el isómero S(+)). Después de la formación del tioéster, este se involucra en una serie de reacciones dentro de las cuales la más importante es la epimerización, dando lugar a la formación del S(+)-ibuprofeno-CoA. Posteriormente a la epimerización, tanto el R(-)-ibuprofeno-CoA como su epímero, entran en el metabolismo de lípidos. En ratas, se da una acumulación del éster del R(-)-ibuprofeno en el tejido adiposo desde donde se va liberando lentamente (Wetcher, 1996; Kaiser *et al.*, 1976).

También se ha observado que conforme avanza la edad de las ratas, existe un aumento de la fracción de fármaco libre, como una consecuencia de la disminución de la cantidad de albúmina en sangre, esto también se ha observado en humanos (Satterwhite y Boudinot, 1991; Albert *et al.*, 1984).

Existen estados patológicos en humanos que repercuten sobre su farmacocinética, como la insuficiencia renal, la cual provoca que los niveles de concentración plasmática del ibuprofeno se vean aumentados; en cuanto al daño hepático, aumenta aproximadamente un 20% el valor de la vida media de eliminación; sin embargo, en pacientes que padecen de artritis reumatoide no se ve alterada su farmacocinética al compararlos con voluntarios sanos (Chen y Chen, 1994; Juhl *et al.*, 1983; Albert y Gernaat, 1984).

Con respecto a pacientes pediátricos menores a los 2.5 años, se reporta que su depuración es menor, esto se debe a que presentan un valor mayor de volumen de distribución (Kauffman y Nelson, 1992).

En cuanto a las interacciones farmacológicas que repercuten en su farmacocinética, la administración de ibuprofeno junto con cimetidina, aumenta el ABC del ibuprofeno y disminuye su depuración. El probenecid afecta a los AINE'S

en general, ya que inhibe la secreción tubular. El ácido acetilsalicílico disminuye la concentración plasmática del ibuprofeno, debido a la competencia por los sitios de unión a proteínas (Evans, 1996; Ochs *et al.*, 1985; Albert y Gernaat, 1984).

2.2.4 Propiedades Toxicológicas

Los síntomas de intoxicación con ibuprofeno incluyen el vómito, diarrea, hematemesis, anorexia, depresión y azotemia, reflejo de dos síndromes de toxicidad: la ulceración gástrica y el daño renal agudo (Poortinga y Hungerford, 1998).

Evans (1996) reportó que algunos pacientes presentan hipersensibilidad al fármaco, a los que se les ha administrado por períodos de tiempo prolongado, debido a la formación de complejos de tioéster-albúmina que son inmunogénicos. En general se puede mencionar la capacidad ulcerogénica de los AINE'S, por la desnaturalización de las glicoproteínas de la mucosa y la formación de radicales libres (Shirwaikar *et al.*, 2003). El ibuprofeno provoca la formación de úlceras, debido a que es un fármaco ácido, así como por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Cuando se administra con otros analgésicos, como el acetaminofeno, se ha presentado un aumento de la ulcerogenicidad (Goodwin, 1984; Shanbhag *et al.*, 1992; Bhattacharya *et al.*, 1991).

Existe la posibilidad de que el ibuprofeno agrave el daño renal, así como el daño cardíaco, en pacientes que presentan estos cuadros, ya que el ibuprofeno inhibe la síntesis de las prostaglandinas vasodilatadoras (Kantor, 1984). Se han reportado aspectos toxicológicos del ibuprofeno al ser administrado con litio, metotrexato y anticoagulantes (Evans, 1996).

Khurana (2002), reporta cambios en la farmacocinética del centcroman al ser coadministrado con el ibuprofeno en ratas wistar, estos cambios se atribuyen a que los animales en que administró el ibuprofeno, incrementaron su motilidad gástrica 1.5 veces más que la velocidad basal, el incremento en la motilidad es responsable de acelerar el vaciado gástrico.

2.3 *Amphiterygium adstringens* (Julianaceae)

El Cuachalalate, perteneciente a la familia Julianiaceae, a la división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida, subclase Rosidae y al orden de las Sapindales, posee el nombre científico de *Amphiterygium adstringens*, es una planta de uso común en la República Mexicana. Su nombre proviene del Náhuatl kojchalalajtli, koj-kuautli-árbol; chalalajtli-chala-chichalaca-guajolote silvestre, también conocido como cuachalalate, cuachalalá, muaxalaxlitti en Morelos, volador en Puebla y chalalate o yalaquitu en Oaxaca; se localiza en varias partes del país, pero principalmente vegeta de Michoacán a Morelos, Puebla, Nayarit, Jalisco, Guerrero y Oaxaca (Linares, 1994; Martínez, 1979; González *et al.*, 2000).

2.3.1 Descripción

Es un árbol que alcanza hasta 10 metros y tiene corteza grisácea. Cuando la corteza se seca es de color ladrillo, de un grosor de 10 a 25 mm. Las hojas están agrupadas en las puntas de las ramas, compuestas de cinco hojuelas sésiles, aserradas, con dienteccillos redondeadas, casi todas abovadas y cuneadas de la base, sus flores pueden ser solitarias o estar en ramillete, éstas originan frutos alargados (Linares, 1994).

2.3.2 Importancia biológica

La corteza del cuachalalate es un remedio popularmente utilizado para el tratamiento de la úlcera péptica en la medicina tradicional mexicana. La decocción, preparada a partir de la corteza del cuachalalate demostró actividad antiulcerosa en un modelo experimental de úlcera duodenal inducida con indometacina e histamina, sin embargo, el extracto no modificó la secreción gástrica (Navarrete *et al.*, 1990).

Se ha comprobado la actividad antiulcerosa de los extractos acuosos de la corteza, la cual no se relaciona con el efecto antagonista de los receptores de la histamina. También se ha demostrado que varias fracciones del extracto metanólico de la corteza de esta planta tienen un efecto gastroprotector (Navarrete *et al.*, 1998)

Se emplea comúnmente para tratar cáncer de estómago, gastritis y lesiones cutáneas. También se emplea en infecciones o inflamación de ovarios y matriz. Como enjuague bucal contra la piorrea, endurece las encías. Como agente hipocolesterolemizante (Martínez, 1992; Navarrete *et al.*, 1982).

Dentro de las propiedades curativas también se ha encontrado que tiene actividad antiinflamatoria. También se le atribuyen propiedades cicatrizantes, antibióticas, así como ser útil para disolver cálculos renales y como antimalarico (Ortega, 1999; Olivera *et al.*, 1999; Mata *et al.*, 1993).

El extracto de Cuachalalate tiene la capacidad actuar como filtro solar (Quintanar *et al.*, 1994).

Existen algunas patentes registradas en Japón, en las cuales se reporta la invención de productos preparados con esta planta. Una de estas patentes se refiere a un tónico para el cabello, cuyo efecto principal es para detener y evitar la caída del cabello. En otra patente del Cuachalalate, se reporta la invención de una composición herbal, en la que se emplea el Cuachalalate en combinación con otra planta del género Equisetum, preparados en bolsas para té, útil para el tratamiento de las hemorroides (Shisheido, 1999; Tsuru *et al.*, 1993; Garza, 1999).

2.3.3 Composición Química

En los estudios fitoquímicos realizados en esta planta, principalmente en la corteza, se han identificado tres tipos de compuestos principales: ácido masticadienónico, ácido 3 α -hidroximasticadienónico (Figura 6) y ácido isomasticadienónico (Navarrete, 1982; Navarrete, 1986); se encontró que el ácido

masticadienoico (Figura 7) se encuentra en mayor proporción en el mes de Febrero, mientras que el ácido 3 α -hidroximasticadienónico en Noviembre, a este último se le atribuye la actividad antiinflamatoria (Olivera *et al.*, 1999).

Se ha reportado la identificación de varios triterpenos, ácidos alquilnacárdicos (ácido 6-(pentadecil)-salicílico, ácido 6-(heptadecil)-salicílico y ácido 6-(nonadecil)-salicílico) y fenoles de cadena larga (Figuras 8 y 9), (Mata *et al.*, 1991; Navarrete, 1986; Navarrete *et al.*, 1989).

Además contiene taninos, saponinas, ceras, resinas, azúcar, celulosa, ácido instipolinácico, ácido cuachalácico, ácido epi-oleanólico (Figura 10), β -sitosterol (Figura 11), ácido oleanólico (Figura 12), (Olivera *et al.*, 1999, Mata *et al.*, 1991, Navarrete *et al.*, 1989; Benítez, 1998).

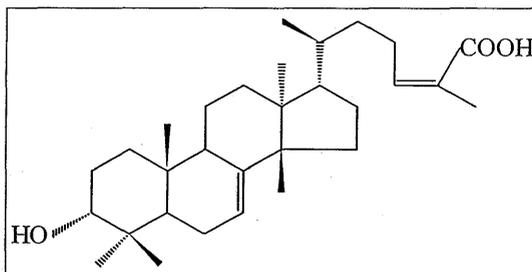


Figura 6. Ácido 3 α -hidroximasticadienónico

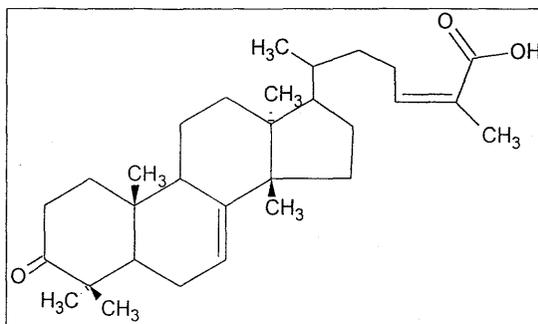


Figura 7. Ácido masticadienónico

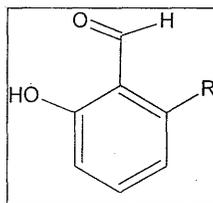


Figura 8. Aldehídos alquilfenólicos

R

-(CH₂)₁₇CH₃-(CH₂)₁₉CH₃-(CH₂)₂₁CH₃

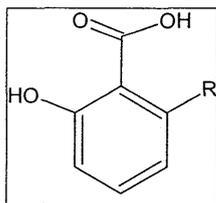
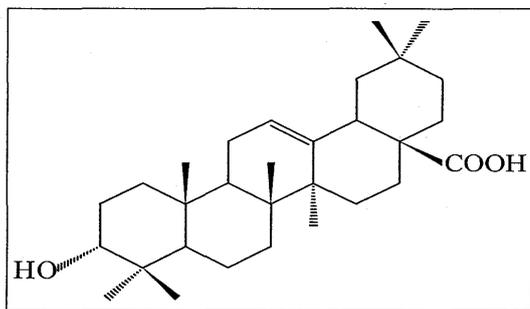


Figura 9. Ácidos alquilfenólicos

R

 $-(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ $-(\text{CH}_2)_{15}\text{CH}_3$ $-(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3$ Figura 10. Ácido 3-*epi*-oleanólico

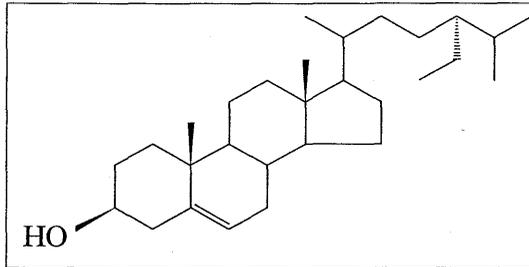
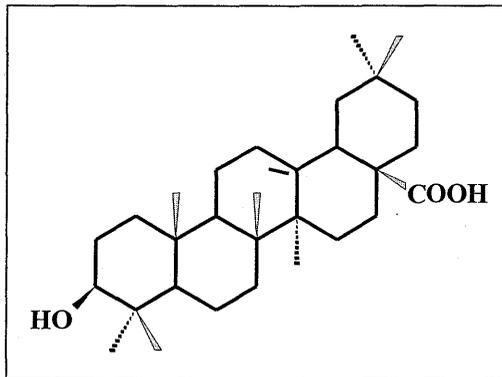
Figura 11. β -sitosterol

Figura 12. Ácido oleanólico

2.4 INTERACCIONES ENTRE PLANTAS Y FÁRMACOS

Los productos herbolarios son de amplio uso por la población general y por lo regular no se manifiesta su uso al médico (Piscitelli y Burstein, 2002). Se estima que en los países en vías de desarrollo, aproximadamente del 75 al 80 % de la población hace uso en alguna medida de las plantas medicinales con fines terapéuticos (Tempesta, 1980).

Con excepción de algunos productos herbolarios (como el jugo de toronja), la literatura frecuentemente menciona sólo la posibilidad de interacciones potenciales. Además, los productos herbolarios en muchas ocasiones, no provienen de extractos estandarizados, por lo que la pureza y la potencia son desconocidas; pueden contener múltiples ingredientes que varían de lote a lote, por mencionar sólo algunos problemas.

En algunos casos, en cuanto a las características de absorción, biotransformación, distribución y eliminación, así como sus efectos fisiológicos son poco estudiados, por lo que la información disponible hasta el momento acerca de las interacciones producto herbolario-fármaco puede resultar especulativa y no predecible adecuadamente en la clínica.

Por mencionar algunas de las interacciones reportadas, se puede citar a la hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*), en la cual se ha encontrado un inductor enzimático microsomal, que al ser usado en terapia concomitante con indinavil, amitriptilina y ciclosporina, causa una reducción en los niveles plasmáticos de estos fármacos (Piscitelli y Burstein, 2002).

Son muchos los ejemplos de terapias herbolarias, con componentes activos múltiples que causan potenciación o antagonismo con algunos fármacos. En el cuadro 3 se enlistan algunas de estas interacciones potenciales (Der Maderosian, 2002).

Cuadro 3. Interacciones potenciales entre plantas y fármacos

Planta	Fármaco o clase de Fármaco	Interacción potencial	Referencia
Aguacate	Warfarina	Disminuye el efecto anticoagulante de la warfarina.	Blickstein <i>et al.</i> , 1991.
Ajo	Saquinavir	Disminuye los niveles plasmáticos del saquinavir	Der Maderosian, 2002
Boldo	Warfarina	Aumenta el efecto anticoagulante de la warfarina, incrementa el riesgo de hemorragia.	Lambert, J., Cormier, A., 2001.
Brócoli	Warfarina	Antagoniza el efecto de la warfarina	Der Maderosian, 2002
Café	Clozapina	Eleva los niveles plasmáticos de la clozapina	Der Maderosian, 2002
	Teofilina	Eleva los niveles plasmáticos de teofilina, incrementa el riesgo de reacciones adversas	Sato <i>et al.</i> , 1993.
Ginkgo biloba	Ácido acetilsalicílico	Incrementa el tiempo de sangrado	Der Maderosian, 2002
	Trazodona	Incrementa la sedación	Der Maderosian, 2002

Cuadro 3. Interacciones potenciales entre plantas y fármacos
(Continuación)

Planta	Fármaco o clase de Fármaco	Interacción potencial	Referencia
Ginseng	Furosemida	Disminuye el efecto diurético de la furosemida	Der Maderosian, 2002
Hierba de San Juan	Inadivir, amitriptilina y ciclosporina	Disminución de los niveles plasmáticos.	Piscitelli y Bursntein, 2002.
	Digoxina	Disminuye los niveles plasmáticos.	Der Maderosian, 2002
	Midazolam	Disminuye los niveles plasmáticos. Disminuye el efecto farmacológico.	Der Maderosian, 2002
	Nifedipina	Disminuye los niveles plasmáticos. Disminuye el efecto farmacológico.	Der Maderosian, 2002
	Simvastatina	El efecto hipocolesterolemia de la simvastatina es reducido.	Der Maderosian, 2002
	Warfarina	Disminuye el efecto anticoagulante.	Der Maderosian, 2002

Cuadro 3. Interacciones potenciales entre plantas y fármacos
(Continuación)

Planta	Fármaco o clase de Fármaco	Interacción potencial	Referencia
Jugo de Toronja	Carbamazepina	Eleva los niveles plasmáticos de la carbamazepina	Der Maderosian, 2002
	Benzodiacepinas	Incrementa el efecto farmacológico	Der Maderosian, 2002
	Inhibidores de la reductasa HMG-CoA	Puede incrementar su tiempo de vida media de eliminación y su ABC. Incrementa el riesgo de rabdomiolisis.	Der Maderosian, 2002
Kava Kava	Alprazolam	Aumenta el riesgo de efectos adversos	Der Maderosian, 2002
Té verde	Warfarina	Antagoniza el efecto anticoagulante	Der Maderosian, 2002

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El ibuprofeno es efectivo para el tratamiento sintomático de la artritis juvenil, se utiliza por sus numerosas ventajas para pacientes pediátricos y geriátricos, pues se encuentra disponible en suspensiones líquidas; también es indicado en pacientes adultos para aliviar las molestias de la artritis reumatoide. Los tratamientos con Ibuprofeno se indican durante períodos prolongados, durante los cuales puede causar daño a la mucosa gastrointestinal por la disminución del nivel citoprotector de las prostaglandinas, estos se manifiestan por dispepsia, ulceración gastrointestinal y hemorragia gástrica. Se estima que del 20 al 40% de los pacientes con artritis reumatoide con tratamiento con AINE's padecen de úlcera gastrointestinal (Lichtenberg *et al.*, 2001).

Dentro de la medicina tradicional mexicana, el Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) se ha usado desde la antigüedad para el tratamiento de la dispepsia, la úlcera gástrica, y el cáncer de estómago, principalmente (Navarrete *et al.*, 1990; Mata *et al.*, 1993). Así, los pacientes con artritis reumatoide que reciben tratamiento con ibuprofeno u otro AINE, toman las decocciones de la corteza de cuachalalate para aliviar las molestias causadas por el analgésico.

Sin embargo, no existe algún reporte científico en el que se haya estudiado la administración conjunta del Ibuprofeno y el Cuachalalate, para evaluar la interacción farmacocinética y farmacodinámica.

En general, la literatura científica reporta numerosas interacciones potenciales entre remedios herbolarios o fitomedicamentos y fármacos, y muy poca información relacionada con estudios para la determinación de la seguridad y eficacia de los fármacos en la administración conjunta con una planta o un producto elaborado con ellos.

Debido a lo anterior, se consideró importante llevar a cabo los estudios correspondientes para evaluar la interacción farmacodinámica (analgésica y antiinflamatoria) y farmacocinética del Ibuprofeno en la administración conjunta con el extracto metanólico de *A. adstringens* en rata wistar a diferentes dosis en las que presenta efecto gastroprotector (Navarrete *et al.*, 1998).

4. HIPÓTESIS.

El *Amphipteryngium adstringens* que es un protector de la mucosa gastrointestinal; se espera que no modifique las propiedades antiinflamatorias, analgésicas y farmacocinéticas del ibuprofeno en rata wistar al ser administrado de manera conjunta con el ibuprofeno.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Evaluar la interacción del extracto metanólico de *Amphipteryngium adstringens* sobre las propiedades analgésicas, antiinflamatorias y farmacocinéticas del ibuprofeno al ser administrados conjuntamente por vía oral en rata wistar.

5.2 Objetivos específicos.

- I. Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para cuantificar al ibuprofeno en plasma, mediante la utilización del diseño experimental y la información obtenida en la determinación de las condiciones óptimas del método.
- II. Determinar el efecto del *A. adstringens* sobre las propiedades analgésicas y antiinflamatorias del ibuprofeno.
- III. Determinar el efecto del *A. adstringens* en la farmacocinética del ibuprofeno.

6. METODOLOGIA

Los reactivos empleados en los estudios se encuentran en el Anexo I.

6.1 Desarrollo y validación de un método bioanalítico para cuantificar ibuprofeno en plasma

6.1.1 Desarrollo de un método analítico para cuantificar ibuprofeno en plasma.

Todo el desarrollo analítico se realizó utilizando un sistema conformado por una bomba mod. 665-A11, una válvula de seis vías Rheodyne, un detector U.V. de longitud de onda variable modelo Spectroflow 783, un integrador marca Waters, modelo 712 WISP. Asimismo, se utilizó una columna Symmetry C18 de 3.5 mm (d.i.) x 150 mm, con un tamaño de partícula de 5 μ m.

- 1) Se realizaron corridas de una mezcla conteniendo ibuprofeno, diclofenaco, acetaminofeno, ketoprofeno y naproxeno utilizando una fase móvil binaria compuesta de metanol (Mallinckrodt UltimAR lote H453KPG) y solución amortiguadora de acetatos pH 3, para determinar el estándar interno a utilizar, las determinaciones se realizaron a 220 nm.
- 2) Se realizaron corridas de una mezcla conteniendo ibuprofeno y diclofenaco utilizando una fase móvil binaria compuesta de metanol (Mallinckrodt UltimAR lote H453KPG) y solución amortiguadora de acetatos pH 3¹, de acuerdo con un diseño experimental factorial fraccionado en el cual se variaron tanto el por

¹ Se preparó con 26.33 mg de acetato sódico trihidratado (JT Baker) y 2.0 mL de ácido acético glacial (JT Baker) en 500 mL de agua desionizada, ajustando el pH con HCl concentrado (JT Baker).

ciento de la solución amortiguadora como la velocidad de flujo de la misma considerando tres niveles para cada factor, además de la columna (columna 1: Symmetry C18 de 4.5 mm (d.i.) x 150 mm, con un tamaño de partícula de 5 μm , columna 2: Symmetry C18 de 3.5 mm (d.i.) x 75 mm, con un tamaño de partícula de 5 μm , columna 3: Symmetry C18 de 3.5 mm (d.i.) x 150 mm, con un tamaño de partícula de 5 μm) manteniendo constantes el pH del amortiguador de acetatos utilizado y su molaridad. En el Cuadro 4, se describen los factores que se manejaron en el estudio.

Cuadro 4. Diseño experimental utilizado para la optimización del método analítico

		Por ciento de solución amortiguadora de acetatos empleada en la fase móvil								
Velocidad de Flujo (mL/min)	15			25			35			
	Columna empleada									
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
0.8			XII	XIII	XV				VIII	
0.9	XIV	X				I, III, IV	VI	VII		
1.0			IX	XI	V				II	

El número romano indica la secuencia del experimento

- 3) Una vez obtenidos los datos y analizado el diseño experimental anterior, los resultados se analizaron mediante la prueba de análisis de varianza.

6.1.2 Validación del método por CLAR para cuantificar ibuprofeno en plasma de rata.

1) Validación cruzada. Consistió en asegurar la especificidad y exactitud del método en la matriz de interés, y analizando por triplicado las muestras preparadas tanto en plasma de cerdo como en plasma de rata, en las concentraciones de 3, 10, 25 $\mu\text{g/mL}$, preparadas como se indica en el Cuadro 5. Para considerar validado el método en plasma de rata, no debían existir diferencias significativas en las respuestas entre ambas poblaciones, y el %CV de las respuestas en la solución no debía ser mayor al 15% en todos los niveles

2) Preparación de soluciones patrón: se pesaron 100 mg de ibuprofeno y se llevaron a un volumen de 100 mL con metanol (Mallinckrodt UltimAR lote H488KPCP) a ésta, se le denomina solución patrón A. De esta solución, se tomó 1 mL y se llevó a 10 mL con metanol (solución patrón B).

3) Preparación del estándar interno: se pesaron 50 mg de diclofenaco (Helm de México) y se llevaron a un volumen de 100 mL con solución de ácido acético (HOAc) al 1% en metanol. De esa solución, se tomaron 5 mL y se aforaron a 50 mL con la solución de HOAc al 1% en metanol. A ésta, se le denomina solución de estándar interno.

4) Método analítico. El método analítico utilizado fue el desarrollado para la cuantificación de ibuprofeno en el diseño de experimentos, y consistió en tomar 100 μL de la solución de muestra en plasma y adicionar 250 μL de estándar interno, todo en un tubo de ultracentrífuga de polipropileno. Se centrifugó la muestra a 5000 rpm durante 10 min. Se tomó el sobrenadante y se depositó en un vial con capacidad de 2000 μL . Se inyectaron 20 μL de este sobrenadante al cromatógrafo. El análisis se realizó utilizando un método que consistía en una fase móvil de metanol: acetatos pH: 3 (75:25). La velocidad de flujo fue de 1 ml/min.

5) **Linealidad del método y límites de detección y cuantificación.** Se prepararon en plasma diluciones de las soluciones patrón (en dos días diferentes, por triplicado cada día), siguiendo el esquema ilustrado en el Cuadro 5:

Cuadro 5. Esquema para la validación del método bioanalítico para cuantificar ibuprofeno en plasma de cerdo.

Solución	Solución de partida	Volumen de solución de partida (mL)	Aforo (mL)	Nivel de la curva ($\mu\text{g/mL}$)
1	2	5	10	1.000
2	4	5	10	2.000
3	6	3	10	3.000*
4	8	1	10	4.000
5	9	5	10	5.000
6	9	1	10	10.00*
7	Solución patrón B	2.5	10	25.00*
8	Solución patrón B	4	10	40.00
9	Solución patrón B	0	0	100.0*

Ver paso 5.

Los primeros 5 niveles sirvieron para los datos de límite de detección (determinar a qué nivel la señal es más intensa que 2 veces el ruido de la línea base) y de cuantificación (determinar cuál es el nivel de la curva más bajo donde se cumple con los parámetros de respuesta lineal, exactitud y precisión). Todos los niveles se utilizaron para determinar la linealidad del método, debiendo cumplir parámetros

de $r^2 > 0.98$, intercepto no estadísticamente diferente de cero, pendiente estadísticamente diferente de cero, para la relación concentración vs. respuesta (siendo la variable de respuesta la relación de ABC analito/estándar interno o la relación de altura de los picos analito/estándar interno).

6) Muestras control. De los niveles marcados con (*) en la tabla anterior, se prepararon 40 muestras, separadamente de las muestras a analizar el primer día (de la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ se prepararon sólo 30). Se guardaron 20 de las muestras a -20°C en tubos de ultracentrífuga de polipropileno. Se analizaron 3 muestras de cada uno de los niveles de estas muestras por día de validación, con la finalidad de determinar la estabilidad de la muestra en estas condiciones. Para el primer día, se analizaron 3 muestras del nivel de 25 $\mu\text{g/mL}$ antes de la corrida de cada curva y al finalizar la última curva, y se determinó el tiempo en que eran estables. Se cumplía con los parámetros de estabilidad si el por ciento de coeficiente de variación (%CV) inter e intralote no era mayor al 15% (o al 20% para la muestra de control de calidad al nivel más bajo). De manera similar, se analizaron las muestras almacenadas después de 8 días de congelación a -20°C .

7) Especificidad y selectividad del método. Para determinar estos parámetros, se analizaron blancos de una mezcla de plasma de cerdo (obtenido a partir de 5 animales), y se verificó que no existían picos que interfirieran con las señales de interés.

8) Exactitud del método. Se determinó a partir de las curvas de cantidad recuperada (relación altura del analito/altura del estándar interno a partir de plasma) vs. cantidad adicionada (relación altura del analito/altura del estándar interno a partir de agua).

9) Precisión (repetibilidad en dos días diferentes por un mismo analista, y de un analista en el mismo día). Se determinó mediante el análisis estadístico de cada nivel de la relación concentración-respuesta para cada curva en cada día y entre los diferentes días.

6.2 Modelo de inflamación inducida por carragenina en ratas para la evaluación del efecto antiinflamatorio y analgésico.

Animales de Laboratorio: para evaluar la actividad antiinflamatoria, analgésica y farmacocinética se utilizaron ratas Wistar macho de 180 a 220 g de peso corporal de 60 días de edad provenientes de la compañía Harlan México.

Para la determinación del efecto antiinflamatorio del ibuprofeno coadministrado con el extracto de *A. adstringens*, se administró el ibuprofeno (100 mg/Kg, por vía oral) y 3 minutos después el extracto metanólico de *A. adstringens* a las dosis de 10, 30, 100 y 300 mg/Kg (el extracto se suspendió en agua destilada utilizando como agente suspensor Tween 80 al 0.05%) y 30 minutos después se aplicó 0.1 ml de una suspensión de carragenina al 3% en el cojinete plantar de las patas de la rata con una jeringa con aguja del número 27, se manejó un grupo control al cual se le administró el vehículo (el control de vehículo se preparó con agua destilada y Tween 80 al 0.05%) (Winter *et al.*, 1962; Van Arman *et al.*, 1965).

Para las mediciones se utilizó un polígrafo modelo MP 100 Manager de la Compañía BIOPAC System INC. Las determinaciones se realizaron con un transductor de presión modelo TD 104 de la compañía BIOPAC System Inc y una cápsula de vidrio para mercurio. Se utilizó el software AcqKnowledge versión 3.5 de la compañía BIOPAC System Inc. Las mediciones se realizaron en los tiempos de cero, una, dos, tres, cuatro y cinco horas.

6.2.1 Determinación de la actividad antiinflamatoria del Ibuprofeno con extracto metanólico de *A. adstringens*.

Las ratas se pusieron en ayuno, 24 horas antes de realizar el estudio. Durante el experimento, no se les proporcionó agua ni alimento. Los animales se pesaron y marcaron con tinta indeleble en el codo de la pata trasera, tanto derecha como izquierda (esta marca se empleó como referencia para introducir la pata al mercurio y para asegurar la reproducibilidad en las determinaciones). En cada sesión se realizó la calibración del polígrafo de 10 a 50 mm Hg con objetos de volumen conocido, antes de comenzar el experimento, seguido de la toma del volumen basal de la extremidad al tiempo cero, la conversión de los mm Hg obtenidos se interpolaron por regresión lineal para transformar a unidades de volumen expresados en mL.

Se administró por vía oral, tanto las dosis de extracto como el ibuprofeno (dosis mencionadas en 6.2), transcurridos 30 minutos se administró a la pata derecha una inyección de carragenina (fracción λ , tipo IV) al 3% p/v disuelta en solución salina fisiológica. En la pata izquierda sólo se administró 0.1 mL de solución salina fisiológica misma que sirvió como referencia de la misma rata.

La metodología empleada en esta técnica se resume en el Esquema 1.

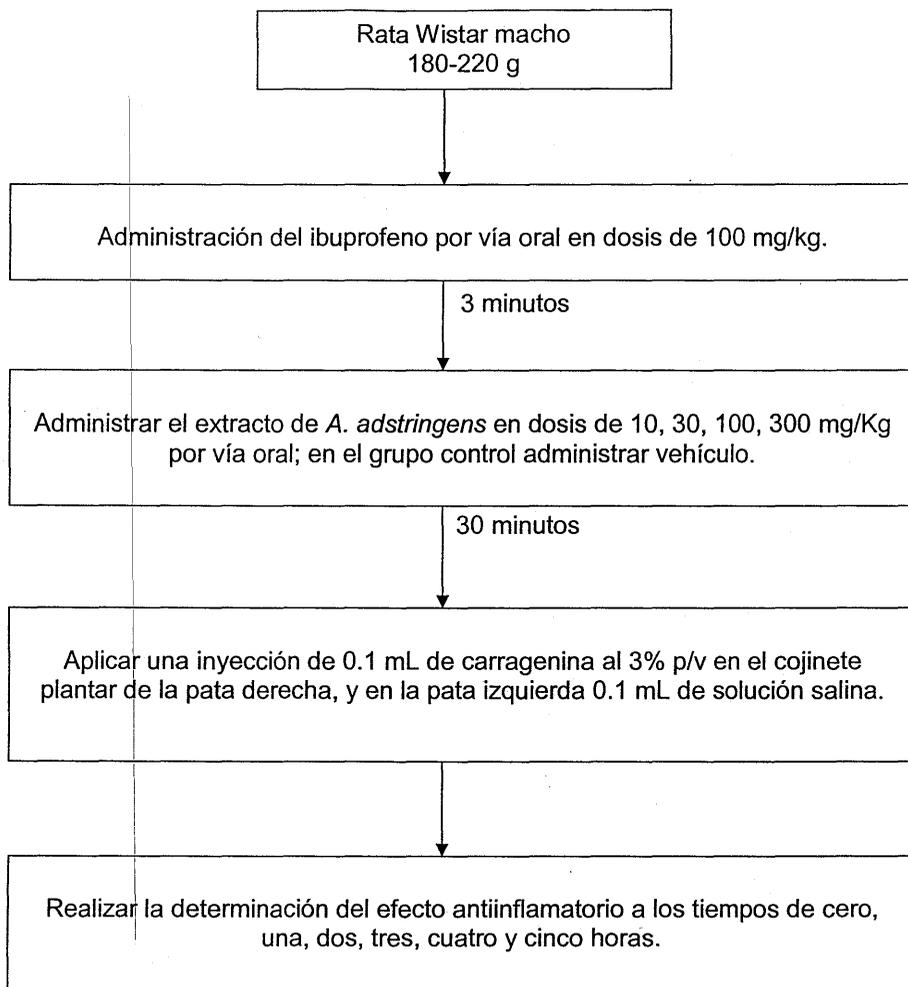
Con los resultados obtenidos se calculó el incremento de volumen (ΔV) en donde:

$$(\Delta V) = V_f - V_i$$

V_f = Volumen final de la extremidad inflamada

V_i = Volumen inicial de la extremidad inflamada.

Los resultados se analizaron estadísticamente por un análisis de varianza de un factor, seguida de la comparación de medias por medio de la prueba de t de Dunnett. Se consideraron diferencias significativas para una $p < 0.05$.



Esquema 1. Determinación de la actividad antiinflamatoria.

6.2.2 Determinación de la actividad analgésica del Ibuprofeno con extracto metanólico de *A. adstringens* por el método de Randall y Selitto.

La evaluación del efecto analgésico se realizó de forma simultánea con el efecto antiinflamatorio.

Se empleó un analgesiómetro Ugo Basile, (tipo 54898, Biological Research Apparatus, Safety Class 1, Comerio-varese Italy), basado en la técnica de Randall y Selitto (1957). Este método mide la actividad analgésica, basado en el principio de que la inflamación aumenta la sensibilidad al dolor y este incremento es susceptible a modificación por el uso de analgésicos (Randall y Selitto, 1957).

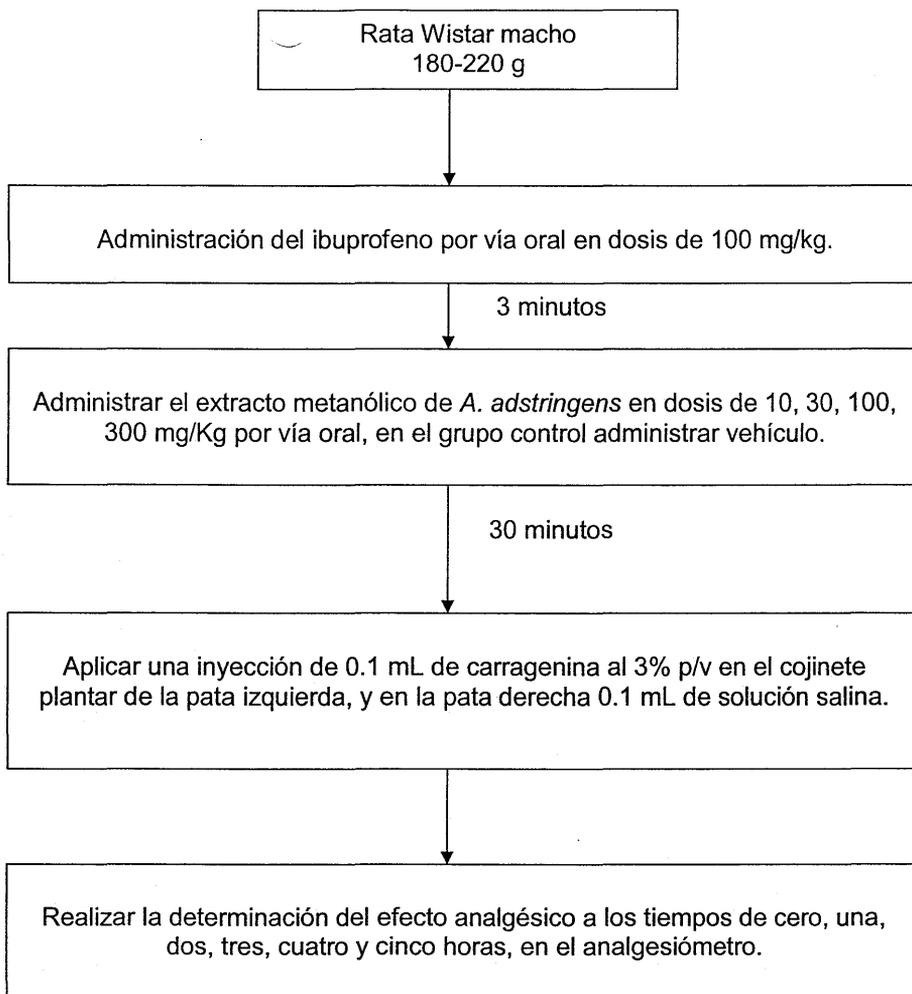
En este estudio el edema fue producido por la carragenina como se describió anteriormente (6.2.1).

El umbral del dolor fue medido por la variación de la presión que soporta el animal en la pata en la que se administró carragenina al 3% p/v, sobre ella se coloca un cono con punta roma de 0.64 cm, se inició la medición de la presión, y se registra el valor en el cual el animal hace el intento por retirar la pata o bien se movió. El valor registrado se multiplica por 30 para obtener los gramos fuerza que se han utilizado, esta medición se hizo a las cero, una, dos, tres, cuatro y cinco horas en los grupos que recibieron los tratamientos mencionados en 6.2.

Los resultados en gramos fuerza vs. tiempo y ABC, se compararon entre los grupos para determinar si existió alguna diferencia con respecto al grupo control; $p < 0.05$.

La metodología empleada en esta técnica se resume en el Esquema 2.

Este estudio se realizó de acuerdo a los estándares éticos para la investigación experimental de dolor en animales del comité de investigación y temas éticos de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, 1980; IASP, 1983), ver anexo II.



Esquema 2. Determinación de la actividad analgésica.

6.3 Determinación de la interacción farmacocinética del Ibuprofeno con extracto metanólico de *A. adstringens*.

Las ratas se colocaron en ayuno 24 horas antes de la administración del tratamiento, se marcaron en la cola y se pesaron. Posteriormente se les anestesió con éter etílico, para proceder con la canulación de la arteria caudal. Se utilizó una cánula de 5 cm de PE-10 unida a 10 cm de cánula PE-50, la cánula se llenó previamente con heparina (la concentración empleada de heparina fue 1mg/mL, 10000 unidades, preparada en solución salina isotónica).

Una vez que las ratas perdían el efecto anestésico, se administró por vía oral el tratamiento asignado:

Grupo I: Ibuprofeno en dosis de 100 mg/Kg.

Grupo II: Ibuprofeno en dosis de 100 mg/Kg y extracto metanólico de *A. adstringens* en dosis de 10 mg/Kg.

Grupo III: Ibuprofeno en dosis de 100 mg/Kg y extracto metanólico de *A. adstringens* en dosis de 30 mg/Kg.

Grupo IV: Ibuprofeno en dosis de 100 mg/Kg y extracto metanólico de *A. adstringens* en dosis de 100 mg/Kg.

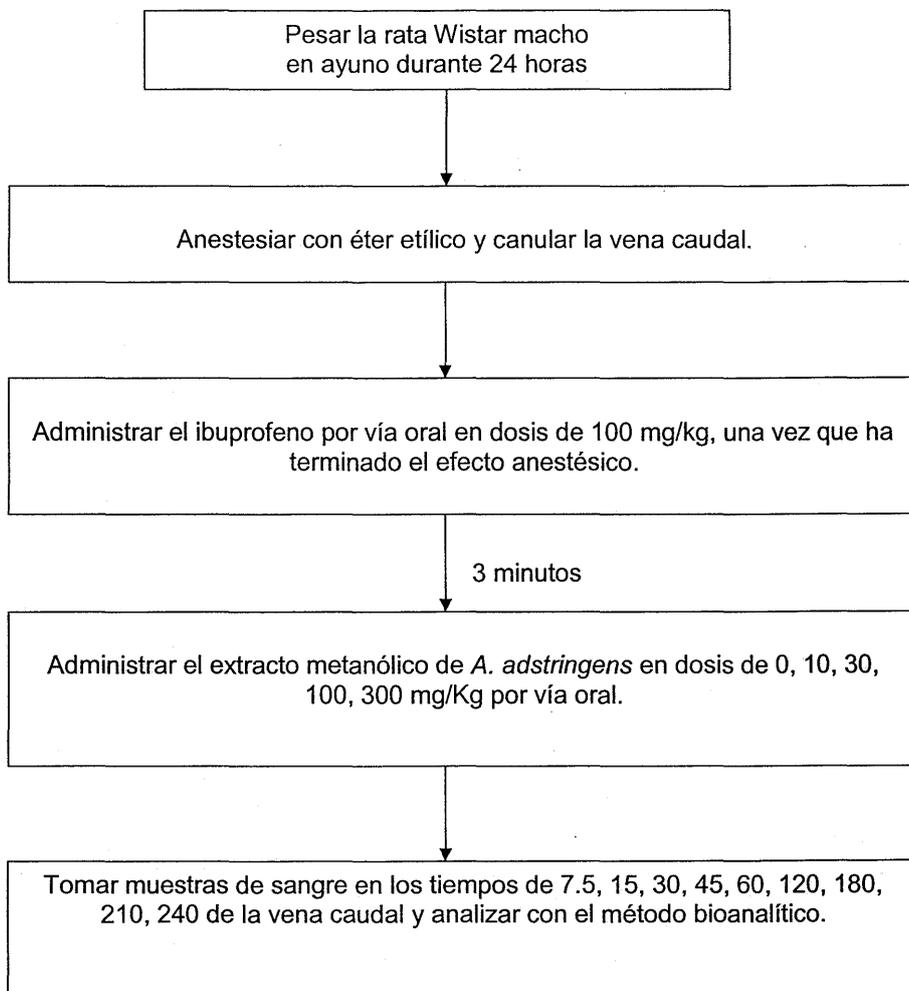
Grupo V: Ibuprofeno en dosis de 100 mg/Kg y extracto metanólico de *A. adstringens* en dosis de 300 mg/Kg.

El extracto se administró transcurridos tres minutos después de la administración del ibuprofeno. Los periodos de muestreos se realizaron a los 0, 7.5, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 210 y 240 minutos, estos fueron definidos después de realizar un estudio preliminar. Las muestras se recolectaron en tubos cónicos de 1.5 mL que contenía 50 μ L de anticoagulante. Una vez recolectadas las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 minutos. Se separó el plasma añadiendo la fase de extracción (indicado en el método bioanalítico). Se homogenizó el plasma y la fase de extracción, se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 5000 rpm.

Se retiró el sobrenadante y se realizó el análisis con el método bioanalítico previamente validado (Esquema 3).

Se obtuvieron las concentraciones plasmáticas a cada tiempo y se calculó el área bajo la curva (ABC) por el método de los trapecios; la concentración plasmática máxima (C_{max}) y el tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima (T_{max}) se obtuvieron directamente de los datos experimentales. Con los datos de C_{max} y $ABC_{0-240 \text{ minutos}}$, se obtuvo la relación de C_{max}/ABC que nos permite determinar la velocidad de absorción (Steinijans y Diletti, 1983).

La comparación entre las poblaciones se realizó por medio de una tabla de análisis de varianza.



Esquema 3. Evaluación de la interacción farmacocinética.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

7.1 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO BIOANALÍTICO PARA CUANTIFICAR IBUPROFENO EN PLASMA.

Para la elección del estándar interno se realizó la evaluación con acetaminofeno, naproxeno, diclofenaco. Como se puede observar en la Figura 13, el diclofenaco se eligió como la mejor opción por ser el fármaco con menor diferencia en el tiempo de retención con respecto al ibuprofeno, manteniendo una buena resolución ($R_s > 2.5$).

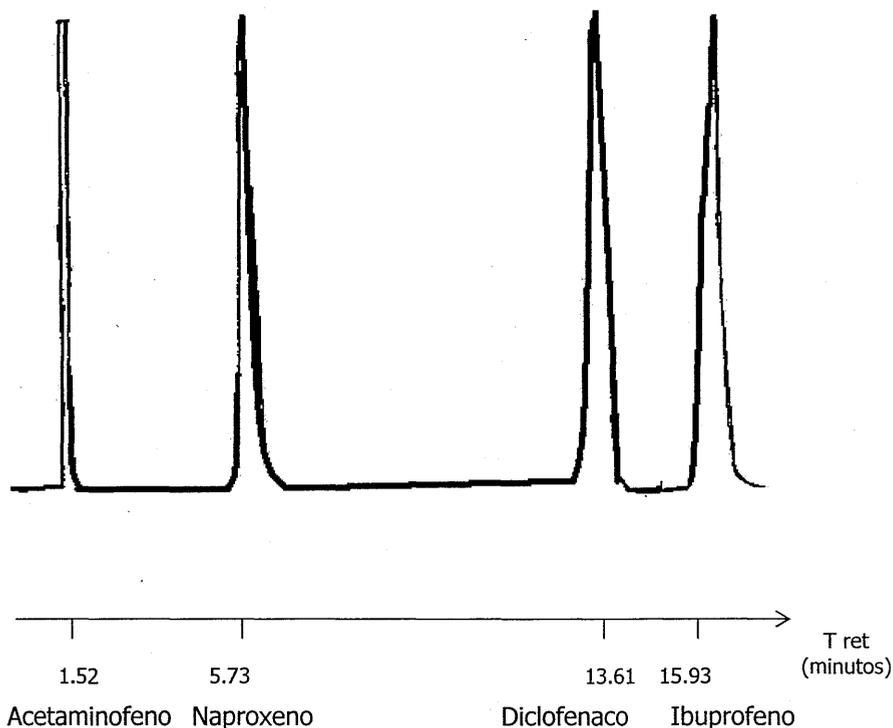


Figura 13. Cromatograma para la elección de estándar interno para el método analítico

7.1.1 Desarrollo y optimización del método analítico por el diseño de Box-Behnken

Se realizó el desarrollo de un método bioanalítico que permitiera cuantificar ibuprofeno en plasma de rata mediante el uso de un diseño de Box-Behnken (Montgomery, 1991) y el análisis inmediato de la información que brindaba cada uno de los experimentos. Se consideraron como variables de respuesta críticas el tiempo de retención (el cuál se considero que fuera menor de 10 minutos) y la resolución del pico del ibuprofeno con respecto del estándar interno, diclofenaco, debido a que estos resultados repercuten en la precisión de los resultados, la minimización de tiempos y la optimización de recursos. Los datos que se obtuvieron del estudio para la optimización del método se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Datos obtenidos de los experimentos para optimizar el método analítico.

Experimento	Tiempo de retención de Ibuprofeno (minutos)	Resolución (minutos)
I	6.22	0.7
II	8.48	8.22
III	6.22	0.7
IV	6.23	0.7
V	6.16	0.9
VI	8.14	9.15
VII	7.26	0.8
VIII	8.46	8.13
IX	3.66	0.6
X	5.05	0.6
XI	5.52	2.5
XII	3.9	0.5
XIII	5.15	1.5
XIV	5.18	1.3
XV	6.41	1

En el Cuadro 7. se muestran los resultados del diseño de experimentos de donde se obtuvieron las condiciones óptimas para el método analítico.

Cuadro 7. Resultados obtenidos del diseño de experimentos para optimizar el método analítico.

Optimización de Respuesta			
Máxima Resolución			
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Flujo	0.8	1	0.9999998
Polaridad	15	35	25
Columna	1	2	3
Minimizar Tiempo de retención			
Factor	Bajo	Alto	Óptimo
Flujo	0.8	1	0.9999998
Polaridad	15	35	25
Columna	1	2	3

De acuerdo con estos datos a fin de tener una buena resolución se deben considerar los valores obtenidos de flujo, polaridad y tipo de columna óptimos con las siguientes condiciones: columna Symmetry C18 de 3.5 mm (d.i.) x 150 mm, con un tamaño de partícula de 5 μ m, fase móvil 75:25 metanol:amortiguador de acetatos (pH 3), velocidad de flujo de 1 mL/minuto.

7.1.2 Validación del método bioanalítico

El método bioanalítico para cuantificar ibuprofeno en plasma de rata se validó de acuerdo con los criterios establecidos en las guías de validación de FDA (FDA, 1994; FDA, 1999).

7.1.2.1 Validación del sistema

Los resultados de validación del sistema se muestran en el gráfico 1. La ecuación que define la curva y los valores de coeficientes de correlación se detallan en el Cuadro 8. En el Cuadro 9 se muestran los resultados de la precisión del sistema.

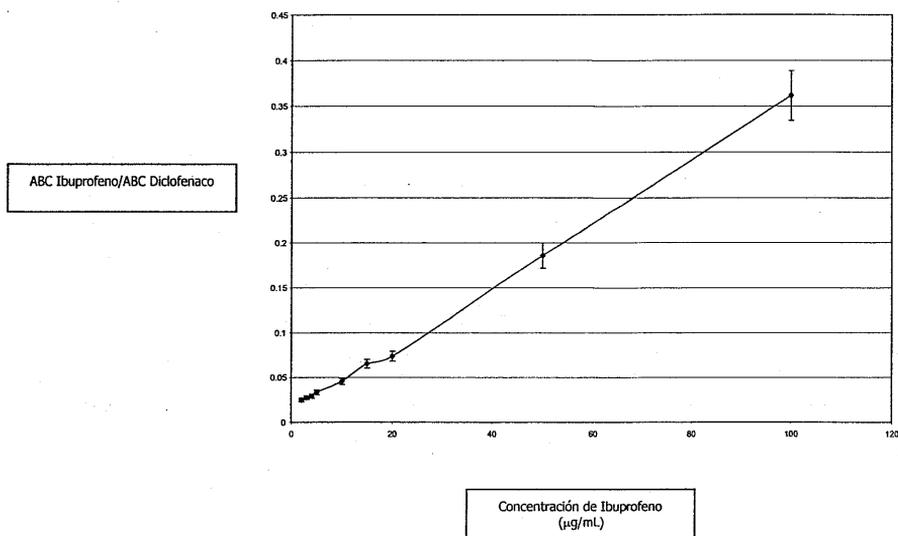


Gráfico 1. Validación del sistema analítico. Linealidad para el ibuprofeno. Cada punto representa la media \pm EEM de 6 repeticiones.

Cuadro 8. Linealidad del sistema para la cuantificación de ibuprofeno.

Datos que describen la curva para linealidad del sistema	
r ²	0.99489563 ± 0.0036714
Pendiente	0.014832240±0.0000241534
Intercepto	0.00335592 ± 0.00109271

Cada valor representa la media ± EEM de 6 repeticiones.

Cuadro 9. Resultados de la determinación de precisión del sistema
(en el nivel de 20 µg/mL):

Parámetro	n	Promedio	D.E.	C.V. %
RABC*	13	1.80	0.01	0.47
Tr (minutos)	13	5.36	0.02	0.35

*RABC: ABC Ibuprofeno/ ABC Diclofenaco

Se puede observar que el sistema es lineal en un intervalo de 1 a 100 $\mu\text{g/mL}$ ya que el coeficiente de determinación fue mayor de 0.98, la pendiente fue significativamente diferente de cero, ya que el valor del estadígrafo T es de 168.66 con lo que la hipótesis nula $H_0=\mu=0$ se rechaza. También es preciso en el nivel de 20 $\mu\text{g/mL}$, ya que el coeficiente de variación fue menor al 2%.

7.1.2.2 Validación del método

El método analítico fue selectivo, de acuerdo con la Figura 14, ya que las sustancias endógenas del plasma y otros posibles contaminantes fueron resueltos de las señales del ibuprofeno.

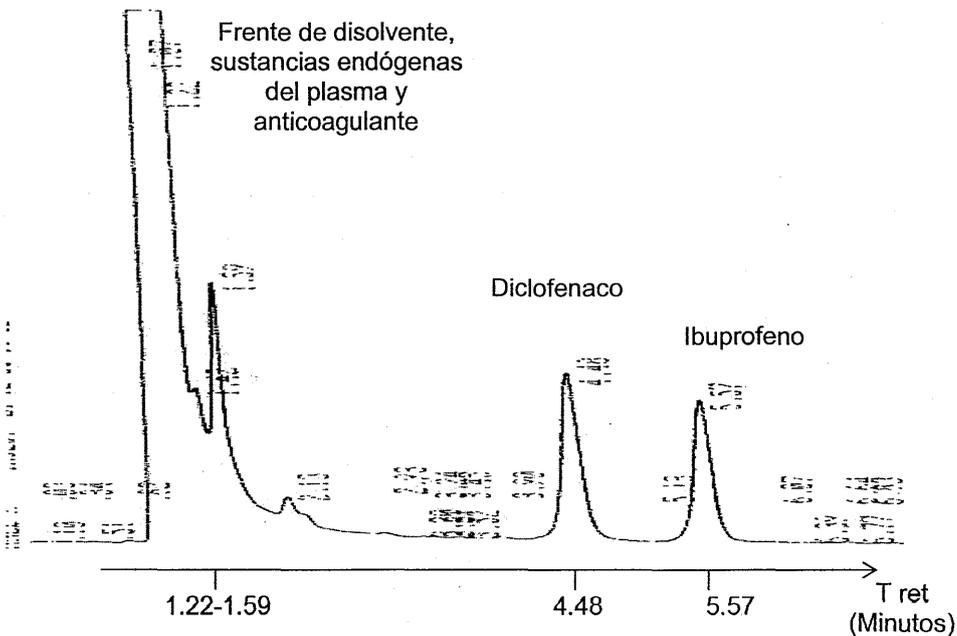


Figura 14. Cromatograma para comprobar la selectividad del método bioanalítico

Los resultados para la exactitud del método se encuentran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Resultados de la determinación de exactitud del método.

Día	Curva	Niveles ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio de % de recobro	D.E.	C.V. %
1	1	2-100	99.7405192	0.00454104	4.41147649
1	2	2-100	99.700318	0.00462105	4.39168762
1	3	2-100	99.809642	0.00455102	4.40987516
2	1	2-100	94.490904	0.00414352	4.36978761
2	2	2-100	97.589843	0.00426897	4.35879716
2	3	2-100	97.258312	0.00419845	4.36123791

El método fue exacto en el intervalo de concentraciones de 2 a 100 $\mu\text{g/mL}$, ya que los valores de recobro, en todos los niveles fueron entre el 94 y el 99 %; el coeficiente de variación menor al 5%. A partir de estos datos se demostró que el método es repetible en todos los niveles de concentración estudiados.

Cuadro 11. Resultados de la determinación de precisión del método.

Día 1			
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio RABC	D.E.	C.V. %
2	0.0172242	0.004561039	10.2483271
3	0.0224374	0.00784765	3.42833969
4	0.0303856	0.00407621	13.5542304
5	0.0384457	0.001271786	3.439381
10	0.0490131	0.010282262	16.8886726
25	0.1108904	0.0455208	4.17951335
40	0.1439847	0.001427639	1.00300492
100	0.4565509	0.01303727	2.90811839

Día 2			
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio RABC	D.E.	C.V. %
2	0.0140179	0.00143235	10.5819015
3	0.0224374	0.00021924	0.91848225
4	0.0339845	0.00248291	7.71450209
5	0.0362429	0.00126958	3.437681
10	0.0670632	0.00085388	1.32425315
25	0.1121441	0.00292606	2.27865114
40	0.1415119	0.001397635	1.01320492
100	0.4400611	0.008726532	1.95375073

Cuadro 11. Resultados de la determinación de precisión del método.
(Continuación)

Comparación entre días								
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	2	3	4	5	10	25	40	100
Valor de P para $\mu_1=\mu_2$	0.770	0.500	0.374	0.374	0.160	0.374	0.512	0.163

El método es preciso en el intervalo de 2 a 100 $\mu\text{g/mL}$, Cuadro 11, ya que el coeficiente de variación intradías en todos los niveles es menor al 17%. Además, el método es repetible por un mismo analista en dos días diferentes.

A partir de los resultados de linealidad, exactitud y precisión del método analítico, el límite de cuantificación fue de 2 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el límite de detección fue de 1 $\mu\text{g/mL}$.

7.1.2.3 Validación cruzada

En los cuadros 12 y 13 se muestran los datos obtenidos de la validación cruzada.

Cuadro 12. Resultados de la precisión del método para la validación cruzada.

Ibuprofeno en plasma 1			
Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	RABC	D.E.	C.V.
3	0.0239701	0.00021924	0.91848225
10	0.0644798	0.00136756	2.12090619
25	0.1274074	0.0207164	1.6259721
Ibuprofeno en plasma 2			
3	0.0228905	0.00019476	0.92833969
10	0.0608826	0.00102822	1.68886726
25	0.1423362	0.00142764	1.00300492

Se comprobó que no existe diferencia significativa en las poblaciones de acuerdo con valor de $p = 0.667$ ($H_0: \mu_a = \mu_b$)

Cuadro 13. Resultados de la validación cruzada.

Tipo de Plasma	Plasma de Rata	Plasma Porcino
RABC	0.1274 ± 0.00207	0.1423 ± 0.00142

7.2 ESTUDIO DEL EFECTO DE *A. adstringens* EN LAS PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS, ANALGÉSICAS Y FARMACOCINÉTICAS DEL IBUPROFENO.

7.2.1 Evaluación del efecto antiinflamatorio

Se realizó la evaluación del efecto antiinflamatorio del ibuprofeno en presencia y ausencia del extracto metanólico de *A. adstringens*. Se describe el curso del edema inducido con carragenina, mediante el incremento de volumen (ΔV) para los grupos tratados con las diferentes dosis de extracto y la dosis de fármaco, así como de un grupo control el cual recibió los vehículos.

Para los tratamientos de *A. adstringens* con Ibuprofeno se observa una disminución del efecto antiinflamatorio.

En el gráfico 2, se reporta el porcentaje de inhibición del edema inducido por carragenina hasta las 5 horas, se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) a las dosis de 30, 100 y 300 mg/Kg de extracto metanólico de *A. adstringens* administrado de forma conjunta con el ibuprofeno con respecto al ibuprofeno solo

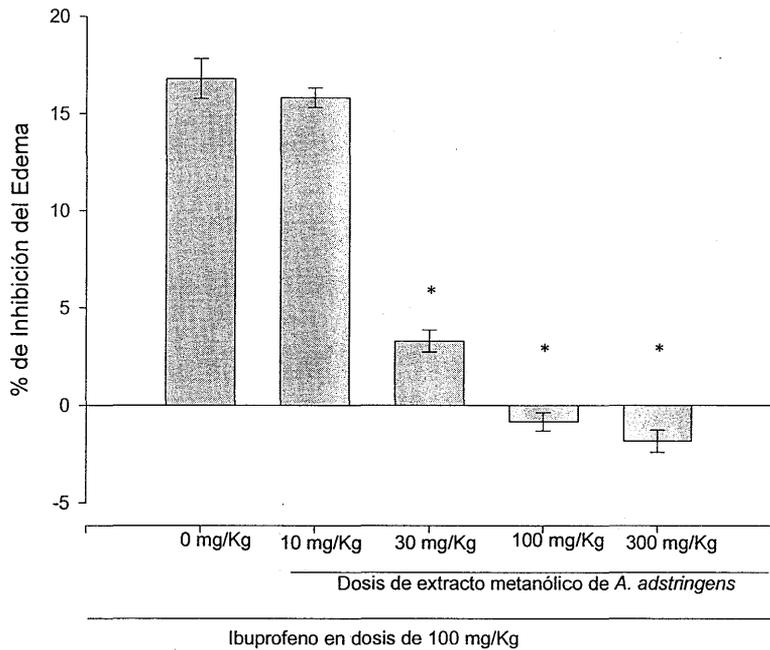


Gráfico 2. Porcentaje de Inhibición (dosis-efecto) del edema inducido con carragenina a las 5 horas, comparación para los diferentes tratamientos. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales.* $p < 0.05$ respecto al ibuprofeno.

La actividad antiinflamatoria del ibuprofeno solo es mayor que la actividad que se observa cuando se administra de manera conjunta al extracto metanólico de *A. adstringens*, el efecto se ve significativamente disminuido a dosis mayores de 30 mg/Kg de extracto, incluso en las dosis de 100 y 300 mg/Kg de extracto se observa una actividad proinflamatoria. Para la inhibición del edema causado por carragenina en los tratamientos con ibuprofeno solo y con la dosis de 10 mg/Kg de extracto metanólico administrado conjuntamente no hay diferencia significativa.

7.2.2 Evaluación del efecto analgésico

En el gráfico 3, se presentan los datos de analgesia (Curva de gramos fuerza vs. tiempo). El efecto analgésico del ibuprofeno es disminuido por la administración conjunta con el extracto de *A. adstringens* a las dosis de 30, 100 y 300 mg/Kg; sin embargo a la dosis de 10 mg/kg del extracto la disminución del efecto analgésico del fármaco no es estadísticamente significativa.

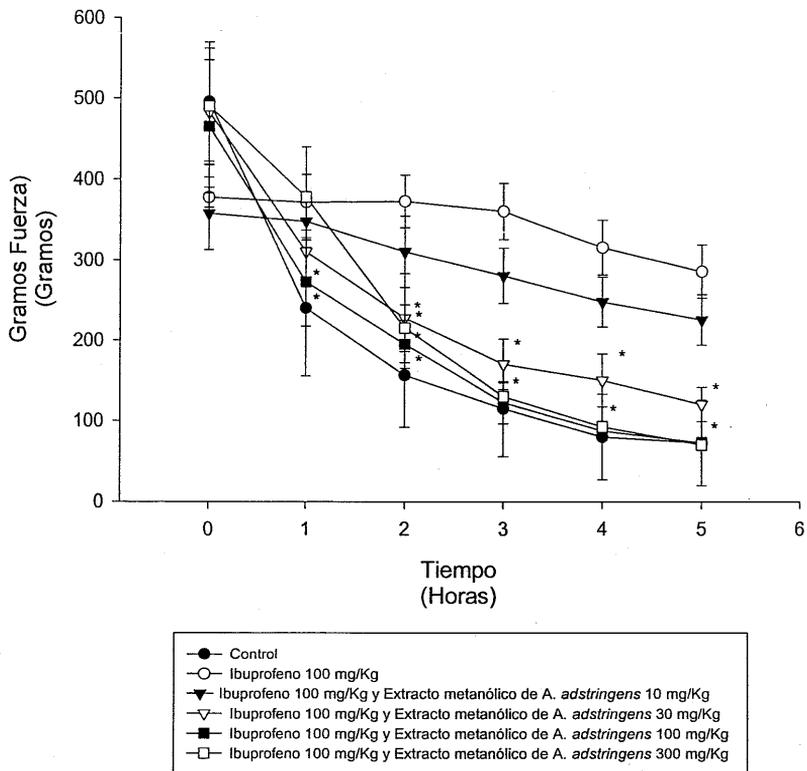


Gráfico 3. Curva de evaluación del efecto analgésico en el edema inducido con carragenina durante las 5 horas. Cada punto representa la media \pm EEM de 6 repeticiones.

7.2.3 Evaluación farmacocinética del ibuprofeno con extracto de *A. adstringens*.

De la evaluación farmacocinética se encontraron los siguientes datos de concentración plasmática (Cuadro 14):

Cuadro 14. Concentraciones plasmáticas obtenidas para cada tratamiento del estudio farmacocinético.

TIEMPO (Minutos)	CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA (Cp) ($\mu\text{g/mL}$)				
	Ibuprofeno (100 mg/Kg)				
	Dosis de Extracto				
	0 mg/Kg	10 mg/Kg	30 mg/Kg	100 mg/Kg	300mg/Kg
0	0	0	0	0	0
7.5	32.671 \pm 0.78	37.815 \pm 0.91	ND	ND	ND
15	80.717 \pm 1.0	82.682 \pm 4.13	13.007 \pm 0.63	ND	ND
30	95.786 \pm 1.2	96.987 \pm 1.84	20.121 \pm 0.81	ND	ND
45	44.832 \pm 0.69	46.411 \pm 1.56	9.664 \pm 0.35	ND	ND
60	17.931 \pm 0.68	18.506 \pm 1.06	ND	ND	ND
120	8.803 \pm 0.57	8.747 \pm 0.76	ND	ND	ND
180	ND	ND	ND	ND	ND
240	ND	ND	ND	ND	ND

ND: No detectable. Los datos representan la media \pm EEM de 6 repeticiones.

Los datos obtenidos de concentración plasmática permiten observar la cinética del fármaco sólo y con el extracto metanólico de *A. adstringens* (Gráfico 4).

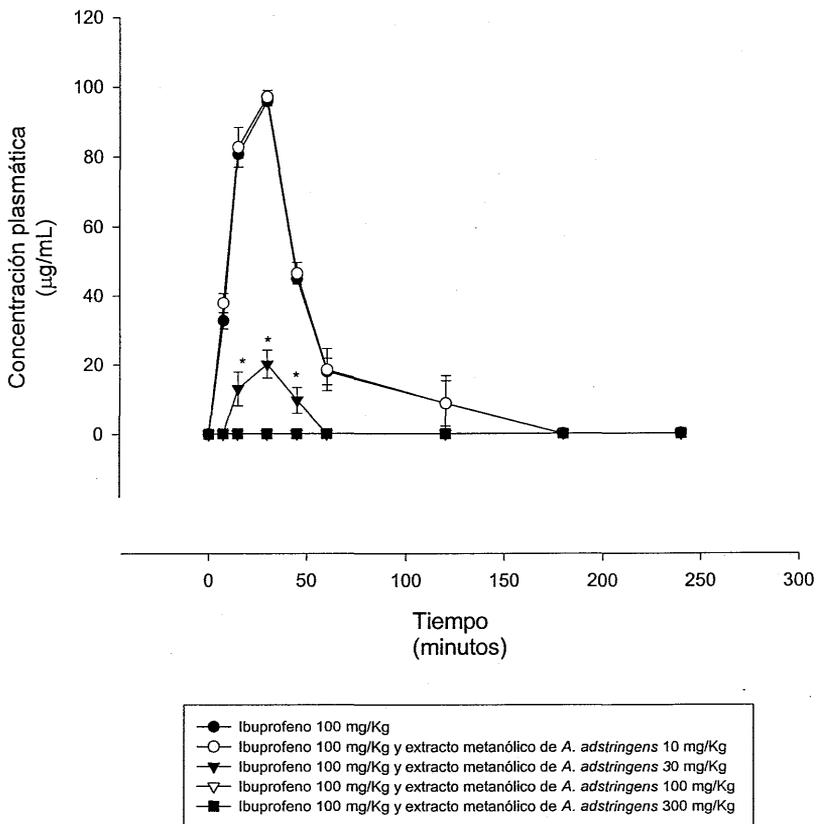


Gráfico 4. Datos de concentración plasmática de ibuprofeno del estudio farmacocinético. Cada punto representa la media \pm EEM de 6 repeticiones.

Para las concentraciones de 100 y 300 mg/Kg de extracto metanólico administrado conjuntamente con el fármaco, la concentración plasmática del ibuprofeno no es detectable.

En el cuadro 15, se muestran los valores obtenidos de C_{max}, T_{max}, ABC y el valor de C_{max}/ABC para cada tratamiento, por medio de los cuales fue posible evaluar los cambios que existen en los parámetros farmacocinéticos.

Cuadro 15. Parámetros farmacocinéticos obtenidos del ibuprofeno

PARAMETRO EVALUADO	TRATAMIENTO ADMINISTRADO				
	Ibuprofeno (100 mg/Kg)				
	Dosis de Extracto				
	0 mg/Kg	10 mg/Kg	30 mg/Kg	100 mg/Kg	300mg/Kg
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	95.78 \pm 1.24	96.98 \pm 1.84	20.12 \pm 0.81*	ND	ND
T_{max} (min)	30	30	30	ND	ND
ABC 0-240 minutos ($\mu\text{g/mL} \times \text{min}$)	4460.1 \pm 16.59	4583.62 \pm 31.82	593.13 \pm 3.88**, a	ND	ND
C_{max}/ABC*1000 (min^{-1})	21.46 \pm 0.29	21.17 \pm 0.63	33.92 \pm 0.30***	ND	ND

ND: no detectable. Los datos representan la media \pm EEM de 6 repeticiones. * p=0.002, ** p=0.031, ***p=0.0027 respecto al grupo control, a: el calculo de ABC para esta dosis se realizó en el intervalo de 0-45 minutos, ya que es el intervalo en donde fue posible cuantificar el fármaco.

Yoon y Yaksh (1999), explican que existen problemas relacionados con la farmacocinética del ibuprofeno (cambios en la absorción, distribución o eliminación, competencia por los sitios de unión, etc.) que repercuten en las propiedades analgésicas y antiinflamatorias del fármaco.

Se ha reportado que existen variaciones en la absorción del ibuprofeno relacionados con la dieta vegetariana, que ocasionaron la aparición de picos múltiples; la dieta de bajo contenido calórico disminuyó la concentración plasmática máxima, además en lugar de aparecer un pico cerca del t_{max} , se observó una meseta. En otro estudio realizado con diferentes líquidos (jugo de cereza, refresco sabor cola o jugo de naranja) se observaron diferencias en la velocidad de absorción y en el tiempo de tránsito intestinal (Pargal *et al.*, 1996; Saano *et al.*, 1992). Esto permite observar que existen varios factores que modifican la absorción del ibuprofeno, sin aclarar exactamente cual es el factor que la modifica.

La velocidad de vaciado gástrico también afecta los niveles plasmáticos de ibuprofeno; Borin *et al.* (1990) refieren que ésta depende del contenido calórico, así como de otros factores tales como la fisiología del tracto gastrointestinal, la postura del cuerpo, el ejercicio, el estado emocional, entre otros. También mencionan que el mecanismo de absorción del ibuprofeno es poco conocido, pero se sabe que existen factores fisiológicos que la modifican tales como el incremento en la secreción biliar, en el fluido pancreático y en las enzimas digestivas.

Es importante mencionar que no hay estudios que reporten los cambios fisiológicos que puede causar el extracto metanólico de *A. adstringens* por lo que si existe alguna variación de estos factores podría repercutir en la absorción del fármaco, sin embargo se sabe que algunos compuestos presentes en el extracto metanólico tales como los taninos y las saponinas modifican algunas características fisiológicas del tracto gastrointestinal. Borrelli e Izzo (2000) describen el efecto de los taninos a nivel fisiológico; estos disminuyen la

permeabilidad de la mucosa intestinal en dosis bajas, mientras que a dosis altas de taninos se causa una coagulación de las proteínas de la capa mucosa, lo que trastorna la absorción de algunas sustancias; además modifican la actividad péptica del jugo gástrico e inhiben la secreción de pepsina. El efecto gastroprotector relacionado con los taninos se explica por su inhibición de la bomba de protones (Khenouf *et al.*, 2003). Nakamura y colaboradores (2003) reportan que los taninos inhiben la absorción de proteínas y algunas otras sustancias en el tracto intestinal. Por otra parte, las saponinas inhiben la secreción de ácido gástrico y la secreción de pepsinógeno y también tienen propiedades surfactantes que modifican las características fisiológicas del lumen intestinal (Borrelli e Izzo, 2000).

Para las dosis de 100 y 300 mg/kg de extracto administradas conjuntamente con el fármaco no fue posible obtener los datos de concentración plasmática de ibuprofeno, lo que indica que existe algún efecto del extracto en la absorción del fármaco, que puede ser atribuible a los taninos o a las saponinas presentes en el extracto por las modificaciones en el tracto gastrointestinal antes mencionadas.

En cuanto al valor del tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima (T max) obtenido es invariablemente de 30 minutos, los cambios en este valor no fueron observables, esto debido a los tiempos de muestreo establecidos previamente, el valor de Tmax obtenido es igual al reportado en las referencias (Albert y Gernaat, 1984; Lichtenberger *et al.*, 2001).

La relación entre $C_{m\acute{a}x}/ABC$ permite tener una aproximación de la velocidad con la que se lleva a cabo la absorción. En el grupo de animales que recibieron la dosis de 30 mg/Kg de extracto metanólico conjuntamente al ibuprofeno, el valor de $C_{m\acute{a}x}/ABC$ es significativamente diferente con respecto al obtenido para el grupo que sólo recibió el ibuprofeno, mientras que el grupo tratado con la dosis de 10 mg/Kg de extracto administrado conjuntamente con el fármaco no tiene diferencia significativa, esto indica que también existe un efecto del extracto metanólico en la velocidad en la que se da el proceso de absorción, y que esta es modificada en dosis mayores de 30 mg/Kg de extracto ($p = 0.231$).

Los cambios en los datos farmacocinéticos del ibuprofeno administrado de forma conjunta con el extracto de *A. adstringens*, se relacionan con los datos obtenidos de la evaluación de las propiedades analgésica y antiinflamatoria.

En dosis mayores de 30 mg/Kg del extracto administrado conjuntamente con el fármaco, tanto el efecto antiinflamatorio como el efecto analgésico se disminuyen. Al administrar conjuntamente el extracto en dosis mayores de 100 mg/Kg, el efecto antiinflamatorio del ibuprofeno es inhibido; incluso en estas dosis se observó un efecto proinflamatorio, esto puede estar relacionado a que el extracto promueve la síntesis de prostaglandinas, hecho relacionado con su efecto gastroprotector (Arrieta *et al.*, 2003). El efecto analgésico del ibuprofeno se disminuyó por la administración conjunta con el extracto de *A. adstringens* a las dosis de 30, 100 y 300 mg/Kg, sin embargo a la dosis de 10 mg/Kg del extracto disminuyó el efecto analgésico del ibuprofeno pero esta disminución no fue estadísticamente significativa.

Por los datos obtenidos en la evaluación de las propiedades analgésicas, antiinflamatorias y farmacocinéticas, la dosis de extracto metanólico de *A. adstringens* que no afectaría significativamente el efecto del ibuprofeno sería la dosis de 10 mg/kg; sin embargo, la dosis en la que se ha comprobado el efecto gastroprotector es de 100 mg/Kg (Navarrete *et al.*, 1998).

8. CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos:

1. Existe una interacción en las propiedades analgésicas y antiinflamatorias del ibuprofeno al administrarse de forma conjunta con el extracto metanólico de *A. adstringens* a dosis mayores de 30 mg/Kg. El efecto analgésico y antiinflamatorio del fármaco disminuye a medida que aumenta la dosis del extracto.
2. La información del estudio farmacocinético muestra una interacción dosis-dependiente entre el extracto metanólico de *A. adstringens* y el ibuprofeno en administración conjunta, esta interacción se observa en dosis mayores de 30 mg/Kg de extracto, por los cambios en los valores de los parámetros farmacocinéticos calculados C_{max} , ABC y C_{max}/ABC .

9. BIBLIOGRAFÍA.

- Albert, K., Gernaat, C. (1984). Pharmacokinetics of ibuprofen. *Am. J. Med.* 77(1A): 40-46.
- Albert, K., Gillespie, A., Wagner, J., Pau, A., Lockwood, G. (1984). Effects of age on the clinical pharmacokinetics of ibuprofen. *Am. J. Med.* 77(1A): 47-50.
- Arrieta, J., Benitez, J., Flores, E., Castillo, C., Navarrete, A. (2003) Purification of gastroprotective triterpenoids from the stem bark of *A. adstringens* (Julianaceae); Role of prostaglandins, sulfhydryls, nitric oxide and capsaicin sensitive neurons. *Planta Medica.* (En prensa).
- Bhattacharya, S., Goel, R., Battacharya, S., Tandos, R. (1991). Potentiation of gastric toxicity of ibuprofen by paracetamol in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 43: 520-521.
- Benitez J., (1998) Evaluación farmacológica del efecto gastroprotector de los triterpenoides de la corteza de cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) en rata Wistar, Tesis Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo)-UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México.
- Blinckstein, D., Shaklai, M., Inbal, A. (1991) Warfarin antagonism by avocado. *Lancet* Vol. 337: 914-915.
- Boneberg, E., Zou, M., Ullrich, V. (1996). Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by R(-)- and S(+)-ibuprofen. *J. Clin. Pharmacol.* 36: 16S-19S.

-
- Borrelli, F., Izzo, A., (2000) The plant kingdom as a source of antiulcer remedies. *Phytother. Res.* 14, 581-591.
- Borin, M., Khare, S., Beihn, R., Jay, M., (1990) The effect of food on gastrointestinal (GI) transit of sustained release ibuprofen tablets as evaluated by gamma scintigraphy. *Pharmaceutical Research*, 7(3): 304-307.
- Botting, J. (1999) Nonsteroidal antiinflammatory agents, *Drugs of today*, 33, No 35 (4-5): 225-235.
- Boudavary, M (Ed.). (1996), The merck Index. An encyclopedia of chemicals, Drugs and Biologicals. The merck Co. Inc., 12 th. Edition, Rahway, N.J. p. 776.
- Bradley, J., Brandt, K., Katz, B., Kalansinski, L., Ryan, S. (1991) Comparison an antiinflammatory dose of ibuprofen, an analgesic dose of ibuprofen and acetaminophen in the treatment of patients with osteoarthritis of the Knee. *N. Engl. J. Med.* 325:87-91.
- Bresler, R., Katz, M. (1993) Geriatric pharmacology, Mc Graw Hill, U.S.A.
- Bye, R., Linares, E., Peñafiel, B., (1994) Selección de plantas medicinales de México. Editorial Limusa, México.
- Chen, C., Chen, C., (1994) Stereoselective disposition of ibuprofen in patients with renal dysfunction, *J. Pharm. Exp. Ther.* . 268(2): 590-594.
- Cox, J., Cox, S., Van Giessen, G., Ruwart, M. (1985). Ibuprofen stereoisomers hepatic clearance and distribution in normal and fatty in situ perfused rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232(3): 636-643.
-

De Graves, F., Anderson, K., Aucoin, D. (1993). Pharmacokinetics of ibuprofen in lactating dairy goats. *Am. J. Vet. Res.* 54(8): 1143-1145.

Der Maderosian (2002) Evidence based herb-drug interactions. Facts & Comparisons. The review of Natural Products. November. U.S.A.

Dirig, D., Isakson, P., Yaksh, T., (1998) Effect of COX1 and COX2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats, *J. Pharm. Exp. Ther.* 285 (3): 1031-1038.

Evans, A. (1996) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the profens: Enantioselectivity, clinical implications, and special reference to S(+)-ibuprofen, *J. Clin. Pharmacol.* 36: 7S-15S.

Falconer, M., (1981) *Farmacología y Terapéutica*, Nueva Editorial Interamericana. México.

FDA (1994) Guidance for Industry. Validation of Chromatographic methods.

FDA (1999) Guidance for Industry. Validation of Bioanalytical methods.

Fowler, C., Tiger, G., Sterström, A., (1997) Ibuprofen inhibits rat brain deamidation of anandamide at pharmacologically relevant concentrations. Mode of inhibition and structure-activity relationship. *J. Exp. Ther.* 283(2):.729-734.

Gans, K., Galbraith, W., Roman, R., Haber, S., Kerr, J., Schmidt, W., Smith, C., Hewes., W, Ackerman., N. (1990) Anti-inflammatory and safety profile of DuP 697, a novel orally effective prostaglandin synthesis inhibitor. *J. Exp. Ther.* 254(3):180-187.

-
- Garza F. (1999). Herbal composition for hemorrhoid treatment. Houston, USA. Patent 5869059 424/725.
- González C, Hersch O, Juárez A, Pérez A. (2000). Plantas medicinales de Copalillo y Temalac Guerrero. Actores Sociales de la Flora Medicinal en México. Serie Patrimonio vivo. Instituto Nacional de Antropología e Historia.
- Goodwin, J. (1984) Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory agents. *Am. J. Med.* 77(1A): 157-164.
- Gridwood, R., Petrie, J., (1992) *Terapéutica Médica*, 15ª Edición, Manual Moderno, México.
- IASP (1980) Ethical standards for investigations of the experimental pain in animals. *Pain* Vol. 9, pp. 141-143.
- IASP (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in animals. *Pain* Vol. 16, pp. 109-110.
- Jamali, F., Mehvar, R., Russel, A., Sattari, S., Yakimets, W., Koo, J. (1992). Human pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers following different doses and formulations: intestinal chiral inversion. *J. Pharm. Sci.* 81(3): 221-225.
- Josa, M., Urizar, J., Rapado, J., Dios-Véitez, C., Castañeda-Hernández, G., Flores-Murrieta, F., Renedo, M., Trocóniz, I., (2001) Pharmacokinetic/Pharmacodynamics modeling of antipyretic and antiinflammatory effects of naproxen in the rat, *J. Pharm. Exp. Ther.* 297(1):198-205.
-

-
- Juhl, R., Van Thiel, D., Dittert, L., Albert, K., Smith, R. (1983). Ibuprofen and sulindac kinetics in alcoholic liver disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* 34(1): 104-109.
- Kaiser, D., Vangiessen, G., Reischer, R., Wechter, W. (1976) Isomeric inversion of ibuprofen (R)-enantiomer in humans. *J. Pharm. Sci.* 65(2): 269-273.
- Kantor, T. (1984). Summary: Ibuprofen- Past, present and future. *Am. J. Med.* 77(1A): 121-125.
- Kauffman, R., Nelson, M. (1992). Effect of age on ibuprofen pharmacokinetics and antipyretic response. *J. Pediatr.* 121(69): 969-973.
- Khenouf, S., Benbdalah, H., Gharzoulli, K., Amira, S., Ito, H., Kim, T., Yoshida, T., Gharzoui, A., (2003) Effect of tannins from *Quercus suber* and *Quercus coccifera* leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. *J. Agric. Food. Chem.* 51(5): 1469-1473.
- Khurana, E., (2002) Pharmacokinetics of centchroman. *Contraception*, 66(1):47-56.
- Larios, P. (Ed.). (1998), Sustancia activa. Ediciones Croissier, S.A. México. p. 337.
- Lambert J., Cormier, A. (2001) Potential interaction between warfarin and boldofenugreek. *Pharmacotherapy* 21: 509-512.
- Leising, G., Resel, R., Stelzer, F., Tasch, F., Lanziner, A. and Hantich, G. (1996). Physical aspects of dexibuprofen and racemic ibuprofen. *J. Clin. Pharmacol.* 36, 3S-6S.
-

-
- Lichtenberger, L., Romero, J., Ruijter, A., Behbod, F., Darling, R., Ashray, A., Sanduja, S., (2001) Phosphatidylcholine association increases the ibuprofen in acute and chronic rodent models of joint inflammation: Relationship to alterations in bioavailability and ciclooxigenase-inhibitory potency, *J. Pharm. Exp. Ther.*, 298(1): 279-287.
- Liso, P., Rebuelta, M., San Román, J., Gallardo, A., Villar., A. (1996) Polymeric drugs derived from Ibuprofen with improved antiinflammatory profile. *J. of Biom. Mat. R.*, Vol. 32, pp. 553-560.
- Mañes, S., Recio, M., Giner., R., Rios., J. L., Gómez, R., Waterman, P., (1999) A glycosyl analogue of diacylglycerol and other antiinflammatory constituents from *Inula viscosa*. *J. Nat. Prod.*, Vol. 62, pp. 601-604.
- Martin, W., Koselowske, G., Töberich, H., Kerkmann, T., Mangold, B. and Augustin, J. (1990). Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ibuprofen after oral administration of ibuprofen lysine in man. *Biopharm. Drug. Disposit.* 11(3): 265-278.
- Martin Memorial Health System (2003). La artritis y otras enfermedades reumáticas. Estadísticas.
URL: <http://mmhs.com/clinical/adult/spanish/arthritis/stats.htm>; consultada el día 21 de mayo de 2003.
- Martínez, M., (1979). Catálogo de nombres vulgares y científicos de Plantas Mexicanas. Ed. Fondo de Cultura Económica. México. p. 298
- Martínez, M., (1992) Plantas medicinales de México. Editorial Botas. México.
-

-
- Miller, J., (1992) Aditivos y conservadores para alimentos, Editorial Limusa-Wiley, México, pp. 123-127.
- Montgomery, D., (1991) Diseño y análisis de experimentos, Grupo Editorial Iberoamérica, México, pp 490-491.
- Nakamura, Y., Tsuji, S., Tonogai, Y., (2003) Method for analysis of tannic acid and its metabolites in biological simples: Application to tannic acid in the rat. *J. Agric. Food. Chem.* 51(1): 331-339.
- Navarrete, A., (1982) Estudio químico y pruebas farmacológicas preliminares de la corteza de *Juliania adstringens* (cuachalalate), Tesis Licenciatura (Químico Farmacéutico Biólogo) UNAM, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, México.
- Navarrete, A., Martínez, U., Reyes, B., (1998) Gastroprotective activity of stem bark of *Amphipteryngium adstringens* in rats. *Phytotherapy Research*, Vol 12, 1-4.
- Navarrete, A., Mata, R., and Delgado, G., (1989). Alkylsuccinic acids from *Amphipteryngium adstringens*. *Planta Med.* 55, 579.
- Navarrete, A., Reyes, B., Sixtos, C., Islas, V., Estrada, E., (1990). Evaluación farmacológica de la actividad antiulcerosa de *Amphipteryngium adstringens* (Cuachalalate). *Rev. Mex. Ciencias Farm*, 21(3): 28-32.
- Ochs, H., Greenblatt, D., Matlis, R., Weinbrenner, J. (1985). Interaction of ibuprofen with the H-2 receptor antagonists ranitidine and cimetidine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 38(6): 648-651.

-
- Ohkubo, T., Shibata, M., Takahashi, H., Inoki, R., (1989) Roles of substance P and Somatostatin on transmission of nociceptive information induced by formalin in spinal cord. *J. Exp. Ther.* 252(3):1261-1267.
- Ortega, A., Soto, M., Martínez, M., Terraza, T., Solares, F., (1999) Phytochemical study of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*, Schiede ex Schlet) *J. Ethnopharmacol.* Dec 15, 68 (1-3): 109-13.
- Paliwal, J., Smith, D., Cox, S., Berardi, R., Dunn-Kucharski, V., Elta, G. (1993). Stereoselective, competitive and nonlinear plasma protein binding of ibuprofen enantiomers as determined in vivo in healthy subjects. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 21(2): 145-161.
- Pargal, A., Kelkar, M., Nayak, J. (1996) The effect of food on the bioavailability of ibuprofen and flurbiprofen from sustained release formulations. *Biopharm. Drug Disposit.* 17(6): 511-519.
- Parks, W., Hook, J., Czeruionke, R., (1981) Comparative effect of ibuprofen on endothelial and platelet prostaglandin synthesis, *J. Pharm. Exp. Ther.* Vol. 219, Issue 2, Pp. 415-419.
- Piscitelli, S., Burnstein, A., (2002) Herb-drug Interactions and confounding in clinical trials. *J. Herb. Pharmacoth.* 2(1): 23-25.
- Poortinga, E., Hungerford, L., (1998) A case-control study of acute ibuprofen toxicity in dogs. *Prev. Vet. Med.* 35: 115-124.
- Quintanar, D., Ávila, J., Arroyo, G., (1994). Estudio de las propiedades fotoprotectoras – cosméticas del extracto de *Amphipterygium adstringens* (Cuachalalate). *Ciencia Cosmética.* 1: 16-17.
-

- Randall, L., Selitto, J., (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 111, pp. 409-419.
- Rifai, N., Sakamoto, M., Law, T., Galpéhan, V., Harris, N., Colin, A. (1996). Use of a rapid HPLC assay for determination of pharmacokinetic parameters of ibuprofen in patients with cystic fibrosis. *Clin. Chem.* 42(11): 1812-1816.
- Rodríguez, H., Cortés, A. (1996). Aspectos biofarmacéuticos de la evaluación de medicamentos. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- Rosenstein, E., (2001) Diccionario de Especialidades Farmacéuticas, 47ª Edición. Ediciones PLM, S.A. de C.V. México.
- Rudy, A., Knight, P., Brater, D., Hall, S., (1995) Enantioselective disposition of ibuprofen in elderly persons with and without renal impairment, *J. Pharm. Exp. Ther.* Vol. 273, Issue 1, Pp. 88-93.
- Saano, V., Paronen, P., Peura, P., Vidgren, M. (1992). Pharmacokinetics of two 200 mg ibuprofen film-coated tablets and effervescent tablet. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 18(4): 491-497.
- Satterwhite, J., Boudinot, F., (1991) Effects of age and dose on the pharmacokinetics of ibuprofen in rat, *Drug metabolism and disposition*, 19 (1): 61-76.
- Sato, J., Nakata, H., Owada, E., Kikuta, T., Umetsu, M., Ito, K. (1993) Influence of usual intake of dietary caffeine on single dose kinetics of theophylline in healthy human subjects. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* Vol. 44, pp. 295.

-
- Sawar, A., Terry, L. (1997) Drug therapy of rheumatoid arthritis, *Drug of today*, Vol. 33, No. 5, pp.299-306.
- Scheurer, S., Williams, K., Bruager, R., Mc Lacglan, A., Brune, K., O Day, R., Geisslinger, G., (1998) Effect of clofibrate on the chiral disposition of ibuprofen in rats, *J. Pharm. Exp. Ther.* Vol. 284, Issue 3, Pp. 1132-1138.
- Shah, A., Jung, D., (1987) Dose dependent pharmacokinetics of ibuprofen in the rat, *Drug metabolism and disposition*, Vol. 15, Issue 2, Pp. 151-154.
- Shanbhag, V., Crider, M., Gokhale, R., Harpalani, A., Dick, R. (1992). Ester and amide prodrugs of ibuprofen and naproxen: Synthesis, anti-inflammatory activity, and gastrointestinal toxicity. *J. Pharm. Sci.* 81(2): 149-154.
- Shirwaikar, A., Bhilegaonkar, P., Malini, S., Sharath, K., (2003). The gastroprotective activity of ethanol extract of *Argeratum conyzoides*. *J. ethnopharmacol.* 86(1): 117-121.
- Shiseido Co. LTD. (1998). The hyaluronic acid promoter contains solvent extract of Cuachalalate *Julianaia adstringens*. Japón. Patent. JP-0027762 19980126.
- Siegel, D., (1998) Drug treatment of juvenile arthritis: accepted therapeutic options. *Drug of today*, 34 (4): 327-340.
- Stein, C., Millan, M., Shippenberg, T., Peter, K., Hertz, A. (1989) Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of *Mu*, *Delta* and *Kappa* receptors. *J. Exp. Ther.* 248(3):1269-1275.

-
- Steinijans, V., Diletti, E., (1983) Statistical analysis of bioavailability studies: parametric and non-parametric confidence intervals. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 24: 127-134.
- Syntex, Symposium. (1987) Inflamación y antiinflamatorios: actualizaciones. 23:29, 61-83, 97:99.
- Tempesta, E., (1980) Evaluation of Local Resource in Traditional Medicine. *J. Ethnopharmacol.* 2, 163-166.
- Thuy, T., Weichman, B. (1989) Pemedolac: A novel and long acting non-narcotic analgesic. *J. Exp. Ther.* 248(3): 907-915.
- Tsuru T, Tshimi K, Kusama K. Hair tonic agent contg. Extract of Juliana plants. Japón. Patent. JP080792 18131392.
- Van Arman, C., Begany, A., (1965) Some details of the inflammation caused by yeast and carrageenin (with appendix on kinetics of the reactions), *J. Pharm. Exp. Ther.*, Vol. 150, pp. 328-334.
- Vander Cammen, T., Rai, S., Exton-Smith, A. (1994) Manual Clínico de geriatría. Manual Moderno. Colombia.
- Vandevier, R., Eidsath, A., Banks, S., Preas, H., Leighton, S., Godin, P., Suffredini, A., Donner, R., (1990) Down-regulation of nitric oxide production by ibuprofen in human volunteers, *J. Pharm. Exp. Ther.* . 289(3): 1398-1403.
- Velasco, M., (1993) Farmacología y Terapéutica clínica, 5ª Edición, Luzen. España.

-
- Wagner, J., Albert, K., Szpunar, G., Lockwood, G. (1984). Pharmacokinetics of ibuprofen in man IV: Absorption and disposition. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 12(4): 381-399.
- Walske, T., (1987) Manual de problemas clínicos en medicina geriátrica. Nueva Editorial interamericana. México.
- Wechter, W., (1996). Understanding the chiral pharmacology of nonsteroidal antiinflammatory drugs in the arylpropionic acid class: S(+)-Ibuprofen: Overview of the symposium "Update on S(+)-ibuprofen. *J. Clin. Pharmacol.* 36: 1S-2S.
- Whitlam, J., Crooks, M., Brown, K., Veng Pedersen, P. (1979). Binding of nonsteroidal anti-inflammatory agents to proteins- I. Ibuprofen- serum albumin interactions. *Biochem. Pharmacol.* 28: 675-678.
- Williamson, E., Okpako, T., Evans, R., (1996) Pharmacological methods in phytotherapy research: selection, preparation and pharmacological evaluation of Plant material, John Wiley & Sons, Volume 1, pp. 131-155.
- Winter, C. (1962) Carrageenin-induced Edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs, *Proc. Soc. Biol. Med.* Vol. 111, pp. 544-547.
- Yoon, M., Yaksh, T., (1999) Evaluation of interaction between gabapentin and ibuprofen on the Formalin Test in Rats, *Anesthesiology*, 91 (4): 1006-1018.

ANEXO I

Reactivos empleados en el estudio:

- Metanol HPLC, Burdick Jacson. Cat. Ah230-4, No. de lote: CF168.
- Acetonitrilo HPLC, J.T. Baker. Cat. 9017-03, No. de lote: V36C53.
- Acetato sódico trihidratado, JT Baker. Cat. 3460. No. de lote: M-35680.
- Ácido acético glacial, JT Baker, No. de lote: V50C21.
- Ácido clorhídrico, JT Baker, Cat. 953502. No. de lote: V630C24.
- Heparina sal sódica, Sigma. Cat. H-7005. No. de lote: 51H0336.
- Carragenina (gelatina vegetal) tipo II, grado comercial, Sigma. Cat. C-1138. No. de lote: 65H1096.
- Cloruro de sodio (cristal, grado reactivo), J.T. Baker, No. de Lote: 3624-01.
- Extracto metanólico de *A. adstringens*. Producido en el laboratorio 126 del conjunto E de Facultad de Química.
- Ibuprofeno, Helm de México. HP, No. de Lote: 1413263.
- Diclofenaco. Helm de México. HP, No. de Lote: 1910136.3

ANEXO II

Estándares éticos para la investigación del dolor experimental en animales.

Los modelos animales que intentan simular dolor crónico como el del humano y que involucran manipulaciones pueden ser:

- Estimulación por corriente eléctrica continua por electrodos implantados dentro de la pulpa dental o en los nervios, o choques repetitivos por electrificación del piso de la jaula.
- Inflamación experimental por inyección subcutánea de turpetina, levadura o carragenina.
- La prueba de la formalina: necrosis e inflamación por administración de formalina subcutánea.
- Infusión continua de sustancias que puedan causar dolor.
- Artritis experimental inducida por toxinas.
- Fractura de huesos.
- Inducción de hiperexcitabilidad por inyección de fármacos convulsivos o toxinas.

Estos métodos pueden inducir estados de dolor y sufrimientos como en humanos. Pero deben ser planeados adecuadamente y reduciendo el dolor innecesario para el animal. En la práctica, pueden cumplir con las siguientes recomendaciones, en cuanto a la severidad y duración del dolor:

1. Es importante tener conciencia del dolor de los animales. El beneficio potencial que se puede obtener de los experimentos para entender los mecanismos de dolor y las terapias necesarias para tratarlo.
2. El estudio debe estar asesorado por etologista, o bien por el comité de ética de la institución, además el investigador a cargo deberá concienciar a los investigadores involucrados.
3. Si es posible, el investigador deberá tratar de estimular el dolor en si mismo, este principio aplica para los métodos no invasivos que puedan causar dolor agudo.
4. Debe ser posible evaluar el nivel de sufrimiento y dolor del animal.
5. Si el animal experimenta dolor crónico debe ser tratado para aliviar el dolor (ya sea con agentes o métodos analgésicos).
6. La duración debe ser lo más breve posible y con el menor número de animales.

Estas recomendaciones fueron tomadas de la Guía ética para la investigación del dolor experimental en animales (IASP, 1980; IASP, 1983)