



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

IMPLEMENTACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO *IN SITU* PARA
DETERMINAR LA PERMEABILIDAD DE FÁRMACOS

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. HUGO OCAMPO REGALADO



TUTOR: DRA. HELGI HELENE JUNG COOK
FACULTAD DE QUÍMICA

México, D.F. abril 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

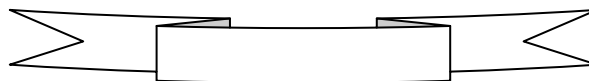
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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.

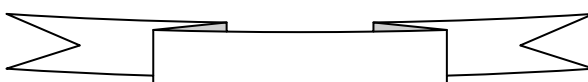
AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría. Número de becario: 270253.
- A mi tutora, la Dra. Helgi Helene Jung Cook por su paciencia, dedicación, enseñanza y valiosos consejos en esta etapa de formación profesional.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la institución educativa que me brindó la oportunidad de realizar los estudios de maestría.
- A la M. en C. Lourdes Mayet, por sus consejos y capacitación.
- A mis sinodales: Dra. Flora Adriana Ganem Rondero, Dra. María Isabel Aguilar Laurents, Dr. Francisco Hernández Luis, Dra. Dea Herrera Ruiz, Dr. José Juan Escobar Chávez por sus valiosos comentarios y observaciones en la revisión de este trabajo.
- A Wendy V. Benitez Alonso, por su gran apoyo y compañía incondicional.
- A mi madre, por su apoyo y sabios consejos.



Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Helgi Helene Jung Cook en los laboratorios 112-113 y en la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) del conjunto E de la Facultad de Química.

Se presentó en el evento QuimiUNAM 2013 en modalidad de cartel, los días 13-15 de noviembre de 2013 en el auditorio “Alfonso Caso”, de la Universidad Nacional Autónoma de México.



ÍNDICE GENERAL

Capítulo	Pág.
Índice de tablas	VI
Índice de figuras	IX
Esquemas	X
Resumen	XI
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Tracto gastrointestinal	3
2.2. Anatomía y fisiología del intestino delgado	4
2.3. Absorción oral	5
2.4. Mecanismos de transporte de fármacos a través de la mucosa intestinal	7
2.4.1. Procesos pasivos	9
2.4.1.1. <i>Transporte pasivo transcelular</i>	9
2.4.1.2. <i>Transporte pasivo paracelular</i>	10
2.4.2. Transporte especializado	11
2.4.2.1. <i>Difusión facilitada</i>	11
2.4.2.2. <i>Transporte activo</i>	12
2.4.3. Otros sistemas de transporte	13

	Pág.
2.5. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica	14
2.6. Determinación de la permeabilidad de un fármaco	15
2.7. Metodologías utilizadas para evaluar la permeabilidad intestinal y la absorción	16
2.7.1. Métodos <i>in silico</i>	16
2.7.2. Métodos fisicoquímicos	17
2.7.2.1. Lipofilia (log P/log D)	18
2.7.2.2. Ensayo de Permeabilidad en Membranas Artificiales Paralelas (PAMPA)	18
2.7.3. Métodos <i>in vitro</i>	19
2.7.3.1. Modelos empleando tejidos animales	19
2.7.3.2. Métodos <i>in vitro</i> empleando cultivos celulares	19
2.7.3.2.1. Células Caco-2	20
2.7.3.2.2. Células MDCK	20
2.7.4. Métodos <i>in vivo</i>	21
2.7.5. Método <i>in situ</i>	22
2.8. Validación de métodos analíticos y bioanalíticos	25
3. Objetivos	28
4. Hipótesis	29
5. Parte experimental	30

	<i>Pág.</i>
5.1. Reactivos, materiales y equipos	30
5.1.1. Reactivos	30
5.1.2. Materiales y equipos	31
5.1.3.- Material biológico	31
5.2. Validación de los métodos analíticos para la cuantificación de clorhidrato de propranolol y clorhidrato de ranitidina	32
5.2.1. Preparación de las soluciones de trabajo y fase móvil	32
5.2.2. Preparación de las curvas de calibración	35
5.2.2.1. Curvas de calibración de clorhidrato de propranolol y clorhidrato de ranitidina	35
5.2.2.2. Curva de calibración de rojo de fenol	36
5.2.2.3. Preparación de los puntos control	36
5.2.3. Método analítico para la cuantificación de clorhidrato de propranolol y clorhidrato de ranitidina	37
5.2.3.1. Condiciones cromatográficas	37
5.2.3.2. Validación	38
5.3. Modelo de perfusión <i>in situ</i> en rata	41
5.3.1. Solución de perfusión	41
5.3.2. Retención de los fármacos en la tubería	41
5.3.3. Anestesia y dosis	42

	<i>Pág.</i>
5.3.4. Cirugía y perfusión	42
5.3.4.1. Cirugía	42
5.3.4.2. Perfusión	43
5.3.5. Cálculos de permeabilidad	45
5.3.5.1. Medición del flujo neto de agua	45
6. Resultados y discusión	46
6.1. Validación de los métodos analíticos para la cuantificación de clorhidrato de propranolol y clorhidrato de ranitidina	46
6.1.1. Selectividad	46
6.1.2. Linealidad y precisión (repetibilidad)	47
6.1.3. Precisión interdía	49
6.1.4. Exactitud	50
6.1.5. Límite de cuantificación	51
6.1.6. Estabilidad a 24 horas en el automuestreador	52
6.1.7. Efecto de la dilución	53
6.2. Implementación del modelo de permeabilidad	55
6.2.1. Ensayo de retención de los fármacos en la tubería	55
6.2.2. Condiciones quirúrgicas y de perfusión	57
6.2.3. Recobro de rojo de fenol y estado de equilibrio en la membrana	58

	<i>Pág.</i>
6.2.4. Resultados de permeabilidad	60
7. Conclusiones	64
8. Referencias	65
9. Apéndice	73
1. Apéndice A. Datos obtenidos de un experimento de perfusión, utilizados para calcular el coeficiente de permeabilidad efectiva (P_{eff}) de clorhidrato de propranolol para una rata	73
2. Apéndice B. Datos obtenidos de un experimento de perfusión, utilizados para calcular el coeficiente de permeabilidad efectiva (P_{eff}) de clorhidrato de ranitidina para una rata	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
Tabla 1. Parámetros biológicos y físicos del tracto intestinal humano.	5
Tabla 2. Factores que influyen en la absorción gastrointestinal de los fármacos.	6
Tabla 3. Mecanismos de transportes involucrados en la absorción de fármacos a través de la mucosa intestinal.	8
Tabla 4. Principales transportadores de influjo y eflujo en el intestino humano involucrados en el transporte de fármacos.	13
Tabla 5. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS).	15
Tabla 6. Fármacos sugeridos para clasificar la permeabilidad de nuevas moléculas.	16
Tabla 7. Algunos modelos celulares utilizados en estudios <i>in vitro</i> para evaluar la permeabilidad de fármacos.	19
Tabla 8. Parámetros y criterios de aceptación requeridos para validar un método analítico de acuerdo a lo establecido en la NOM- 177- SSA1- 2013.	25
Tabla 9. Preparación de las curvas de calibración de propranolol y ranitidina.	35
Tabla 10. Preparación de la curva de calibración de rojo de fenol.	36
Tabla 11. Preparación de los puntos control.	36
Tabla 12. Condiciones cromatográficas utilizadas para la cuantificación de propranolol, ranitidina y rojo de fenol.	37

Tabla 13. Linealidad y precisión (repetibilidad) del método analítico para la cuantificación de propranolol.	48
Tabla 14. Linealidad y precisión (repetibilidad) del método analítico para la cuantificación de ranitidina.	48
Tabla 15. Precisión interdía del método analítico para la cuantificación de clorhidrato de propranolol.	49
Tabla 16. Precisión interdía del método analítico para la cuantificación de clorhidrato de ranitidina.	49
Tabla 17. Exactitud del método analítico para la cuantificación de propranolol.	50
Tabla 18. Exactitud del método analítico para la cuantificación de ranitidina.	51
Tabla 19. Clorhidrato de propranolol. Resultados de límite de cuantificación.	51
Tabla 20. Clorhidrato de ranitidina. Resultados de límite de cuantificación.	52
Tabla 21. Estabilidad de propranolol en el automuestreador.	52
Tabla 22. Estabilidad de ranitidina en el automuestreador.	53
Tabla 23. Efecto de dilución en la cuantificación de propranolol.	53
Tabla 24. Efecto de dilución en la cuantificación de ranitidina.	54
Tabla 25. Retención de propranolol en la tubería utilizada.	56
Tabla 26. Retención de ranitidina en la tubería utilizada.	56

Tabla 27. Relación de concentración de entrada y salida de rojo de fenol.	59
Tabla 28. Valores de recobro de rojo de fenol.	60
Tabla 29. Valores de permeabilidad de clorhidrato de propranolol.	61
Tabla 30. Valores de permeabilidad de clorhidrato de ranitidina.	62

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Pág.</i>
Figura 1. Tracto gastrointestinal.	4
Figura 2. Proceso de absorción oral de fármacos en el tracto gastrointestinal (TGI).	6
Figura 3. Vías de transporte a través de la barrera intestinal. (A) Difusión pasiva paracelular, (B) difusión pasiva transcelular, (C-F), transporte facilitado de influjo/ eflujo por proteínas de membrana, (G) transcitosis y (H) endocitosis.	7
Figura 4. Comparación entre difusión simple y difusión facilitada.	11
Figura 5. Principales parámetros fisicoquímicos considerados para la predicción de la absorción de fármacos.	17
Figura 6a. Técnica de perfusión intestinal <i>in situ</i> .	23
Figura 6b. Transporte de fármacos a través del epitelio intestinal durante la perfusión intestinal de un solo paso (SIPP). C_{in} , concentración del fármaco a la entrada; C_{out} , concentración del fármaco a la salida; Q , velocidad de perfusión en el lumen.	23
Figura 7. Técnica de perfusión intestinal implementada.	43
Figura 8. Cromatogramas representativos: (A) Blanco c. propranolol, (B) blanco c. ranitidina, (C) muestra de perfusión conteniendo c. propranolol, (D) muestra de perfusión conteniendo c. ranitidina, (E) muestra de perfusión conteniendo rojo de fenol, (F) blanco rojo de fenol.	46

Figura 9. Linealidad del método para la cuantificación de propranolol (a), linealidad del método para la cuantificación de ranitidina (b).	47
Figura 10. Recobro de rojo de fenol.	59
Figura 11. Variabilidad entre los valores de P_{eff} de propranolol.	61
Figura 12. Valores de permeabilidad de propranolol y ranitidina. El P_{eff} medio de propranolol es 10.9 veces mayor al de ranitidina.	62

ESQUEMAS

Esquema 1. Procedimiento de cirugía y perfusión desarrollado en el modelo de permeabilidad.	44
--	----

RESUMEN

La predicción de la fracción de dosis oral absorbida en el humano es muy importante en etapas de descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas con actividad terapéutica. Los estudios en líneas celulares (Caco-2 y MDCK) son utilizados comúnmente para este propósito, sin embargo, el método *in situ* ha mostrado una mejor predicción y requiere menor tiempo de experimentación.

En el presente trabajo se implementó un método *in situ*, utilizando íleon de rata, para determinar la permeabilidad de fármacos. Se desarrollaron y validaron los métodos analíticos para la cuantificación de propranolol (estándar interno de alta permeabilidad) y ranitidina (estándar interno de baja permeabilidad) en las muestras de perfusión. Posteriormente, se evaluó la permeabilidad de ambos fármacos, y se determinó el recobro de rojo de fenol.

Los resultados indicaron que el segmento intestinal mantuvo su integridad y documentan la confiabilidad del método para su uso en la evaluación de la permeabilidad de fármacos. Al determinar la permeabilidad (P_{eff}) de los fármacos control, se encontró que los valores fueron semejantes a los reportados en la literatura ($0.6478 \times 10^{-4} \pm 0.0745 \times 10^{-4}$ cm/s para propranolol y $0.0592 \times 10^{-4} \pm 0.0227 \times 10^{-4}$ cm/s para ranitidina), siendo la permeabilidad de propranolol 10.9 veces mayor que la obtenida para la ranitidina.

El método *in situ* implementado es simple, preciso, exacto, confiable y requiere de menor tiempo de experimentación que los métodos *in vitro* basado en líneas celulares.

1.- INTRODUCCIÓN

En etapas de descubrimiento y desarrollo de nuevas moléculas con actividad terapéutica, las características farmacocinéticas desfavorables, tales como pobre absorción, son causantes de la exclusión del 39% de ellas. Por ello, es muy importante la predicción de la fracción de dosis oral absorbida (Garberg y col., 1999; Salphati y col., 2001).

La biodisponibilidad oral depende principalmente de tres procesos: La fracción de dosis absorbida (F_a), la fracción del fármaco que escapa del metabolismo en la pared intestinal (F_g) y la fracción de fármaco que evade el metabolismo hepático (F_h). Por tanto la biodisponibilidad oral de un fármaco es primariamente una función de la permeabilidad efectiva (P_{eff}) a través de la mucosa intestinal, de las características de solubilidad de la molécula en el medio gastrointestinal y de su estabilidad metabólica (Martínez y Amidon, 2002). El transporte de fármacos a través de la membrana intestinal es fundamental en el campo de la administración oral de fármacos, ya que la P_{eff} es una de las variables biofarmacéuticas claves que determina la velocidad y cantidad absorbida *in vivo*.

Existen diferentes modelos para evaluar la permeabilidad de los fármacos: coeficiente de partición octanol-agua, permeabilidad de membranas artificiales (PAMPA), estudios *in vitro* (en líneas celulares), *ex vivo* (extirpación de un segmento intestinal de rata), perfusión intestinal *in situ* e *in vivo*, así como métodos *in silico* (uso de modelos computacionales) (Bohets y col., 2001; Buckley y col., 2012). Los estudios en líneas celulares (Caco-2 y MDCK), son comúnmente utilizados para evaluar la permeabilidad intestinal (Garberg y col., 1999). A pesar de que estos métodos han sido correlacionados con la absorción intestinal en humanos, los resultados obtenidos se ven afectados por parámetros experimentales como el pH y co-solventes (Yamashita y col., 2000). El método *in situ* proporciona condiciones experimentales similares a las que se encuentran después de la administración oral, con baja sensibilidad a variaciones de pH. Con el método *in situ*, se mantiene el flujo sanguíneo

intacto y la barrera intestinal funcional, por lo que puede utilizarse para calcular el impacto de las vías de depuración (enzimas y/o transportadores) presentes en el intestino; además de requerir menor tiempo de experimentación. Se ha encontrado también que la perfusión intestinal en ratas proporciona una mejor predicción de la fracción de dosis oral absorbida en el humano que los modelos *in vitro* (Kim y col., 2006).

Cabe mencionar que a pesar del uso y las ventajas que proporciona la técnica *in situ*, en México no ha sido muy utilizada. Por lo anteriormente mencionado, se decidió implementar un método *in situ* utilizando íleon de rata, que permita evaluar la permeabilidad intestinal de nuevas moléculas y de aquellas ya conocidas cuya permeabilidad aún no haya sido determinada.

2. ANTECEDENTES

2.1. TRACTO GASTROINTESTINAL

El intestino humano ha evolucionado durante miles de años para establecer un sistema eficiente para la extracción de nutrientes de una dieta variada. Funcionalmente, el intestino se divide en una región de almacenamiento primaria y preparativa (la boca y el estómago), una región de secreción y de absorción (el intestino medio), un sistema de recuperación de agua (colon ascendente), y finalmente, un sistema de almacenamiento de producto de desecho (regiones del colon descendente y sigmoide, y el recto) (Dressman y Lennernäs, 2000). El tracto gastrointestinal (Figura 1) es el encargado de preparar los alimentos ingeridos para que los nutrientes puedan ser incorporados al medio interno. Para realizar esta función, el sistema gastrointestinal utiliza una serie de procesos que tienen como objetivo manipular los componentes alimentarios de forma que se transformen en compuestos que puedan ser incorporados al medio interno. La motilidad se encarga de la manipulación mecánica de los alimentos disminuyendo su tamaño, y hace progresar en sentido oral-aboral los alimentos o sus productos de degradación permitiendo la incorporación de los nutrientes al medio interno (deglución, vaciamiento gástrico, motilidad intestinal). Los procesos de secreción (ácido clorhídrico, enzimas, etc.) intervienen en la degradación de los componentes alimentarios para que puedan ser incorporados al torrente sanguíneo. La acción conjunta de la motilidad y secreción permite la correcta digestión de los alimentos. La absorción de los nutrientes y fluidos completan la función digestiva.

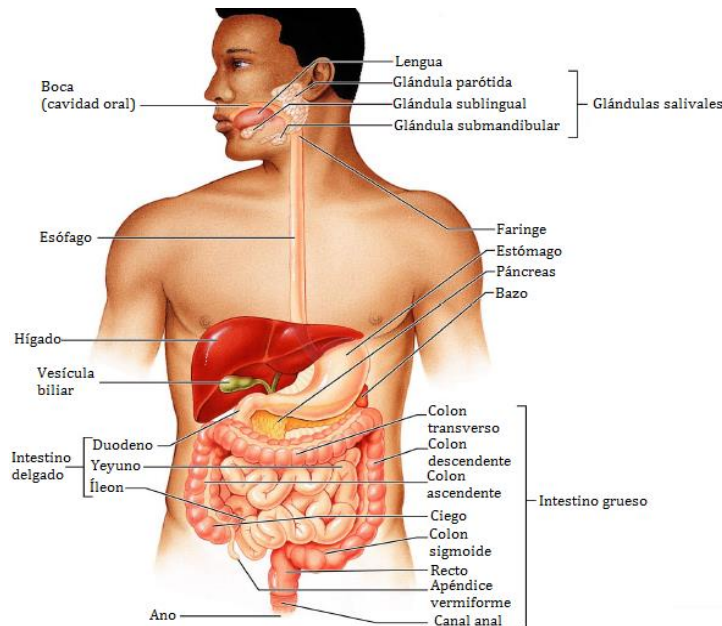


Figura 1. Tracto gastrointestinal. Modificada de Benjamin Cummings, 2001.

2.2. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL INTESTINO DELGADO

La función principal del intestino delgado es la absorción selectiva de nutrientes, además limita la absorción de enzimas digestivas y sustancias extrañas ingeridas. Está constituido por estructuras y células con características únicas que le confieren una morfología compleja y especializada cuyo objetivo es aumentar el área disponible para que el proceso de absorción pueda llevarse a cabo de manera eficaz (Herrera y col., 2012). El intestino delgado humano mide de 2-6 metros y está dividido en tres secciones: **Duodeno, yeyuno e íleon**, que corresponden al 5%, 45%, y 50% de la longitud (Ganong, 1995). Cerca del 90% de la absorción total en el tracto gastrointestinal se lleva a cabo en esta región, la cual posee pliegues circulares que rodean el interior del lumen intestinal e incrementan el área superficial del intestino delgado tres veces. Las vellosidades incrementan el área 30 veces, y las microvellosidades la aumentan por un factor de 600 (Tabla 1). Las células epiteliales en la región intestinal son una población heterogénea de células que incluyen enterocitos, células Goblet que secretan mucina, células endócrinas, células de Paneth, células M (micropliegues), células Tuft y células Cup. Las células epiteliales más

comunes son los enterocitos y son los responsables de la mayor parte de la absorción de nutrientes y fármacos en el intestino delgado (Balimane y col., 2000).

Tabla 1. Parámetros biológicos y físicos del tracto intestinal humano. Modificada de Daugherty y Mrsny, 1999.

Segmento gastrointestinal	Área de superficie	Longitud del segmento (cm)	Tiempo de residencia	pH del segmento
Cavidad oral	100 cm ²		Segundos a minutos	6.5
Esófago	200 cm ²	23- 25	Segundos	
Estómago	3.5 m ²	25	1.5 h	1-2
Duodeno	1.9 m ²	35	0.5- 0.75 h	4.0- 5.5
Yeyuno	184 m ²	280	1.5- 2.0 h	5.5- 7.0
Íleon	276 m ²	420	5- 7 h	7.0- 7.5
Colon y recto	1.3 m ²	150	1- 60 h (promedio= 30 h)	7.0- 7.5

2.3. ABSORCIÓN ORAL

La administración oral de fármacos es la vía más utilizada debido a sus ventajas: fácil administración, comodidad y alto cumplimiento por parte del paciente, así como su bajo costo (Balimane y col., 2000; Dressman y Lennernäs, 2000). La absorción oral de un principio activo implica la liberación del fármaco de la forma farmacéutica, su disolución en el tracto gastrointestinal, el paso de las moléculas a través de la mucosa intestinal y la liberación dentro de la circulación sistémica (Figura 2). Por lo tanto, se trata un proceso complejo que depende de numerosos factores fisiológicos, fisicoquímicos y de la forma farmacéutica (Tabla 2).

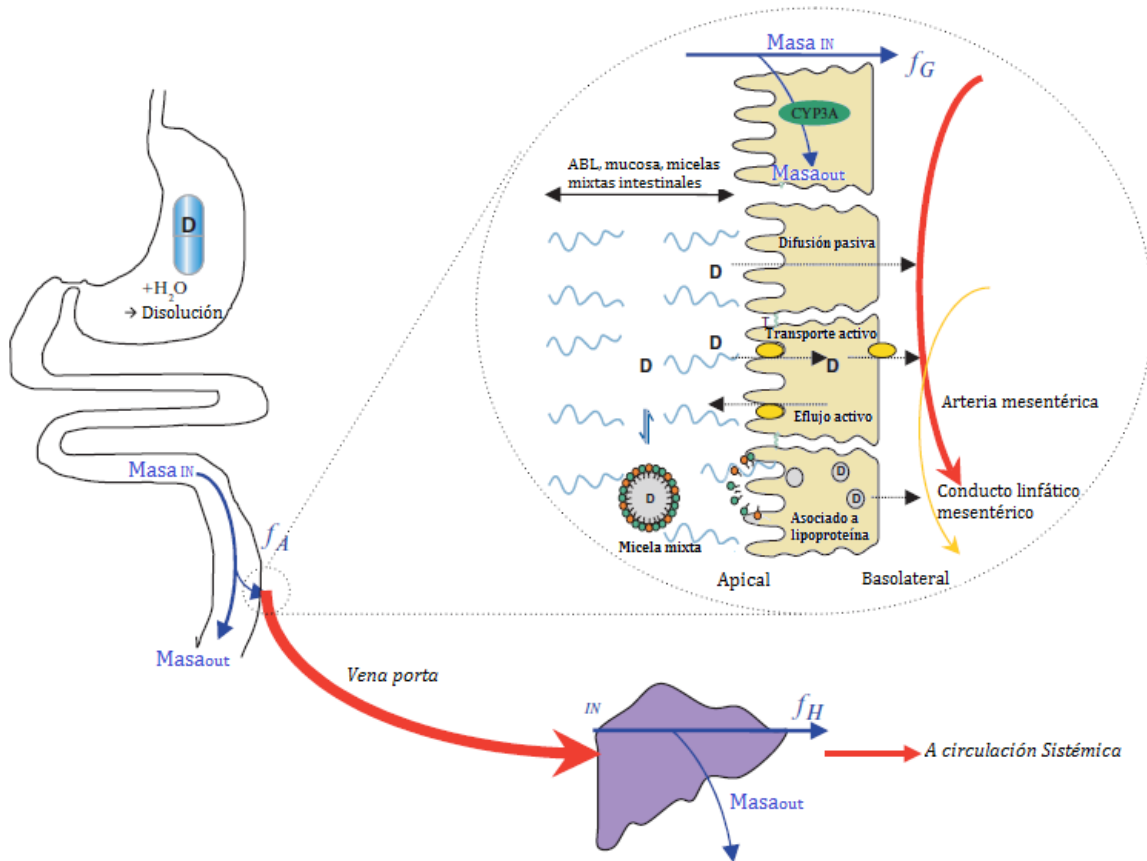


Figura 2. Proceso de absorción oral de fármacos en el tracto gastrointestinal (TGI).
Modificada de Griffin y O'Driscoll.

Tabla 2. Factores que influyen en la absorción gastrointestinal de los fármacos.

Modificada de Griffin y O'Driscoll.

Propiedades fisicoquímicas de los fármacos	Factores fisiológicos del tracto gastrointestinal (TGI)	Forma de dosificación y factores de formulación
Solubilidad	Velocidad de vaciado gástrico	Velocidad de disolución
log P	Motilidad intestinal	Velocidad de desintegración
pKa	Área de superficie de membrana	Mecanismos de liberación del fármaco
Potencial para formar enlaces de H	Mecanismo de transporte	Efectos del excipiente
Tamaño/ peso molecular	Surfactantes nativos	
PSA	Secreciones intestinales (mucosa, enzimas)	
	Flujo sanguíneo intestinal	

PSA: Área de superficie polar; log P: Coeficiente de partición octanol/agua.

2.4. MECANISMOS DE TRANSPORTE DE FÁRMACOS A TRAVÉS DE LA MUCOSA INTESTINAL

El transporte a través de epitelio intestinal es un proceso complejo y dinámico, que incluye el paso de las moléculas a través de varias vías (Figura 3). La absorción se lleva a cabo por mecanismos tales como difusión pasiva (paracelular y transcelular), proceso mediado por acarreadores (facilitado y activo), transcitosis y endocitosis (Tabla 3).

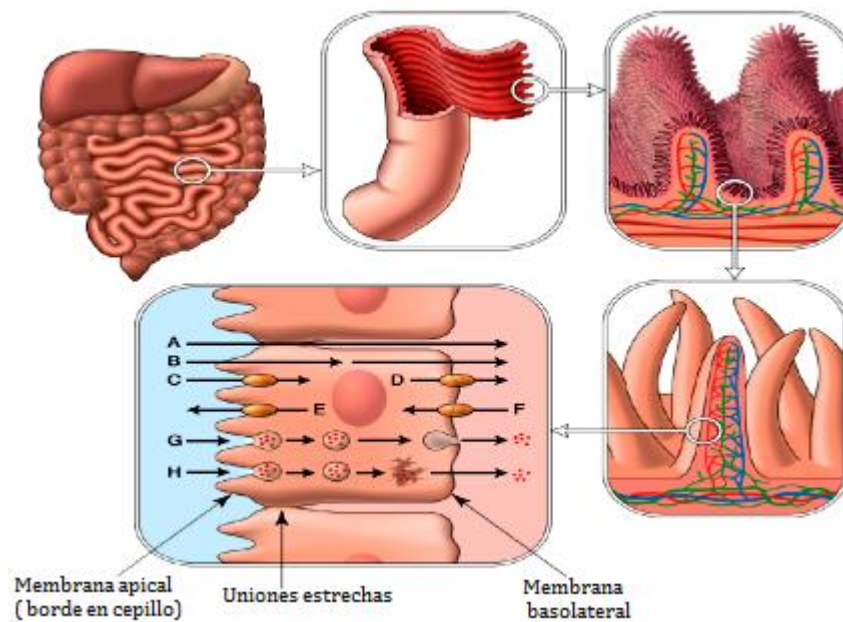


Figura 3. Vías de transporte a través de la barrera intestinal. (A) Difusión pasiva paracelular, (B) difusión pasiva transcelular, (C-F), transporte facilitado de inyección/ eflujo por proteínas de membrana, (G) transcitosis y (H) endocitosis. Modificada de Buckley y col., 2012.

Tabla 3. Mecanismos de transportes involucrados en la absorción de fármacos a través de la mucosa intestinal.

Tipo de transporte	Características
Procesos pasivos de difusión:	
1.- <i>Transporte pasivo transcelular</i> (difusión simple)	Mecanismo más empleado por los fármacos Condicionado principalmente por la liposolubilidad y el tamaño de las moléculas
2.- <i>Transporte pasivo paracelular</i>	Ocurre a través de las uniones estrechas entre las células. Moléculas pequeñas e hidrófilas presentan este tipo de transporte
Transporte especializado:	
1.- <i>Difusión facilitada</i>	Uso de transportadores Se lleva a cabo a favor del gradiente de concentración sin gasto de energía, es específico y saturable
2.- <i>Transporte activo:</i>	Bombas que transportan sustancias en contra del gradiente electroquímico Son saturables, específicos y presentan variación regional
a) Primario	Utiliza como fuente de energía la hidrólisis del ATP
b) Secundario	Utilizan el potencial químico generado por los transportadores primarios
Otros sistemas de transporte:	
1.- <i>Endocitosis</i>	Englobamiento de las moléculas en una vacuola que es liberada en el citosol
2.- <i>Transcitosis</i>	Internalización del soluto por endocitosis, transporte y liberación en la membrana basolateral

2.4.1. PROCESOS PASIVOS

La mayor parte de los fármacos se absorben por procesos pasivos, entre los cuales se encuentran:

2.4.1.1. TRANSPORTE PASIVO TRANSCELULAR

Es el mecanismo más utilizado por los fármacos para atravesar las membranas biológicas. Este tipo de transporte implica el paso de la molécula a través de la membrana apical, seguido por la difusión en el citoplasma y posterior permeación a través de la membrana basolateral. La difusión de moléculas pequeñas en el citoplasma es un proceso rápido, por tal motivo se considera a la membrana apical como la barrera que limita el transporte transcelular (Engman, 2003).

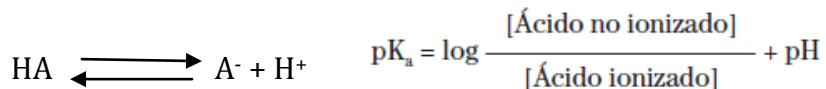
Este proceso está condicionado principalmente por la liposolubilidad y el tamaño de las sustancias. Mientras mayor sea la liposolubilidad de una molécula, aumentará la velocidad de difusión. La liposolubilidad de una molécula está expresada por su coeficiente de partición (o distribución) lípido/agua. Todas estas características fisicoquímicas de las moléculas están incluidas en la ley de Fick, que describe la velocidad de difusión (ds/dt) de una molécula al cruzar una bicapa lipídica.

$$ds/dt = (A D \beta [C_e - C_i]) 1/\Delta X \quad \text{Donde:}$$

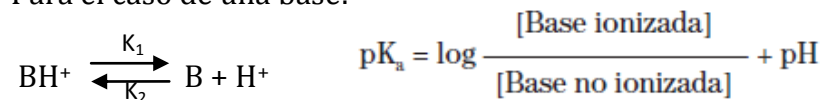
A: Es el área de la bicapa sobre la cual ocurrirá la difusión. **ΔX :** La distancia que debe recorrer a través de la bicapa la molécula que difunde. **D:** El coeficiente de difusión de la molécula. **β :** El coeficiente de partición lípido/agua. **$[C_e - C_i]$:** El gradiente de concentración.

La mayoría de los fármacos son ácidos o bases débiles y son, por lo tanto, electrolitos que en solución acuosa se encuentran en sus formas: ionizada y no ionizada. De acuerdo a la teoría de pH partición, sólo el fármaco no ionizado, podrá ser absorbido por difusión pasiva. El grado de ionización de una molécula depende de tres factores: a) su naturaleza ácida o básica, b) su pKa y c) el pH del medio. El valor del pKa y pH se relacionan por medio de la ecuación de Henderson-Hasselbach, que determina la fracción de fármaco ionizada y la no ionizada de acuerdo a la siguiente ecuación:

Para el caso de un ácido:



Para el caso de una base:



La proporción ionizada de un fármaco ácido será menor si el pH del medio es bajo. Del mismo modo, la proporción ionizada de un fármaco básico será menor en los medios básicos con pH alto (Goodman & Gilman, 2006).

2.4.1.2. TRANSPORTE PASIVO PARACELULAR

Es un proceso de transporte a través de las uniones estrechas formadas entre las células. Es considerado un proceso de difusión pasiva, que involucra la circulación de gran cantidad de agua como resultado de una diferencia hidrostática u osmótica (Velázquez, 2005). Moléculas pequeñas e hidrofílicas, tales como Atenolol, pueden pasar a través del epitelio intestinal por este mecanismo, sin embargo, este tipo de fármacos no se absorben completamente ya que los poros paracelulares representan solo 0.01- 0.1 % del área de superficie total del intestino (Engman, 2003).

2.4.2 TRANSPORTE ESPECIALIZADO

2.4.2.1. DIFUSIÓN FACILITADA

Las proteínas de membrana que se encuentran en las superficies extra e intracelular de la membrana, cumplen funciones variadas. Algunas de ellas, las denominadas *proteínas transportadoras*, son capaces de traslocar a una sustancia al otro lado de la membrana, donde es liberada. Este mecanismo permite que atraviesen las membranas, sustancias que tienen un tamaño demasiado grande para difundir por poros o bien que, debido a su polaridad, no son capaces de atravesarlas. La glucosa, por ejemplo, pasa a través de las vellosidades intestinales y del epitelio del túbulo renal por difusión facilitada (Velázquez, 2005). Estos procesos no implican consumo energético, pero son específicos y saturables (Zhang y col., 1998; Velázquez, 2005). La figura 4 muestra la comparación entre un sistema de transporte por difusión simple y otro por difusión facilitada.

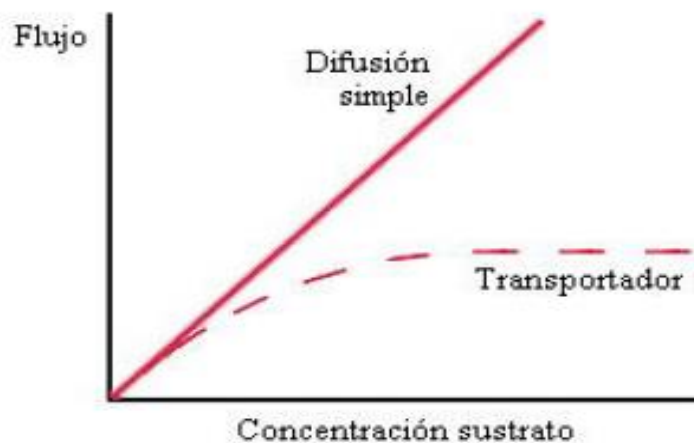


Figura 4. Comparación entre difusión simple y difusión facilitada. Al ocupar el sustrato todos los sitios de unión del transportador, el transporte se satura, cosa que no ocurre en la difusión simple, donde un aumento de la concentración de sustrato induce un mayor flujo. Velázquez, 2005.

2.4.2.2. TRANSPORTE ACTIVO

Los sistemas de transporte activo, a menudo llamados *bombas*, transportan sustancias a través de la membrana en contra del gradiente electroquímico. Se han identificado dos tipos de transporte activo: primario y secundario, los cuales se diferencian en que el primero transporta iones o moléculas a través de la membrana en contra de su gradiente de concentración, utilizando como fuente de energía la hidrólisis del ATP, generando a su vez, un potencial químico que es aprovechado por los transportadores secundarios para traslocar simultáneamente dos o más moléculas, de manera que una atravesará la membrana siguiendo su gradiente de concentración y las otras serán transportadas en contra de su gradiente. Los sistemas de transporte activo poseen cinética saturable, son específicos y presentan variabilidad de expresión regional (Carl y col., 2007). Los enterocitos expresan una variedad de transportadores, sin embargo son pocos los conocidos que desempeñan una función clave en la absorción de fármacos. Los transportadores ABC (Adenosine Triphosphate Binding Cassette) utilizan ATP para el transporte de moléculas. Por otro lado, los transportadores SLC (Solute Carrier), utilizan principalmente gradientes iónicos creados a través de la membrana por los transportadores activos primarios (Tsuji y Tamai, 1996). En la tabla 4 se muestra los principales transportadores involucrados en las superfamilias que transportan fármacos en el humano.

Tabla 4. Principales transportadores de influjo y eflujo en el intestino humano involucrados en el transporte de fármacos. Modificada de El-Kattan y Varma, 2012.

Superfamilia	Proteína transportadora	Orientación	Fármaco sustrato
ABC	<i>Gen 1 de resistencia a multifármacos</i> gp-P (glicoproteína-P)/ MDR1	Eflujo apical	Ciclosporina A, digoxina, docetaxel, doxorubicina, eritromicina, fexofenadina
	<i>Proteína de resistencia del cáncer de mama</i> BCRP	Eflujo apical	Ciprofloxacino, erlotinib, furosemida, hidroclorotiazida, paclitaxel, quinidina
	<i>Proteínas de resistencia a multifármacos:</i> MRP1 MRP2 MRP3 MRP4	Eflujo basolateral	Doxorrubicina, epirubicina, metotrexato, vincristina
		Eflujo apical	Indinavir, saquinavir, vinblastina, metotrexato
Eflujo basolateral		Etopósido, metotrexato	
Eflujo apical		Ceftizoxima, topotecán	
SLC	<i>Transportador de péptidos</i> PepT1	Influjo apical	Ampicilina, captopril, cefalexina, enalapril, valaciclovir
	<i>Polipéptidos transportadores de aniones orgánicos:</i> OATP1A2 OATP2B1	Influjo apical	Fexofenadina, levofloxacino, metotrexato, saquinavir
		Influjo apical	Atorvastatina, fluvastatina, pravastatina, rosuvastatina
	<i>Transportador de monocarboxilatos</i> MCT1	Influjo apical	Ketoprofeno, naproxeno, propicilina, feneticilina
	<i>Transportador de multivitaminas dependientes de sodio</i> SMVT	Influjo apical	Gabapentina
	<i>Transportadores de cationes orgánicos y zwitteriones:</i> OCTN1 OCTN2	Influjo apical	Quinidina, verapamilo
Influjo apical		Imatinib, quinidina, verapamilo	

2.4.3. OTROS SISTEMAS DE TRANSPORTE

ENDOCITOSIS

Este mecanismo de transporte implica el englobamiento de moléculas disueltas en el fluido luminal mediante la formación de una invaginación de la membrana plasmática que posteriormente se cierra al fusionarse los bordes de la cavidad formada, dando lugar a una vacuola que es liberada en el citosol (Velázquez, 2005).

TRANSCITOSIS

El soluto unido a un receptor de superficie de membrana, es internalizado por endocitosis y transportado en la vesícula internalizada hacia la membrana basolateral, donde es liberado. Este tipo de mecanismo es complejo y tiene baja capacidad de transporte, por lo que solo es de importancia para moléculas de fármacos muy grandes que son activos a bajas concentraciones (Swaan 1998).

2.5. SISTEMA DE CLASIFICACIÓN BIOFARMACÉUTICA

En 1977 Ho y col. afirmaron que las características de absorción de un fármaco están asociadas a las propiedades fisicoquímicas del compuesto y a las propiedades biofisicoquímicas de la barrera del tracto gastrointestinal. Estos principios fundamentales fueron estudiados extensamente y condujeron al establecimiento de un Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS, Biopharmaceutical Classification System), en el cual las características de absorción del fármaco se establecen con base en sus características de solubilidad acuosa y permeabilidad de la membrana (Amidon y col., 1995). Este sistema de clasificación fue introducido para reducir la necesidad de realizar estudios *in vivo*, mediante el empleo de estudios de disolución *in vitro* como sustituto de los estudios de bioequivalencia. De acuerdo con el BCS, los fármacos se clasifican en 4 grupos (Tabla 5).

Un fármaco es considerado altamente soluble cuando la dosis más alta es soluble en 250 mL o menos, de medio acuoso en un rango de pH de 1.0-7.5 (CDER/FDA, 2006). La clasificación de la permeabilidad se basa directamente en la absorción intestinal de una molécula en humanos o indirectamente en las mediciones de la velocidad de transferencia de masa a través de la membrana intestinal humana. Una sustancia es considerada altamente permeable cuando la cantidad absorbida es del 90% o mayor (CDER/FDA, 2006).

Tabla 5. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS).

Clase	Solubilidad	Permeabilidad	Ejemplos
I	Alta	Alta	Propranolol Metoprolol Diltiazem Verapamilo
II	Baja	Alta	Fenitoína Danazol Ketoconazol Ácido mefenámico
III	Alta	Baja	Ranitidina Aciclovir Captopril Neomicina B
IV	Baja	Baja	Taxol Furosemida Hidroclorotiazida

2.6. DETERMINACIÓN DE LA PERMEABILIDAD DE UN FÁRMACO

La permeabilidad de un fármaco puede determinarse en humanos empleando métodos como balance de masa, biodisponibilidad absoluta o técnicas de perfusión intestinal. Los métodos que no involucran humanos incluyen a la perfusión intestinal *in vivo* o *in situ* en un modelo animal adecuado (por ejemplo, ratas) y/o métodos *in vitro* utilizando tejidos intestinales extirpados de humano o animal, o estudios a través de monocapas de cultivos celulares (CDER, 2000). Para evaluar la permeabilidad de una molécula, la guía de la FDA recomienda el uso de dos estándares internos (un fármaco de alta permeabilidad y uno de baja) que deben ser incluidos en el líquido de perfusión o fluido donador junto con el fármaco en estudio, además de la adición de un compuesto de permeabilidad cero (polietilenglicol 4000 o rojo de fenol) como marcador del volumen del fluido, incluido en ciertos tipos de técnicas de perfusión (por ejemplo, Perfusión intestinal de un solo paso)(CDER, 2000). La tabla 6 lista algunos estándares internos sugeridos por la FDA para caracterizar la permeabilidad de fármacos.

Tabla 6. Fármacos sugeridos para clasificar la permeabilidad de nuevas moléculas. Modificada de Löbenberg y Amidon, 2000.

Fármaco	Permeabilidad (Clase)	Observaciones
Alfametildopa	Baja	Transportador de aminoácidos
Antipirina	Alta	Estándar interno
Atenolol	Baja	Estándar interno, paracelular
Cafeína	Alta	
Carbamazepina	Alta	
Hidroclorotiazida	Baja	Clase IV
Furosemida	Baja	Clase IV
Ketoprofeno	Alta	
Manitol	Baja	Estándar interno
Metopropol	Alta	Estándar interno, marcador de alta a baja
Naproxeno	Alta	
Polietilenglicol 400-4000	Baja	PEG 4000 puede usarse como marcador no absorbible para estudios in vivo
Rojo de fenol		Marcador no absorbible
Propranolol	Alta	Estándar interno, clase I
Ranitidina	Baja	Estándar interno, clase III
Teofilina	Alta	
Verapamilo	Alta	Candidato para caracterización del eflujo de glicoproteína-P en sistemas in vitro

2.7. METODOLOGÍAS UTILIZADAS PARA EVALUAR LA PERMEABILIDAD INTESTINAL Y LA ABSORCIÓN

Existen diferentes métodos para evaluar la permeabilidad, los cuales se dividen en: métodos *in silico*, métodos fisicoquímicos y métodos *in vitro*, métodos *in vivo* y métodos *in situ*. A continuación se presentan las técnicas que han sido más utilizadas, así como sus ventajas y desventajas.

2.7.1. MÉTODOS *IN SILICO*

Los modelos *in silico* pueden predecir la permeabilidad de los fármacos con base en su lipofilia, capacidad para formar enlaces de hidrógeno, tamaño molecular, área de superficie polar (PSA) y propiedades cuánticas. Un modelo *in silico* predictivo puede reducir el tiempo requerido para la síntesis, así como estudios experimentales de miles de moléculas. La relación estructura- propiedad cuantitativa (QSPR) predice la absorción intestinal humana sin la síntesis real del compuesto. En 1999, Stenberg y col. demostraron que los descriptores de superficie molecular y descriptores

mecanocuánticos son más útiles que la simple “regla de cinco” (Lipinski y col., 1997) como predictor de la absorción intestinal. El principal impedimento para el modelado *in silico* es la falta de una base de datos suficientemente grande con información segura. Estos métodos no son tan confiables como los datos experimentales reales en la predicción de la permeabilidad y las características de absorción de los compuestos. Sin embargo, a pesar de las limitaciones, existen paquetes de software disponibles comercialmente (QMPRplus y Oraspotter) que incorporan la metodología *in silico* para la predicción *in vivo* de números de absorción.

2.7.2. MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS

En la administración oral, la exposición sistémica del fármaco depende de diferentes factores. Las propiedades fisicoquímicas del compuesto son determinantes de la permeabilidad intestinal. Esto incluye: el peso molecular, pka, lipofilia ($\log P/\log D$), carga/ ionización, solubilidad, pH gastrointestinal y tamaño molecular (Figura 5). A pesar de que los parámetros fisicoquímicos pueden ser usados para predecir las características de permeabilidad de los compuestos, su alcance está limitado ya que no se toman en cuenta las interacciones fármaco-membrana u otros factores que pueden alterar las propiedades fisicoquímicas.

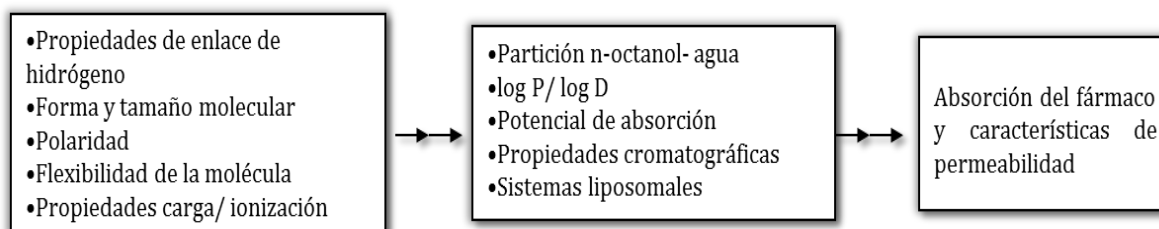


Figura 5. Principales parámetros fisicoquímicos considerados para la predicción de la absorción de fármacos.

2.7.2.1. Lipofilia (log P/log D)

La lipofilia es uno de los parámetros fisicoquímicos más importantes en la predicción e interpretación de la permeabilidad de la membrana. El coeficiente de partición octanol-agua (log P) ha sido aceptado como referencia para predecir la absorción en sistemas biológicos. Este parámetro proporciona información indirecta de la cantidad de transporte pasivo transcelular. En la actualidad se sabe que el uso del log P para predecir la absorción es una simplificación excesiva de un proceso complejo, y no es exacta, dado que se sabe que el transporte a través de las membranas biológicas implica varios mecanismos (Balimane et al., 2000).

2.7.2.2. Ensayo de Permeabilidad en Membranas Artificiales Paralelas (PAMPA)

En 1998, Kansy y colaboradores mostraron la utilidad y predicción del ensayo de permeabilidad en membranas artificiales paralelas (PAMPA, parallel artificial membrane permeability assay) como una herramienta de alto rendimiento para la determinación de la permeabilidad en el descubrimiento de fármacos. Consiste en placas de microtitulación de 96 pocillos que contienen filtros hidrofóbicos que son revestidos con una mezcla de lecitina y un disolvente orgánico inerte, el cual forma una membrana lipídica artificial (Buckley y col., 2012). El grado de permeación a través de la membrana se mide y compara con la cantidad conocida de la absorción del fármaco en humanos. La limitación de este modelo es que PAMPA subestima la absorción de compuestos que son transportados a través de transporte activo, o compuestos hidrofílicos con bajo peso molecular (Avdeef, 2005).

2.7.3. MÉTODOS *IN VITRO*

2.7.3.1. Modelos empleando tejidos animales

Los modelos de tejidos animales se han utilizado desde los años 50s para explorar el mecanismo de absorción de los nutrientes del intestino. Algunos de los métodos utilizados para los estudios de absorción y permeabilidad son: la técnica del intestino invertido (Balimane y col., 2000), el transporte *in vitro* a través del segmento intestinal (Cámara de Ussing) (Ungell y col., 1998) y las vesículas de membrana aisladas. Sin embargo, es difícil de mantener la viabilidad de los tejidos extirpados ya que carecen del suministro directo de sangre y necesitan constante oxigenación.

2.7.3.2. Métodos *in vitro* empleando cultivos celulares

Se han empleado numerosos modelos de cultivo celular para estudiar la permeabilidad y propiedades de absorción de fármacos a través de la barrera intestinal (Tabla 7). Estos modelos muestran características estructurales y biológicas del epitelio intestinal diferenciado (por ejemplo, microvellos y uniones estrechas), además de expresar diferentes transportadores de fármacos y enzimas metabólicas. Sin embargo, debido a su naturaleza biológica, presentan un alto grado de variabilidad, además de un tiempo de cultivo prolongado previo a los experimentos, son laboriosos y costosos (Le Ferrec y col., 2001; Buckley y col., 2012).

Tabla 7. Algunos modelos celulares utilizados en estudios *in vitro* para evaluar la permeabilidad de fármacos. Modificada de Buckley y col., 2012.

Línea celular	Origen	Propiedades
Caco-2	Humano	Derivado de adenocarcinoma de colon. Expresan un gran número de transportadores
HT29-MTX	Humano	Línea celular productora de mucosa. Permite el estudio de la interacción del fármaco con la mucosa
MDCK	Canino	Epitelio renal. Expresa baja cantidad de transportadores y actividad metabólica. Permite estudiar interacciones con transportadores individuales
TC7	Humano	Clon de Caco-2. Mayor homogeneidad y ofrece resultados con menor variabilidad que Caco-2
2/4/A1	Rata	Útil para la evaluación de compuestos transportados por vía paracelular

2.7.3.2.1. Células Caco-2

Las células Caco-2 (adenocarcinoma de colon humano) son el modelo celular más utilizado y extensamente caracterizado en el campo de la permeabilidad y absorción de fármacos (Borchardt, 1995; Rubas et al., 1996), una vez que alcanza la confluencia en un filtro poroso semipermeable, la polaridad celular, y las uniones estrechas están bien establecidas (Van Breemen y Li, 2005). Se ha demostrado la predicción y utilidad de este modelo para clasificar un gran número de compuestos en términos del potencial de absorción (Chong et al., 1997). Este modelo mide el transporte pasivo de fármacos (transcelular y paracelular). Se ha reportado que los transportadores importantes se encuentran subexpresados en las células Caco-2, al compararlos con resultados de estudios *in vivo*. El uso de cantidades apreciables de cosolventes orgánicos está limitado porque compromete la integridad de las uniones estrechas entre las células. Por ello, un número significativo de fármacos con pobre solubilidad acuosa no son evaluados con este modelo. La preparación de una monocapa celular funcional generalmente requiere un periodo de cultivo de 3 semanas (Da violante y col., 2004).

2.7.3.2.2. Células MDCK

Las células MDCK (epitelio renal canino Madin-Darby) se diferencian en células epiteliales columnares y forman uniones estrechas cuando se cultivan sobre membranas semipermeables. El uso de la línea celular MDCK como modelo para evaluar las características de transporte intestinal de los compuestos se discutió por primera vez en 1989 (Cho y colaboradores). Existe buena correlación entre los valores de permeabilidad obtenidos en células MDCK y Caco-2 (Putnam y col., 2002). Una de las principales ventajas de las células MDCK sobre las células Caco-2 es su periodo de cultivo, el cual es más corto (3 días contra 3 semanas) (Irvine y col., 1999).

2.7.4. MÉTODOS *IN VIVO*

Basado en la similitud de la composición de las membranas celulares epiteliales de los mamíferos, y el hecho de que la absorción es básicamente una interacción entre el fármaco y la membrana biológica, la permeabilidad a través del tracto gastrointestinal debe ser similar entre las especies. Sin embargo, existen factores fisiológicos como el pH, motilidad gastrointestinal, tiempo de tránsito y diferente distribución de las enzimas y transportadores que pueden afectar la absorción originando variabilidad entre las especies. A pesar de ser un método costoso, la evaluación *in vivo* de la absorción de fármacos en animales de laboratorio es un método comúnmente utilizado para predecir la cantidad absorbida de un fármaco en humanos. La comparación de los valores de ABC (área bajo la curva) de la administración intravenosa y la oral, permiten determinar la cantidad absoluta absorbida *in vivo*. Este método es capaz de diferenciar los compuestos bien absorbidos de los compuestos pobremente biodisponibles (Kararli, 1995; Lin, 1995).

2.7.5. MÉTODO *IN SITU*

La perfusión intestinal de un solo paso (SPIP, single-pass intestinal perfusion) en ratas ha demostrado ser un método preciso para predecir la absorción oral en el humano (Kim y col., 2006; Lennernas, 2007). Por tanto, la FDA incluye al modelo SIPP como una herramienta para la evaluación de la permeabilidad y la caracterización de un fármaco de acuerdo al BCS (CDER, 2000).

La SPIP se refiere a la perfusión a velocidad constante de un fármaco en solución, a través de un segmento intestinal aislado y canulado, desde la porción proximal. Las muestras son recolectadas en la porción distal a intervalos de tiempo definidos (Figura 6a). La absorción se evalúa con respecto a la desaparición del fármaco en el segmento intestinal perfundido (Volpe, 2010; Reis y col., 2013) (Figura 6b). Este método proporciona condiciones experimentales similares a las que se encuentran después de la administración oral, con baja sensibilidad a variaciones de pH. La presencia de un flujo sanguíneo intacto al intestino, nervios, y la capacidad de depuración en el sitio de absorción corroboran que éste es un excelente sistema experimental que imita las condiciones *in vivo*. Además, la entrada de los compuestos puede ser controlada de acuerdo a la concentración, pH, velocidad de flujo, región intestinal, etc. Esta técnica también permite estimar el impacto de las enzimas y transportadores que están presentes en el intestino, y requiere también un menor tiempo de experimentación. Por ello, la perfusión intestinal en ratas proporciona una mejor predicción de la fracción de dosis oral absorbida en el humano que los modelos *in vitro* (Salphati y col., 2001).

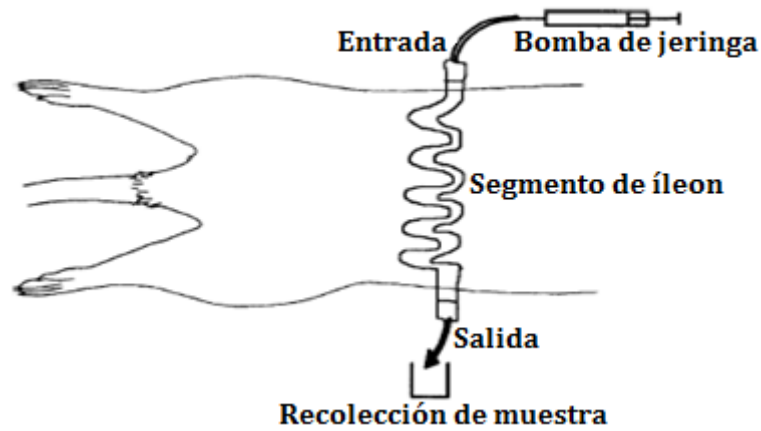


Figura 6a. Técnica de perfusión intestinal *in situ*.
Modificada de Salphati y col., 2001.

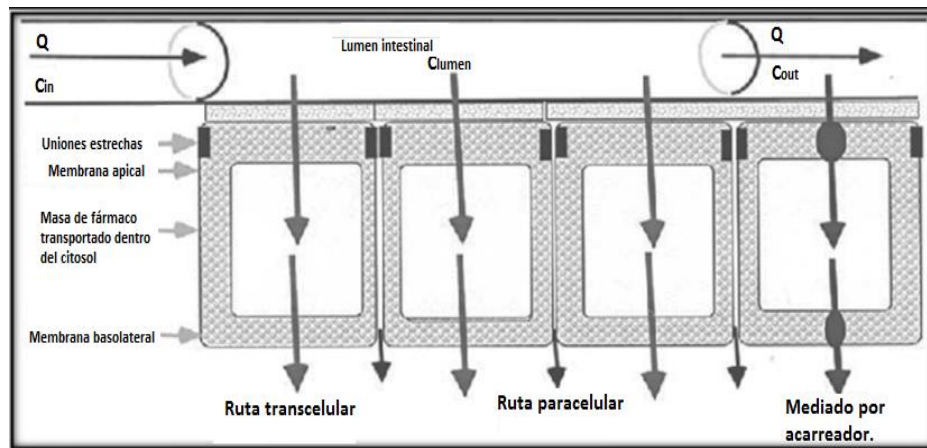


Figura 6b. Transporte de fármacos a través del epitelio intestinal durante la perfusión intestinal de un solo paso (SIPP). C_{in} , concentración del fármaco a la entrada; C_{out} , concentración del fármaco a la salida; Q , velocidad de perfusión en el lumen. Modificada de Dressman y Lennernäs, 2000.

En la perfusión de un solo paso, la permeabilidad efectiva neta (P_{eff}) se calcula:

$$P_{eff} \text{ (cm/s)} = \frac{-Q \ln(C'_{out}/C'_{in})}{2\pi RL}$$

Donde Q es la velocidad de flujo de la solución de perfusión, C'_{out}/C'_{in} es la relación de la concentración de salida y la concentración de entrada o inicial del compuesto evaluado que ha sido ajustado por el transporte de agua, R es el radio del segmento intestinal y L es la longitud del segmento intestinal.

Al utilizar técnicas *in situ* se debe tener en cuenta que, la alteración del volumen de la solución del fármaco en el lumen (debido a la absorción y secreción de agua durante la perfusión), puede introducir errores en las concentraciones luminales, y por tanto, en el coeficiente de permeabilidad efectiva calculado. Para subsanar este problema, se han publicado varios métodos para la corrección del flujo de agua, los cuales incluyen la coperfusión de un marcador “no absorbible” como el rojo de fenol, la inulina o ^{14}C PEG 4000 (Ecuación 1). Como alternativa, puede aplicarse también un método gravimétrico usando la ecuación 2 (Sutton y Rinaldi., 2001), el cual involucra la determinación del peso de las muestras de perfusión a intervalos de tiempo definidos y su conversión a un parámetro volumétrico.

$$C_{out}^{corregida} = C_{out} \cdot \frac{[\text{Concentración del marcador}_{in}]}{[\text{Concentración del marcador}_{out}]} \quad (1)$$

$$C_{out}^{corregida} = C_{out} \cdot \frac{Q_{out}}{Q_{in}}$$

Donde Q_{in} es la velocidad de flujo medida a la entrada y Q_{out} la velocidad de flujo medida a la salida del segmento intestinal (peso neto de la muestra \div el intervalo de tiempo de muestreo), asumiendo una densidad de la solución de perfusión de 1.0 g/mL.

(2)

Entre las desventajas del método *in situ* se encuentran: a) El número de animales requerido para obtener datos de absorción estadísticamente significativos. b) La manipulación quirúrgica del intestino combinado con la anestesia puede producir un cambio significativo en el flujo sanguíneo al intestino y ocasionar un efecto notable sobre la velocidad de absorción (Uhing y Kimura, 1995). c) Si el fármaco en estudio es metabolizado por los enterocitos, entonces su desaparición del lumen intestinal no reflejaría la aparición del fármaco en la sangre (Watkins y col., 1987).

A pesar de estas desventajas, la técnica de perfusión intestinal en rata es una poderosa herramienta de investigación, que ha demostrado tener muy buena correlación con datos *in vivo* (Chiou y Barve, 1998).

2.8. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS Y BIOANALÍTICOS

La validación es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado. En estudios de permeabilidad *in situ*, es necesario contar con métodos analíticos confiables para la cuantificación de los fármacos en las muestras de perfusión. De acuerdo con la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-177-SSA1-2013, los parámetros para validar una metodología analítica son los siguientes (Tabla 8):

Tabla 8. Parámetros y criterios de aceptación requeridos para validar un método analítico de acuerdo a lo establecido en la NOM- 177- SSA1- 2013.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO	
Parámetro de validación	Criterio de aceptación
Selectividad	No deben existir interferencias en la cuantificación de los compuestos por analizar
Recuperación absoluta	La recuperación no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango.
Linealidad	$r > 0.99$; $r^2 > 0.98$ %ERR ≤ 3
Precisión	%CV del factor de respuesta ≤ 3
Exactitud	%DEA ≤ 3
Límite de cuantificación	%CV ≤ 3
Estabilidad	%DEA ≤ 3 %CV ≤ 3

r: coeficiente de correlación; r^2 : coeficiente de determinación; %ERR: error relativo debido a la regresión (%); %CV: coeficiente de variación (%); %DEA: desviación estándar absoluta (%).

RANGO. Es el intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

SELECTIVIDAD. Es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

RECUPERACIÓN ABSOLUTA. Es la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra.

LINEALIDAD. Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra. También se le conoce como *Función Respuesta*.

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

- **Repetibilidad:** Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.
- **Reproducibilidad:** Precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas.

EXACTITUD. Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia (como valor verdadero o de aceptación).

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN. Es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

ESTABILIDAD. Es la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Implementar un método *in situ* para evaluar la permeabilidad de moléculas, utilizando íleon de rata.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Validar el método analítico para la cuantificación de clorhidrato de propranolol y el método analítico para la cuantificación de clorhidrato de ranitidina.
- 2.- Desarrollar la técnica quirúrgica en la rata y encontrar la tubería adecuada a utilizar en los experimentos.
- 3.- Evaluar la permeabilidad de clorhidrato de propranolol (control de alta permeabilidad) y clorhidrato de ranitidina (control de baja permeabilidad), expresado en términos de coeficiente de permeabilidad efectiva (P_{eff}) en la sección ileal de la rata.

4. HIPÓTESIS

El método *in situ* en modelo de rata, será simple, rápido, confiable y exacto para evaluar la permeabilidad de fármacos.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

5.1.1. REACTIVOS:

- Estándar de clorhidrato de propranolol (USP).
- Estándar de clorhidrato de ranitidina (USP).
- Cloruro de sodio (NaCl), J.T. Baker.
- Cloruro de potasio (KCl), J.T. Baker.
- Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄), J.T. Baker.
- Fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄), J.T. Baker.
- Rojo de fenol, Golden Bell.
- Solución de perfusión: 160 µg/mL de clorhidrato de propranolol, 80 µg/mL de clorhidrato de ranitidina y 12.5 µg/mL de rojo de fenol.
- Buffer de fosfatos salino pH 7.4
- Buffer de fosfatos 10mM pH 7.6
- Metanol grado HPLC, J.T. Baker.
- Fase móvil.
 - Metanol grado HPLC: Buffer de fosfatos 10 mM pH 7.6 (80:20).
 - Metanol grado HPLC: Buffer de fosfatos 10 mM pH 7.6 (50:50).
- Agua desionizada.
- Solución de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N.
- Solución salina 0.9 %, Pisa.
- Solución inyectable de clorhidrato de ketamina. Pisa.
- Solución inyectable de clorhidrato de xilacina, Pisa.

5.1.2. MATERIALES Y EQUIPOS

- Tubo de plástico de 2 mm de diámetro interno.
- Llaves de 3 pasos.
- Hilo de seda para sutura 3-0.
- Jeringas de 1 mL.
- Jeringas de 30 mL HSW.
- Gasas estériles.
- Herramientas para cirugía:
 - Mango de bisturí No. 4
 - Hoja de bisturí No. 10
 - Pinzas de disección de acero inoxidable.
- Máquina rasuradora eléctrica, Oster.
- Lámpara de 60 watts.
- Almohadilla térmica (43 X 32 cm) FH100, Microlife.
- Baño de agua Imperial IV, Lab line.
- Bomba de Jeringa New Era (NE-1000), Multi-Phaser™
- Tubos Eppendorf.
- Balanza analítica A210P, Sartorius.
- Micropipeta Eppendorf de 100-1000 µL.
- Micropipeta Eppendorf de 500-5000 µL.
- Potenciómetro 410 A+, Thermo Orion.
- Filtros de membrana de 0.45 µm.
- Baño de ultrasonido FS60, Fisher Scientific.
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, Shimadzu LC-10AD *vp*.

5.1.3.- MATERIAL BIOLÓGICO

- Ratas Wistar albino macho (260- 300 grs.).

5.2. VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLORHIDRATO DE PROPRANOLOL Y CLORHIDRATO DE RANITIDINA

5.2.1. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO Y FASE MÓVIL

5.2.1.1. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS SALINO pH 7.4

Se pesaron por separado, 8.064 g de cloruro de sodio (NaCl) , 0.201 g de cloruro de potasio (KCl), 1.149 g de fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄) y 0.204 g de fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄); se transfirieron a un vaso de precipitados de un litro, se disolvieron en aproximadamente 250 mL de agua desionizada y bajo agitación magnética se llevó con el mismo disolvente hasta un volumen de 900 mL, inmediatamente se ajustó cuidadosamente el pH por adición de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, una vez efectuado esto, el contenido se transfirió a un matraz volumétrico de un litro y se llevó al aforo con agua desionizada. La solución se filtró a través de un filtro membrana con tamaño de poro de 0.45 µm.

5.2.1.2. SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 10 mM pH 7.6

Se pesaron por separado 0.387 g de KH₂PO₄ y 1.015 g Na₂HPO₄; se transfirieron a un vaso de precipitados de un litro, se disolvieron en 250 mL de agua desionizada y bajo agitación magnética se llevó a un volumen de 900 mL aproximadamente con el mismo disolvente, inmediatamente se ajustó cuidadosamente el pH por adición de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N; una vez efectuado esto, el contenido se transfirió a un matraz volumétrico de un litro y se llevó al aforo con agua desionizada. La solución se filtró a través de un filtro membrana con tamaño de poro de 0.45 µm.

5.2.1.3. SOLUCIÓN STOCK DE CLORHIDRATO DE PROPRANOLOL (1000 µg/mL)

Se pesaron con exactitud 10 mg de clorhidrato de propranolol (propranolol) y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvieron en aproximadamente 4 mL de solución buffer de fosfatos salino pH 7.4 y se llevó al punto de aforo con la misma solución.

5.2.1.4. SOLUCIÓN STOCK DE CLORHIDRATO DE PROPRANOLOL (100 µg/mL)

Se tomó una alícuota de 2.5 mL de la solución stock de clorhidrato de propranolol de 1000 µg/mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL, se llevó al aforo con la solución buffer de fosfatos salino.

5.2.1.5. SOLUCIÓN STOCK DE CLORHIDRATO DE RANITIDINA (1000 µg/mL)

Se pesaron con exactitud 10 mg de clorhidrato de ranitidina (ranitidina) y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvieron en aproximadamente 4 mL de solución buffer de fosfatos salino pH 7.4 y se llevó al punto de aforo con la misma solución.

5.2.1.6. SOLUCIÓN STOCK DE CLORHIDRATO DE RANITIDINA (100 µg/mL)

Se tomó una alícuota de 2.5 mL de la solución stock de clorhidrato de ranitidina de 1000 µg/mL y se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL, se llevó al aforo con la solución buffer de fosfatos salino.

5.2.1.7. SOLUCIÓN STOCK DE ROJO DE FENOL (50µg/mL)

Se pesaron 12.5 mg de rojo de fenol, se transfirieron a un matraz volumétrico de 250 mL, se disolvieron en aproximadamente 80 mL de solución buffer de fosfatos salino y se llevó al aforo con la misma solución.

5.2.1.8. SOLUCIÓN STOCK DE ROJO DE FENOL (5µg/mL)

Se tomó una alícuota de 2.5 mL del stock de rojo de fenol de 50 µg/mL, se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL y se llevó al punto de aforo con la solución buffer de fosfatos salino.

5.2.1.9. SOLUCIÓN DE CLORHIDRATO DE PROPRANOLOL (16 µg/mL) Y CLORHIDRATO DE RANITIDINA (8 µg/ mL)

A partir del stock de 100 µg/mL de clorhidrato de propranolol, se tomó una alícuota de 1600 µL y se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL. Posteriormente, se tomó una alícuota de 800 µL del stock de 100 µg/mL de clorhidrato de ranitidina, se transfirió al mismo matraz y se llevó al aforo con solución amortiguadora de fosfatos salino.

5.2.1.10. FASES MÓVILES

La fase móvil empleada para la cuantificación de propranolol fue: metanol- solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.6 (80:20), la cual se preparó de la siguiente manera: Se filtraron 400 mL de metanol grado HPLC empleando un filtro de membrana con tamaño de poro de 0.45 µm y se transfirieron a un frasco de vidrio de 0.5 L, se le agregaron 100 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.6 y se mezclaron. La mezcla se desgasificó con ultrasonido durante 20 minutos.

La fase móvil empleada para la cuantificación de ranitidina y rojo de fenol fue: metanol- solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.6 (50:50) y se preparó de la siguiente manera: Se filtraron 250 mL de metanol grado HPLC empleando un filtro de membrana con tamaño de poro de 0.45 µm y se transfirieron a un frasco de vidrio de 0.5 L, se le agregaron 250 mL de la solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.6 y se mezclaron. La mezcla se desgasificó con ultrasonido durante 20 minutos.

5.2.1.11. SOLUCIÓN DE PERFUSIÓN

La solución de perfusión contenía 160 µg/mL de clorhidrato de propranolol, 80 µg/mL de clorhidrato de ranitidina y 12.5 µg/mL de rojo de fenol.

Para ello se pesaron por separado 40.0 mg de clorhidrato de propranolol, 20.0 mg de clorhidrato de ranitidina, se transfirieron a un matraz volumétrico de 250 mL y se disolvieron en aproximadamente 70 mL de solución amortiguadora de fosfatos salino. Posteriormente se adicionaron 62.5 mL de rojo de fenol del stock de 50 µg/ mL y se llevó al aforo con la solución buffer.

5.2.2. PREPARACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN

5.2.2.1. Curvas de calibración de clorhidrato de propranolol y clorhidrato de ranitidina

El rango de trabajo utilizado para los dos fármacos fue el siguiente:

Clorhidrato de propranolol: 1.0- 20 µg/mL.

Clorhidrato de ranitidina: 2-36 µg/mL.

La preparación de las curvas se llevó a cabo de la siguiente manera:

A partir de la solución stock de 100 µg/mL de propranolol y de ranitidina, se tomaron las alícuotas correspondientes para cada nivel de concentración, se transfirieron a matraces de 10 mL, de manera que ambos fármacos se mezclaron, y se aforaron con la solución buffer de fosfatos salino. En la tabla 9 se muestran las alícuotas correspondientes para la preparación de cada punto de las curvas.

Tabla 9. Preparación de las curvas de calibración de propranolol y ranitidina.

Alícuota de la solución Stock de 100 µg/mL correspondiente (µl)		Volumen final (mL)	Concentración final (µg/mL)	
Propranolol	Ranitidina		Propranolol	Ranitidina
100	200	10	1.0	2.0
200	400	10	2.0	4.0
300	600	10	3.0	6.0
500	1000	10	5.0	10.0
1000	1800	10	10.0	18.0
2000	3600	10	20.0	36.0

5.2.2.2. CURVA DE CALIBRACIÓN DE ROJO DE FENOL

Rango de trabajo: 0.5- 2.0 µg/mL.

La curva de rojo de fenol se preparó a partir del stock de 5.0 µg/mL, se tomaron las alícuotas correspondientes, se transfirieron a matraces volumétricos de 5 mL y se llevaron al punto de aforo con la solución amortiguadora de fosfatos salino. La tabla 10 muestra las alícuotas tomadas.

Tabla 10. Preparación de la curva de calibración de rojo de fenol.

Alícuota del stock de 5.0 µg/mL (µL)	Volumen final (mL)	Concentración de rojo de fenol (µg/mL)
500	5	0.5
1000	5	1.0
1250	5	1.25
1500	5	1.5
2000	5	2.0

5.2.2.3. PREPARACIÓN DE LOS PUNTOS CONTROL

Los puntos control (bajo, medio y alto) utilizados en la validación del método de cuantificación de clorhidrato de ranitidina (3.0, 17.0 y 33.0 µg/mL) y para clorhidrato de propranolol (1.5, 9.0 y 18.0 µg/mL) se prepararon a partir del stock de 100 µg/mL respectivo. Se tomaron las alícuotas correspondientes (Tabla 11), se transfirieron a matraces de 10 mL a manera que cada punto control contuviera ambos fármacos, y finalmente se llevó al punto de aforo con solución buffer de fosfatos salino.

Tabla 11. Preparación de los puntos control.

Puntos control	Alícuota de la solución stock de 100 µg/mL correspondiente (µL)		Volumen final (mL)	Concentración final (µg/mL)	
	Propranolol	Ranitidina		Propranolol	Ranitidina
Bajo	150	300	10	1.5	3
Medio	900	1700	10	9	17
Alto	1800	3300	10	18	33

5.2.3. MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE CLORHIDRATO DE PROPRANOLOL Y CLORHIDRATO DE RANITIDINA

5.2.3.1. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Se realizó un barrido en la región del ultravioleta a los estándares (190- 390 nm), para encontrar la longitud de máxima absorción de cada compuesto. Para ello se prepararon por separado soluciones de los estándares a una concentración de 10 µg/ mL, y 12.5 µg/mL para rojo de fenol, en solución amortiguadora de fosfatos salino pH 7.4. Una vez identificadas las longitudes de máxima absorción respectivas, se preparó una solución conteniendo los dos estándares y el rojo de fenol en las mismas concentraciones empleadas para hacer el barrido, y se evaluaron diferentes condiciones cromatográficas, como, velocidad de flujo y proporción de fase móvil. En la tabla 12 se muestran las mejores condiciones encontradas para cada uno de los compuestos bajo estudio.

Tabla 12. Condiciones cromatográficas utilizadas para la cuantificación de propranolol, ranitidina y rojo de fenol.

Condiciones cromatográficas*	Clorhidrato de propranolol	Clorhidrato de ranitidina	Rojo de fenol
Fase móvil	Metanol: Solución amortiguadora de fosfatos 10mM pH 7.6 (80:20)	Metanol: Solución amortiguadora de fosfatos 10mM pH 7.6 (50:50)	
Volumen de inyección (µL)	20		
Velocidad de flujo (mL/min)	1.0		
Longitud de onda (nm)	290	320	354
Tiempo de retención (min)	3.2	3	1.7
Tiempo de corrida (min)	5.0	4.5	2.5
Columna cromatográfica	Agilent Zorbax Eclipse XDB-C18, 5 µm, 4.6 x 150 mm		

* Todos los compuestos fueron analizados a temperatura ambiente.

Para la cuantificación se utilizó el área de los picos de los compuestos, los cuales se graficaron contra la concentración. Para calcular la concentración de propranolol y ranitidina en cada una de las muestras, se interpoló el área del pico obtenido de cada compuesto en la curva de calibración correspondiente a cada fármaco, las cuales se prepararon por duplicado previamente al análisis de las muestras (sección 5.2.2.1).

5.2.3.2. VALIDACIÓN

Con el fin de contar con métodos analíticos confiables para la cuantificación de los fármacos durante los estudios de permeabilidad, éstos se validaron de acuerdo con lo establecido en la NOM-177-SSA1-2013. Para los dos fármacos se evaluaron los siguientes parámetros: Selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación, estabilidad en el automuestreador durante 24 horas y efecto de la dilución.

5.2.3.2.1. Selectividad

La Selectividad se evaluó demostrando que no hay interferencia entre los componentes de las muestras en la cuantificación de cada uno de los compuestos.

Para ello se analizaron por quintuplicado blancos de solución de perfusión y muestras de solución de perfusión, que se sometieron a las condiciones cromatográficas de propranolol, ranitidina y rojo de fenol.

Criterio de aceptación: No debe existir interferencia de los componentes de la solución de perfusión blanco en los tiempos de retención de propranolol, ranitidina y rojo de fenol.

5.2.3.2.2. Linealidad

Para la linealidad del método se prepararon 3 curvas de calibración en los intervalos de concentración especificado en la sección 5.2.2.1.

A cada curva se le calculó el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m) y ordenada al origen (b). También se calculó el error relativo debido a la regresión (%ERR) para cada una de las curvas y para la curva promedio, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Error relativo debido a la regresión \%} = \frac{S_{y/x}}{\bar{Y}} \times 100$$

Donde:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - (\text{pendiente} \cdot \sum yx) - (\text{ordenada} \cdot \sum y)}{n-2}}$$

$S_{y/x}$: Desviación estándar (error estándar) de la regresión.

\bar{Y} : Promedio de la respuesta (área del pico).

x: Concentración.

y: Respuesta (área del pico)

n-2: Grados de libertad.

Criterio de aceptación: Un coeficiente de correlación (r) mayor a 0.99 y un %E.R.R. menor o igual al 3%.

5.2.3.2.3. Precisión y exactitud

La precisión se evaluó de acuerdo a lo establecido en la NOM-177-SSA1-2013. La metodología fue la siguiente: De los datos de linealidad obtenidos, se calculó el coeficiente de variación del factor de respuesta por curva y para la curva promedio. El factor respuesta se calculó dividiendo la respuesta obtenida (área del pico) para cada uno de los puntos de la curva entre su concentración correspondiente. A partir de estos resultados, se calculó el coeficiente de variación (%) para todos los puntos de la curva.

Criterio de Aceptación: El Coeficiente de variación del factor de respuesta deberá ser menor o igual al 3%.

La Exactitud se expresó en términos de porcentaje de Desviación Estándar Absoluta (%DEA) para cada uno de los niveles de concentración de la curva promedio, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%DEA = \left| \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración experimental}}{\text{Concentración nominal}} \right| \times 100$$

Criterio de aceptación: El valor de la desviación absoluta debe ser menor del 3%.

5.2.3.2.4. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se evaluó analizando en fresco, por quintuplicado la concentración más baja de la curva de calibración correspondiente a cada fármaco. De las áreas obtenidas se calcularon las concentraciones experimentales, se promediaron y se calculó el coeficiente de variación (%).

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación no debe ser mayor al 3%.

5.2.3.2.5. Estabilidad en el automuestreador durante 24 horas

Este parámetro se evaluó preparando en fresco, por triplicado, los puntos control bajo, medio y alto (sección 5.2.2.3). Las muestras permanecieron en el automuestreador por un periodo de 24 horas, al término de este tiempo fueron analizadas y se compararon contra puntos control frescos. Se calculó la desviación estándar absoluta (%) y el coeficiente de variación (%) para cada nivel de concentración.

Criterio de aceptación: La desviación estándar absoluta y el coeficiente de variación en cada nivel de concentración no deben ser mayor al 3%.

5.2.3.2.6. Efecto de la dilución

Se evaluó este parámetro, con el fin de asegurar que la dilución de las muestras no afecta la precisión y exactitud. A partir de la solución stock de propranolol (sección 5.2.1.4) y de ranitidina (sección 5.2.1.6), se prepararon por cuadruplicado soluciones conteniendo a ambos fármacos en una concentración de 16 µg/mL para propranolol y 8 µg/mL para ranitidina (la preparación de las soluciones se detalla en la sección 5.2.1.9). Así mismo, se prepararon por cuadruplicado diluciones 1/10 en solución amortiguadora de fosfatos salino pH 7.4, a partir de la solución de perfusión (160 µg/mL de propranolol y 80 µg/mL de ranitidina). Una vez que se analizaron las muestras, se determinó la concentración experimental de cada una de ellas y se promediaron, se calculó el coeficiente de variación (%) y la desviación estándar absoluta (%).

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación y la desviación estándar absoluta deben ser menores o iguales al 3%.

5.3. MODELO DE PERFUSIÓN *IN SITU* EN RATA

Los experimentos se llevaron a cabo en la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) del conjunto E de la facultad de Química. El protocolo fue aceptado por el Comité para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL). Se emplearon ratas Wistar albino macho, de 8 semanas de edad y un rango de peso de 260-300 g.

5.3.1. SOLUCIÓN DE PERFUSIÓN

De acuerdo con el BCS (Amidon y col., 1995), para estudios de permeabilidad *in situ*, la concentración de los fármacos en el líquido de perfusión se calcula dividiendo la dosis más alta administrada por vía oral entre un volumen convencional de 250 mL para representar la concentración máxima de los fármacos presentes en el segmento intestinal. En México, las dosis de propranolol y ranitidina son 160 y 150 mg, respectivamente, sin embargo, para nuestros objetivos se eligieron dosis más bajas para cada compuesto (40 mg para propranolol y 20 mg para ranitidina), para evitar que la columna cromatográfica pudiera saturarse. Esto es permitido cuando las concentraciones empleadas son clínicamente relevantes (Berggren y col., 2004).

5.3.2. RETENCIÓN DE LOS FÁRMACOS EN LA TUBERÍA

Se realizó un ensayo de perfusión de los fármacos con tiempos de muestreo seleccionados, sin la rata. Las muestras se recolectaron en intervalos de 10 minutos a los siguientes tiempos: 40, 50, 60, 70, 80 y 90 min, se diluyeron 1/10 en solución amortiguadora de fosfatos salino pH 7.4 y se analizaron empleando la metodología analítica descrita en la sección 5.2.3.1. Se calculó un porcentaje de recobro de los fármacos empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Recobro (\%)} = \frac{\text{Área del pico promedio del fármaco en las muestras}}{\text{Área del pico promedio del fármaco en la concentración de entrada (inicial)}} \times 100$$

Criterio de aceptación: El promedio de porcentaje de recobro de los fármacos debe estar entre 97-103%.

Con esto se asegura que las permeabilidades obtenidas en los experimentos, correspondan únicamente el paso de los fármacos a través de la mucosa intestinal.

5.3.3. ANESTESIA Y DOSIS

Durante todo el experimento de perfusión, la rata debe estar perfectamente anestesiada. Para el estudio se eligió como agente anestésico, una solución de clorhidrato de ketamina-clorhidrato de xilacina (9:1) a una dosis de 1.6 mL /kg de peso, administrada por vía intraperitoneal. En caso necesario se aplicó una cuarta parte de la dosis inicial a mitad del experimento.

5.3.4. CIRUGÍA Y PERFUSIÓN

5.3.4.1. CIRUGÍA

Una vez que se instalaron las ratas en el bioterio, se mantuvieron durante tres días en observación y aclimatación, y bajo condiciones de 12 horas luz-oscuridad.

Previo al experimento, permanecieron en ayuno 16 horas, con libre acceso al agua.

Cada rata se anestesió mediante una inyección intraperitoneal (1.6 mL/kg) de la solución de ketamina- xilacina (9: 1, respectivamente) y se colocó sobre una almohadilla térmica para mantener la temperatura corporal normal. También se utilizó una lámpara con foco de 60 watts para proporcionar calor. Se rasuró el área del abdomen donde se haría la incisión. Se realizó una incisión de línea media en el abdomen (3-4 cm).

Se aisló un segmento ileal de 8.5-13.5 cm. Se identificó la unión ileocecal como marcador distal. Se hicieron incisiones semicirculares en cada extremo.

Los extremos se canularon con un tubo de plástico (2.0 mm de diámetro interno) y ligaron con sutura de seda.

El segmento se cubrió con una gasa que fue humedecida constantemente con solución salina isotónica a 37°C.

5.3.4.2. PERFUSIÓN

Una vez aislado el segmento intestinal, el procedimiento a seguir fue el siguiente:

Se infundió blanco de perfusión pH 7.4 de la entrada (In) a la salida (Out), durante un tiempo de 10 min a una velocidad de flujo de 1.5 mL/ min para limpiar el segmento intestinal. Posteriormente se infundió la solución de perfusión a una velocidad de 0.2 mL/ min durante un periodo aproximado de 100 min, manteniendo la solución a 37 °C. Transcurridos 40 minutos del inicio de la perfusión (Figura 7 y Esquema 1), se colectó el líquido de perfusión en el extremo distal, a los siguientes tiempos: 40, 50, 60, 70, 80 y 90 min. Las muestras fueron diluidas 1/10 en solución de fosfatos salino y se analizaron empleando el método analítico descrito en la sección 5.2.3.1., por HPLC. Al finalizar la perfusión, la rata fue sacrificada inmediatamente en la cámara de CO₂. Se cortó el segmento intestinal y se midió cuidadosamente el diámetro y longitud.

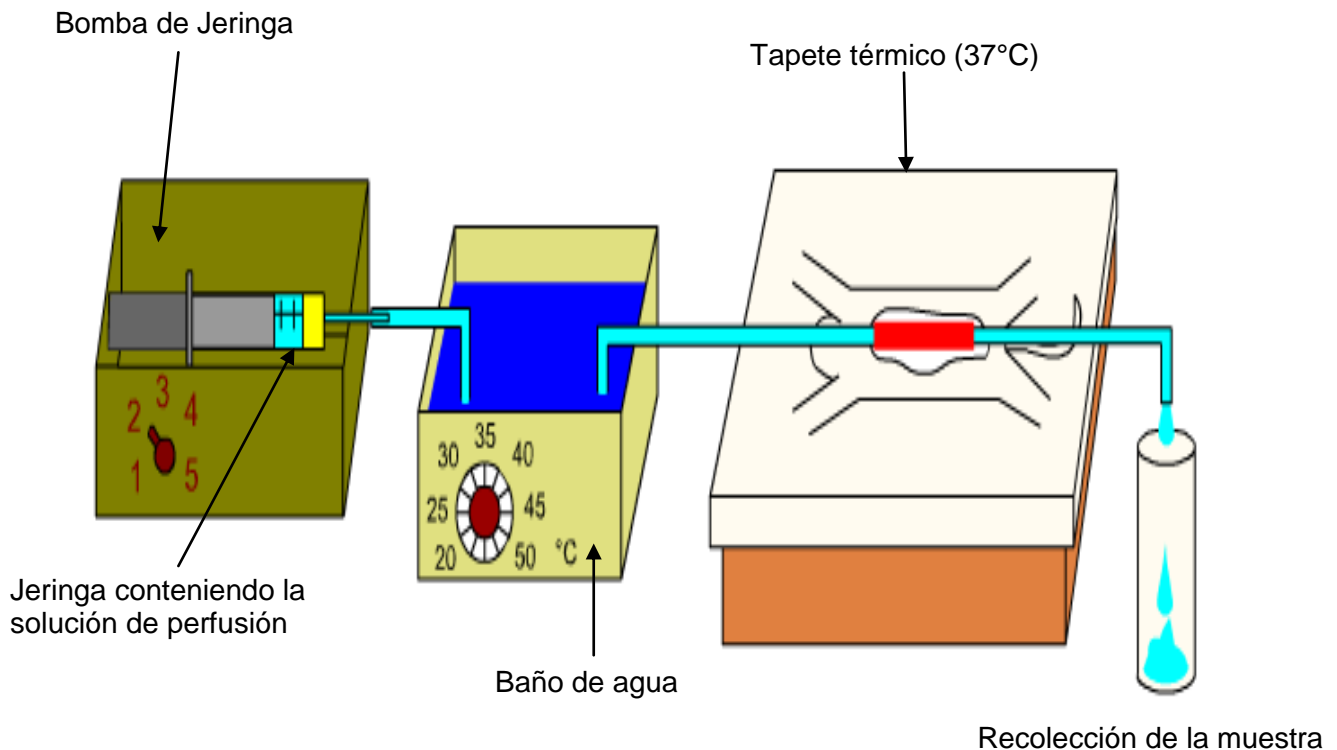
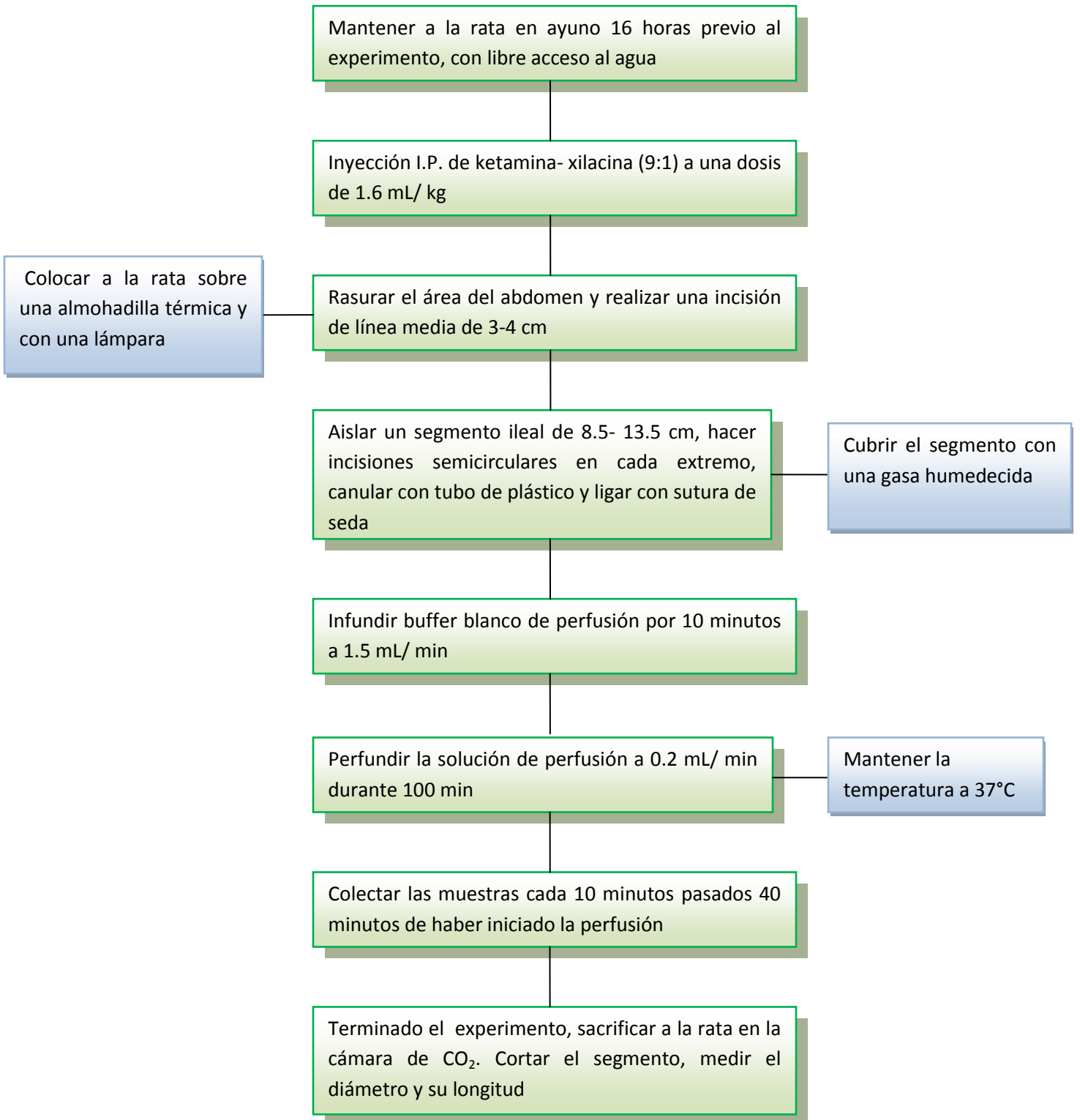


Figura 7. Técnica de perfusión intestinal implementada.



Esquema 1. Procedimiento de cirugía y perfusión desarrollado en el modelo permeabilidad.

5.3.5. CÁLCULOS DE PERMEABILIDAD

Los coeficientes de permeabilidad efectiva (P_{eff}) para cada fármaco se calcularon de acuerdo a la siguiente ecuación (Dahan y col., 2009):

$$P_{\text{eff}} \text{ (cm/s)} = \frac{-Q \ln(C'_{\text{out}}/C'_{\text{in}})}{2\pi RL} \quad \text{Dónde:}$$

Q: Velocidad de flujo de la solución de perfusión.

$C'_{\text{out}}/C'_{\text{in}}$: Relación de la concentración de salida y de entrada (inicial) del compuesto evaluado que ha sido ajustado por el transporte de agua.

R: Radio del segmento intestinal.

L: Longitud del segmento intestinal.

5.3.5.1. Medición del flujo neto de agua

El flujo neto del agua (absorción y eflujo en el segmento intestinal) se determinó por medición del rojo de fenol, el cual se incluyó en la solución de perfusión (12.5 $\mu\text{g/mL}$). La relación $C'_{\text{out}}/C'_{\text{in}}$ se corrigió de acuerdo a la siguiente ecuación (Dahan y col., 2009):

$$\frac{C'_{\text{out}}}{C'_{\text{in}}} = \frac{C_{\text{out}}}{C_{\text{in}}} \times \frac{C_{\text{in rojo de fenol}}}{C_{\text{out rojo de fenol}}} \quad \text{Dónde:}$$

$C_{\text{in rojo de fenol}}$: Concentración inicial de rojo de fenol.

$C_{\text{out rojo de fenol}}$: Concentración de rojo de fenol a la salida del segmento intestinal.

El valor promedio del coeficiente de permeabilidad efectiva (P_{eff}) de clorhidrato de propranolol (Clase I, control de alta permeabilidad) y clorhidrato de ranitidina (Clase III, control de baja permeabilidad) se calculó a partir del valor de permeabilidad de 6 experimentos independientes, calculando el P_{eff} en cada muestra, así como el porcentaje de recobro de rojo de fenol.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Validación de los métodos analíticos para la cuantificación de Clorhidrato de Propranolol y Clorhidrato de Ranitidina

6.1.1. SELECTIVIDAD

La figura 8 muestra los blancos y cromatogramas típicos de propranolol, ranitidina y rojo de fenol. Se puede observar que no existe interferencia de los componentes de la muestra en los tiempos de retención de los compuestos, lo que indica que los métodos fueron selectivos.

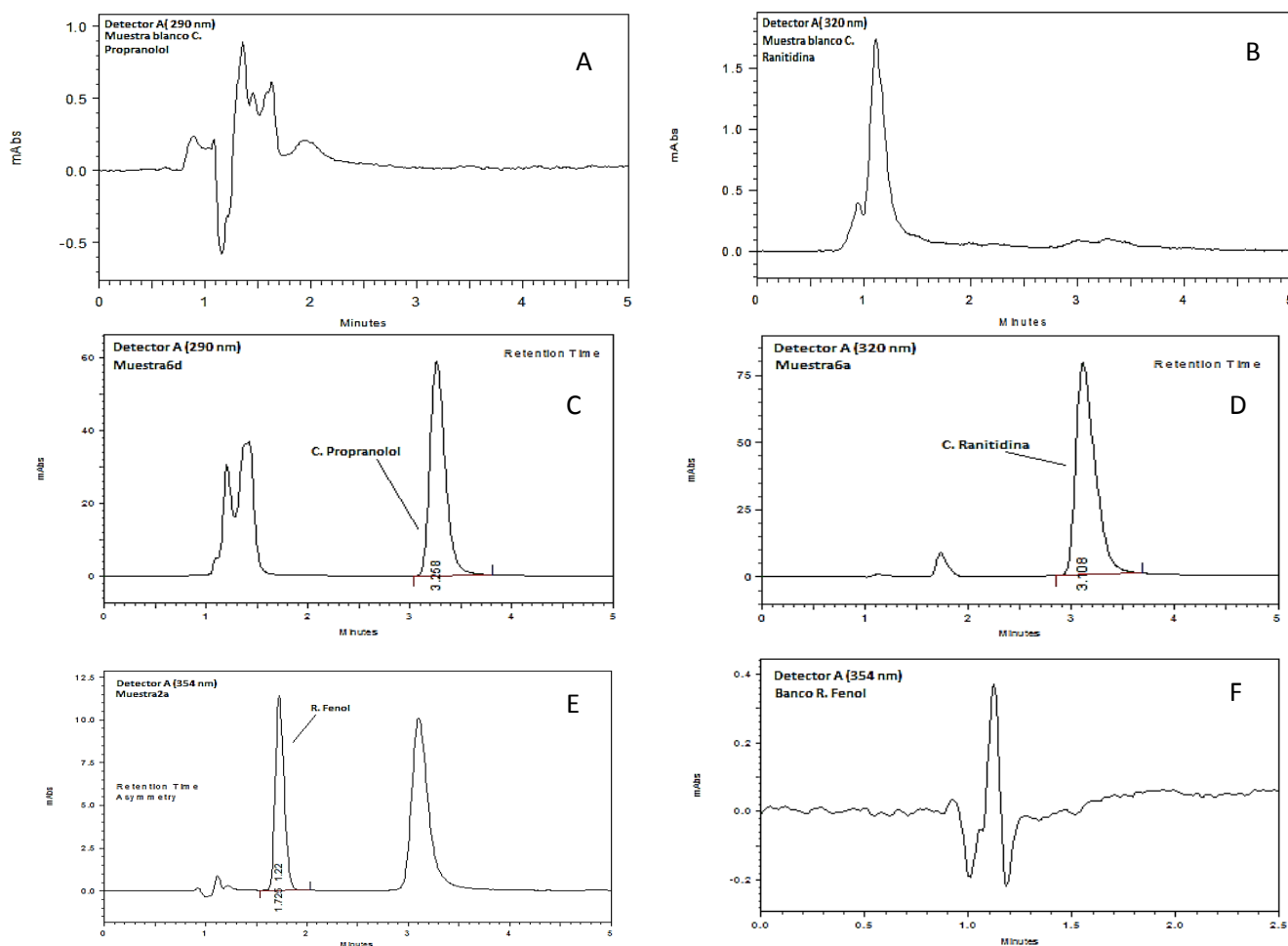


Figura 8. Cromatogramas representativos: (A) Blanco c. propranolol, (B) blanco c. ranitidina, (C) muestra de perfusión conteniendo c. propranolol, (D) muestra de perfusión conteniendo c. ranitidina, (E) muestra de perfusión conteniendo rojo de fenol, (F) blanco rojo de fenol.

6.1.2. LINEALIDAD Y PRECISIÓN (REPETIBILIDAD)

La figura 9a muestra la curva promedio de propranolol y la ecuación de regresión correspondiente. La tabla 13 presenta los datos de linealidad y precisión obtenidos. Se puede observar que las tres curvas, así como la curva promedio presentan un coeficiente de correlación (r) mayor a 0.99 y un %ERR menor al 3%. Esto indica que el método fue lineal en el rango de trabajo empleado. Respecto a la precisión intradía, el coeficiente de variación (%) para cada nivel de concentración fue 0.47- 1.61 en el rango empleado. También se puede observar que el coeficiente de variación (%) para el factor respuesta fue de 1.22- 1.38 con un valor de 1.06 para la curva promedio, confirmando que el método fue repetible. Con respecto a ranitidina, la figura 9b muestra la curva promedio y la ecuación de regresión representativa. En la tabla 14 se presentan los datos de las tres curvas, así como la curva promedio. Se puede observar que el coeficiente de correlación fue mayor a 0.99, un %ERR menor a 3%, un coeficiente de variación por nivel de concentración de 0.36-1.80 en el rango utilizado, y un coeficiente de variación del factor respuesta de 0.93- 1.51 con un valor de 0.87 para la curva promedio, indicando que este método también fue lineal y repetible en el intervalo de trabajo empleado.

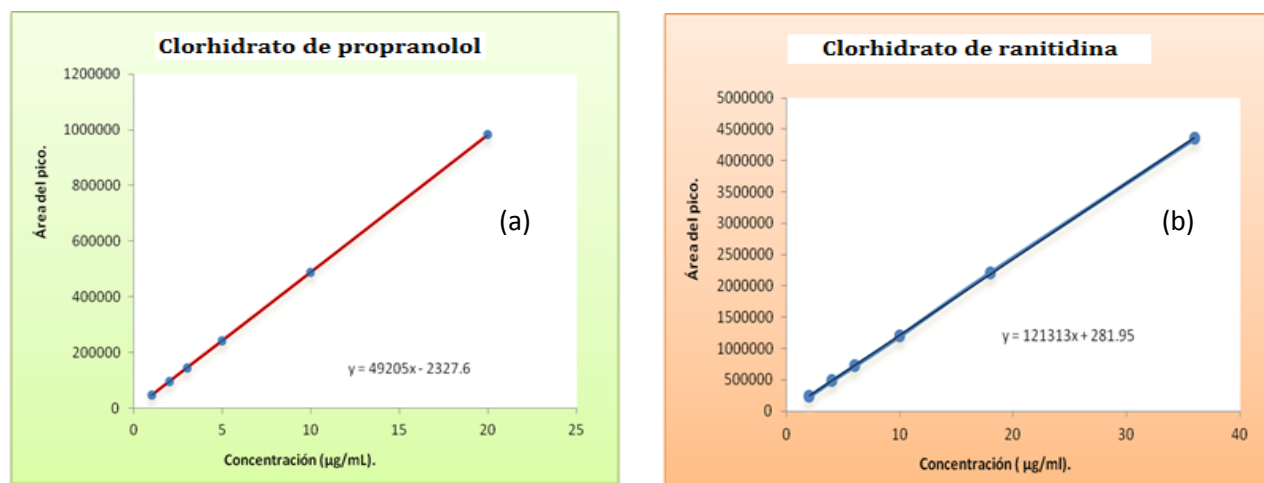


Figura 9. Linealidad del método para la cuantificación de propranolol (a), linealidad del método para la cuantificación de ranitidina (b).

Tabla 13. Linealidad y precisión (repetibilidad) del método analítico para la cuantificación de propranolol.

Concentración (µg/ mL)	Área del pico				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva promedio	%CV
1	47680	48616	47087	47794.33	1.61
2	96611	95043	96084	95912.66	0.83
3	147117	144542	145228	145629	0.91
5	243810	244117	241128	243018.33	0.67
10	487399	491388	487384	488723.66	0.47
20	988047	979068	979969	982361.33	0.50
Pendiente (m)	49439.90	49076.10	49098.97	49204.99	
Ordenada al origen (b)	-2728.69	-1557.68	-2696.35	-2327.57	
Coefficiente de determinación (r ²)	0.99995	0.99998	0.99999	0.99999	
%ERR	0.76	0.48	0.34	0.25	
Factor respuesta %CV	1.23	1.22	1.38	1.06	

Tabla 14. Linealidad y precisión (repetibilidad) del método analítico para la cuantificación de ranitidina.

Concentración (µg/ mL)	Área del pico				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva promedio	%CV
2	236528	242376	240873	239925.66	1.26
4	482938	478314	493229	484827	1.57
6	718155	728391	721920	722822	0.71
10	1216238	1178950	1216756	1203981.33	1.8
18	2226608	2214533	2198782	2213307.66	0.63
36	4340006	4371416	4358354	4356592	0.36
Pendiente (m)	120986.82	121819.68	121131.53	121312.68	
Ordenada al origen (b)	4245.68	-7386.01	3986.17	281.94	
Coefficiente de determinación (r ²)	0.99977	0.99983	0.99996	0.9999	
%ERR	1.67	1.44	0.63	1.08	
Factor respuesta %CV	1.51	1.47	0.93	0.87	

6.1.3. PRECISIÓN INTERDÍA

Las tablas 15 y 16 presentan los datos de precisión interdía correspondientes al método de cuantificación de propranolol y al método de cuantificación de ranitidina. El promedio de 6 concentraciones experimentales para cada nivel de concentración equivalente a dos días de trabajo muestra un %CV de 0.14- 2.25 y de 0.26-2.65 para propranolol y ranitidina, respectivamente, a lo largo del rango de trabajo establecido para cada fármaco. Esto confirma que ambos métodos fueron precisos, ya que todos los valores de %CV fueron menores al 3% establecido en la NOM-177-SSA1-2013.

Tabla 15. Precisión interdía del método analítico para la cuantificación de clorhidrato de propranolol.

Concentración nominal (µg/mL)	Concentración experimental de clorhidrato de propranolol (µg/mL)								
	Día 1			Día 2			Promedio	D.E.*	%CV
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
1	1.0314	1.0371	0.9727	1.0195	1.0223	1.0139	1.0161	0.0228	2.25
2	1.9947	2.0358	2.0113	2.0093	1.9683	2.0118	2.0052	0.0223	1.11
3	3.0387	2.9753	3.0163	3.0308	2.9770	3.0127	3.0085	0.0267	0.89
5	4.9867	5.0295	5.0293	4.9866	5.0059	4.9659	5.0007	0.0256	0.51
10	9.9036	9.8625	9.9595	9.9136	10.0445	9.9814	9.9442	0.0647	0.65
20	20.0446	20.0596	20.0106	20.0399	19.9817	20.0139	20.0250	0.0283	0.14

* D.E: Desviación estándar.

Tabla 16. Precisión interdía del método analítico para la cuantificación de clorhidrato de ranitidina.

Concentración nominal (µg/mL)	Concentración experimental de clorhidrato de ranitidina (µg/mL)								
	Día 1			Día 2			Promedio	D.E.*	%CV
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
2	2.0003	2.0555	2.0031	1.9198	2.0502	1.9556	1.9975	0.0529	2.65
4	4.0456	3.9997	4.0403	3.9565	3.987	4.0389	4.0113	0.036	0.89
6	6.0198	6.026	5.9872	5.9007	6.0398	5.9268	5.9834	0.0572	0.95
10	10.071	10.0665	9.9343	10.018	9.7384	10.012	9.9733	0.1251	1.25
18	17.783	17.7553	17.927	18.369	18.2394	18.1191	18.0319	0.2505	1.38
36	36.081	36.0964	35.997	35.837	35.9449	35.9474	35.9837	0.0966	0.26

* D.E: Desviación estándar.

6.1.4. EXACTITUD

La exactitud para cada nivel de concentración se expresó en términos de la desviación estándar absoluta (DEA). Las tablas 17 y 18 muestran los resultados de exactitud de los métodos de cuantificación para dos días de trabajo. En ellas se observa que el método de propranolol muestra un %DEA de 0.05- 1.86 en el día 1, mientras que el día 2 presentó un %DEA de 0.19-1.37. El método de ranitidina muestra un %DEA de 0.14- 1.34 para el día 1, y en el día 2 presenta un %DEA de 0.16- 0.99. Dado que todos los valores fueron menores a 3%, se demuestra que los métodos fueron exactos.

Tabla 17. Exactitud del método analítico para la cuantificación de propranolol.

Concentración nominal (µg/mL)		Concentración experimental de clorhidrato de propranolol (µg/mL)				
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	%DEA*
Día 1	1	1.0195	1.0223	1.0139	1.0186	1.86
	2	2.0093	1.9683	2.0118	1.9965	0.17
	3	3.0308	2.977	3.0127	3.0068	0.22
	5	4.9866	5.0059	4.9659	4.9862	0.27
	10	9.9136	10.0445	9.9814	9.9798	0.2
	20	20.0399	19.9817	20.0139	20.0119	0.05
Día 2	1	1.0314	1.0371	0.9727	1.0137	1.37
	2	1.9947	2.0358	2.0113	2.0139	0.69
	3	3.0387	2.9753	3.0163	3.0101	0.33
	5	4.9867	5.0295	5.0293	5.0152	0.3
	10	9.9036	9.8625	9.9595	9.9085	0.91
	20	20.0446	20.0596	20.0139	20.0382	0.19

* %DEA: Porcentaje de desviación estándar absoluta.

Tabla 18. Exactitud del método analítico para la cuantificación de ranitidina.

Concentración nominal (µg/mL)		Concentración experimental de clorhidrato de ranitidina (µg/mL)				
		Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	%DEA*
Día 1	2	1.9198	2.0502	1.9556	1.9752	1.23
	4	3.9565	3.987	4.0389	3.9941	0.14
	6	5.9007	6.0398	5.9268	5.9558	0.73
	10	10.0175	9.7384	10.012	9.9226	0.77
	18	18.3686	18.2394	18.1191	18.2423	1.34
	36	35.8366	35.9449	35.9474	35.9096	0.25
Día 2	2	2.0003	2.0559	2.0031	2.01981	0.99
	4	4.0456	3.9997	4.0403	4.0285	0.71
	6	6.0198	6.026	5.9872	6.011	0.18
	10	10.0709	10.0665	9.9343	10.0239	0.23
	18	17.7825	17.7553	17.9268	17.8215	0.99
	36	36.0806	36.0964	35.9965	36.0578	0.16

* %DEA: Porcentaje de desviación estándar absoluta.

6.1.5. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

En las tablas 19 y 20 se pueden observar los valores de coeficiente de variación en por ciento al analizar por quintuplicado, la concentración más baja de la curva. Dado que los valores fueron: 1.48 y 0.87%, se demuestra que el método analítico de propranolol es capaz de cuantificar con precisión la concentración de 1 µg/mL, así mismo, el método analítico de ranitidina es capaz de cuantificar con precisión 2 µg/mL.

Tabla 19. Clorhidrato de propranolol. Resultados de límite de cuantificación.

	Área	Concentración experimental
Concentración nominal (1µg/mL)	42671	1.0200
	42548	1.0176
	41243	0.9914
	41484	0.9962
	42893	1.0245
Media	42167.8	1.0100
Desviación Estándar	749.419	0.0150
%CV	1.77	1.48

Tabla 20. Clorhidrato de ranitidina. Resultados de límite de cuantificación.

	Área	Concentración experimental
Concentración nominal (2µg/mL)	241490	2.0773
	236516	2.0369
	237373	2.0439
	235992	2.0327
	236918	2.0402
Media	237657.8	2.0462
Desviación Estándar	2201.861	0.0178
%CV	0.92	0.87

6.1.6. ESTABILIDAD A 24 HORAS EN EL AUTOMUESTREADOR

Las tablas 21 y 22 presentan los valores obtenidos al analizar los puntos control frescos y los que permanecieron 24 horas en el automuestreador, para los tres niveles de concentración. En ellas se puede observar que los valores de CV% para propranolol fueron de 1.01, 0.83 y 0.37, mientras que para la ranitidina los valores fueron, 1.22, 0.59 y 0.32. Dado que todos los valores de %CV fueron menores al 3%, se demuestra que los fármacos bajo estudio, fueron estables en la solución amortiguadora de fosfatos salino pH 7.4, durante 24 horas en el automuestreador.

Tabla 21. Estabilidad de propranolol en el automuestreador.

Condiciones	Concentración recuperada (µg/mL)		
	Control Bajo (1.5 µg/mL)	Control Medio (9 µg/mL)	Control Alto (18 µg/mL)
Frescos	1.4991	9.0234	17.7445
	1.4798	8.8487	17.6656
	1.4656	9.0617	17.7211
Temperatura en el automuestreador por 24 horas	1.5079	8.9070	17.6988
	1.4821	8.9051	17.6595
	1.4924	8.9112	17.8426
Promedio	1.4878	8.9429	17.7220
Desviación estándar	0.0151	0.0743	0.0673
%CV	1.01	0.83	0.37
%DEA	0.80	0.63	1.54

Tabla 22. Estabilidad de ranitidina en el automuestreador.

Condiciones	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)		
	Control Bajo (3 $\mu\text{g/mL}$)	Control Medio (17 $\mu\text{g/mL}$)	Control Alto (33 $\mu\text{g/mL}$)
Frescos	3.0161	16.8962	33.1562
	2.9308	17.0319	33.2722
	3.0079	17.0389	33.1877
Temperatura en el automuestreador por 24 horas	2.9926	16.9315	33.3943
	2.9886	17.1829	33.3547
	3.0391	17.0569	33.4157
Promedio	2.9959	17.0231	33.2968
Desviación estándar	0.0366	0.1014	0.10
%CV	1.22	0.59	0.32
%DEA	0.13	0.13	0.89

6.1.7. EFECTO DE LA DILUCIÓN

Dado que las muestras de perfusión fueron diluidas 1/10 para su análisis, se evaluó el efecto de la dilución sobre la precisión y exactitud (sección 5.2.3.2.6). El propranolol presentó un %CV de 1.15 y un %DEA de 0.39 (tabla 23), mientras que ranitidina mostró un %CV de 0.87 y un %DEA de 0.41 (tabla 24). Dado que los valores de %CV y %DEA fueron menores al 3% se demostró que la dilución no afecta la precisión y exactitud.

Tabla 23. Efecto de dilución en la cuantificación de propranolol.

Concentración inicial	Concentración final	Área del pico	Concentración experimental ($\mu\text{g/mL}$)
Solución de perfusión (160 $\mu\text{g/mL}$)	16 $\mu\text{g/mL}$	796777	15.7897
		804151	15.9340
		802602	15.9037
		800386	15.8603
16 $\mu\text{g/mL}$		816370	16.1731
		819299	16.2304
		803750	15.9261
		791209	15.6807
Promedio			15.9373
D.E.*			0.1837
%CV			1.15
%DEA			0.39

* D.E: Desviación estándar.

Tabla 24. Efecto de dilución en la cuantificación de ranitidina.

Concentración inicial	Concentración final	Área del pico	Concentración experimental ($\mu\text{g/mL}$)
Solución de perfusión (80 $\mu\text{g/mL}$)	8 $\mu\text{g/mL}$	960577	7.9480
		974136	8.0585
		963095	7.9685
		978061	8.0904
8 $\mu\text{g/mL}$		957506	7.9230
		956921	7.9182
		955363	7.9056
		957516	7.9231
Promedio			7.9669
D.E.*			0.0696
%CV			0.87
%DEA			0.41

*D.E: Desviación estándar.

6.2. IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO DE PERMEABILIDAD

6.2.1. ENSAYO DE RETENCIÓN DE LOS FÁRMACOS EN LA TUBERÍA

Diferentes estudios han recomendado tuberías de distintos tamaños y materiales, entre las que se encuentran tubos de plástico de 4 mm de diámetro externo (Jain y col., 2007), de 1 mm de diámetro interno (Song y col., 2013), tubos de PVC de 2.29 mm de diámetro interno (Dahan y col., 2009; Incecayir y col., 2013), de 4 mm de diámetro externo (Cao y col., 2013), o bien tubos de polietileno de 3.1 mm de diámetro interno (Neerati y col., 2011) y 2.08 mm de diámetro externo (Salphati y col., 2001). Dada la gran variedad en tamaños y la dificultad para conseguirlos, se seleccionaron las sondas de plástico para secreciones tamaño infantil, de 2 mm de diámetro interno, las cuales se cortaron y ajustaron a la longitud requerida. Posteriormente se evaluó la posible adherencia de los fármacos, ya que, si éstos se adhieren a las paredes, se puede sobreestimar el valor del coeficiente de permeabilidad efectiva (Peff) de un fármaco (Fagerholm y col., 1996; Jain y col., 2007; Neerati y col., 2011).

Los resultados de las tablas 25 y 26 muestran un recobro promedio de 98.28 % para clorhidrato de propranolol y 100.85 % para clorhidrato de ranitidina, lo que demuestra que ambos fármacos no se adhieren a las paredes de la tubería empleada. Con esta evidencia se pudo concluir que utilizar el tubo de plástico de 2.0 mm de diámetro interno era adecuado.

Así mismo, estos porcentajes de recobro obtenidos indican que no hubo degradación de los fármacos, confirmando su estabilidad en la solución de perfusión durante los experimentos.

Tabla 25. Retención de propranolol en la tubería utilizada.

Concentración inicial de propranolol en la solución de perfusión diluida 1/10 (16 µg/mL)	Área del pico	Recobro (%)
	800979*	98.28
Muestras diluidas 1/10	780845	
	778520	
	790787	
	802310	
	778028	
	792738	
Promedio	787204.66	

*Área promedio del pico (cuadruplicado) de la concentración inicial en la solución de perfusión diluida 1/10.

Tabla 26. Retención de ranitidina en la tubería utilizada.

Concentración inicial de ranitidina en la solución de perfusión diluida 1/10 (8 µg/mL)	Área del pico	Recobro (%)
	968967.25*	100.85
Muestras diluidas 1/10	977799	
	973294	
	991344	
	975307	
	962298	
	983491	
Promedio	977255.5	

*Área promedio del pico de la concentración inicial en la solución de perfusión diluida 1/10.

6.2.2. CONDICIONES QUIRÚRGICAS Y DE PERFUSIÓN

Los estudios de perfusión se realizaron en la región del íleon, dado que es el segmento del intestino delgado que posee mayor longitud y área de superficie de absorción. Con respecto al pH de la solución de perfusión, se decidió ajustar a 7.4 con el objetivo de relacionarla al pH fisiológico del íleon, el cual se encuentra entre 7.0-7.5 (Balimane y col., 2000; Incecayir y col., 2013).

Se sabe que la cirugía y los agentes anestésicos pueden causar anoxia, disminución del flujo sanguíneo intestinal y de la motilidad, provocando la disminución del transporte pasivo y activo (Fagerholm y col., 1996). Se ha recomendado el uso de algunos agentes anestésicos, entre los que se encuentran los barbitúricos, uretano y una combinación de ketamina- xilacina (9:1), dado que han mostrado mínimos efectos sobre la absorción intestinal (Fagerholm y col., 1996; Reis y col., 2013; Song y col., 2013), se eligió la inyección intraperitoneal de ketamina- xilacina (9:1), que se ajustó a dosis de 1.6 mL/kg, resultando adecuada para la anestesia general de las ratas, las cuales mostraron un plano de anestesia profunda durante un periodo de 2.1 horas.

Los extremos canulados se ligaron correctamente, ya que no se observó fuga de la solución de perfusión en los sitios donde se realizaron las incisiones y los amarres.

Con respecto a la velocidad perfusión, existen diferentes reportes en los que se han empleado velocidades entre 0.1 y 0.3 mL/min. Se encontró que la más utilizada era 0.2 mL/min (Shalpathi y col., 2001; Dahan y col., 2009; Reis y col., 2013). En 1996, Fagerholm y colaboradores encontraron que una velocidad de 0.2 mL/min era adecuada para este tipo de estudios, tomando como base que en estudios de perfusión en humanos la velocidad empleada es de 2-3 mL/min y el radio del intestino de rata es aproximadamente 10 veces menor que el del humano. Por tales motivos, se eligió una velocidad de 0.2 mL/min.

La velocidad de flujo es determinante del tiempo requerido para alcanzar el estado de equilibrio en la membrana (absorción y excreción de agua), y por tanto para la toma de muestras. Distintos estudios han reportado tiempos de perfusión de 20 min a 1 h necesarios para alcanzar el equilibrio (Reis y col., 2013; Eedara y col., 2013; Cao y col., 2013), hecho que se demuestra con una relación de entrada y salida de rojo de fenol (marcador del flujo de agua) muy cercana a 1 en todas las muestras. Los resultados que se presentan en la tabla 25, muestran que un tiempo de perfusión de 40 minutos a una velocidad de flujo de 0.2 mL/min es suficiente para alcanzar el estado de equilibrio hidrodinámico en la membrana, lo cual también confirma, que el muestreo a partir del minuto 40 fue apropiado.

6.2.3. RECOBRO DE ROJO DE FENOL Y ESTADO DE EQUILIBRIO EN LA MEMBRANA

Se han reportado varios métodos para la corrección del flujo de agua (secreción y/o absorción de agua en la membrana), estos incluyen la coperfusión de marcadores no absorbibles, tales como rojo de fenol o ^{14}C PEG 4000, y métodos gravimétricos. Tanto el método gravimétrico como los basados en marcadores no absorbibles han mostrado ser exactos (Sutton y Rinaldi, 2001). Sin embargo, con el método gravimétrico, la posibilidad de desgaste de la superficie de la mucosa intestinal ocasionada por la canulación y/o el flujo de la solución de perfusión puede dar lugar a la entrada de ciertos componentes solubles e insolubles en el líquido de perfusión alterando la densidad de la solución de perfusión e introduciendo errores a los valores de permeabilidad. El uso de radiomarcadores como el ^{14}C PEG 4000 resulta más costoso y dada su naturaleza, agregan a los estudios otro tipo de regulaciones y aspectos de seguridad (Issa y col., 2003; Sutton y Rinaldi, 2001). Dado que el rojo de fenol es barato y fácil de conseguir, se eligió como marcador.

Los valores calculados de la relación entre la concentración de rojo de fenol inicial ($C_{in \text{ rojo de fenol}}$) y a la salida ($C_{out \text{ rojo de fenol}}$) se presentan en la tabla 27, en ella se muestran valores muy cercanos a 1 (0.9493 - 1.0473) en todas las muestras analizadas, lo cual indica que se mantuvo un estado de equilibrio de flujo de agua en la membrana durante los experimentos. Por otra parte, en la figura 10 y tabla 28 se muestran los resultados del recobro de rojo de fenol de cada una de las muestras, así como el promedio por rata, que presentan valores de 100.77 - 102.63%, con un valor medio de $101.47 \pm 0.87 \%$ (media \pm D.E.) para las 6 ratas. Este recobro fue constante y prácticamente del 100%, por lo tanto, indica que no hubo daño a la mucosa intestinal y que se mantuvo su integridad durante los procedimientos de perfusión. Estas condiciones sugieren el funcionamiento correcto del modelo.

Tabla 27. Relación de concentración de entrada y salida de rojo de fenol.

Tiempo de perfusión (min)	Muestra	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6
		$C_{in \text{ rojo de fenol}} / C_{out \text{ rojo de fenol}}^*$					
40	1	0.9958	0.9934	0.9493	0.9973	1.0037	0.9872
50	2	1.0028	1.0096	0.9539	0.9923	0.9830	0.9834
60	3	0.9895	1.0077	1.0473	0.9903	0.9845	0.9614
70	4	0.9960	0.9827	0.9693	0.9927	0.9925	0.9646
80	5	0.9864	0.9668	0.9668	0.9968	0.9843	0.9878
90	6	0.9829	0.9843	0.9651	0.9814	0.9845	0.9654

* El Cociente de la concentración de entrada y salida de rojo de fenol cercano a 1 indica el equilibrio de flujo de agua en la membrana.

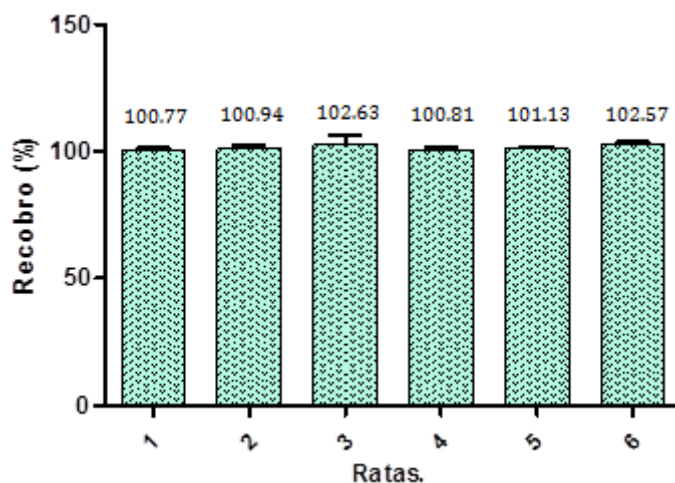


Figura 10. Recobro de rojo de fenol.

Tabla 28. Valores de recobro de rojo de fenol.

Muestras	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6
	Recobro (%)					
1	100.41	100.66	105.33	100.26	99.62	101.29
2	99.71	99.04	104.83	100.76	101.72	101.67
3	101.05	99.23	95.47	100.96	101.57	104.01
4	100.39	101.75	103.15	100.72	100.74	103.66
5	101.37	103.42	103.42	100.31	101.59	101.22
6	101.73	101.58	103.60	101.88	101.56	103.58
Promedio por rata	100.77	100.94	102.63	100.81	101.13	102.57
Promedio (n= 6 ratas)	101.47					
D.E.	0.87					

6.2.4. RESULTADOS DE PERMEABILIDAD

El propranolol (fármaco de Clase I) se eligió como control de alta permeabilidad ya que es recomendado para su uso como potencial estándar interno (CDER, 2000). También se ha utilizado como marcador de difusión pasiva y como indicador de cambios significativos en el flujo sanguíneo mesentérico (Varma y Panchagnua, 2005; Neerati y col., 2011).

Los valores de los coeficientes de permeabilidad efectiva (P_{eff}) calculados para propranolol se presentan en la tabla 29, en la cual se observa que el valor promedio fue de $0.6478 \times 10^{-4} \pm 0.0745 \times 10^{-4}$ cm/s (media \pm D.E.) para 6 ratas. Este valor es similar al reportado por Salphati y colaboradores ($0.66 \times 10^{-4} \pm 0.29 \times 10^{-4}$ cm/s), y ligeramente más alto al calculado por Kim y colaboradores ($0.49 \times 10^{-4} \pm 0.07 \times 10^{-4}$ cm/s). También se muestra que los valores de P_{eff} fueron semejantes durante las perfusiones y además se determinó un coeficiente de variación de 11.50% entre los experimentos (Figura 11). Estos resultados muestran baja variabilidad intra e interindividual, indicando que el modelo implementado mantuvo sus propiedades y no hubo cambios grandes en el flujo sanguíneo mesentérico durante los experimentos.

Con respecto a ranitidina (clase III), ésta se empleó como control de baja permeabilidad, ya que, al igual que propranolol se recomienda como estándar interno (CDER, 2000). La ranitidina se coperfundió con el propranolol y el rojo de fenol. La tabla 30 presenta los resultados obtenidos, en donde se muestra un valor promedio de permeabilidad de $0.0592 \times 10^{-4} \pm 0.0227 \times 10^{-4}$ cm/s (media \pm D.E.). Este valor es ligeramente menor al reportado por Kim y colaboradores ($0.073 \times 10^{-4} \pm 0.06 \times 10^{-4}$ cm/s) pero con menor variabilidad, sugiriendo que el método es preciso.

Cabe mencionar también, que los valores de permeabilidad calculados para propranolol y ranitidina podrán ser usados para comparar valores entre laboratorios que lleven a cabo este tipo de estudios.

Tabla 29. Valores de permeabilidad de clorhidrato de propranolol.

Tiempo de perfusión (min)	Muestras	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6
		P _{eff} (10 ⁻⁴ cm/s)					
40	1	0.55	0.63	0.77	0.75	0.69	0.84
50	2	0.52	0.63	0.77	0.73	0.70	0.81
60	3	0.52	0.60	0.52	0.75	0.63	0.78
70	4	0.55	0.62	0.59	0.67	0.56	0.74
80	5	0.54	0.65	0.51	0.69	0.58	0.61
90	6	0.54	0.65	0.59	0.64	0.53	0.71
Promedio por rata		0.54	0.63	0.63	0.71	0.61	0.75
Promedio (n= 6 ratas)		0.64					
D.E.		0.07					
%CV		11.50					

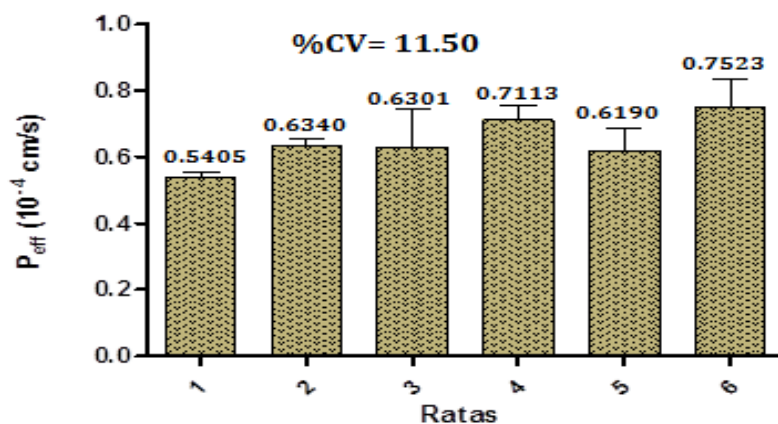


Figura 11. Variabilidad entre los valores de P_{eff} de propranolol.

Tabla 30. Valores de permeabilidad de clorhidrato de ranitidina.

Tiempo de perfusión (min)	Muestras	Rata 1	Rata 2	Rata 3	Rata 4	Rata 5	Rata 6
		P_{eff} (10^{-4} cm/s)					
40	1	0.04	0.02	0.03	0.06	0.09	0.03
50	2	0.04	0.05	0.08	0.07	0.08	0.02
60	3	0.04	0.03	0*	0.07	0.09	0.03
70	4	0.05	0.06	0.02	0.09	0.07	0.02
80	5	0.08	0.09	0.02	0.07	0.10	0*
90	6	0.06	0.07	0.04	0.05	0.10	0.03
Promedio por rata		0.0564	0.0580	0.0399	0.0720	0.0962	0.0332
Promedio (n= 6 ratas)		0.0592					
D.E.		0.0227					

* Los valores negativos se reportaron como cero y no fueron considerados en los cálculos.

Al comparar los valores de P_{eff} calculados para el estándar interno de alta permeabilidad contra los valores obtenidos para el de baja permeabilidad, se encontró que el P_{eff} de propranolol fue aproximadamente 10.9 veces mayor que el calculado para ranitidina (figura 12). Este resultado también sugiere que el modelo funcionó correctamente.

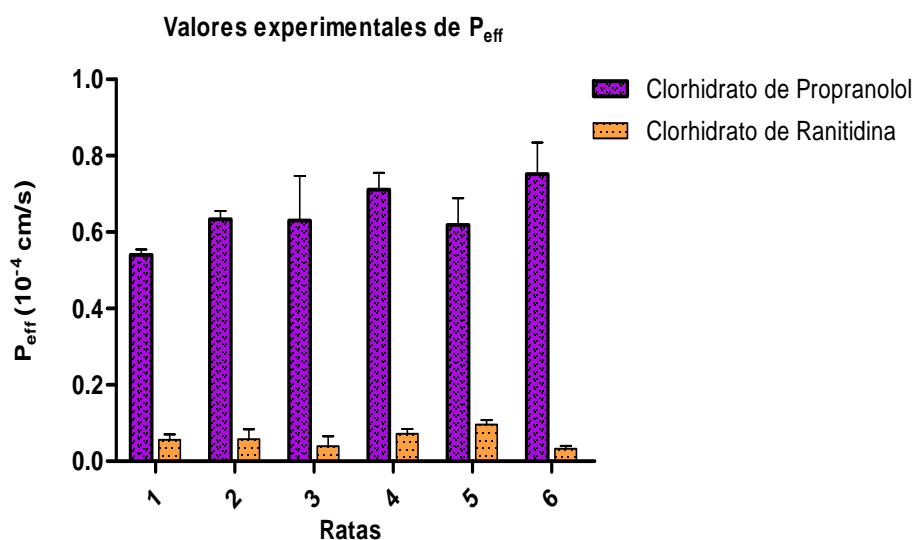


Figura 12. Valores de permeabilidad de propranolol y ranitidina. El P_{eff} medio de propranolol es 10.9 veces mayor al de ranitidina.

Los parámetros evaluados y los resultados obtenidos indican que el segmento intestinal mantuvo de manera normal el transporte pasivo (transcelular y paracelular) y la integridad de la mucosa intestinal, documentando la confiabilidad del método para su uso en la evaluación de la permeabilidad de fármacos.

7. CONCLUSIONES

- 1.- Los métodos analíticos para la cuantificación de clorhidrato de propranolol y clorhidrato de ranitidina cumplieron con los criterios de aceptación para especificidad, linealidad, precisión y exactitud en los rangos de 1- 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 2- 36 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.
- 2.- Las sondas de plástico para secreciones tamaño infantil, de 2 mm de diámetro interno fueron adecuadas para los estudios, además de ser más económicas que las tuberías recomendadas.
- 3.- El método *in situ* implementado es simple, preciso, exacto, confiable, requiere de menor tiempo de experimentación que los métodos *in vitro* basado en líneas celulares y podrá ser utilizado para evaluar la permeabilidad de fármacos nuevos y aquellos cuya permeabilidad no ha sido reportada.
- 4.- Este método podría ser utilizado también para estudios de mecanismos de transporte involucrados en la absorción de fármacos.

8. REFERENCIAS

- Amidon, G.L., Lennernas, H., Shah, V.P., Crison, J.R., 1995. A theoretical basis for a biopharmaceutics drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm. Res.* 12: 413–420.
- Avdeef, A., Artursson, P., Neuhoff, S., Lazarova, L., Gråsjö, J., Tavelin, S., 2005. Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA pK_a^{flux} method. *Eur. J. Pharm. Sci.* 24: 333–349.
- Balimane, P.V., Chong, S., Morrison, R.A., 2000. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 44: 301- 312.
- Berggren, S., Hoogstraate, J., Fagerholm, U., Lennernäs, H., 2004. Characterization of Jejunal Absorption and Apical Efflux of Ropivacaine, Lidocaine and Bupivacaine in the Rat Using In Situ and In Vitro Absorption Models. *Eur. J. Pharm. Sci.* 21: 553–560.
- Biopharmaceutics Classification System Guidance Office of Pharmaceutical Science, CDER/FDA. 2006.
- Bohets, H., Annaert, P., Mannens, G., Beijsterveldt, L.V., Anciaux, K., Verboven, P., Meuldermans, W., Lavrijsen, K., 2001. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Curr. Top. Med. Chem.* 1: 367–383.
- Borchardt, R., 1995. The application of cell culture systems in drug Discovery and development. *J. Drug Targeting.* 3: 179- 182.
- Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Ed. McGraw- Hill, 11ª edición. 2006.
- Buckley, S.T., Fischer, S.M., Fricker, G., Brandl, M., 2012. In vitro models to evaluate the permeability of poorly soluble drug entities: Challenges and perspectives. *Eur. J. Pharm. Sci.* 45: 235–250.

- Cao, F., Gao, Y., Wang, M., Fang, L., Ping, Q., 2013. Propylene Glycol-Linked Amino Acid/Dipeptide Diester Prodrugs of Oleanolic Acid for PepT1-Mediated Transport: Synthesis, Intestinal Permeability, and Pharmacokinetics. *Mol. Pharm.* 10: 1378–1387.
- Carl, S., Herrera, D., Bhardwaj, R., Gudmundsson, O., Knipp, G., Mammalian oligopeptide transporters. En: You, G., Morris, M.E. *Drug transporters*. 1 st ed. New Jersey: John Wiley and Sons; 2007. pp. 105- 146.
- Chiou, W.L., Barve, A., 1998. Linear Correlation of the Fraction of Oral Dose Absorbed of 64 Drugs Between Humans and Rats. *Pharm. Res.* 15: 1792–1795.
- Cho, M., Thompson, D., Cramer, C., Vidmar, T., & Scieszka, J., 1989. The Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cell monolayer as a model cellular transport barrier. *Pharm. Res.* 6: 71- 77.
- Chong, S., Dando, S., & Morrison, R., 1997. Evaluation of Biocat intestinal epithelium differentiation environment (3-day cultured Caco-2 cells) as an absorption screening model with improved productivity. *Pharm. Res.* 14: 1835-1837.
- Da Violante, G., Zerrouk, N., Richard, I., Frendo, J.L., Zhiri, A., Li-Khuan, R., Tricottet, V., Provot, G., Chaumeil, J.C., Arnaud, P., 2004. Short term Caco-2/TC7 cell culture: comparison between conventional 21-d and a commercially available 3-D system. *Biol. Pharm. Bull.* 27: 1986–1992.
- Dahan, A., West, B.T., Amidon, G.L., 2009. Segmental- dependent membrane permeability along the intestine following oral drug administration: Evaluation of a triple single- pass intestinal perfusión (TSPiP) approach in the rat. *Eur. J. Pharm. Sci.* 36: 320–329.
- Daugherty, A., Mrsny, R., 1999. Transcellular uptake mechanisms of the intestinal epithelial barrier: Part 1. *Pharm. Sci. Technol. To.* 2: 144- 151.

- Dressman, J.B., Lennernäs, H., 2000. Oral Drug Absorption. Prediction and Assessment. Drugs and the Pharmaceutical Sciences. Ed. Marcel Dekker. 2000.
- Eedara, B.B., Veerareddy, P.R., Jukanti, R., Bandari, S., 2013. Improved oral bioavailability of fexofenadine hydrochloride using lipid surfactants: ex vivo, in situ and in vivo studies. Drug Dev. Ind. Pharm. pág. 1-14.
- El-Kattan, A., Varma, M., 2012. Oral Absorption, Intestinal Metabolism and Human Oral Bioavailability. Topics on Drug Metabolism, James Paxton (Ed.), ISBN: 978-953-51-0099-7. InTech, DOI: 10.5772/31087.
- Engman, H., 2003. Intestinal Barriers to Oral Drug Absorption: Cytochrome P450 3A and ABC- Transport Proteins. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy 296. 61 pp. Uppsala.
- Fagerholm, U., Johansson, M., Lennernas, H., 1996. Comparison between permeability coefficients in rat and human jejunum. Pharm. Res. 13: 1336-1342.
- Ganong, W., 1995. Review of medical physiology. Stamford, CT: Appleton and Lange.
- Garberg, P., Eriksson, P., Schipper, N., Sjostrom, B., 1999. Automated absorption assessment using Caco-2 cells cultured on both sides of polycarbonate membranes. Pharm. Res. 16: 441- 445.
- Guidance for industry. Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. CDER/FDA, 2000.

- Herrera, D., Hernández, E., Espinosa, J.C., de la Luz, I., Beltrán, A.A., Martínez, J.M., 2012. Revisión bibliográfica: Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 43(1): 18- 32.
- Ho, N.F., Park, J.Y., Morozowich, W., Higuchi, W.I., 1977. Physical Model Approach to the Design of Drugs With Improved Intestinal Absorption. In: EB Roche (Ed.), *Design of Biopharmaceutical Properties Through Prodrugs and Analogs*. Washington, D.C., AAPS Vol. 8: pp 136–227.
- Incecayir, T., Tsume, Y., Amidon, G.L., 2013. Comparison of the Permeability of Metoprolol and Labetalol in Rat, Mouse, and Caco-2 Cells: Use as a Reference Standard for BCS Classification. *Mol. Pharm.* 10: 958–966.
- Irvine, J. D., Takahashi, L., Lockhart, K., Cheong, J., Tolan, J. W., Selick, H. E., & Grove, J. R., 1999. MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: a tool for membrane permeability screening. *Eur. J. Pharm. Sci.* 88: 28- 33.
- Issa, C., Gupta, P., Bansal, A.K., 2003. Implications of Density Correction in Gravimetric Method for Water Flux Determination Using Rat Single-Pass Intestinal Perfusion Technique: A Technical Note. *AAPS PharmSciTech.* 4(2), artículo 16.
- Jain, R., Duvvuri, S., Kansara, V., Mandava, N.K., Mitra, A.K., 2007. Intestinal absorption of novel-dipeptide prodrugs of saquinavir in rats. *Int. J. Pharm.* 336: 233–240.
- Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K., 1998. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J. Med. Chem.* 41: 1007- 1010.
- Kararli, T., 1995. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharm. Drug Dispos.* 16: 351-380.

- Kim, J.S., Mitchell, S., Kijek, P., Tsume, Y., Hilfinger, J., Amidon, G.L., 2006. The suitability of an in situ perfusion model for permeability determinations: utility for BCS class I biowaiver requests. *Mol. Pharm.* 3, 686.
- Krause, E., Dathe, M., Wieprecht, T., Bienert, M., 1999. Noncovalent immobilized artificial membrane chromatography, an improved method for describing peptide- lipid bilayer interactions. *J. Chromatogr.* 849: 125- 133.
- Le Ferrec, E., Chesne, C., Artusson, P., Brayden, D., Fabre, G., Gires, P., Guillou, F., Rousset, M., Rubas, W., Scarino, M.L., 2001. In vitro models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European Centre for the Validation of Alternative methods. *Altern. Lab. Anim.* 29: 649–668.
- Lennernäs, H., 2000. Animal Perfusion Studies. En: Dressman, J.B., Lennernas, H. *Oral Drug Absorption: Prediction and Assessment*. New York, NY, Dekker. Pág. 73–98.
- Lennernäs, H., 2007. Animal data: the contributions of the Ussing chamber and perfusion systems to predicting human oral drug delivery in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 1103.
- Lin, J. H., 1995. Species similarities and differences in pharmacokinetics. *Drug Metab. Dispos.* 23: 1008- 1021.
- Lipinski, T., Lombardo, F., Dominy, B., Feeney, P., 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 23: 3 -25.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J.C., Lizasoain, I., Moro, M.A. Velázquez. *Farmacología básica y clínica*. Ed. Panamericana, 17^a edición. 2005.

- Martinez, M.N., Amidon, G.L., 2002. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *J. Clin. Pharmacol.* 42, 620.
- Neerati, P., Ganji, D., Bedada, S.K., 2011. Study on in situ and in vivo absorption kinetics of phenytoin by modulating P-glycoprotein with verapamil in rats. *Eur. J. Pharm. Sci.* 44: 27–31.
- Norma Oficial Mexicana NOM- 177- SSA1- 2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.
- Putnam, W.S., Pan, L., Tsutsui, K., Takahashi, L., Benet, L.Z., 2002. Comparison of bidirectional cephalixin transport across MDCK and caco-2 cell monolayers: interactions with peptide transporters. *Pharm. Res.* 19: 27–33.
- Reis, J.M., Dezani, A.B., Pereira, T.M., Avdeef, A., Serra, C.H.R., 2013. Lamivudine permeability study: A comparison between PAMPA, ex vivo and in situ Single-Pass Intestinal Perfusion (SPIP) in rat jejunum. *Eur. J. Pharm. Sci.* 48: 781-789.
- Rubas, W., Cromwell, M. E., Shahrokh, Z., Villagran, J., Nguyen, T. N., Wellton, M., Nguyen, T. H., Mrsny, R. J., 1996. Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue. *J. Pharm. Sci.* 85: 165- 169.
- Salphati, L., Childers, K., Pan, L., Tsutsui, K., Takahashi, L., 2001. Evaluation of a single-pass intestinal-perfusion method in rat for the prediction of absorption in man. *J. Pharm. Pharmacol.* 53: 1007–1013.

- Shah, P., Jogani, V., Bachi, T., Misra, A., 2006. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol. Prog.* 22: 186-198.
- Song, W.H., Yeom, D.W., Lee, D.H., Lee, K.M., Yoo, H.J., Chae, B.R., Song, S.H., Choi, Y.W., 2013. In situ intestinal permeability and in vivo oral bioavailability of celecoxib in supersaturating self-emulsifying drug delivery system. *Arch. Pharm. Res.* DOI 10.1007/s12272-013-0202-7.
- Stenberg, P., Luthman, K., Ellens, H., Lee, C. P., Smith, P. L., Lago, A., Elliott, J. D., Artursson, P., 1999. Prediction of the intestinal absorption of endothelin receptor antagonists using three theoretical methods of increasing complexity. *Pharm. Res.* 16: 1520- 1526.
- Stewart, B. H., Chan, O. H., 1998. Use of immobilized artificial membrane chromatography for drug transport applications. *J. Pharm. Sci.* 87: 1471- 1478.
- Sutton, S.C., Rinaldi, M.T.S., 2001. Comparison of the Gravimetric, Phenol Red, and 14C-PEG-3350 Methods to Determine Water Absorption in the Rat Single-Pass Intestinal Perfusion Model. *AAPS Pharm Sci.* 3: 1-5.
- Swaan, P.W., 1998. Recent Advances in intestinal macromolecular drug delivery via receptor- mediated transport pathways. *Pharm. Res.* 15: 826- 834.
- Tsuji, A., Tamai, I., 1996. Carrier-mediated intestinal transport of drugs. *Pharm. Res.* 13: 963-977.
- Uhing, M., Kimura, R., 1995. The effect of surgical bowel manipulation and anesthesia on intestinal glucose absorption in rats. *J. Clin. Invest.* 95: 2790- 2798.
- Ungell, A., Nylander, S., Bergstrand, S., Sjoberg, A., & Lennernas, H., 1998. Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat. *J. Pharm. Sci.* 87: 360- 366.

-
- Van Breemen, R.B., Li, Y., 2005. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 1: 175–185.
 - Varma, M.V.S., Panchagnula, R., 2005. Prediction of In vivo intestinal absorption enhancement on P-glycoprotein inhibition, from rat in situ permeability. *J. Pharm. Sci.* 94: 1694–1704.
 - Volpe, D.A., 2010. Application of method suitability for drug permeability classification. *AAPS J.* 12: 670–678.
 - Watkins, P.B., Wrighton, S.A., Schuetz, E.G., Molowa, D.T., Guzelian, P.S., 1987. Identification of Glucocorticoid-Inducible Cytochromes P-450 in the Intestinal Mucosa of Rats. *J. Clin. Invest.* 80: 1029–1036.
 - Yamashita, S., Furubayashi, T., Kataoka, M., Sakane, T., Sezaki, H., Tokuda, H., 2000. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur. J. Pharm. Sci.* 10: 195- 204.
 - Zhang, L., Brett, C.M., Giacomi, K.M., 1998. Role of organic transporters in drug absorption and elimination. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38: 431- 460.

9. APÉNDICE

1. **Apéndice A.** Datos obtenidos de un experimento de perfusión, utilizados para calcular el coeficiente de permeabilidad efectiva (P_{eff}) de clorhidrato de propranolol para una rata.

Rata	Tiempo de perfusión (min)	Muestra	$C_{in\ nom}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$C_{in\ exp}$ ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración de salida (C_{out} , $\mu\text{g/mL}$)	$C_{in\ r.f.}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$C_{in\ exp\ r.f.}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$C_{out\ r.f.}$ ($\mu\text{g/mL}$)	Longitud del segmento intestinal (cm)	Radio (cm)	Velocidad de flujo (mL/min)
1	40	1	160	158.2568	130.1375	12.5	12.4	12.4519	9.5	0.2	0.2
	50	2			130.6367			12.3647			
	60	3			132.6788			12.5303			
	70	4			130.4061			12.4488			
	80	5			132.2464			12.5701			
	90	6			132.4388			12.6151			

$C_{in\ nom}$: Concentración nominal inicial (entrada), $C_{in\ exp}$: Concentración experimental inicial (entrada), $C_{in\ r.f.}$: Concentración nominal inicial de rojo de fenol, $C_{in\ exp\ r.f.}$: Concentración experimental inicial de rojo de fenol, $C_{out\ r.f.}$: Concentración de rojo de fenol a la salida

APÉNDICE

2. **Apéndice B.** Datos obtenidos de un experimento de perfusión, utilizados para calcular el coeficiente de permeabilidad efectiva (P_{eff}) de clorhidrato de ranitidina para una rata.

Rata	Tiempo de perfusión (min)	Muestra	$C_{in\ nom}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$C_{in\ exp}$ ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración de salida (C_{out} , $\mu\text{g/mL}$)	$C_{in\ r.f.}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$C_{in\ exp\ r.f.}$ ($\mu\text{g/mL}$)	$C_{out\ r.f.}$ ($\mu\text{g/mL}$)	Longitud del segmento intestinal (cm)	Radio (cm)	Velocidad de flujo (mL/min)
1	40	1	80	80.8867	79.8767	12.5	12.4	12.4519	9.5	0.2	0.2
	50	2			79.4958			12.3647			
	60	3			80.3030			12.5303			
	70	4			79.5598			12.4488			
	80	5			79.6736			12.5701			
	90	6			80.4142			12.6151			

$C_{in\ nom}$: Concentración nominal inicial (entrada), $C_{in\ exp}$: Concentración experimental inicial (entrada), $C_{in\ r.f.}$: Concentración nominal inicial de rojo de fenol, $C_{in\ exp\ r.f.}$: Concentración experimental inicial de rojo de fenol, $C_{out\ r.f.}$: Concentración de rojo de fenol a la salida