



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LOS GLICÓSIDOS AISLADOS DE
SEMILLAS DE *THEVETIA THEVETIOIDES* SOBRE LA
PERMEABILIDAD INTESTINAL DE SIMVASTATINA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A:
ERIKA LIZBETH PINEDA POSADAS

Director: Dr. Andrés Navarrete Castro

Asesor: M. en F. Martha Ugalde Hernández



2015



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 Dr. Andrés Navarrete Castro, por permitirme trabajar en su laboratorio y ser parte de su equipo de trabajo, por sus enseñanzas, su confianza, su apoyo y asesoría en éste proyecto.

Al M. en C. Simone Barbonetti, por ser mi equipo de trabajo, por todo su apoyo, su trabajo y enseñanzas.

A la Q.F.B. Marylú Tinajero por la ayuda y el apoyo al inicio de éste proyecto.

Al Candidato a Doctor Alejandro Alfaro por su ayuda para el desarrollo del método analítico.

Al Dr. José Luis Balderas López, por su ayuda en la identificación de los compuestos aislados, así como para el análisis de cinética de permeabilidad.

A la candidata a Doctor Alejandra Orona y al Candidato a Doctor Josué Velázquez por su apoyo en la revisión del presente trabajo y asesorías diarias.

A mi jurado, por su revisión y aportaciones a éste trabajo

Incluyendo a los antes mencionados y a mis demás compañeros del Laboratorio 126, Abigail, Israel, Dulce, Juan Carlos, Natalia, Christy, Iván, Carlitos, Melisa, Pamela y Miguel, a cada uno de ustedes muchas gracias por sus consejos, anécdotas y momentos divertimos que pasamos, los considero a todos muy buenos amigos.

Al proyecto PAIP 5000 – 9143 y PAPIIT IN203614 por los recursos proporcionados.

DEDICATORIA

A mi familia por el gran apoyo y amor que me han brindado siempre, a mi madre Patricia Posadas, mis abuelitos Aurelia Apolinar y Candelario Hernández, mi tía Cristina Posadas y hermanos Andrés Pineda y Ricardo Pineda.

A Oscar por el amor que tenemos, su ayuda incondicional y el gran equipo que somos.

LISTA DE ABREVIATURAS

gp- P	Glicoproteína P
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
TMD	Dominio Transmembranal
ATP	Adenosin Trifosfato
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
CCF	Cromatografía en Capa Fina
ABC	Área Bajo la Curva
ANOVA	Análisis de Varianzas
tr	Tiempo de retención
rpm	Revoluciones por minuto
HMGCoA	Hidroximetil Glutaril Coenzima A
Kg	Kilogramos
Uma	Unidad de masa atómica
t ₀	Tiempo cero
m/z	Relación masa/ carga
Min	Minutos
ml	Mililitros
G	Gramos
mg	Miligramos
H	Hora
CH ₃ Cl ₃	Cloroformo
CLAR- EM	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
MeOH	Metanol
AChE	Acetil Colinesterasa
kDa	Kilodalton
EFF	Endocitosis de Fase Fluída
EMR	Endocitosis Mediada por Receptores
MRPs	Proteínas asociadas a la Resistencia Múltiple
MDR	Multidrug Resistance
NBD	Nucleotide Binding Domain
CoA	Coenzima A

1.	RESUMEN	8
2.	INTRODUCCIÓN	9
3.	MARCO TEÓRICO.....	10
3.1.	Absorción y permeabilidad intestinal	10
3.2.	El intestino delgado	10
3.3.	Mecanismos de transporte de fármacos a nivel intestinal	12
3.3.1.	Transporte pasivo	12
3.3.1.1.	Difusión transcelular o difusión simple.....	12
3.3.1.2.	Transporte paracelular.....	13
3.3.1.3.	Transporte mediado por acarreadores (difusión facilitada).....	13
3.3.2.	Transporte activo	14
3.3.2.1.	Transporte mediado por acarreadores (con gasto de energía).	14
3.3.3.	Transporte por vesículas.....	15
3.3.4.	Mecanismos de eflujo	15
3.3.4.1.	Glicoproteína P.....	16
3.4.	Estatinas	18
3.5.	Modelos “In vitro” empleados para la evaluación de permeabilidad y absorción intestinal.....	19
3.5.1.	Tejidos extraídos.....	20
3.5.2.	Perfusión en segmentos de intestino	20
3.5.3.	Modelo de intestino invertido	21
3.5.4.	Modelo de saco intestinal.....	21
3.6.	<i>Thevetia thevetioides</i>	22

3.6.1.	Características botánicas	22
3.6.2.	Etnobotánica	23
3.6.3.	Farmacología y toxicidad	24
3.6.4.	Química.....	25
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	29
5.	HIPÓTESIS	30
6.	OBJETIVO GENERAL	31
6.1.	Objetivos particulares.....	31
7.	MATERIAL	32
7.1.	Fármacos y sustancias.....	32
7.2.	Material Vegetal	32
7.3.	Animales	33
7.4.	Sistemas	34
8.	MÉTODOS	35
8.1.	Obtención de la fracción de glicósidos de <i>Thevetia thevetioides</i>	35
8.2.	Obtención de glicósidos hidrolizados	36
8.3.	Identificación de los compuestos	37
8.4.	Estudios de permeabilidad en intestino delgado	39
8.5.	Método analítico en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la cuantificación de Simvastatina.....	41
8.5.1.	Matriz biológica (placebo)	42
8.5.2.	Selectividad.....	42
8.5.3.	Exactitud	42
8.5.4.	Precisión	42
8.5.5.	Estabilidad	43

8.5.6. Linealidad.....	43
9. RESULTADOS.....	44
9.1. Rendimiento de glicósidos obtenidos.....	44
9.2. Identificación de los glicósidos.....	44
9.2.1. Thevetina A.....	46
9.2.2. Thevetina B.....	48
9.2.3. Thevetina C.....	49
9.2.4. Acetil thevetina A.....	50
9.2.5. Acetil thevetina B.....	51
9.2.6. Acetil thevetina C.....	52
9.2.7. Nerifolina.....	53
9.2.8. Acetil nerifolina.....	54
9.2.9. Acetil peruvosido.....	55
9.3. Validación del método bio-analítico.....	56
9.3.1. Selectividad.....	56
9.3.2. Linealidad.....	57
9.4. Permeabilidad de simvastatina.....	59
9.4.1. Permeabilidad de simvastatina en presencia de los glicósidos.....	62
10. DISCUSIÓN.....	65
11. CONCLUSIONES.....	67
12. REFERENCIAS.....	68
13. ANEXOS.....	73

1. RESUMEN

Thevetia thevetioides, es una planta de uso ornamental, cuya semilla se ingiere con la finalidad de bajar de peso o como desparasitante. La ingesta induce cuadros de diarrea, acompañados de náuseas, vómito, mareos, dolor abdominal y arritmias. Una posible causa de los cuadros de diarrea que provoca su consumo, se sugiere, es por la participación de la Glicoproteína de permeabilidad (gp- P), presente en la capa luminal del intestino delgado, la cual está involucrada en la excreción inmediata de xenobióticos. En el presente trabajo se estudió la posible actividad de los glicósidos de *T. thevetioides* sobre la gp- P, utilizando como sustrato de referencia a la Simvastatina. Por medio del análisis de cromatografía de líquidos acoplado a Espectrometría de masas se identificaron los glicósidos: thevetina A, thevetina B, thevetina C, acetil thevetina A, acetil thevetina B, Acetil thevetina C, Nerifolina, Acetil nerifolina así como Acetil peruvosido. En el presente estudio de permeabilidad se encontró que el modelo matemático que describe el paso de la simvastatina desde la luz intestinal hacia el intersticio, en un modelo *in vitro* de asa intestinal de cobayo, se ajusta a un modelo biexponencial. Para determinar la interacción, se administró conjuntamente la Simvastatina con la mezcla de glicósidos de *T. thevetioides*, encontrándose que la permeabilidad de ésta, no se vio modificada por la presencia de los glicósidos, al no haber diferencias significativas en la velocidad a la cual atraviesa la membrana intestinal.

2. INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido utilizadas durante siglos, para tratar diversos padecimientos, representando una fuente de obtención de productos naturales, que se utilizan por sus efectos terapéuticos. En México alrededor de 4 000 especies de plantas tienen atributos medicinales, sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en 5% de estas especies, es por eso que la Herbolaria Mexicana representa un recurso viable para encontrar nuevos tratamientos contra las enfermedades más comunes. Las ventas de libre acceso de productos naturales, se ven acrecentadas por las campañas de que “si es natural, su uso no es tóxico, ni peligroso”; sin embargo, se sabe que las plantas y sus productos no son inocuos, además de sus efectos benéficos pueden producir efectos colaterales y tóxicos.^{1, 2, 3}

Un caso particular, es el de *Thevetia thevetioides*, una planta con alto riesgo a la ingesta. Las semillas se consumen para favorecer la pérdida de peso o como antiparasitaria. Se ha determinado toxicidad en extractos etanólicos de las semillas, además de contener entre sus principios activos glicósidos cardiotónicos que producen un cuadro similar de intoxicación como una sobredosis de digitálicos.^{4, 5}

A la fecha, no se conocen estudios farmacocinéticos en relación a la absorción y permeabilidad intestinal de los glicósidos de *Thevetia thevetioides*. Por lo anterior, en el presente trabajo se realizó el estudio de la interacción entre los glicósidos de las semillas de ésta planta sobre la permeabilidad intestinal de simvastatina, un sustrato de la gp- P.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Absorción y permeabilidad intestinal

La absorción estudia el paso de los fármacos del medio exterior a la circulación sistémica, atravesando distintas barreras biológicas.^{6, 7}

La permeabilidad se refiere como la propiedad por la cual una membrana permite el paso de un soluto a través de ella.^{6, 7}

La absorción de una sustancia por vía oral, implica generalmente, el paso de tales moléculas desde el lumen intestinal hacia la sangre a través de la membrana intestinal. Aproximadamente el 90% de toda la absorción de nutrientes, se produce en el intestino delgado.⁸

3.2. El intestino delgado

El intestino delgado de seres humanos es una sección del sistema gastrointestinal, mide aproximadamente entre 2 y 6 m, está dividido en tres secciones: duodeno, yeyuno e íleon, que comprenden el 5%, 50% y 45% de longitud, respectivamente. En su superficie, posee proyecciones únicas (evaginaciones de membrana) que aumentan significativamente el área disponible para la absorción, así como también la presencia de las vellosidades y micro vellosidades que aumentan el área de superficie por 30 y 600 veces, respectivamente (**Figura 1**). Su función es la absorción selectiva de nutrientes y limita el paso de sustancias extrañas (xenobióticos), enzimas digestivas y bacterias.^{9, 10.}

El epitelio es una monocapa de células compuesto en su mayoría por enterocitos o células de absorción, poseen una membrana apical y una baso-lateral. Estas células se orientan hacia la luz intestinal y están unidas entre sí mediante uniones estrechas (*zonula occludens*). La unión estrecha, una región donde las membranas fosfolipídicas de dos células contiguas se hallan en contacto y se unen entre sí mediante proteínas integradas a la membrana, rodea a la célula en forma de anillo, formando en conjunto una barrera continua.^{8, 10}

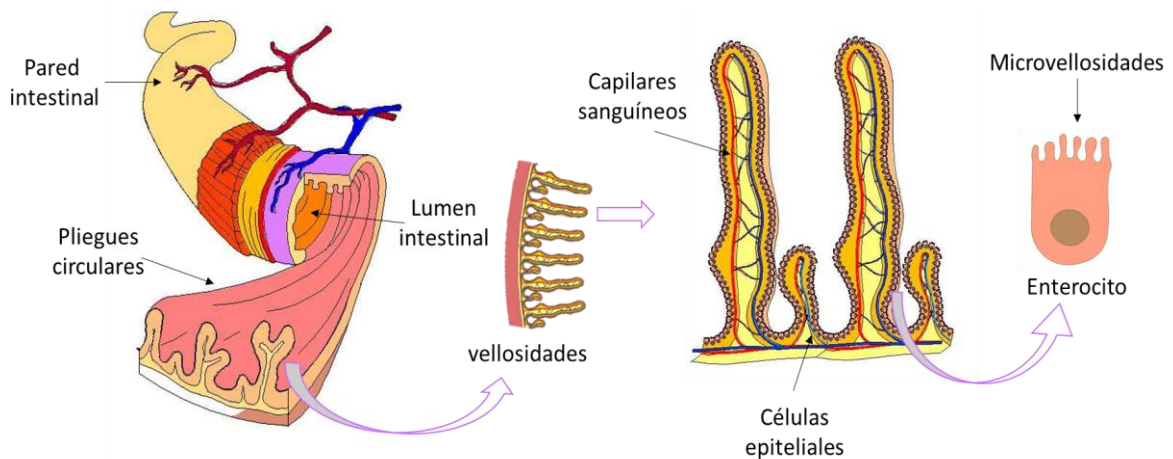


Figura 1. Estructura de pliegues, vellosidades y microvellosidades intestinales (Modificada de Sugano K. et. al. 2010)

El componente bioquímico de la barrera mucosa consiste en enzimas metabolizadoras de fármacos y de transportadores, siendo la isoenzima CYP3A4 la que representa cerca del 60% del total de las enzimas del citocromo encontradas en el intestino.¹⁰

3.3. Mecanismos de transporte de fármacos a nivel intestinal

Las moléculas que llegan al lumen intestinal, pueden presentar alguno de los siguientes procesos de transporte: Difusión transcelular, transporte paracelular, transporte mediado por acarreadores (difusión facilitada o con gasto de energía), mediante vesículas y mecanismos de eflujo. Algunos de estos mecanismos de transporte se clasifican dependiendo el gasto de energía, en transporte pasivo y transporte activo:

3.3.1. Transporte pasivo

Los materiales son transportados a través de la membrana epitelial gastrointestinal en respuesta a un gradiente de concentración o electroquímico.⁷

3.3.1.1. Difusión transcelular o difusión simple

Representa la principal vía de transporte de los compuestos hidrofóbicos, las velocidades de transporte por difusión dependen del tamaño, de la liposolubilidad del soluto, de un gradiente de concentración y no se requiere gasto de energía, involucrando el movimiento de las moléculas de soluto a través de la membrana apical (**Figura 2 A**).^{6, 7, 8}

3.3.1.2. Transporte paracelular

Constituye una vía de transporte extracelular a través de las uniones estrechas formadas entre las células. Los factores que intervienen en la difusión paracelular son el gradiente de potencial electroquímico (derivado de la diferencia en gradientes de concentración), el potencial eléctrico y la presión hidrostática. Se considera que la difusión paracelular es un proceso pasivo que se rige por la Ley de Fick, donde las moléculas hidrofílicas, en su mayoría de bajo peso molecular (200 Da), pueden permear mediante este mecanismo, el cual cabe mencionar, tiene una tasa de transporte reducida (**Figura 2 B**).⁸

3.3.1.3. Transporte mediado por acarreadores (difusión facilitada).

Requiere que una proteína transportadora de la membrana se fije a la molécula en cuestión y modifique su conformación, formando un complejo que puede atravesar la membrana por ser más liposoluble que el sustrato original. Permite atravesar la membrana a aquellas moléculas demasiado grandes y que debido a su polaridad tampoco son capaces de atravesarlas, se realiza en sentido del gradiente de concentración y sin ningún gasto de energía (**Figura 2 C**).^{6, 7, 8}

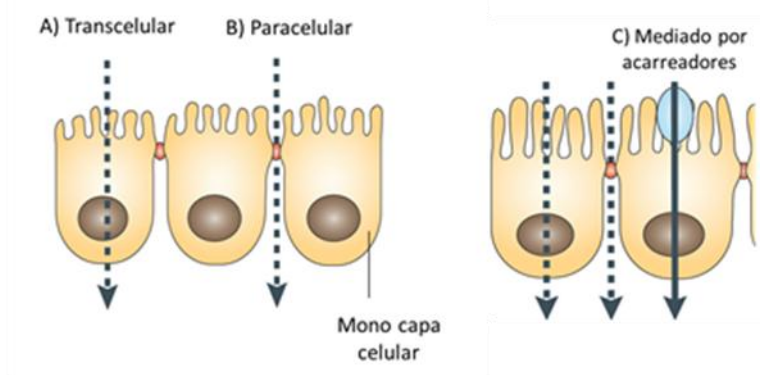


Figura 2. Mecanismos de transporte pasivo: La monocapa formada por células alineadas en el intestino, puede presentar transporte transcelular pasivo (A), en donde las sustancias pasan a través de las células, transporte paracelular (B), que ocurre entre los espacios celulares, que es importante para la permeación de fármacos hidrofílicos pequeños. Finalmente el transporte mediado por acarreadores (C) cuando la membrana de las células expresan proteínas de transporte.

(Modificada de Sugano K. et. al. 2010)

3.3.2. Transporte activo

Es el paso de una sustancia a través de la membrana biológica en contra de un gradiente electroquímico. Para ello se requiere consumo energético y la velocidad de transporte no depende del gradiente de concentración.^{6, 8}

3.3.2.1. Transporte mediado por acarreadores (con gasto de energía).

Este mecanismo requiere de un transportador, una proteína de membrana que forma un complejo con la molécula del fármaco, para así atravesar la membrana y posteriormente liberar al fármaco del otro lado, a la vez que el transportador retoma su conformación original. Dentro de las características de estas proteínas destacan su especificidad, capacidad de saturación y variabilidad de expresión regional. Existen más de 400 transportadores de membrana que pertenecen a dos grandes familias: la familia ABC por

sus siglas en inglés (ATP Binding Cassette) y la familia de transportadores de solutos ^{7, 8,}

11.

3.3.3. Transporte por vesículas

Este tipo de transporte incluye a los procesos de endocitosis de fase fluida (EFF), endocitosis mediada por receptores (EMR), transocitosis y exocitosis. En la EFF, las moléculas de soluto disueltas en el fluido luminal son incorporadas a las vesículas endocíticas originando invaginaciones que dan lugar a vesículas o pinosomas que migran a través de la célula hacia los endosomas, los cuales, subsecuentemente se fusionan con los lisosomas. Actualmente se sabe que algunos péptidos y proteínas emplean esta vía de transporte. Por su parte, la EMR involucra la unión de la macromolécula a un receptor de membrana y la unión subsecuente del complejo receptor-ligando dentro de sacos cubiertos de caltrina. Posteriormente, se presenta un proceso conocido como “sorting” en el cual los ligandos normalmente son destruidos por los lisosomas mientras que los receptores pueden ser destruidos o reciclados. La transocitosis, por otro lado, ocurre cuando el ligando disuelto en la vesícula endocítica (posterior a la EFF o EMR) atraviesa los lisosomas y es liberado a través de la membrana basolateral (exocitosis) ^{. 8}

3.3.4. Mecanismos de eflujo

En contraste con los transportadores que promueven la absorción intestinal, existen otros transportadores conocidos como transportadores de eflujo que presentan el efecto contrario, es decir, se encargan de mediar la expulsión de compuestos hacia el lumen intestinal mediante un proceso llamado eflujo apical. Los mecanismos de eflujo intestinal

se atribuyen regularmente a proteínas localizadas en la membrana apical pertenecientes a la familia ABC, tales como la gp- P y a otras proteínas asociadas a la resistencia múltiple a fármacos conocidas como MRPs. La localización de los transportadores de eflujo en la membrana apical de enterocitos y colonocitos confiere al intestino la capacidad de limitar la absorción. Los transportadores de eflujo presentan baja selectividad y se consideran una limitante para la absorción de fármacos, por lo que el estudio de sus características y afinidades resulta de gran relevancia para la absorción de entidades terapéuticas.^{8, 10}

3.3.4.1. Glicoproteína P

La superfamilia de transportadores ABC comprende un gran número de proteínas transmembranales con diversas funciones y están subdivididas en siete subfamilias designadas de la A a la G, los miembros de ésta superfamilia muestran alta similitud de aminoácidos que rodean los pliegues de unión al ATP. Un miembro perteneciente a ésta superfamilia es la gp- P o también llamada MDR1, se expresa como el resultado de la transcripción del gen ABCB1 y a la fecha es el mejor caracterizado debido a su papel significativo en conferir resistencia a múltiples fármacos.^{12, 13.}

La gp- P es expresada en la membrana plasmática de células de barrera y órganos de eliminación (intestino, riñón, hígado, cerebro y placenta) en los que tiene funciones de excreción y protección. En el intestino, el hígado y el riñón la expresión de la gp- P, puede restringir la absorción y eliminación de sus sustratos, minimizando así la exposición sistémica de algunos fármacos, desempeñando un papel importante en la eliminación de primer paso de los fármacos administrados por vía oral, limitando de esta forma su biodisponibilidad.¹⁴

Una de las características más interesantes de ésta proteína es que los sustratos varían en estructura y funcionalidad, que van desde pequeñas moléculas tales como cationes orgánicos, hidratos de carbono, aminoácidos y algunos antibióticos, a las macromoléculas como polisacáridos y proteínas.^{12, 13}

La gp- P (**Figura 3**); consta de 1276 – 1280 aminoácidos, con una masa molecular de aproximadamente 170 kDa. Consiste en dos mitades homólogas, cada una presenta seis dominios transmembranales altamente hidrófobos (TMD). Los TMD forman la vía a través de la cual las moléculas del fármaco atraviesan la membrana, dispuestos en tres pares y asociados con un dominio hidrofílico C-terminal que se sitúa en el citoplasma de la membrana. Las tres partes de segmentos transmembranales están separados por largas cadenas de aminoácidos, cada mitad de la molécula contiene un dominio NBD (Nucleotide Binding Domain). Los NBD son esenciales para el buen funcionamiento y actividad de gp- P ya que es totalmente dependiente de la presencia de ATP. Los dominios de unión a ATP actúan como ATPasa, proporcionan energía necesaria para bombear sustratos a través de membranas en contra gradiente de concentración. La interfase TMD – NBD permite los cambios conformacionales asociados con la hidrólisis del ATP para la translocación del sustrato, llamados hélices intracelulares.^{12, 15}

Los grandes cambios conformacionales en la gp- P ocurren en la unión de ATP, aunque, a menudo se ha asumido que la hidrólisis de ATP maneja los procesos de transporte, los datos muestran que las reducciones de la afinidad de unión a gp- P de los fármacos son debidos a la unión de ATP en lugar de su hidrólisis. Por lo tanto la unión de ATP parece

conducir los grandes cambios conformacionales que reducen la afinidad de unión de los fármacos y exponen el sitio de unión del fármaco al medio extracelular.^{12, 16.}

La presencia de múltiples sitios de unión de fármacos en la gp- P podría proporcionar una explicación de la amplia gama de compuestos conocidos para interactuar con esta proteína. Estudios previos han determinado que hay dos grandes sitios de unión de sustrato sobre la gp- P, los sitios de TMD 5 y 6 y los sitios de TMD 11 y 12.¹²

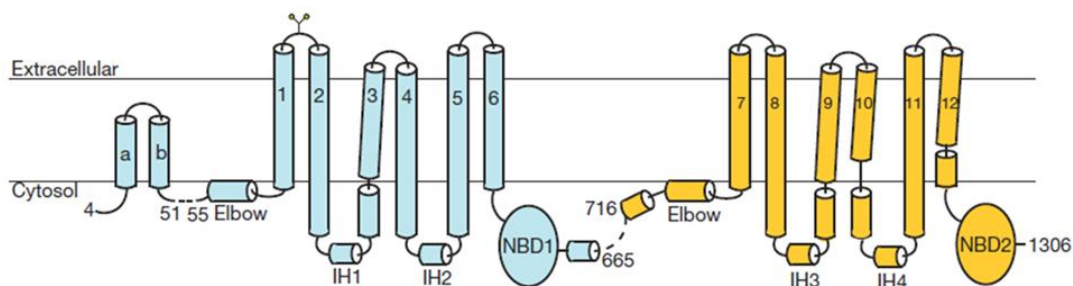


Figura 3. Modelo aceptado para la estructura topológica de gp- P.
(Modificada de Zhou S. F. 2008)

3.4. Estatinas

Las estatinas son fármacos para disminuir los niveles de colesterol en sangre y con ello ayudan a reducir drásticamente las enfermedades cardiovasculares asociadas con niveles elevados de colesterol.¹⁴

Son inhibidores selectivos y competitivos de la HMGCoA reductasa, enzima limitante de la síntesis de colesterol, por ser responsable de la conversión de HMGCoA a mevalonato, precursor del colesterol. El colesterol es capturado por las LDL, por endocitosis por lo que la inhibición de la enzima hace que reduzca la cantidad de colesterol y se aumenta el

número de receptores hepáticos para las LDL, incrementándose la captación y catabolismo.¹⁷

Existen inhibidores de la HMGCoA reductasa, entre los cuales están: Lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina y cerivastatina. Los tres primeros son de origen natural, producidos por el hongo *Aspergillus terreus* y los restantes sintéticos.^{17, 18.}

En general, las estatinas se consideran seguras, sin embargo, en dosis altas las interacciones medicamentosas que resultan de elevados niveles sistémicos de fármaco han desarrollado rabdomiolisis.

Recientemente, el potencial de interacciones fármaco – fármaco, resultantes de la inhibición de la gp- P, ha recibido una considerable atención como un factor que contribuye a las interacciones entre fármacos con estatinas.^{14, 17, 18.}

3.5. Modelos “*In vitro*” empleados para la evaluación de permeabilidad y absorción intestinal

La habilidad de un compuesto administrado oralmente para absorberse a través de la mucosa intestinal puede estar limitada por los componentes físicos o bioquímicos de la barrera epitelial, por lo que los modelos de permeabilidad *in vitro* contribuyen a predecir el potencial de absorción intestinal de un fármaco y al igual proporcionan información para comprender los mecanismos de absorción relacionados. Esto puede ser cumplido en la medida que el modelo de permeabilidad incorpore la funcionalidad de los

componentes físicos y bioquímicos de la barrera intestinal como son los métodos basados en tejidos animales ^{8, 10, 11, 19}.

3.5.1. Tejidos extraídos

Los tejidos intestinales extraídos se han utilizado frecuentemente para estudiar la absorción intestinal de nutrientes y fármacos. En este sistema se aplica por un lado del tejido (mucosa o serosa) una solución que contiene al fármaco. La tasa de absorción de fármaco se determina ya sea midiendo la cantidad desaparecida de fármaco de la solución donadora o la aparición del mismo en el lado opuesto. Aunque varían en complejidad y versatilidad, estas preparaciones de tejido comparten dos ventajas importantes: la integridad del tejido y la habilidad para determinar la absorción a través de diferentes segmentos intestinales. Una desventaja en común es la viabilidad limitada de este tipo de preparaciones. ^{8, 10, 19}.

3.5.2. Perfusión en segmentos de intestino

Consiste en perfundir regiones específicas a lo largo del tracto intestinal, en este sistema se calcula la permeabilidad al cuantificar la desaparición del compuesto del lumen intestinal donde, por lo general se asume que el fármaco desaparecido es igual al fármaco absorbido. Los intestinos perfundidos pueden usarse para estudiar diferencias de absorción y metabolismo en cada segmento. La desventaja es que el número de segmentos intestinales que pueden obtenerse de un animal es limitado, sin embargo tiene un gran valor para la elucidación de mecanismos de transporte y para evaluar la absorción de fármacos cuya baja solubilidad requiere el uso de vehículos complejos que

no podrían ser presentados en otros sistemas *in vitro*. Cabe resaltar que éste es el modelo que ofrece la forma más directa de medir la permeabilidad intestinal.^{8, 19.}

3.5.3. Modelo de intestino invertido

Ésta fue una de las primeras técnicas *in vitro* utilizadas para estudiar la absorción intestinal de fármacos. El modelo incluye a la mucosa y a las capas musculares subyacentes donde la presencia de la capa muscular puede inducir la acumulación de fármaco y, en dado caso, dar lugar a una recuperación pobre del mismo. Ésta técnica fue muy popular hace algunas décadas, sin embargo, su uso en años recientes se ha reducido en gran medida debido a las complicaciones que presenta en cuanto a la viabilidad de los tejidos por tiempos prolongados y a la poca reproducibilidad que se puede presentar, aun así, todavía se puede observar su implementación en estudios para determinar la absorción de fármacos.^{8, 10.}

3.5.4. Modelo de saco intestinal

El empleo del saco no invertido fue diseñado originalmente para evaluar los mecanismos de transporte. Permite estudiar la permeabilidad pasiva de las moléculas transportadas activamente y se pueden estudiar dos o más fármacos simultáneamente, en éste modelo se evitan daños morfológicos y las cantidades de fármaco que se requieren para el estudio son relativamente pequeñas, además, se pueden tomar muestras analíticamente limpias y en forma sucesiva.

3.6. *Thevetia thevetioides*

Es una planta de la Herbolaria Mexicana conocida popularmente como codo de fraile, cabalonga, calaverita, hueso de fraile, huevos de gato, venenillo, o Yoyote, que en Náhuatl significa cascabel. Es originaria de América tropical y pertenece a la familia botánica de las *Apocynaceae*, es utilizada para controlar la obesidad a riesgo de sufrir, incluso, hasta la muerte.^{5, 20.}

3.6.1. Características botánicas

Es un arbusto de 3 a 9 m de altura; el tallo es de color gris, las hojas son angostas y miden hasta 15 cm de largo. Las flores son amarillas y aparecen en racimos que tienen pocas flores. Sus frutos son de mediano tamaño y tienen una semilla café claro (**Figura 4**). Habita en clima cálido, cultivada en huertos familiares y solares. Asociada a bosque tropical subcaducifolio y matorral xerófilo, se localiza en los estados de Guerrero, Jalisco, Colima, México, Michoacán, Puebla, Oaxaca, San Luis Potosí y Veracruz.^{5, 20.}

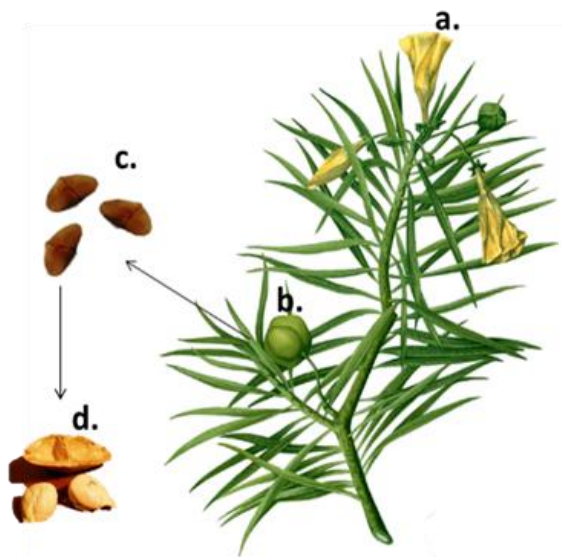


Figura 4. *Thevetia thevetioides*. Las flores se ubican al extremo del tallo **a**; su fruto es una drupa carnosa de color verde **b**, la cual contiene las semillas **c**, de donde se obtiene el endospermo rico en compuestos glicosilados. (Figura elaborada por el sustentante)

3.6.2. Etnobotánica

Esta planta se recomienda para el tratamiento de afecciones de la piel como barros y espinillas (Morelos); padecimientos bucales así como dolor de muelas y caries; problemas cardiovasculares tales como almorranas o várices, para estos dos últimos casos, en Michoacán, se recomienda moler la semilla con vaselina y aplicar la pomada en la parte afectada. Se refiere también para quitar el dolor causado por la picadura de alacrán y la “tos ahogadora”. Se emplea contra algunas enfermedades culturales como el “ojo en niños” y “la mollera caída”. En la india los extractos de *Thevetia thevetioides* son usados como pediculicida.²⁰

3.6.3. Farmacología y toxicidad

Se ha determinado actividad letal cuando los extractos etanólicos de las semillas se incorporaron a la dieta de larvas *Ostrinia nubilalis* y mostraron una mortalidad del 100 %. Desde el punto de vista de su toxicidad se indica que toda la planta es tóxica; sin embargo, en la semilla se concentra la mayor cantidad de principios tóxicos.^{5, 21.}

También se han determinado signos y síntomas de intoxicación en ratones macho CD1 tras la administración de un extracto acuoso de semillas de *Thevetia peruviana* registrándose 10 minutos después de la administración de una dosis de (100 mg/kg de peso) taquicardias, así como pérdida de peso significativa; y tras la administración de tres dosis de (50 mg/kg de peso) que incluyó la pérdida de adherencia en las extremidades traseras, contracciones musculares, taquicardia, una parálisis completa de la extremidades traseras, ataxia y algunos sufrieron bradicardia y murieron. Reportándose el aumento de los niveles de acetilcolinesterasas (AChE) y lesiones en tejido cardíaco.²²

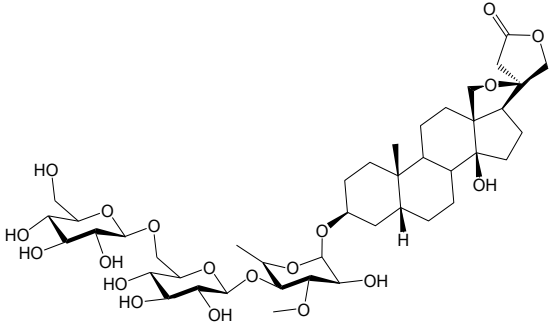
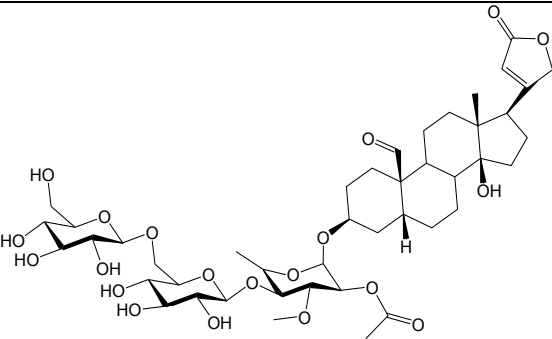
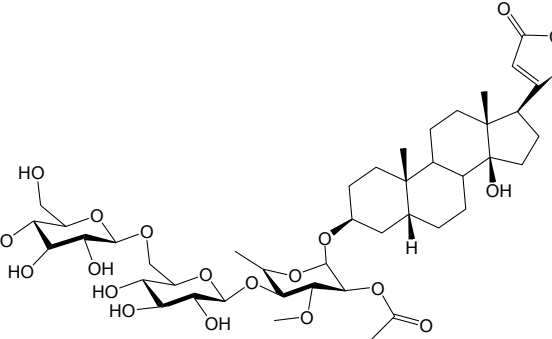
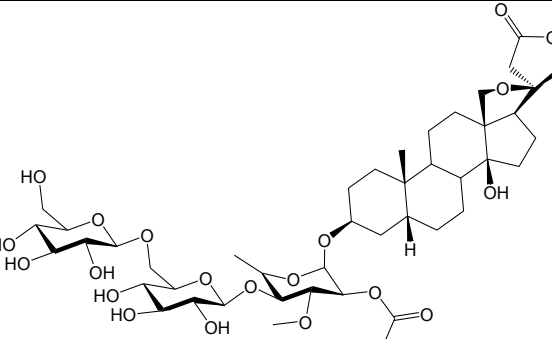
La ingestión de las semillas del género *Thevetia sp*, produce un cuadro clínico similar a la intoxicación por digoxina: vómitos, diarrea, mareos y arritmias cardíacas y en casos extremos la muerte. El tiempo de intoxicación después de la ingesta es muy variable y prolongado, lo cual hace que el mecanismo de intoxicación por *Thevetia sp*, no esté claro todavía.²³

3.6.4. Química

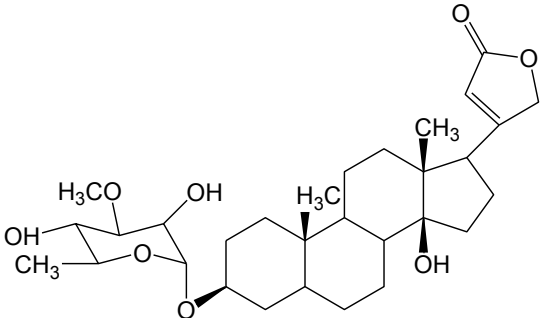
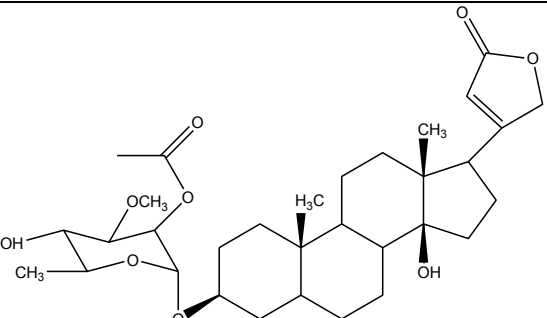
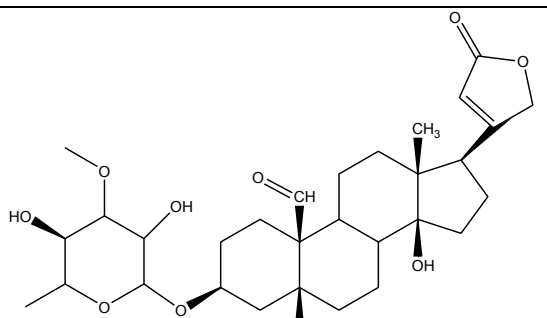
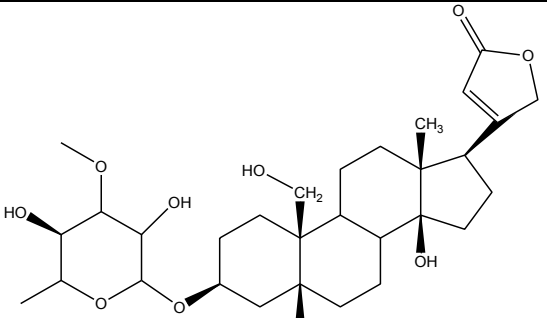
Los compuestos más estudiados de *Thevetia sp* son los glicósidos cardioactivos o también llamados tevetósidos. (**Cuadro 1**). Dichos compuestos se han encontrado en toda la planta, siendo las semillas la principal fuente y forma de ser consumidos. Estos estudios se han hecho principalmente sobre *Thevetia peruviana* y, con excepción de nerifolina y acetilnerifolina, no se ha reportado su presencia en *Thevetia thevetioides*.^{5, 24,}

25, 26, 27, 28, 29

Cuadro 1. Estructuras de los glicósidos encontrados en <i>Thevetia sp</i>.	
Thevetina A	
Thevetina B	

Continuación del cuadro 1. Estructuras de los glicósidos encontrados en <i>Thevetia sp.</i>	
Thevetina C	
Acetil thevetina A	
Acetil thevetina B	
Acetil thevetina C	

Estudio del efecto de los glicósidos aislados de semillas de *Thevetia thevetioides* sobre la permeabilidad intestinal de simvastatina

Continuación del cuadro 1. Estructuras de los glicósidos encontrados en <i>Thevetia sp.</i>	
Nerifolina	
Acetil Nerifolina	
Peruvoside	
Ruvosido	

Los glicósidos cardiotónicos son sustancias amargas, derivadas de los esteroides, que actúan sobre el corazón. La porción del azúcar contiene de 3 a 5 moléculas de monosacáridos. Poseen una aglicona esteroidal y en ella hidroxilos en el carbono 14 y en el 3 al cual siempre va unida la porción de azúcar y en el carbono 17 se encuentra un anillo lactónico α , β -insaturado (**Figura 5**). Son solubles en agua y son insolubles en éter de petróleo y CH_3Cl_3 .³⁰

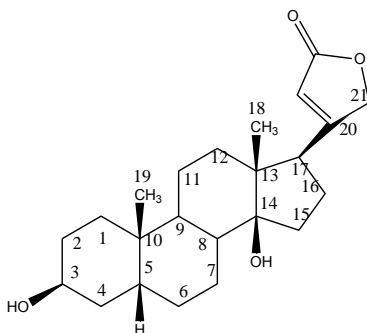


Figura 5. Estructura base de un Glicósido cardiotónico. (Figura tomada de Domínguez X., 1979)

Los azúcares de los glicosidos de *Thevetia sp* son dos, la gentobiosa, compuesto por dos unidades de D-glucosa y la tevetosa (monosacárido) que se encuentra acetilado en posición 2' en las formas acetiladas de los thevetósidos (**Figura 6**).

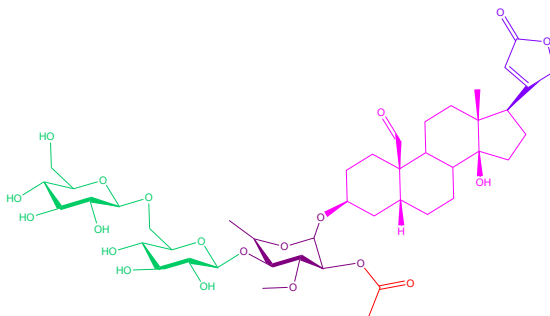


Figura 6. Acetil Thevetina A. En donde se muestra la aglicona esteroidal de color rosa, el anillo lactónico insaturado de color azul, la gentobiosa de color verde, la tevetosa de color morado y de rojo se muestra el grupo acetil unido a tevetosa que está presente en las formas acetiladas de los glicósidos de *Thevetia sp*.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que la Glicoproteína de permeabilidad (gp- P), está involucrada en la excreción de xenobióticos y su función principal es la protección. Se expresa en la membrana luminal del intestino delgado, donde limita la captación celular y la absorción de los enterocitos, éste mecanismo de protección, mantiene altas concentraciones de las moléculas que son expulsadas por la gp- P en el lumen, en donde puede ocurrir un mecanismo fisiológico de eliminación rápida de sustancias tóxicas o irritantes del intestino. Debido a la presencia de solutos poco absorbibles o no absorbidos en la luz intestinal, se crea un gradiente osmótico que favorece el paso de agua desde el compartimento vascular, por tanto, se produce una diarrea rica en agua. Las semillas de *Thevetia thevetioides* que se ingieren con la finalidad de bajar de peso o como desparasitante, inducen cuadros de diarrea, acompañada de náuseas, vómito, mareos, dolor abdominal y arritmias; un cuadro similar de intoxicación al de una sobredosis de compuestos digitálicos. Se sabe que la digoxina, el digitálico principal, es sustrato de la gp- P y dado que los glicósidos de *T. thevetioides* están relacionados estructural y biológicamente con ésta, se consideró importante investigar si al igual que digoxina los glicósidos de esta planta son sustratos de la gp-P.

5. HIPÓTESIS

Los glicósidos de las semillas de *Thevetia thevetioides*, al tener una estructura relacionada con la digoxina, glicósido cardiotónico principal de la digital y al compartir efectos biológicos similares, se espera que, éstos glicósidos sean también sustratos de la Glicoproteína de permeabilidad (gp- P), por lo que al ponerlos simultáneamente con simvastatina, un sustrato de la gp- P en el saco intestinal de cobayo aumentarán la permeabilidad de la simvastatina, lo que será indicativo de que los glicósidos de *T. thevetioides* son también sustratos de la gp- P.

6. OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio de la interacción en la permeabilidad intestinal entre simvastatina y la mezcla de glicósidos aislados de las semillas de *Thevetia thevetioides* empleando el modelo *in vitro* de asa intestinal de cobayo midiendo los cambios de concentración de simvastatina por un método de CLAR.

6.1. Objetivos particulares

- Obtener la mezcla de glicósidos de las semillas de *Thevetia thevetioides* y la Identificación de algunos de los compuestos por CLAR- EM.
- Determinar la cinética de permeabilidad de la simvastatina en intestino de cobayo en presencia y en ausencia de la mezcla de glicósidos de las semillas de *Thevetia thevetioides*.

7. MATERIAL

7.1. Fármacos y sustancias.

La Simvastatina, el ácido 3, 5- dinitrobenzónico se adquirieron de Sigma Aldrich, St. Louis Mo. USA. Los disolventes Hexano, Cloroformo, Metanol se adquirieron en JT Baker. El Metanol, Etanol y Acetonitrilo de grado HPLC marca JT Baker

Para la preparación de 4 L de solución Fisiológica (Krebs- Henseleit) se pesaron las siguientes cantidades: 27.6 g (NaCl), 1.4 g (KCl), 1.18 g ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0.66g (NaH_2PO_4), 8.4 g (NaHCO_3), 7.9 g (D- glucosa), 0.068 g (EDTA), 1.47g ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$).

Para el reactivo revelador de Kedde para cardenólidos Se preparó ácido 3, 5- dinitrobenzónico al 3% en etanol y NaOH 2M. De los cuales se realiza una mezcla 1:1 de cada disolución al momento de usarlo para revelar las placas cromatográficas.

7.2. Material Vegetal

Las semillas de *Thevetia thevetioides* fueron colectadas en la Ciudad de Colima del Estado de Colima México, en Agosto del 2012.

7.3. Animales

Los experimentos se realizaron en cobayos macho de 350 – 450 g de peso, los animales se adquirieron de Biosupply S.A. de C.V., los cuales fueron sometidos a ciclos de luz - oscuridad de 12 h y con libre acceso de agua y alimento. Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los lineamientos marcados por la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Cuidado y manejo de animales. Especificaciones técnicas para la producción, cuidados y uso de los animales de laboratorio.

7.4. Sistemas

Para los estudios de permeabilidad se utilizaron cámaras de órgano aislado (**Figura 7**), una cámara para cada segmento de intestino.

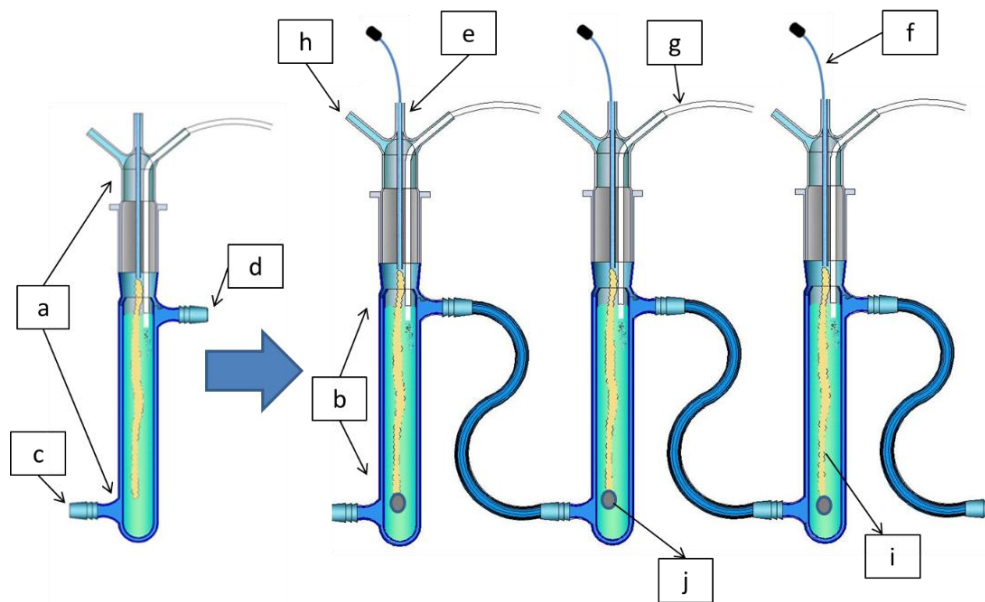


Figura 7. Sistema de cámaras para estudios de permeabilidad: El compartimento “a” corresponde a la cámara de órgano aislado, cada una, cubierta por una chaqueta de calentamiento “b”, con sus respectivas entrada “c” y salida “d” de agua permitiendo mantener la temperatura a $37^{\circ} \pm 0.5^{\circ} \text{C}$. El tubo central “e” de la cámara sirve para colocar el saco intestinal, de igual manera se puede introducir una cánula “f” permitiendo la adecuada administración del fármaco y las tomas de muestra; en el tubo “g”, se introduce una manguera para permitir el burbujeo continuo con gas carbónico; el tubo “h” sirve de salida de gases después de oxigenar al tejido. El saco intestinal se representa con la letra “i” en cuyo extremo se coloca la pesa “j” para evitar el movimiento del tejido durante la toma de muestras. Las cámaras están conectadas entre sí para el flujo de agua caliente que mantiene la temperatura. (Figura elaborada por el sustentante)

8. MÉTODOS

8.1. Obtención de la fracción de glicósidos de *Thevetia thevetioides*

Los glicósidos se aislaron a partir de 1552 g de semillas de *Thevetia thevetioides*, las cuales fueron separadas de su mesocarpio y se dejaron secar en un lugar con ventilación, posteriormente se trituraron. Se realizaron tres maceraciones con 3 L de hexano durante 72 h cada una, se filtró el disolvente y se concentró a sequedad en un evaporador rotatorio, con esto se desengrasaron las semillas, obteniendo 490 g. Se secaron las semillas y se realizaron tres maceraciones más, esta vez con 3 L de MeOH durante 72 h cada una, filtrando y evaporando en un evaporador rotatorio el disolvente, de éste extracto metanólico se obtuvieron 76.2 g del cual se montó una cromatografía en columna abierta de fase normal, utilizando como fase móvil una mezcla de MeOH: CH₃Cl₃ de polaridad creciente la cual se monitoreó por CCF, utilizando como agente revelador el reactivo de Kedde. Las fracciones que contienen los glicósidos presentaron una coloración morada en la cromatoplaca, las cuales se juntaron, obteniendo 41.2 g.^{5, 30, 31, 32.}

- Purificación de la fracción de glicósidos

Se realizaron recristalizaciones sucesivas con etanol, suspendiendo la fracción y filtrando a temperatura ambiente para eliminar cualquier impureza.

8.2. Obtención de glicósidos hidrolizados

En un frasco de vidrio se colocaron 500 mg de la mezcla de glicósidos con 10 g de semillas de *Thevetia thevetioides* frescas y pulverizadas con 100 ml de agua destilada y 3 ml de hexano. El frasco se tapó con un tapón de gasa y se dejó hidrolizar durante 4 días a una temperatura de 37° C, con un monitoreo constante de CCF. Posteriormente para la extracción de los compuestos se adicionaron 80 ml de etanol absoluto y fueron filtrados al vacío con ayuda de tierra de diatomea, al residuo se le adicionó EtOH al 50 % para filtrarlo nuevamente. La mezcla fue evaporada a presión reducida hasta un volumen final de 30 ml. Posteriormente se le realizaron 3 lavados con 30 ml de CH₃Cl₃ cada uno, los lavados clorofórmicos fueron secados con Na₂SO₄ anhidro y se concentraron al vacío, se filtró y se cristalizó; como resultado se obtuvieron 351.6 mg de polvo color amarillo claro, el cual se analizó por CCF y mostró 3 manchas diferentes que revelaron con el reactivo de kedde para compuestos que tienen la aglicona esterooidal de los glicósidos de *T. Thevetioides*.

El polvo amarillento (351.6 mg) se sometió a cromatografía en columna abierta de fase normal, empacada con 120 g de sílice gel, utilizando como fase móvil una mezcla de MeOH: CH₃Cl₃ (70:30), la cual se monitoreo por CCF. Las manchas individuales que se obtuvieron fueron analizadas por CLAR – EM.

8.3. Identificación de los compuestos

La identificación de la fracción de glicósidos de *Thevetia thevetioides* y de la obtención de glicósidos hidrolizados se realizó por la técnica de CLAR – EM, comparando los patrones de fragmentación obtenidos con los reportados en la literatura.^{27, 30}

Las condiciones de trabajo para el análisis CLAR – EM fueron:

- Espectrómetro: Espectrómetro de Masas Modelo Synapt GS-2, Marca WATERS,
- Tipo de ionización: Electrospray
- Temperatura: 100° C
- Voltaje del capilar: 3.00 kV
- Intervalo de masas: 50 – 1500 uma
- Dirección de iones: positivos
- Resolución: 20,000
- Cromatógrafo de Líquidos Modelo ACQUITY, Marca WATERS
- Columna: ACQUITY UPLC BEH, Fase Reversa C18, 1.7um, 2.1X100mm. Número de serie: 01803016915356.
- Temperatura de columna: 25 ° C
- Fase móvil: Fase A: Agua Milli Q con 0.1% de ácido fórmico; Fase B: Acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico.

- Velocidad de flujo: 0.3mL/min
- Gradiente cromatográfico para la fracción de glicósidos (**Tabla 1**) :

t (min)	% A	% B
0	87	13
9	60	40
10	0	100

Tabla 1. Gradiente cromatográfico de fase A y fase B en CLAR- EM, para la fracción de glicósidos.

- Gradiente cromatográfico para la fracción de glicósidos hidrolizados (**Tabla 2**) :

t (min)	%A	%B
0	90	10
12	50	50
14	10	90
15	10	90

Tabla 2. Gradiente cromatográfico de fase A y fase B en CLAR- EM, para la fracción de glicósidos hidrolizados.

8.4. Estudios de permeabilidad en intestino delgado

Los animales se sacrificaron con una dosis de 150 mg/ kilogramo de peso de pentobarbital sódico. Se realizó la disección del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), se lavó con Solución fisiológica Krebs- Henseleit (KHS) y se cortaron segmentos de 15 cm de longitud cada uno, ya limpios se montaron en una cámara de órgano aislado, sujetando con un hilo grueso un extremo del tejido para formar un saco y el otro extremo se adapta para su posterior administración de fármaco (**Figura 7**). La cámara con solución fisiológica se mantuvo con burbujeo continuo de gas carbógeno y a una temperatura constante de $37^{\circ} \pm 0.5^{\circ} \text{C}$, por medio de un baño recirculador de agua.

Para el estudio de permeabilidad de simvastatina se adicionaron 1.8 mL de solución de Krebs dentro del intestino y 0.2 mL de una solución de simvastatina a una concentración de 10 mg/mL; se tomaron muestras de 0.2 mL a los 0, 3, 6, 9, 12, 20, 30, 40, 60, 80 y 100 minutos, restituyendo cada vez el volumen con solución fisiológica. A las muestras se les adicionaron 0.8 mL de una mezcla ACN: MeOH (1:1), se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 11000 rpm durante 10 min, se filtró el sobrenadante (Con Filtro Millipore 0.45 μm) y fueron analizadas por CLAR.

Para el estudio de determinación de la cinética de permeabilidad de simvastatina en presencia de la mezcla de glicósidos de las semillas de *Thevetia thevetioides*, se intercambió el volumen de llenado del intestino de 1.8 mL por 1.6 mL de solución fisiológica y se adicionaron 0.2 mL de la fracción de los glicósidos y posteriormente 0.2 mL de simvastatina a la misma concentración del experimento anterior (10 mg/mL). Se realizó la comparación de permeabilidad de simvastatina con seis concentraciones

distintas de la mezcla de glicósidos, estas fueron: 2.5, 5, 10, 15, 20, 30 mg de glicósidos en 1 mL de Solución fisiológica. Se tomaron muestras de 0.2 mL a los 0, 3, 6, 9, 12, 20, 30, 40, 60, 80 y 100 min, restituyendo cada vez el volumen con solución fisiológica. A las muestras se les adicionaron 0.8 mL de una mezcla ACN: MeOH (1:1), se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 11000 rpm durante 10 min, se filtró el sobrenadante (Con Filtro Millipore 0.45 μ m) y fueron analizadas por CLAR, teniendo las concentraciones de glicósidos en el tiempo cero de: 50, 100, 200, 300, 400 y 600 μ g/ mL; cada experimento se realizó por sextuplicado.

8.5. Método analítico en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución para la cuantificación de Simvastatina.

Para el análisis y cuantificación de simvastatina en las muestras biológicas se utilizó un método analítico por CLAR con las siguientes características descritas en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Condiciones del Método analítico para la cuantificación de simvastatina por CLAR.

Tipo de Columna	Luna C18 (2), con tamaño de partícula de 5µm, de 4.6 mm de diámetro interno y 150 mm de longitud, marca Phenomenex.
Tipo de Precolumna	LC-18 marca Supelco, tamaño de partícula de 5 µm y 2 cm de longitud.
Temperatura de la columna	40°C
Longitud de onda	239 nm
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Volumen de inyección	10 µL
Tiempo de análisis	10 min
Fase móvil	Acetonitrilo 100 %

La validación del método analítico se realizó siguiendo los lineamientos establecidos en la guía de validación de métodos bioanalíticos. Los parámetros fundamentales mínimos para la validación de estos métodos incluyen: exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y la estabilidad.

8.5.1. Matriz biológica (placebo)

Se realizó la disección de un segmento de intestino y se mantuvo en solución Krebs y refrigeración por tres días para extraer todas las sustancias que se desprenden del intestino durante el experimento de permeabilidad.

8.5.2. Selectividad

Se tomaron 0.2 ml de la matriz biológica y 0.2 ml de simvastatina (1mg/ml Sol. Fisiológica). A las muestras se le adicionaron 0.8 mL de una mezcla ACN: MeOH (1:1), se agitó en vórtex y se centrifugó a 11000 rpm durante 10 minutos, se filtró el sobrenadante (Con Filtro Millipore 0.45 µm), finalmente, se inyectaron en el cromatógrafo y se analizó con el mismo método utilizado para el análisis de las muestras.

8.5.3. Exactitud

Se prepararon 5 placebos adicionados con cada una de las siguientes concentraciones: 0.689 mg/mL, 7.8 µg/mL y 61 ng/mL. Las muestras obtenidas se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos.

8.5.4. Precisión

Se prepararon 3 placebos adicionados a las concentraciones de 0.689 mg/mL, 7.8 µg/mL y 61 ng/mL los cuales se inyectaron por quintuplicado.

8.5.5. Estabilidad

Ciclos de congelado - descongelado.

Se prepararon 3 placebos adicionados a las concentraciones de 0.689 mg/mL, 7.8 µg/mL y 61 ng/mL y se refrigeraron a -4°C por 24 h y se descongelaron a temperatura ambiente, una vez descongeladas las muestras se volvieron a congelar por 24 h, éste ciclo se repitió y se analizaron las muestras por CLAR.

8.5.6. Linealidad

Se construyó una curva con matrices cargadas con las siguientes concentraciones: 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 µg / mL (cada matriz se realizó por triplicado) y fueron analizadas por CLAR. Los datos obtenidos como área bajo la curva se grafican contra la concentración conocida.

9. RESULTADOS

9.1. Rendimiento de glicósidos obtenidos

Se obtuvieron 41.2 g de mezcla de glicósidos de semillas de *T. thevetioides*, mediante cromatografía en columna abierta de fase normal, con un rendimiento del 2.7 %.

Se obtuvieron 46.83 mg de glicósidos hidrolizados con un rendimiento de 9.36 %.

9.2. Identificación de los glicósidos

De las fracciones de glicósidos hidrolizados y no hidrolizados, que tuvieron alta pureza de acuerdo a cromatografía en capa fina, se lograron identificar (mediante cromatografía de Líquidos acoplado a Espectrometría de Masas): Nerifolina, Acetil nerifolina, Acetil peruvosido, Thevetina A, Thevetina B, Thevetina C, Acetil thevetina A, Acetil thevetina B y Acetil thevetina C. Proponiendo un patrón de fragmentación para cada uno de ellos, correspondiente con los picos encontrados en los espectros de masas.

El patrón de fragmentación común para los thevetósidos presenta picos de 323 m/z, 325 m/z y 485 m/z, correspondientes a la fragmentación de sus azúcares (**Figura 8**); por otro lado en los thevetósidos acetilados, los picos característicos son de 203 m/z y 171 m/z (**Figura 9**)

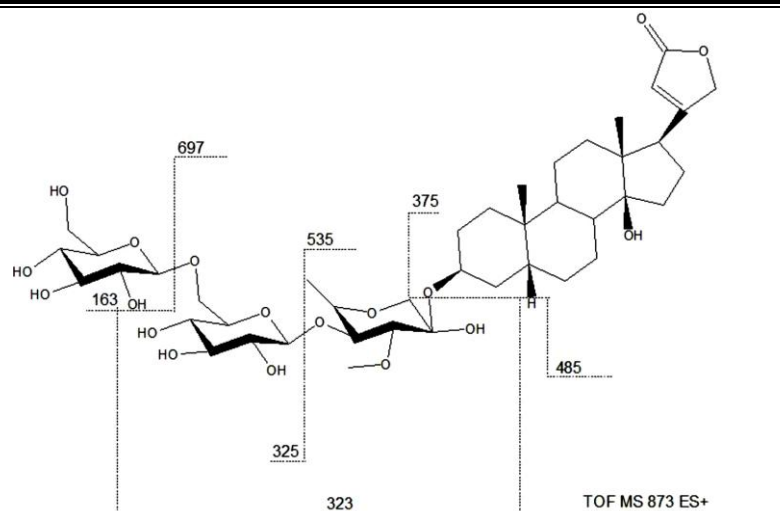


Figura 8. Fragmentación de Thevetina B. El patrón de fragmentación de azúcares de la molécula, presenta picos de: 323 m/z correspondiente al disacárido proximal, 325 m/z correspondiente a la gentobiosa y 485 m/z correspondiente a la cadena de tres azúcares (gentobiosa mas thevetosa).

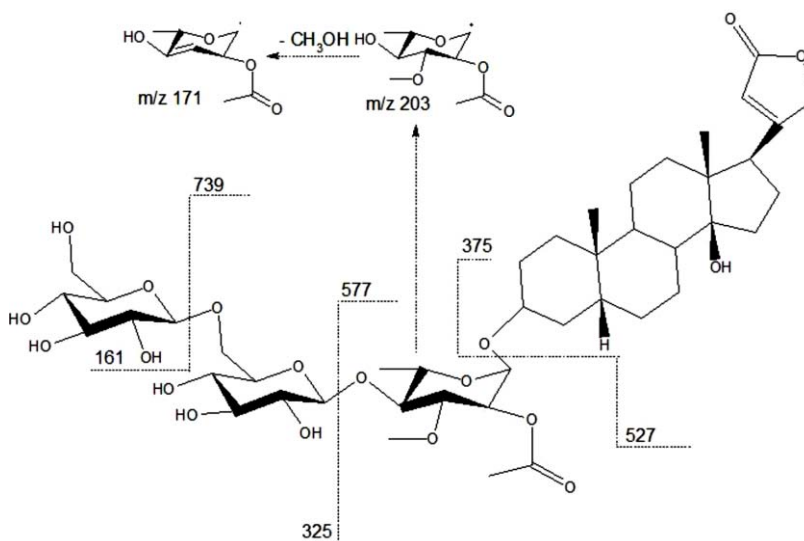


Figura 9. Fragmentación de Acetilthevetina B. En el patrón de fragmentación de azúcares de la molécula de Acetilthevetina B y de los thevetósidos acetilados, se genera la molécula de thevetosa acetilada con un pico característico que corresponde a 203 m/z y de 171 m/z su derivado metoxilado.

9.2.1. Thevetina A

De fórmula molecular $C_{42}H_{64}O_{19}$ y con una masa exacta de 872.40 uma, Se encontró en el cromatograma del Anexo 1, a $t_r = 12.7$ min, el cual presenta en su espectro de masas (Anexo 2): al ion molecular en el pico de 873 m/z en donde está formando un aducto con H^+ y otro de 892 m/z donde el aducto es con NH_4^+ ; un pico base de 353 m/z el cual corresponde a la aglicona esteroideal deshidratada en los carbonos 3 y 14, un pico de 549 m/z correspondiente a la aglicona monoglicosilada, en 389 m/z representa a la aglicona sin cadena de azúcares y finalmente los picos de 485 m/z y 325 m/z corresponden a la fragmentación de azúcares (**Figura 10**).

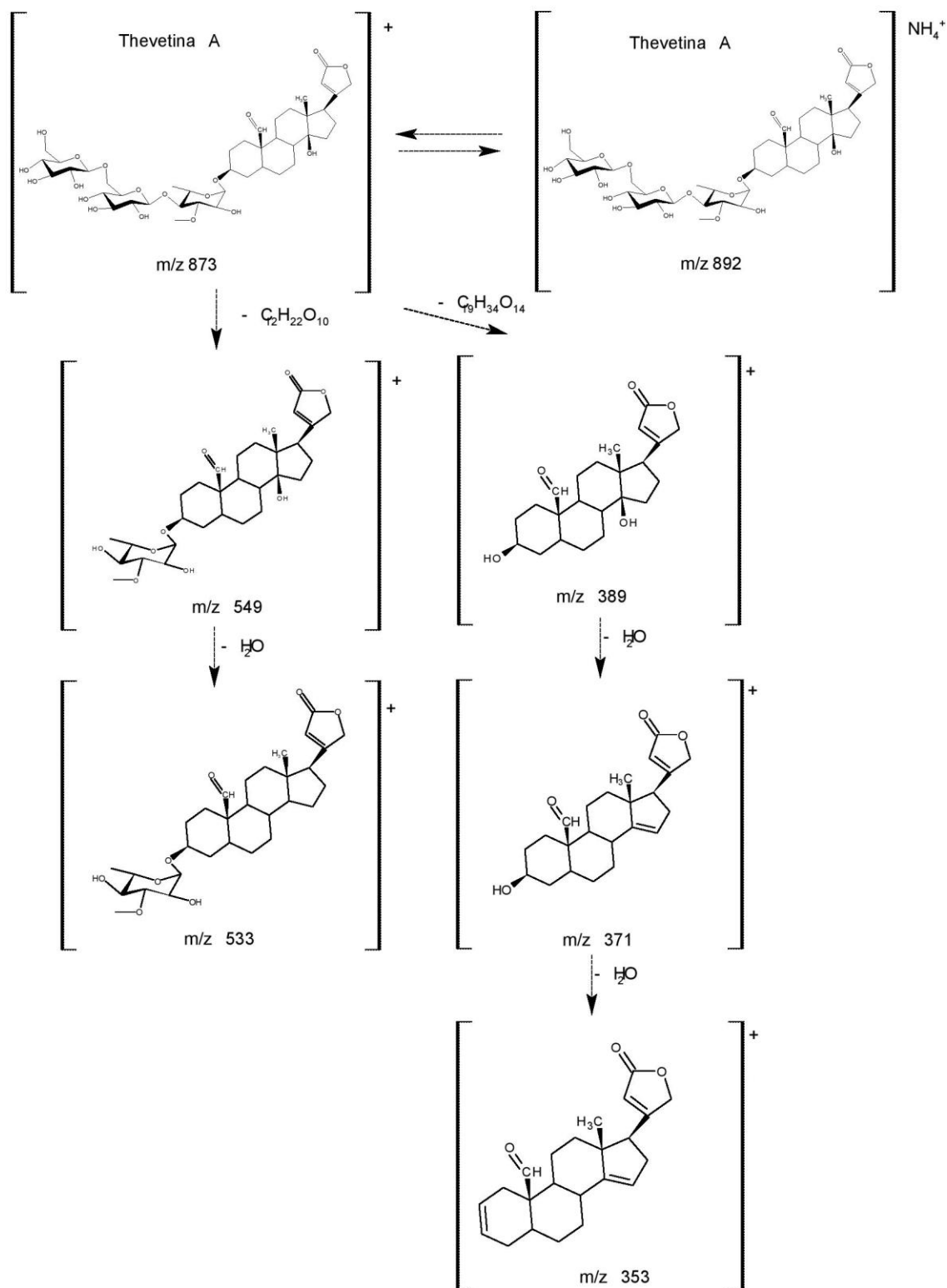


Figura 10. Patrón de fragmentación de Thevetina A

9.2.2. Thevetina B

De fórmula molecular $C_{42}H_{66}O_{18}$ y con una masa exacta de 858.42 uma, se encontró en el cromatograma del Anexo 1 a un $t_r = 13.0$ min, el cual presenta en su espectro de masas (Anexo 3) un pico base de 339 m/z correspondiente a la glicona esteroidal deshidratada en los carbonos 3 y 14, el ion molecular representado por el pico de 859 m/z, los fragmentos de azúcares en 485 m/z y 325 m/z, la aglicona esteroidal en 375 m/z y su forma glicosilada en 535 m/z, los picos de 111 m/z y 85 m/z corresponden a la fragmentación del anillo lactónico (**Figura 11**).

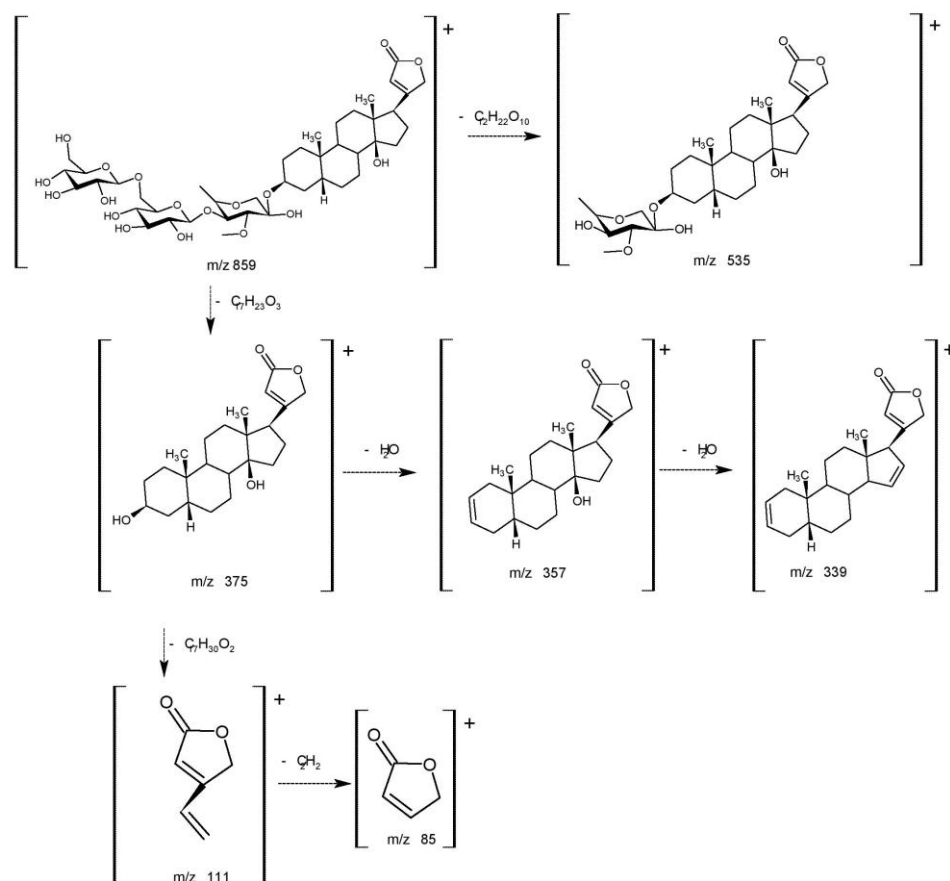


Figura 11. Patrón de fragmentación de Thevetina B

9.2.3. Thevetina C

De fórmula molecular $C_{42}H_{66}O_{19}$ con una masa exacta de 874.42 uma, se encontró en el cromatograma del Anexo 1, a un $t_r = 13.05$ min, el cual presenta en su espectro de masas (Anexo 4) un pico base de 353 m/z correspondiente a la glicona esteroidal deshidratada en los carbonos 3 y 14, el ion molecular representado por el pico de 873 m/z el cual forma un aducto con H^+ y por el pico de 892 m/z formando aducto con NH_4^+ , los fragmentos de azúcares en 485 m/z y 325 m/z, la aglicona esteroidal en 391 m/z y su forma glicosilada en 549 m/z, los picos de 85 m/z y 111 m/z corresponden a la fragmentación del anillo lactónico (Figura 12).

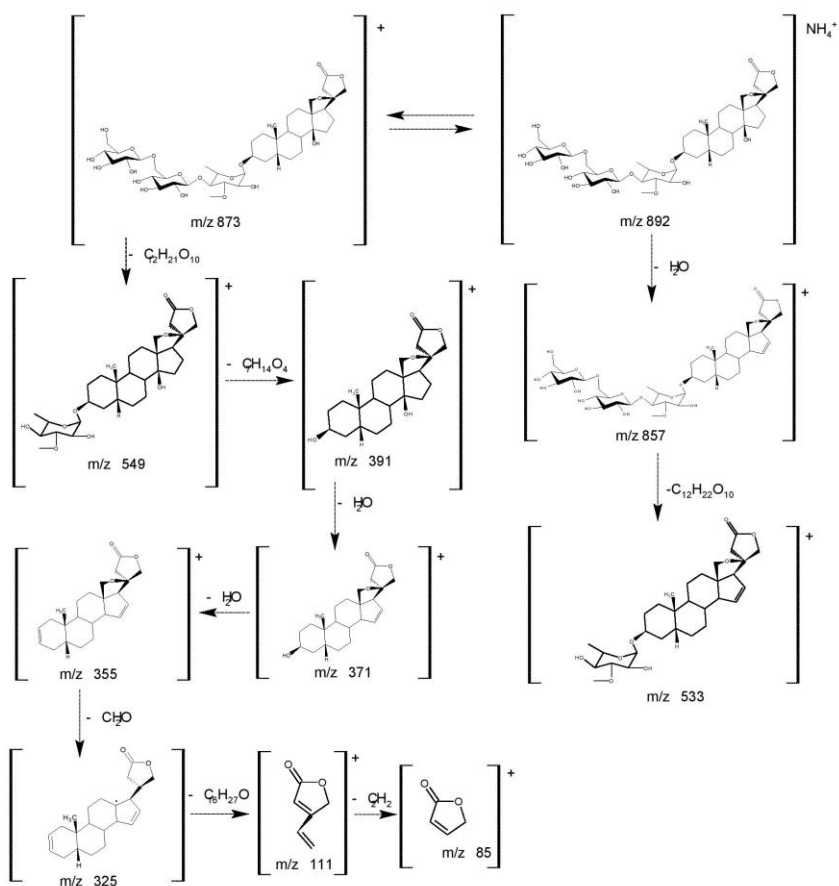


Figura 12. Patrón de fragmentación de Thevetina C

9.2.4. Acetil thevetina A

De fórmula molecular $C_{44}H_{66}O_{20}$ y con una masa exacta de 914.41 uma, se encontró en el cromatograma del Anexo 5, a un tr de 6.4 min, el cual presenta en su espectro de masas (Anexo 6) un pico base de 203 m/z correspondiente a acetil thevetosa, el ion molecular representado por el pico de 937 m/z el cual forma un aducto con Na^+ , la glicona esteroidea de 389 m/z, con la pérdida de una molécula de agua de 371 m/z y con la pérdida de dos moléculas de agua de 353 m/z, los picos de 85 m/z y 111 m/z corresponden a la fragmentación del anillo lactónico (Figura 13).

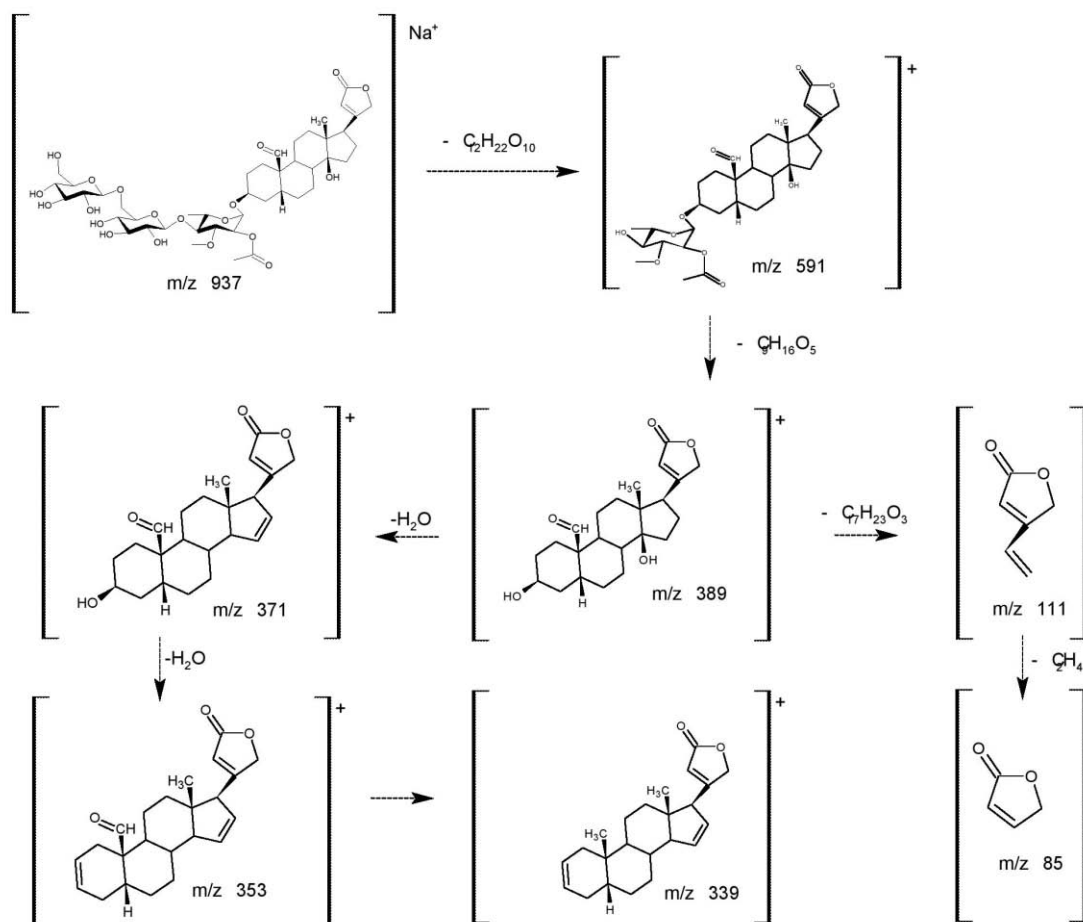


Figura 13. Patrón de fragmentación de Acetil thevetina A

9.2.5. Acetil thevetina B

De fórmula molecular $C_{44}H_{68}O_{19}$ y con una masa exacta de 900.44 uma, se encontró en el cromatograma del Anexo 5, a un tiempo de retención de 7.338 min, el cual presenta en su espectro de masas (Anexo 7) un pico base de 203 m/z correspondiente a acetil thevetosa, el ion molecular representado por el pico de 918 m/z que forma aducto con NH_4^+ y por el pico de 923 m/z el cual forma un aducto con Na^+ , la aglicona esteroidal de 339 m/z con la pérdida de dos moléculas de agua, los picos de 85 m/z y 111 m/z corresponden a la fragmentación del anillo lactónico (Figura 14).

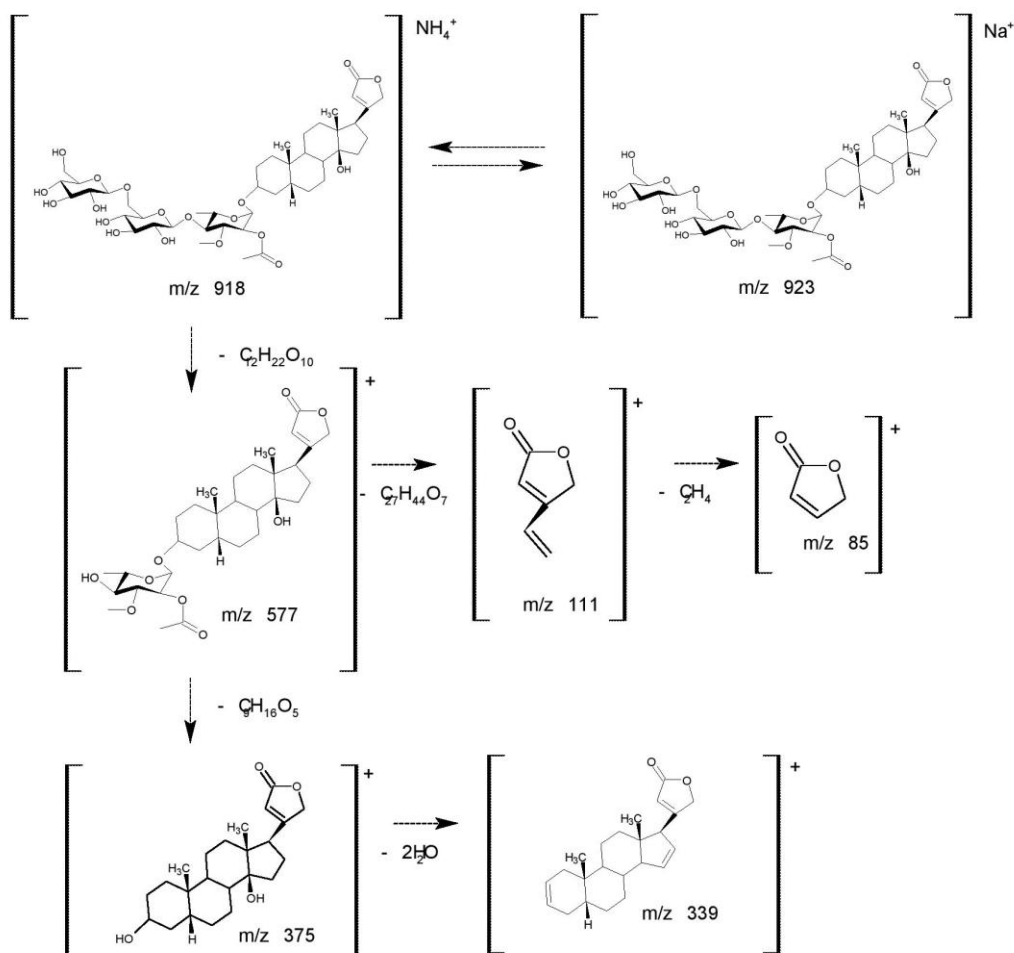


Figura 14. Patrón de fragmentación de Acetil thevetina B

9.2.6. Acetil thevetina C

De fórmula molecular $C_{44}H_{68}O_{20}$ y con una masa exacta de 916.43 uma, se encontró en el cromatograma del Anexo 5, a un tiempo de retención de 6.695 min, el cual presenta en su espectro de masas (Anexo 8) el ion molecular representado por el pico de 934 m/z que forma aducto con NH_4^+ y por el pico de 939 m/z el cual forma un aducto con Na^+ (éste último aducto es también el pico base), la aglicona esteroidal monoglicosilada de 593 m/z y con la pérdida de una molécula de agua resulta el pico de 575 m/z (**Figura 15**).

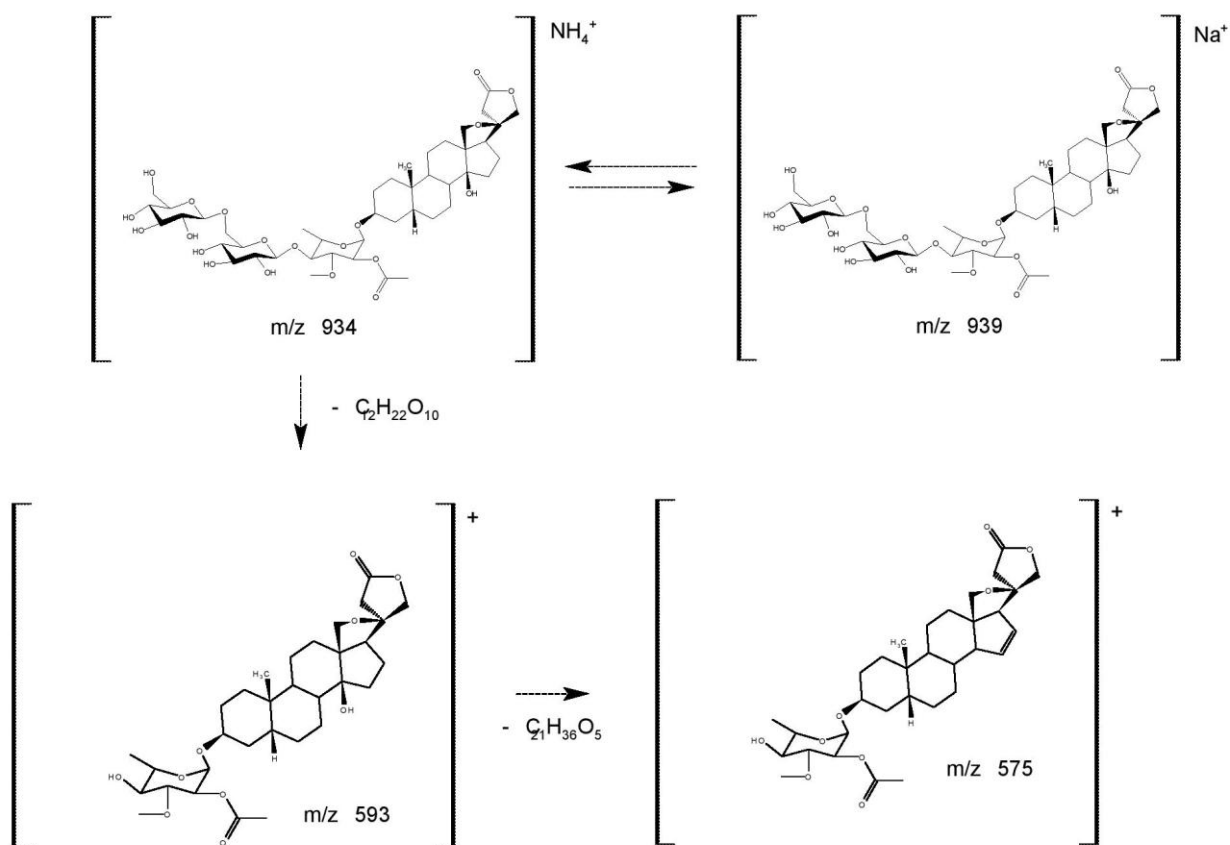


Figura 15. Patrón de fragmentación de Acetil thevetina C

9.2.7. Nerifolina

De fórmula molecular $C_{30}H_{46}O_8$ y con una masa exacta de 534.68 uma, se encontró en el cromatograma del Anexo 9, a un $t_r = 8.828$ min, el cual presenta en su espectro de masas (Anexo 10) el ion molecular representado por el pico de 535 m/z que forma aducto con H^+ y por el pico de 1070 m/z el cual es un aducto de sí mismo y representa el pico base, la aglicona esteroidal de 375 m/z, de 357 m/z con la pérdida de una molécula de agua y de 339 m/z con la pérdida de dos moléculas de agua (**Figura 16**).

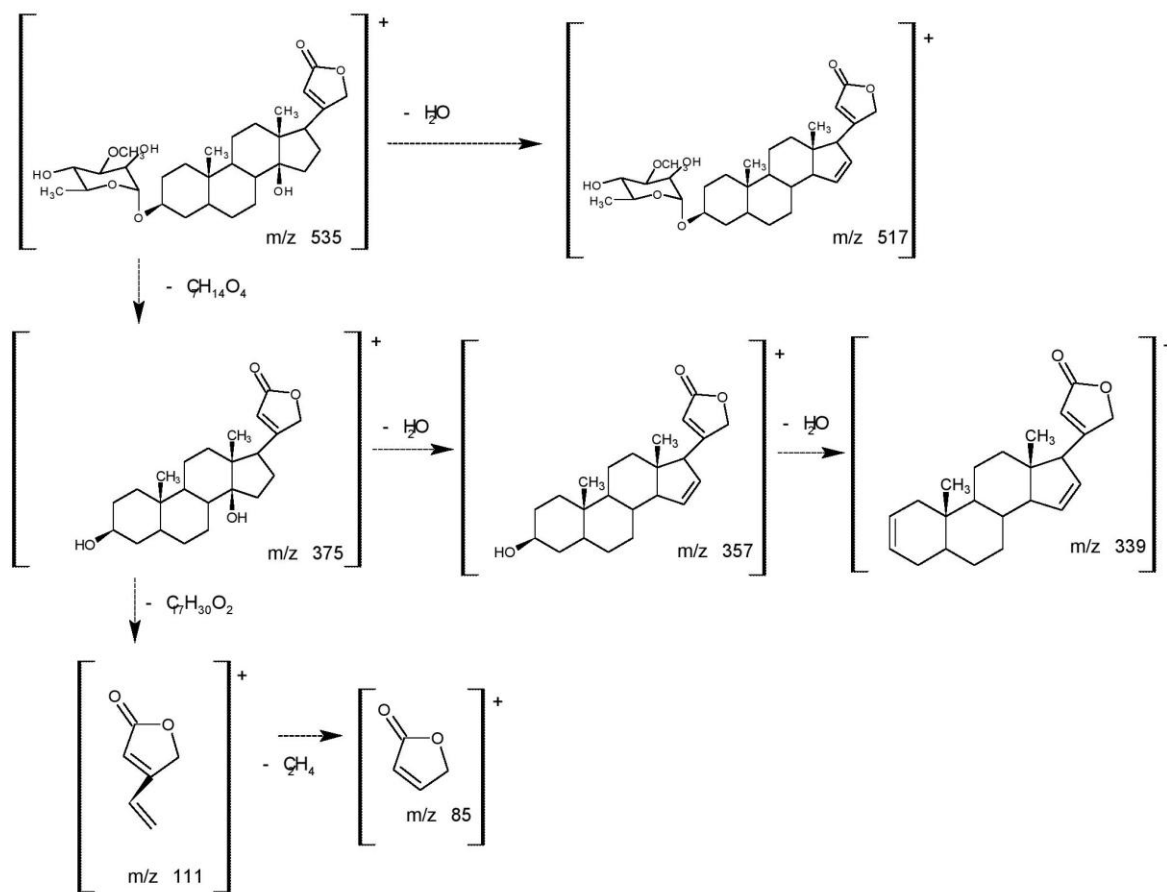


Figura 16. Patrón de fragmentación de Nerifolina

9.2.8. Acetil nerifolina

De fórmula molecular $C_{32}H_{48}O_9$ y con una masa exacta de 576.62 uma, se encontró en el cromatograma del Anexo 11, a un $t_r = 8.828$ min, el cual presenta en su espectro de masas (Anexo 12) un pico base de 85 m/z correspondiente al anillo luego de la ruptura de la aglicona, el ion molecular representado por el pico de 577 m/z que forma aducto con H^+ y por el pico de 1154 m/z que corresponde a un dímero de sí mismo, la aglicona esteroidal de 339 m/z con la pérdida de dos moléculas de agua y el pico de 111 m/z corresponde a la fragmentación del anillo lactónico (**Figura 17**).

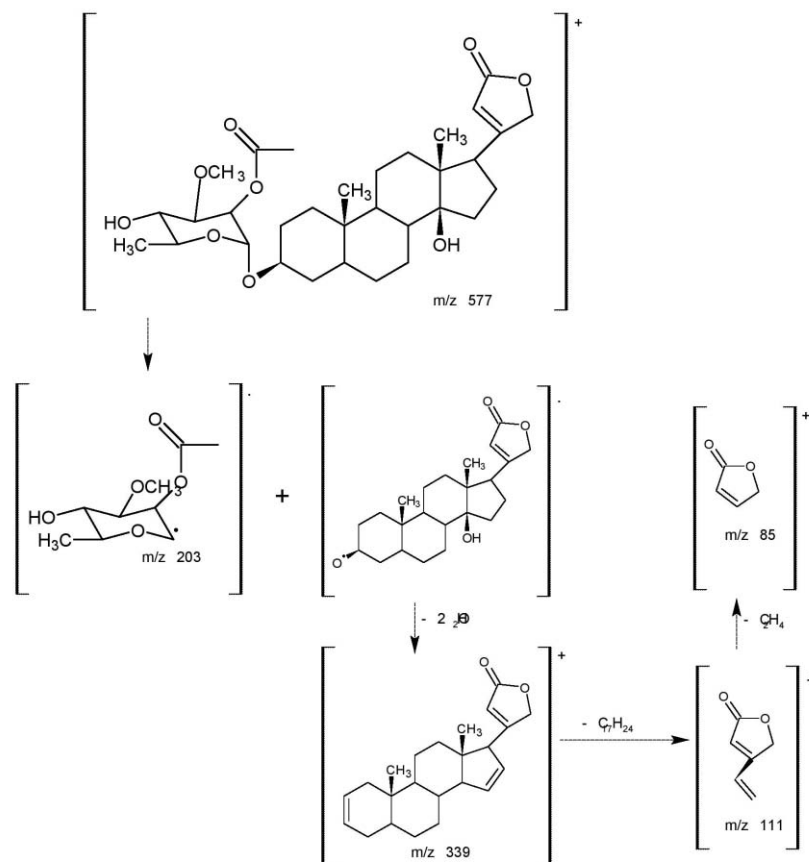


Figura 17. Patrón de fragmentación de Acetil nerifolina

9.2.9. Acetil peruvosido

De fórmula molecular $C_{32}H_{46}O_{10}$ y con una masa exacta de 590.31 uma, se encontró en el cromatograma del Anexo 13, a un $t_r = 9.29$ min, el cual presenta en su espectro de masas (Anexo 13) un pico de 85 m/z correspondiente al anillo luego de la ruptura de la aglicona, el ion molecular representado por el pico de 591 m/z que forma aducto con H^+ y por el pico de 1182 m/z que corresponde a un dímero de sí mismo siendo éste último el pico base, los fragmentos de azúcares en 171 m/z y 203 m/z, la aglicona esteroidal de 353 m/z con la pérdida de dos moléculas de agua (**Figura 18**).

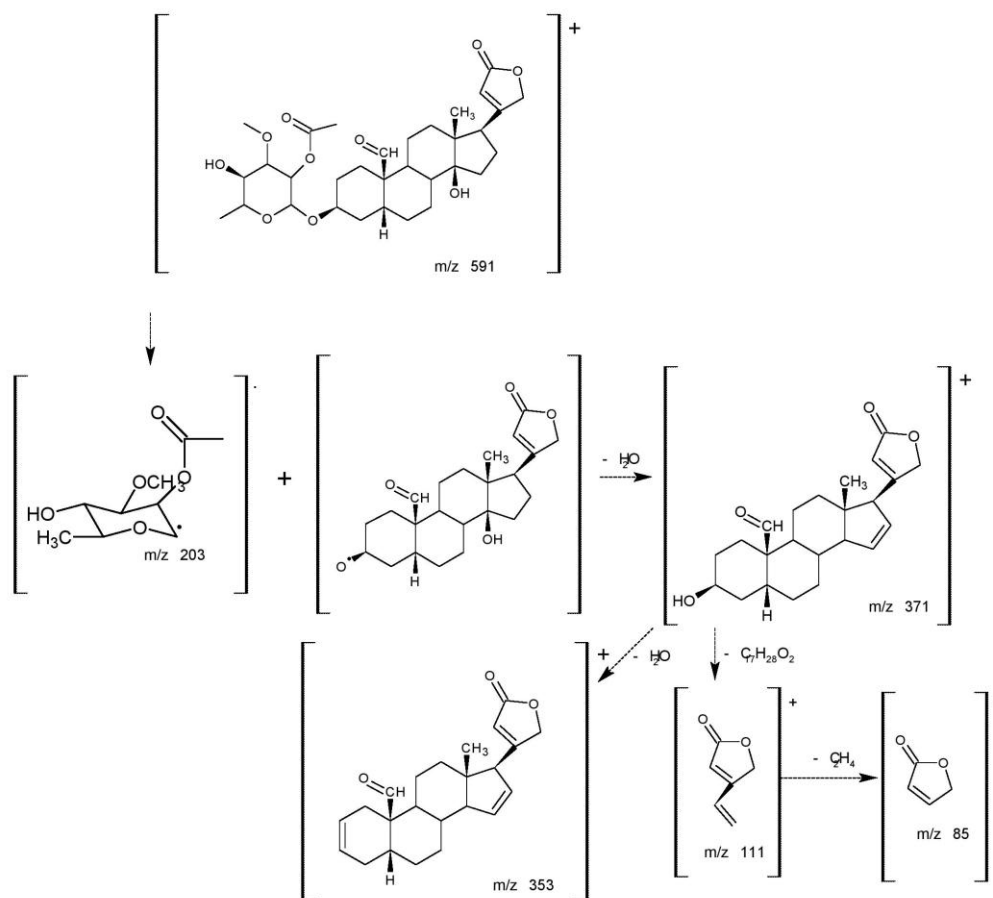


Figura 18. Patrón de fragmentación de Acetil peruvosido

9.3. Validación del método bio-analítico

El método desarrollado por CLAR se validó anteriormente para la determinación de simvastatina en el modelo *in vitro* de intestino aislado, en el Anexo 15 se presentan los resultados para exactitud, precisión y estabilidad del método.³³

9.3.1. Selectividad

En los cromatogramas (**Figura 19**) se observa la ausencia de picos en la matriz biológica (A), que interfieran en el tr del estándar de simvastatina, utilizado en las determinaciones biológicas (B). Por lo anterior el método es adecuado para la cuantificación de simvastatina.

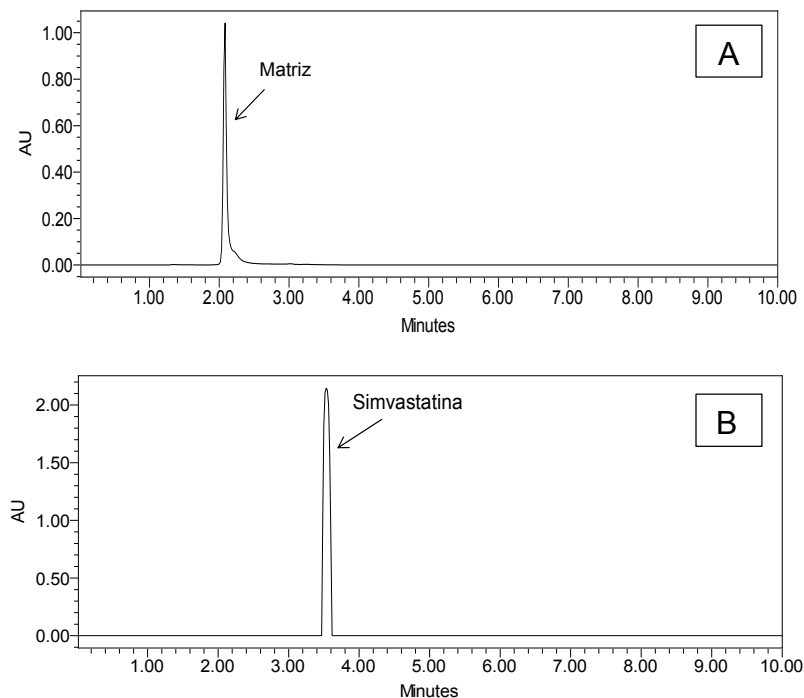


Figura 19. Cromatogramas de la matriz biológica (A) y simvastatina (0.2 mg/ml) (B); para la prueba de selectividad del método analítico con las siguientes condiciones: Velocidad de flujo: 1 ml/ min, Vol. Iny. 10 μ L, Temperatura: 40° C, Tiempo: 10 min, Longitud de onda: 239 nm, Fase móvil: Acetonitrilo, Columna Luna C18, 150 x 4.6 mm, 5 μ m.

9.3.2. Linealidad

Se realizó la prueba de linealidad del método graficando los datos obtenidos como área bajo la curva contra la concentración conocida de simvastatina, obteniendo la ordenada al origen de $b = -40207 \mu\text{v} \cdot \text{sec}$ y la constante $k = 30140 \pm 293.4$. Se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.998. Cada punto representa la media de tres determinaciones (**Figura 20**).

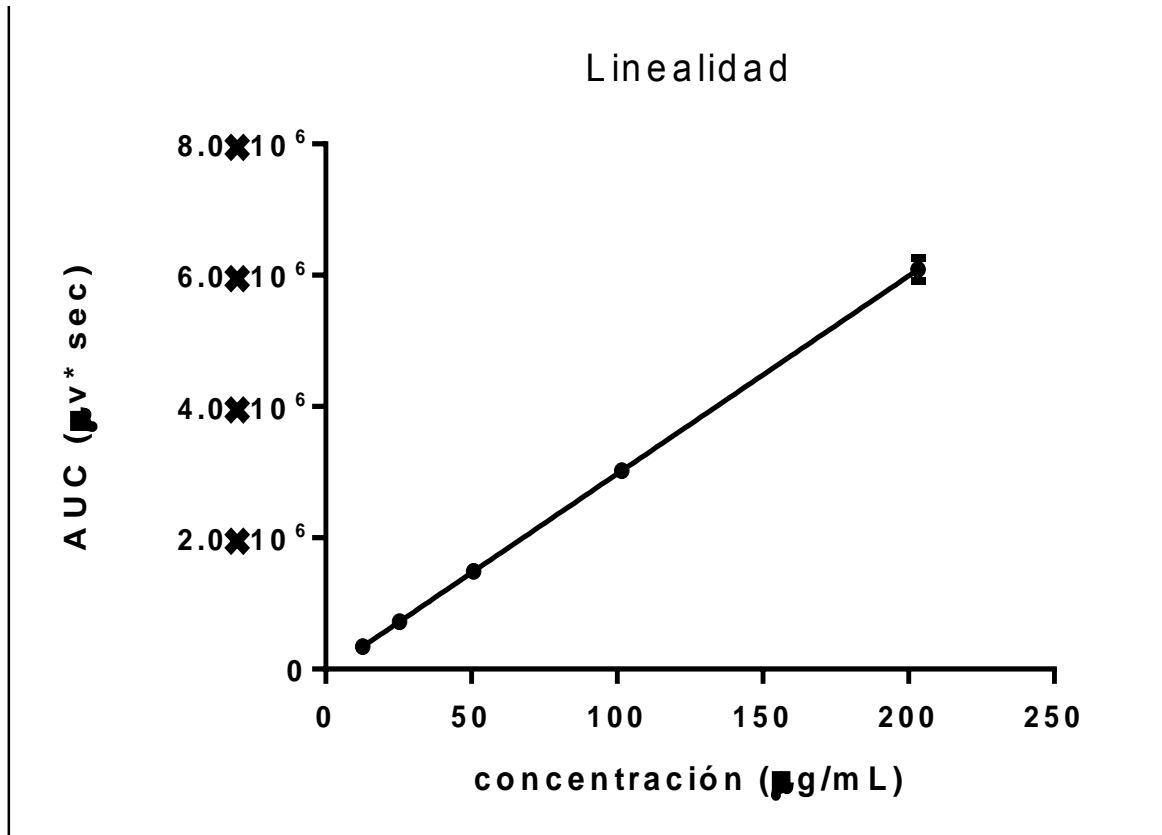


Figura 20. Gráfico de linealidad de la recta de calibración de simvastatina.

$$\text{Ecuación AUC} = 30140 \pm 293.4 * C - 40207, r^2 = 0.998.$$

Se determinó la homocedasticidad para los datos en la recta de calibración, resultando de 12.25 demostrando que la varianza de los errores es constante.³⁴

9.4. Permeabilidad de simvastatina

No se encontraron diferencias en la permeabilidad en los tres segmentos intestinales de cobayo (duodeno, yeyuno e íleon), a lo largo de 100 min, partiendo de una concentración inicial de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de simvastatina (**Figura 21**).

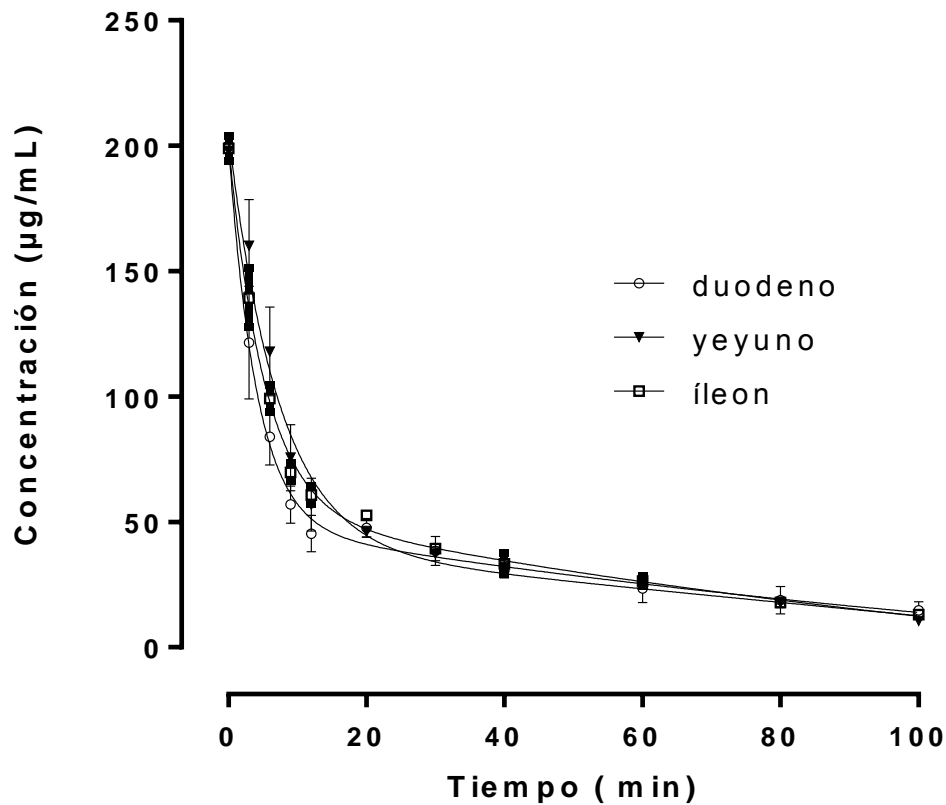


Figura 21. Gráfico de permeabilidad de las concentraciones obtenidas de simvastatina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en cada segmento de intestino, a lo largo de 100 minutos. Cada punto es el promedio \pm Error Estándar de la Media (EEM) de seis experimentos.

Se encontró que el modelo matemático que describe el paso de la simvastatina en intestino de cobayo desde la luz intestinal hacía el intersticio, en un modelo *in vitro* de asa intestinal, se ajusta a un modelo biexponencial (**Figura 22**), descrito por la ecuación:

$$C = A_0 e^{-\alpha t} + B_0 e^{-\beta t}$$

Donde, C es la concentración de simvastatina a un tiempo específico (t), B₀ es el antilogaritmo de la ordenada al origen de la fase lenta (fase beta) de la gráfica y β es la pendiente de la caída de ésta fase. A₀ es el antilogaritmo de la ordenada al origen de los residuales de la fase rápida (fase alfa) de la gráfica y α la pendiente negativa de ésta fase.

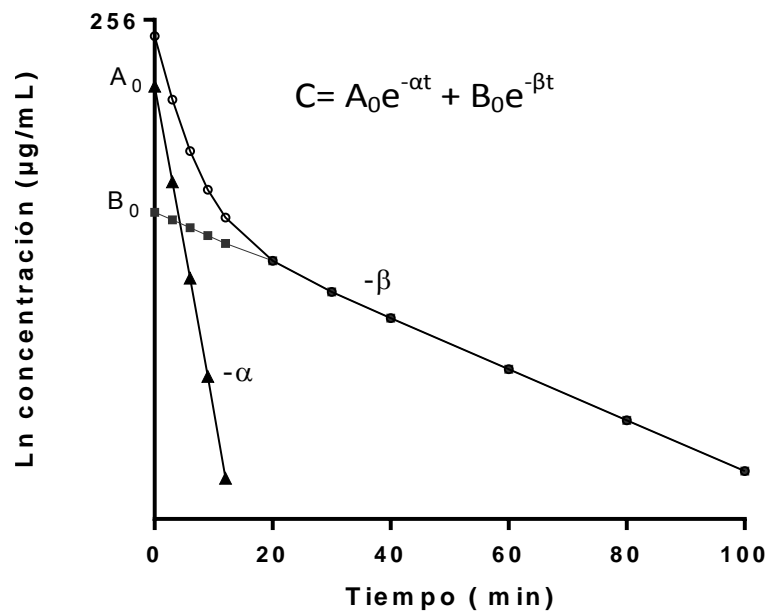


Figura 22. Representación del ajuste al modelo biexponencial, que describe el paso de la simvastatina en intestino de cobayo a lo largo del tiempo.

Con base a un ANOVA de una vía de las constantes (rápida y lenta) de cada segmento intestinal, obtenidas a partir de la ecuación anterior, se demuestra que no hay diferencia significativa, resultando un valor de $P= 0.993$ y $P= 0.166$, para las constantes α y β , respectivamente (Tabla 4).

Tabla4. Constantes de velocidad de permeación de simvastatina

Segmento intestinal	α (min^{-1})	\pm EEM	β (min^{-1})	\pm EEM
Duodeno	0.2466	0.05553	0.006305	0.03157
Yeyuno	0.1384	0.03734	0.0006412	0.06082
Íleon	0.1910	0.02697	0.006379	0.01690

Se determinó el valor del área bajo la curva (ABC), calculada por el método de los trapecios de cada experimento, para observar la similitud de la cantidad remanente de simvastatina en el saco intestinal (**Figura 23**), sin observarse diferencia significativa ($P= 0.3957$), lo que indica que hay similitud entre el comportamiento de la permeabilidad de simvastatina en los segmentos: duodeno, yeyuno e íleon.

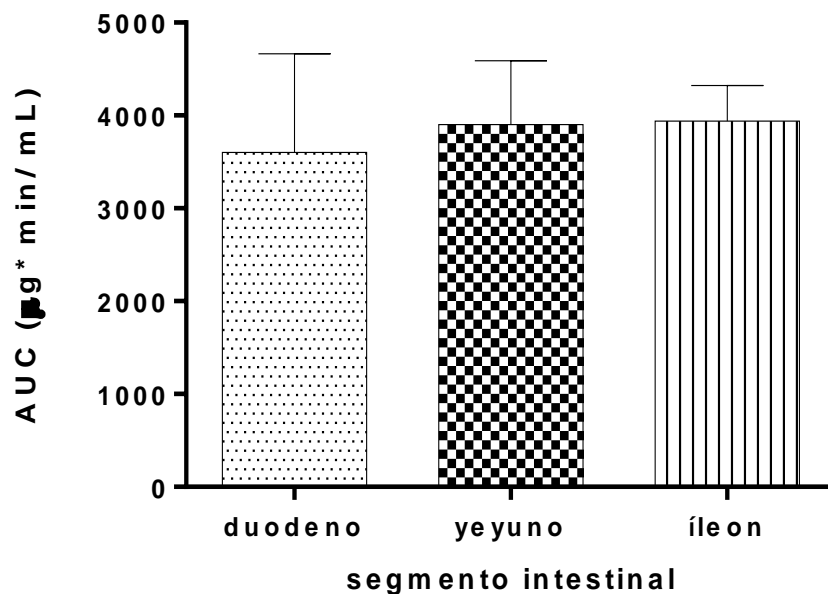


Figura 23. Gráfico del Área Bajo la Curva (ABC) de simvastatina en cada segmento intestinal.

9.4.1. Permeabilidad de simvastatina en presencia de los glicósidos

Para determinar si la mezcla de glicósidos interviene en la función de la glicoproteína P, se realizó el estudio de permeabilidad intestinal de simvastatina en presencia de distintas concentraciones (50, 100, 200, 300, 400 y 600 µg/ mL) de la fracción de glicósidos. La concentración inicial de simvastatina fue de 200 µg/ mL en todos los experimentos (Figura 24).

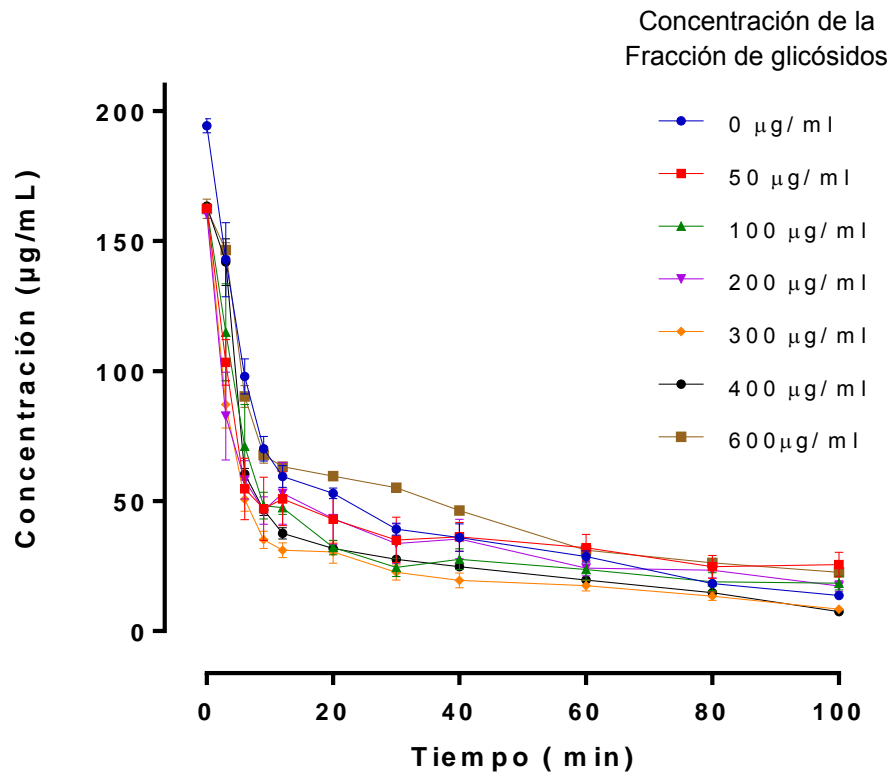


Figura 24. Gráfico de Permeabilidad de simvastatina a una concentración inicial de 200 µg/mL. Cada curva representa la concentración de simvastatina a lo largo del tiempo, administrada conjuntamente con una concentración respectiva de solución de glicósidos (0, 50, 100, 200, 300, 400 y 600 µg/mL), cada punto representa el promedio \pm EEM de 6 experimentos.

Con base a un ANOVA de una vía; se compararon las constantes (rápida y lenta) de cada curva de permeabilidad de simvastatina con su respectiva concentración de glicósidos (50, 100, 200, 300, 400 y 600 µg/mL), contra las constantes (rápida y lenta) de simvastatina sin glicósidos (0 µg/mL, control), obtenidas a partir de la ecuación (1), se

encontró que no hay diferencia significativa en ninguna de las constantes respecto al control.

Se determinó el valor del área bajo la curva (ABC), calculada por el método de los trapecios de cada experimento, para observar la similitud de la cantidad remanente de simvastatina en el saco intestinal que fue administrada conjuntamente con las distintas concentraciones de los glicósidos (**Figura 25**).

Sólo se observó diferencia significativa en el ABC remanente de simvastatina que fue administrada conjuntamente con los glicósidos a una concentración de 300 µg/mL.

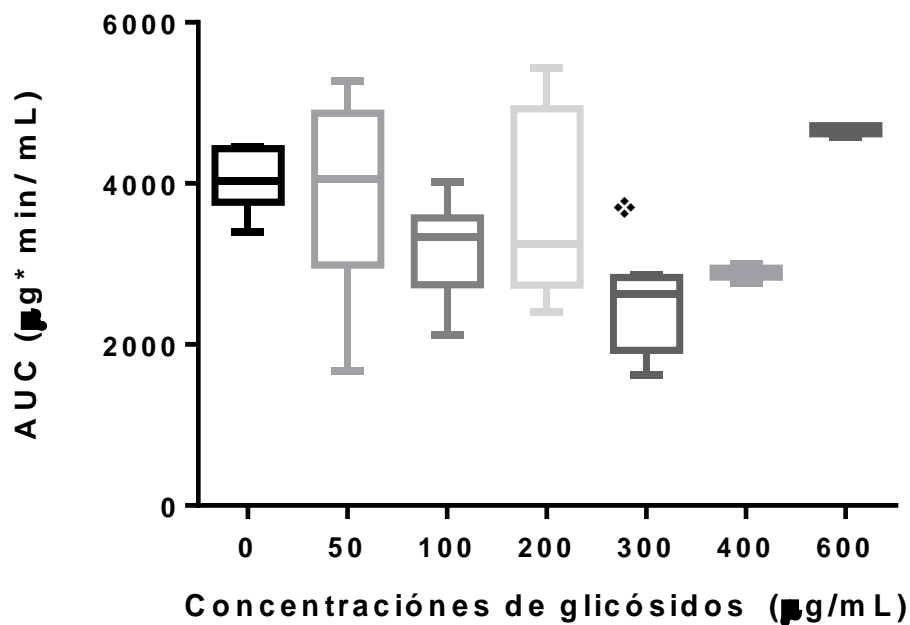


Figura 25. Gráfico de cajas y bigotes de las Áreas Bajo la Curva (ABC) de remanente de simvastatina en el saco intestinal, en presencia de las respectivas concentraciones de la fracción de glicósidos.

10. DISCUSIÓN

Se logró determinar el comportamiento de la permeabilidad de simvastatina en los tres segmentos intestinales de cobayo (duodeno, yeyuno e íleon), a lo largo de 100 min, con lo cual se demostró que el compuesto atraviesa la membrana intestinal.³⁵ Debido a que la simvastatina es lipofílica y puede penetrar fácilmente la membrana intestinal de una forma no específica.³⁶

La permeabilidad *in vitro*, en las pruebas realizadas, se describe por la desaparición del compuesto del saco intestinal donde fue administrado. Se encontró que el modelo matemático que lo describe, se ajusta a un modelo biexponencial, por que tiene el mayor valor de coeficiente de correlación comparado con otros modelos.

La razón por la cual se ajusta a un modelo biexponencial, es porque tiene dos velocidades de permeabilidad, en los primeros 20 min la velocidad de desaparición del compuesto en el saco intestinal es mayor que los posteriores 80 min, es por ello que se obtienen dos constantes de cada curva, las cuales se denominan constante rápida (α) y constante lenta (β), respectivamente.

Se logró demostrar que la velocidad de desaparición de simvastatina entre los segmentos intestinales se lleva a cabo de forma indistinta. Al igual se observó que el valor del área bajo la curva (ABC), la cual es la cantidad remanente de simvastatina en el saco intestinal a lo largo del tiempo es muy similar entre éstos ($P= 0.3957$).

En la administración concomitante con glicósidos no se modifica la cinética de permeabilidad de la simvastatina, resultando ser la misma con o sin presencia de glicósidos, sugiriendo que los glicósidos no tienen alguna acción sobre la gp- P.

Teniendo en cuenta que, si los glicósidos fueran sustrato de la glicoproteína P, la constante de velocidad de desaparición del compuesto aumentaría, sugiriendo que, ésta proteína deje de tener acción sobre la simvastatina, evitando que sea expuesta hacia el lumen intestinal nuevamente, de tal manera que atravesaría la membrana intestinal sin ningún problema y es por ello que su constante de velocidad de desaparición del lumen intestinal sería mayor.

Éstos resultados coinciden con los de un estudio que se llevó a cabo a la par, en donde se evaluó el paso de los glicósidos (tevetina A, tevetina B y tevetina C) a través de células Caco- 2, en las cuales está sobre expresada la Glicoproteína P. Las pruebas de permeabilidad fueron realizadas en ambas direcciones: apical/ basolateral y basolateral / apical, con 4 concentraciones de thevetósidos (100 – 750 µg/mL) usando como control a propanolol. En donde no pudo ser detectada la presencia de los compuestos en la dirección basolateral/ apical, la cual hubiera sugerido un pasaje a través de la Glicoproteína P.³⁷ Estos resultados indican que los thevetósidos tienen una permeabilidad limitada y que ésta no es una vía de eliminación importante para éstos compuestos como lo es para la digoxina.³⁸

11. CONCLUSIONES

La permeabilidad de simvastatina no se vio afectada en ninguna de las interacciones de seis diferentes concentraciones provenientes de una fracción de glicósidos obtenidas a partir de semillas de *Thevetia thevetioides* (compuesta por: Nerifolina, Acetil nerifolina, Acetil peruvosido, Thevetina A, Thevetina B, Thevetina C, Acetil thevetina A, Acetil thevetina B y Acetil thevetina C). Esto sugiere que los glicósidos cardiacos de la semilla de *T. Thevetioides* no son sustratos de la gp- P, como lo es la digoxina.

La simvastatina es permeable a través de la membrana intestinal, siguiendo una cinética biexponencial, sin ninguna diferencia entre los segmentos intestinales (duodeno, yeyuno e íleon).

12.REFERENCIAS

1. Mendoza P. y Figueroa H. Herbolaria. *Rev Fac Med UNAM*. 2009; 25: 248-249.
2. Ocegueda S., Moreno E. y Koleff P. Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas*. 2005; 62: 12 – 15.
3. Sáenz C. Medicamentos, plantas medicinales y productos naturales. *Fármacos*. 2003; 16 (1): 13 – 20.
4. Torres N. Actualización sobre intoxicación con *Thevetia* peruviana. Retel [internet]. 2003; 2 – 18.
5. McLauhlin J., Freedman B, Powell R., and Smith C. Neriifolin and 2'-Acetylneriifolin: Insecticidal and Cytotoxic Agents of *Thevetia thevetioides* Seeds. *J EconEntomol*.1980; 73 (3): 398-402.
6. Velázquez B., Lorenzo P, Moreno A. Farmacología básica y clínica. 17ª ed. Madrid España: Ed. Médica Panamericana; 2007: 17 – 29.
7. Lullmann H., Mohr K. and Hein L. Farmacología, Texto y Atlas. 6ª ed. Madrid España: Ed. Médica Panamericana; 2010.
8. Herrera D., Hernández B., Espinosa L., Martínez I., Beltrán T. y Martínez A. Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos. *Rev Mex Cienc Farm*. 2012; 43 (1): 18 – 32.

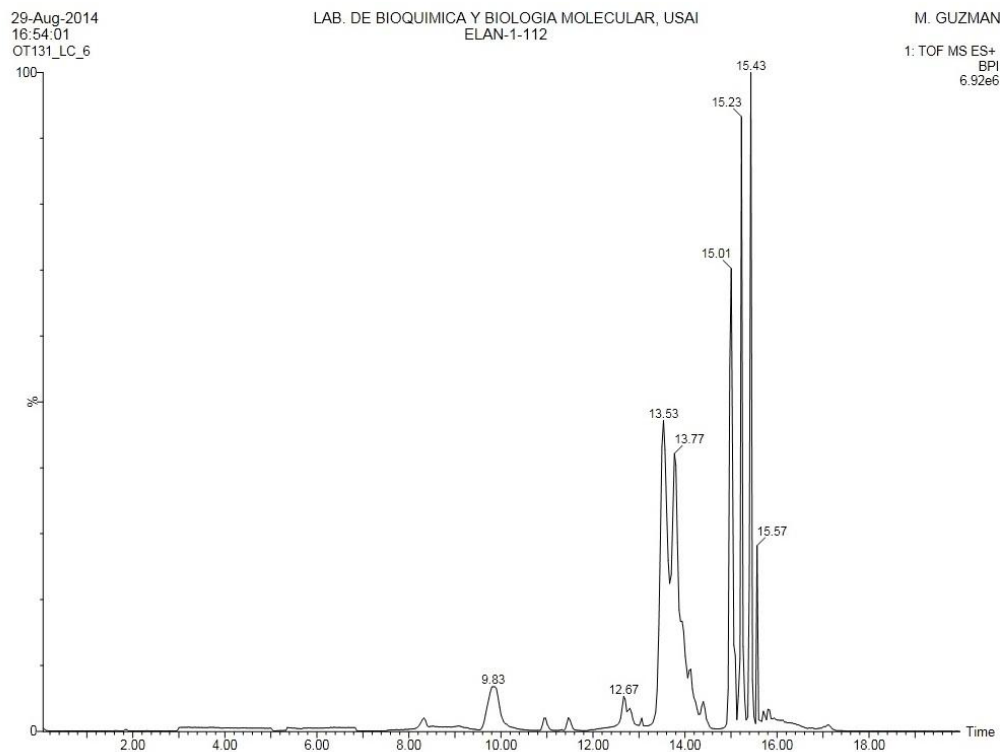
9. Sernka T., Jacobson E. Fundamentos de fisiología gastrointestinal. Ed. Reverté: España; 1992.
10. Praveen V., Saeho C., Cell culture - based models for intestinal permeability: a critique. *Drug Discov Today*. 2005; 10 (5): 335- 343.
11. Sugano K., Kansy M., Artursson P., Avdeef A., Bendels L., Ecker G., et. al. Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9: 597- 661.
12. Zhou S. F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica*. 2008; 38: 802- 832.
13. Hodges M.L. et al. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, Pglycoprotein). *PharmacogenetGenomics*. 2011; 21(3): 152- 161.
14. Hochman J., Pudvah N., Qiu J., Yamazaki M., Tang C., Lin J. and Prueksaritanont T. Interactions of Human P- glycoprotein with Samvastatin, Simvastatin Acid and Atorvastatin. *Pharm Res*. 2004; (21) 9: 1686- 1691.
15. Jin M. S., Oldham M. L., Zhang Q., Chen J. Crystal structure of the multidrug transporter P- glycoprotein from *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2012; 000: 1- 5.
16. Suzuki H., Sugiyama Y. Role of metabolic enzymes and efflux transporters in the absorption of drugs from the small intestine. *Eur J Hosp Pharm Sci Pract*. 2000; 12: 3- 12.

17. Marhuenda E. Statins in the treatment of dyslipemias (Estatinas en el tratamiento de dislipemias). *Ars Pharmaceutica*. 2002; (43) 2: 83- 85.
18. Wang E., Casciano C., Clement R. and Johnson w. HMG-CoA Reductase inhibitors (statins) characterized as Direct Inhibitors of P- Glycoprotein. *Pharm Res*. 2001; (18) 6: 800- 806.
19. Praveen V., Saecho C., Richard A. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2000; 44: 301- 312.
20. Argueta A., Gallardo M. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. *Instituto Nacional Indigenista*. 1994.
21. Galsky A., Wilsey J., and Powell R. Crown Gall Tumor Disc Bioassay a possible aid in the detection of compounds with antitumor activity. *Plant Physiol*. 1980; 65 (2): 184- 185.
22. Marroquin R., Calvillo R., Mora J., et al. Increased acetylcholine esterase activity produced by the administration of an aqueous extract of the seed kernel of *Thevetia peruviana* and its role on acute and subchronic intoxication in mice. *Phcog Mag*. 2014; 10 (37): 171- 175.
23. Eddleston M., Ariaratnam C., Meyer W., Perera G., Kularatne A., Attapattu S. and Warrell D. Epidemic of self-poisoning with seeds of the yellow oleander tree (*Thevetia peruviana*) in northern Sri Lanka. *Tropical Medicine and International Health*. April 1999; 4 (4): 266- 273.
24. Abe F., Chen R., Yamauchi T. Dinormonoterpenoids and their apiosylglucosides from *Thevetia peruviana*. *Phytochemistry*. September 1996; 43 (1): 161- 163.

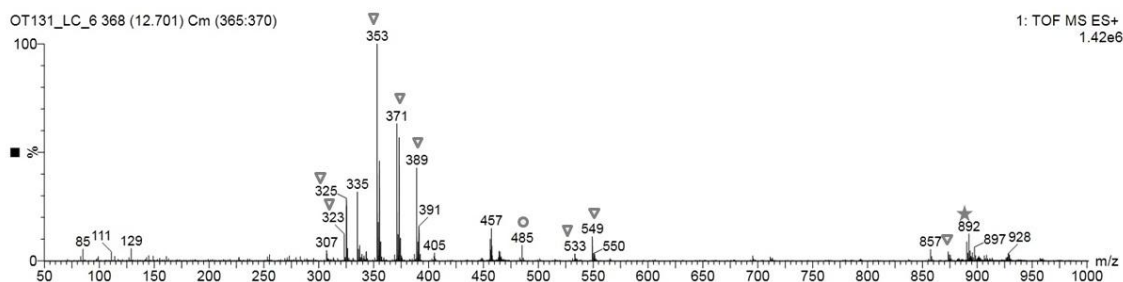
25. Abe F., Chen R. and Wan A., Cardiac Glycosides from the leaves of *Thevetia Neriifolia*. *Phytochemistry*. 1992; 31 (9): 3189- 3193.
26. Kohls S., Scholz-Böttcher B., Teske J., Zark P., Rullkötter J. Cardiac glycosides from Yellow Oleander (*Thevetia peruviana*) seeds. *J Pharmacogn Phytochem*. 2011; 75: 114- 127.
27. Kohls S., Scholz-Böttcher B., Rullkötter J., Teske J. Method validation of a survey of thevetia cardiac glycosides in serum samples. *Forensic SciInt Genet*. 2012; 215: 146- 151.
28. Chen K. and Chen A. The action of crystalline thevetin, a cardiac glucoside of *Thevetia neriifolia*. *Journal of Pharmacology*. 1934; 51(1): 23- 34.
29. Villa F., Hormaza A. y Arias M. Thevetin B: glicósido cardiotónico predominante en thevetia peruviana. *Scientia et Technica*, 2011; 3(49): 298- 303.
30. Domínguez X., Métodos de investigación fitoquímica. México: Ed Limusa; 1979: 195- 209.
31. Liu, Q., Tang, J., Hu M., Liu J., Chen H., et al. Antiproliferative Cardiac Glycosides from the Latex of *Antiaris toxicaria*. *J. Nat. Pro*. 2013; 76(9): 1771- 1780.
32. Cruz A., Guzmán A., Iriarte J., Medina R. y Muchowski J. 18,20-Oxido-20,22-dihidroneriifolin, an Unusual Oxygenated Cardanolide. *J Org Chem*. 1979; 44 (20): 3511- 3515.
33. Food and Drug Administration. Department of Health and Human Services. Bioanalytical Method Validation. United States. 2001.

34. Almeida A., Castel M., Falcao A. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography*. 2002; 774: 215- 222.
35. Corsinia Alberto et al. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Therapeut*. 1999; 84: 413- 428.
36. Shitara Yoshihisa and Sugiyama Yuichi. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: Drug–drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol Therapeut*. 2006; 112: 71- 105.
37. Barbonetti Simone. Evaluación de la permeabilidad e inhibición enzimática *in vitro* de los glicósidos cardiotónicos de la semilla de *Thevetia thevetioides* [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
38. Horn J. and Hansten P. Drug interactions with digoxin: The role of P- glycoprotein. *Pharmacy times*. 200; 70: 35- 45.

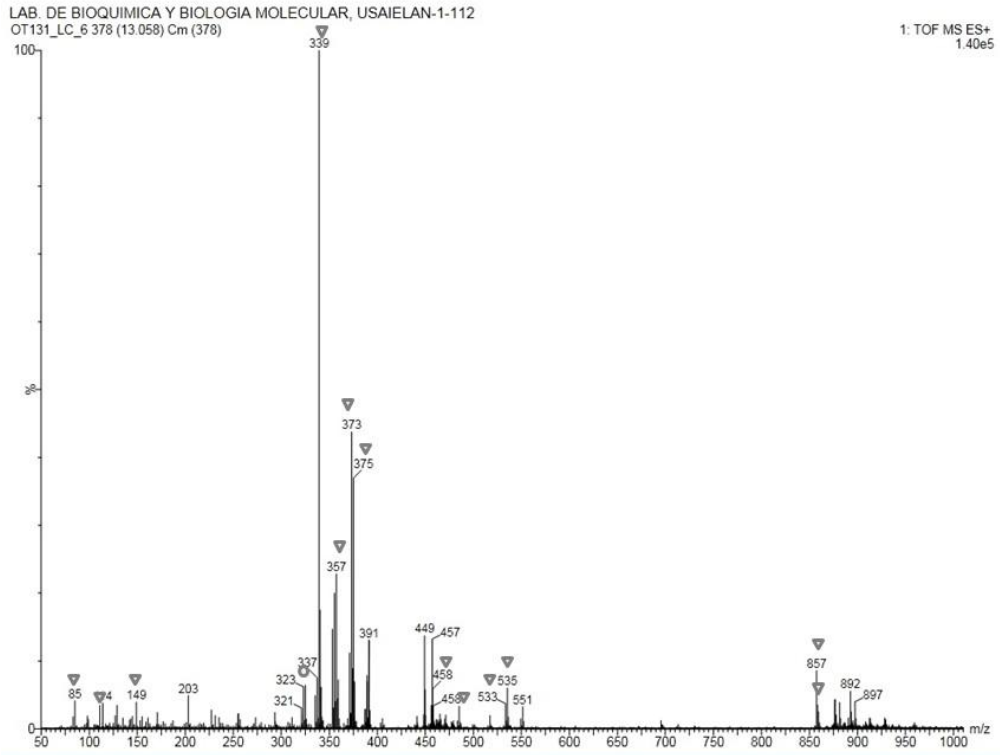
13. ANEXOS



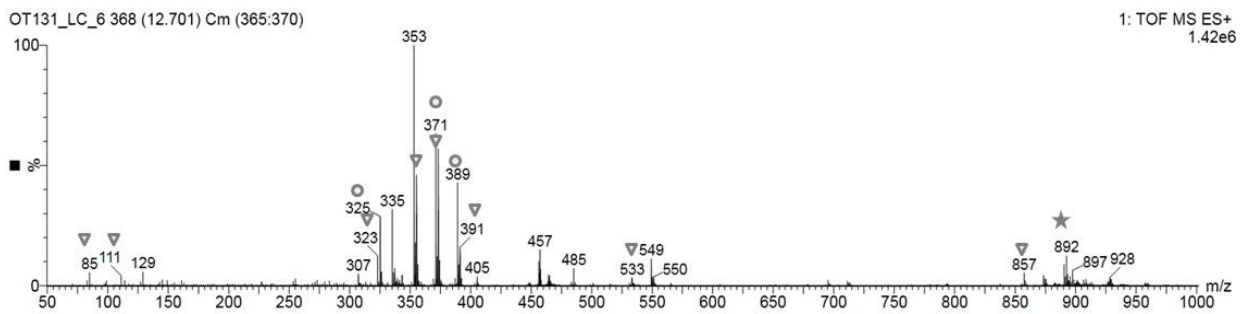
Anexo 1. Cromatograma de la fracción OT_131_LC



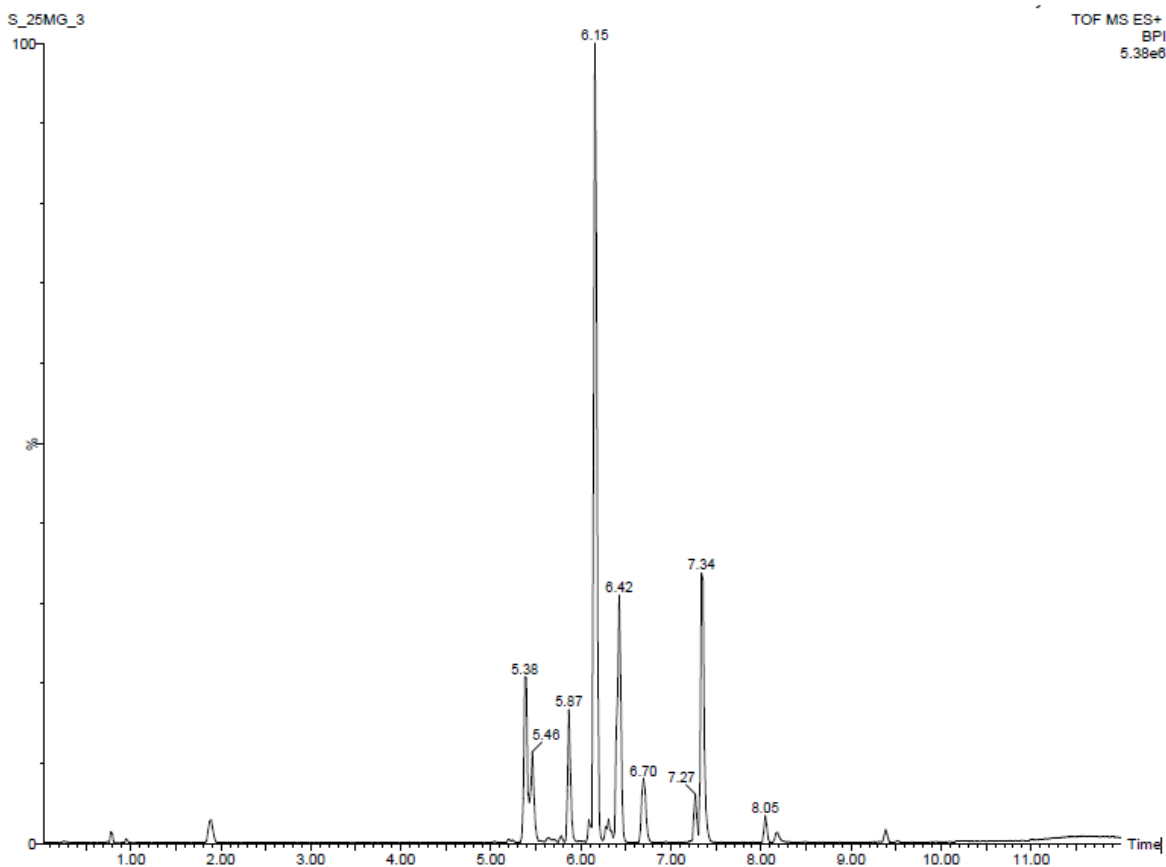
Anexo 2. Espectro de masas TOF ES⁺ de Thevetina A



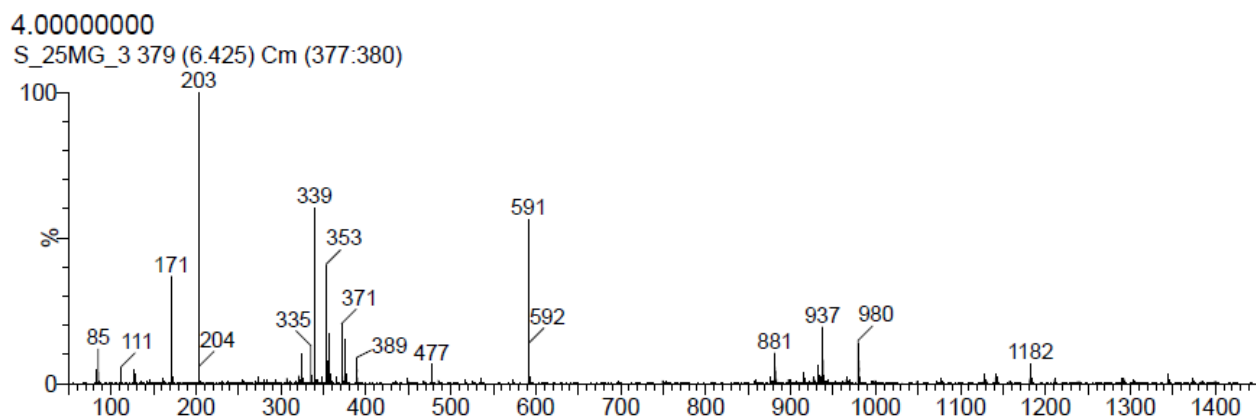
Anexo 3. Espectro de masas TOF ES⁺ de Thevetina B



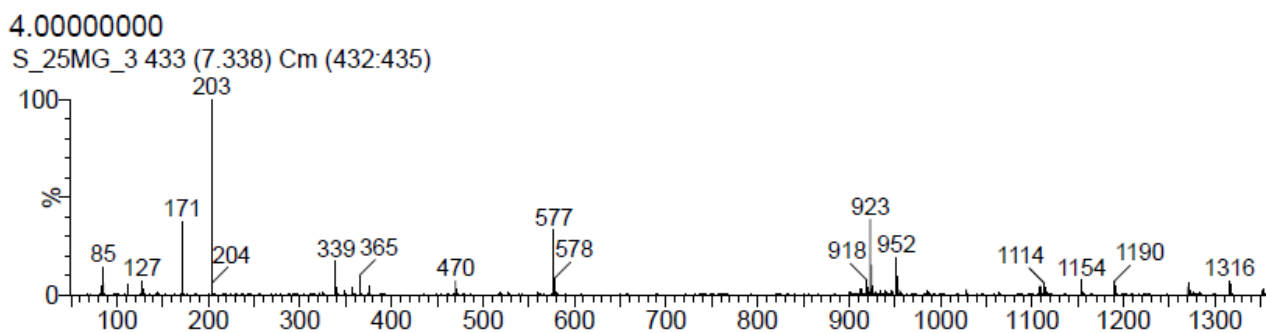
Anexo 4. Espectro de masas TOF ES⁺ de Thevetina C



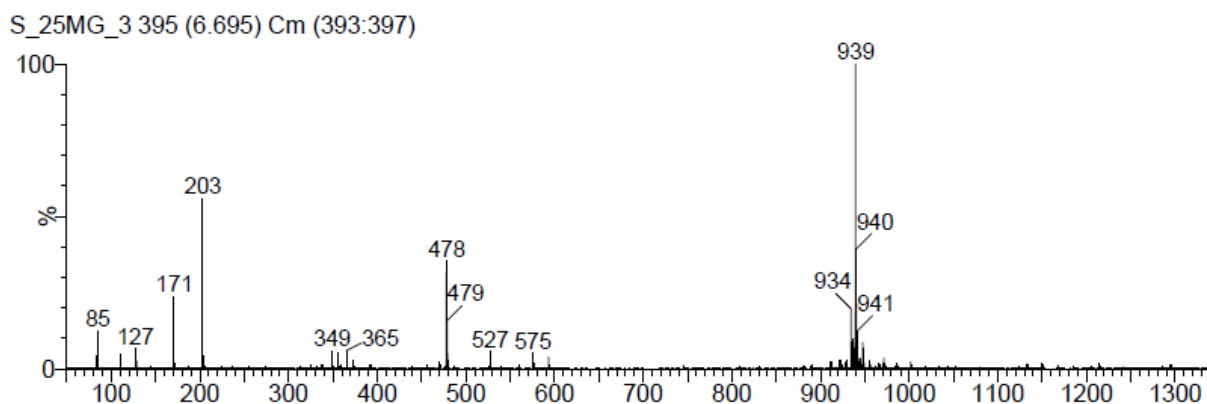
Anexo 5. Cromatograma de la fracción s_25MG_3



Anexo 6. Espectro de masas TOF ES⁺ de Acetil thevetina A

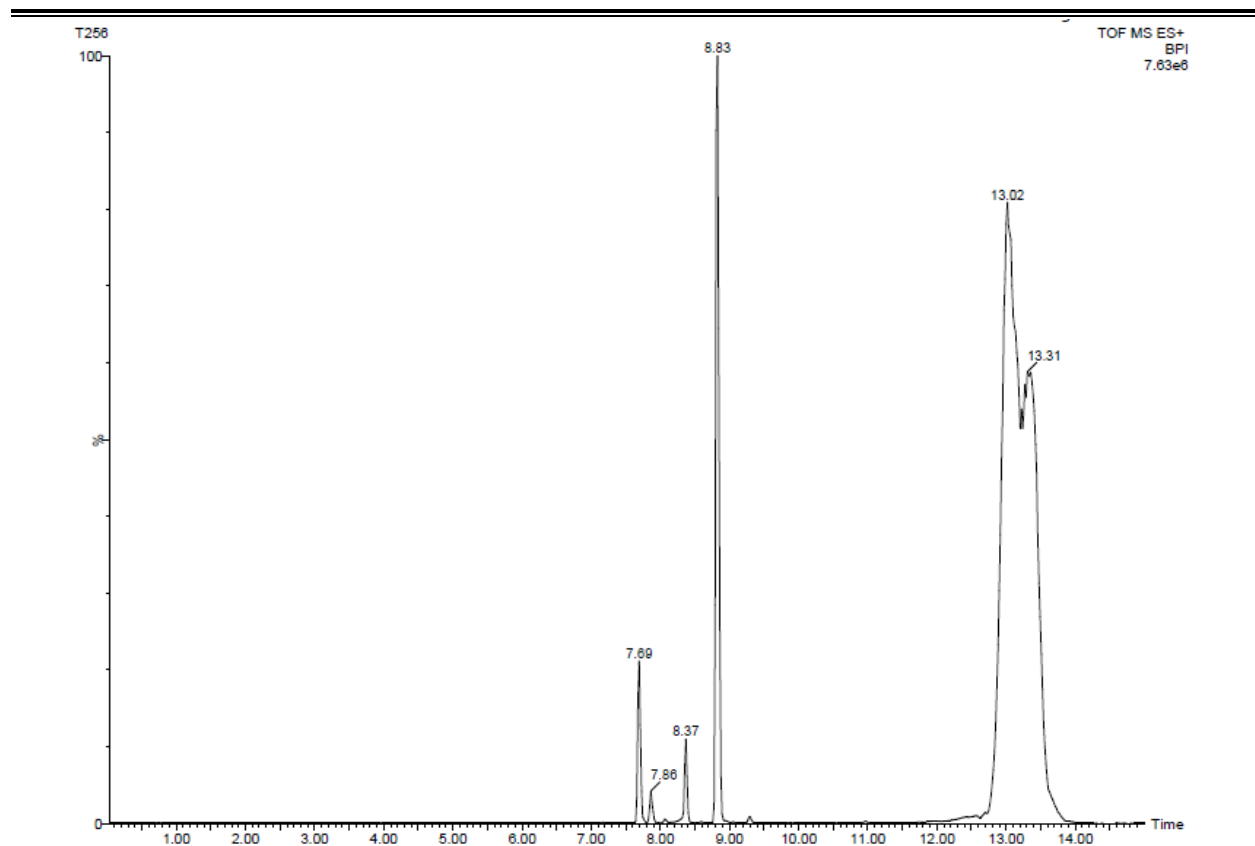


Anexo 7. Espectro de masas TOF ES⁺ de Acetil thevetina B

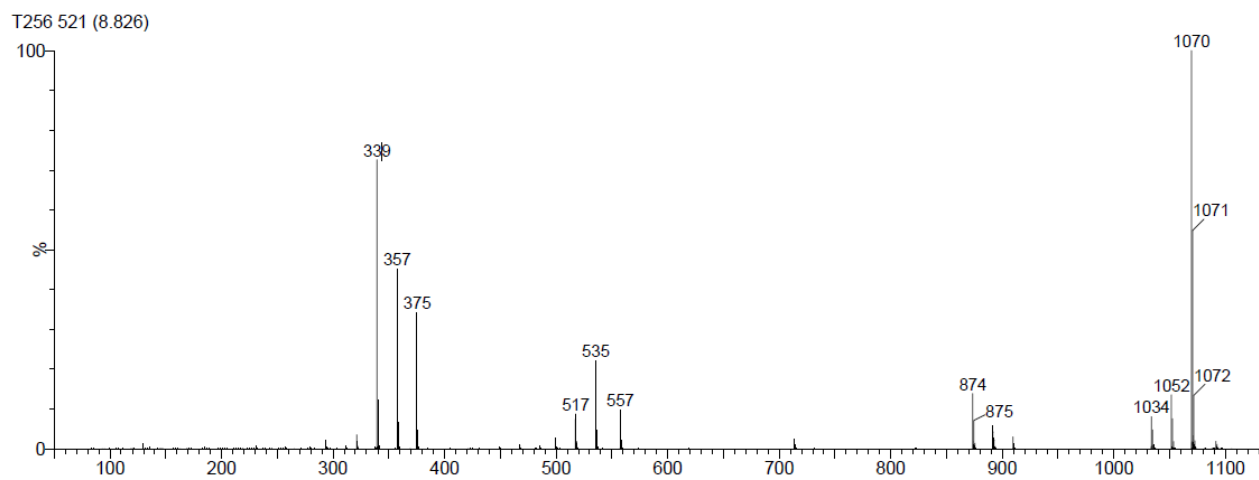


Anexo 8. Espectro de masas TOF ES⁺ de Acetil thevetina C

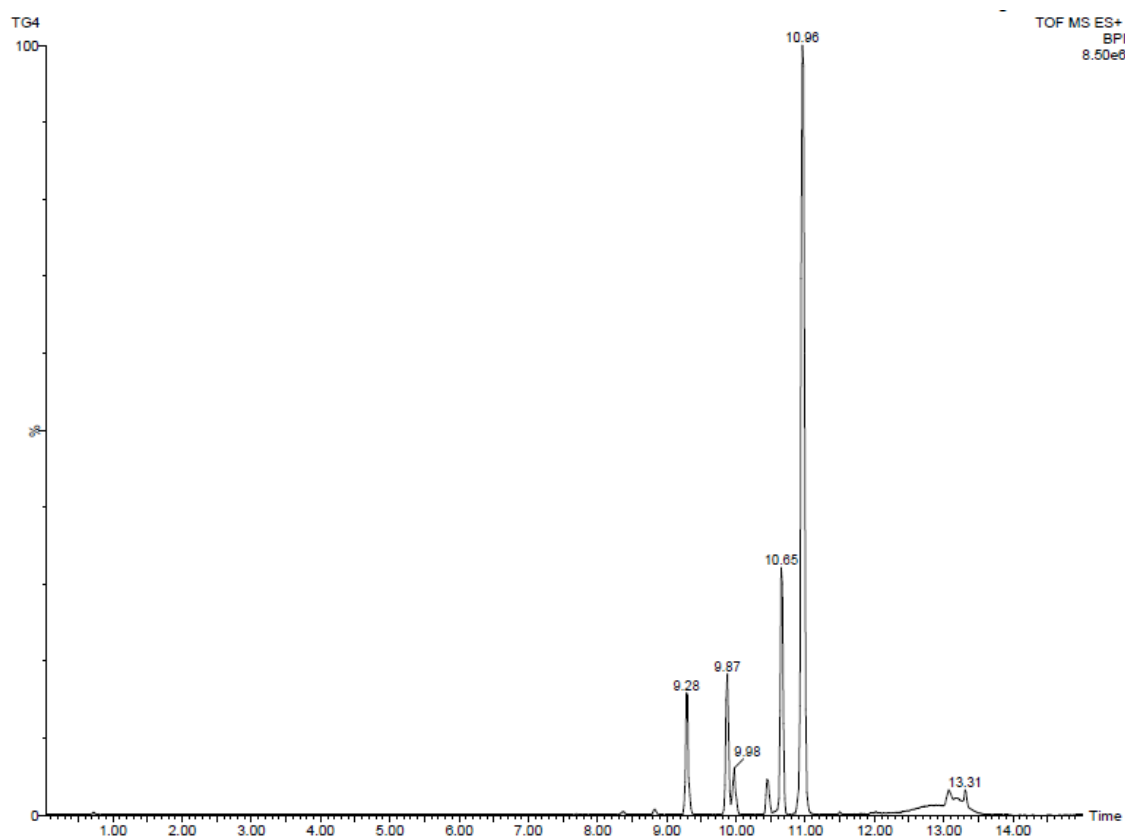
Estudio del efecto de los glicósidos aislados de semillas de *Thevetia thevetioides* sobre la permeabilidad intestinal de simvastatina



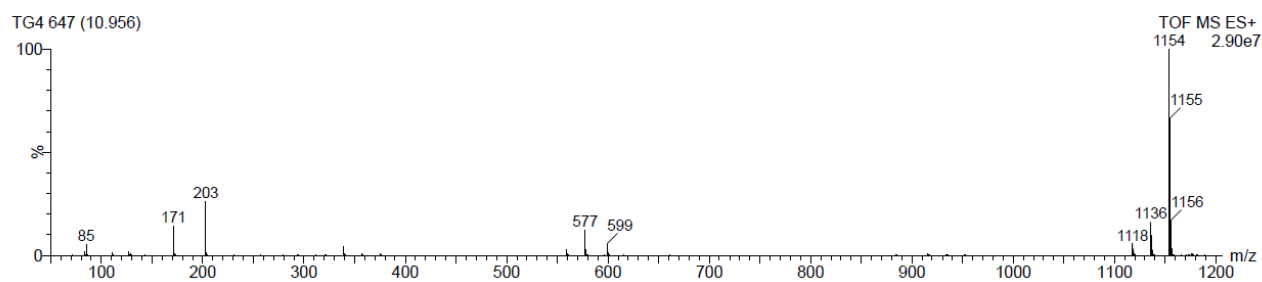
Anexo 9. Cromatograma de la fracción T256



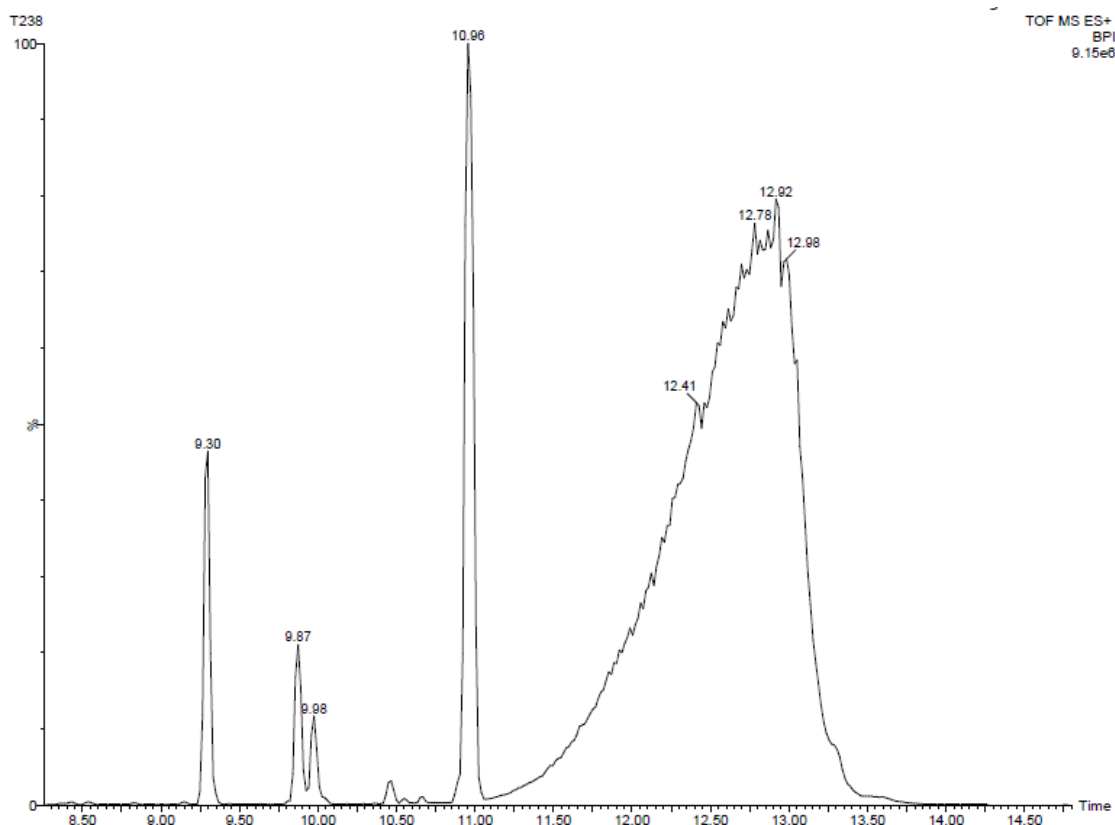
Anexo 10. Espectro de masas TOF ES⁺ de Nerifolina



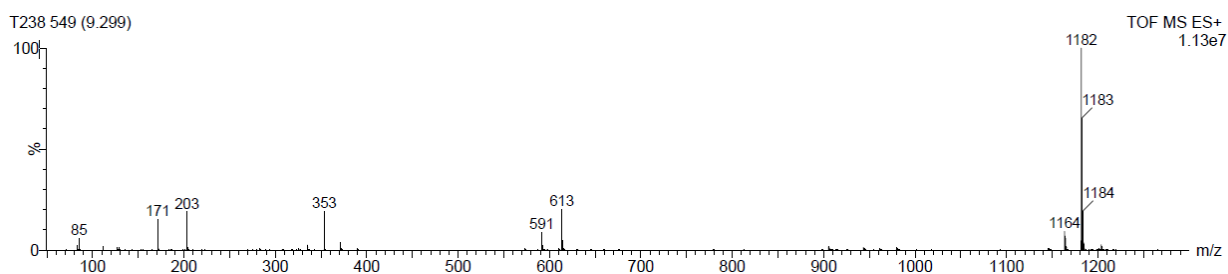
Anexo 11. Cromatograma de la Fracción TG4



Anexo 12. Espectro de masas TOF ES⁺ de Acetil nerifolina



Anexo 13. Cromatograma de la fracción T238



Anexo 14. Espectro de masas TOF ES⁺ de Acetil peruvósido

Anexo 15. Resultados exactitud, precisión y estabilidad de la validación del método bio-analítico.

A. Exactitud y precisión del método

La precisión del método fue de 0.57% para el nivel de concentración de 0.28 µg/mL, de 0.32% para 8.00 µg/mL y 0.33% para 300 µg/mL, expresado como coeficiente de variación (CV), los resultados de exactitud se presentan en la siguiente tabla como porcentaje de fármaco recuperado, para los tres niveles de concentración estudiados.

Concentración de SV (µg/mL)	% Recobro (n = 6)	CV (n = 6)
0.28	99.48	0.46
8.00	99.78	0.20
300	100.29	0.30

Tabla 4 Resultado de las pruebas de exactitud del método, para los tres niveles de concentración estudiados.

En todos los casos se cumplió el criterio de que la precisión alrededor del valor medio no debe exceder el 15% expresado como CV, excepto en el LC en donde no debe exceder del 20% CV. En tanto que el porcentaje de recobro se encuentra dentro del rango de 95 a 105% para su aceptación.

B. Estabilidad del analito en muestras adicionadas.

Los resultados del estudio de estabilidad de SV en la matriz biológica demostraron la tolerancia del fármaco a los ciclos de congelamiento – descongelamiento (Tabla 2) así como a las condiciones rutinarias (Tabla 3, 4 y 5), debido a que no existe una diferencia significativa en las concentraciones obtenidas antes y después de dicho estudio.

Concentración de SV ($\mu\text{g/mL}$)	Antes del primer ciclo de congelamiento (A) (n = 3)	Después del tercer ciclo de congelamiento (B) (n = 3)	(A)/(B)
0.28	0.99 ± 0.05	0.98 ± 0.05	1.01
8.00	0.99 ± 0.06	1.02 ± 0.02	0.97
300	0.99 ± 0.05	1.05 ± 0.07	0.94

Tabla 5 Estabilidad a corto plazo frente a ciclos de congelamiento – descongelamiento de Simvastatina en matriz biológica intestinal.

Concentración de SV ($\mu\text{g/mL}$)	Antes del primer ciclo de congelamiento (A) (n = 3)	Después del primer ciclo de congelamiento y 24 h a T_{amb} (B) (n = 3)	(A)/(B)
0.28	0.99 ± 0.05	0.95 ± 0.18	1.04
8.00	0.99 ± 0.06	0.97 ± 0.10	1.02
300	0.99 ± 0.05	0.94 ± 0.04	1.05

Tabla 6 Estabilidad a la temperatura a corto plazo de Simvastatina en matriz biológica intestinal.

Concentración de SV ($\mu\text{g/mL}$)	Muestras acabadas de preparar (A) (n = 3)	Después de 72 h a T_{amb} (B) (n = 3)	(A)/(B)
0.28	0.99 ± 0.05	0.99 ± 0.01	1.00
8.00	0.99 ± 0.06	0.99 ± 0.04	1.00
300	0.99 ± 0.05	1.04 ± 0.02	0.95

Tabla 7 Estabilidad a la temperatura a largo plazo de Simvastatina en matriz biológica intestinal.

Concentración de SV (µg/mL)	Muestras acabadas de preparar (A) (n = 3)	Después de 72 h a T_{amb} en el carrusel del inyector (B) (n = 3)	(A)/(B)
0.28	0.99 ± 0.05	0.96 ± 0.09	1.03
8.00	0.99 ± 0.06	0.99 ± 0.06	1.00
300	0.99 ± 0.05	1.00 ± 0.10	0.99

Tabla 5 Estabilidad pos-preparativa de Simvastatina en matriz biológica intestinal.