



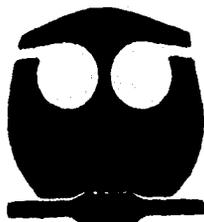
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

77
29

FACULTAD DE QUIMICA

IMPLEMENTACION DE UNA TECNICA "IN SITU" EN
INTESTINO DE RATA PARA ABSORCION
DE FARMACOS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
AIDA MELESIO MAGALLON



MEXICO, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. Inés Fuentes Noriega.

VOCAL: Prof. Helen Helgi Jung Cook.

SECRETARIO: Prof. Rafael Rión Arriola.

1^{er}. SUPLENTE: Prof. Elia Brosla Naranjo Rodríguez.

2^{do}. SUPLENTE: Prof. Sofia Margarita Rodríguez Alvarado.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO. DEPARTAMENTO
DE FARMACIA DIVISIÓN DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA.
LABORATORIO DE BIOFARMACIA. FACULTAD DE
QUÍMICA.**

SUSTENTANTE: _____

Aída Melesio M.

Aída Melesio Magallón

ASESOR DEL TEMA: _____

Inés Fuentes

M. en C. Inés Fuentes Noriega.

**ESTE TRABAJO ESTÁ ESPECIALMENTE DEDICADO A AQUELLAS PERSONAS
QUE PENSARON, SINTIERON Y/O DIJERON QUE ESTO SÓLO ERA "PÉRDIDA
DE TIEMPO" YA QUE CON ELLOS, POR ELLOS Y A PESAR DE ELLOS...**

LO LOGRÉ.

DEDICATORIAS.

A MIS PADRES.

Espero que con esto se sientan un poco orgullosos de mí.

A MI HERMANA.

Porque en muchas ocasiones fué mucho más que una madre para mí.

A MI HERMANO.

Porque gracias a él escogí esta hermosa profesión y he conocido gente maravillosa.

A MIS ABUELOS.

Macario Magallón Jacobo.

Judith Vasconcelos Pastrana.

Porque fueron los únicos que nunca perdieron la fé en mí.

A CURI.

Por apoyarme siempre que lo necesité.

A MIS SOBRINITAS.

Fer y Adi, esperando que este trabajo les pueda ayudar algo en el futuro.

A LINO.

Por el amor que me has dado, por tu paciencia, comprensión, apoyo y ayuda incondicional. Por inyectarme la fuerza para continuar siempre que lo necesité. Por todo lo que hemos compartido en el pasado y lo que nos falta en el futuro.

GRACIAS.

A MI QUERIDA ASESORA.

M. en C. Inés Fuentes Noriega.

Gracias por soportarme en las buenas
y en las malas; por sus consejos, apoyo,
comprensión y su invaluable amistad.

A la M. en C. Helgi Jung Cook.

Por su valiosa colaboración para la
culminación de éste trabajo, por su
apoyo y amistad.

A la M. en C. Margarita Rodríguez Alvarado.

Por darme su apoyo así como asesoría técnica en
todo momento.

Al Q.F.B. Raúl Garza Velasco.

Por su apoyo y ayuda incondicional, porque
gracias a él pude dar este gran paso.

Al M.V.Z. Enrique Pinzón Estrada.

Por su colaboración para la realización de este trabajo.

Muy en especial a Manolo y a Lalo, por tratar de
facilitarme siempre el trabajo, por sus consejos,
apoyo, amistad y por hacer la estancia en el lab.
mucho más agradable.

A todos mis compañeros del 112 y 113,
porque tuve la fortuna de conocerlos y
porque juntos pasamos momentos involu-
dables.

A TODOS USTEDES MUCHAS GRACIAS.

A Vero, porque nuestra amistad no requiere de frecuencia, sino de calidad; porque siempre has estado ahí.

A Eli, por tenerme la confianza que a la mayoría les faltó. Por tu amistad.

A "la banda del 7", por compartir nuestros pininos en esta Facultad, no digo nombres por temor a omitir alguno.

A Ana y Nelly, por su amistad y confianza. Las quiero.

A Lila, por ser quien es y como es.

A Fa, por su apoyo y amistad, esperando que ésta última madure con el tiempo al igual que nosotras.

A Lalo y Saúl, por ser mis grandes amigos.

A todos los miembros activos de la Familia Q.F.B. '90 incluyendo a los honorarios Q.F.B.'s Tecnología de Alimentos y los Q.F.B.'s '89, porque siempre habrá buenos momentos que recordar.

A mis amigos alimentos: Rolas y Aida, por los momentos compartidos.

A todos mis alumnos del I.V.S., por todas las satisfacciones que me han dado, porque han enriquecido mi vida y porque todos y cada uno de ellos tomaron participación de este logro.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron para la realización y culminación de éste trabajo.

A mis amigas Areli y Cinthya, que me han demostrado su amistad mucho más que otras personas.

MIL GRACIAS.

**NO TE DEJES VENCER POR NINGUNA
CIRCUNSTANCIA. LA DERROTA DEPENDE DE
NOSOTROS, A LA PAR QUE EL TRIUNFO. SIN
EMBARGO, LA PEOR DERROTA ES LA DE QUIEN SE
DESANIMA. PERDER, NO SIEMPRE ES DERROTA.
PERO EL DESALIENTO ARRUINA COMPLETAMENTE
LA VIDA. NO TE DESANIMES NUNCA. SIGUE
ADELANTE CON VALENTÍA, PORQUE EL TRIUNFO LES
SONRÍE ÚNICAMENTE A LOS QUE NO SE PARAN A
MITAD DEL CAMINO.**

ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE GENERAL.	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. OBJETIVOS.	3
3. GENERALIDADES.	4
3.1. Monografía de Paracetamol.	4
3.1.1. Descripción.	4
3.2. Monografía de Ácido Acetil Salicílico.	6
3.2.1. Descripción.	6
3.3. Absorción de fármacos.	9
3.3.1. Difusión pasiva de membranas.	9
3.3.2. Transporte Activo de las Membranas.	10
3.3.3. Métodos de Estudio.	11
3.4. Métodos In Vitro, In Situ e In Vivo Para el estudio de los factores fisiológicos que afectan la absorción de fármacos.	12
3.4.1. Modelos In Vitro para probar la absorción de nuevos fármacos.	13
3.4.2. Estudios In Vitro.	14
3.4.3. Estudios In Situ (sistemas).	15
3.4.4. Estudios In Vivo.	15
3.5. Elección de un Modelo Animal.	16
4. PARTE EXPERIMENTAL	18
4.1. Material y Equipo.	18
4.2. Materias Primas.	18
4.2.1. Estándares.	18
4.2.2. Reactivos.	19
4.2.3. Animales de Laboratorio.	19
4.3. Preparación de soluciones.	19

4.3.1. Solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH = 6.0.	19
4.3.2. Solución de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH = 6.0 (1 mg/ml).	20
4.3.3. Solución de Ácido Acetil Salicílico en solución amortiguadora Krebs-Ringer pH = 6.0 (1 mg/ml).	20
4.3.4. Solución de Paracetamol en solución amortiguadora Krebs-Ringer pH = 6.0 (1 mg/ml).	20
4.3.5. Soluciones estándar.	20
4.3.5.1. Solución estándar de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH = 6.0 (1 mg/ml).	20
4.3.5.2. Solución estándar de Ácido Salicílico en solución amortiguadora Krebs-Ringer pH = 6.0 (1 mg/ml).	21
4.3.6. Reactivos para desarrollar color.	21
4.3.6.1. Reactivo de o-toluidina.	21
4.3.6.2. Reactivo de Trinder.	21
4.4. Estudio de permeación de la glucosa para determinar la integridad funcional del intestino de rata en la técnica "in situ".	22
4.4.1. Método analítico.	22
4.4.2. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de glucosa en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH = 6.0).	23
4.4.2.1. Linealidad.	23
4.4.2.2. Repetibilidad.	23
4.4.3. Técnica "In Situ" en intestino de rata.	23
4.5. Estudio de la absorción del Ácido Acetil Salicílico en intestino de rata "In Situ".	27
4.5.1. Método analítico.	27
4.5.2. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de salicilatos en solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH = 6.0).	28
4.5.2.1. Linealidad.	28
4.5.2.2. Repetibilidad.	28
4.5.3. Técnica "In Situ" en intestino de rata.	28
4.6. Estudio de la absorción del Acetaminofén en intestino de rata "In Situ".	29
4.6.1. Método analítico.	29
4.6.2. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de acetaminofén en solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH = 6.0).	30
4.6.2.1. Linealidad.	30
4.6.2.2. Repetibilidad.	30

4.6.3. Técnica "In Situ" en intestino de rata.	31
5. RESULTADOS EXPERIMENTALES	33
5.1. Estudio de permeación de glucosa para determinar la integridad funcional del intestino por la técnica "In Situ".	33
5.1.1. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH = 6.0).	33
5.1.1.1. Linearidad.	33
5.1.1.2. Repetibilidad.	34
5.1.2. Técnica In Situ en intestino de rata.	34
5.2. Estudio de la absorción del Ácido Acetil Salicílico en intestino de rata por la técnica "In Situ".	36
5.2.1. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de salicilatos en solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH = 6.0).	36
5.2.1.1. Linearidad.	36
5.2.1.2. Repetibilidad.	37
5.2.2. Técnica In Situ en intestino de rata.	38
5.3. Estudio de la absorción de Acetaminofén en intestino de rata por la técnica "In Situ".	38
5.3.1. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de Acetaminofén en solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH = 6.0).	38
5.3.1.1. Linearidad.	38
5.3.1.2. Repetibilidad.	39
5.3.2. Técnica In Situ en intestino de rata.	40
6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.	42
6.1. Estudio de permeación de la glucosa para determinar la integridad funcional del intestino de rata por la técnica In Situ.	42
6.1.1. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de glucosa en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH = 6.0).	42

6.1.1.1. Linearidad.	40
6.1.1.2. Repetibilidad.	40
6.1.2. Técnica In Situ en intestino de rata.	40
6.2. Estudio de la absorción del Ácido Acetil Salicílico en intestino de rata por la técnica In Situ.	43
6.2.1. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de salicilatos en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH = 6.0).	43
6.2.1.1. Linearidad.	43
6.2.1.2. Repetibilidad.	43
6.2.2. Técnica In Situ en intestino de rata.	43
6.3. Estudio de la absorción del Acetaminofén en intestino de rata por la técnica In Situ.	44
6.3.1. Validación del método analítico por espectrofotometría para la cuantificación de acetaminofén en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH = 6.0).	44
6.3.1.1. Linearidad.	44
6.3.1.2. Repetibilidad.	44
6.3.2. Técnica In Situ en intestino de rata.	44
7. CONCLUSIONES.	46
8. BIBLIOGRAFÍA.	47
ÍNDICE DE TABLAS.	
Tabla I. Solución de Krebs-Ringer.	20
Tabla II. Curva estándar de glucosa.	22
Tabla III. Curva estándar de Ácido Acetil Salicílico.	27
Tabla IV. Curva estándar de Acetaminofén.	30
Tabla V. Linearidad método analítico. Glucosa.	33
Tabla VI. Repetibilidad método analítico. Glucosa.	35
Tabla VII. Linearidad método analítico. Salicilatos.	36
Tabla VIII. Repetibilidad método analítico. Salicilatos.	37
Tabla IX. Linearidad método analítico. Acetaminofén.	39
Tabla X. Repetibilidad método analítico. Acetaminofén.	40
ÍNDICE DE GRÁFICAS.	
Fig. 5.1. Linearidad método analítico. Glucosa.	34
Fig. 5.2. Ln Concentración glucosa vs tiempo.	35

Fig.5.3. Linearidad método analítico. Salicilatos.	37
Fig.5.4. Ln Concentración Ác. Acetil Salicílico vs tiempo.	38
Fig.5.5. Linearidad método analítico. Acetaminofén.	39
Fig.5.6. Ln Concentración Acetaminofén vs tiempo.	41

1. INTRODUCCIÓN.

1. INTRODUCCIÓN.

Hasta ahora, la mayoría de los conceptos básicos involucrados en la absorción intestinal de fármacos están fundamentados en experimentos en ratas en modelos *in vitro* e *in situ*.

Brodie y col., usando la técnica de perfusión intestinal *in situ*, determinaron en el equilibrio, la concentración de fármaco en sangre y lumen intestinal inyectando simultáneamente éste en el torrente sanguíneo y perfundiéndolo en solución en el intestino. (4)

En ésta técnica es muy útil la información ya que se elimina la posibilidad de considerar procesos como metabolismo, excreción y distribución tisular, pero no trata directamente con el proceso de absorción.

También se han descrito⁽²⁾ técnicas de perfusión *in situ* en segmentos intestinales de rata para estudiar la cinética de absorción de algunos fármacos, como la de perfusión de paso simple, recirculativa, oscilativa y el método del orificio cerrado, en donde se ha encontrado que el flujo afecta la velocidad de absorción y la reproducibilidad del método.

A la técnica de intestino invertido⁽⁸⁾ modelo *in vitro* introducida por primera vez desde 1954, se le ha encontrado amplia aplicación, particularmente para estudiar la influencia de varios factores en la absorción de fármacos. Aunque ésta técnica controla muchas de las variables del proceso de absorción, tiene la desventaja de que no existe suministro sanguíneo y se obtienen velocidades de absorción más lentas, y el tiempo de depósito del fármaco en la membrana es mayor que el real.⁽⁴⁾

1. INTRODUCCIÓN.

Uno de los métodos "in situ" utilizado para determinar velocidades de absorción de fármacos en un segmento gastrointestinal de ratas, es el reportado por Doluisio y col. (4) . La ventaja que ofrece con respecto a los otros es que nos permite obtener velocidades de absorción comparables con las reales, la técnica experimental es simple, los aparatos no son costosos y están disponibles en el laboratorio, además de que con un sólo animal se pueden obtener datos experimentales apropiados para complementar el análisis cinético cuantitativo, y el tiempo experimental utilizado es moderado.

El objetivo de este trabajo es desarrollar la técnica incorporada por Doluisio para su evaluación y determinar la viabilidad del intestino así como el proceso de absorción de dos fármacos.

Con base en lo anterior, se desarrolló el presente trabajo con los siguientes objetivos.

2. OBJETIVOS.

2. OBJETIVOS.

- A) Montar y validar la técnica *In Situ* en intestino de rata para evaluar la absorción de fármacos.

- B) Determinar el grado de absorción de Acetaminofén y ácido acetilsalicílico en el intestino delgado (Duodeno) en una solución de Krebs-Ringer a un pH = 6.0.

3. GENERALIDADES.

PARACETAMOL.

3.1. Monografía.

Von Mering usó por primera vez en medicina el acetaminofeno (paracetamol; N-acetil-*p*-aminofenol) en 1893, sin embargo, sólo después de 1949 se hizo popular, después de haber sido reconocido bien el principal metabolito activo de la acetanilida y la fenacetina.

La actividad antipirética de los compuestos reside en la estructura aminobenzeno. La introducción de otros radicales en el grupo hidroxilo del *p*-aminofenol y en los grupos amino libres de la anilina reduce la toxicidad sin pérdida de la acción antipirética.⁽⁵⁾

3.1.1. Descripción:

Nombre químico ⁽²³⁾.

4-Hidroxiacetanilida, *p*-Hidroxiacetanilida, *p*-Acetamidofenol, *p*-Acetaminofenol, *p*-Acetilaminofenol, N-(4-Hidroxifenil) acetamida, N-*p*-Hidroxifenilacetamida.

Sinónimos ⁽²³⁾.

Acetaminofén, Acetofenum, Paracetamol.

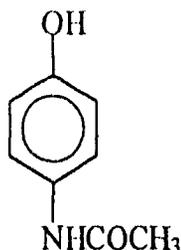
Nombres comerciales ⁽²³⁾.

Abesanil, Acamol, Acetalgin, Amadil, Anaflon, Apamíde, APAP, Bickie-mol, Calpol, Cetadol, Datriil, Dial-a-gésico, Dirox, Dymadon, Eneril, Febrilix, Finimal, Gelocatil, Hedex, Homoolan, Korum, Lyteca, Naprinol, Nobedon, Pacemo, Panadol, Panets, Paraspen, Parmol, Tabalgin, Tapar, Temlo, Temptra, Traigon, Tylenol, Valadol.

Fórmula condensada ⁽²³⁾.

$C_8H_9NO_2$

Fórmula desarrollada ⁽²³⁾.



Peso molecular ⁽²³⁾.
151.1

Solubilidad ^(6,23).

Una parte en 70 de agua, 1 en 20 de agua hirviendo, 1 en 7 de alcohol, 1 en 13 de acetona, 1 en 50 de cloroformo, 1 en 40 de glicerol, 1 en 10 de alcohol metílico y 1 en 9 de propilen glicol; insoluble en éter, soluble en soluciones de hidróxidos alcalinos. Una solución saturada tiene un pH alrededor de 6,0.

pKa ⁽²⁴⁾= 9.5.

Farmacocinética ⁽⁶⁾.

El Acetaminofén y la Fenacetina se metabolizan principalmente por las enzimas microsomales hepáticas.

El Acetaminofén es rápidamente absorbido casi por completo después de su administración oral, en el tracto gastrointestinal. Su volumen de distribución ha sido reportado en el rango de 0.83-1.36 L/kg.

Las variaciones en la cantidad de acetaminofén absorbido dependen del vehículo usado así como de la vía de administración.

Su distribución es bastante uniforme en la mayoría de los líquidos orgánicos. La unión del fármaco con proteínas plasmáticas es variable, sólo un 20-50 % puede unirse en las concentraciones encontradas durante la intoxicación aguda. Después de dosis terapéuticas, puede recuperarse un 90 a 100 % del fármaco en la orina en el primer día, principalmente después de la conjugación hepática con ácido glucurónico (cerca del 60 %), ácido sulfúrico (alrededor del 35 %) o cisteína (cerca del 3 %); también se detectaron pequeñas cantidades de metabolitos hidroxilados y desacetilados. Una pequeña proporción de acetaminofeno sufre N-

3. GENERALIDADES.

A dosis equivalentes, la formulación oral produce niveles séricos más grandes y absorción total comparándolo con respecto a la formulación de supositorios de propilen glicol, ambas son las preparaciones comerciales. Se ha reportado que cruza la placenta.

El Acetaminofén y sus metabolitos son excretados por el riñón. Después de dosis terapéuticas del fármaco, sólo del 1-4% se excreta inalterado.

La vida media del Acetaminofén es entre 2-4 hrs. en gente sana. El $t_{1/2}$ y el Vd. son comparables en adultos así como en niños.

La vida media del Acetaminofén en plasma es considerada como el mejor indicador de toxicidad seria (ejem. daño hepático).

En adultos puede producirse hepatotoxicidad después de la ingestión de una sola dosis de 10 a 15 g (150 a 250 mg/kg) de acetaminofeno; dosis de 20 a 25 g o más son potencialmente fatales.

El daño hepático grave (con niveles de actividad de aspartato aminotransferasa mayores de 1.000 UI por litro de plasma) se presenta en un 90 % de los pacientes con concentraciones plasmáticas de acetaminofeno superiores a 300 $\mu\text{g/mL}$ 4 horas después de la ingestión del fármaco o de 45 $\mu\text{g/mL}$ 15 horas después de ella.

El principal tratamiento antidoto consiste en la administración de compuestos sulhidrílo, que tal vez actúen, en parte, reponiendo los depósitos hepáticos de glutatión. La N-acetilcisteína por vía oral es particularmente efectiva.

Con dosis terapéuticas, aproximadamente el 25 % del fármaco es metabolizado por el efecto del primer paso a través del hígado; es excretado por orina como varios conjugados: 44-55 % como conjugados glucurónidos, 20-30 % como sulfato y 15-55 % como conjugados ácidos de cisteína y mercaptúrico. Aproximadamente el 2 % de la dosis se elimina en forma inalterada.

La dosis oral convencional de acetaminofeno es de 325 a 1.000 mg (650 mg por vía rectal); la dosis total diaria no debe exceder 4.000 mg. Para niños, dosis individual 40 a 480 mg, según edad y peso, no más de 5 dosis en 24 horas. No debe administrarse durante más de 10 días ni a niños muy pequeños, excepto por prescripción médica.

ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO.

3.2. Monografía.

La corteza del sauce (*Salix alba*), cuya virtud antipirética conocían los antiguos, contiene un glucósido llamado *salicina*, descubierto por Leroux en 1827. Por hidrólisis, la

3. GENERALIDADES.

salicina libera glucosa y alcohol salicílico (*saligenina*). Pira, en 1838, elaboró ácido salicílico de la salicina. Seis años más tarde, Cahours preparó ácido salicílico del aceite volátil de *gaultheria* (esencia de Wintergreen). En 1860, Kolbe y Lautemann realizaron la síntesis de este ácido partiendo del fenol. El salicilato de sodio fue usado por primera vez como antipirético en la fiebre reumática por Buss en 1875 y al año siguiente Stricker y MacLagan, cada uno por su parte, descubrieron el valor de esta sustancia en la fiebre reumática. En 1886 Nencki introdujo en la medicina el salicilato de fenilo y Dreser en 1899 hizo lo mismo con la aspirina (ácido acetil salicílico). Los salicilatos sintéticos pronto desplazaron totalmente a los compuestos más caros que se obtenían de las fuentes naturales.

3.2.1. Descripción:

Nombre químico (23).

Acetato de ácido salicílico; ácido 2 - (acetiloxi)- benzoico; ácido o-acetil salicílico, ácido 2 acetoxibenzoico.

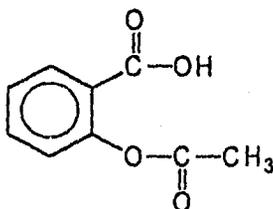
Nombres Comerciales (23).

El nombre aspirina está limitado, otros nombres bajo los cuales se le conocen son: Ácido acetil salicílico; A.S.A.; Aciben; Adiro; A.S.A 500; Asawin; Asawin Pediátrico; Acetiben, Acetiben 500; Acetiben S; Dolmex; Ecotrin 650; Labysal; Rhonal.

Fórmula condensada (23).



Fórmula desarrollada (23).



Peso molecular (23),
180.15

Solubilidad (5,23).

3. GENERALIDADES.

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

pKa (24) = 3.5.

Farmacocinética (23).

Los salicilatos ingeridos oralmente son absorbidos rápidamente, parte por el estómago y en mayor cantidad en el intestino delgado. La velocidad de absorción es determinada por muchos factores, particularmente las velocidades de desintegración y disolución, el pH en la superficie mucosal y el tiempo de vaciamiento gástrico; si son tabletas.

Después de la absorción, los salicilatos se distribuyen en los tejidos y fluidos transcelulares por medio de procesos principalmente pasivos dependientes del pH. Atraviesa barrera placentaria con facilidad.

Después de su administración intravenosa, su vida media en el organismo humano es de sólo 15 minutos, y se estima que el 20 % de su hidrólisis *in vivo* se lleva a cabo en la sangre

La biotransformación del salicilato tiene lugar en muchos tejidos, pero particularmente en el retículo endoplásmico hepático y mitocondrias. Los tres principales metabolitos son: ácido salicílico (el conjugado de glicina), el éter o glucurónido fenólico, y el éster o acil glucurónido. Además, una pequeña fracción es oxidada a ácido gentísico (ácido 2,5-dihidrobenczoico) y a ácidos 2,3-dihidrobenczoico y 2,3,5-trihidrobenczoico; ácido gentisúrico, el conjugado de glicina ácido gentísico también se forma.

Las principales rutas metabólicas utilizadas (glucurónido salicílico y salicil fenol) se saturan con las dosis para el tratamiento de la inflamación.

Los salicilatos son excretados en la orina como ácido salicílico (10 %), ácido salicílico (75 %), glucurónido salicil fenólico (10 %) y acil glucurónido (5 %), ácido gentísico (< 1 %). La excreción renal involucra filtración glomerular, secreción renal tubular activa y reabsorción tubular pasiva.

La dosis letal varía con la preparación del salicilato. De 10 a 30 g. de salicilato de sodio o aspirina ha causado la muerte en adultos, pero cantidades mucho más grandes (130 g de aspirina, en un caso) han sido ingeridas sin resultados fatales.

3.3.ABSORCIÓN DE FÁRMACOS.

La absorción de los fármacos se define como el paso del fármaco de su sitio de administración a la circulación.⁽²⁾

Un fármaco debe atravesar varias membranas biológicas antes de que alcance su sitio de acción independientemente de la ruta de administración. En la cavidad oral existen dos regiones, bucal y sublingual, donde las membranas son muy delgadas y tienen un suministro de sangre abundante.⁽⁹⁾

El transporte o paso del fármaco a través de las membranas en varias partes del cuerpo depende del amplio intervalo en la selectividad y las características de las membranas. El tamaño del poro, la composición de las membranas y la presencia de acarreadores dependientes de energía pueden afectar la absorción del fármaco, sin embargo, la mayoría de los fármacos pasan a través de las membranas biológicas por difusión simple o pasiva.⁽⁹⁾

La velocidad de absorción a partir de los diferentes sitios de absorción está determinada por las propiedades fisicoquímicas del fármaco, la forma de dosificación, y por un gran número de factores anatómicos y fisiológicos.⁽²⁾

Los fármacos pueden ser administrados oralmente en una variedad de formas de dosificación, las cuales incluyen cápsulas, tabletas, soluciones, emulsiones y suspensiones; también son administrados por otras vías, por ejemplo: sublingualmente como tabletas, rectalmente como supositorios o soluciones, tópicas como ungüentos, linimentos, soluciones, cremas o soluciones por inhalación como gases, vapores, aerosoles o polvos, y por inyección; como soluciones o suspensiones.

3.3.1. Difusión pasiva a través de membranas.

La difusión ocurre cuando las moléculas del fármaco existen en una alta concentración a un lado de la membrana y una concentración pequeña en el otro lado de ésta. La difusión se desarrolla a determinada velocidad para igualar la concentración del fármaco en ambos lados de la membrana, en donde la velocidad de transporte es proporcional al gradiente de concentración a través de la membrana. La Ley de Fick establece que la velocidad de difusión o transporte a través de la membrana es directamente proporcional al área superficial de la

3. GENERALIDADES.

membrana y al gradiente de concentración, y es indirectamente proporcional a la adherencia de la membrana.⁽²⁾

Un cambio en cualquiera de estas variables puede alterar la velocidad de transporte del fármaco a la sangre. El valor del coeficiente de difusión es dependiente de la naturaleza química del fármaco y, en particular, de su grado de lipofilia, el cual puede ser evaluado a partir del coeficiente de partición en disolvente acuoso-orgánico. La difusión también puede estar influenciada por la temperatura, la presión, y por la naturaleza del disolvente. En el intestino delgado la absorción es más rápida que en el estómago ya que su gran área superficial está provista por vellos y microvellos.⁽²⁾

3.3.2. Transporte activo en las membranas.⁽⁹⁾

Los fármacos también se absorben por un mecanismo de transporte activo, pueden pasar de áreas de menor concentración a áreas de alta concentración. Se piensa que la transferencia es medida vía un "acarreador", éste puede consistir de una enzima o de otra sustancia en la pared gastrointestinal. El acarreador se combina con el fármaco y lo acompaña a través de la membrana para ser descargado en el otro lado de ésta. El complejo acarreador-fármaco se considera que tiene una alta permeabilidad a través de la membrana del intestino, no así el fármaco solo. El transporte activo de los fármacos es específico de un sitio, y la mayor absorción ocurre en lugares del tracto gastrointestinal, donde la concentración del acarreador es mayor.

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

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

La difusión facilitada es una forma especial de transporte por acarreadores la cual tiene varias características del transporte activo, pero el sustrato no se mueve contra un gradiente de concentración. La glucosa que las células toman es un ejemplo de la difusión facilitada. La difusión facilitada es mediada por una molécula de acarreador en la mucosa, la cual es

3. GENERALIDADES.

selectiva, saturable, y que puede ser inhibida por ciertos electrolitos, pero la difusión facilitada no necesita de la energía liberada por el cuerpo para que este proceso ocurra.

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

3.3.3 Métodos de estudio.

Por muchos años, la absorción del tracto gastrointestinal fue analizada simplemente tomando como base si el fármaco era efectivo o no cuando era administrado por vía oral.

Posteriormente se desarrolló comparando la respuesta farmacológica vista después de la administración oral, con la obtenida después de una inyección intravenosa.⁽²⁾

Con el advenimiento de métodos químicos específicos para la estimación de fármacos en fluidos biológicos, se utilizaron bases cuantitativas para el estudio de los fármacos de manera que se puede estimar la velocidad de absorción así como a los mecanismos de absorción para obtener datos cinéticos detallados. Con base en estos estudios se puede establecer si las moléculas del fármaco penetran la membrana gastrointestinal o si el fármaco es destruido por las enzimas intestinales o el ácido gástrico.⁽²⁾

Manteniendo la definición de la absorción de un fármaco, el camino más directo para demostrar que la absorción se ha llevado a cabo, debe ser por la detección del fármaco en la sangre o en orina después de la administración oral. Desafortunadamente, excepto bajo circunstancias especiales, ésta forma de detección no es cuantitativa.⁽²⁾

Para eliminar variables, los investigadores han buscado condiciones experimentales menos fisiológicas, por ejemplo, para estudios de absorción existen los métodos de intestino ligado y los de perfusión con los que se disminuye grandemente la variabilidad biológica y proveen un alto grado de reproducibilidad.⁽²⁾

En el intestino, los fármacos se colocan en un segmento de intestino o porción de éste ligado (loop), preparado quirúrgicamente, el cual abre al exterior del animal para facilitar la introducción repetida y obtención de solución del fármaco. Adicionalmente para reducir la variabilidad, las soluciones de fármaco pueden ser adicionadas a una velocidad constante a

3. GENERALIDADES.

través de los segmentos intestinales o de las porciones de intestino ligadas (loops). Con estos métodos de perfusión, es posible reducir la variabilidad de la motilidad y mantener una presión hidrostática constante y un volumen de fluido constante a través del lumen del segmento. Las técnicas de perfusión proveen un alto grado de reproducibilidad de todos los métodos de absorción.⁽²⁾

Una aproximación radicalmente diferente para el estudio de la absorción involucra la medición del paso de una sustancia a través de la pared del intestino *in vitro*, esto es, movimiento de la región mucosal hacia la región serosal (Wilson). Por definición dicho movimiento no constituye la absorción, tomando en cuenta que no hay un suministro sanguíneo en el tejido.⁽²⁾

3.4. Métodos *In Vitro*, *In Situ* e *In Vivo* para el estudio de los factores fisiológicos que afectan la absorción de fármacos.

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

Los métodos *In Vitro* e *In Situ* son simples, reproducibles y de gran valor, ya que son estudios más directos y económicos de la absorción y acción de los fármacos. La experimentación *In Vivo* con humanos provee la información más útil, pero el trabajo es más caro, difícil de interpretar y limitado por restricciones severas, tales como el consentimiento del paciente, particularmente en el caso de estudios pediátricos y geriátricos.⁽³⁾

Los estudios preclínicos de biodisponibilidad basados en la comparación de perfiles de administración intravenosa con perfiles que resultan de otras rutas de administración proveen un índice de la biodisponibilidad absoluta del compuesto administrado. Comparaciones similares sin un estándar, usualmente permiten sólo una evaluación de la biodisponibilidad relativa.⁽²¹⁾

Existe una variedad de factores fisicoquímicos que afectan la biodisponibilidad del fármaco, incluyendo la estabilidad, el tamaño de partícula, el tamaño de cristal y polimorfismo.

3. GENERALIDADES.

Los parámetros primarios de absorción del fármaco son sus características de solubilidad y de disolución. Un fármaco sólido administrado oralmente se debe disolver en el tracto gastrointestinal antes de su absorción a través de la mucosa gastrointestinal.⁽²¹⁾

Se ha encontrado que en el intestino se tienen gradientes osmóticos, hidrostáticos y eléctricos los cuales pueden inducir movimiento de agua en estudios in vitro. Esto sugiere una variabilidad en el transporte de agua que contribuye a una variabilidad en la absorción intestinal de los fármacos administrados, particularmente cuando son administrados con nutrientes. El impacto del transporte de agua en el intestino en la absorción de varios fármacos in vivo, es significativo sólo en el caso de ser una función de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y de los nutrientes que influyan en los parámetros fisiológicos gastrointestinales.⁽¹⁰⁾

Se debe tener cuidado con aquellos fármacos que pueden ejercer un efecto inductor de el paso de agua ya que si está además combinado con una solución fisiológica que contenga glucosa, el efecto del paso de agua no sólo va a ser atribuido a la glucosa sino que un fármaco presente en el estudio de otro de interés, puede estar afectando o puede ser que el mismo fármaco que se está analizando induzca el paso de agua a través de las membranas.⁽¹⁰⁾

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

En los últimos 60 años se han desarrollado un número de métodos in vitro para el estudio de la absorción intestinal. En 1899 Reid describió experimentos con intestino aislado el cual separaba dos fluidos. Posteriormente Auchinachie, MacLeod y Magee usaron porciones de intestino de conejo y los suspendían en un baño de solución salina oxigenada.⁽¹⁹⁾

El primer método para asegurar una oxigenación adecuada del tejido fue descrita en 1949 por Fisher y Parsons, y subsecuentemente modificada por otros. En este método una porción de intestino de rata, se montó de tal manera que la solución salina oxigenada podía circular en ambos lados del tejido. Un último desarrollo fue el uso de sacos de intestino invertido, los cuales eran incubados con agitación en pequeños matraces gasificados con oxígeno.⁽¹⁹⁾ Posteriormente Wilson y Wiseman describieron un método con el uso de segmentos aislados de intestino invertido. En su método, el fluido serosal puede ser muestreado solamente al final del procedimiento de experimentación. Crane y Wilson posteriormente legaron un sistema de sacos invertidos el cual permitía un muestreo en serie del fluido en el lado serosal del intestino.⁽²²⁾

3. GENERALIDADES.

Tomando en cuenta que la administración oral es la ruta de elección para la administración de los fármacos, los procesos in vitro que simulan a los procesos in vivo, son útiles en la identificación de los problemas potenciales de biodisponibilidad durante el desarrollo de un fármaco. Uno de los principales factores que afectan la absorción del fármaco es la permeabilidad del mismo a través de la mucosa gastrointestinal.⁽²¹⁾

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

Existen varios mecanismos para explicar los efectos de los cationes y los azúcares en el transporte de fármacos. Uno de estos considera la concentración efectiva de fármaco en el tejido intestinal (ejemplo: el compartimento epitelial celular). Existe indudablemente un incremento en el volumen compartamental celular del tejido del intestino, en la presencia de varios inhibidores. Si este incremento en el volumen celular resulta en una disminución en la concentración del fármaco en la célula, uno esperaría que disminuyera el gradiente de concentración entre este compartimento y la solución serosal. Si la transferencia del tejido al compartimento serosal es limitante de la velocidad, existiría una disminución en la velocidad de aparición del fármaco en el compartimento serosal.⁽¹⁶⁾

Con fármacos relativamente insolubles, la velocidad de disolución generalmente es el paso determinante en la velocidad de absorción que sigue a una administración oral. Considerando fármacos relativamente solubles, la permeabilidad puede ser un paso determinante.

Se debe determinar cuál parámetro asociado con el proceso de absorción es el paso limitante de la velocidad. Una prueba de absorción o de permeación puede reducir el tiempo de desarrollo de un nuevo fármaco si es realizado antes de los estudios clínicos.⁽²²⁾

3.4.2. Estudios In Vitro.⁽⁸⁾

3. GENERALIDADES.

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

Dentro de los sistemas intestinales *In Vitro* se encuentran los siguientes:

- a) Técnica del saco invertido ⁽¹⁰⁾,
- b) Técnica de circulación ⁽⁹⁾,
- c) Técnica del anillo invertido o de rebanada ^(9,21),
- d) Técnica del saco invertido con sistema de flujo ⁽⁹⁾.

3.4.3. Estudios *In Situ* (sistemas).⁽²¹⁾

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

- Segmentos gastrointestinales ligados.⁽²¹⁾
- Técnica de perfusión.⁽⁹⁾
- Técnica del intestino de rata.⁽⁹⁾
- Técnica del asa intestinal de intestino de rata. ⁽⁹⁾
- Técnica del estómago de rata.⁽⁹⁾

3.4.4. Estudios *In Vivo*.^(8,9)

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

3. GENERALIDADES.

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

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

3.5. ELECCIÓN DE UN MODELO ANIMAL.⁽²⁴⁾

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

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

Los animales pequeños, tales como el ratón, la rata y el hamster, son elecciones muy pobres para estudios de biodisponibilidad *in vivo*, tomando en cuenta que no pueden ingerir la mayoría de las formas farmacéuticas intactas, y que no se pueden obtener varios especímenes biológicos de un mismo animal. En algunos casos donde se designa un protocolo para evaluar

3. GENERALIDADES.

la excreción urinaria solamente, estos animales pueden usarse en estudios preliminares. El conejo es una elección pobre para estudios de absorción debido al tiempo de vaciado tan grande de su estómago, y la dificultad para obtener un estómago limpio por métodos convencionales de alimentación.

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

4. PARTE EXPERIMENTAL.

4.1. MATERIAL Y EQUIPO:

- Potenciómetro
- Espectrofotómetro DU68 Beckman
- Centrifuga
- 1 Termómetro
- 1 Vaso de pp de 2000 mL
- 2 Vasos de pp de 600 mL
- 30 Tubos de 13*100
- 1 Parrilla
- 3 Gradillas
- 2 Jeringas hipodérmicas de 30 mL
- 2 Llaves de 3 vías
- 1 Equipo de cirugía
- 2 Vasos de pp de 100 mL
- 3 Vasos de pp de 250 mL
- 1 Probeta graduada de 100 mL
- 1 Probeta graduada de 500 mL
- 2 Matraces volumétricos de 1000 mL
- 5 Matraces volumétricos de 50 mL
- 7 Matraces volumétricos de 25 mL
- 1 Cronómetro
- Sutura de seda
- 2 Catéteres de vidrio en forma de L
- 1 Probeta graduada de 10 mL
- 3 Micropipetas (5-50,50-200,200-1000 microlitros)
- Puntas para micropipetas
- 1 Celda de cuarzo para el espectrofotómetro.
- Papel fisiológico y papel limpia celdas.
- 2 Tablas como mesas de cirugía.

4.2. MATERIAS PRIMAS.

4.2.1. Estándares:

4. PARTE EXPERIMENTAL.

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

Estándar de acetaminofén, pureza 99.4%, proporcionado por la Sociedad Química Industrial.

4.2.2. REACTIVOS:

Cloruro de sodio. R.A.	J. T. Baker.
Cloruro de potasio. R.A.	Mallinckrodt.
Cloruro de calcio. R.A.	J. T. Baker.
Fosfato monobásico de potasio.	Mallinckrodt.
Sulfato de magnesio heptahidratado. R.A.	Productos químicos Monterrey.
Bicarbonato de sodio. R.A.	J.T. Baker.
Glucosa. R.A.	J. T. Baker.
Nitrato férrico cristales. R.A.	Merck.
Cloruro mercúrico. R.A.	J. T. Baker.
O-toluidina. R.A.	Merck.
Tiourea. R.A.	Merck.
Eter o cloroformo. R.A.	Mallinckrodt.
Etol. R.A.	Mallinckrodt.
Ácido clorhídrico. R.A.	Mallinckrodt.
Ácido acético glacial. R.A.	Mallinckrodt.

4.2.3. Animales de laboratorio.

60 Ratas Wistar Macho de 300-400 gramos.

4.3. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

4.3.1. Solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 6.0.

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

Tabla No. 1. Soluciones para la Solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=6.0.

SALES	CONC. (%)	CONC. (M)	PROPORCIONES (mL)
NaCl	0.90	0.154	100
KCl	1.15	0.154	4
CaCl ₂	1.22	0.110	3
KH ₂ PO ₄	2.11	0.154	1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.82	0.154	1
NaHCO ₃	1.3	0.154	21

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

-Adicionar 2g de glucosa por litro de solución.

-Ajustar el pH a 6.0 con HCl 0.1N.

4.3.2. Solución de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=6.0 (1 mg/mL).

Pesar 100 mg de glucosa, disolver y llevar con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=6.0 a 100 mL.

4.3.3. Solución de ácido acetil salicílico en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=6.0 (1 mg/mL).

Pesar 100 mg de AAS y llevar a 100 mL con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=6.0.

4.3.4. Solución de acetaminofén en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=6.0 (1 mg/mL).

Pesar 25 mg de acetaminofén, disolver y llevar a 25 mL con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=6.0.

4.3.5. Soluciones estándar.

4.3.5.1. Solución estándar de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=6.0 (1 mg/mL).

4. PARTE EXPERIMENTAL.

Pesar 25 mg de glucosa previamente desecada a 80-90° C durante dos horas cuando menos, disolver y llevar a 25 mL con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=6.0.

4.3.5.2. Solución estándar de ácido salicílico en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=6.0. (1 mg/mL).

Pesar 25 mg de AS, disolver y llevar a 25 mL con solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=6.0.

4.3.6. Reactivos para desarrollar color.

4.3.6.1. Reactivo de o-toluidina.^(6,11)

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

4.3.6.2. Reactivo de Trinder.⁽¹⁷⁾

Transferir 4 g de Cloruro mercuríco a un matraz volumétrico de 100 mL y adicionar 12 mL de HCl 0.1 N, disolver y adicionar 4 g de Nitrato férrico, agitar hasta disolución (calentar un poco), llevar a volumen con agua destilada y mezclar.

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

Con el propósito de implementar ésta técnica se consideró importante realizarla en las siguientes etapas:

a) Integridad del intestino.

Teniendo en cuenta que la glucosa atraviesa las membranas biológicas por medio del transporte activo, el cual involucra acarreadores proteínicos en el proceso, nos permite saber si el intestino ha sufrido algún daño durante el intervalo de tiempo que usamos en la cirugía.

b) Absorción de Ácido Acetil Salicílico.

En estudios anteriores⁽¹⁾, se trabajó la técnica del intestino en la absorción de Ácido Acetil Salicílico, con buenos resultados. Este estudio se compara con la técnica anterior.

c) Absorción de Acetaminofén.

Se sabe que el Acetaminofén casi no se absorbe⁽⁶⁾ en vía intestinal, lo que se comprobará con ésta técnica.

4.4. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DE LA GLUCOSA PARA DETERMINAR LA INTEGRIDAD FUNCIONAL DEL INTESTINO DE LA RATA EN LA TÉCNICA "IN SITU".

4.4.1. Método analítico.

El método analítico utilizado para la cuantificación de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=6.0 es el reportado por Huitman y Dubowsky. Modificado por Hyvärinen y Nikkilä.^(6,11)

En la tabla No.II se presenta la forma de preparar las diluciones del estándar de glucosa (preparada de acuerdo a la sección 4.3.4.1.), para la curva de calibración de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH=6.0.

TABLA No. II.
Preparación de la curva estándar para la determinación de glucosa por espectrofotometría ($\lambda = 630 \text{ nm}$).

DILUCIÓN	GLUCOSA (1mg/mL)	VOL.AFORO (mL)	CONC.GLUCOSA ($\mu\text{g/mL}$)
1	1.25	25	50
2	2.5	25	100
3	3.75	25	150
4	5.0	25	200
5	6.25	25	250

ANÁLISIS DE MUESTRAS.

Cuantificación de glucosa.

De las soluciones de la tabla No. II tomar 1 mL de cada una y colocarlas en un tubo de ensayo por separado. Adicionar a cada tubo 5 mL de reactivo de o-toluidina. (Preparado de acuerdo a la sección 4.3.5.1.). Tapar los tubos con tapones de plástico con rosca. Agitar en vórtex por 10 segundos. Colocar en baño maría a ebullición por 10 mín. cada una de las muestras contenidas en los tubos. Enfriar las muestras contenidas en los tubos en un baño

4. PARTE EXPERIMENTAL.

de agua fría. Determinar la absorbancia de cada una de las soluciones de la curva estándar a 630 nm, tomando como blanco una solución que contiene 1 mL de solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH=6.0) y 5 mL de solución reactivo de o-toluidina contenido en un tubo de ensayo.

4.4.2. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH=6.0).

4.4.2.1. Linealidad.

Se determinó la linealidad trabajando 3 curvas en un día en un intervalo de concentración de 50 - 250 µg/mL, de acuerdo a la Tabla II y se realizó el análisis de las muestras mencionadas en la parte anterior.

Se calculó el coeficiente de correlación, pendiente e intercepto para cada una de las curvas.

4.4.2.2. Repetibilidad (intra-días).

Se determinó la concentración obtenida entre mediciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, aparatos, tiempo y laboratorios), se prepararon tres curvas estándar de glucosa en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH=6.0) en el intervalo de 50-250 µg/mL en 2 diferentes días, se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada una de las concentraciones estudiadas.

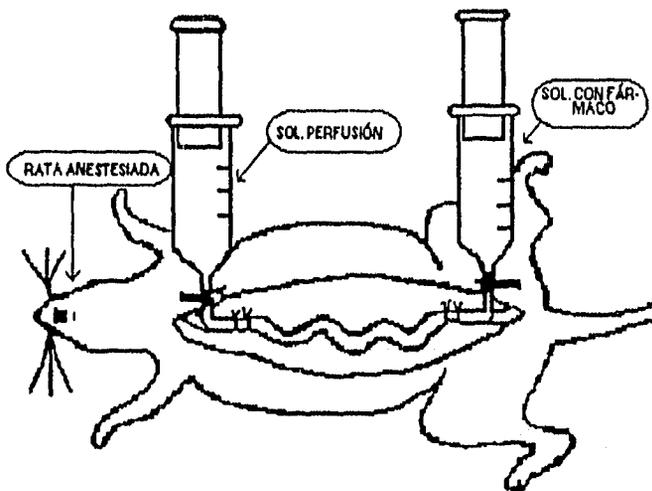
4.4.3. Técnica "in situ" en intestino de rata para la determinación de permeación de glucosa.

Se utilizaron ratas Wistar macho con un peso de 350 - 400 gramos, las cuales fueron mantenidas sin alimento con acceso libre al agua en forma de "ad libitum" las 24 horas previas al experimento. La rata se anestesió con éter etílico (se debe tener mucho cuidado en este punto ya que si no está bien sedado el animal puede llegar a levantarse, es por esto que se le amarran suavemente pero con firmeza sin cortar la circulación las cuatro extremidades y se sujetan a un clavo que está en la tabla de cirugía), se expuso el intestino haciendo una incisión abdominal y a través de dos pequeños cortes tanto del duodeno como de la porción final del mismo, se insertaron dos catéteres de plástico. (Se debe tener mucho cuidado con la

4. PARTE EXPERIMENTAL.

manipulación del intestino ya que debe ser muy suave y reducir al mínimo la cirugía con el objeto de mantener el suministro de sangre como si estuviera en condiciones normales).

Los catéteres se aseguraron ligándolos con sutura de seda y el intestino se devolvió a la cavidad abdominal para ayudar a mantener su integridad. En el esquema No. 4.1 se representa el método utilizado, en el cual se ha canulado todo el intestino delgado.

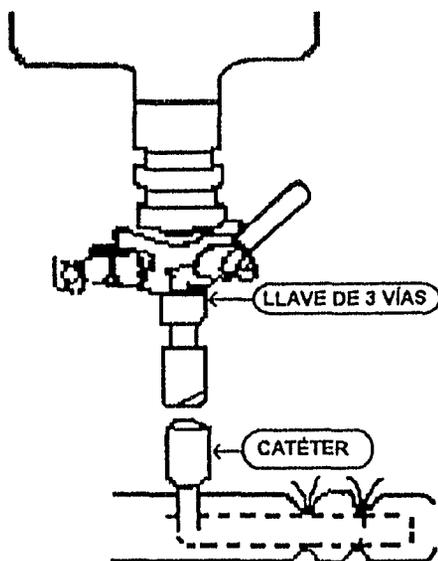


Esquema No. 4.1. Técnica de perfusión del intestino de rata.

Con el fin de limpiar el intestino, el fluido de perfusión se pasó a través de éste lentamente y se retiró por el catéter del ileon; esto se realizó hasta que la solución salió clara. La solución de perfusión se mantuvo a una temperatura de 37 °C.

4. PARTE EXPERIMENTAL.

La solución de perfusión remanente, se retiró del intestino metiendo un poco de aire con la jeringa cuidadosamente e inmediatamente después se introdujeron 10 mL de solución de glucosa con una concentración de $200\mu\text{g}/\text{mL}$.



Esquema No. 4.2. Cateterización y posición de la llave de 3 vías utilizada en el experimento de perfusión del intestino.

Para asegurarse de la uniformidad en la concentración del fármaco a través del segmento de intestino, las alícuotas se obtuvieron de las dos jeringas alternativamente.

De cada muestreo, se obtuvo el máximo volumen posible sin dañar las paredes del intestino (esto es, cuidando que los catéteres no se taponen, ya que el tapón lo forma el tejido de la pared intestinal). El muestreo se realizó a los siguientes tiempos: 1, 5, 10, 15, 20, 30 y 45 minutos. Después de cada tiempo, las muestras se centrifugaron por un lapso de 10 minutos para obtener una solución transparente, sin restos de tejido ó sangre (de éstas se tomó 1.0 mL para el análisis posterior correspondiente). En el interior del intestino, se restituyó con un volumen de 3 mL con solución de perfusión ($200\mu\text{g}/\text{mL}$). De la muestra centrifugada, se tomó 1.0 mL y se le adicionó 5 mL de reactivo de o-toluidina, se taparon los tubos con tapones de plástico con rosca, se agitaron en vórtex por 10 segundos, se colocaron en baño maría a ebullición por 10 minutos, se enfriaron en un baño de agua fría y por último se determinó su absorbancia a 630 nm, utilizando como blanco la muestra de solución Krebs-Ringer (pH= 6.0) sin glucosa.

4. PARTE EXPERIMENTAL.

Se efectuó una curva de calibración de glucosa (de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 4.4.1.), en solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH= 6.0), con reactivo de o-toluidina, y se determinaron las concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) de glucosa que se absorbió por interpolación de cada una de las muestras obtenidas a cada tiempo.

NOTA:

Al preparar la solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH=6.0) no se adicionó glucosa, ya que por medio de ésta se valoró la integridad del intestino.

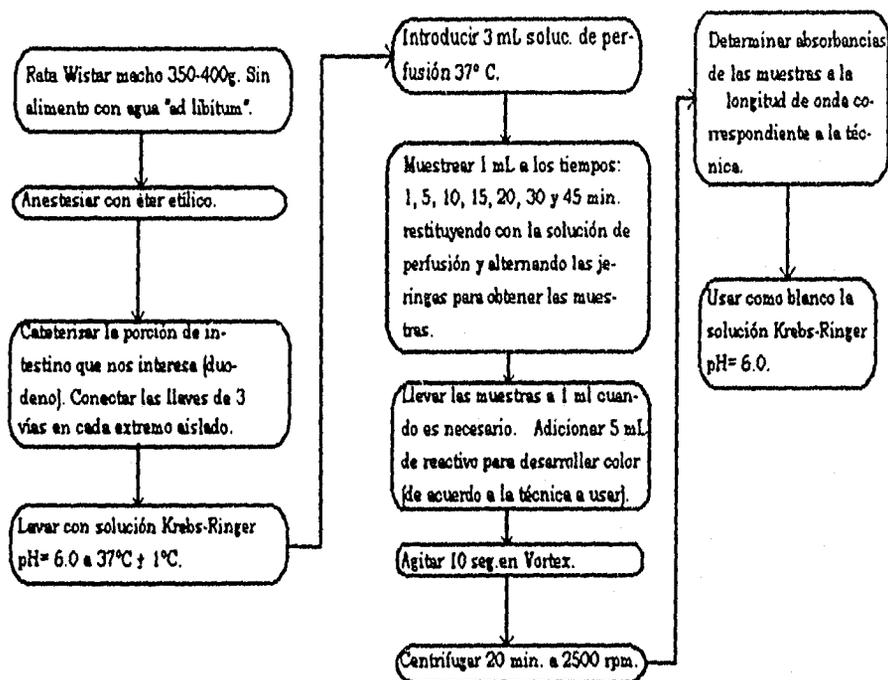


Diagrama 1. Procedimiento experimental para la prueba de permeación de glucosa.

4.5. ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN DEL ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO EN INTESTINO DE RATA *IN SITU*.

4.5.1. Método analítico.

El método analítico utilizado para la cuantificación de salicilatos en solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH 6.0), es el reportado por Trinder. (19)

En la Tabla No. III se presenta la forma de preparar las diluciones de la solución estándar de Ácido Salicílico, para la curva de calibración en solución amortiguadora de Krebs - Ringer pH = 6.0.

Tabla No. III. Preparación de la curva estándar para la determinación de Ácido Acetil Salicílico ($\lambda = 540$ nm).

DILUCIÓN	ÁCIDO SALICÍLICO (1 mg/mL)	VOL. KREBS- RINGER (mL)	CONC. ÁCIDO SALICÍLICO ($\mu\text{g/mL}$)
1	0.025	25	1
2	0.075	25	3
3	0.125	25	5
4	0.25	25	10
5	0.5	25	20
6	0.75	25	30

ANÁLISIS DE MUESTRAS.

Cuantificación de salicilatos.

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

4. PARTE EXPERIMENTAL.

Adicionar a cada tubo 5 mL de solución reactivo de Trinder, (preparado de acuerdo al procedimiento de la sección 4.3.5.2.), agitar en vórtex por 10 segundos.

Determinar la absorbancia de cada una de las soluciones de la curva estándar a 540 nm, tomando como blanco una solución que contiene 1 mL de solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH= 6.0), y 5 mL de solución reactivo de Trinder contenido en un tubo de ensayo.

4.5.2. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de salicilatos en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 6.0).

4.5.2.1. Linearidad.

Se prepararon en un día tres curvas estándar en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 6.0) según la Tabla III, en 2 diferentes días en un intervalo de 1 a 30 $\mu\text{g/mL}$, se calculó el coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto para cada una de ellas.

4.5.2.2. Repetibilidad.

Se determinó la concentración obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, aparatos, tiempo y laboratorios), se prepararon el mismo día tres curvas estándar de ácido salicílico en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 6.0) en el intervalo de 1 a 30 $\mu\text{g/mL}$, se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada una de las concentraciones estudiadas. El experimento se repitió por 2 días.

4.5.3. TÉCNICA "IN SITU" EN INTESTINO DE RATA.

Se procedió como se indica en la sección 4.4.3. en lo que se refiere a las condiciones de los animales previas a la cirugía así como al método usado para su sedación.

Se hizo la incisión abdominal, se expuso el intestino del animal, se localizó la porción a utilizar y se hicieron las incisiones correspondientes para poder insertar los catéteres.

Los catéteres se aseguraron ligándolos con sutura de seda y el intestino se devolvió a la cavidad abdominal para ayudar a mantener su integridad.

4. PARTE EXPERIMENTAL.

Como medio para limpiar el intestino, el fluido de perfusión se pasó a través de éste lentamente alternando las jeringas para extraer e introducir la solución; esto se realizó hasta que ésta salió clara. La solución de perfusión debe mantenerse a una temperatura de 37° C.

La solución de perfusión remanente, se retiró del intestino metiendo aire con la jeringa cuidadosamente e inmediatamente después se introdujeron 10 mL de solución con el fármaco.

Para asegurarse de la uniformidad en la concentración del fármaco a través del segmento de intestino, las alícuotas se obtienen de las dos jeringas alternativamente.

De cada muestreo, se obtuvo el máximo volumen posible sin dañar las paredes del intestino (esto es, cuidando que los catéteres no se taponen, ya que el tapón lo forma el tejido de la pared intestinal). El muestreo se realizó a los siguientes tiempos: 1, 5, 10, 15, 20, 30 y 45 minutos. Después de cada tiempo, las muestras se centrifugaron a 2500 rpm por un lapso de 10 minutos para obtener una solución transparente, sin restos de tejido ó sangre (de éstas se tomó 1.0 mL para el análisis posterior correspondiente). En el interior del intestino, se restituyó con un volumen de 3 mL con solución de perfusión (30 µg/mL). De la muestra centrifugada, se tomó 1.0 mL y se le adicionó 5 mL de reactivo de Trinder, se agitaron en vórtex por 10 segundos, se determinó su absorbancia a 540 nm, utilizando como blanco 1 mL de solución Krebs-Ringer (pH= 6.0) con 5 mL de reactivo de Trinder.

Se realizó una curva de calibración estándar de ácido salicílico (de acuerdo al procedimiento de la sección 4.5.1.), en solución de Krebs-Ringer pH = 6.0, y se determinaron las concentraciones de fármaco que se absorbió en µg/mL por interpolación de cada una de las muestras obtenidas a cada tiempo.

4.6. ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN DEL ACETAMINOFÉN EN INTESTINO DE RATA *IN SITU*.

4.6.1. Método analítico.

El método analítico utilizado para la cuantificación de acetaminofén en solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH 6.0), se implementó de acuerdo con las características del fármaco según Florey ⁽⁶⁾.

En la Tabla No. IV se presenta la forma de preparar las diluciones de la solución estándar de Acetaminofén, para la curva de calibración en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH = 6.0.

Tabla No. IV. Preparación de la curva estándar para la determinación de Acetaminofén ($\lambda = 241 \text{ nm}$).

DILUCIÓN	ACETAMINOFÉN (1 mg/mL)	VOL. KREBS- RINGER (mL)	CONC. ACETAMINOFÉN ($\mu\text{g/mL}$)
1	0.025	25	1
2	0.075	25	3
3	0.125	25	5
4	0.25	25	10
5	0.5	25	20
6	0.75	25	30

ANÁLISIS DE MUESTRAS.

Cada una de las muestras se leyeron a 241 nm utilizando como blanco solución de Krebs-Ringer pH = 6.0.

4.6.2. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de acetaminofén en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 6.0).

4.6.2.1. Linearidad.

Se prepararon en un día tres curvas estándar en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 6.0) en diferentes días en un intervalo de 1 a 30 $\mu\text{g/mL}$, se calculó el coeficiente de correlación, la pendiente y el intercepto para cada una de ellas.

4.6.2.2. Repetibilidad.

4. PARTE EXPERIMENTAL.

Se determinó la concentración obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, aparatos, tiempo y laboratorios), se prepararon el mismo día tres curvas estándar de acetaminofén en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH 6.0) en el intervalo de 1 a 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. en 2 días diferentes, se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada una de las concentraciones estudiadas.

4.6.3. TÉCNICA "IN SITU" EN INTESTINO DE RATA.

Se procedió como se indica en la sección 4.4.3. en lo que se refiere a las condiciones de los animales previas a la cirugía así como al método usado para su sedación.

Se hizo la incisión abdominal, se expuso el intestino del animal, se localizó la porción a utilizar y se hicieron las incisiones correspondientes para poder insertar los catéteres.

Los catéteres se aseguraron ligándolos con sutura de seda y el intestino se devolvió a la cavidad abdominal para ayudar a mantener su integridad.

Como medio para limpiar el intestino, el fluido de perfusión se pasó a través de éste lentamente con las jeringas alternando una y otra para introducir y extraer la solución, esto se realizó hasta que ésta salió clara. La solución de perfusión debe mantenerse a una temperatura de 37 °C.

La solución de perfusión remanente, se retiró del intestino metiendo un poco de aire con la jeringa cuidadosamente e inmediatamente después se introducen 10 mL de solución con el fármaco.

Para asegurarse de la uniformidad en la concentración del fármaco a través del segmento de intestino, las alicuotas se obtuvieron de las dos jeringas alternativamente.

De cada muestreo, se obtuvo el máximo volumen posible sin dañar las paredes del intestino (esto es, cuidando que los catéteres no se taponen, ya que el tapón lo forma el tejido de la pared intestinal). El muestreo se realizó a los siguientes tiempos: 1, 5, 10, 15, 20, 30 y 45 minutos. Después de cada tiempo, las muestras se centrifugaron a 2500 rpm por un lapso de 10 minutos para obtener una solución transparente, sin restos de tejido ó sangre (de éstas se tomó 1.0 mL para el análisis posterior correspondiente). En el interior del intestino, se

4. PARTE EXPERIMENTAL.

restituyó con un volumen de 3 mL con solución de perfusión (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). De la muestra centrifugada, se tomó 1.0 mL y se determinó su absorbancia a 241 nm, utilizando como blanco 1 mL de solución Krebs-Ringer ($\text{pH} = 6.0$).

Se preparó una curva de calibración estándar de acetaminofén (de acuerdo al procedimiento de la sección 4.6.1.), y se determinaron las concentraciones de fármaco que se absorbió en $\mu\text{g}/\text{mL}$ por interpolación de cada una de las muestras obtenidas a cada tiempo.

La cantidad absorbida se calculó por diferencia de concentraciones, esto es; la concentración de la solución de perfusión que se introdujo al intestino fué de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, de ésta se tomaron las muestras a los tiempos correspondientes; por lo tanto, cuantificamos la cantidad remanente en el intestino y por diferencia de concentraciones obtenemos la cantidad que se absorbió del fármaco.

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

5.1. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DE LA GLUCOSA PARA DETERMINAR LA INTEGRIDAD FUNCIONAL DEL INTESTINO POR MEDIO DE LA TÉCNICA *IN SITU*.

5.1.1. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer (pH 6.0).

5.1.1.1. Linearidad.

En la Tabla No. V se presentan los resultados de absorción obtenidos al analizar las tres curvas estándar de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 6.0 así como el coeficiente de correlación, la pendiente, el intercepto de cada una de éstas y el coeficiente de variación a cada una de las concentraciones. En la Fig. No. 5.1 se presenta la gráfica en la que se observa la linearidad del método en el intervalo de 50 a 250 $\mu\text{g/mL}$ coeficiente de correlación de 0.999.

Tabla No. V. Linearidad del método analítico.
Cuantificación de glucosa.

DÍA 1.

$\mu\text{g/mL}$	CURVA 1	CURVA 2	CURVA 3	PROMEDIO
0	0	0	0	0
50	0.094	0.087	0.092	0.091
100	0.165	0.159	0.176	0.166
150	0.242	0.238	0.253	0.244
200	0.329	0.316	0.343	0.329
250	0.385	0.380	0.400	0.388
r =	0.9998	0.9994	0.9997	0.9996
b =	0.0192	0.0131	0.0179	0.0167
m =	1.49×10^{-3}	1.48×10^{-3}	1.56×10^{-3}	1.51×10^{-3}

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

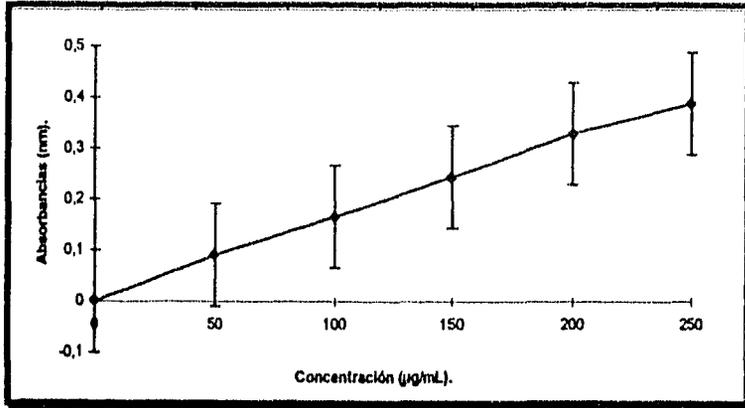


FIGURA 5.1 Linearidad del método analítico. Cuantificación de glucosa.

5.1.1.2. Repetibilidad.

En la Tabla No.VI se presentan los resultados de las tres curvas estándar de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 6.0.

**Tabla No. VI. Repetibilidad del método analítico.
Cuantificación de glucosa.**

DÍA 2.						
µg/mL	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Prom.	Std. Dev.	C.V. (%)
0	0	0	0	0	0	0
50	0.013	0.016	0.014	0.0143	1.53×10^{-3}	10.7
100	0.024	0.025	0.026	0.025	1×10^{-3}	4.0
150	0.039	0.04	0.038	0.039	1×10^{-3}	2.5
200	0.049	0.051	0.048	0.049	1.5×10^{-3}	3.0
250	0.068	0.07	0.068	0.068	1.15×10^{-3}	1.7
r =	0.997	0.993	0.995	0.995		
b =	-9×10^{-4}	2×10^{-4}	-9.5×10^{-5}	-9.5×10^{-5}		
m =	2.65×10^{-4}	1.48×10^{-3}	2.6×10^{-4}	6.68×10^{-4}		

5.1.2. Técnica *In Situ* en intestino de rata.

En la figura 5.2 se muestra la absorción de la glucosa en el intestino perfundido.

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

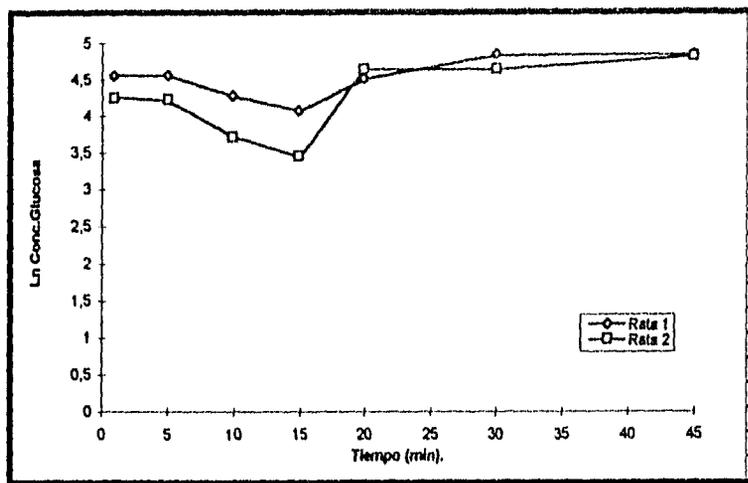


Fig. 5.2. Gráfica Ln Conc. Glucosa vs Tiempo (2 ratas).

Características físicas que presentó el intestino en los diferentes tiempos:

- Coloración rosada en los primeros 25 minutos, vasos sanguíneos cercanos sin sobresaltarse, tejido cercano con buena oxigenación y por consiguiente buena coloración.
- Coloración roja después de los 25 minutos, vasos sanguíneos comienzan a abultarse, tejidos cercanos empiezan a tomar coloración más clara por la falta de irrigación sanguínea.
- Coloración amoratada a los 45 minutos indicando necrosis, venas sobresaltadas totalmente, tejidos cercanos muy pálidos.

Durante el tiempo de muestreo se observó, que el intestino se mantuvo íntegro funcionalmente durante aproximadamente 45 - 50 minutos desde el momento de su presentación fuera del animal hasta su muestreo. Se tomó como mínimo 15 minutos de preparación del intestino (cateterización), observándose que el intestino es viable (aproximadamente 20 minutos), después de ese tiempo la coloración rosada se tornó rojiza y los vasos sanguíneos se sobresaltaron.

La absorción de glucosa se observa en la fig 5.2 y se aprecia claramente cómo decrece hasta los 20 minutos, como se esperaba, pero a los 25 minutos la absorción se vuelve lenta y en menor concentración.

5.2. ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN DEL ÁCIDO ACETIL SALICÍLICO EN INTESTINO DE RATA (*IN SITU*).

5.2.1. Validación del método Espectrofotométrico para la cuantificación de salicilatos en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH=6.0).

5.2.1.1. Linealidad.

En la Tabla No. VII se puede observar los coeficientes de correlación de las tres curvas estándar en el intervalo de 1 a 30 $\mu\text{g/ml}$, pendiente e intercepto.

Tabla No. VII. Linealidad del método analítico.
Cuantificación de Salicilatos.

DÍA 1.

$\mu\text{g/ml}$	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio
0	0	0	0	0
1	0.002	0.0018	0.002	0.0019
3	0.006	0.005	0.006	0.0056
5	0.011	0.009	0.012	0.011
10	0.02	0.018	0.019	0.019
20	0.039	0.038	0.039	0.038
30	0.058	0.057	0.059	0.058
r =	0.9999	0.9999	0.9999	0.9999
b =	5.3×10^{-4}	-1.7×10^{-3}	7.2×10^{-4}	-1.5×10^{-4}
m =	1.94×10^{-3}	1.97×10^{-3}	1.95×10^{-3}	1.95×10^{-3}

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

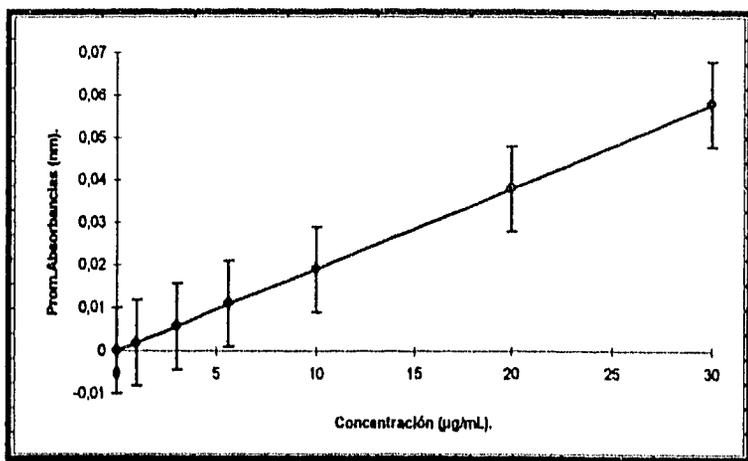


Figura 5.3. Linearidad del método analítico. Cuantificación de salicilatos.

5.2.1.2. Repetibilidad.

En la Tabla No. VIII se muestran los resultados del Día 2, de 3 curvas a una concentración de 1 a 30 µg/mL, con su coeficiente de variación para cada una de las concentraciones.

Tabla No. VIII. Repetibilidad del método analítico.
Cuantificación de Salicilatos.

DÍA 2.

µg/mL	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Prom.	Std.Dev.	C.V.(%)
0	0	0	0	0	0	0
1	0.001	0.0009	0.001	0.0009	5.7×10^{-5}	5.9
3	0.005	0.0048	0.005	0.0049	1.1×10^{-4}	2.3
5	0.01	0.009	0.009	0.0093	5.7×10^{-4}	6.2
10	0.019	0.018	0.019	0.0183	1.1×10^{-3}	6.3
20	0.039	0.038	0.039	0.0386	5.7×10^{-4}	1.5
30	0.06	0.058	0.06	0.059	1.7×10^{-3}	2.9
r =	0.9998	0.9999	0.9999	0.9998		
b =	-8.8×10^{-4}	-1.1×10^{-3}	-1.2×10^{-3}	-1.6×10^{-3}		
m =	2×10^{-3}	1.9×10^{-3}	2.0×10^{-3}	1.9×10^{-3}		

5.2.2. Técnica *In Situ* en intestino de rata de la absorción de Ácido Acetil Salicílico.

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

El intestino presenta las mismas características descritas en la sección 5.1.2 a los diferentes tiempos de muestreo.

En la fig. 5.4 se observan los resultados de la permeación del Ácido Acetil Salicílico a través de la membrana intestinal.

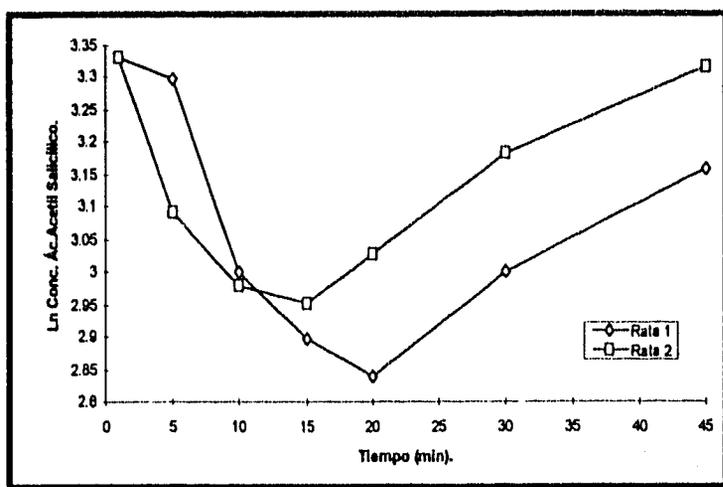


Fig. 5.4. Gráfica Ln Conc. Ácido Acetil Salicílico vs Tiempo.

5.3. ESTUDIO DE LA ABSORCIÓN DEL ACETAMINOFÉN EN INTESTINO DE RATA (*IN SITU*).

5.3.1. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de acetaminofén en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH= 6.0).

5.3.1.1. Linealidad.

En la Tabla No.IX se presentan los resultados de 3 curvas en el Día 1 con su coeficiente de correlación, pendiente e intercepto.

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Tabla No. IX. Linealidad del método analítico.
Cuantificación de Acetaminofén.

µg/mL	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio
0	0	0	0	0
1	0.069	0.065	0.06	0.0646
3	0.194	0.197	0.192	0.1943
5	0.325	0.316	0.325	0.322
10	0.636	0.645	0.643	0.641
20	1.286	1.279	1.285	1.283
30	1.93	1.943	1.935	1.936
r =	0.99998	0.99995	0.99999	0.99997
b =	1.5×10^{-3}	-2×10^{-3}	-1.2×10^{-3}	-5.6×10^{-4}
m =	0.0642	0.0645	0.0645	0.0644

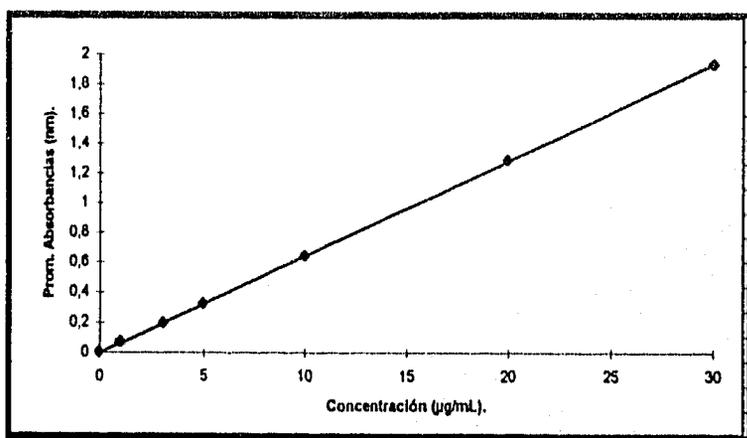


Fig. 5.5. Linealidad del método analítico. Cuantificación de Acetaminofén.

5.3.1.2. Repetibilidad.

En la Tabla No.X se muestran los resultados del Día 2 con sus coeficientes de variación para cada concentración.

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Tabla No. X. Repetibilidad del método analítico.
Cuantificación de Acetaminofén.

DÍA 2.

µg/mL	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Prom.	Std.Dev.	C.V.(%)
0	0	0	0	0	0	0
1	0.043	0.037	0.035	0.0383	4.2×10^{-3}	10.8
3	0.166	0.174	0.162	0.1673	6.1×10^{-3}	3.6
5	0.315	0.325	0.286	0.3086	0.0202	6.5
10	0.563	0.619	0.581	0.5876	0.0285	4.8
20	1.22	1.303	1.192	1.238	0.0577	4.6
30	1.938	1.99	1.702	1.876	0.1534	8.1
r =	0.9989	0.9998	0.9993	0.9993		
b =	-0.0358	-0.0292	-6.2×10^{-3}	-0.0237		
m =	0.0646	-0.0292	0.0579	0.0311		

5.3.2. Técnica *In Situ* en intestino de rata.

En la Figura 5.6. se muestra la concentración de Acetaminofén absorbida vs tiempo en 2 ratas trabajadas en diferentes días.

Las características del intestino fueron las mismas señaladas en la sección 5.1.2.

5. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

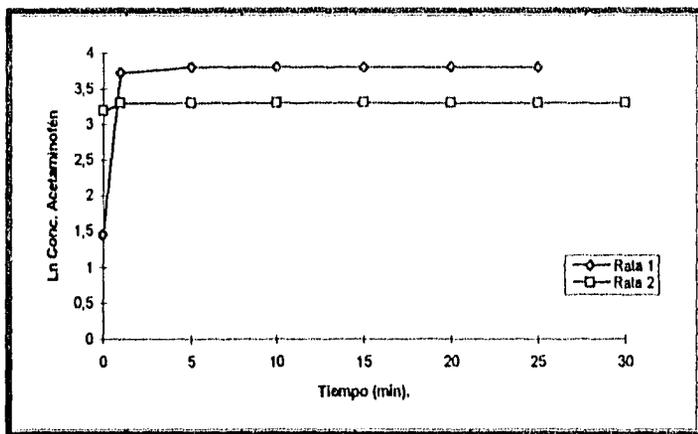


Figura 5.6. Gráfica de Ln Conc. Acetaminofén vs Tiempo.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

6.1. ESTUDIO DE PERMEACIÓN DE LA GLUCOSA PARA DETERMINAR LA INTEGRIDAD FUNCIONAL DEL INTESTINO DE RATA POR MEDIO DE LA TÉCNICA *IN SITU*.

6.1.1. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de glucosa en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH=6.0).

6.1.1.1. Linearidad.

En la Tabla No. V se observa que el método cumple con los lineamientos de linealidad con un coeficiente de correlación de 0.999 y una pendiente cercana a cero.

6.1.1.2. Repetibilidad.

En la Tabla No. VI se presentan los resultados de repetibilidad al analizar las tres curvas patrón de glucosa en solución amortiguadora de Krebs-Ringer pH= 6.0, en donde se observa que el coeficiente de variación más alto fue de 10.7 % a la concentración más baja. En los demás casos, osciló entre 1.7 y 4 %.

6.1.2. Técnica *In Situ* en intestino de rata.

Teniendo en cuenta que la glucosa atraviesa las membranas biológicas por medio del transporte activo, el cual involucra acarreadores proteínicos en el proceso, su determinación permite establecer si el intestino ha sufrido algún daño durante el intervalo de tiempo utilizado en la cirugía (2).

Durante el tiempo de muestreo se observó, que el intestino se mantuvo íntegro durante aproximadamente 20 minutos después de ser cateterizado, ya que es visible su color rosado, después de ese tiempo se empiezan a apreciar zonas de necrosis en el tejido, lo que se puede confirmar con el paso de glucosa a través del intestino en la Fig. No. 5.2.

6.2. Estudio de la absorción del ácido acetil salicílico en intestino de rata (*in situ*).

6.2.1. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de salicilatos en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH= 6.0).

6.2.1.1. Linealidad.

En la Tabla No. VII se puede observar que los coeficientes de correlación de las tres curvas estándar en el intervalo de 1 a 30 $\mu\text{g/mL}$ son de 0.9999 por lo que el método cumple con el criterio de linealidad en el intervalo de concentraciones estudiadas, presentando una pendiente de 1.95×10^{-3} y un intercepto promedio de -1.5×10^{-4} .

6.2.1.2. Repetibilidad.

En la Tabla No. VIII se puede observar que el coeficiente de variación más alto fue de 6.3 % para la concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$, por lo que el método se consideró repetible en el intervalo de concentraciones estudiadas, además se toma en consideración que cae dentro del intervalo permitido para un estudio en fluido biológico, el cual debe ser menor del 15%.⁽²⁶⁾

6.2.2. Técnica *In Situ* en intestino de rata.

Los resultados mostraron que el Ácido Acetil Salicílico sí se absorbe en el intestino durante los primeros 20 minutos, y conforme pasa ese tiempo se absorbe en menor cantidad.

Según la Fig. No. 5.3 se puede observar que muestra en los primeros 15 minutos una cinética de 1^{er} orden.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Comparando ésta técnica con la de intestino invertido, se observa que el tiempo de viabilidad en la técnica *In Situ* es menor que el reportado en la referencia 1 en la que se encontró que con la técnica de intestino invertido éste permanece viable durante 60 minutos.

6.3. Estudio de la absorción del acetaminofén en intestino de rata (*in situ*).

6.3.1. Validación del método analítico por Espectrofotometría para la cuantificación de acetaminofén en solución amortiguadora Krebs-Ringer (pH= 6.0).

6.3.1.1. Linealidad.

En la Tabla No. IX se puede observar que los coeficientes de correlación de las tres curvas estándar en el intervalo de 1 a 30 $\mu\text{g/mL}$ son de 0.9999 por lo que el método cumple con el criterio de linealidad en el intervalo de concentraciones estudiadas, presentando una pendiente de 0.0644 y un intercepto promedio de -5.6×10^{-4} .

6.3.1.2. Repetibilidad.

En la Tabla No. X se puede observar que el coeficiente de variación más alto fue de 10.8 % para la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$, por lo que el método se consideró repetible en el intervalo de concentraciones estudiadas, considerando que cae dentro del rango permitido para un estudio en fluido biológico, el cual debe ser menor del 15%.⁽²⁶⁾

6.3.2. Técnica *In Situ* en intestino de rata.

A partir de los resultados experimentales, se pudo establecer que la absorción de este fármaco no fué detectable por medio de la técnica utilizada ya que la concentración del mismo se mantuvo constante durante el tiempo de muestreo. Es importante mencionar de que en la bibliografía⁽⁶⁾ se reporta que el 40 % de una dosis oral se absorbe a lo largo de todo el intestino y el 60 % lo hace en el estómago.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Para poder contar con un mayor tiempo de muestro, se sugiere disminuir el tiempo en el montaje de la técnica, (incisiones en el intestino, limpieza e inserción del catéter para muestrear).

La técnica experimental desarrollada resultó ser más sencilla que la de intestino invertido, los aparatos se encuentran disponibles fácilmente en cualquier laboratorio y la variabilidad entre rata y rata es mínima.

7. CONCLUSIONES.

7. CONCLUSIONES.

Los métodos analíticos utilizados en el desarrollo de este trabajo, fueron validados de acuerdo con las especificaciones reportadas en la literatura, obteniéndose buenos resultados en los parámetros medidos.

Se montó la técnica *In Situ* para determinar la absorción intestinal de fármacos, empleando para ello intestino de rata. Se observó que el intestino es viable durante los primeros 40 minutos manteniendo a la rata en condiciones de sedación normal.

Con la técnica de glucosa se observó que la integridad del intestino fue adecuada durante los 20 minutos del montaje de la técnica y 20 minutos de muestreo.

Al comparar los resultados del Ácido acetil salicílico, se observó que la cinética de absorción es similar a la obtenida con la técnica de intestino invertido, por lo que es factible utilizar ambos métodos para evaluar su absorción.

En el caso del Acetaminofén, dada su lenta absorción, la técnica presentó la limitación del tiempo de viabilidad del mismo, por lo que para este tipo de fármacos sería recomendable utilizar la técnica del intestino invertido.

Considerando que los estudios de absorción de fármacos son de gran importancia en el área de la biofarmacia, ya que con ellas se puede establecer el sitio, cinética y mecanismo de absorción de fármacos nuevos así como evaluar la influencia de los excipientes en la absorción de fármacos ya conocidos, el implementar este tipo de técnicas apoyará las investigaciones a realizar en ésta área.

8. BIBLIOGRAFÍA.

8. BIBLIOGRAFÍA.

1.-Aguilar Ma. del Socorro. Estudio de la influencia de polietilenglicoles sobre la absorción del ácido acetil salicílico en intestino invertido de rata. México. 1994. Págs.45-46, 51-52.

2.-B.N. LaDu, M.D., Ph.D.; H.G. Mandel, Ph.D.; E.L. Way, Ph.D. Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposition. Drug Absorption. Chapter 2. The Williams & Wilkins Company. U.S.A. Baltimore. 1971. Págs.22-25.

3.-Clarke E.G.C. Isolation and Identification of Drugs. The Pharmaceutical Press. London. 1969. Págs.465-466.

4.-Doluisio, J.T., Billups, N.F., Dittert, L.W., Sugita, E.T.; Drug Absorption I: An In Situ Rat Gut Technique Yielding Realistic Absorption Rates. Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 58. No.10. October 1969. Pages:1196-1200.

5.-Dubowsky, K.M.; An o-toluidine method for body-fluid glucose determination. Clin. Chem.; 1962; 8: Págs. 215-235.

6.-Florey Klaus; Analytical Profiles of Drug Substances V.8. Academic Press. New York. U.S.A. 1979. Págs.1 - 46.

7.-Florey Klaus; Analytical Profiles of Drug Substances V. 14 Academic Press. New York. U.S.A. 1979. Págs. 551-596.

8.-Gibaldi, M., Grundhofer, B. Drug Transport IV: Functional Integrity of the Rat Everted Small Intestine with Respect to Passive Transfer. Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol. 61. No. 1. January 1972. Pages:116-119.

9.-Handbook of Pharmaceutical Excipients. *The Pharmaceutical Society of Great Britain*; Published by *American Pharmaceutical Association*; Washington D.C. Pags.209-213.

10.-Hebert A. Lieberman; Leon Lachman. Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets. Vol. 1. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel. U.S.A. 1980. Pags.24-26, 66-67, 88-91, 113-161, 129-135.

11.-Hebert A. Lieberman; Leo Lachman. Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets. Vol.2. Marcel Dekker, Inc. New York & Basel. U.S.A. 1981. Págs.294-297, 332-335, 338-340, 362-365, 428-439.

12.-Hsiao-Hwa Lu, Thomas J. Fleisher D.; Influence of D-Glucose-Induced Water Absorption on Rat Jejunal Uptake of Two Passively Absorbed Drugs. Journal of Pharmaceutical Sciences. Vol.81. No.1. January 1992. Págs. 21-25.

8. BIBLIOGRAFIA.

13.-Hyvärinen, A.; E.A. Nikkila. Specific determination of blood glucose with o-toluidine. *Clin. Chem Acta.*; 1962; 7: Págs: 140-143.

14-James Swarbrick; Ph. D. Current Concepts in the Pharmaceutical Sciences Biopharmaceutics. Gastrointestinal Absorption. De. Lea & Febiger. Philadelphia. 1970. Págs. 80-85.

15-James T.Doluisio;Norman F.Billups;Lewis W.Dittert;Edwin T.Sugita & Joseph V.Swintosky. Drug Absorption I:An In Situ Rat Gut Technique Yielding Realistic Absorption Rates. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol.58. No.10. October 1969. Págs.1197-1200.

16-L.A.Underhill;et al. Alternatives to Animal Testing in the USP-NF Resent and Future.; *Drug Development & Industrial Pharmacy*. Marcel Dekker,Inc. 20(2),1994. Págs.165-216.

17-Leon Lachman; Hebert A. Lieberman; Joseph L. Kaning. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. Third edition. Lea and Febiger. Philadelphia U.S.A. 1986. Págs. 27, 67-71, 183-184, 315-317, 328.

18-Michael Meyerson; Milo Gibaldi. Drug Transport III: Influence of Various Sugars on Passive Transfer of Several Drug Across the Everted Small Intestine. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 60.No. 2. February 1971. Págs. 225-230.

19-P.Trinder. Rapid Determination of Salicylate in Biological Fluids. *Biochem. J.* Vol.57, 1954. Págs. 301-303.

20Remington's Pharmaceutical Sciences. 17th edition. Mack Publishing Company. Easton, Pennsylvania.19858. Págs. 1522-1523, 1252-1253.

21Robert K. Crane, T. Hastings Wilson. In Vitro for the Study of the Rate of Intestinal Absorption of Sugars. *J. Appl. Physiol.* Vol. 12; 1958. Págs: 145-146.

22-Schurgers N.,Bijndendik J.,Tukker J.J.,Crommelin D.J.A.;Comparison of Four Experimental Techniques for Studying Drug Absorption Kinetics in the Anesthetized Rat In Situ.*Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol.75. No.2. February 1986. Págs.117-119.

23-Stanley A. Kaplan;Margaret L.Jack.Principles and Perspectives in Drug Bioavailability.Chapter 6.In Vitro,In Situ and In Vivo Models in Bioavailability Assessment.Karger and Basel.1979.Págs.156-191.

8. BIBLIOGRAFÍA.

24-Stanley A. Kaplan; Stanley Cotler. Use of Canulated Everted Intestinal Sac of Serial Sampling as Drug Absorbability (Permeability Screen). *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 61. No. 9. September 1972. Págs. 1361-1365.

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

26-The Pharmaceutical Codex. 11(th.) Edition. Pharmaceutical Press. London. 1979. Pág. 638.

27-Trad.QFB Ma.del Rosario Carsolio Pacheco.Guía Profesional de Medicamentos. El Manual Moderno. 3a.Edic. México.1989. Pág.159.

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

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

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA