



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“Determinación del coeficiente de permeabilidad
aparente de la línea celular Caco-2 a derivados del ácido
2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-5-ilcarboxílico”

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARLENE MEDINA LOPEZ



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

MEXICO, D. F.

2005

m. 346265



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

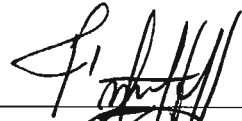
Jurado asignado:

Presidente	Profa. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado
Vocal	Prof. Francisco Hernández Luis
Secretario	Profa. Ma. de Lourdes Mayet Cruz
1er. suplente	Prof. Julio César Rivera Leyva
2o. Suplente	Prof. Martín Rueda Espinosa

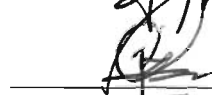
El presente trabajo se llevo a cabo en:

Laboratorio 122 del conjunto E, Facultad de Química, UNAM y en la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Bajo la dirección de: Dr. Francisco Hernández Luis



SUPERVISOR TÉCNICO Q.F.B. Julio César Rivera Leyva



Sustentante: Marlene Medina López



AGRADECIMIENTOS

- ★ *A Dios, por permitirme vivir un día más para poder alcanzar mis metas, objetivos y sueños; por su infinito amor y porque nunca me ha dejado sola.*
- ★ *A mi familia que siempre me ha apoyado tanto en los momentos felices como el los más amargos de mi vida.*
- ★ *Al amor de mi vida, que en él encontré la parte complementaria de mi existencia para poder ser completamente feliz.*
- ★ *A mis amigos, con los cuales compartí experiencias que me enriquecieron como persona.*
- ★ *A mi segunda casa materna, la UNAM, por brindarme la oportunidad de realizar una carrera universitaria y darme las herramientas necesarias para enfrentarme al mundo laboral.*
- ★ *A la Facultad de Química, por darme los elementos necesarios para tener una formación profesional de excelencia.*
- ★ *A todos mis profesores, por compartir sus conocimientos.*
- ★ *Al Dr. Francisco Hernández Luis, por su apoyo y oportuna asesoría para la realización de este trabajo de tesis.*
- ★ *A la Dra. Lilián Yépez Mulia y a Julio César Rivera Leyva, por su paciencia, apoyo incondicional y por brindarme todo lo necesario para llevar a cabo esta tesis.*
- ★ *Al apoyo financiero proporcionado por el proyecto DGPA-PAPIIT 1N210805 para la realización de este trabajo de tesis.*
- ★ *A todos mis sinodales por su asesoría y correcciones oportunas.*

A TODOS ELLOS ... ¡MIL GRACIAS!

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico con mucho cariño y amor a ...

Mi mamá, que con su amor, motivación y confianza hicieron posible que saliera adelante en mi vida, ya que sin ella no estaría aquí.

Mi papá, que con su paciencia y apoyo me enseñó a valorar todo lo que la vida me ha dado.

Claudia y Ulises, por todos los momentos felices que hemos pasado juntos, por su apoyo incondicional y por ver en mí a alguien en quien confiar.

Cocolín, porque gracias a ti conocí el verdadero amor, tener en ti un hombro en donde llorar, una mano amiga en donde apoyarme, ya que cada vez que me he caído siempre estas tú para levantarme. Gracias mi amor por existir... recuerda que eres y seguirás siendo la esencia de mi ser.

Mis niñas, que son el tesoro más grande que Dios me ha enviado.

A toda la familia López y Medina, por todos los buenos ánimos y deseos para mi superación profesional.

A todos mis amigos en especial a Cristian, Emilio y a toda la familia Corleone por su cariño, apoyo y por todos los momentos felices y tristes que hemos compartido.

Con cariño y aprecio...

Marlene

INDICE GENERAL

Página

INTRODUCCIÓN.....	1
I. ANTECEDENTES.....	3
1.1. Bencimidazoles como agentes antihelmínticos y antiparasitarios.....	6
1.2. Bencimidazoles de importancia médica.....	9
1.2.1. Tiabendazol.....	9
1.2.2. Mebendazol.....	9
1.2.3. Albendazol.....	10
1.3. Tracto gastrointestinal.....	12
1.3.1. Fisiología.....	12
1.3.1.1. Estómago.....	13
1.3.1.2. Intestino delgado.....	13
1.3.1.3. Intestino grueso o colón.....	13
1.3.1.4. Organización de la pared intestinal.....	14
1.3.1.5. Células epiteliales (enterocitos).....	15
1.3.1.6. Vellosidades intestinales.....	16
1.4. Barreras epiteliales.....	18
1.4.1. Barreras extrínsecas.....	18
1.4.1.1. Moco (Mucina).....	18
1.4.1.2. Capa no agitada: una barrera de significado fisiológico desconocido.....	18
1.4.1.3. pH gastrointestinal.....	19
1.4.1.4. Flujo sanguíneo gastrointestinal.....	19
1.4.2. Barreras intrínsecas.....	20
1.4.2.1. El epitelio.....	21
1.4.2.2. Ruta paracelular.....	21
1.4.2.3. Ruta transcelular.....	22
1.5. Absorción gastrointestinal. Consideraciones fisicoquímicas.....	25
1.5.1. pka del fármaco y pH gastrointestinal.....	25

	Página
1.5.2. Solubilidad lipídica.....	26
1.5.3. Composición de la membrana. Modelos de partición.....	27
1.5.4. Estabilidad del fármaco e hidrólisis en el tracto gastrointestinal.....	28
1.6. Metodologías actuales utilizadas en la evaluación de la permeabilidad y absorción intestinal.....	29
1.6.1. Métodos <i>in vivo</i>	29
1.6.2. Métodos <i>in situ</i>	29
1.6.3. Métodos <i>in silico</i>	30
1.6.4. Métodos <i>in vitro</i>	31
1.6.4.1. Saco intestinal invertido.....	31
1.6.4.2. Captación de radionucleótidos y estudios de eflujo en células aisladas.....	32
1.6.4.3. Vesículas de la membrana.....	32
1.6.4.4. Membranas del epitelio mucosal.....	32
1.6.4.5. Anillos intestinales.....	32
1.6.4.6. Suspensiones de células mucosales.....	33
1.6.4.7. Fracciones subcelulares.....	33
1.6.4.8. Membrana artificial inmovilizada (IAM) por cromatografía.....	33
1.6.4.9. Ensayos de permeabilidad en membranas artificiales paralelas (PAMPA).....	34
1.6.4.10. Cultivos celulares. Caco-2.....	34
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	39
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	40
3.1. Hipótesis.....	40
3.2. Objetivo general.....	40
3.3. Objetivos específicos.....	40
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	41
5. RESULTADOS.....	54
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	75
7. CONCLUSIONES.....	80
BIBLIOGRAFÍA.....	81
ANEXO A.....	89

ANEXO B.....	92
ANEXO C.....	102

INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Derivados del ácido 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-ilcarboxílico y compuestos de referencia utilizados en el estudio.....	4
2	Propiedades fisicoquímicas de los compuestos en estudio.....	5
3	Prevalencia global de infecciones por helmintos.....	6
4	Perfil terapéutico de fármacos empleados en el tratamiento de helmintosis humana.....	7
5	Modelos de líneas celulares para la predicción de la permeabilidad intestinal.....	35
6	Concentración de atenolol (μM) obtenida en el estudio A-B para cada inserto.....	54
7	Concentración de atenolol (μM) obtenida en el estudio B-A para cada inserto.....	55
8	Concentración promedio de atenolol (μM) obtenida para ambos transportes.....	56
9	Concentración de propranolol (μM) obtenida en el estudio A-B para cada inserto.....	56
10	Concentración de propranolol (μM) obtenida en el estudio B-A para cada inserto.....	57
11	Concentración promedio de propranolol (μM) obtenida para ambos transportes.....	58
12	Concentración de FHL 21 (μM) obtenida en el estudio A-B para cada inserto.....	58
13	Concentración de FHL 21 (μM) obtenida en el estudio B-A para cada inserto.....	59
14	Concentración promedio de FHL 21 (μM) obtenida para ambos transportes.....	60
15	Concentración de FHL 30 (μM) obtenida en el estudio A-B para cada inserto.....	60
16	Concentración de FHL 30 (μM) obtenida en el estudio B-A para cada inserto.....	61
17	Concentración promedio de FHL 30 (μM) obtenida para ambos transportes.....	62
18	Concentración de FHL 31 (μM) obtenida en el estudio A-B para cada inserto.....	62
19	Concentración de FHL 31 (μM) obtenida en el estudio B-A para cada inserto.....	63
20	Concentración promedio de FHL 31 (μM) obtenida para ambos transportes.....	64
21	Concentración de FHL 33 (μM) obtenida en el estudio A-B para cada inserto.....	64
22	Concentración de FHL 33 (μM) obtenida en el estudio B-A para cada inserto.....	65
23	Concentración promedio de FHL 33 (μM) obtenida para ambos transportes.....	66
24	Concentración de FHL 34 (μM) obtenida en el estudio A-B para cada inserto.....	66
25	Concentración de FHL 34 (μM) obtenida en el estudio B-A para cada inserto.....	67
26	Concentración promedio de FHL 34 (μM) obtenida para ambos transportes.....	68
27	Concentración de FHL 35 (μM) obtenida en el estudio A-B para cada inserto.....	68
28	Concentración de FHL 35 (μM) obtenida en el estudio B-A para cada inserto.....	69

Tabla	Título	Página
29	Concentración promedio de FHL 35 (μM) obtenida para ambos transportes.....	70
30	Concentración promedio (μM) de todos los compuestos obtenida para el transporte A-B.	71
31	Concentración promedio (μM) de todos los compuestos obtenida para el transporte B-A	71
32	Coefficientes de permeabilidad aparente obtenidos de los compuestos analizados.....	73
33	Preparación de las curvas patrón de Lucifer Yellow en HSSB.....	92
34	Preparación de la solución 10 mM de cada compuesto.....	93
35	Preparación de las curvas patrón de los compuestos en HSSB.....	93
36	Linealidad y precisión del Atenolol en HSSB pH 7.4, $\lambda_{\text{máx}} = 280 \text{ nm}$	94
37	Linealidad y precisión del Propranolol en HSSB pH 7.4, $\lambda_{\text{máx}} = 290 \text{ nm}$	95
38	Linealidad y precisión del FHL 21 en HSSB pH 7.4, $\lambda_{\text{máx}} = 254 \text{ nm}$	96
39	Linealidad y precisión del FHL 30 en HSSB pH 7.4, $\lambda_{\text{máx}} = 254 \text{ nm}$	97
40	Linealidad y precisión del FHL 31 en HSSB pH 7.4, $\lambda_{\text{máx}} = 280 \text{ nm}$	98
41	Linealidad y precisión del FHL 33 en HSSB pH 7.4, $\lambda_{\text{máx}} = 280 \text{ nm}$	99
42	Linealidad y precisión del FHL 34 en HSSB pH 7.4, $\lambda_{\text{máx}} = 254 \text{ nm}$	100
43	Linealidad y precisión del FHL 35 en HSSB pH 7.4, $\lambda_{\text{máx}} = 280 \text{ nm}$	101

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Estructura química del Tiabendazol.....	9
2	Estructura química del Mebendazol.....	10
3	Estructura química del Albendazol.....	12
4	Organización de la pared intestinal.....	15
5	Anatomía del enterocito.....	16
6	Organización estructural de una vellosidad intestinal.....	17
7	Vellosidades intestinales en la pared intestinal.....	17
8	Barreras del epitelio intestinal.....	18
9	Rutas para el transporte a través de las barreras celulares.....	20
10	Microscopía electrónica de las Células Caco-2.....	36
11	Metodologías empleadas en la línea celular Caco-2.....	41
12	Técnicas experimentales aplicadas al cultivo celular Caco-2.....	42
13	Representación de la medida de la resistencia eléctrica transepitelial (TEER).....	44
14	Lucifer Yellow.....	50
15	Representación esquemática del método de difusión <i>in vitro</i> en la línea celular Caco-2.....	51
16	Cinética de transporte del atenolol determinada de A-B.....	55
17	Cinética de transporte del atenolol determinada de B-A.....	55
18	Cinética de transporte del atenolol determinada de A-B y B-A.....	56
19	Cinética de transporte del propranolol determinada de A-B.....	57
20	Cinética de transporte del propranolol determinada de B-A.....	57
21	Cinética de transporte del propranolol determinada de A-B y B-A.....	58
22	Cinética de transporte del FHL 21 determinada de A-B.....	59
23	Cinética de transporte del FHL 21 determinada de B-A.....	59
24	Cinética de transporte del FHL 21 determinada de A-B y B-A.....	60
25	Cinética de transporte del FHL 30 determinada de A-B.....	61
26	Cinética de transporte del FHL 30 determinada de B-A.....	61
27	Cinética de transporte del FHL 30 determinada de A-B y B-A.....	62

Figura	Título	Página
28	Cinética de transporte del FHL 31 determinada de A-B.....	63
29	Cinética de transporte del FHL 31 determinada de B-A.....	63
30	Cinética de transporte del FHL 31 determinada de A-B y B-A	64
31	Cinética de transporte del FHL 33 determinada de A-B.....	65
32	Cinética de transporte del FHL 33 determinada de B-A.....	65
33	Cinética de transporte del FHL 33 determinada de A-B y B-A.....	66
34	Cinética de transporte del FHL 34 determinada de A-B.....	67
35	Cinética de transporte del FHL 34 determinada de B-A.....	67
36	Cinética de transporte del FHL 34 determinada de A-B y B-A.....	68
37	Cinética de transporte del FHL 35 determinada de A-B.....	69
38	Cinética de transporte del FHL 35 determinada de B-A.....	69
39	Cinética de transporte del FHL 35 determinada de A-B y B-A.....	70
40	Cinética de transporte A-B para todos los compuestos.....	72
41	Cinética de transporte B-A para todos los compuestos.....	72
42	Coefficiente de permeabilidad aparente como una función del coeficiente de partición.....	74
43	Coefficiente de permeabilidad aparente como una función de la solubilidad.....	74
44	Curva patrón del atenolol.....	94
45	Curva patrón del propranolol.....	95
46	Curva patrón del FHL 21.....	96
47	Curva patrón del FHL 30.....	97
48	Curva patrón del FHL 31.....	98
49	Curva patrón del FHL 33.....	99
50	Curva patrón del FHL 34.....	100
51	Curva patrón del FHL 35.....	101

INTRODUCCIÓN

Cuando se lleva a cabo la administración oral de un compuesto antiparasitario para que ejerza su actividad terapéutica a nivel sistémico, se necesita que sus moléculas se difundan a través de la membrana gastrointestinal hacia la circulación sistémica. Este proceso fisiológico se conoce como absorción, la cual depende no sólo de la liberación del fármaco de su forma farmacéutica, sino también de las propiedades fisicoquímicas del mismo, como son: pKa, peso molecular, coeficiente de partición (log P), solubilidad, entre otras. Sin embargo, el hecho de que un fármaco sea absorbido no implica que ya esté disponible para su actividad, pues existen otros procesos asociados a procesos biológicos (unión a proteínas, metabolismo hepático, unión a tejidos, etc.) que pueden influir en su biodisponibilidad (1).

Por ello, en la etapa de descubrimiento de principios activos, se requieren de estudios que puedan predecir la absorción de estas sustancias, con el fin de evidenciar los problemas de biodisponibilidad que se puedan presentar en el proceso de desarrollo preclínico de dichos compuestos (2).

Hasta el momento, se cuentan con varios métodos *in vivo*, *in situ*, *in silico* e *in vitro* que permiten predecir la absorción de un principio activo a través de modelos diseñados para tal fin. Uno de ellos consiste en la determinación de la permeabilidad celular a dichos compuestos. En este rubro, el procedimiento *in vitro* más empleado es la determinación del coeficiente de permeabilidad aparente (*Papp*) en la línea celular Caco-2 (3-5).

En cultivo, las células Caco-2 (células epiteliales originalmente aisladas de carcinoma de colon humano) forman monocapas que se adhieren mediante uniones fuertes (laterales hemidesmosómicas), lo cual permite discriminar entre el transporte transcelular y paracelular (6). Adicionalmente, presentan características morfológicas y bioquímicas similares a las de los enterocitos, células encargadas de la permeabilidad a sustancias en el intestino delgado (7).

Este modelo se encuentra entre los métodos *in vitro*, aceptados oficialmente por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos (FDA), para determinar la clase de permeabilidad de un fármaco y en la guía para solicitar excepción de los estudios de bioequivalencia (8, 9).

Varios grupos de investigadores, ya han informado de estudios de permeación de compuestos en cultivos de monocapas Caco-2, cuyos resultados exhiben una buena correlación con los obtenidos en estudios de absorción *in vivo* (10, 11).

Con la intención de que nuestro grupo de investigación cuente con la información sobre el potencial de permeación celular de compuestos recién sintetizados como agentes antiparasitarios, resulta de gran interés implementar los procedimientos para la determinación del coeficiente de permeabilidad aparente en la línea celular Caco-2 para un grupo de derivados del ácido 2-(trifluorometil)-*1H*-bencimidazol-5-ilcarboxílico. Esta determinación, utilizada sistemáticamente, permitirá enriquecer los criterios de selección del o los compuestos para su posterior evaluación *in vivo*.

1. ANTECEDENTES

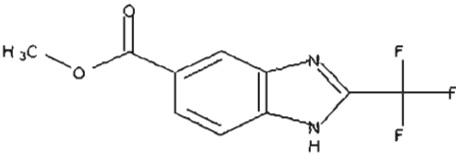
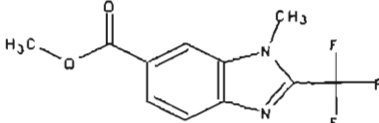
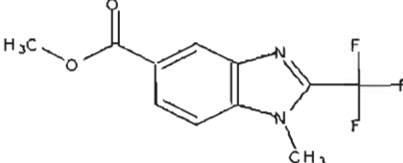
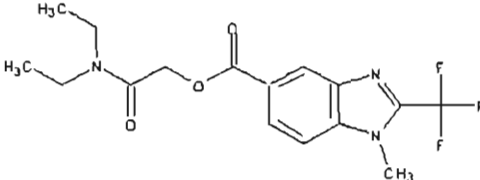
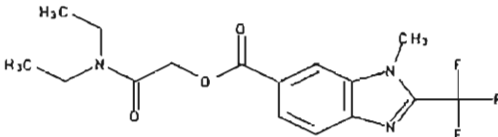
Las enfermedades parasitarias tanto las protozoosis como las helmintosis, siguen siendo un problema de salud pública en nuestro país y en muchas partes del mundo, especialmente en países en vías de desarrollo. Las infecciones por estos parásitos ocupan uno de los primeros lugares como causa de morbilidad que afectan principalmente a la población infantil. Actualmente existen alternativas quimioterapéuticas para controlar dichas enfermedades, las cuales son efectivas pero suelen producir efectos secundarios que van de leves a severos. De tal manera, surge la necesidad de desarrollar nuevos fármacos que sean realmente efectivos, con mejores características fisicoquímicas y biofarmacéuticas que las de los fármacos de uso actual, de fácil síntesis, bajo costo y que perdure en beneficio de los pacientes (12).

En las últimas décadas se ha utilizado para el tratamiento efectivo de las parasitosis compuestos derivados del carbendazim (1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo) como el albendazol y el mebendazol. A pesar de su uso generalizado, la eficacia de estos compuestos a nivel sistémico se ve limitada por su insolubilidad en fluidos biológicos, lo que ocasiona poca absorción intestinal, bajas y erráticas concentraciones en plasma y poca biodisponibilidad en tejidos (13 - 15).

Por ello, nuestro grupo de investigación llevó a cabo la síntesis de compuestos derivados del ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-ilcarboxílico (Tabla 1) que al ser evaluados *in vitro*, presentaron buena actividad antiparasitaria. Sin embargo, un paso importante en la obtención de compuestos con actividad biológica sistémica es que presenten buena biodisponibilidad oral y ésta depende entre otros factores, de su paso a través del epitelio intestinal. Hoy en día existen diversas técnicas que se emplean para la evaluación de la permeabilidad intestinal; una de ellas es la determinación de la permeabilidad aparente (*Papp*) en la línea celular Caco-2.

En la Tabla 2, se presentan las propiedades fisicoquímicas de los compuestos por analizar, el albendazol y los compuestos de referencia propranolol y atenolol.

Tabla 1. Derivados del ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-ilcarboxílico y compuestos de referencia

Clave	Estructura Química
FHL 21	 <p data-bbox="453 440 970 466">2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-5-ilcarboxilato de metilo</p>
FHL 35	 <p data-bbox="420 662 1004 688">1-metil-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-6-ilcarboxilato de metilo</p>
FHL 34	 <p data-bbox="420 876 1004 901">1-metil-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-5-ilcarboxilato de metilo</p>
FHL 30	 <p data-bbox="373 1110 1044 1156">1-metil-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-5-ilcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo</p>
FHL 31	 <p data-bbox="373 1349 1048 1395">1-metil-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-6-ilcarboxilato de 2-(dietilamino)-2-oxoetilo</p>

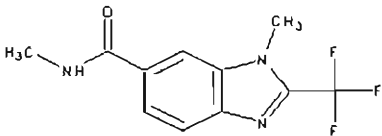
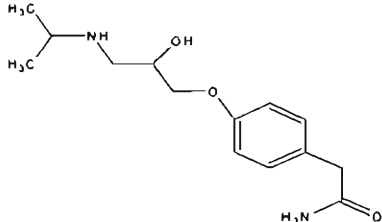
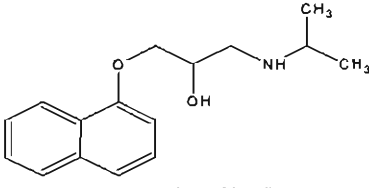
FHL 33	 <p><i>N</i>,1-dimetil-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-6-ilcarboxamida</p>
atenolol	 <p>2-{4-[2-hidroxi-3-(isopropilamino)propoxi]fenil}acetamida</p>
propranolol	 <p>1-(isopropilamino)-3-(1-nafiloxi)propan-2-ol</p>

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos en estudio

Compuesto	Fórmula molecular	*P.M.	CLog P*	CSolubilidad (g/L)*
atenolol	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	266.336	1.09 ± 0.22	69.30
propranolol	C ₁₆ H ₂₁ NO ₂	259.344	3.10 ± 0.19	0.25
FHL 21	C ₁₀ H ₇ F ₃ N ₂ O ₄	244.170	2.38 ± 0.71	1.74
FHL 30	C ₁₆ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃	357.328	2.23 ± 1.21	3.84
FHL 31	C ₁₆ H ₁₈ F ₃ N ₃ O ₃	357.328	2.23 ± 1.21	3.84
FHL 33	C ₁₁ H ₁₀ F ₃ N ₃ O	257.212	1.35 ± 1.21	32.10
FHL 34	C ₁₁ H ₉ F ₃ N ₂ O ₂	258.197	2.69 ± 1.18	0.77
FHL 35	C ₁₁ H ₉ F ₃ N ₂ O ₂	258.197	2.69 ± 1.18	0.77
albendazol	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ SO ₂	265.330	3.01 ± 0.86	0.32

*Peso molecular, CLog P y la CSolubilidad fueron calculados con el programa ACDLabs Free Ware 5.0.

1.1 Bencimidazoles como agentes antihelmínticos y antiparasitarios

La importancia de descubrir nuevos compuestos con actividad antiparasitaria radica en que las enfermedades parasitarias siguen siendo un grave problema de salud pública en el mundo. Uno de los informes clásicos de infecciones por helmintos fue publicado por Stoll en 1947. Los datos indicaron que cerca de 650 millones de personas estaban infectadas con *Ascaris lumbricoides* (población mundial 2.1. mil millones). En forma similar, estimó que para infecciones como trichuriasis, enterobiosis y estrongiloidosis, la población infectada era de 350, 209 y 35 millones, respectivamente. A pesar de las diferentes estrategias que se han implementado para la prevención y tratamiento de este tipo de infecciones, algunos reportes indican que con el aumento en la población mundial, las infecciones prevalentes se incrementa proporcionalmente (16) (Tabla 3).

Tabla 3. Infecciones por helmintos prevalentes a nivel mundial

Parásito	1947 ^a	1984 ^b	2000 ^c
<i>Ascaris</i>	650	1100-1300	1472
<i>Tenias</i>	450	1000	1298
<i>Trichuris</i>	350	500-1000	1049
<i>Enterobius</i>	209	300-500	300
<i>Estrongiloides</i>	35	50-100	70

^aPoblación mundial 2.1 mil millones de personas. ^b Población mundial 4.3 mil millones de personas. Horton (1990).

^cPoblación mundial estimada de 6.0 mil millones (www.npg.org ; www.biosci.ohio-state.edu [01/10/03])

Las infecciones causadas por helmintos son conocidas tanto en humanos como en animales domésticos. La magnitud de estas parasitosis es tan grande que en la actualidad representa el grupo más importante de infecciones sobre el planeta (16).

Según lo propuesto por expertos de la Central para el Control de Enfermedades de Atlanta (CDC) E.U.A., y la OMS, una de las actividades encaminadas a solucionar la problemática de las enfermedades helmínticas es el control quimioterapéutico de éstas a través de la implementación de tratamientos masivos (17). En nuestro país, la población infantil es la que se ve mayormente afectada por infecciones helmínticas (18), lo cual ha llevado a las campañas de desparasitación nacional como lo recomienda la OMS (17). Por otro lado, llama la atención que para las infecciones causadas por protozoarios no se han implementado campañas similares.

Los helmintos (nemátodos, cestodos y trematodos) son organismos diversificados responsables de las enfermedades helmínticas, varían en su ciclo biológico, en su fisiología, en su evolución, en el hábitat

que ocupan dentro del huésped y en su susceptibilidad a los compuestos antiparasitarios. La gravedad de la infección, tanto en el hombre, como en otros hospederos, está dada por la intensidad de la exposición (19).

Gran parte de los medicamentos utilizados en la quimioterapia para el tratamiento de las diferentes infecciones parasitarias, han derivado del uso empírico y tradicional. La quimioterapia racional se basa en el trabajo del patólogo Paul Ehrlich en los años 1870's y 1880's. La aplicación en bacterias y protozoarios inició la quimioterapia moderna (20).

A través del tiempo se han empleado para el tratamiento de las helmintosis muchos compuestos con gran diversidad en sus estructuras moleculares, que van desde compuestos simples, como los hidrocarburos halogenados, hasta moléculas complejas como la lucantona o la hicanona (avermectinas) (19).

Por otro lado, como consecuencia del progreso sustancial ocurrido con el descubrimiento y el desarrollo de fármacos, particularmente en medicina veterinaria, en la actualidad se dispone de agentes efectivos capaces de curar o controlar la mayoría de las infecciones humanas producidas por helmintos intestinales. Algunos de los compuestos que se utilizan en la actualidad para el tratamiento de las diversas infecciones por helmintos se enlistan a continuación (Tabla 4).

Tabla 4. Perfil terapéutico de fármacos empleados en el tratamiento de helmintosis humana

Fármaco (Compañía)	Dosis recomendada en adulto (administración oral)	Helmintosis
amoscanato (Ciba-Geigy)	7 mg/kg por 3 días.	Esquistosomiosis
diclorofeno (Burton T. Bush)	2 a 3 g cada 8 horas por 3 dosis.	Infecciones por <i>T. solium</i> y <i>T. saginata</i>
dietilcarbamazina (American Cyanamid)	4-6 mg/kg (citrate) ó 2-3 mg (base) dado en 3 dosis durante 14- 21 días.	Filiariosis linfática y loosis
ivermectina (MSD)	Dosis única de 100-200 µg/kg.	Filiariosis linfática
levamisol (Janssen, ICI)	Dosis única de 2.5 mg/kg.	Ascariosis
metronidazol (Rhône-Poulenc)	250 mg 3 veces al día por 3 días.	Infección por el parásito de Guinea
metrifonato (Bayer)	7.5 mg/kg por 5 días.	Cisticercosis
niridazol (Ciba)	25 mg/kg por 7 días.	Esquistosomiosis

praziquantel (E. Merck, Bayer)	50 mg/kg/ día por 15 días, 25 mg/kg por 3-6 días. Dosis única de 40 mg/kg.	Cisticercosis Esquistosomiosis
tetracloroetileno (Columbia-Southern)	0.1 mL/kg (máx. 5 mL) en ayuno.	Infecciones por <i>Ancylostoma sp</i> y <i>Heterophyes sp.</i>
niclosamida (Bayer)	2 g (divididos en 4 tabletas masticables).	Todas las infecciones por gusanos planos.
oxamniquina (Pfizer)	15 mg/kg dos veces al día por 3 días.	<i>Schistosomia mansoni</i>
pamoato de pirantel (Pfizer)	Dosis única de 10 mg/kg (máx. 1 g) 10-20 mg/kg.	Ascariosis, enterobiosis Infecciones por <i>Ancylostoma</i>
pamoato de oxantel (Pfizer)	Dosis única de 10-20 mg/kg (base).	Trichuriasis
piperazina (Dow, BDH, etc.)	75 mg/kg (máx. 3.5-4 g) por 2 días.	Ascariosis, enterobiosis
cambendazol (MSD)	5 mg/kg.	Estrongiloidiosis
mebendazol (Janssen)	100 mg dos veces al día por 3 días, 200 mg dos veces por 20 días, 400-600 mg 3 veces al día por 21-30 días.	Ascariosis, enterobiosis, trichuriasis, estrongiloidiosis. Capiliariosis Quiste hidatídico
flubendazol (Janssen)	200 mg diariamente por 3 días ó 100 mg dos veces por día durante 3 días.	Infecciones por <i>Ancylostoma</i> y trichuriasis
albendazol (SKF)	Dosis única de 400 a 800 mg.	Ascariosis, enterobiosis, trichuriasis, estrongiloidiosis e infecciones por <i>Ancylostoma</i>
tiabendazol (MSD)	25 mg/kg (máx. 3 g en dosis diaria).	Enterobiosis, trichinosis, estrongiloidiosis, capiliariosis, <i>larva migrans</i> cutánea y toxocariosis

Sharma S. (1994) (21)

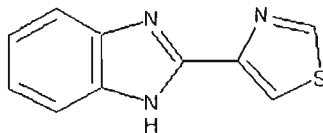
Con respecto al tratamiento de las diferentes parasitosis sistémicas, se requiere de productos que alcancen concentraciones plasmáticas adecuadas para erradicar la infección. Algunos medicamentos tienen actividad biológica o farmacológica adecuada, pero por lo general tienen otras características no deseables, por ejemplo, alta toxicidad, insolubilidad o problemas de inestabilidad; persistiendo la necesidad de disponer de fármacos adecuados para combatir distintos tipos de infecciones sistémicas como la neurocisticercosis, equinococosis, la oncocercosis y la triquinosis, las cuales requieren para su tratamiento de altas dosis y tratamientos prolongados, por lo que se requiere diseñar nuevas estructuras, con mejores características de solubilidad, permeabilidad y estabilidad. En la actualidad, se ha probado una gran variedad de estructuras químicas como sustancias antiparasitarias (22).

1.2 Bencimidazoles de importancia médica

La necesidad de un antihelmíntico con un amplio espectro de acción, alto grado de eficacia, buen margen de seguridad y versatilidad en la administración, apuntó las investigaciones hacia los bencimidazoles, en especial de tres compuestos: tiabendazol, mebendazol y el albendazol (16).

1.2.1 Tiabendazol (TBZ)

El TBZ (Fig. 1) es activo contra una gran variedad de nematodos que infestan el tracto gastrointestinal de animales domésticos; tiene actividad larvicida y ovicida *in vitro* en concentraciones muy bajas (23). El mecanismo de acción primario del TBZ se desconoce, se cree que inhibe el sistema fumarato reductasa específico de las mitocondrias de los helmintos, posiblemente por interacción con una quinona endógena. El TBZ se absorbe rápidamente después de su administración oral, las concentraciones máximas en plasma se alcanzan 1 hora después de su administración; pero sólo un pequeño porcentaje, cerca del 2%, llega a circulación sanguínea. La mayor parte se excreta dentro de las 24 horas, por la orina, como 5-hidroxtiabendazol conjugado como glucurónido o como sulfato. Aunado a lo anterior, se encontró una gran incidencia de reacciones alérgicas graves hacia este producto, por ello, actualmente es muy poco utilizado en la medicina clínica (24).



2-(1,3-tiazol-4-il)-1H-bencimidazol

Figura 1. Estructura química del tiabendazol.

1.2.2 Mebendazol (MBZ)

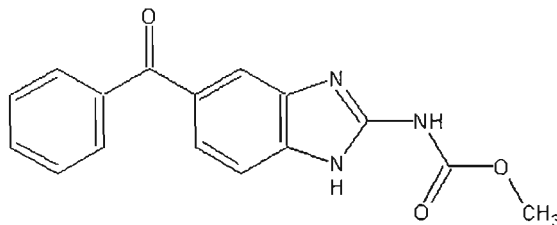
Derivado bencimidazólico muy utilizado particularmente contra nematodos gastrointestinales donde su acción es independiente de su concentración sistémica (Fig. 2). Este fármaco es efectivo en infecciones tales como ascariidiosis, capilariosis intestinal, enterobiosis, trichuriasis, anquilostomiosis y en

triquinosis. El fármaco es activo tanto en los estadios larvarios, como en los adultos de los nematodos que producen estas infecciones y es ovicida para *Ascaris sp* y *Trichuris sp* (25).

La inmovilización y la muerte de parásitos, susceptibles al MBZ, se produce lentamente y su eliminación del tracto gastrointestinal puede no completarse hasta varios días después del tratamiento con este fármaco. El MBZ produce la desaparición selectiva de los microtúbulos citoplasmáticos de las células tegumentarias e intestinales de los parásitos afectados, así como la alteración de las sustancias secretoras acumuladas en el aparato de Golgi, la secreción de acetilcolinesterasa y el consumo de glucosa y el agotamiento de glucógeno (26).

Por otro lado, se encontró que esta acción se debe a que afecta al complejo succinato deshidrogenasa-fumarato reductasa y afecta a la cadena del transporte de electrones entre una quinona y la NADH deshidrogenasa (27).

El MBZ se absorbe en forma deficiente y errática. Las concentraciones del fármaco en el plasma son bajas y no reflejan la dosis ingerida (28, 29). El MBZ presenta metabolismo de primer paso, dando lugar a dos metabolitos el 5-[hidroxi(fenil)metil]-1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo y el (2-amino-1*H*-bencimidazol-5-il) (fenil) metanona.



5-benzoil-1*H*-bencimidazol-2-ilcarbamato de metilo

Figura 2. Estructura química del mebendazol.

1.2.3 Albendazol (ABZ)

Desde 1976 hasta en la actualidad el ABZ (Fig. 3) es un fármaco antiparasitario de amplio espectro, que se utiliza en el tratamiento de ascariosis (*Ascaris lumbricoides*), tricocefalosis (*Trichuris trichuria*), enterobiosis (*Enterobius vermicularis*), uncinariosis (*Ancylostoma duodenale* y *Necator americanus*), solitarias (*Hymenolepsis nana* y *Taenia spp*), estrogiloidosis (*Strongyloides stercolaria*), triquinelosis

(*T. spiralis*) y cisticercosis (*C. cellulosae*). Este fármaco es uno de los de mayor eficacia en el tratamiento de las helmintosis comparándolo con otros bencimidazoles, como el flubendazol y el mebendazol (30, 31). Además, se ha demostrado que el ABZ es muy bien tolerado por los pacientes (32).

El ABZ tiene un metabolismo extenso de primer paso, por lo que es difícil detectarlo en plasma u orina como tal. Sus principales metabolitos son el sulfóxido de ABZ (conocido como ricobendazol), que presenta una gran actividad antihelmíntica y una vida media en plasma de aproximadamente 8.5 horas; y sulfona de ABZ que no presenta actividad alguna (33).

El ABZ ejerce su efecto antihelmíntico en forma similar al MBZ. Después de la administración oral del ABZ (15 mg/kg), se absorbe en forma de sulfóxido de ABZ, alcanzando aproximadamente entre las dos y cuatro horas concentraciones plasmáticas máximas (3-5 µg/mL). De una dosis comercial de 400 mg, sólo el 5% se absorbe en el tracto intestinal. Esto es debido a su limitada solubilidad en el fluido gastrointestinal que no permite optimizar su dosificación y su actividad terapéutica para obtener mejores resultados en las parasitosis sistémicas (34, 35).

Otra de las cosas que hay que mencionar, es la capacidad de inducción de enzimas microsomales hepáticas que provoca el ABZ, que pondrían influir en su comportamiento metabólico o en el de otros fármacos que con él se coadministren (36).

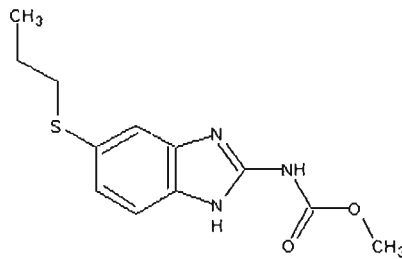
El sulfóxido de ABZ se liga a proteínas plasmáticas en forma variable, aunque se observó que lo hace en un 70%. Existe una gran variabilidad en los niveles plasmáticos máximos alcanzados en individuos tratados, al igual que las áreas bajo la curva. Se considera al sulfóxido de ABZ como el responsable de la acción antihelmíntica del ABZ; debido principalmente a que el ABZ no se encuentra como tal en el plasma (31, 36, 37).

Se demostró que la solubilidad del ABZ es mayor en dimetilsulfóxido y ácido acético que en soluciones acuosas. Por otro lado, encontraron que el ABZ se absorbe en el tracto gastrointestinal de ratas en el siguiente orden: íleon > yeyuno > colon > duodeno. Por último, la cinética de absorción que se encontró a lo largo de todo el tracto gastrointestinal fue de orden cero. Con respecto al sulfóxido de ABZ, este es menos soluble que el ABZ, se encuentra en forma no ionizada a pH 7.4, lo cual explica el paso a través del fluido cerebroespinal (38).

Algunos autores han reportado que la absorción del ABZ se lleva a cabo por un proceso no saturable como la difusión pasiva (14, 38). En estos estudios se concluyó que la solubilidad y no la liposolubilidad es la etapa limitante en el proceso de absorción del ABZ.

A pesar de los grandes esfuerzos realizados para obtener compuestos con un espectro de actividad amplio que actúen no sólo a escala intestinal, sino a nivel extraintestinal con mejores características de solubilidad que el ABZ, éste sigue siendo uno de los bencimidazoles de mayor uso a escala mundial.

La acción del ABZ es la inhibición de la polimerización de la tubulina para formar el microtúbulo nuclear, afectando la división mitótica de la célula (39, 40). Por otro lado, estudios *in vitro* con cultivos celulares mostraron que el ABZ presenta efectos teratogénicos, los cuales han sido atribuidos a su principal metabolito, el ricobendazol (sulfóxido de ABZ), por lo que su administración en mujeres embarazadas no ha sido recomendada (41).



5-(propiltio)-1H-benzimidazol-2-il-carbamato de metilo

Figura 3. Estructura química del Albendazol.

1.3 Tracto gastrointestinal

1.3.1 Fisiología

Los principales componentes del tracto gastrointestinal son: el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso o colon (42).

1.3.1.1 Estómago

La superficie del estómago es bastante limitada porque carece de microvellosidades; además, las uniones entre las células epiteliales son firmes esto hace que el estómago sea un órgano de escasa absorción. Sin embargo, y a pesar de las características antes mencionadas ciertos medicamentos (especialmente ácidos débiles como el ácido acetilsalicílico y los barbitúricos) se absorben bien en esta región. Así mismo, cantidades limitadas de algunas sustancias muy liposolubles como el alcohol pueden absorberse en pequeñas cantidades (43 - 45).

1.3.1.2 Intestino delgado

El intestino delgado es el sitio más importante para la absorción pasiva de los fármacos en el tracto gastrointestinal, mide aproximadamente entre 2 – 6 m de longitud y esta dividido en tres secciones: duodeno, yeyuno e íleon; los cuales comprenden el 5%, 50% y 45% de extensión, respectivamente. Aproximadamente el 90% de toda la absorción en el tracto gastrointestinal ocurre en la región del intestino delgado (47). La superficie de la mucosa donde la absorción puede tener lugar en el intestino delgado es grande debido a la presencia de microvellosidades que aumentan casi tres veces la superficie de absorción de las células epiteliales. En consecuencia, la superficie total de absorción es de aproximadamente de 462 cm^2 . El intestino delgado es también la región más importante del tracto gastrointestinal con respecto al transporte mediado por acarreadores.

La función absorbente del intestino delgado corre a cargo de las vellosidades intestinales y específicamente de los enterocitos (42 - 46).

1.3.1.3 Intestino grueso o colon

Si el intestino delgado es un órgano de absorción, el intestino grueso es un órgano de deshidratación, de depósito y de expulsión de las materias fecales (44).

La superficie del colon al igual que la del estómago es bastante limitada porque carece de pliegues circulares y vellosidades, de manera tal que la mucosa tiene un aspecto liso; sus criptas tienen un mayor número de células caleciformes, en estas criptas al igual que en el resto del intestino hay una intensa

actividad mitótica que permite la renovación del epitelio en pocos días. Además, las uniones entre las células del epitelio del intestino grueso son mucho más densas que las del intestino delgado.

El intestino grueso funciona como una zona de absorción para medicamentos que son tan lentamente absorbidos que una porción considerable de la dosis es capaz de sobrepasar el estómago e intestino delgado. Además, tiene gran capacidad para absorber activamente iones sodio; el potencial eléctrico creado por la absorción del sodio también provoca la absorción de cloruro. El colon también puede servir como zona de absorción para medicamentos administrados en formas retardadas (43, 44, 46).

1.3.1.4 Organización de la pared intestinal

La pared intestinal consiste de 4 capas: la mucosa, la submucosa, la muscularis propia y una capa serosa o adventita. La mucosa del epitelio superficial consiste en una capa subyacente de tejido conectivo ancho que contiene nervios y vasos (lámina propia) y una capa delgada de músculo liso (mucosa muscularis). La mucosa también contiene un arreglo de linfocitos, macrófagos y en estados de enfermedad, leucocitos polimorfonucleares, todos estos constituyentes son capaces de regular la función epitelial. La mucosa es soportada por una capa subyacente de tejido fibroconectivo llamada submucosa. La submucosa contiene nervios, vasos linfáticos, que llegan a la mucosa. La submucosa, descansa sobre la muscularis propia, la cual está compuesta de dos, y algunas veces de tres capas. En muchos casos, los órganos están revestidos por una delicada capa de tejido fibrograso, la cual soporta una capa continua de células mesoteliales (serosa). En la Figura 4 se describe esquemáticamente los componentes de la pared intestinal (45, 46).

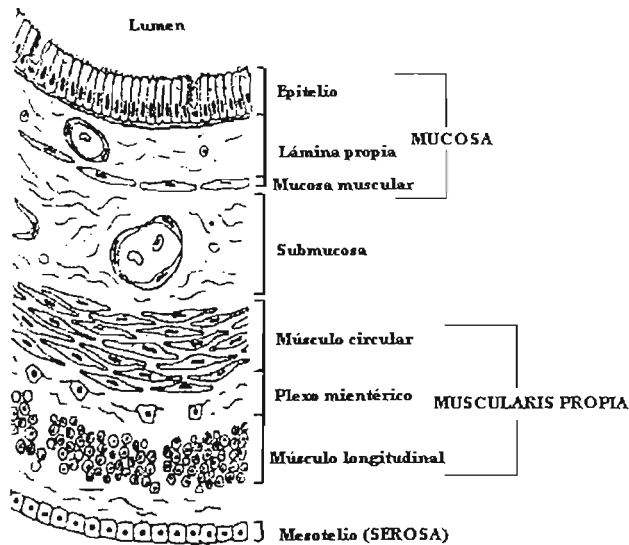


Figura 4. Organización de la pared intestinal.

1.3.1.5 Células epiteliales (enterocitos)

Los enterocitos son células cilíndricas que poseen una membrana plasmática lipídica; su extremo libre adyacente a la luz del intestino (porción apical) está constituido por microvellosidades de la membrana plasmática que reciben el nombre de “borde en cepillo” y que contienen enzimas digestivas que terminan el proceso de digestión y facilitan la absorción. Además, entre los enterocitos se encuentran las células calciformes productoras de moco. Cerca del borde en cepillo de la célula epitelial se encuentran muchas mitocondrias que suministran a la célula la energía oxidante necesaria para el transporte activo de sustancias a través del epitelio intestinal.

Cada célula epitelial está unida a su vecina cerca de la superficie apical por estructuras conocidas como uniones estrechas. Las células epiteliales sirven como barrera entre los compartimentos luminal y tisular de manera que son la principal barrera para la absorción de los fármacos administrados oralmente (Fig. 5) (43, 45, 46).

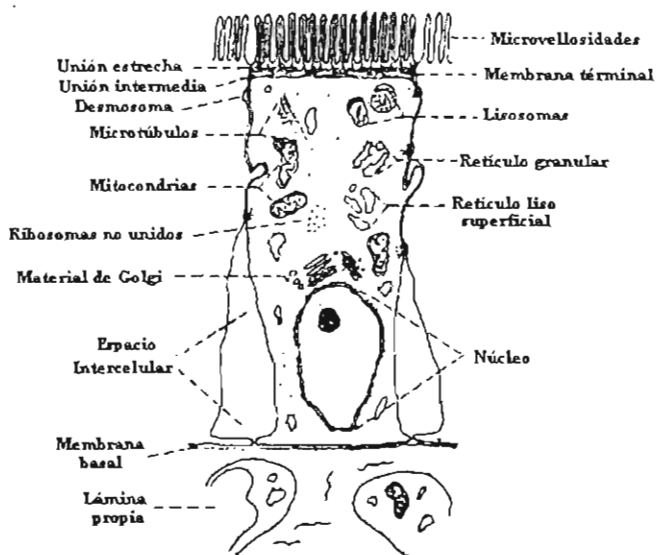


Figura 5. Anatomía del enterocito.

1.3.1.6 Vellosidades intestinales

Las vellosidades intestinales son minúsculas prolongaciones digitiformes de la mucosa intestinal que se proyectan hacia la luz; están formadas por una capa de células denominadas enterocitos, lo que hace más eficiente su función absorbente. Además, la vellosidad contiene una porción central que es continuación de la lámina propia de tejido conjuntivo. En la lámina propia corren los vasos sanguíneos arteriales y venosos (sistema vascular) para la absorción de líquidos y sustancias disueltas para ser transportadas a la vena porta.

Entre las vellosidades están las criptas de Lieberkühn que son glándulas tubulares; su epitelio tiene células cilíndricas bajas, células calciformes (secretoras de moco), células Paneth (secretan lisosima y anticuerpos) y células argentafines (secretan hormonas gastrointestinales). En el fondo de las criptas se pueden ver muchas de las células epiteliales en proceso de mitosis y en las puntas de las vellosidades las células que son descarnadas a la luz intestinal. La función principal de las glándulas intestinales es servir a la constante reposición de células epiteliales para las vellosidades. En la Figura 6 se presenta la

organización estructural y funcional de una vellosidad intestinal, mientras que en la Figura 7 se muestra el lugar que ocupan las vellosidades intestinales en la pared celular (46, 48).

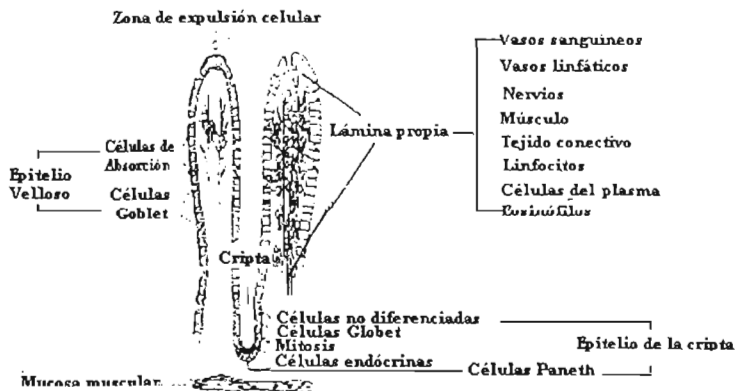


Figura 6. Organización estructural de una vellosidad intestinal.

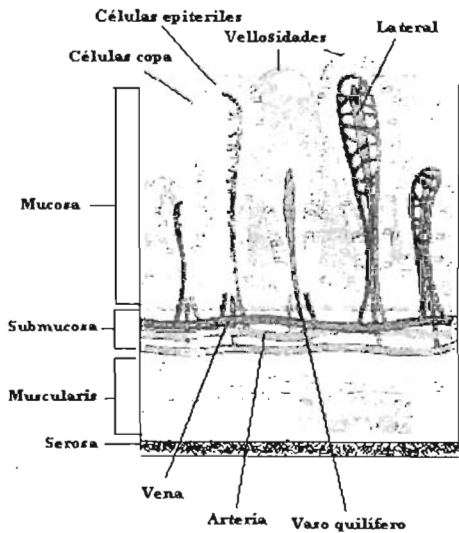


Figura 7. Vellosidades intestinales en la pared intestinal

1.4 Barreras epiteliales

Las barreras epiteliales se dividen en dos categorías principales: las barreras extrínsecas y las barreras intrínsecas (Fig. 8).

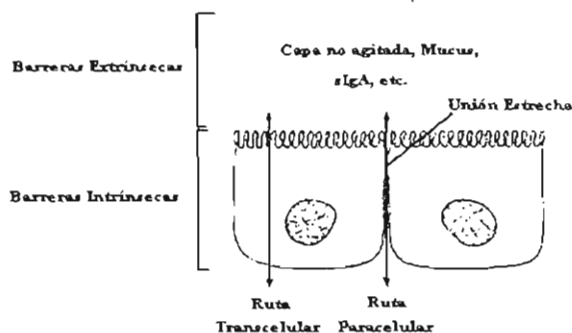


Figura 8. Barreras del epitelio intestinal

1.4.1 Barreras extrínsecas

A continuación se presentan algunos de los factores biológicos que influyen en la absorción de los fármacos.

1.4.1.1 Moco (Mucina)

Las superficies mucosas del estómago y del intestino están cubiertas por una capa fina de un muco-polisacárido viscoso denominado mucina. La alta viscosidad de la mucina sugiere, que puede actuar como una barrera de difusión, y con ello disminuir la velocidad de la absorción. La mucina también es capaz de interactuar con ciertos medicamentos e inhibir su absorción. Amplias investigaciones demostraron que el mucus intestinal inhibe la absorción de compuestos de amonio cuaternario por formación de complejos no absorbibles (46).

1.4.1.2 Capa no agitada: una barrera de significado fisiológico desconocido

El contenido luminal del tracto gastrointestinal es principalmente agua y, por lo tanto, representa una "fase acuosa". La absorción óptima de un compuesto requiere más que su dispersión en los contenidos luminales, como puede ocurrir con la mezcla. El fármaco debe estar disuelto en la fase acuosa. La velocidad de flujo de los contenidos luminales disminuye cuando un fármaco se dirige a la superficie

mucosal, formando una capa acuosa estacionaria adyacente al borde microvellosa de los enterocitos, llamada la "capa acuosa no agitada". El grosor de la capa en el intestino delgado ha sido estimado en varios cientos de micrómetros (300 - 800 μm). La capa no agitada, es particularmente importante para fármacos que penetren la barrera rápidamente, que estén disueltos en la fase acuosa y difunden pasivamente a través de esta capa. Debido al movimiento propulsivo del tracto intestinal, el lumen puede ser más que turbulento, lo cual resulta en la mezcla de los contenidos luminales y tiende a destruir la capa de agua no agitada. Por otro lado, el tracto gastrointestinal contiene una capa de moco que lógicamente impide la mezcla y promueve el mantenimiento de la capa de agua no agitada (49).

1.4.1.3 pH gastrointestinal

El pH en el sitio de absorción es un factor importante en la absorción del fármaco debido a que muchos de ellos son ácidos o bases débiles. En solución existen electrolitos orgánicos en forma no ionizada (usualmente liposoluble) e ionizada (usualmente pobremente soluble en lípidos). La fracción de cada especie depende del pH de la solución. Ya que la barrera gastrointestinal es mucho más permeable a solutos no cargados solubles en lípidos, un fármaco puede ser bien absorbido a partir de un segmento del tracto gastrointestinal, donde existe un pH favorable. La absorción de fármacos débilmente básicos se favorece en el intestino delgado donde existen ampliamente en la forma no ionizada. Por otro lado, los fluidos gástricos ácidos tienden a retardar la absorción de bases débiles pero promueve la absorción de fármacos débilmente ácidos. Los cambios en el pH de los fluidos en un segmento dado del tracto pueden mejorar o impedir la absorción de un fármaco.

El pH del fluido gástrico varía considerablemente: el ayuno tiende a disminuir el pH de los fluidos gástricos. Algunos fármacos también pueden modificar el pH, tal es el caso de los antiácidos que son ampliamente usados para neutralizar la acidez gástrica y elevar el pH de los contenidos gástricos. Los cambios en el pH gástrico relacionado con enfermedad o fármacos pueden influenciar la disolución, estabilidad y/o absorción de ciertos fármacos (42, 45, 48).

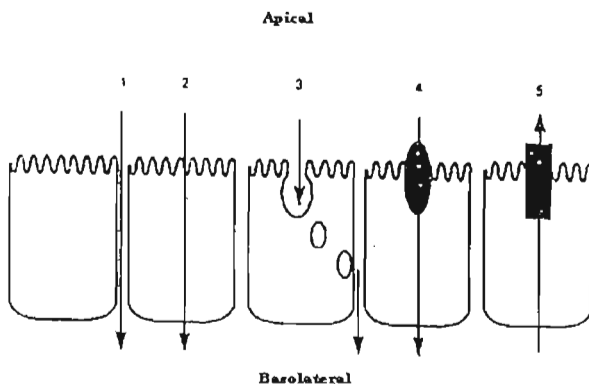
1.4.1.4 Flujo sanguíneo gastrointestinal

La irrigación de sangre al tracto gastrointestinal juega un papel importante en la absorción del fármaco ya que continuamente mantiene el gradiente de concentración a través de la membrana epitelial. La dependencia de la absorción intestinal con la velocidad de flujo sanguíneo varía desde independiente a

limitada. Moléculas polares que son absorbidas lentamente no muestran dependencia del flujo sanguíneo; la absorción de moléculas liposolubles y moléculas pequeñas es rápida y altamente dependiente de la velocidad de flujo sanguíneo. La velocidad de absorción de muchos fármacos probablemente muestra una dependencia intermedia de la velocidad de flujo sanguíneo. La sangre que drena a la gran parte del tracto gastrointestinal regresa a la circulación sistémica pasando a través del hígado. Por lo tanto, la dosis total de un fármaco que es administrado oralmente y completamente absorbida, está expuesta al hígado antes de alcanzar la circulación sistémica. Como el hígado es el órgano más importante para el metabolismo de los fármacos, existe la posibilidad de que una gran fracción de la dosis nunca llegue a la circulación sistémica debido al metabolismo hepático durante la absorción. Este fenómeno se conoce como efecto de primer paso hepático y es responsable de la biodisponibilidad incompleta de muchos fármacos administrados oralmente. El metabolismo de un fármaco durante el proceso de absorción, por las enzimas que se encuentran en la pared intestinal también reduce su biodisponibilidad (42, 45).

1.4.2 Barreras intrínsecas

El transporte de compuestos o de sustancias a través de la membrana intestinal es un proceso complejo y dinámico. Éste incluye el paso de los compuestos a través de varios caminos o rutas funcionales en paralelo (47) como los que se muestran a continuación en la Figura 9.



1. Paracelular; 2. Difusión transcelular pasiva; 3. Transcitosis; 4. Captación mediada por transportadores; 5. Eflujo mediado por transportadores.

Figura 9. Rutas para el transporte a través de las barreras celulares.

1.4.2.1 El epitelio

Los fármacos pueden pasar la barrera epitelial por alguna de estas dos rutas:

a) Ruta paracelular

Algunos fármacos permanecen ionizados en todo el intervalo de pH encontrado a lo largo del tracto gastrointestinal (son electrolitos fuertes). Para que estos iones se absorban, deben atravesar la monocapa de enterocitos a través de espacios en las uniones intercelulares (ruta paracelular). Las uniones estrechas son la barrera limitante que restringe el movimiento pasivo de solutos hidrofóbicos a través del espacio paracelular. Sin embargo, las uniones estrechas no están perfectamente cerradas sino que tienen varios grados de permeabilidad a iones dependiendo de la localización del epitelio. Las uniones intercelulares en el intestino delgado son bastante permeables a los iones comparadas con las presentes en el colon y otros tejidos. Estudios de las uniones estrechas sugieren que los iones pasan a través de canales. En algunos casos, los cationes parecen atravesar las uniones más fácilmente que aniones de tamaño idéntico, sugiriendo que el área que rodea a las uniones estrechas posee una carga negativa.

Aunque muchos fármacos tienen diámetros menores que las dimensiones estimadas de los canales de las uniones estrechas presentes en el intestino delgado, por el hecho de estar ionizados se encuentran hidratados incrementándose grandemente su tamaño efectivo y limitando su acceso por la ruta paracelular. Por lo tanto, quizá muchas moléculas ionizadas se absorben atravesando la membrana apical del enterocito y no por la ruta paracelular.

El movimiento del agua a través del epitelio gastrointestinal ocurre pasivamente a través de la unión estrecha de acuerdo a un gradiente de concentración; es decir, desde una región de mayor concentración a una de menor concentración.

El transporte pasivo es descrito por la primera ley de Fick, la cual establece que la velocidad de difusión a través de una membrana (dC/dt) es proporcional a la diferencia en la concentración del fármaco en cada lado de la membrana (ΔC), esto es:

$$-\left(\frac{dC}{dt}\right) = k * \Delta C = k(C_1 - C_2)$$

Donde:

C_1 y C_2 = Concentraciones del fármaco en cada lado de la membrana

k = Constante de proporcionalidad

Se asume que $C_1 > C_2$ y que hay transporte neto del fármaco desde la región 1 a la región 2. La constante de proporcionalidad incorpora el coeficiente de difusión del fármaco, el grosor y área de la membrana biológica y la permeabilidad de la membrana para el fármaco específico. La absorción gastrointestinal de un fármaco desde una solución acuosa requiere difusión en el lumen hacia la pared intestinal y penetración de la barrera epitelial a los capilares de la circulación sistémica. Una vez que emerge en la sangre, el fármaco se distribuye rápidamente dentro de un volumen aparente que usualmente es considerablemente más grande que el volumen de la sangre. Por lo tanto, durante la absorción, la concentración del fármaco en la sangre será mucho menor que en el sitio de absorción. En consecuencia, el gradiente de concentración es aproximadamente igual a C_1 de tal manera que la ecuación 1 puede ser escrita de la siguiente manera:

$$-\left(\frac{dC}{dt}\right) \cong kC_1$$

La absorción gastrointestinal de muchos fármacos a partir de una solución puede ser descrita por cinética de primer orden; la velocidad de absorción es proporcional a la concentración del fármaco a través de un amplio rango de concentración indicando absorción pasiva (44, 45, 49).

b) Ruta transcelular

Para difundir pasivamente a través de una célula, un ión u otro soluto hidrofílico debe interactuar con tres barreras en serie: la membrana apical, el citosol y la membrana basolateral.

Todas las células epiteliales están revestidas por una membrana plasmática, que es la principal barrera que aísla el interior celular del medio ambiente. Como otras membranas biológicas, la membrana plasmática consiste de una bicapa lipídica. Las bicapas lipídicas restringen severamente la permeación de solutos hidrofílicos y tienden a preservar los gradientes iónicos transmembranales.

Las membranas biológicas (bicapas lipídicas más proteínas de la membrana integral) también tienen resistencias que son muy restrictivas al flujo pasivo de iones, aunque menores que las bicapas del modelo lipídico (10^3 a $10^4 \Omega \cdot \text{cm}^2$). El responsable principal del movimiento iónico a través de las membranas biológicas parece ser debido a las proteínas de la membrana integral, presumiblemente transportadores y canales. En ausencia de rutas de transporte específico, las membranas biológicas intactas pueden ser consideradas virtualmente impermeables a solutos hidrofílicos de 5 nm o mayor tamaño. En contraste a los solutos hidrofílicos, las moléculas hidrofóbicas fácilmente permean la bicapa lipídica.

Otra barrera además de las dos membranas plasmáticas (apical y basolateral) para restringir la permeación pasiva transcelular es el citosol. Debido a que el citosol tiene las características de un gel hidratado, es probable que la resistencia proporcionada por esta barrera sea solo marginalmente mayor que la de la solución libre.

Hay grandes diferencias entre la composición de las membranas apical y basolateral de los enterocitos. Por ejemplo, la membrana apical es significativamente menos fluida que la membrana basolateral. Los mecanismos involucrados en la migración transcelular de los fármacos durante la absorción no se conocen bien. La captación a partir del lumen puede involucrar la simple disolución de fármacos solubles en lípidos dentro de la membrana apical. Alternativamente, pueden existir poros en la membrana apical que permiten el paso de moléculas pequeñas hacia el enterocito.

Además, existen muchos mecanismos de transporte selectivo en la membrana apical que pueden ser usados por los fármacos. Así, tenemos que cierto número de compuestos de interés terapéutico se absorben por medio de un mecanismo de transporte activo; es decir, por un proceso donde las sustancias pueden ser transportadas contra un gradiente de concentración; lo cual significa que la difusión ocurre desde una región de menor concentración a una de mayor concentración. Aún cuando el mecanismo de absorción activa no se ha dilucidado, pudiera ser que alguna molécula "portadora" (sea una enzima o cualquier otro componente de la mucosa) fuese capaz de recoger una molécula de soluto de la superficie de la membrana gastrointestinal, transportándola a través de la membrana y liberándola en la superficie serosa (zona sanguínea) de la membrana. El portador entonces vuelve a la superficie de la mucosa para recoger a otra molécula de soluto. Una característica de este proceso de transporte es que la cantidad de material portador está limitada. De manera que a determinada concentración del

medicamento en la zona de absorción, el sistema de transporte llega a ser saturado. La absorción activa tiene lugar a una velocidad proporcional a la concentración del medicamento, solamente hasta cierta concentración. Después, la concentración es lo suficientemente alta para saturar el sistema de transporte y el posterior aumento en la concentración no ejercerá efecto sobre la velocidad de absorción. La velocidad de absorción de un producto que es activamente transportado, tiene una dependencia lineal de la concentración, solamente a concentraciones bajas. A concentraciones más elevadas la pendiente de la curva disminuye y se hace invariable con respecto a la concentración. La región de la meseta refleja la saturación del mecanismo de transporte.

Los diversos sistemas de transporte activo cuya existencia en el sistema gastrointestinal se conocen parecen ser altamente específicos para una estructura química en particular. Además de la especificidad estructural, existe un cierto grado de especificidad de zona. También se ha observado la competición entre dos solutos similares para un mismo mecanismo de transporte, con la consiguiente inhibición de la absorción de uno o de varios solutos. La inhibición de la absorción activa también puede ser producida por ciertos agentes no específicos.

Algunos sustratos y fármacos naturales se absorben por procesos simultáneos de transporte activo y difusión pasiva. La contribución de cada proceso a la absorción total varía con la concentración. A bajas concentraciones del medicamento en la zona de absorción, el transporte activo tiene lugar generalmente a una velocidad mucho mayor que la de la difusión pasiva. La contribución del proceso de la difusión pasiva llega a ser importante, a concentraciones que sean lo suficientemente altas, como para saturar los procesos de transporte activo.

Se ha mostrado que la membrana apical contiene sistemas de transporte que aparentemente bombean hacia el lumen intestinal sustancias que están presentes en el enterocito. Esto es posible por los mecanismos de transporte que trabajan en "reversa".

Una vez que cruzan la membrana apical muchos fármacos parecen alcanzar la superficie basolateral del enterocito por medio del citosol. Los ácidos débiles se disocian después de atravesar la membrana apical como resultado del pH neutro del citosol, y los iones resultantes pueden ser suficientemente solubles en agua para difundir a la membrana basolateral. Sin embargo, los fármacos solubles en lípidos atraviesan el enterocito, presumiblemente por su unión a proteínas citosólicas solubles (46, 49, 50).

1.5 Absorción gastrointestinal. Consideraciones fisicoquímicas

La absorción de un fármaco está influenciada por muchos factores fisiológicos, pero también depende de los parámetros fisicoquímicos de los compuestos como los son: la solubilidad, tamaño de partícula, lipofilia, pKa, grado de ionización, pH gastrointestinal, peso molecular, etc. Diferencias clínicamente significativas en la absorción de fármacos estrechamente relacionados, son el resultado de diferencias en las propiedades fisicoquímicas (47).

La constante de disociación y liposolubilidad de un fármaco, así como el pH en el sitio de absorción, determinan las características de absorción de un fármaco. La interrelación entre estos parámetros es conocida como la teoría pH-partición de la absorción del fármaco. Esta teoría se basa en el supuesto de que el tracto gastrointestinal es una simple barrera de lípidos para el transporte de sustancias. Por consiguiente, la forma no ionizada de un fármaco ácido o básico, si es suficientemente liposoluble, es absorbida, pero la forma ionizada no lo es. Entre mayor sea la fracción de la forma no ionizada en un sitio de absorción específico, la absorción será más rápida. La velocidad de absorción está relacionada con el coeficiente de partición lípido/agua ($\log P$) de un fármaco: los compuestos más lipofílicos se absorberán más rápidamente (42, 45).

1.5.1 pKa del fármaco y pH gastrointestinal

La fracción de fármaco en solución que existe en la forma no ionizada es función de la constante de disociación del fármaco y del pH de la solución. La constante de disociación a menudo es expresada para ácidos y bases como pKa. La relación entre pH y pKa, y el grado de ionización es dada por la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$\begin{array}{ll} \text{Para un ácido} & \text{pKa} - \text{pH} = \log(\text{HA}/\text{A}^-) \\ \text{Para una base} & \text{pKa} - \text{pH} = \log(\text{A}^-/\text{HA}) \end{array}$$

Donde:

HA y A^- = Fracciones de fármaco en la forma no ionizada e ionizada respectivamente.

Muchos fármacos ácidos están predominantemente no ionizados en el bajo pH de los fluidos gástricos y pueden ser absorbidos desde el estómago así como desde los intestinos. El intervalo de pH

encontrado en el tracto gastrointestinal desde el estómago al colon es alrededor de 1 a 8. Muchos ácidos débiles ($pK_a > 8$) esencialmente están no ionizados a través del tracto gastrointestinal. La ionización de ácidos débiles con valores de pK_a entre 2.5 - 7.5 es sensible a cambios en el pH. Gran parte de los ácidos débiles en los fluidos del intestino delgado (pH 6.5) presentan una relación fármaco no ionizado/fármaco ionizado no favorable, no obstante, estos compuestos se absorben bien en el intestino delgado. Una área superficial grande y un tiempo de residencia relativamente largo en el intestino delgado son factores que contribuyen a su absorción.

Estos factores minimizan la necesidad de tener una gran fracción de la forma no ionizada del fármaco en el intestino delgado. Los ácidos fuertes están ionizados a través del tracto gastrointestinal y se absorben pobremente. Muchas bases débiles se absorben pobremente en el estómago ya que están ampliamente ionizadas a pH bajo (el intervalo de pH de los intestinos desde el duodeno al colon es alrededor de 5 a 8).

Fármacos débilmente básicos ($pK_a < 5$) esencialmente están no ionizados a través de los intestinos. Las bases fuertes están ionizadas a través del tracto gastrointestinal y tienden a ser pobremente absorbidas (42, 50).

1.5.2 Solubilidad lipídica

La difusión a través de la fase lipídica de las membranas es la ruta más importante para la absorción de los fármacos en el tracto gastrointestinal. Quizá, la solubilidad en lípidos es la propiedad más importante para la evaluación de la absorción de los fármacos. Ciertos fármacos se pueden absorber pobremente después de su administración oral aún cuando estén ampliamente no ionizados en el intestino delgado, la razón puede ser la baja solubilidad en lípidos de la molécula sin carga.

Sin embargo, durante la absorción a partir del lumen intestinal un fármaco tiene que pasar ambos medios: el acuoso y el lipídico. Por lo tanto, el prerrequisito para que un fármaco sea fácilmente absorbido es una óptima relación entre la solubilidad en lípidos y en agua más que sólo solubilidad en lípidos. Un incremento en la solubilidad lipídica más allá de una relación óptima no se acompaña por un incremento en la velocidad de absorción.

Cuando al pasar una sustancia por una membrana (soluble en lípidos), se acumula dentro de la fase lipídica de la membrana, esto influye la cinética de absorción. La absorción de una sustancia soluble en lípidos se puede describir en términos de un proceso biexponencial mientras que la absorción de una sustancia insoluble en lípidos, no acumulable sigue una función monoexponencial.

Por otro lado, la velocidad de permeación de un fármaco que cruza la fase lipídica de una membrana es menor cuando el número de grupos polares de una molécula incrementa.

1.5.3 Composición de la membrana. Modelos de partición

La velocidad de difusión depende del coeficiente de partición de la sustancia que difunde entre el material de la membrana y el fluido de los alrededores. Por lo tanto, la composición lipídica de la membrana es un factor importante para la difusión. El análisis de los lípidos a partir de las membranas microvellosas de la rata mostró una gran variedad de lípidos químicamente diferentes. El coeficiente de partición de un fármaco ha sido determinado usando modelos de sistemas de partición en los cuales los lípidos de la membrana son remplazados por solventes orgánicos los cuales solo son parcialmente miscibles con el agua. Sin embargo, no hay una clara correlación entre el coeficiente de partición y la velocidad de absorción. La correlación depende del solvente orgánico seleccionado. Desafortunadamente, para evaluar la absorción de los fármacos en el intestino delgado ningún solvente orgánico especial puede ser recomendado. En el caso de la determinación de la absorción de los fármacos a partir del estómago se recomienda la determinación del coeficiente de partición entre el agua e hidrocarburos simples o clorados (éter de petróleo, benceno, cloroformo, etc.).

La falta de consistencia entre el coeficiente de partición y la velocidad de absorción puede ser explicada por el hecho de que los sustitutos usados en los modelos de partición posiblemente son similares pero no son los mismos lípidos de la membrana o que un solvente inadecuado como cloroformo es usado cuyos productos de degradación pueden reaccionar rápidamente con bases orgánicas. Sin embargo, es difícil decidir si la inconsistencia solo es debida a las diferencias en las propiedades del solvente orgánico y los lípidos de la membrana o si otros factores prevalecen y ocultan la dependencia de la absorción intestinal sobre la solubilidad lipídica de los fármacos. Otra explicación puede ser el hecho de que el coeficiente de partición se refiere a un estado de equilibrio, mientras que la absorción del fármaco a partir del tracto gastrointestinal es un proceso dinámico.

El resultado principal de esas consideraciones es que los estudios de partición por sí mismos predicen la absorción del fármaco pobremente. La razón es obvia; el epitelio mucosal puede tener algunas propiedades en común con una simple membrana lipídica, pero está compuesto de una monocapa de células las cuales en toda su longitud, aún son "cajas negras" hasta el destino de los fármacos. La unión de los fármacos a constituyentes celulares, (por ejemplo proteínas) y partición de los fármacos entre varios compartimentos celulares puede interferir con los procesos de transferencia a través de la membrana (51, 52).

1.5.4 Estabilidad del fármaco e hidrólisis en el tracto gastrointestinal

La hidrólisis ácida y enzimática de los fármacos en el tracto gastrointestinal es algunas veces la razón de la pobre biodisponibilidad. La hidrólisis e inactivación de la penicilina G en el estómago es un ejemplo. La vida media de degradación de la penicilina G es menor a 1 minuto a, pH de 1 y alrededor de 9 minutos a pH de 2.

Cuando un fármaco es inestable en los líquidos ácidos del estómago una rápida disolución puede reducir su biodisponibilidad fisiológica. Sin embargo, ciertos profármacos deben ser hidrolizados al fármaco principal en los fluidos gastrointestinales para producir el efecto clínico esperado. El Clorazepato es convertido rápidamente al ansiolítico Nordiazepam a pH bajo. El único sitio para su conversión efectiva es el fluido gástrico. La absorción del profármaco evita su total conversión al fármaco patrón de manera que si tiene algún efecto tranquilizador (profármaco) este es mínimo (42).

1.6 Metodologías actuales utilizadas en la evaluación de la permeabilidad y absorción intestinal

Los métodos más comúnmente usados y adecuados para estudiar la permeabilidad celular así como la absorción intestinal de los fármacos se clasifican en cuatro grandes categorías: métodos *in vivo*, métodos *in situ*, métodos *in silico* y métodos *in vitro*.

1.6.1 Métodos *in vivo*

Los métodos *in vivo* miden la aparición de un agente dado en los compartimentos corporales o fluidos especialmente sangre y orina después de la administración oral y/o miden la desaparición de un agente dado a partir del tracto gastrointestinal. Estos estudios están basados en la similitud de la composición de las membranas de las células epiteliales de los animales con la del hombre, y el hecho de que la absorción es básicamente una interacción entre el fármaco y la membrana biológica, la permeabilidad a través del tracto gastrointestinal podría ser similar entre las distintas especies. Los factores fisiológicos tales como: pH, motilidad gastrointestinal, tiempo de tránsito, la distribución diferente de las enzimas así como de los transportadores pueden afectar la absorción entre las diferentes especies (47).

1.6.2 Métodos *in situ*

Los modelos animales *in situ* se basan en aislar el segmento intestinal de interés en el animal anestesiado, administrar el fármaco en su interior y medir la desaparición del mismo desde el citado segmento y/o su aparición en la sangre del animal.

Los dos métodos más ampliamente usados en estudios con animales son modificaciones de los métodos de perfusión y de asa cerrada. Aunque ambos métodos han sido usados en algunos estudios de permeabilidad y cinética de absorción de fármacos en realidad tiene algunas desventajas notables:

- Es necesario contar con un equipo externo para asegurar la circulación o recirculación del fluido de perfusión y mantener al animal y al fluido caliente.
- Se requiere que el animal esté anestesiado.

- Mide la desaparición de un agente dado a partir del tracto gastrointestinal considerando que el fármaco que desaparece es totalmente absorbido, sin contemplar que parte del mismo se puede unir al tejido intestinal, quedar atrapado en el interior celular, etc (47, 53).
- El método de asa cerrada se requiere administrar intraperitonealmente un anestésico adecuado de acción larga.
- La orientación anatómica exacta es esencial ya que únicamente los segmentos homólogos pueden ser comparados.
- El fármaco bajo estudio debe ser administrado dentro del segmento predeterminado sin puncionar la pared intestinal entre las ligaduras (53, 54).

La investigación con segmentos intestinales cerrados tiene las siguientes ventajas (42):

1. La absorción puede ser investigada independientemente del tiempo de vaciamiento estomacal o del tiempo de paso a través del intestino.
2. Es posible comparar diferentes secciones del tracto gastrointestinal.
3. Es posible, si es necesario, evitar o investigar interferencia de la circulación enterohepática.
4. Con un diseño apropiado esta técnica puede ser usado para estudiar la velocidad, el grado así como los mecanismos de absorción lo más cercano a lo fisiológico.

1.6.3 Métodos *in silico*

Los modelos *in silico* pueden actualmente predecir la permeabilidad de la membrana de fármacos prueba basados en su lipofilia, capacidad de hacer puentes de hidrógeno, peso y tamaño molecular, superficie de el área polar (PSA), propiedades cuánticas y síntesis química. Además, puede disminuir los pasos de síntesis y estudios experimentales de miles de compuestos que están en prueba (47).

Los métodos *in silico*, son métodos computacionales que pueden predecir cualitativamente el desarrollo de los compuestos. Predice bajas permeabilidades para compuestos con más de 5 puentes de hidrógeno donadores, 10 puentes de hidrógeno aceptores, con grandes pesos moleculares desde 500 y Clog P más grandes de 5 (47).

Uno de los procedimientos utilizado para predecir la absorción intestinal es el uso del QSPR (Quantitative Structure-Property Relationship). El QSPR también es utilizado para conocer las propiedades fisicoquímicas, cromatográficas y espectroscópicas de los compuestos.

Hasta la fecha, uno de los mayores impedimentos críticos en estos métodos es la falta de una base de datos lo suficientemente grande para resguardar toda información, además de la carencia de confianza para poder extrapolar los datos obtenidos con los datos reales experimentales (47).

1.6.4 Métodos *in vitro*

En las investigaciones *in vitro* las preparaciones no están sujetas al flujo sanguíneo, de manera que la situación llega a ser excepcionalmente clara y las muestras para el análisis son fáciles de obtener. Además, las preparaciones dependen del mantenimiento de su vitalidad para lo cual, en muchos casos se les mantiene en contacto con un líquido oxigenado de una composición adecuada. La medida de transporte solo se puede realizar cuando el soluto permanece en su estado inicial a través de los procesos de transferencia, cualquier unión del soluto a tejidos, puede ser una fuente de error en los métodos *in vitro* los cuales intentan definir mecanismos de transporte por técnicas de acumulación tisular o medida de la capacidad absorbente por transferencia desde el lado mucosal al lado serosal. Las ventajas relativas de cada método surgen de su habilidad para excluir ciertos factores que confunden, por ejemplo en el intestino aislado despojado de las capas musculares se excluyen los efectos del flujo sanguíneo y motilidad; los enterocitos aislados excluyen la influencia de péptidos o neurotransmisores preexistentes y las membranas apicales o basolaterales purificadas permiten la identificación de rutas de transporte en cualquiera de los dos lados de la membrana biológica. A continuación se presentan las características de los métodos *in vitro* más comúnmente usados (53, 55).

1.6.4.1 Saco intestinal invertido

Esta técnica permite la estimación a groso modo de las funciones de secreción o absorción. En este procedimiento pequeños segmentos del intestino son evertidos, ocupados con un fluido y cerrados en ambos extremos; además, los segmentos son suspendidos en la misma solución que ocupa el interior del saco intestinal. Se asume que el fluido y soluto aparecen en el lado serosal por difusión desde el espacio intersticial y tejidos subepiteliales después de moverse desde el lado mucosal dentro y fuera de la célula epitelial; por lo tanto, las concentraciones del material que aparecen en el lado serosal se interpretan como una reflexión del mecanismo por el cual el material abandona o es expulsado de la célula epitelial. Un problema potencial es que solo aquellas sustancias absorbidas capaces de penetrar las capas musculares y la serosa pueden ser detectadas por esta técnica (49, 53, 54, 56).

1.6.4.2 Captación de radionucleótidos y estudios de eflujo en células aisladas

La captación de un radionucleótido dentro de las células o eflujo fuera de las células se puede estudiar por el uso de enterocitos aislados. La técnica puede verificar si está presente un mecanismo de cotransporte o intercambio iónico, también puede detectar fácilmente un canal iónico, sin embargo, el método no puede diferenciar directamente un canal de un transportador; también se puede probar la activación o inhibición de estas rutas por péptidos (49).

1.6.4.3 Vesículas de la membrana

Las membranas apicales y basolaterales del epitelio intestinal se pueden aislar, separar y purificar por sus diferentes densidades, la membrana apical es un poco más densa que la basolateral debido a que tiene un citoesqueleto unido. Los fragmentos de la membrana plasmática rota que tienen los portadores de transporte, canales, o bombas tienden a cerrarse como vesículas redondas. Con estas vesículas se pueden realizar estudios de captación o eflujo de manera similar a los estudios con células completas. La concentración de iones dentro y fuera de la vesícula se puede controlar mejor que en las células completas, de manera que en tiempos más cortos pueden ser estudiados y se puede obtener una mejor estimación de la estequiometría de una ruta de transporte dada (49).

1.6.4.4 Membranas del epitelio mucosal

El uso de membranas aisladas totalmente del epitelio mucosal y la lámina propia evita la desventaja de las largas rutas de difusión a través de las capas de células musculares (55).

1.6.4.5 Anillos intestinales

La preparación de anillos intestinales puede responder a la pregunta de la posible captación de sustancias por células mucosales. El procedimiento de la prueba no difiere del método del saco evertido excepto por que las secciones intestinales se cortan en piezas de 0.5 a 1 centímetros de longitud y se agitan en una adecuada suspensión oxigenada. Debido a que los músculos de los especímenes intestinales inmediatamente se contraen, las vellosidades del intestino delgado llegan a quedarse sobre la superficie y están bien distendidas (55).

1.6.4.6 Suspensiones de células mucosales

La única ventaja que tienen sobre los anillos intestinales es que su uso evita la captación de sustancias dentro de los tejidos que no participan en la absorción tales como músculo, células de tejido conectivo, etc. Sin embargo, la técnica de la preparación es relativamente complicada. Con el fin de verificar si las células son dañadas o no durante la preparación se pueden usar colorantes tal como azul de timol, las células vivas no captan el color (57).

1.6.4.7 Fracciones subcelulares

Las vesículas de la membrana del borde en cepillo se pueden obtener a partir de las células mucosales aisladas por centrifugación diferencial y de gradiente con centrífugas de alta velocidad. Sin embargo, se debe puntualizar en que las vesículas de la membrana del borde en cepillo obtenidas de esta manera contienen una gran fracción de membranas terminales las cuales se deben asignar al interior celular y no a la membrana celular. Estas vesículas han sido investigadas principalmente por su contenido de enzimas y su habilidad para formar uniones selectivas con ciertas sustancias (55).

1.6.4.8 Membrana artificial inmovilizada (IAM) por cromatografía

La membrana artificial inmovilizada (IAM) por cromatografía simula el ambiente lipídico de las membranas celulares. IAM es una superficie cromatográfica preparada por la inmovilización covalente de los fosfolípidos de la membrana a una superficie sólida por la densidad de la monocapa. En la actualidad se ha demostrado la eficiencia predictiva de la permeabilidad y la relación costo-efectividad de los compuestos que se ponen a prueba. Los factores predominantes que regulan el paso de los fármacos a través de la mucosa intestinal es su habilidad de pasar a través de las membranas lipídicas de la célula. El log k' deriva de la columna IAM muestra razonablemente la correlación de la partición del fármaco dentro de los liposomas y la permeabilidad a través de las monocapas celulares de Caco-2. La IAM es una metodología que no sólo predice la absorción intestinal del fármaco, sino también la partición de los solutos dentro de los liposomas y de los principales canales celulares.

Una de las desventajas que presenta este método es el hecho de que las membranas artificiales carecen de poros que favorecen el transporte paracelular que forman una parte integral de la arquitectura de la membrana biológica; además de las proteínas de transporte que están implicadas en el transporte de fármacos mediada por acarreadores (47).

1.6.4.9 Ensayos de permeabilidad en membranas artificiales paralelas (PAMPA)

Recientemente (1998), se ha demostrado la utilidad de este método para la predicción de la permeabilidad intestinal transcelular, consiste en el uso de una membrana artificial de naturaleza lipídica (mezcla de lecitina con solventes orgánicos inertes, como el *n*-dodecano) sobre un filtro que es utilizado como soporte, además de que no presenta poros. Estos ensayos presentan las siguientes ventajas: Los ensayos se pueden ejecutar en menos de 24 horas, presenta datos reproducibles para compuestos que presentan un mecanismo de difusión pasiva transcelular, es simple, de bajo costo y se puede manejar a un rango de pH amplio. El grado de permeación de los fármacos a través de la membrana es comparada con el grado de absorción mostrada en humanos.

Debido al uso de placas de 96-pozos, nos permite tener un rápido análisis espectrofotométrico de toda la placa para una serie de compuestos que se quiera estudiar.

La limitación de este modelo es la subestimación de la absorción de los compuestos que son transportados activamente o para compuestos hidrofílicos de bajo peso molecular (47).

1.6.4.10 Cultivos celulares

Los modelos *in vitro* basados en cultivos de líneas celulares son un ideal sistema para evaluar de manera rápida la permeabilidad intestinal de nuevos fármacos, ejemplos de estos modelos celulares son descritos en la Tabla 5 (69).

Las células epiteliales cultivadas, especialmente líneas continuas excluyen factores introducidos por las células endocrinas, células nerviosas, nervios finales y células inmunes que están presentes en el tejido aislado. Una línea cultivada que solo contiene un tipo celular sirve como un mejor modelo para el estudio de los mecanismos de transporte.

Recientemente se ha mostrado que algunas líneas celulares y en especial líneas celulares de carcinoma de colon humano, son capaces de exhibir de manera permanente y espontánea o bajo condiciones de cultivo particular, características de diferenciación de enterocitos maduros o células secretoras de moco y propiedades funcionales que son específicas del epitelio transportador.

Tabla 5. Algunos modelos de líneas celulares utilizados para predecir la permeabilidad intestinal

Línea celular	Especie u origen	Características particulares
Caco-2	Adenocarcinoma de colon humano.	Perfectamente bien establecida como modelo celular. Diferenciación y expresión de algunos transportadores de eflujo. La expresión de transportadores de influjo es variable (laboratorio a laboratorio).
MDCK	Células epiteliales de riñón de canino.	Células polarizadas con una baja expresión intrínseca de transportadores.
LLC-PK1	Células epiteliales de riñón de cerdo.	Células polarizadas con una baja expresión intrínseca de transportadores. Ideal para transfecciones.
2/4/A1	Células epiteliales intestinales de feto de rata.	Sensibles a la temperatura. Ideal para compuestos que se absorben paracelularmente.
TC-7	Subclon de Caco-2.	Similar a la línea Caco-2
HT-29	Células de colon humano.	Contienen células en forma de copa productoras de moco.
IEC-18	Células de intestino delgado de ratas.	Suministran una barrera selectiva en tamaño, para compuestos que son transportados paracelularmente.

Caco-2

La línea celular Caco-2 fue establecida en cultivo en 1974 a partir de un adenocarcinoma de colon humano por Jorgen Fogh. Fue hasta 1983 cuando se observó que las células sufren espontáneamente una típica diferenciación enterocítica bajo condiciones de cultivo estándar. La diferenciación de las células Caco-2 presenta varias características cronológicas, morfológicas y funcionales precisas (3, 4, 58).

I. Las células no están diferenciadas cuando el crecimiento es exponencial, el inicio de la diferenciación ocurre en la confluencia (cuando las células detienen su división) y es total dentro de los 20 días. Esta situación se parece a la encontrada en el intestino delgado en donde las células de las criptas intestinales que proliferan no están diferenciadas y la diferenciación ocurre durante la migración desde las criptas a las vellosidades de células que no se están dividiendo.

II. En las últimas etapas del cultivo las células forman una monocapa polarizada que exhibe uniones estrechas bien definidas y presenta valores de resistencia eléctrica de aproximadamente $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$. La línea celular permite estudiar la importancia relativa de las rutas transcelular y paracelular en el transporte de un determinado fármaco. También se observan microvellosidades apicales que están

organizadas en un borde en cepillo típico y que cubren la superficie celular. Estas microvellosidades en borde en cepillo son muy similares a las observadas en el intestino delgado normal y colon (Fig. 10).

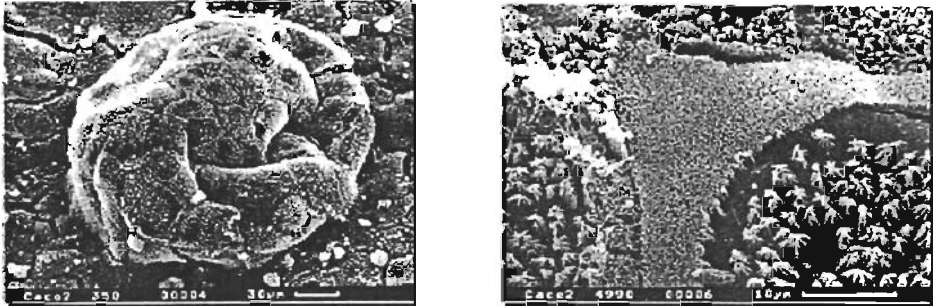


Figura 10. Microscopia electrónica de las células Caco-2. A la izquierda unión desmosómica y a la derecha vellosidades.

Hidrolasas que normalmente están presentes en la microvellosidad en borde en cepillo del intestino delgado pero están ausentes en el colon, están asociadas con la membrana microvellosa de las células Caco-2; estas hidrolasas incluyen a la sucrasa-isomaltasa, lactasa, *N*-aminopeptidasa, dipeptidilpeptidasa IV y la fósfatasa alcalina. Sin embargo, no todas las hidrolasas del borde en cepillo que se han identificado en el intestino delgado humano están presentes en las células Caco-2, tal es el caso de la hidrolasa maltasa-glucoamilasa, que está ausente. Durante la fase de crecimiento exponencial la actividad enzimática es mínima; sin embargo, se inicia un incremento lineal en la confluencia y después de 20 días se alcanzan valores que son para algunas enzimas tal como la sucrasa y dipeptidilpeptidasa IV cercanos a los observados en el intestino delgado. No obstante, la expresión de las diferentes hidrolasas es heterogénea. La diferenciación enzimática de las células Caco-2 aumenta con el número de pases hasta valores máximos que permanecen estables después de 90 pases.

III. Después de la confluencia los cultivos de células Caco-2 que crecen sobre soportes impermeables forman domos que son un indicio de las propiedades de transporte transepitelial. No obstante, su ausencia no es suficiente para descartar la función de transporte.

Las propiedades morfológicas y bioquímicas de las células Caco-2 son más similares a las de las células epiteliales del intestino delgado que a las células del colon. Sin embargo, la permeabilidad paracelular de los fármacos en el modelo Caco-2 es similar a la del epitelio del colon. Así varios

fármacos que se absorben en el intestino delgado pero no en el colon tienen coeficientes de permeabilidad muy bajos en el modelo Caco-2. Tal es el caso de los compuestos hidrofílicos cuyo transporte está reducido a niveles muy bajos. No obstante, la permeabilidad de las monocapas Caco-2 se puede modular por el uso de un interruptor de calcio de manera que la resistencia transmembranal puede ser reversiblemente disminuida desde aproximadamente $280 \Omega \cdot \text{cm}^2$ a aproximadamente $60 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

Caco-2 posee atributos que la hacen un modelo apropiado de sistema *in vitro* para la investigación del transporte pasivo de los fármacos a través del epitelio del intestino delgado.

- Son monocapas bien caracterizadas y homogéneas.
- Nos permiten excluir la influencia de varios factores tales como moco y otras poblaciones celulares.
- Con excepción de la mucina, el modelo Caco-2 parece, tener las tres principales barreras de permeabilidad para la absorción de los fármacos como son:
 1. La capa de agua estacionaria (no agitada).
 2. El complejo de unión, incluyendo a las uniones estrechas intercelulares.
 3. La monocapa celular.

Por otro lado, también presenta diversas aplicaciones en los estudio de absorción intestinal, como los son (65):

- ✓ Evalúa el potencial tóxico de los componentes de la formulación de los fármacos sobre la mucosa intestinal.
- ✓ Caracteriza las propiedades fisicoquímicas óptimas (puentes de hidrógeno, conformación estructural, etc.) de los fármacos que pueden cruzar la mucosa intestinal, ya sea por una ruta paracelular o transcelular.
- ✓ Determina la relación estructura-transporte para el transporte del fármaco vía acarreadores (transportador de péptidos, etc.).
- ✓ Determina como los componentes de la formulación (adyuvantes, lubricantes, saborizantes, colorantes, etc.) pueden influir en el transporte de fármacos a través de la mucosa intestinal.
- ✓ Investiga el potencial de la interacción fármaco-fármaco durante el transporte a través de la mucosa intestinal.
- ✓ Elucida los diferentes caminos de transporte de fármacos (paracelular contra transcelular; pasivo contra el mediado por acarreadores) a través de la mucosa intestinal.

✓ Elucida el potencial de los caminos del metabolismo del fármaco en la mucosa intestinal.

Cuando la difusión de una molécula a través de las células Caco-2 es pasiva, el transporte no es saturable y la velocidad de transporte desde el lado luminal al lado basolateral de las monocapas es el mismo que en dirección opuesta. Es probable que las células Caco-2 también sean útiles para estudios de metabolismo ya que tienen muchas enzimas del borde en cepillo de la mucosa del intestino delgado en cantidades similares a las encontradas *in vivo*.

El modelo Caco-2 puede ser una alternativa útil a los modelos animales para el estudio de la absorción intestinal de los fármacos, además de ser una herramienta en la preformulación y optimización de sistemas de liberación oral de fármacos (3, 49, 58 - 64).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) es una propiedad biofarmacéutica que determina la velocidad de transferencia del fármaco a través de las membranas biológicas, la cual depende directamente de sus propiedades fisicoquímicas, como la solubilidad y el coeficiente de partición ($\log P$).

Actualmente, los antiparasitarios comerciales presentan problemas de absorción debido a su poca solubilidad y baja biodisponibilidad en tejidos. Con el fin de tener nuevos fármacos antiparasitarios que presenten buena actividad biológica tanto a nivel sistémico como gastrointestinal y con ello presentar buenas propiedades biofarmacéuticas (solubilidad, $\log P$ y P_{app}); nuestro grupo de investigación, sintetizó compuestos derivados del ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-il-carboxílico, los cuales presentaron buena actividad biológica *in vitro*. Bajo este contexto, ¿siendo diferentes estructuralmente al albendazol, estos derivados presentarán mejores características de permeación celular?

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis

Por la solubilidad y el coeficiente de partición ($\log P$) determinados *in silico*, que presentan los compuestos derivados del ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-ilcarboxílico, su coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) será mayor que la que presenta el albendazol.

3.2 Objetivo general

- ❖ Evaluar el coeficiente de permeabilidad aparente en la línea celular Caco-2 de los compuestos derivados del ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-ilcarboxílico.

3.3 Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones cromatográficas (CLAR), para el conocimiento de los tiempos de retención y cuantificación de cada compuesto, y los compuestos de referencia (atenolol y propranolol).
2. Conocer y aplicar las técnicas empleadas en el mantenimiento del cultivo celular, para la obtención de monocapas celulares de Caco-2.
3. Correlacionar el P_{app} y el $\log P$ de los compuestos en estudio, incluyendo los compuestos de referencia (propranolol y atenolol).

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

A continuación se presentan de manera general (Fig. 11 y Fig. 12) los diagramas de las distintas metodologías que se llevaron a cabo durante el trabajo experimental.

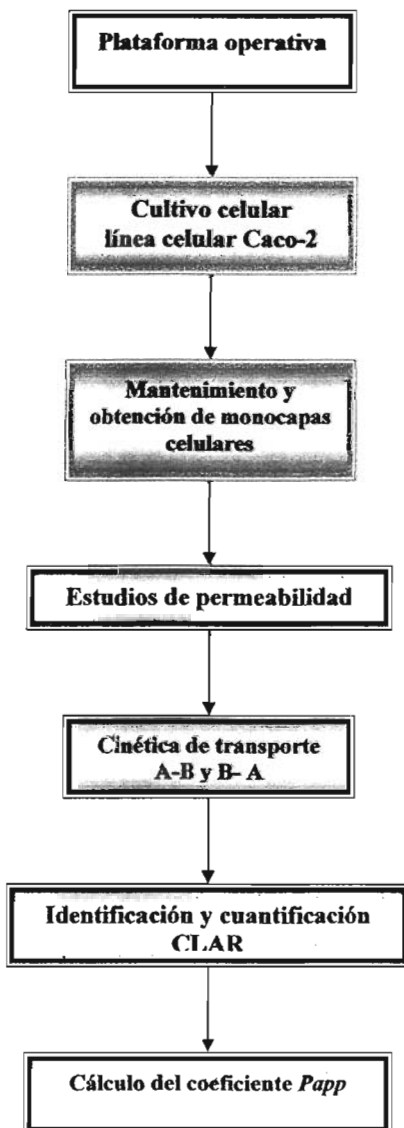


Figura 11. Metodologías empleadas en la línea celular Caco-2.

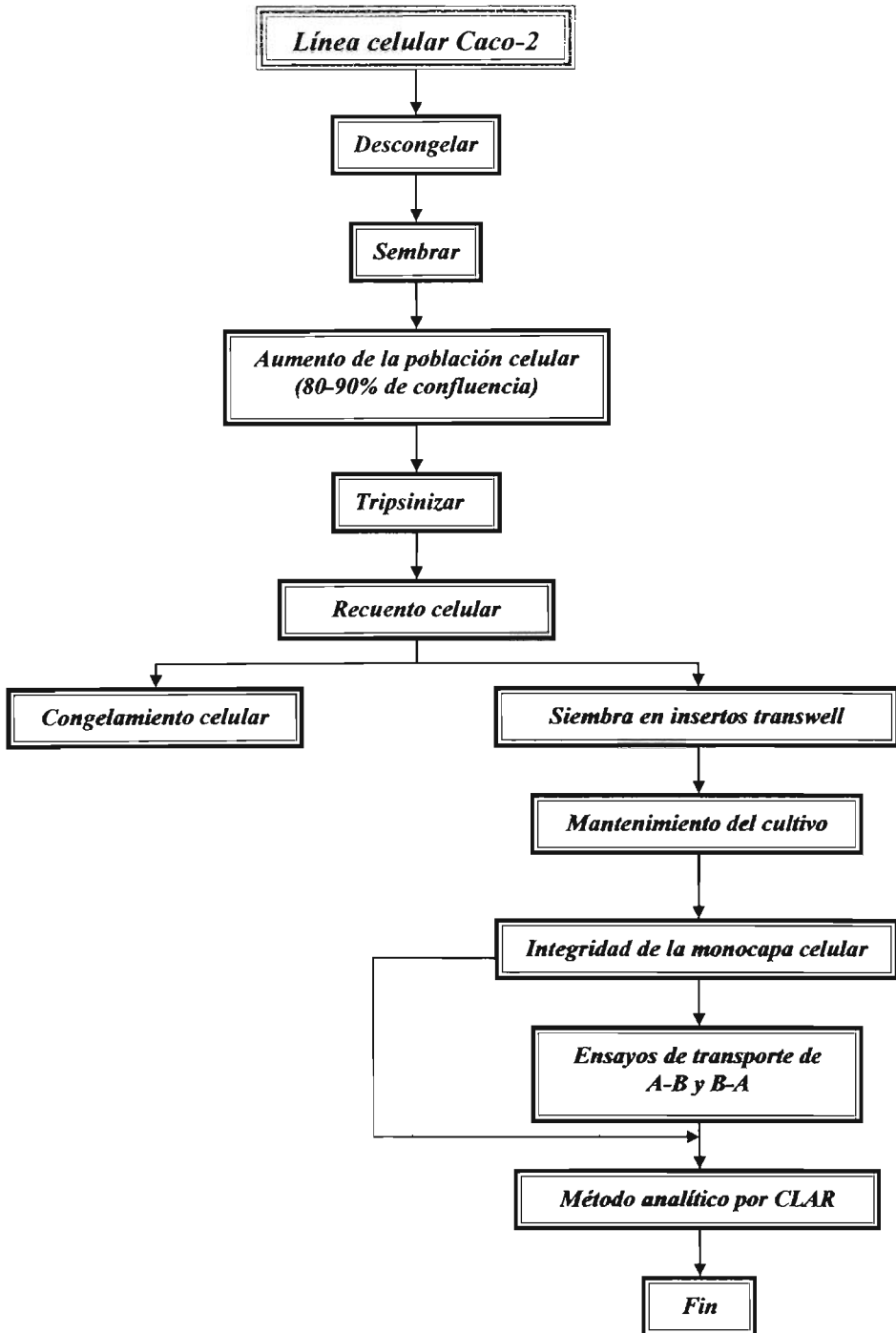


Figura 12. Técnicas experimentales aplicadas al cultivo celular Caco-2.

Equipos y Materiales

A continuación se presentan los reactivos, materiales y equipos utilizados en las diferentes etapas del trabajo experimental.

Reactivos

- Colágena de cola de rata (tipo I) 10 mg. Roche (Boehvinger mannheim-Alemania), lote 1179179.
- Medio de Dulbecco's Modified Eagle (1x). Sigma-Aldrich Cheme (Alemania), lote 082K83081.
- Solución salina de Hank's 10x. In vitro, S. A., lote 010904.
- Amortiguador de Sales de Fosfato Dulbecco's (1x). GIBCO BRL (U.S.A), lote 1022012.
- Solución de Piruvato de Sodio 100mM (100x) estéril. Sigma-Aldrich Cheme (Alemania), lote 33K2367.
- Suero Fetal Bovino. Hyclone-Fetal clone III (U.S.A) estéril y filtrado, lote AMH16999.
- Aminoácidos no esenciales (100x). In vitro, S.A. (México), lote 101089.
- Mezcla de Penicilina-Estreptomicina 10,000U/ μ g/mL. In vitro, S.A. (México), lote 256890.
- Dimetil sulfoxido. J. T. Baker (E. U. A).
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3). J. T. Baker (E. U. A), lote 36509.
- Hepes (N-[2-Hidroxietil]-piperazina-N'-[ácido-2-etanosulfónico]. Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo), lote 43H5700.
- Solución de Tripsina 0.05% (1x) estéril. Hyclone, lote AHH8787.
- D- Glucosa. Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo).
- Acetonitrilo grado CLAR. J. T. Baker 9017-02, lote M51C60.
- Ácido acético glacial. J. T. Baker 9507-05, lote Y38C54.
- Alcohol metílico. Reposifin (PQF), lote 9471-C.
- Agua bidestilada grado CLAR, desgasificada.

Materiales

- Frascos de cultivo de área de crecimiento de 25 cm² y 75 cm². Costar, Co (U.S.A).
- Placas Transwell de 12 pozos, diámetro de 12mm (área superficial, 1.13cm²) con una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 0.4µm. Costar, Co (U. S. A), estériles.
- Tubos Falcon de 15 mL y 50 mL. Costar, Co (U.S.A), estériles.
- Pipetas pasteur con bulbo, estériles.
- Placas de 12 pozos. Costar, Co (U. S. A), estériles.
- Placas de fluorocromo de 96 pozos. MazSorp TM-Surface NUNC.
- Unidades de filtración para esterilización (membrana de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0.2 µm).
- Puntas azules con una capacidad de 1 mL para micropipetas, estériles.
- Puntas amarillas con una capacidad de 200 µL para micropipetas, estériles.
- Filtros con membranas de nitrocelulosa con diámetro de poro de 0.2 µm, estériles.
- Cámara de Neubauer.
- Micropipetas-Transferpette CE (20-200 µL). Brand (Alemania), lote 07B4591.
- Micropipetas-Transferpette CE (200-1000 µL). Brand (Alemania), lote 04B8144.
- Guantes de látex estériles. PROTEC™ (México).
- Gasas no estériles.
- Masking tape.
- 10 frascos limpios con una capacidad de 5mL cada uno.
- Matraces aforados de 10mL.
- Matraces Erlenmeyer de 1L.
- Probetas graduadas de 1L.
- Criotubos con una capacidad de 2 mL.
- Agitador magnético.
- 5 vasos de precipitados de 100 mL.

Equipo

- Balanza Analítica Scientech, modelo SA210 (U.S.A).
- Gabinete de Flujo Laminar NUAIRE, Clase II Tipo A2, modelo UN-425-400.
- Centrifuga Clínica Mikro 22, modelo 1110-01 (Alemania).
- Incubadora NuAire IR AUTO FLOW.
- Microscopio Invertido Zeiss (Alemania Occidental).
- Potenciómetro Prazisions, modelo E510 (Científica Internacional, S.A.)
- Vortex-Genie 2, modelo G-560.
- Voltímetro para tejido epitelial EVOM y un electrodo EndHOM-12 (World Precision Instruments, Sarasota, FL).
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). Arreglo de fotodiodos Waters.
- Agitador de platillos, modelo QW4587.
- Parrilla con agitador magnético, modelo HG4589.

I. Descongelamiento de células

1. Preparación de los frascos de cultivo de 25 y 75 cm² de superficie con 5 y 7 mL de medio de DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado. respectivamente.*
2. Retirar los tubos con células de las condiciones de criogénia (N₂ líquido a -196 °C).
3. Colocar los criotubos en baño maría a 37°C, hasta que se descongelen completamente.
4. Secar y limpiar con una solución de EtOH al 70%, en el gabinete de flujo laminar.
5. Destapar y verter el contenido de los criotubos en los frascos de cultivo previamente preparados.*
6. Agitar suavemente para distribuir la población celular. *
7. Aflojar la tapa de los frascos dentro de la estufa incubadora.
8. Dejar que las células que se adhieran por 24 hrs a 37 °C, 5% CO₂ y 95% HR.
9. Cambio de medio de cultivo.

* Actividades que se realizaron en el gabinete de flujo laminar.

Nota: Para consultar la preparación del medio de cultivo (DMEM suplementado), ver el anexo A.

II. Cultivo y mantenimiento de la línea celular Caco-2 (siembra, proliferación y tripsinización).

Para el manejo de la línea celular Caco-2, así como la preparación del medio de cultivo celular y de otros reactivos, se llevó a cabo en un gabinete de flujo laminar equipada con una lámpara de luz UV que permitió proporcionar un ambiente estéril en el interior de la gabinete.

La línea celular Caco-2 cepa ASI4 de pase 74 fue donada por el Dr. Ismael Hidalgo de los Laboratorios Absorption Systems (Exton, PA).

Siembra

1. Sembrar las células en los frascos de cultivo 25 cm² de superficie con 5 mL de medio de cultivo de DMEM suplementado.
2. Incubar a 37 °C, 5% CO₂ y 95% HR por 24 hrs.
3. Verificar al microscopio la adhesión celular.

Proliferación celular

4. Cambiar el medio de cultivo cada 48 hrs, hasta obtener una confluencia celular cercana del 80 - 90%.

Tripsinización

5. Eliminar el medio de DMEM de los frascos de cultivo.
6. Adicionar 5 mL de amortiguador de fosfatos isotónico y estéril pH 7.4. Homogenizar manualmente y eliminar el amortiguador.
7. Adicionar 1.5 mL de tripsina e incubar por 5 min a 37°C, 5 % CO₂ y 95% HR.
8. Agregar 5 mL de medio de DMEM suplementado. Homogenizar manualmente.
9. Transvasar a un tubo Falcon de 15 mL de capacidad y centrifugar a 2000 rpm por 5 min a temperatura ambiente.
10. Desechar el medio y resuspender el botón celular.
11. Adicionar 3 mL de medio DMEM suplementado. Homogenizar manualmente.
12. Recuento celular (6×10^5 células/mL).
13. Siembra en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie. Homogenizar manualmente y en forma circular.

El mismo procedimiento se llevó a cabo para la siembra de los frascos de cultivo de 75 cm² de superficie, sólo difiere en los volúmenes de los reactivos utilizados (tres veces el volumen requerido para los frascos de cultivo de 25 cm²).

III. Recuento celular

1. Colocar una gota de la suspensión celular en la cámara de Neubauer.
2. Observar y contabilizar en el microscopio invertido, las células que se encuentren en los cinco cuadrantes de la cámara.
3. Realizar las diluciones necesarias para tener una cantidad aproximadamente de 6×10^5 a 1×10^6 células/mL.
4. Sembrar en frascos de cultivo.

IV. Criopreservación de células

1. Eliminar el medio de DMEM de los frascos de cultivo.
2. Tripsinizar las células de los frascos de cultivo.
3. Realizar una cuenta celular de 1×10^6 células/mL.
4. Preparación del medio de congelamiento.*
5. Llevar a volumen requerido con medio de cultivo (DMEM) fresco.
6. Refrigerar entre $0 - 5$ °C por 4 hrs.
7. Congelar a -20 °C por 4 hrs y por último colocar los criotubos en el tanque de nitrógeno líquido a -196 °C .

** La preparación del medio de congelamiento (criopreservación) consultar el anexo A.*

V. Preparación de las celdas transwell

Para la preparación de las celdas transwell, se preparó una solución de colágena a una concentración de 0.9 mg/mL. Para ver los detalles consultar el anexo A.

- Recubrimiento de las membranas de policarbonato
 1. Colocar 200 μ L de la solución de colágena (0.9 mg/mL) a cada canastilla de la placa transwell. Agitar lentamente y en forma circular.
 2. Dejar evaporar el EtOH (que contiene la solución de colágena) de la placa, tapar la placa y guardar a 37 °C por 3 días en el cuarto caliente.
 3. Rotular con la fecha de recubrimiento y guardar.
 4. Irradiar las placas transwell con las tapas abiertas con UV por 30 min en el gabinete, el día de su uso.

Nota: El recubrimiento de las placas transwell se realizó en el gabinete.

VI. Cultivo celular en insertos Transwell

1. Tripsinizar los frascos de cultivo que presentaran una confluencia de cercana entre 80 - 90%.
2. Cuenta celular.
3. Preparar una suspensión de células (8×10^5 células en 13 mL).
4. Colocar 0.5 mL de la suspensión de células en la celda (6×10^4 células) y 1.5 mL de medio de cultivo en el pozo. Incubar a 37°C , 5% CO_2 y 95% HR.
5. En los primeros 7 días, cambiar medio cada 48 hrs. A partir del día 8 hasta el día 28, cambiar medio cada 24 hrs.
6. Estudios de integridad de las monocapas celulares.

VII. Integridad de la monocapa

Para verificar la integridad de la monocapa celular de 28 días de cultivo, se determinará midiendo la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) y el *Papp* de Lucifer Yellow.

- Medición de la TEER.

1. Retirar totalmente el medio de cultivo de toda la placa.
2. Adicionar solución de Hank's (HSSB) pH 7.4 a 37°C .
3. Lavar 3 veces con la HSSB pH 7.4 toda la placa.
4. En el último lavado, adicionar 0.5 mL de la misma solución en la celda y 1.5 mL en el pozo (en toda la placa).
5. Incubar a 37°C , 5% CO_2 , 95% HR por 30 min.
6. Medir la resistencia eléctrica de cada transwell con un voltímetro EVOM (Fig. 13).



Figura 13 . Representación de la Medida de la Resistencia Eléctrica Transepitelial (TEER)

- Determinación del *Papp* de Lucifer Yellow.

El Lucifer Yellow (colorante 4-aminonaftalimida sustituido (Fig. 14) de intensa fluorescencia, fácilmente visible en células vivas a concentraciones y niveles de iluminación a los cuales no es tóxico). Debido a su bajo peso molecular (457.2) y solubilidad en agua, el colorante no cruza la membrana celular, propiedad que ha sido utilizada para determinar los cambios en la permeabilidad de las uniones intercelulares ya que esta es la ruta que sigue para pasar de un lado de la célula al otro.

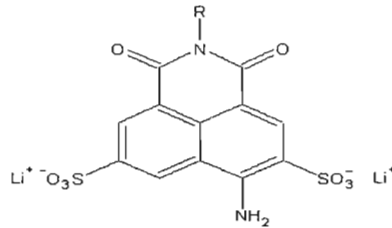


Figura 14. Lucifer Yellow

1. Concluidos los estudios de transporte, preparar una solución de Lucifer Yellow a una concentración 100 μM , a partir de una solución stock 1 mM.*
2. Colocar en cada celda transwell, 0.5 mL de la solución de Lucifer Yellow 100 μM y 1.5 mL de HSSB pH 7.4 en cada pozo.
3. Incubar a 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 con agitación continua a 75 rpm por 30 min.**
4. Realizar una curva patrón de Lucifer Yellow, en un intervalo de 0.3125 μM a 100 μM .
5. Tomar alícuotas de 200 μL por duplicado de cada pozo de toda la placa.
6. Leer las muestras por fluorometría con una $\lambda_{\text{emisión}} = 538 \text{ nm}$ y una $\lambda_{\text{excitación}} = 485 \text{ nm}$.
7. Cálculo del *Papp* del colorante.

* Para la preparación de las soluciones, el aforo es con HSSB pH 7.4

** La agitación de las placas se realizó con un agitador de platillos.

Nota: Para ver los detalles de la preparación de la solución stock 1 mM y la curva patrón de Lucifer Yellow, consultar el anexo B.

VIII. Estudios de transporte de A-B y B-A

1. Preparar una solución de cada compuesto (FHL 21, FHL 30, FHL 31, FHL 33, FHL 34, FHL 35, propranolol y atenolol) a una concentración 100 μM con HSSB pH 7.4.
2. Terminando de medir la TEER de cada inserto, se elimina el medio de transporte de ambos lados de la celda.

Transporte de B-A

1. Adicionar 1.5 mL de la solución del compuesto prueba en el pozo y 0.5 mL de HSSB pH 7.4 en la celda transwell.
2. Trabajar a una temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 y con una agitación constante de 75 rpm, durante todo el experimento.
3. Del lado apical, muestrear 200 μL a los 0, 15, 30, 45, 60 y 90 min (con reposición de HSSB pH 7.4) y del lado donador tomar 1 mL.

Transporte de A-B

1. Adicionar 0.5 mL de la solución del compuesto prueba en la celda y 1.5 mL de HSSB pH 7.4 en el pozo.
2. Trabajar a una temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 y con una agitación constante de 75 rpm, durante todo el experimento.
3. Del lado basolateral, muestrear 0.5 mL a los 0, 15, 30, 45, 60 y 90 min (con reposición de HSSB pH 7.4) y del lado donador tomar 0.5 mL.
4. Todas las muestras (para ambos transportes) se guardaron en tubos eppendorf a 4 $^{\circ}\text{C}$ hasta el día del análisis por CLAR.

Nota:

- La agitación de las muestras se realizaron con un agitador de platillos.
- Para el estudio de los diferentes transportes (A-B y B-A), se realizó en el cuarto caliente de la unidad de investigación de parasitología.

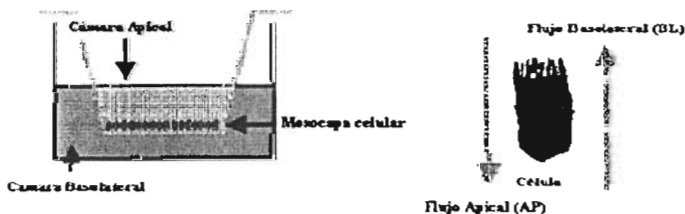


Figura 15. Representación esquemática del método de difusión in vitro basado en el cultivo de la línea celular Caco2 sobre un filtro soporte, que permite discriminar el flujo apical y basolateral a través de la monocapa celular.

IX. Método analítico por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

Para el análisis de las muestras de cada compuesto, se utilizaron las siguientes condiciones cromatográficas:

- ☛ Flujo: 0.7 mL/ min.
- ☛ Fase móvil: Solución de Ácido Acético al 0.5%: Acetonitrilo con Ácido Acético al 0.5% (30:70).
- ☛ Longitud de onda máximas utilizadas para cada compuesto:

Compuesto	Longitud de onda máxima (nm)
FHL 34, FHL 30 y FHL 21. Atenolol, FHL 35, FHL 31 y FHL 33.	254
Propranolol.	280
	290

- ☛ Columna Atlantis™ dC18 Waters, tamaño de poro 5µm, longitud 3.9 x 150 mm.
- ☛ Las muestras, así como las curvas patrón se prepararon con HSSB pH 7.4.
- ☛ Volumen de inyección: 50 µL.
- ☛ Equipo utilizado:
 - Bombas: Dos bombas isocráticas, Waters 1525, Modelo 25 P.
 - Inyector: Manual, loop de 20 µL.
 - Detector: Arreglo de Fotodiodos, Waters 996.

Preparación de las muestras del estudio.

1. Preparar soluciones de cada compuesto a una concentración 10 mM (ver anexo B).
2. Tomar 100 µL y aforar a 10 mL con HSSB pH 7.4 para tener una solución 100 µM.
3. Realizar los estudios de transporte.
4. Colectar muestras.
5. Filtrar cada muestra con un filtro de tamaño de poro de 0.4 µm.
6. Inyectar 50 µL de cada muestra en el inyector del equipo CLAR.

X. Determinación del coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) de los compuestos derivados del ácido 2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol-5-ilcarboxílico.

Para cada compuesto se preparó una curva estándar en HSSB a las siguientes concentraciones: 1, 5, 10, 25, 40, y 50 μM ; incluyendo para los compuestos de referencia de permeabilidad (atenolol y propranolol). Todas las muestras fueron analizadas por CLAR, conforme al método ya descrito.

Para el cálculo del P_{app} , se graficó la cantidad acumulada de traslado del compuesto con respecto al tiempo, calculándose la pendiente de la curva (dC/dt) por mínimos cuadrados y sustituyendo el valor obtenido en la siguiente ecuación:

$$P_{app} = \left(\frac{dC}{dt} \right) \left(\frac{V_r}{A * C_o} \right)$$

Donde:

dC/dt = Velocidad de paso del compuesto a través de la monocapa ($\mu\text{M/s}$).

V_r = Volumen del lado receptor (cm^3).

A = Área del cultivo de la monocapa (cm^2).

C_o = Concentración del compuesto en el lado donador (μM).

Nota: La preparación de las curvas patrón y de las soluciones 10 mM de cada compuesto se encuentran en el anexo B.

5. RESULTADOS

En la identificación y cuantificación de los compuestos derivados del ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-ilcarboxílico se utilizó el método analítico de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) anteriormente descrito.

En el anexo C se muestran los cromatogramas, así como, los espectros de UV para cada compuesto analizado. Para la cuantificación se llevó a cabo la preparación de curvas patrón para cada compuesto en estudio, las cuales se encuentran en el anexo B.

La cuantificación de las muestras colectadas para cada compuesto a diferentes tiempos en los ensayos de transporte, se realizó empleando el método analítico mencionado en el procedimiento experimental.

Para cada estudio de transporte se utilizaron de 3 a 6 insertos transwell, el número de insertos utilizados variaba en función de la integridad de la membrana. La integridad de la membrana se verificó determinando el coeficiente de *Papp* de Lucifer Yellow el cual fue de 1×10^{-7} cm/s (se realizó al final de cada estudio de cinética de transporte); además, también se utilizaron los valores de TEER, la cual oscilaba después de 28 días de cultivo entre 300 a 600 Ωcm^2 (ésta determinación se llevó a cabo tanto al principio como al final de cada estudio).

A continuación se presentan los datos de concentración a diferentes tiempos para cada compuesto:

Atenolol

Las concentraciones acumuladas de cada inserto a diferentes tiempos en la cinética de transporte A-B y B-A se encuentran reportadas en la Tabla 6 y en la Tabla 7, respectivamente.

Tabla 6. Concentración (μM) de atenolol para el transporte A-B

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4	Inserto 5	Promedio \pm DS*
0 – 3600	0	0	0	0	0	0
5400	0.81	1.28	0.68	0.89	0.71	0.874 \pm 0.242

DS* = Desviación Estándar

Tabla 7. Concentración (μM) de atenolol para el transporte B-A

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4	Inserto 5	Inserto 6	Promedio \pm DS
0 - 2700	0	0	0	0	0	0	0
3600	0.19	0.17	0	0.29	0.28	0.32	0.208 ± 0.118
5400	1.44	1.33	1.33	1.17	1.36	1.53	1.360 ± 0.121

La representación gráfica de las concentraciones obtenidas para la cinética A-B y de B-A a diferentes tiempos, se observan en la Figura 16 y 17, respectivamente.

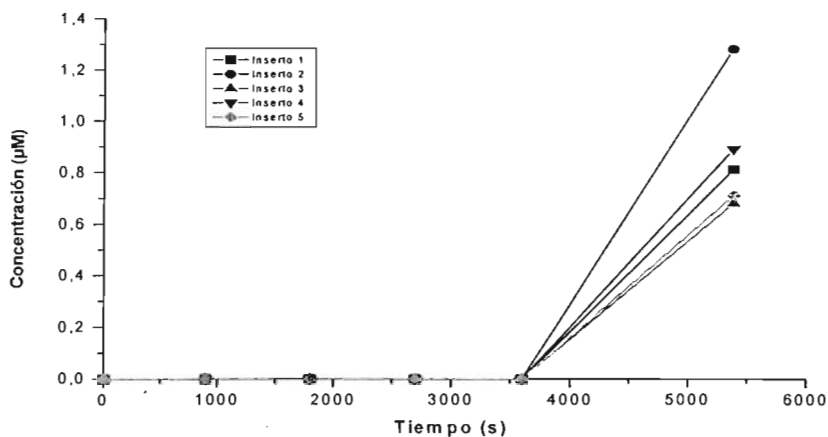


Figura 16. Cinética de transporte del atenolol de A-B.

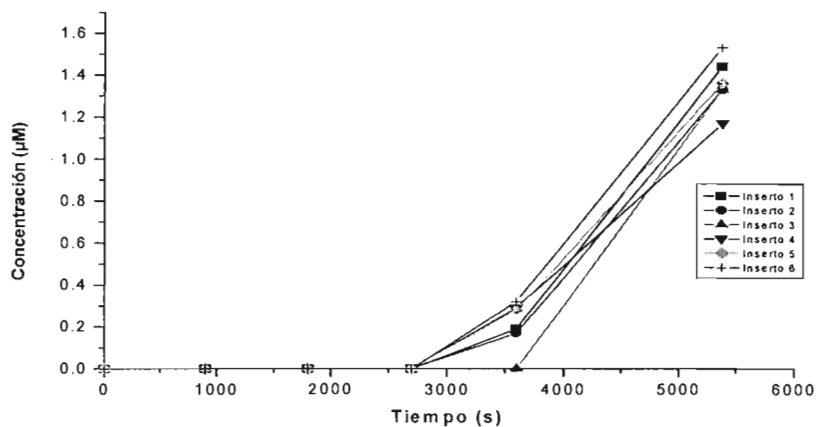


Figura 17. Cinética de transporte del atenolol de B-A.

Para apreciar el comportamiento que presenta el atenolol en el transporte A-B y B-A, se muestran en la Tabla 8 las concentraciones promedio para cada tiempo de muestreo. En la Figura 18 se representa de manera gráfica las concentraciones promedio en función del tiempo.

Tabla 8. Concentración promedio (μM) de atenolol para el transporte A-B y B-A

Tiempo (s)	A-B	B-A
0 - 2700	0.00	0.00
3600	0.00	0.21
5400	0.87	1.36

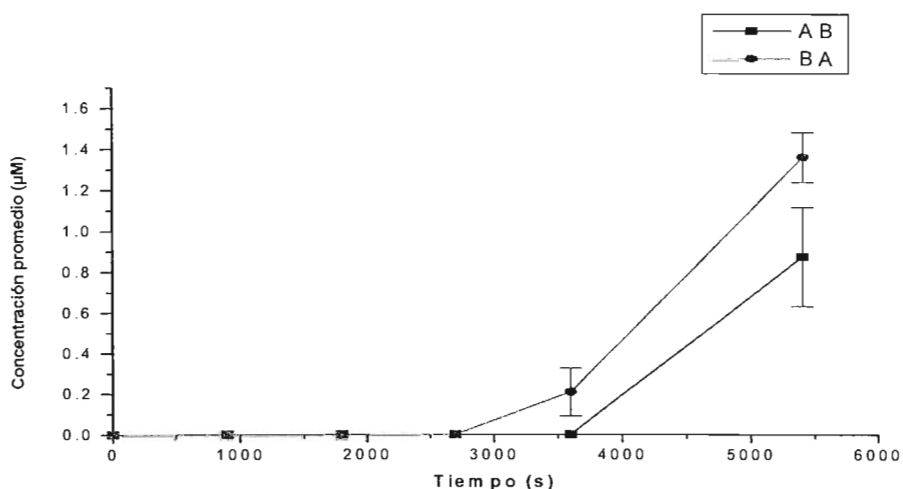


Figura 18. Cinética de transporte del atenolol determinada de A-B y B-A.

Propranolol

Las concentraciones acumuladas de cada inserto a diferentes tiempos en la cinética de transporte A-B y B-A se encuentran en la Tabla 9 y en la Tabla 10, respectivamente.

Tabla 9. Concentración (μM) de propranolol para el transporte A-B

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4	Inserto 5	Promedio \pm DS
0	0	0	0	0	0	0
900	5.67	6.04	5.61	6.01	4.28	5.522 ± 0.721
1800	11.70	12.51	11.58	12.60	10.11	11.700 ± 1.001
2700	17.34	19.27	17.59	18.15	15.78	17.626 ± 1.272
3600	22.86	26.58	23.41	24.36	23.13	24.068 ± 1.514
5400	34.14	39.00	35.58	35.88	34.91	35.902 ± 1.857

Tabla 10. Concentración (μM) de propranolol en el transporte B-A

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4	Inserto 5	Promedio \pm DS
0	0	0	0	0	0	0
900	10.02	7.93	2.77	2.98	2.51	5.242 ± 3.491
1800	17.00	18.34	28.96	32.03	32.56	25.778 ± 7.543
2700	52.52	51.10	45.35	47.61	48.38	48.992 ± 2.848
3600	65.41	64.04	56.85	59.03	58.64	60.794 ± 3.713
5400	82.84	78.34	69.12	71.65	68.33	74.056 ± 6.294

La representación gráfica de las concentraciones obtenidas para la cinética A-B y de B-A a diferentes tiempos, se observan en la Figura 19 y 20, respectivamente.

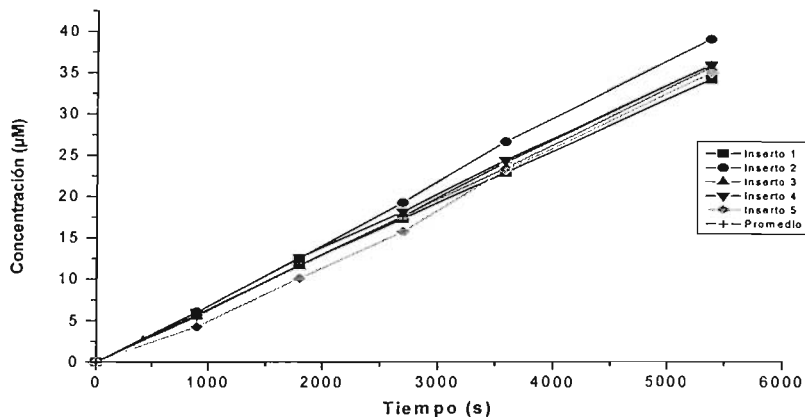


Figura 19. Cinética de transporte del propranolol de A-B.

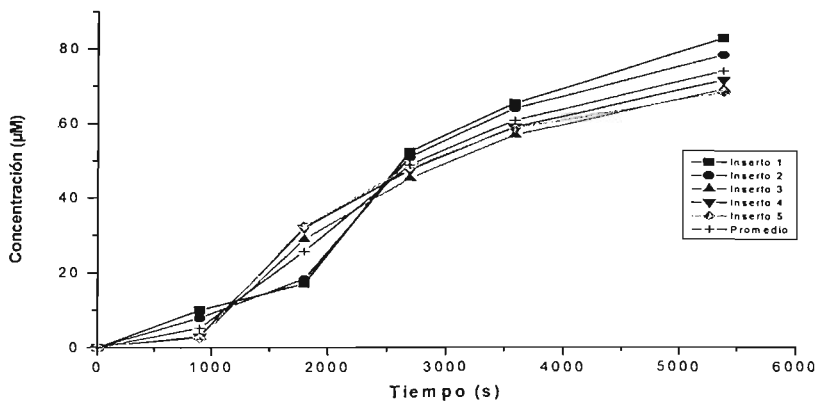


Figura 20. Cinética de transporte del propranolol de B-A.

En la Tabla 11. se muestran los resultados de la cinética de transporte A-B y B-A para el Propranolol. En la Figura 21 se representa de manera gráfica las concentraciones promedio en función del tiempo.

Tabla 11. Concentración promedio (μM) de propranolol para el transporte A-B y B-A

Tiempo (s)	A-B	B-A
0	0.00	0.00
900	5.52	5.24
1800	11.70	25.78
2700	17.63	48.99
3600	24.07	60.80
5400	35.90	74.06

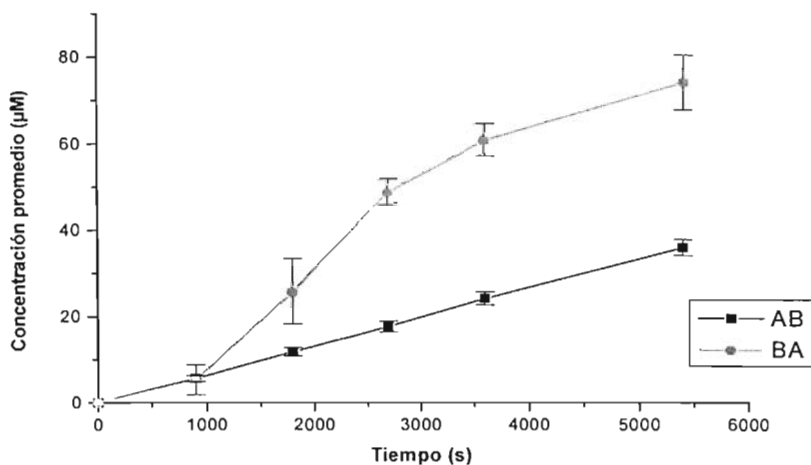


Figura 21. Cinética de transporte del propranolol determinada de A-B y B-A.

FHL 21

Las concentraciones acumuladas de cada inserto a diferentes tiempos en la cinética de transporte A-B y B-A se encuentran reportadas en la Tabla 12 y Tabla 13, respectivamente.

Tabla 12. Concentración (μM) del FHL 21 para el transporte A-B

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Promedio \pm DS
0	1.45	1.61	1.57	0
900	3.11	3.14	3.21	1.543 ± 0.083
1800	5.03	5.07	5.00	3.153 ± 0.051
2700	6.90	7.05	6.85	5.033 ± 0.035
3600	13.68	13.74	13.51	6.933 ± 0.104
5400	1.45	1.61	1.57	13.643 ± 0.119

Tabla 13. Concentración (μM) del FHL 21 para el transporte B-A

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Promedio \pm DS
0	0	0	0	0
900	2.81	2.07	2.92	2.600 ± 0.462
1800	9.35	5.33	8.74	7.807 ± 2.166
2700	14.08	11.24	14.86	13.393 ± 1.905
3600	20.16	16.53	20.32	19.003 ± 2.143
5400	37.49	34.94	37.17	36.533 ± 1.389

La representación gráfica de las concentraciones obtenidas para la cinética A-B y de B-A a diferentes tiempos, se observan en la Figura 22 y 23, respectivamente.

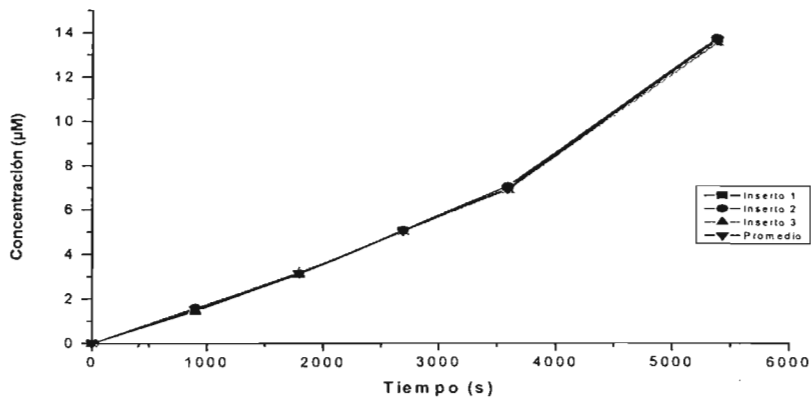


Figura 22. Cinética de transporte del FHL 21 de A-B.

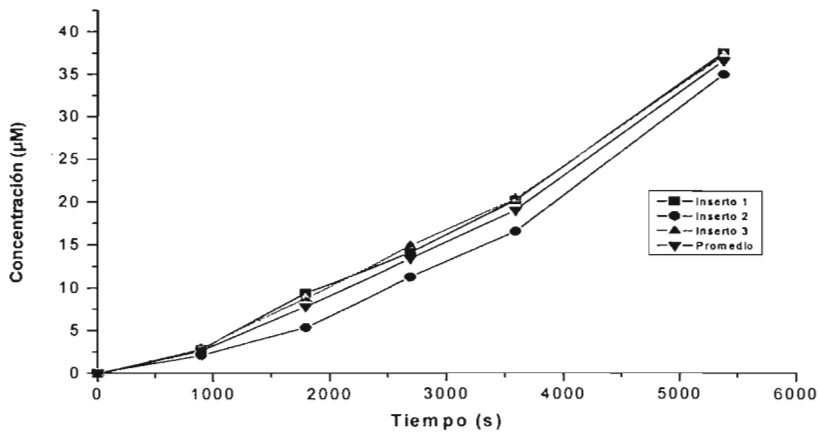


Figura 23. Cinética de transporte del FHL 21 de B-A.

En la Tabla 14, se muestran las concentraciones promedio del FHL 21 para cada tiempo de muestreo en el transporte A-B y B-A. En la Figura 24 se representa de manera gráfica las concentraciones promedio en función del tiempo.

Tabla 14. Concentración promedio (μM) del FHL 21 para el transporte A-B y B-A

Tiempo (s)	A-B	B-A
0	0	0
900	1.54	2.60
1800	3.16	7.81
2700	5.03	13.39
3600	6.93	19.00
5400	13.64	36.53

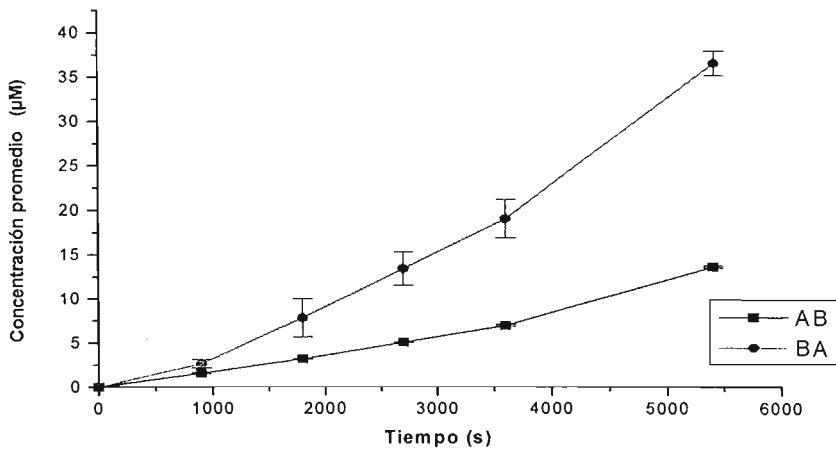


Figura 24. Cinética de transporte del FHL 21 determinada de A-B y B-A.

FHL 30

Las concentraciones acumuladas de cada inserto a diferentes tiempos en la cinética de transporte A-B y B-A se encuentran reportados en la Tabla 15 y Tabla 16, respectivamente.

Tabla 15. Concentración (μM) del FHL 30 para el transporte A-B

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4	Inserto 5	Promedio \pm DS
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0
900	0.75	0.54	0.88	0.89	0.77	0.766 ± 0.141
1800	1.39	0.88	1.71	1.74	1.70	1.484 ± 0.366
2700	1.86	1.80	2.51	2.37	2.39	2.186 ± 0.330
3600	4.19	4.16	5.07	4.98	5.28	4.736 ± 0.524
5400	7.93	7.99	8.84	9.53	9.82	8.822 ± 0.864

Tabla 16. Concentración (μM) del FHL 30 para el transporte B-A

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4	Inserto 5	Promedio \pm DS
0	0	0	0	0	0	0
900	1.37	1.26	1.41	1.07	1.28	1.278 ± 0.132
1800	3.21	3.75	5.37	2.75	2.99	3.614 ± 1.049
2700	5.79	6.45	7.84	5.26	5.55	6.178 ± 1.028
3600	8.30	8.72	9.86	7.64	7.96	8.496 ± 0.862
5400	11.79	14.22	11.27	13.25	14.07	12.920 ± 1.334

La representación gráfica de las concentraciones obtenidas para la cinética A-B y de B-A a diferentes tiempos, se observan en la Figura 25 y 26, respectivamente.

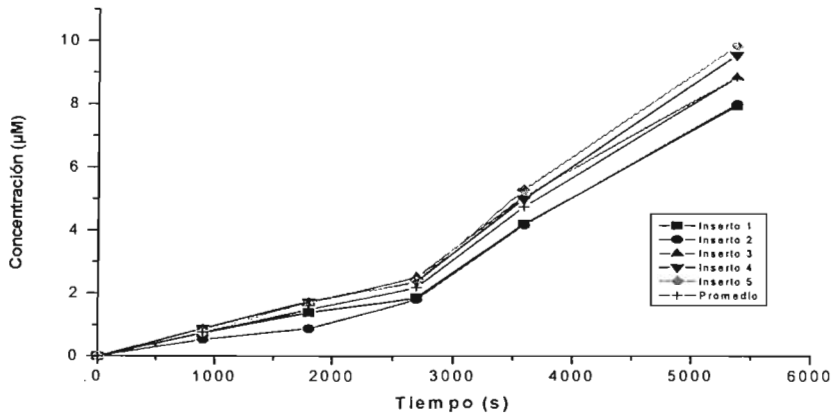


Figura 25. Cinética de transporte del FHL 30 de A-B.

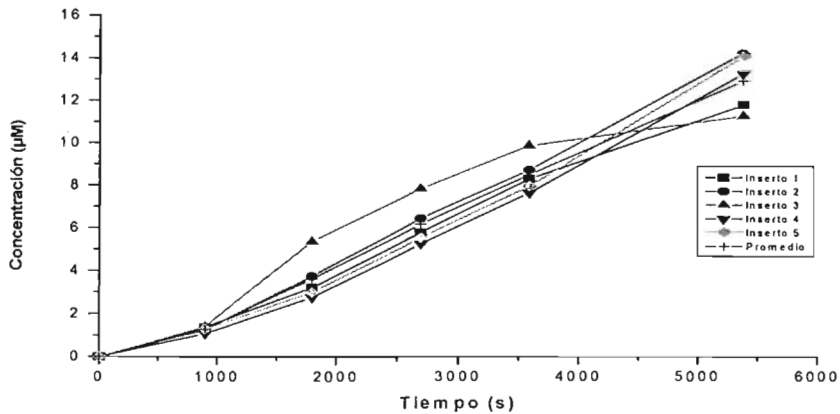


Figura 26. Cinética de transporte del FHL 30 de B-A.

El comportamiento que presenta el FHL 30 en el transporte A-B y B-A se muestra en la Tabla 17. En la Figura 27 se representa de manera gráfica las concentraciones promedio en función del tiempo.

Tabla 17. Concentración promedio (μM) del FHL 30 para transporte A-B y B-A

Tiempo (s)	A-B	B-A
0	0.00	0.00
900	0.77	1.28
1800	1.48	3.61
2700	2.19	6.18
3600	4.74	8.49
5400	8.82	12.92

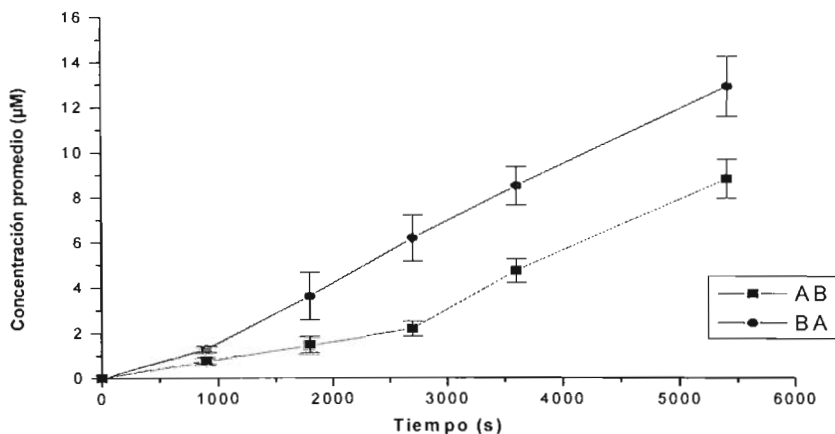


Figura 27. Cinética de permeabilidad del FHL 30 determinada de A-B y B-A.

FHL 31

Las concentraciones acumuladas de cada inserto a diferentes tiempos en la cinética de transporte A-B y B-A se encuentran reportados en la Tabla 18 y Tabla 19, respectivamente.

Tabla 18. Concentración (μM) del FHL 31 para el transporte A-B

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4	Inserto 5	Promedio \pm DS
0	0	0	0	0	0	0
900	1.00	1.11	1.13	1.06	1.16	1.092 ± 0.063
1800	1.96	2.13	2.26	2.11	2.18	2.128 ± 0.110
2700	2.95	3.15	3.44	3.26	3.30	3.220 ± 0.183
3600	4.10	4.24	4.45	4.30	4.32	4.282 ± 0.127
5400	5.87	6.25	6.18	6.04	6.70	6.208 ± 0.311

Tabla 19. Concentración (μM) del FHL 31 para el transporte B-A

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4	Inserto 5	Promedio \pm DS
0	0	0	0	0	0	0
900	4.49	4.64	4.42	4.28	4.00	4.366 ± 0.242
1800	7.05	7.19	6.88	7.21	6.34	6.934 ± 0.357
2700	8.74	8.90	8.70	9.30	7.65	8.658 ± 0.611
3600	9.66	9.85	9.70	10.40	8.77	9.676 ± 0.587
5400	17.46	17.30	17.63	12.09	9.96	14.888 ± 3.608

Los gráficos correspondientes para cada cinética de transporte (A-B y B-A), se muestran en la Figura 28 y 29, respectivamente.

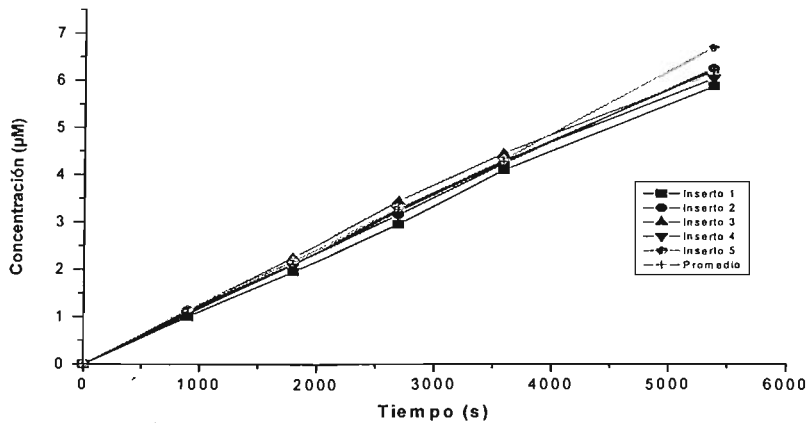


Figura 28. Cinética de transporte del FHL 31 de A-B.

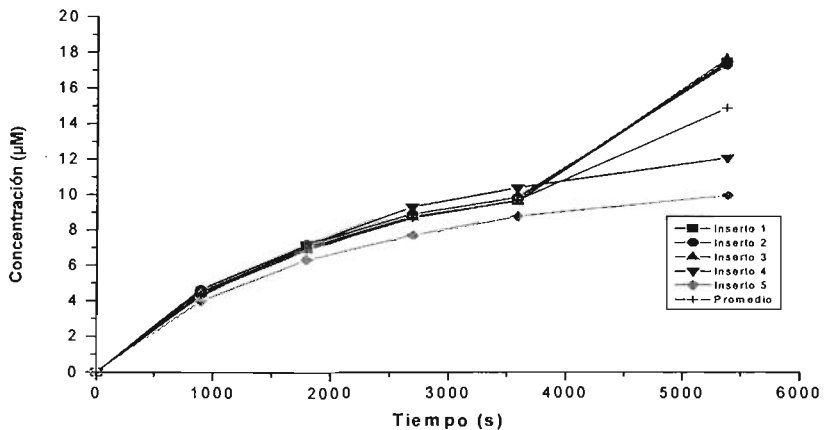


Figura 29. Cinética de transporte del FHL 31 de B-A.

En la Tabla 20, se muestran los resultados de la cinética transporte A-B y B-A para el FHL 31. En la Figura 30 se representa de manera gráfica las concentraciones promedio en función del tiempo.

Tabla 20. Concentración promedio (μM) del FHL 31 para transporte A-B y B-A

Tiempo (s)	A-B	B-A
0	0.00	0.00
900	1.09	4.37
1800	2.13	6.93
2700	3.22	8.66
3600	4.28	9.68
5400	6.21	14.89

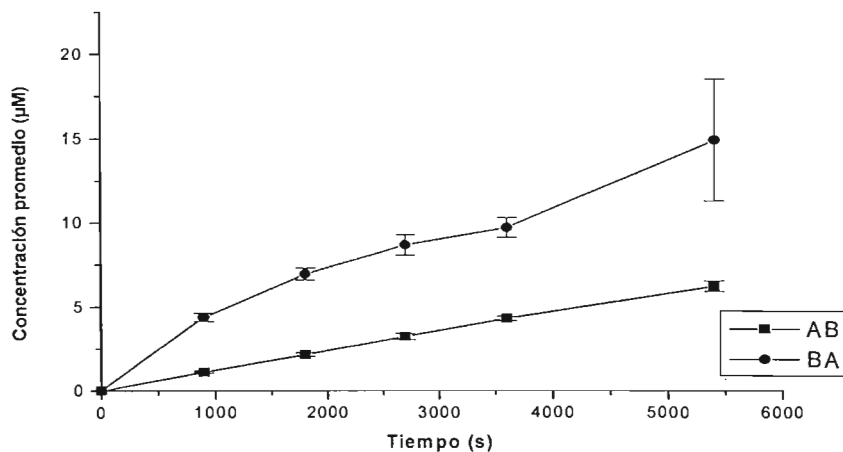


Figura 30. Cinética de transporte del FHL 31 determinada de A-B y B-A.

FHL 33

Las concentraciones acumuladas de cada inserto a diferentes tiempos en la cinética de transporte A-B y B-A se encuentran reportados en la Tabla 21 y Tabla 22, respectivamente.

Tabla 21. Concentración (μM) del FHL 33 para el transporte A-B

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4	Inserto 5	Inserto 6	Promedio \pm DS
0	0	0	0	0	0	0	0
900	0.41	0.68	0.49	1.03	0.61	0.58	0.633 ± 0.216
1800	0.83	1.27	1.01	1.85	1.33	1.10	1.232 ± 0.352
2700	1.29	1.80	1.49	2.41	2.01	1.78	1.797 ± 0.393
3600	1.99	2.76	2.50	3.24	2.89	2.45	2.638 ± 0.428
5400	6.20	5.32	5.86	7.18	6.80	6.21	6.262 ± 0.661

Tabla 22. Concentración (μM) del FHL 33 para el transporte B-A

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4	Inserto 5	Inserto 6	Promedio \pm DS
0	0	0	0	0	0	0	0
900	1.60	2.56	3.02	2.63	2.60	2.46	2.478 ± 0.471
1800	2.91	3.76	4.38	4.71	3.99	3.90	3.942 ± 0.614
2700	4.74	5.16	5.75	5.92	5.35	5.26	5.363 ± 0.424
3600	5.95	6.48	7.33	7.36	6.67	6.55	6.723 ± 0.541
5400	11.11	11.43	12.18	12.20	11.67	11.43	11.670 ± 0.440

Los gráficos correspondientes para cada cinética de transporte (A-B y B-A), se muestran en la Figura 31 y 32, respectivamente.

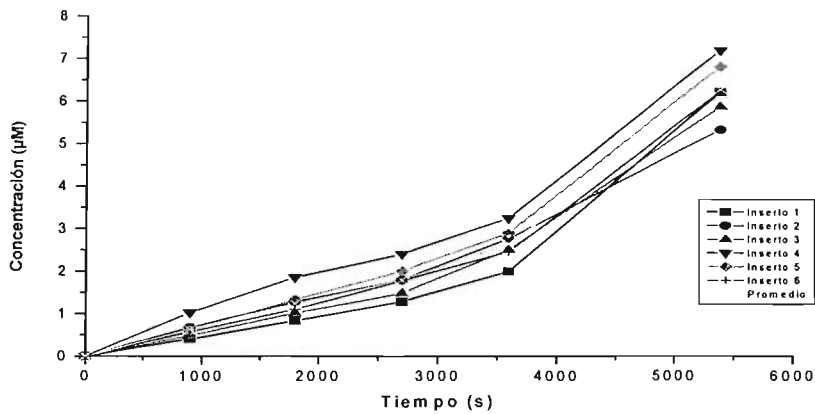


Figura 31. Cinética de transporte del FHL 33 de A-B.

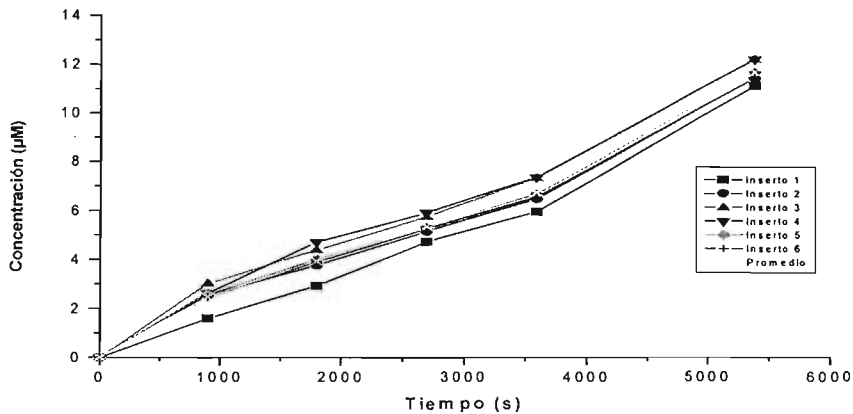


Figura 32. Cinética de transporte del FHL 33 de B-A.

Para apreciar el comportamiento que presenta el FHL 33 en el transporte A-B y B-A, se muestra a continuación en la Tabla 23. En la Figura 33 se representa de manera gráfica las concentraciones promedio en función del tiempo.

Tabla 23. Concentración promedio (μM) del FHL 33 para el transporte A-B y B-A

Tiempo (s)	A-B	B-A
0	0.00	0.00
900	0.63	2.48
1800	1.23	3.94
2700	1.80	5.36
3600	2.64	6.72
5400	6.26	11.67

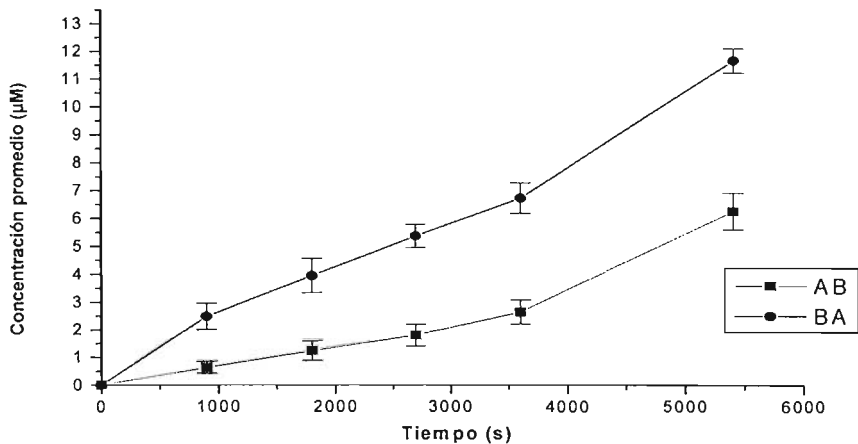


Figura 33. Cinética de transporte del FHL 33 determinada de A-B y B-A.

FHL 34

Las concentraciones acumuladas de cada inserto a diferentes tiempos en la cinética de transporte A-B y B-A se encuentran reportados en la Tabla 24 y Tabla 25, respectivamente.

Tabla 24. Concentración (μM) del FHL 34 para el transporte A-B

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Promedio \pm DS
0	0	0	0	0
900	1.88	1.71	1.90	1.830 ± 0.104
1800	4.56	4.58	4.16	4.433 ± 0.237
2700	6.28	6.23	5.54	6.017 ± 0.414
3600	7.94	7.14	6.45	7.177 ± 0.746
5400	11.53	11.12	10.30	10.983 ± 0.626

Tabla 25. Concentración (μM) del FHL 34 para el transporte B-A

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Promedio \pm DS
0	0	0	0	0
900	3.84	2.56	2.47	2.957 ± 0.766
1800	5.81	5.32	6.80	5.977 ± 0.754
2700	9.01	11.85	13.39	11.417 ± 2.222
3600	13.01	12.53	14.28	13.273 ± 0.904
5400	14.64	38.29	41.93	31.620 ± 14.817

La representación gráfica de las concentraciones obtenidas para la cinética A-B y de B-A a diferentes tiempos, se observan en la Figura 34 y 35, respectivamente.

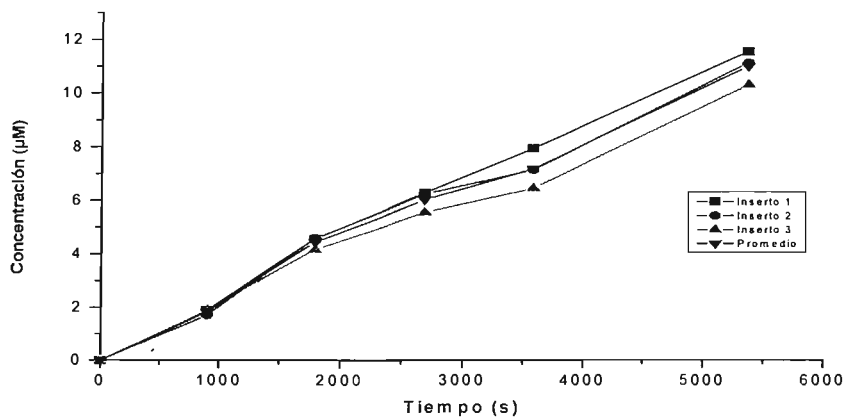


Figura 34. Cinética de transporte del FHL 34 de A-B.

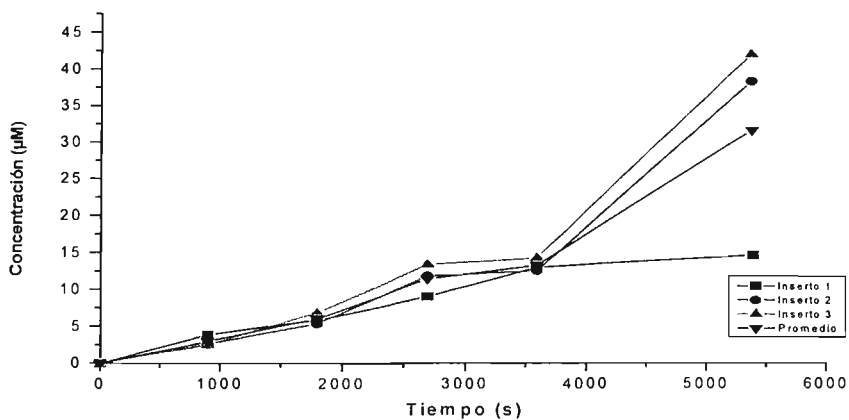


Figura 35. Cinética de transporte del FHL 34 de B-A.

En la Tabla 26, se muestran las concentraciones promedio para cada tiempo de muestreo del FHL 34 para el transporte A-B y B-A. En la Figura 36 se representa de manera gráfica las concentraciones promedio en función del tiempo.

Tabla 26. Concentración promedio (μM) del FHL 34 para el transporte A-B y B-A

Tiempo (s)	A-B	B-A
0	0	0
900	1.83	2.96
1800	4.44	5.98
2700	6.02	11.42
3600	7.18	13.27
5400	10.98	31.62

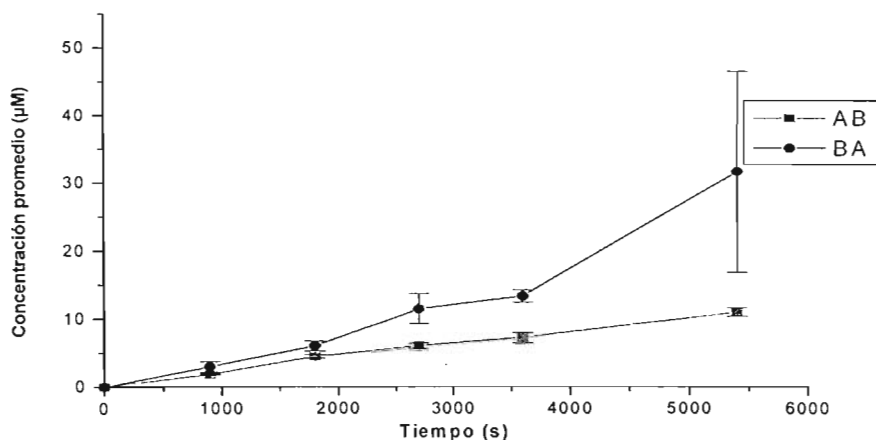


Figura 36. Cinética de transporte del FHL 34 determinada de A-B y B-A.

FHL 35

Las concentraciones acumuladas de cada inserto a diferentes tiempos en la cinética de transporte A-B y B-A se encuentran reportados en la Tabla 27 y Tabla 28, respectivamente.

Tabla 27. Concentración (μM) del FHL 35 para el transporte A-B

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4	Inserto 5	Inserto 6	Inserto 7	Inserto 8	Promedio \pm DS
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	2.41	2.79	2.76	3.40	3.43	2.62	3.69	3.05	3.019 ± 0.4450
1800	4.71	5.18	5.87	6.63	5.91	5.38	7.35	5.90	5.866 ± 0.831
2700	7.13	7.53	9.29	9.82	8.99	8.31	10.86	8.92	8.856 ± 1.207
3600	10.68	11.08	12.72	13.40	12.03	10.56	14.00	12.02	12.061 ± 1.260
5400	14.40	14.58	17.68	18.36	16.83	13.39	18.24	16.07	16.194 ± 1.897

Tabla 28. Concentración (μM) del FHL 35 para el transporte B-A

Tiempo (s)	Inserto 1	Inserto 2	Inserto 3	Inserto 4	Inserto 5	Inserto 6	Inserto 7	Inserto 8	Promedio \pm DS
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	4.25	4.04	5.31	5.66	4.31	4.08	4.97	6.91	4.941 ± 0.997
1800	6.73	6.75	8.66	9.03	6.70	6.82	8.11	9.95	7.844 ± 1.275
2700	9.02	8.89	11.39	11.18	13.33	9.15	10.48	12.15	10.699 ± 1.616
3600	15.56	17.28	17.84	16.81	20.19	18.14	19.68	20.54	18.255 ± 1.752
5400	22.41	25.47	22.99	21.93	28.95	30.32	29.80	35.49	27.170 ± 4.777

Los gráficos correspondientes para cada cinética de transporte, se muestran en la Figura 37 y 38, respectivamente.

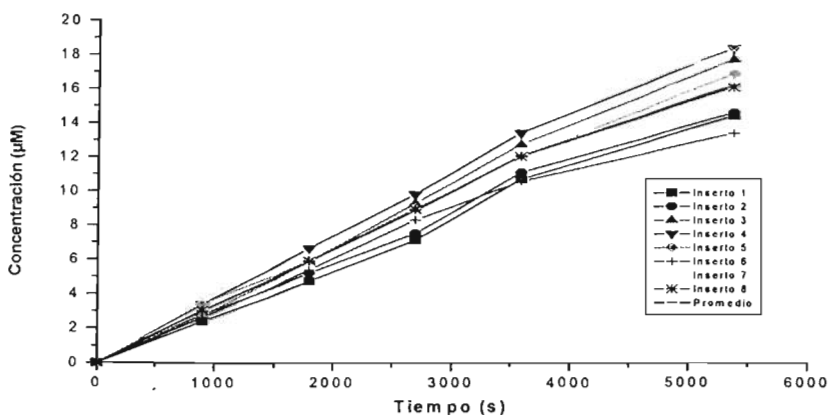


Figura 37. Cinética de transporte del FHL 35 de A-B.

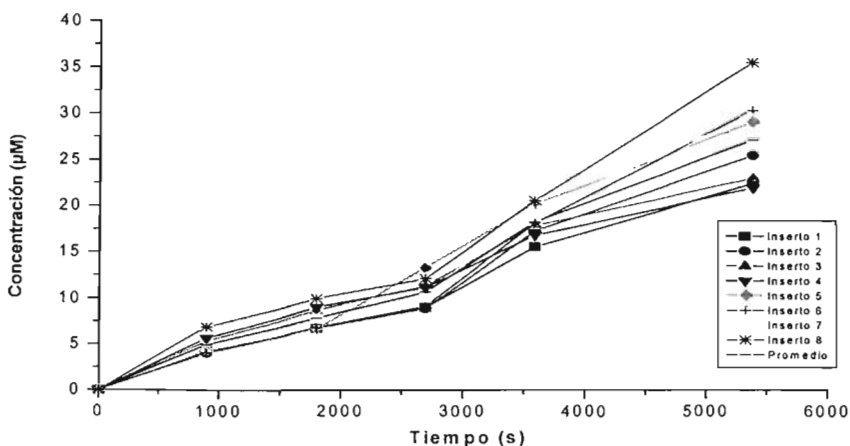


Figura 38. Cinética de transporte del FHL 35 de B-A.

En la Tabla 29 se muestran las concentraciones promedio para cada tiempo de muestreo del FHL 35, para el transporte A-B y B-A. En la Figura 39 se representa de manera gráfica las concentraciones promedio en función del tiempo.

Tabla 29. Concentración promedio (μM) del FHL 35 para el transporte A-B y B-A

Tiempo (s)	A-B	B-A
0	0.00	0.00
900	3.02	4.94
1800	5.87	7.84
2700	8.86	10.70
3600	12.06	18.25
5400	16.19	27.17

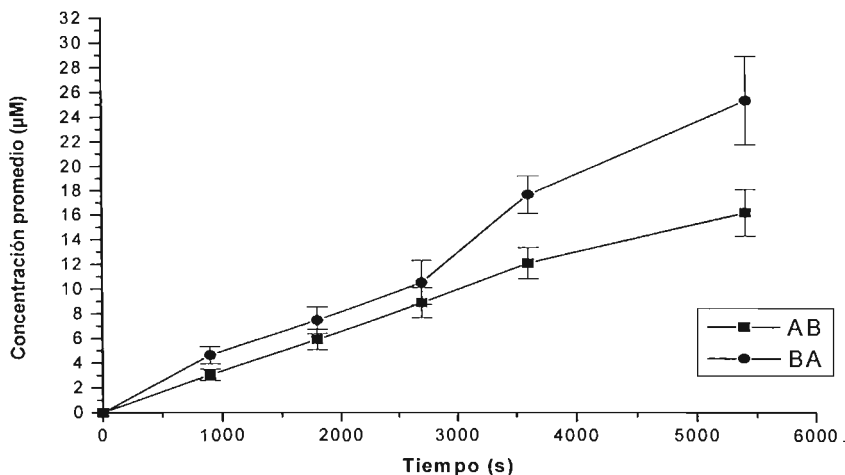


Figura 39. Cinética de transporte del FHL 35 determinada de A-B y B-A.

Análisis conjunto. Determinación del coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app})

En la Tabla 30 y 31, se observan los valores promedio de concentración de todos los compuestos analizados en este estudio, determinado para el transporte A-B y B-A. La cinética promedio para ambos transportes de estos compuestos se observa en las Figuras 40 y 41. Los compuestos que

presentan una mayor velocidad de permeación son el **FHL 21**, **FHL 34** y **FHL 35**, mientras que el **propranolol** y **atenolol** presentan una mayor y menor velocidad de permeación a través de las membranas biológicas de la línea celular Caco-2, respectivamente.

Tabla 30. Concentración promedio (μM) obtenida para el transporte A-B para todos los compuestos

Tiempo (s)	FHL 21	FHL 30	FHL 31	FHL 33	FHL 34	FHL 35	Atenolol	Propranolol
0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	2.60	1.28	4.37	2.48	2.96	4.94	0	5.24
1800	7.81	3.61	6.93	3.94	5.98	7.84	0	25.78
2700	13.39	6.18	8.66	5.36	11.42	10.70	0	48.99
3600	19.00	8.49	9.68	6.72	13.27	18.25	0.21	60.80
5400	36.53	12.92	14.89	11.67	31.62	27.17	1.36	74.06

Tabla 31. Concentración promedio (μM) obtenida para el transporte B-A para todos los compuestos

Tiempo (s)	FHL 21	FHL 30	FHL 31	FHL 33	FHL 34	FHL 35	Atenolol	Propranolol
0	0	0	0	0	0	0	0	0
900	1.54	0.77	1.09	0.63	1.83	3.02	0	5.52
1800	3.16	1.48	2.13	1.23	4.44	5.87	0	11.70
2700	5.03	2.19	3.22	1.80	6.02	8.86	0	17.63
3600	6.93	4.74	4.28	2.64	7.18	12.06	0	24.07
5400	13.64	8.82	6.21	6.26	10.98	16.19	0.87	35.90

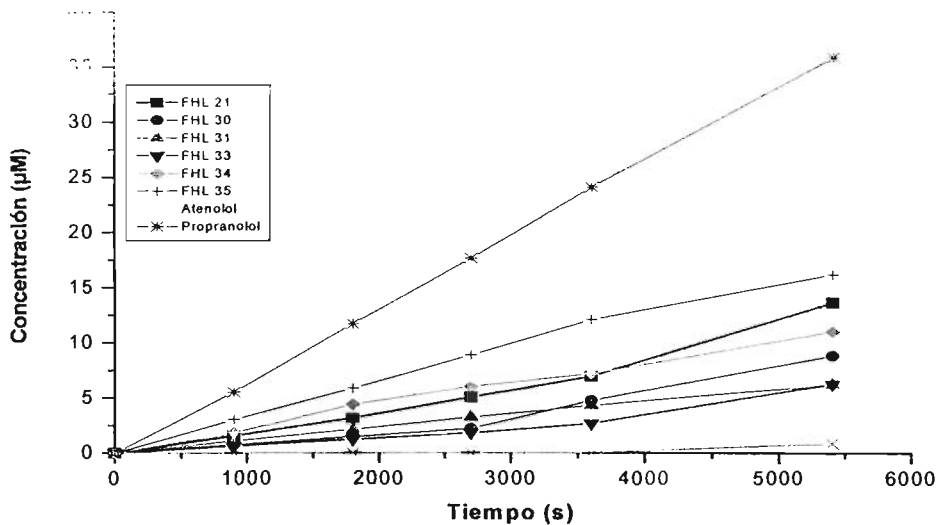


Figura 40. Cinética de transporte A-B para todos los compuestos.

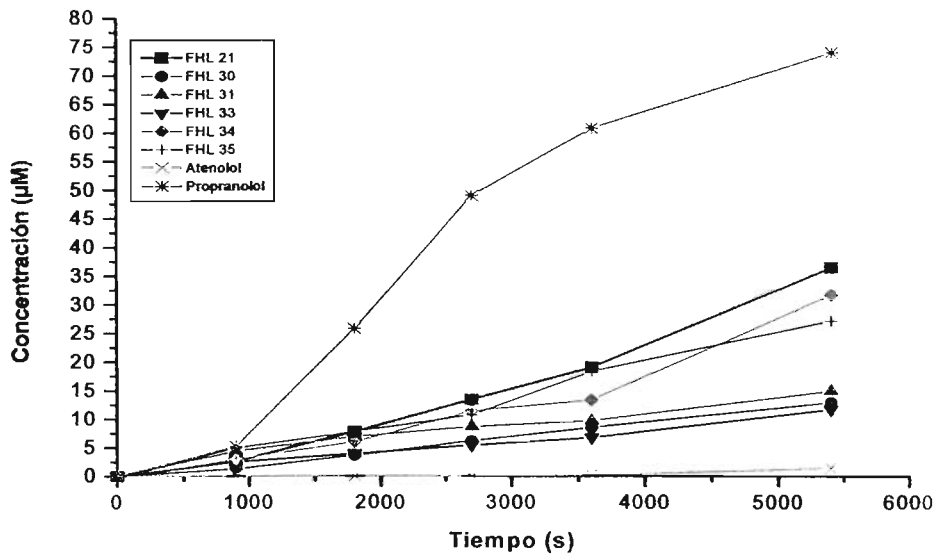


Figura 41. Cinética de para el transporte B-A para todos los compuestos.

El valor del coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}), de cada uno de los compuestos estudiados, se enlistan en la Tabla 32. El compuesto que mayor P_{app} tiene, en el transporte A-B es el **FHL 35**, seguido de **FHL 21**, **FHL 34**, **FHL 30**; mientras que el **FHL 31** y **FHL 33** presentan la misma cinética de transporte. En el caso del estudio realizado para la cinética de transporte B-A, se tiene que el compuesto con un mayor transporte es el **FHL 21**, **FHL 34** y **FHL 35**, posteriormente el **FHL 31**, **FHL 30** y el **FHL 33**.

Estos datos son comparables con los observados en nuestros compuestos de referencia, el atenolol y el propranolol, los cuales nos da una idea entre que intervalo de permeabilidad se encuentran nuestros compuestos.

Tabla 32. Coeficientes de permeabilidad aparente obtenidos de los compuestos analizados

Compuesto	P_{app} ($\times 10^{-5}$ cm/seg) A-B	P_{app} ($\times 10^{-5}$ cm/seg) B-A	Relación B-A/A-B
FHL 21	3.269	2.299	0.703
FHL 30	2.194	1.101	0.502
FHL 31	1.537	1.304	0.848
FHL 33	1.458	0.898	0.616
FHL 34	2.666	2.387	0.895
FHL 35	3.925	2.176	0.554
Atenolol	0.177	0.101	0.571
Propranolol	8.916	6.803	0.763
*Albendazol	0.840	1.060	0.790

* Morales Hurtado, Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. UNAM. 2000

Por otro lado, para determinar si hay una relación directa entre las propiedades fisicoquímicas de los compuestos estudiados y con el P_{app} ; se correlacionó los valores calculados de $\log P$ y solubilidad con respecto los valores obtenidos de la P_{app} de A-B (Fig. 42 y 43).

"Correlación entre el coeficiente P_{app} y el log P"

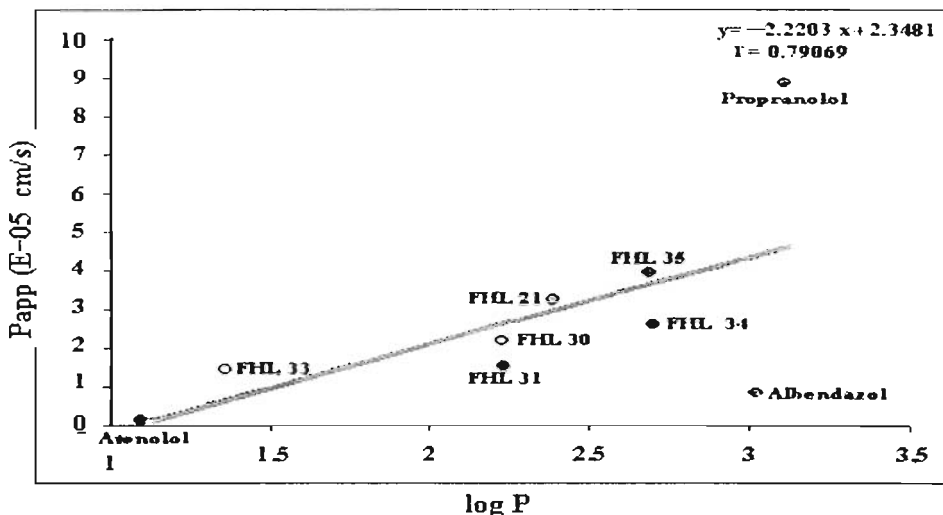


Figura 42. Coeficiente de permeabilidad aparente como una función del coeficiente de partición.

"Correlación entre el coeficiente P_{app} y la Solubilidad"

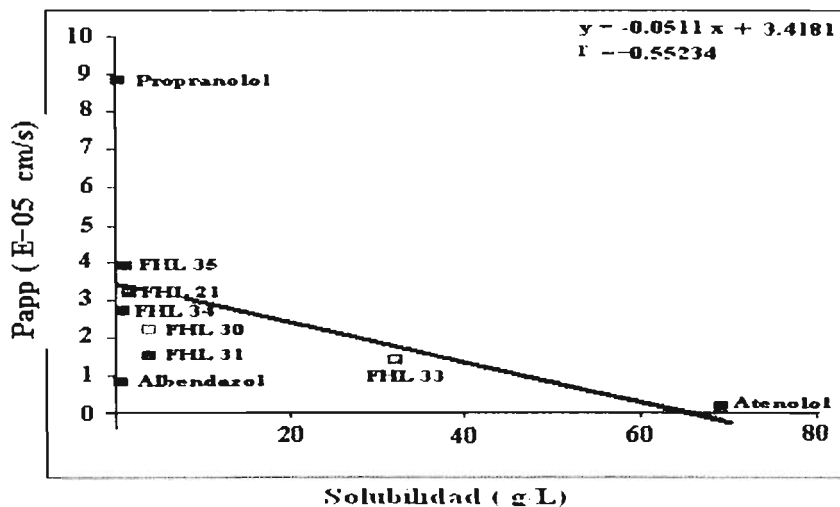


Figura 43. Coeficiente de permeabilidad aparente como una función de la solubilidad.

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En los últimos años, el desarrollo de diversas técnicas *in vitro* ha aumentado considerablemente los conocimientos sobre la absorción intestinal. Una de las técnicas empleadas en esta tesis fue la línea celular Caco-2.

A pesar de tener su origen en un carcinoma colorectal humano, la línea celular Caco-2 es muy similar a los enterocitos del intestino delgado con respecto a su estructura y funcionalidad. Al igual que las células del epitelio intestinal, Caco-2 presenta complejos de unión (constituidos por uniones estrechas, intermedias y desmosomas) por medio de los cuales las células se unen; sin embargo, dichas uniones son más cerradas y semejantes a las del intestino grueso que a las del intestino delgado, por ello, la permeabilidad paracelular (entre las células) de Caco-2 es semejante a la del epitelio colónico. Dado que los complejos de unión representan una barrera para la ruta paracelular, es importante verificar su integridad (integridad de la monocapa) como una prueba de control de calidad.

Con el objetivo de verificar la integridad de las monocapas y garantizar que los datos de permeabilidad no estuvieran afectados por la ruptura de las uniones celulares, se determinó el *Papp* del Lucifer Yellow, que por sus propiedades fisicoquímicas no le permite cruzar la monocapa celular. Únicamente aquellas monocapas para las cuales el Lucifer Yellow hubiese obtenido un *Papp* $< 1 \times 10^{-7}$ cm/s, fueron consideradas para determinar la cinética del proceso de permeabilidad (se realizó al finalizar la cinética de transporte para cada compuesto); además, otro parámetro importante que se determinó fue la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) los datos obtenidos oscilan entre 300 – 600 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, en esta última, la integridad de las monocapas celulares se verificó al principio y al final cada experimento. Por esta razón, el número de insertos transwell utilizados para cada compuesto se encuentra entre 3 – 6, teniendo como antecedente que el número total de insertos transwell fue de 6 para cada compuesto.

A partir de los valores obtenidos de TEER y de *Papp* del Lucifer Yellow para cada inserto, nos da la seguridad de que todas las monocapas utilizadas cumplieron con el parámetro de integridad establecido, lo cual nos indica lo siguiente:

- La integridad de las monocapas no únicamente se mantuvo a lo largo de los estudios de transporte, sino además, se desarrolló una excelente barrera para moléculas pequeñas.

- El manejo de la línea celular Caco-2 desde el momento de su cultivo hasta el final de los estudios fue adecuado, pues de lo contrario no se hubiese logrado la formación y mantenimiento de las monocapas celulares.

Para el estudio se empleó como compuestos patrón el atenolol y el propranolol; ambos compuestos considerados como buenos agentes antihipertensivos se seleccionaron debido a sus propiedades de solubilidad y liposolubilidad, los cuales nos permiten identificar si nuestros compuestos puedan tener alta permeabilidad, y finalmente correlacionar el resultado con su probable biodisponibilidad oral. Además se utilizaron los datos referentes del albendazol (reportado en la bibliografía) para llevar a cabo una comparación de sus propiedades biofarmacéuticas de este antiparasitario de amplio espectro, con los derivados del ácido 2-(trifluorometil)-*1H*-bencimidazol-5-ilcarboxílico.

En primer lugar para la determinación y cuantificación de los compuestos del estudio, se utilizó el método analítico de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR); los datos de las concentraciones acumuladas de los compuestos **FHL 21**, **FHL 30**, **FHL 31**, **FHL 33**, **FHL 34** y **FHL 35** para cada inserto a través del tiempo del transporte A-B, en sus gráficas nos muestran una linealidad que nos indican que a la concentración empleada no hubo saturación en el transporte de los compuestos. Sin embargo, para determinar si el transporte de estos compuestos ocurre por un proceso de difusión pasivo o activo, se necesita estudiar el efecto de la concentración en la velocidad de permeabilidad. Así, si el proceso es pasivo la relación concentración vs velocidad de permeabilidad será lineal y directa, pero si el proceso es activo se llegará a una concentración a la cual la velocidad de permeabilidad se mantendrá constante.

De la misma manera, para la cinética de permeabilidad para el transporte A-B, se tiene que los compuestos que presentaron una mayor velocidad de permeación son el **FHL 35** seguido del **FHL 34**, **FHL 21** (con un P_{app} de 3.925×10^{-5} , 3.296×10^{-5} y 2.666×10^{-5} cm/s, respectivamente); en cambio los compuestos de menor velocidad de permeación son el **FHL 33** (1.458×10^{-5} cm/s) y el **FHL 31** (1.537×10^{-5} cm/s).

En la cinética de transporte de B-A, los compuestos que presentan una mayor velocidad de permeación son: el **FHL 34** (2.387×10^{-5} cm/s) > **FHL 21** (2.299×10^{-5} cm/s) > **FHL 35** (2.176×10^{-5} cm/s). El de menor velocidad de traslado fue el **FHL 33** (0.898×10^{-5} cm/s).

Así que, para el transporte A-B y B-A, todos los compuestos de interés se transportan en mayor grado que el albendazol.

Por otro lado, se ha reportado que el P_{app} de los compuestos se puede correlacionar con la permeabilidad en humanos de la siguiente manera (67, 68):

- ❖ Compuestos con un $P_{app} < 0.1 \times 10^{-5}$ cm/s, son compuestos que se absorben pobremente (0 - 20%).
- ❖ Compuestos con un P_{app} entre 0.1 y 1×10^{-5} cm/s, son compuestos que se absorben moderadamente (20 - 70%).
- ❖ Compuestos con un $P_{app} > 1 \times 10^{-5}$ cm/s, son compuestos que se absorben bien (70 - 100%).

Esto ubica a los compuestos sintetizados incluyendo al propranolol, en compuestos que se absorben bien entre un 70 a un 100%, en el caso del albendazol y el atenolol se absorben moderadamente entre un 20 a un 70%. Esto implicaría que en el caso de todos los compuestos excepto el albendazol, la permeabilidad a través de la capa celular, no es el proceso limitante en su absorción y que ésta depende entre otros factores, de su solubilidad.

Es importante considerar que aunque el modelo de la monocapa de la línea celular Caco-2 nos proporciona información acerca de la permeabilidad de diferentes compuestos no cuenta con todas las capas fisiológicas de la membrana gastrointestinal, por lo que es posible que los bencimidazoles interactúen de forma significativa con alguno o algunos componentes de la membrana gastrointestinal de los cuales depende finalmente su permeabilidad. Se tiene que tomar en cuenta que en el presente estudio todos los compuestos se probaron a una concentración de 100 μ M, en donde todos los compuestos se encontraban totalmente solubles, además de no precipitarse al pH que se empleó (pH 7.2), en donde no se llega a ningún proceso de saturación del sistema.

Por otro lado, con la finalidad de determinar si existe algún mecanismo de transporte diferente, a la difusión simple, involucrado en el transporte de estos compuestos a través de la línea célula Caco-2, se determinó la relación entre el P_{app} calculado entre las dos cinéticas de transporte (B-A/A-B) (Tabla 32). Se considera que si existe una relación de más de tres magnitudes, en la cinética de transporte de los compuestos, entonces existe un mecanismo de transporte en la absorción de los mismos. En otras palabras, si $B-A/A-B = 3$ entonces existe un proceso de eflujo del compuesto a través de la línea

celular, donde interviene algún transportador existente en la membrana de la línea celular Caco-2. Lo cual indica que los fármacos se difunden en forma pasiva.

En lo que respecta al log P, los valores calculados para los compuestos de interés y el albendazol reflejan la estrecha relación que existe entre la estructura química de los compuestos y sus propiedades fisicoquímicas (66). Es decir, entre más polar es el sustituyente, mayor será la difusión hacia la fase acuosa, en consecuencia, la relación lípido/agua será menor; lo contrario sucede para una molécula de menor polaridad, cuya difusión hacia la fase acuosa será menor que hacia la fase orgánica dando como resultado una relación lípido/agua mayor.

Ahora bien, la solubilidad se define como la capacidad máxima de un soluto para integrarse en un disolvente sin afectarse sus propiedades fisicoquímicas en condiciones normales de temperatura y presión. En la Figura 43 se observa que los compuestos que presentan una mayor solubilidad en agua son el **FHL 33** seguido del **FHL 30**, **FHL 21** y **FHL 34**; los compuestos **FHL 31** y el **FHL 35** (isómeros del **FHL 30** y **FHL 34**, respectivamente) presentan las mismas propiedades de lipofilia y solubilidad a pesar de presentar diferente estructura molecular.

Bajo este contexto, la correlación que tiene la solubilidad y el log P se muestra en la Tabla 2, Figura 42 y 43; se observa que el compuesto que presenta un log P pequeño es el atenolol (1.09 ± 0.22) por lo que al ser una molécula polar su solubilidad aumenta considerablemente (69.3 g/L), hecho contrario a lo que sucede con el propranolol que a pesar de presentar un log P alto (3.10 ± 0.19) su solubilidad en agua es muy pequeño (0.25 g/L).

En la Tabla 2 y 32, se observa que el P_{app} no necesariamente puede tener una relación directa con la lipofilia de los compuestos, como es el caso del albendazol que a pesar de tener un log P mayor de 3.0 su P_{app} es menor de $1 \times 10^{-5} \text{ cm/s}$. Esto puede deberse a su baja solubilidad en medio acuoso.

A partir de este análisis se pone de manifiesto que en la permeación de un compuesto participan diferentes factores fisicoquímicos que afectan su traslado a través de las membranas celulares (naturaleza química, pKa y grado de ionización, peso molecular, pH en el sitio de absorción, etc.) incluyendo la solubilidad y lipofilia (42, 48).

A este respecto, la falta de correlación entre el log P y el coeficiente P_{app} de cada uno de los compuestos nos revela, como se ha demostrado en otros estudios (47, 58), que la lipofilia de un

compuesto no predice su absorción, ya que si bien es cierto que entre más lipofílica sea una molécula más fácilmente se trasladará dentro de las membranas celulares lipídicas, también es cierto que su velocidad de disolución resultará afectada debido a la polaridad de los fluidos biológicos (agua). Así tenemos que para compuestos polares la absorción estará limitada por su paso a través de las membranas celulares lipídicas, mientras que para compuestos no polares (lipofílicos) la absorción estará limitada por su velocidad de disolución en los fluidos biológicos.

Es importante considerar que la membrana gastrointestinal, está compuesta de una capa de mucus, por grupos de células en forma estratificada y por células formando criptas intestinales, las cuales, incrementan el área de absorción para los compuestos. De tal manera, en la línea celular Caco-2 es posible que los valores de P_{app} para los compuestos puedan estar subestimados.

Por ello, el empleo de Caco-2 es una alternativa útil a los modelos *in vivo* e *in situ* para el estudio del transporte de fármacos.

Sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas de Caco-2 es importante no olvidar que al ser de origen cancerígeno, tendrá características que la hacen diferente a los enterocitos intestinales. Carece de la capa de mucus-gel que se puede unir a los fármacos y disminuir su absorción, además los experimentos de absorción se pueden realizar bajo condiciones en donde el metabolismo del fármaco puede quedar excluido debido a que no todas las hidrolasas del borde de cepillo que han sido identificadas en el intestino delgado humano están presentes en las células Caco-2, sumando a ello, la mayoría de las enzimas y transportadores identificados están subexpresados.

Actualmente, se dispone de una clona de Caco-2 que necesita únicamente de una semana para su diferenciación enterocítica y presenta la capa de mucus-gel. Estas características, nos permitirían por un lado acortar el tiempo necesario para iniciar los estudios de transporte, y por otro lado estudiar el efecto de la capa de mucus-gel en la absorción de los compuestos, obteniéndose así valores de P_{app} en condiciones que podrían ser semejantes a las reales.

7. CONCLUSIONES

Al finalizar la siguiente tesis, nuestro equipo de trabajo concluyó lo siguiente:

- ✚ Se manejó adecuadamente la línea celular Caco-2 durante todo el estudio.
- ✚ Se establecieron las condiciones cromatográficas que nos permitieron la identificación (mediante el conocimiento de los tiempos de retención) y la cuantificación de los compuestos del estudio.
- ✚ Por las propiedades fisicoquímicas (solubilidad y log P) que presentan los compuestos derivados del ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-ilcarboxílico, su *P_{app}* es mayor que el que presenta el albendazol; por lo tanto la hipótesis planteada para este trabajo de investigación se acepta.
- ✚ El coeficiente *P_{app}* no necesariamente puede tener una relación directa con la lipofilia de los compuestos.
- ✚ El transporte tanto de los compuestos derivados del ácido 2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-5-ilcarboxílico como del atenolol y propranolol a través de la línea Caco-2, se lleva a cabo por un mecanismo de difusión.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cárdenas, R. H. L., Cortés, A. A. R., 1996. Aspectos biofarmacéuticos de la evaluación de medicamentos. Unidad 1. Biofarmacia: antecedentes y aspectos generales. 1a. ed., Ed. UAM Xochimilco, pp. 219-220.
2. Bermejo, M. V., Merino, M., Garrigues, T. M., Plá Delfina, J. M., 1999. Validation of a biophysical drug absorption model by the PATQSAR system. *J. Pharm. Sci.* 88(4): 398.
3. Hidalgo, I. J., Raub, Th. J. and Borchardt, R. T., 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96:736-749.
4. Audus, K.L., Bartel, R.L., Hidalgo, I. J. and Borchardt, R.T., 1990. The use of culture epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharm. Res.* 7(5): 435.
5. Hilgers, A. R., Conradi, R. A. and Burton, P.S., 1990. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharm. Res.* 7:902.
6. Tanaka, Y., Taki, Y., Sakane, Y., 1995. Characterization of drug transport through tight-junctional pathway in Caco-2 monolayer: comparison with isolated rat jejunum and colon. *Pharm. Res.* 12:523.
7. Pinto, M., Robine, S., Appay, M., Kendinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon, P., Haffen, K., Fogh, J. and Zweibaum, A., 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 cells-2 in culture. *Biology of the Cell* 47:323-330.
8. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
9. <http://www.fda.gov/cder/audiences/iact/spanish2.htm>

10. Lentz, K. A., Hayashi, J., Lucisano, L. J. and Polli, J. E., 2000. Development of a more rapid, reduced serum culture system for Caco-2 monolayers and application to the biopharmaceutics classification system. *Int. J. Pharm.* 200(1): 40-41.
11. Yamashita, S., Konishi, K. and Yamasaki, Y., 2002. New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system. *J. Pharm. Sci.* 91 (3): 669.
12. Cedillo, Rivera R., Kumate, J., Gutiérrez, G., Muñoz, O., Santos, J. I., 1990. *Manual de infectología: parasitosis intestinales*. 12ª ed., Ed. Francisco Méndez Cervantes, Méndez Cervantes, México, D.F., pp. 99-109.
13. Jung, H., Sánchez, M., Medina, M. T., Hurtado, M., Sotelo, J., 1992. Clinical pharmacokinetics of albendazole in patients with brain cysticercosis. *J. Clin. Pharmacol.* 32:28-31.
14. Prieto, J. G., Justel, A., Del Estal, J.L., Barrio, J. P. and Álvarez, A. I., 1991. Comparative study on gastric absorption of albendazole and mebendazole in rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C (3):397-400.
15. Villaverde, C., Álvarez, A. I., Del Estal, J. L., Prieto, J.G., 1992. Albendazole and Mebendazole uptake by isolated enterocytes. *Dev. Pharmacol. Ther.* 19:27-31.
16. Horton, R. J., 1990. Benzimidazoles in a wormy world. *Parasitology Today* 6(4):106.
17. Colley, D. G., Lo Verde, P. T., Savioli, L., 2001. Infectious disease. Medical helminthology in the 21st century. *Science* 293:1437,1438.
18. <http://www.ssa.gob.mx>
19. Sharma, S. and Abusar, S., 1983. The benzimidazole anthelmintics-chemistry and biological activity. *Prodrug Research* 27:85-161.
20. Croft, S. L., 1994. A rationale for antiparasite drug discovery. *Parasitology Today* 10 (10):385-386.

21. Sharma, S., 1994. Design of new drugs for helminth diseases: lead optimization in benzimidazoles. *Adv. Drug Res.* 25:103-172.
22. Morales, Hurtado R., 2000. Determinación del coeficiente de permeabilidad aparente utilizando a la línea celular Caco-2 como modelo in vitro de derivados del 1-metilbencimidazol. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Química UNAM, p. 9.
23. Brown, H. D., Matzuk, A. R., Ilves, I. R., Peterson, L. M., Harris, S. A., Sarett, L. H., Igerton, J. R., Yakstis, J. J., Campbell, W. C. and Cuckler, A. C., 1961. Antiparasitic drugs. I.V. 2-(4-thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic. *J. Amer. Chem. Soc.* 83:1764-1765.
24. Kean, B. H. and Hoskins, D. W., 1964. Treatment of trichinosis with thiabendazole. A preliminary report. *J. Amer. Med. Assc.* 190:852-853.
25. Keystone, J. S. and Murdoch, J. K., 1979. Mebendazole. *Annual of Internal Medicine* 91:582-586.
26. Watts, S. D. M., Rapson, E. B., Atkins, A. M. and Lee, D. L., 1982. Inhibition of acetylcholinesterase secretion from *Nippostrongylus brasiliensis* by benzimidazole anthelmintics. *Biochem. Pharmacol.* 31(19):3035-3040.
27. Boczon, K., Olba, W. and Olaszek, M., 1984. The Influence of some anthelmintics on the bioenergetic metabolism of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis*. *Biochem. Pharmacol.* 33(15):2523-2525.
28. Levin, M. L., 1983. Treatment of trichinosis with mebendazole. *Amer. J. Trop. Med. and Hyg.* 32(5):980-983.
29. Witassek, F., Burkhardt, B., Eckert, J. and Bircher, J., 1981. Chemotherapy of alveolar echinococcosis comparison of plasma mebendazole concentrations in animals and man. *Europ. J. Clin. Pharmacol.* 20: 427-433.

30. Theodorides, V. J., Gyurik, R. J., Kingbury, W. D. and Parish, R. C., 1976. Anthelmintic activity of albendazole against liver flukes, tapeworms, lung and gastrointestinal roundworms. *Experientia* 32(6):702-703.
31. McCracken, R. O. and Lipkowitz, K. B., 1990. Structure-activity relationships of benzothiazole and benzimidazoles anthelmintics: A molecular modeling approach to in vivo drug efficacy. *J. Parasitol.* 76 (6):853-864.
32. Saimont, A. G., Meulemans, A., Cremieux, A. C., Giovenangeli, M. D., Hay, J. M., Delaitre, B. and Coulaud, J. P., 1983. Albendazole as a potential treatment for human hydatidosis. *Lancet* ii: 652-656.
33. Marriner, S. E., Madris, D. L., Dickson, B. and Bogan, J. A., 1986. Pharmacokinetics of albendazole in man . *Europ. J. Clin. Pharmacol.* 30:705-708.
34. Penicaut, B., Beeck, C., Maugein, Pb., Parish, R., Randolph, W., Di cuollo, C. J. and Rossignol, J. F., 1981. Albendazol. Perfil farmacocinético. *Compendium de Investigaciones Clinicas Latinoamericanas* 1. (suplemento1):61-66.
35. Cook, G. C., 1990. Use of bencimidazole chemotherapy in human helminthiases: indications and efficacy. *Parasitology Today* 6(4):133-136.
36. Souhaili-El, A. H., Fergentton, X., Etienne, B., Totis, M., Batt, A. M., 1988. Inducing effect of albendazole on rat liver drug metabolizing enzymes and metabolite pharmacokinetics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 92:141-149.
37. Marriner, S. E. and Bogan, J. A., 1980. Pharmacokinetics of albendazole in sheep. *Amer. J. Vet. Res.* 41:1126-1129.
38. Jung, H., Medina, L., García, L., Fuentes, I. and Moreno, E. R., 1998. Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolito albendazoles sulphoxide. *J. Pharm. Pharmacol.* 50:43-48.

39. Lacey, E. and Watson, T. R., 1985. Structure-activity relationships of benzimidazole carbamates as inhibitors of mammalian tubulin, *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 34(7):1073-1077.
40. Lacey, E., 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* 15(7):886-927.
41. Whittaker, S. G. and Faustman, E. M., 1992. Effects of albendazole and albendazole sulfoxide on cultures of differentiating rodent embryonic cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 113(1):144-151.
42. Gibaldi, M., 1984. *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*. 3a. ed., Ed. LEA FEBIGER, U. S. A., pp. 30-34, 35, 44-45.
43. Guyton, A. C., 1998 *Tratado de Fisiología Médica*. 9a. ed., Ed. Interamericana. McGraw-Hill, U. S. A., pp. 909-915.
44. Aiache, Jean M., Devissaguet, A. M. and Guyot-Hermann, A. M., 1983. *Biofarmacia*. 2a. ed., Ed. El Manual Moderno, pp. 216, 487.
45. Banker, G. S., Rhodes, Ch. T., 1990. *Modern Pharmaceutics*. 2a. ed., Ed. Marcel Dekker Inc., U. S. A., pp. 23-39.
46. McClintic, J. Robert., 1989. *Fisiología del cuerpo humano*. 2a. ed., Ed. Limusa, U. S. A., pp. 512-522.
47. Balimane, P. V., Chong, S. and Morrison, R. A., 2000. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J. Pharmacol. and Toxicolog. Meth.* 44: 301-312.
48. Goodman and Gilman., 1996. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica: Fármacos usados en la quimioterapia de infecciones causados por protozoos y helmintos*. 9ª. ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana, pp. 1019-1023, 1049-1060, 1073-1079.

49. Tadataka Yamada, M. D., 1991. Textbook of Gastroenterology V.I. capitulo 6. Epithelia: Biologic principles of organization. Ed. J. B. Lippincott Company., pp.354-359.
50. Hunter, J., Jepson, M. A., Tsuruo, T., Simmons, N. L. and Hirst, B.H., 1993. Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* 268(20): 14991-14997.
51. Bochum, W. F. and Humburg-Saar, W. R., 1975. International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics; section 39B. Pharmacology of Intestinal Absorption: gastrointestinal absorption of drugs. V. I., 1a. ed., pp. 575-598.
52. Slordal, L., Spigset, O., 2005. Basic pharmacokinetics-absorption. *Tidsskr Nor Laegeforen* 125(7):886-887.
53. Wagner, John G., 1983. Farmacocinética clínica. 1a. Ed. Editorial Reverté, S. A., pp 20-21, 390-394.
54. Bar, W. H. and Riegelman, S., 1970. Intestinal drug absorption and metabolismo I: Comparison of methods and models to study physiological factors of in vitro and in vivo intestinal absorption. *J. Pharm. Sci.* 59(2):154-163.
55. Wilson, T. H. and Wiseman, G., 1954. The use of sacs of everted small intestine for the study of the transference of substances from the mucosal to the serosal surface. *J. Physiol.* 123:116-125.
56. Kedinger, R. F., Kedinger, M., Simón, P., Grenier, J. and Haffen, K., 1978. Behavior of isolated rat intestinal cells maintained in suspensión or monolayer cultures. *Biol. Cell.* 33:163-168.
57. Artusson, P. and Karlsson, J., 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochem. and Bioph. Res. Commun.* 175(3):880-885.

58. Irvine, J. D., Takahashi, L., Lockhart, K., Cheong, J., Tolan, J. W., Selick, H. E. and Russell, G. J., 1999. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J. Pharm. Sci.* 88(1):28-33.
59. Fogh, J., Fogh, J.M. and Orfeo, Th., 1977. One hundred and twenty seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 59(1):221-226.
60. Leibovitz, A., Stinson, J. C., McCombs III, W. B., McCoy, C. E., Mazur, K. C. and Mabry, N. D., 1976. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res.* 36:4562-4569.
61. Pinto, M. and Robine-Leon, S., 1983. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell.* 47:323-330.
62. Artursson, P. and Magnusson, Ch., 1990. Epithelial transport of drugs in cell culture. II: Effect of extracellular calcium concentration on the paracellular transport of drugs and different lipophilicities across monolayers of intestinal epithelial (Caco-2) cells. *J. Pharm. Sci.* 79(7):595-600.
63. Knipp, G.T., Norman, F. H. Ho., Barsuhn, C. L. and Borchardt, R. T., 1997. Paracellular diffusion in Caco-2 cell monolayers: effect of perturbation on the transport of hydrophilic compounds that vary in charge and size. *J. Pharm. Sci.* 86(10):1105-1110.
64. Weiqing, Ch., Fuxing, T., Kazutoshi, H. and Borchardt, R. T., 1997. Caco-2 cell monolayers as a model for studies of drug transport across human intestinal epithelium. *Cell culture models of biological barriers* 10:145.
65. Lehr, Claus-Michael., 2002. Cell culture models of biological barriers: in vitro test systems for drug absorption and delivery. Ed. Universitas Saraviensis, pp. 143-145.
66. Morrison, R. T. y Boyd, R. N., 1976. Química Orgánica. 3a. ed. en español. Ed. Fondo Educativo Interamericano, S. A., U. S. A., pp. 32-34.

67. Martin, Y. C., 1981. A practitioner's perspective of the role of quantitative structure-activity analysis in medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* 24:229-237.
68. Yee, S., 1997. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestine) absorption in man-fact or myth. *Pharm. Res.* 14(6):763-766.
69. Balimane, P. V. and Chong S., 2005. Cell culture-based models por intestinal permeability: a critique. *Drug Discovery Today* 10(5):335-342.

Medio de cultivo celular suplementado (1000mL)

Para preparar el medio de cultivo celular suplementado a un pH 7.4, se requiere de los siguientes reactivos:

- Medio de Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM).
- 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) inactivado.
- 1% de Aminoácidos no esenciales, 2mM.
- 1% de la mezcla de antibióticos, 100 U/mL de penicilina, 100 µg de estreptomicina.
- 1% de Piruvato de sodio, 1mM.
- HEPES (N-[2-hidroxietyl]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfónico]), 6.5075 g (25mM).
- NaHCO₃, 3.7g.
- Agua bidestilada estéril, 850mL.
- Solución de HCl al 10%.

La preparación es la siguiente:

1. Medir aproximadamente 800 mL de agua bidestilada estéril y colocarla en un matraz Erlenmeyer de 1 L.
2. Adicionar el frasco que contiene el medio de cultivo DMEM poco a poco en el matraz que contiene el agua bidestilada estéril.
3. Agitar manualmente y enjuagar bien el frasco que contenía el medio DMEM en polvo.
4. Adicionar 3.7 g de NaHCO₃ al volumen final de la solución preparada.
5. Agregar a esta solución 6.5075 g de HEPES.
6. Adicionar 100 mL de SFB inactivado. *
7. Adicionar 10 mL de cada suplemento: aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio y la mezcla de antibióticos.
8. Aforar con agua bidestilada estéril.
9. Ajustar el pH entre 7.0 – 7.2 con una solución de HCl al 10%, haciendo uso del potenciómetro y de un agitador magnético.
10. Filtrar la solución con un dispositivo de esterilización.

11. Realizar pruebas de esterilidad, colocando 1.5 mL del medio recién preparado en 3 pozos de una placa de cultivo estéril.**
12. Incubar a 37 °C, 5% CO₂ y 95 % HR por 72 hrs.
13. Si no se observa turbiedad en el medio, este estará en óptimas condiciones para ser utilizado.

** La inactivación del SFB se realiza colocando en baño maría a 56 °C el SFB por un periodo de 30 a 45 min.*

*** Estas actividades se realizan en el gabinete de flujo laminar.*

Nota: Entre la adición de cada reactivo, homogenizar manualmente.

Medio de criopreservación

La composición del medio de criopreservación es el siguiente:

- 90% de Medio de DMEM suplementado.
 - 10% DMSO estéril.
1. A 2.7 mL de suspensión de células (1×10^6 células/mL) adicionar 300 µL de DMSO estéril.
 2. Agitar lentamente con una pipeta pasteur estéril y colocar 1 mL de esta suspensión en cada criotubo.
 3. Colocar los criotubos cerrados y rotulados en un baño de hielo hasta su traslado al refrigerador.

Nota: Estas actividades se realizan en el gabinete de flujo laminar.

Preparación de la solución de colágena

Para la preparación de la solución de colágena para el recubrimiento de los insertos transwell, se requiere de los siguientes reactivos:

- Solución de ácido acético al 2% w/w.
- Colágena de cola de rata (tipo I) 10 mg.
- Solución de etanol al 70%.

1. Preparar una solución de ácido acético al 2% w/w.
2. Adicionar 2.7 mL de la solución de ácido acético al frasco de colágena, para obtener una concentración de 3.7 mg/mL. Agitar hasta obtener una solución transparente.
3. Adicionar EtOH al 70% hasta un volumen final de 11 mL, para obtener una concentración final de 0.9 mg/mL.

Nota: Para la preparación de la solución de colágena se utilizó en todo momento un filtro con una membrana de 0.2 μm de poro, esta actividad se realizó en el gabinete.

Preparación de la solución transportadora (1000mL) a un pH 7.4

Utilizar los siguientes reactivos:

- Solución de Hank's 10X (HSSB), 100 mL.
 - Hepes (N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanesulfónico], 10mM.
 - D-Glucosa, 10mM.
 - Agua bidestilada, 700 mL.
 - Solución de HCl al 10%.
1. A 500 mL de agua bidestilada, adicionar 2.62 g de HEPES, adicionar 1.80 g de D-Glucosa.
 2. A la solución anterior adicionar 100 mL de la HSSB 10X.
 3. Aforar casi por completo a 1 L con agua bidestilada.
 4. Ajustar el pH a 7.4 con la adición de HCl al 10% gota a gota.
 5. Pasar la solución a través de un sistema de filtración y por último guardar a 4 °C hasta el día de los estudios de transporte.

Nota: Entre cada actividad se debe de homogenizar muy bien la solución resultante.

- **Curvas patrón de Lucifer Yellow**

1. Preparar una solución estándar 1mM de Lucifer Yellow con HSSB pH 7.4.

Del frasco que contiene el reactivo Lucifer Yellow (25 mg) adicionar con exactitud 55 mL de HSSB pH 7.4

2. A partir de la solución estándar preparada en el punto 1, hacer las curvas como se indica a continuación:

Tabla 33. Preparación de las curvas patrón de Lucifer Yellow en HSSB

<i>Alícuota de la solución estándar de Lucifer Yellow 1 mM. (μL)</i>	<i>Aforo con HSSB pH 7.4 (μL)</i>	<i>Concentración (μM)</i>
100	900	100
500	500	50
500	500	25
500	500	12.50
500	500	6.25
500	500	3.13
500	500	1.56
500	500	0.78
500	500	0.39

3. En una placa de 96 pozos, colocar 200 μL (por duplicado) de cada solución por pozo. Leer por fluorimetría a una $\lambda_{\text{excitación}} = 485 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 538 \text{ nm}$.
4. Evaluar los datos de densidad óptica (absorbancia) de cada solución.
5. Realizar el gráfico de absorbancia vs concentración, obteniendo la regresión lineal por mínimos cuadrados.
6. Los datos obtenidos de absorbancia del estudio de integridad de la membrana con Lucifer Yellow, interpolarlos y obtener la concentración que le corresponde a cada muestra.

- Curvas patrón de los compuestos **FHL 21, FHL 30, FHL 31, FHL 33, FHL 34, FHL 35, propranolol y atenolol.**

1. Preparar una solución 10 mM de cada compuesto en EtOH al 10%.

Pesar con exactitud las cantidades de compuesto señaladas en la Tabla 34 y aforar a 10 mL con una solución de EtOH al 10%.

Tabla 34. Preparación de la solución 10 mM de cada compuesto

Compuesto	Peso (mg)
<i>FHL 21</i>	24.4
<i>FHL 30</i>	35.7
<i>FHL 31</i>	35.7
<i>FHL 33</i>	25.7
<i>FHL 34</i>	25.8
<i>FHL 35</i>	25.8
<i>Atenolol</i>	26.6
<i>Propranolol</i>	25.9

2. Preparar una solución 100 μ M de cada compuesto en HSSB pH 7.4.

De la solución de 10 mM de cada compuesto utilizada en los estudios de transporte, tomar con exactitud 100 μ L y aforar a 10 mL con HSSB pH 7.4.

3. A partir de las soluciones estándar 100 μ M de cada compuesto, preparar una serie de curvas patrón como se muestra en la Tabla 35.

Tabla 35. Preparación de las curvas patrón de los compuestos en HSSB

<i>Alicuota de la solución estándar del compuesto 100 μM. (μL)</i>	<i>Aforo con HSSB pH 7.4 (μL)</i>	<i>Concentración (μM)</i>
10	990	1
50	950	5
100	900	10
250	750	25
400	600	40
500	500	50

4. Inyectar 50 μ L de la muestra en CLAR (utilizando un loop de 20 μ L) y evaluar las áreas obtenidas.
5. Realizar los gráficos de áreas vs concentración, obteniendo la regresión lineal por mínimos cuadrados.

6. Las áreas obtenidas para cada muestra del estudio de transporte, interpolar los datos y obtener la concentración que le corresponde.

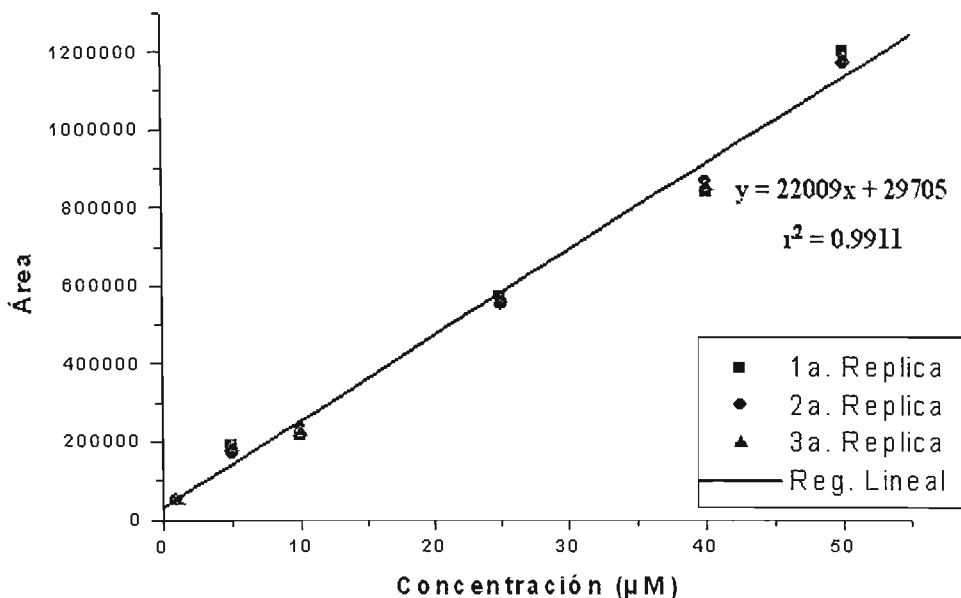
Los datos correspondientes para cada curva patrón de cada compuesto se muestran a continuación:

Atenolol

Tabla 36. Linealidad y precisión del Atenolol en HSSB pH 7.4, $\lambda_{\text{máx}} = 280 \text{ nm}$.

Concentración μM	Repeticiones Áreas			Promedio	De	%CV
	1	2	3			
1.00	52560.06	52686.48	51055.12	52100.55	907.58	1.74
5.00	193888.99	166296.46	186985.04	182390.16	14358.68	7.87
10.00	214968.99	239497.89	221732.27	225399.72	12669.03	5.62
25.00	574096.87	550079.17	567719.94	563965.33	12441.27	2.21
40.00	838801.12	867692.37	854965.08	853819.52	14479.65	1.70
50.00	1200063.65	1168617.45	1182594.95	1183758.68	15755.36	1.33
m	22081.27	21986.56	21979.37	22015.73		
b	30250.79	26786.15	31335.95	29457.63		
r	0.990302	0.996560	0.993758	0.995540		

Figura 44. Curva patrón del atenolol.

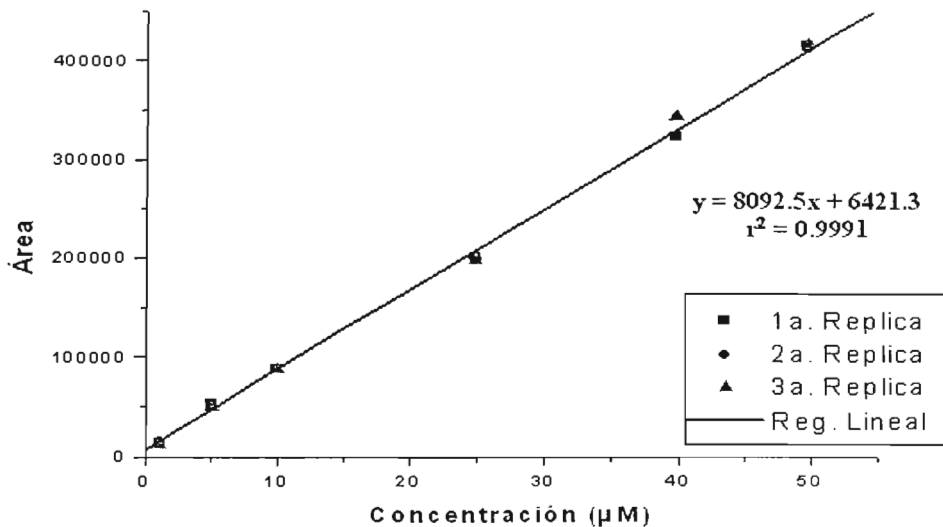


Propranolol

Tabla 37. Linealidad y precisión del Propranolol en HSSB pH 7.4, λ_{\max} = 290 nm.

Concentración μM	Repeticiones Áreas			Promedio	De	%CV
	1	2	3			
1.00	14298.73	14660.88	11820.52	13593.38	1545.98	11.37
5.00	52816.695	53263.27	50323.076	52134.34	1584.42	3.04
10.00	87828.91	88231.35	87808.10	87956.12	238.58	0.27
25.00	201959.56	199380.35	198992.18	200110.70	1612.88	0.81
40.00	323307.21	323612.73	343427.70	330115.88	11529.39	3.49
50.00	415674.34	411803.58	416711.91	414729.94	2586.86	0.62
m	8034.24	7968.20	8274.94	8092.46		
b	7233.33	7852.91	4177.63	6421.29		
r	0.999262	0.999306	0.998815	0.999550		

Figura 45. Curva patrón del propranolol.

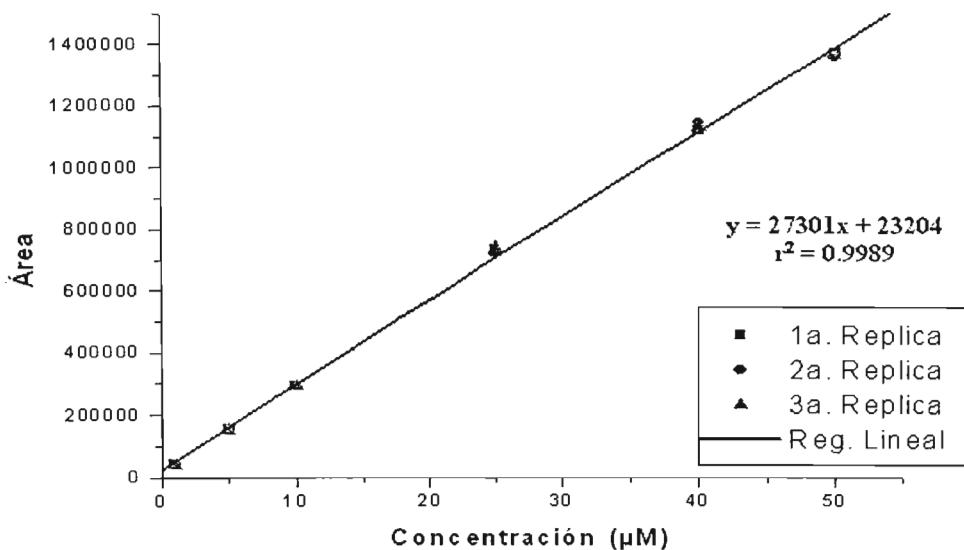


FHL 21

Tabla 38. Linealidad y precisión del FHL 21 en HSSB pH 7.4, $\lambda_{\text{m\acute{a}x}} = 254 \text{ nm}$.

Concentración μM	Repeticiones Áreas			Promedio	De	%CV
	1	2	3			
1.00	43102.52	43183.43	41411.85	42565.93	1000.28	2.35
5.00	157587.07	152952.15	153080.64	154539.96	2639.66	1.71
10.00	291466.59	292308.27	291254.27	291676.37	557.44	0.19
25.00	735168.75	720336.90	739493.34	731666.33	10047.01	1.37
40.00	1116261.57	1144836.17	1131211.97	1130769.90	14292.43	1.26
50.00	1373519.22	1356923.97	1362993.37	1364478.85	8396.76	0.62
m	27272.27	27307.97	27323.71	27301.31		
b	24073.12	22199.45	23339.97	23204.18		
r	0.999607	0.999266	0.999267	0.999450		

Figura 46. Curva patrón del FHL 21.

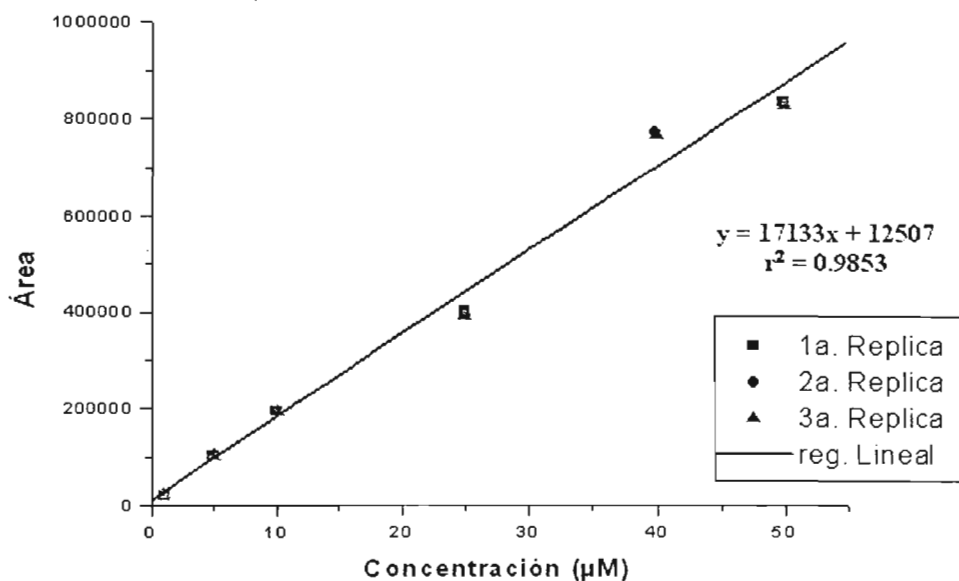


FHL 30

Tabla 39. Linealidad y precisión del FHL 30 en HSSB pH 7.4, $\lambda_{\text{m\acute{a}x}} = 254 \text{ nm}$.

Concentración μM	Repeticiones Áreas			Promedio	De	%CV
	1	2	3			
1.00	23017.54	24471.20	24722.98	24070.57	920.60	3.82
5.00	104584.31	103687.81	103945.93	104072.68	461.49	0.44
10.00	194302.93	194170.27	195030.92	194501.37	463.38	0.24
25.00	402072.24	391720.37	392798.61	395530.40	5690.98	1.44
40.00	767180.71	771200.63	768475.00	769190.67	2842.52	0.37
50.00	835810.97	832337.21	828223.87	832124.02	3798.04	0.46
m	17185.30	17149.53	16059.68	17133.20		
b	12615.73	11833.26	16658.32	12506.78		
r	0.993596	0.992140	0.998611	0.992623		

Figura 47. Curva patrón del FHL 30.

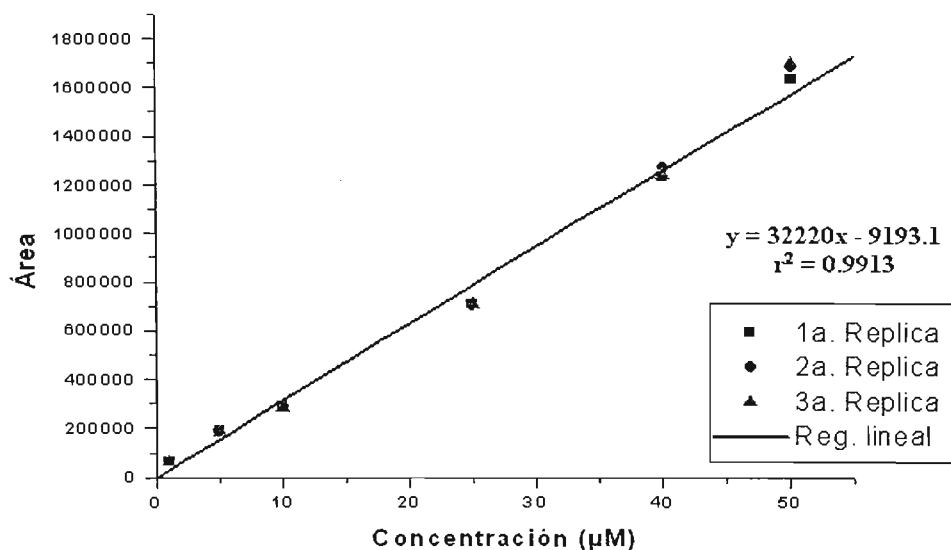


FHL 31

Tabla 40. Linealidad y precisión del FHL 31 en HSSB pH 7.4, $\lambda_{\text{m\acute{a}x}} = 280 \text{ nm}$.

Concentración μM	Repeticiones Áreas			Promedio	De	%CV
	1	2	3			
1.00	65437.52	65585.24	65019.27	65347.34	293.56	0.45
5.00	188453.52	187983.23	184277.52	186904.76	2287.37	1.22
10.00	287677.68	286848.87	286275.31	286933.95	705.05	0.25
25.00	702184.92	701369.75	708376.89	703977.19	3831.99	0.54
40.00	1232438.97	1274501.93	1242853.64	1249931.51	21906.51	1.75
50.00	1636428.95	1682429.79	1699001.76	1672620.16	32419.29	1.94
m	31527.44	32568.16	32565.64	32220.41		
b	-2912.13	-11284.97	-13382.32	-9193.14		
r	0.996323	0.995552	0.994889	0.995640		

Figura 48. Curva patrón del FHL 31.

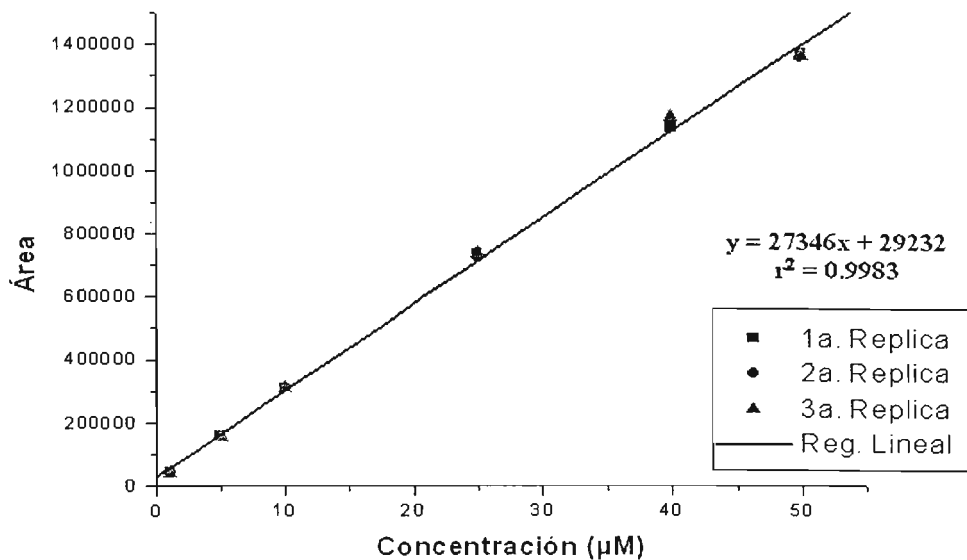


FHL 33

Tabla 41. Linealidad y precisión del FHL 33 en HSSB pH 7.4, $\lambda_{\text{m\acute{a}x}} = 280 \text{ nm}$.

Concentración μM	Repeticiones Áreas			Promedio	De	%CV
	1	2	3			
1.00	43102.52	43183.43	43411.85	43232.60	160.42	0.37
5.00	157587.07	157952.15	153080.64	156206.62	2713.33	1.74
10.00	310466.59	312308.27	311254.27	311343.04	924.05	0.30
25.00	735168.75	720336.90	739493.34	731666.33	10047.01	1.37
40.00	1136261.57	1144836.17	1171211.97	1150769.90	18215.09	1.58
50.00	1373519.22	1356923.97	1362993.37	1364478.85	8396.76	0.62
m	27341.84	27146.82	27548.91	27345.85		
b	29054.20	29884.68	28756.46	29231.78		
r	0.999492	0.999226	0.998551	0.999150		

Figura 49. Curva patrón del FHL 33.

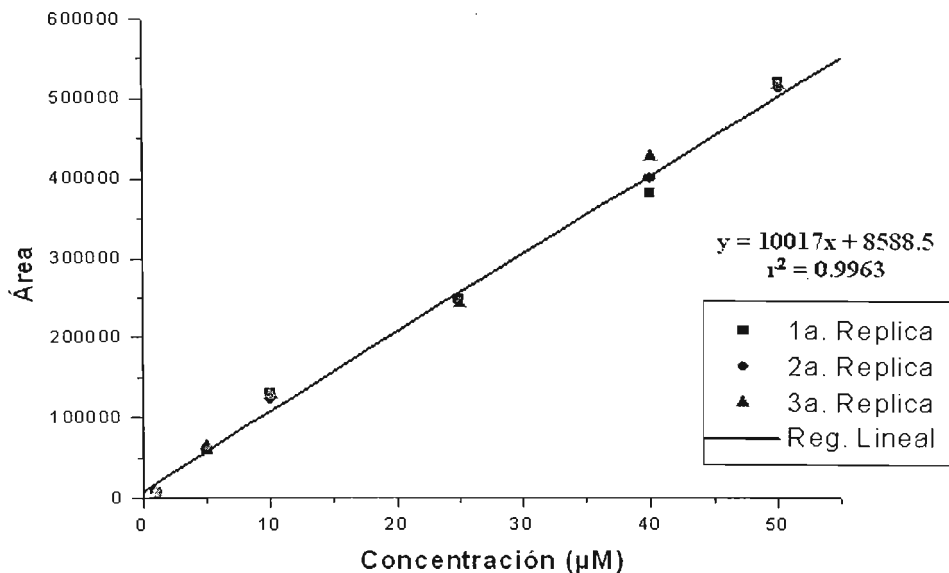


FHL 34

Tabla 42. Linealidad y precisión del FHL 34 en HSSB pH 7.4, $\lambda_{\text{máx}} = 254 \text{ nm}$.

Concentración μM	Repeticiones Áreas			Promedio	De	%CV
	1	2	3			
1.00	7676.74	7938.97	7528.57	7714.76	207.82	2.69
5.00	59506.51	63288.27	65250.04	62681.61	2919.43	4.66
10.00	130122.62	123369.89	128135.24	127209.25	3470.29	2.73
25.00	248188.62	247781.20	242376.70	246115.51	3244.30	1.32
40.00	380957.44	400860.91	427462.88	403093.74	23332.98	5.79
50.00	520234.43	514093.79	516627.73	516985.32	3085.90	0.60
m	9686.56	9795.61	10014.12	9832.10		
b	15951.36	15192.88	15603.43	15582.56		
r	0.995234	0.998664	0.997172	0.998148		

Figura 50. Curva patrón del FHL 34.

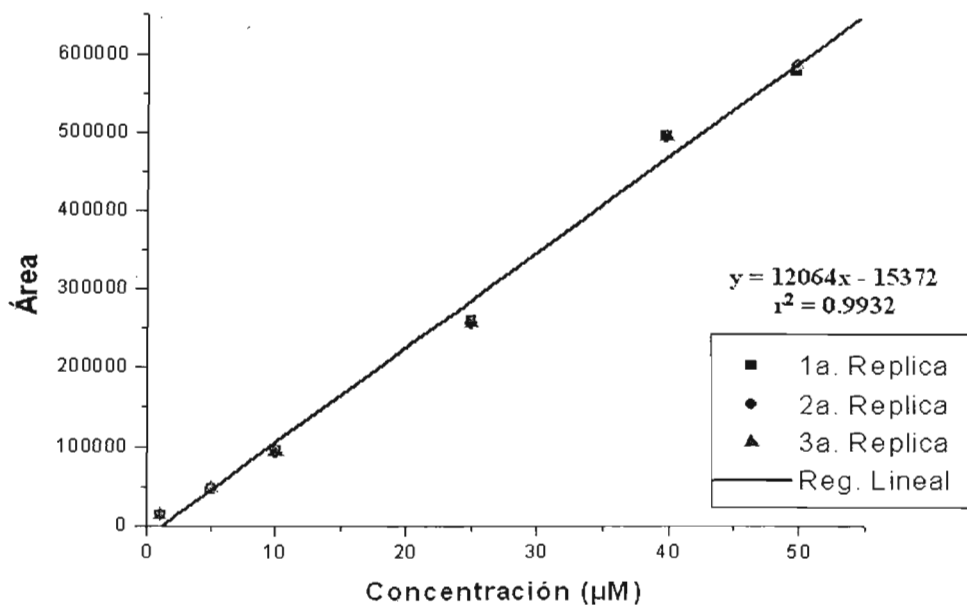


FHL 35

Tabla 43. Linealidad y precisión del FHL 35 en HSSB pH 7.4, $\lambda_{\text{máx}} = 280 \text{ nm}$.

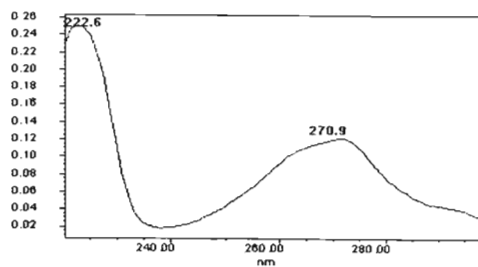
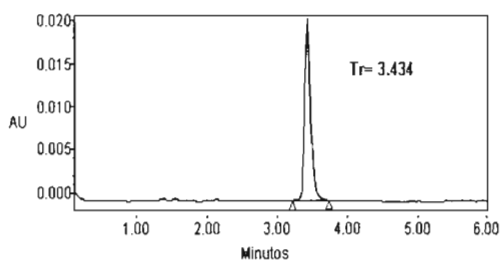
Concentración μM	Repeticiones Áreas			Promedio	De	%CV
	1	2	3			
1.00	13812.15	13269.57	13214.20	13431.97	330.41	2.46
5.00	46909.50	46144.25	47723.38	46925.71	789.69	1.68
10.00	93650.15	92820.39	94839.76	93770.10	1015.02	1.08
25.00	259444.05	256518.07	256785.67	257582.59	1617.61	0.63
40.00	494385.94	493058.21	493928.07	493790.74	674.44	0.14
50.00	578041.76	583816.59	585913.36	582590.57	4076.50	0.70
m	12004.44	12086.45	12099.71	12063.53		
b	-14389.66	-16283.04	-15442.84	-15371.84		
r	0.996572	0.996584	0.996638	0.996594		

Figura 51. Curva patrón del FHL 35.

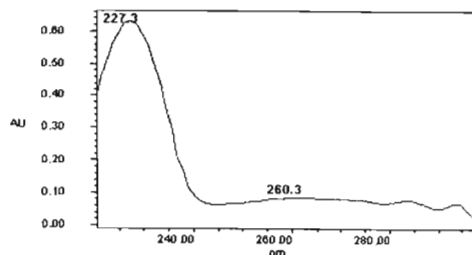
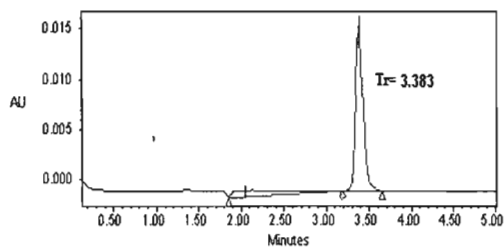


En este apartado se presentan los cromatogramas y espectros de UV representativos para cada compuesto a una concentración 40 μM en HSSB pH 7.4.

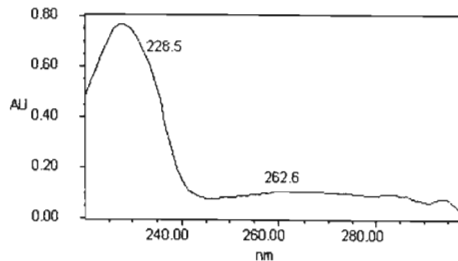
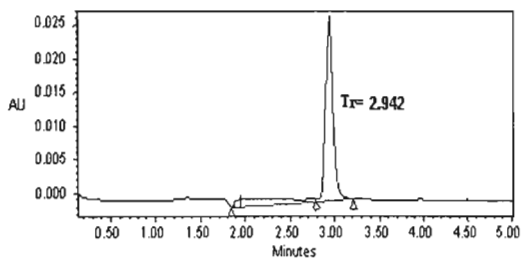
1. FHL 35



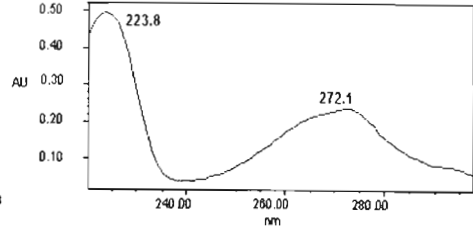
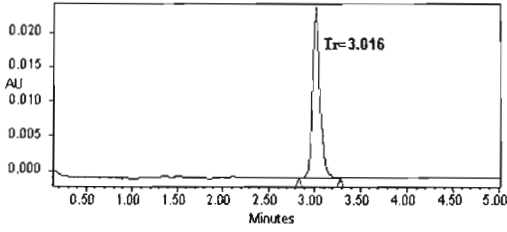
2. FHL 34



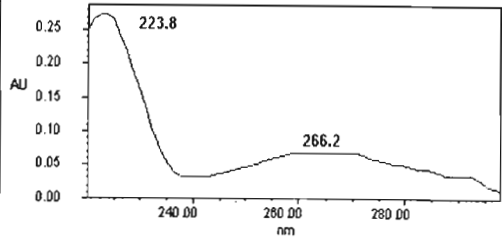
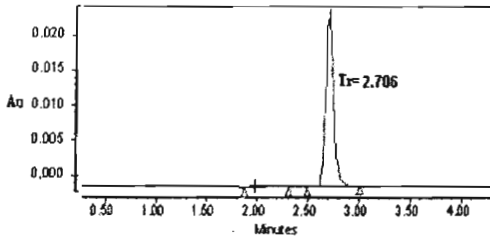
3. FHL 30



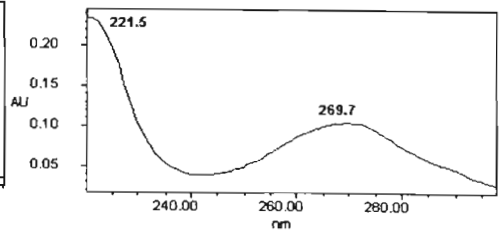
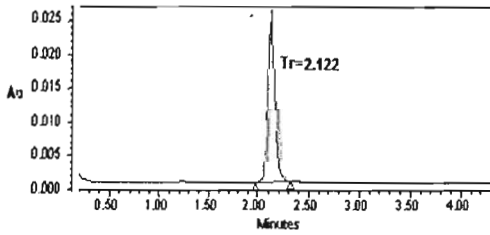
4. FHL 31



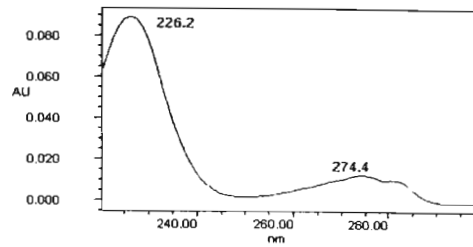
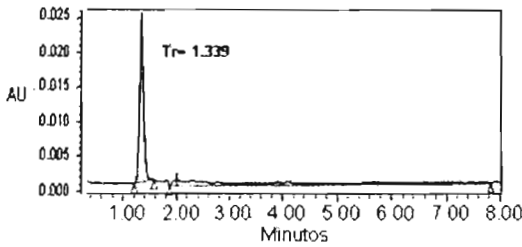
5. FHL 21



6. FHL 33



7. Atenolol



8. Propranolol

