



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIOS DE PERMEABILIDAD DE PROPRANOLOL Y
RANITIDINA EN MONOCAPAS CELULARES DE LA LÍNEA
CELULAR MDCK.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

MAGALY MARES SÁNCHEZ



MÉXICO, D.F.

2013

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: PROFESORA: Inés Fuentes Noriega
VOCAL: PROFESORA: Sofía Margarita Rodríguez Alvarado
SECRETARIO: PROFESOR: Juan Manuel Rodríguez
1er SUPLENTE: PROFESORA: María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz
2do SUPLENTE: PROFESORA: Kenneth Rubio Carrasco

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 112 y 113, Departamento de Farmacia, Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Laboratorio de Cultivo Celular, Unidad de Experimentación Animal UNEXA, Conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema:

Dra. Inés Fuentes Noriega

Supervisor Técnico:

Kenneth Rubio Carrasco

Sustentante:

Magaly Mares Sánche

ÍNDICE GENERAL.

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Desarrollo de Nuevos Fármacos.....	3
2.2 Éxito del “Nuevo Fármaco”	7
2.3 Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.	9
2.4 Permeabilidad y Tipos de Transporte de los Fármacos en el organismo.....	10
2.5 Modelos para determinar la Permeabilidad.....	13
2.6 Línea Celular Madin Darby Canine Kidney (MDCK).....	17
2.7 Ranitidina.	18
2.8 Propranolol.....	21
2.9 Validación de Métodos Bioanalíticos.....	24
2.9.1 Validación.	24
2.9.2 Linealidad	24
2.9.3 Precisión.....	25
2.9.3.1 Repetibilidad.....	25
2.9.3.2 Reproducibilidad.....	25
2.9.4 Selectividad.....	25
2.9.5 Límite de detección.....	25
2.9.6 Límite de Cuantificación.....	26
2.9.7 Exactitud.....	26
2.9.8 Recobro Absoluto	26
2.9.9 Estabilidad	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Objetivo General.	27
3.2 Objetivos Particulares.	27
4. METODOLOGÍA.....	28
4.1 Equipo y Material.....	28
4.1.1 Cultivo Celular	28
4.1.2 Método Bioanalítico	29
4.2 Reactivos.	30
4.2.1 Cultivo Celular	30

4.2.2	Método Bioanalítico.....	31
4.2.3	Estándares	31
4.2.4	Material Biológico	32
4.3	Preparación de Soluciones	32
4.3.1	Cultivo Celular.....	32
4.3.2	Método Bioanalítico.....	36
4.4	Procedimiento Experimental.....	38
4.4.1	Cultivo Celular	38
4.4.2	Ensayos de Inhibición de la Proliferación Celular.....	40
4.4.4	Validación del Método Bioanalítico para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina en Solución Amortiguadora de Hank.....	42
4.4.4.1	Validación del Sistema.....	43
4.4.4.2	Validación del Método.....	43
4.4.5	Validación del Método Bioanalítico para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol en Solución de Hank.....	46
4.4.6	Estudios de Permeabilidad.....	47
5.	RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.....	50
5.1	Ensayos de Inhibición de la Proliferación Celular.....	50
5.2	Selección de las condiciones cromatográficas para implementar los métodos bioanalíticos para cuantificar Clorhidrato de Propranolol y Clorhidrato de Ranitidina en Solución Amortiguadora de Hank.....	52
5.3	Validación del Método Bioanalítico para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina en Solución de Hank.....	53
5.3.1	Validación del sistema.....	54
5.3.2	Validación del Método.....	57
5.4	Validación del Método Bioanalítico para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol en Solución de Hank.....	66
5.4.1	Validación del Sistema.....	66
5.4.2	Validación del Método.....	69
5.5	Estudios de Permeabilidad.....	78
6.	CONCLUSIONES.....	85
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	86

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Preparación de la Curva Patrón conteniendo Ranitidina en Fase Móvil.	43
Tabla 2. Preparación de los Puntos Control conteniendo Ranitidina en Solución Amortiguadora de Hank.....	44
Tabla 3. Preparación de la Curva Patrón conteniendo Propranolol.....	46
Tabla 4. Preparación de los Puntos Control conteniendo Propranolol.....	47
Tabla 5. Porcentaje de Inhibición de la Proliferación Celular de la línea celular MDCK por efecto del Clorhidrato de Propranolol.....	50
Tabla 6. Porcentaje de Inhibición de la Proliferación Celular de la línea celular MDCK por efecto del Clorhidrato de Ranitidina.....	51
Tabla 7. Condiciones Cromatográficas para cuantificar Clorhidrato de Ranitidina en Solución Amortiguadora de Hank.....	53
Tabla 8. Condiciones Cromatográficas para cuantificar Clorhidrato de Propranolol en Solución Amortiguadora de Hank.....	53
Tabla 9. Adecuabilidad del sistema.....	54
Tabla 10. Linealidad del sistema para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.	55
Tabla 11. Precisión del sistema.....	56
Tabla 12. Linealidad del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.....	59
Tabla 13. Respuesta obtenida para el Limite de Cuantificación.....	60
Tabla 14. Repetibilidad del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.....	61
Tabla 15. Reproducibilidad del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina	62
Tabla 16. Recobro Absoluto del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.....	63

Tabla 17. Estabilidad a Temperatura Ambiente del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.....	64
Tabla 18. Estabilidad a 3ciclos de Congelación y Descongelación en un periodo de 24hrs x 3 del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.....	65
Tabla 19. Adecuabilidad del sistema.....	66
Tabla 20. Linealidad del sistema para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol en fase móvil.....	67
Tabla 21. Precisión del sistema para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol en fase móvil.....	69
Tabla 22. Linealidad del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.....	71
Tabla 23. Limite de cuantificación del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.....	73
Tabla 24. Repetibilidad del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.....	73
Tabla 25. Reproducibilidad y Exactitud del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.....	74
Tabla 26. Recobro Absoluto del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.....	75
Tabla 27. Estabilidad a Temperatura Ambiente del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.....	76
Tabla 28. Estabilidad a 3ciclos de Congelación y Descongelación en un periodo de 24hrs x 3 del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.....	77
Tabla 29. Cantidad Acumulada Promedio de Ranitidina en cada intervalo de tiempo para tres concentraciones 4.0, 8.0 y 16.0 µg/mL, en ambos sentidos	78
Tabla 30. Cantidad Acumulada Promedio de Propranolol en cada intervalo de tiempo para tres concentraciones 4.0, 8.0 y 16.0 µg/mL, en ambos sentidos	81
Tabla 31. Coeficientes de Permeabilidad Aparente (cm/s).....	82

Tabla 32. Determinación de la Relación de los Coeficientes de Permeabilidad Aparente (cm/s) del Transporte de Ranitidina y Propranolol a través de

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Las 4 fases secuenciales reconocidas en los estudios clínicos de nuevos fármacos.....	7
Figura 2. Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, Clase I alta solubilidad y alta permeabilidad, Clase II baja solubilidad y alta permeabilidad, Clase III alta solubilidad y baja permeabilidad, Clase IV baja solubilidad y baja permeabilidad.	10
Figura 3. Esquema del sistema de cultivo para determinar la permeabilidad aparente.	5
Figura 4. Estructura Química de Ranitidina	8
Figura 5. Estructura Química de Propranolol	21
Figura 6. Distribución de las soluciones del analito a evaluar en la placa de 96 pozos (Una placa para cada analito Propranolol o Ranitidina por triplicado).	40
Figura 7. Grafica Porcentaje de Inhibición de la Proliferación Celular de la línea celular MDCK por efecto del Clorhidrato de Propranolol.	50
Figura 8. Grafica Porcentaje de Inhibición de la Proliferación Celular de la línea celular MDCK por efecto del Clorhidrato de Ranitidina.....	52
Figura 9. Linealidad del sistema para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.	56
Figura 10. Cromatograma de la Solución Amortiguadora de Hank bajo las condiciones cromatograficas.	57
Figura 11. Cromatograma de la Solución de 8 µg/mL en fase móvil a partir de la solución stock de Ranitidina en metanol bajo las condiciones cromatograficas.	57
Figura 12. Cromatograma de la Solución de 8 µg/mL en solución amortiguadora de Hank a partir de la solución stock de Ranitidina en metanol.	58

Figura 13. Linealidad del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.	58
Figura 14. Linealidad del sistema para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol en fase móvil.	68
Figura 15. Cromatograma de la Solución Amortiguadora de Hank bajo las condiciones cromatograficas.	70
Figura 16. Cromatograma de la Solución de 10 µg/mL en fase móvil a partir de la solución stock de Propranolol en metanol.	70
Figura 17. Cromatograma de la Solución de 10 µg/mL en solución amortiguadora de Hank a partir de la solución stock de Propranolol en metanol.	71
Figura 18. Linealidad del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.	72
Figura 19. Cantidad Acumulada Promedio de Ranitidina en cada intervalo de tiempo para tres concentraciones 4.0, 8.0 y 16.0 µg/mL, en ambos sentidos.	80
Figura 20. Cantidad Acumulada Promedio de Propranolol en cada intervalo de tiempo para tres concentraciones 4.0, 8.0 y 16.0 µg/mL, en ambos sentidos.....	80
Figura 21. Coeficientes de Permeabilidad Aparente (cm/s) del Transporte de Ranitidina y Propranolol a través de células MDCK en sentido Apical/Basolateral (A/B) y Basolateral/Apical (B/A)	83

ABREVIATURAS

MDCK: Línea Celular Madin Darby Canine Kidney.

MDR1-MDCK: Clona de la Línea Celular Madin Darby Canine Kidney.

Caosco-2: Línea celular

FDA: Food and Drug Administration.

CLAR: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

NDA: Aplicación de un Nuevo Fármaco.

COFEPRIS: Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios.

IND: Nuevo Fármaco.

ADME: Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción.

pH: potencial de Hidrogeno.

mL: mililitros

%: Porcentaje

ATP: Adenosín trifosfato.

Log P: Coeficiente de partición.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

cm: Centímetros

s: segundos

cm²: Centímetros cuadrados

µg: microgramos

g: gramo

mg: miligramo

°C: grados Celsius

pKa: Constante de disociación

h: hora

ABREVIATURAS

hrs: horas

HCl: Clorhidrato

μm : micrómetro

μL : microlitro

D-MEM: Dulbecco's Modified eagle Medium

L: litros

M: Molar

mM: mili molar

p: peso

v: volumen

M. T. E. : medio de transporte estéril.

rpm: revoluciones por minuto

min: minutos

mm: milímetros

Cel: células

nm: nanómetros.

Sol. : Solución

CV: Coeficiente de variación.

DEA: Desviación Estándar Absoluta.

Ω : Ohms

r^2 : coeficiente de determinación.

1. INTRODUCCIÓN.

El desarrollo de nuevos medicamentos implica varias etapas que abarcan desde el descubrimiento y síntesis de nuevas moléculas hasta su aprobación para ser comercializados, durante este proceso es necesario caracterizar las propiedades fisicoquímicas y efectos toxicológicos de dichas moléculas, se evalúa su efecto terapéutico, eficacia y seguridad, ya que en muchos casos dichas moléculas no cumplen con alguna de estas características y no llegan a ser comercializados, ya que no es factible su uso.

Como parte de dicha caracterización se encuentra la clasificación biofarmacéutica, la cual sirve como herramienta para elucidar la biodisponibilidad de los fármacos y así su eficacia, además durante el desarrollo de las formulaciones farmacéuticas ayuda a elegir los componentes de las mismas y en conjunto con las pruebas de disolución in-vitro es usada para justificar la exención de los estudios in-vivo de bioequivalencia.

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutica fue introducido por Amidon en 1995, nos permite clasificar a una sustancia en base a su solubilidad acuosa y a su permeabilidad intestinal, consta de cuatro clases (figura 2), nos ayuda a evaluar cuál de estas propiedades tiene mayor influencia en la absorción de los fármacos dentro del organismo.

Por esta razón en este proyecto nos enfocamos a desarrollar una metodología para determinar la permeabilidad de las moléculas de estudio, evaluando el transporte de dichas moléculas a través de monocapas celulares de la línea celular MDCK de manera práctica y sencilla, con la perspectiva de poder caracterizar la permeabilidad de moléculas nuevas en un futuro comparando su comportamiento con el de nuestras moléculas de estudio.

La permeabilidad nos proporciona la capacidad y velocidad de las moléculas para transportarse a través de una membrana, los factores que la influyen son la liposolubilidad, tamaño, polaridad y carga eléctrica de las moléculas así como su similitud a sustancias endógenas. La permeabilidad es alta cuando la absorción es

mayor o igual al 90%, moderada cuando la absorción se encuentra entre 50 y 89% y baja cuando la absorción es menor al 50 %.

La FDA sugiere cuatro métodos para estudiar la permeabilidad uno de ellos son los ensayos in vitro a través de membranas de células epiteliales, estos ensayos consisten en un modelo de absorción intestinal en los cuales se emplean celdas formadas por dos compartimentos divididas por un soporte de policarbonato o celulosa en los cuales se cultivan células epiteliales, tales como las MDCK, Caco-2 entre otras, para formar una monocapa celular que simula la membrana intestinal.

En este estudio empleamos la línea celular Madin Darby Canine Kidney (MDCK), estas células son de tejido epitelial de riñón de perro que se emplean para estudiar metabolismo, regulación del crecimiento celular y transporte celular. Tienen la ventaja formar la monocapa celular menos tiempo que las células Caco-2, son menos susceptibles a la contaminación, tienen alta resistencia eléctrica transepitelial, mejor composición lipídica y expresión de proteínas.

La FDA estableció una lista de 20 estándares de permeabilidad de los cuales sugiere al Propranolol como uno de los estándares de alta permeabilidad y a la Ranitidina como un estándar de baja permeabilidad, por lo que los elegimos para este proyecto como analitos de estudio.[2]

Para desarrollar los estudios de permeabilidad decidimos cuantificar los estándares por medio de cromatografía de líquidos de Alta Resolución (CLAR), por lo que es necesario desarrollar, validar y aplicar dos métodos analíticos, uno enfocado a cuantificar Clorhidrato de Propranolol y el otro a Clorhidrato de Ranitidina ambos en Solución Amortiguadora de Hank, ya que esta solución simula al fluido intersticial y por lo mismo funciona como medio de transporte en los estudios de permeabilidad.

2. ANTECEDENTES

2.1 Desarrollo de Nuevos Fármacos. [8] [9] [10] [12] [13] [17]

El desarrollo de nuevos fármacos es un proceso muy complejo que parte del descubrimiento de una molécula con un probable efecto terapéutico hasta su salida al mercado como un medicamento.

Durante el desarrollo de nuevos fármacos el objetivo principal es comprobar que estos sean seguros y eficaces para la especie humana, se inicia con los estudios preclínicos los cuales consisten en realizar pruebas farmacológicas, toxicológicas y bioquímicas, mediante estudios in vitro e in vivo, al menos en dos especies animales, que aseguren que el fármaco cumple con los requerimientos para ser considerado por la regulación sanitaria como un “nuevo fármaco” y sea aprobada la siguiente etapa de la investigación la Fase Clínica.

El término de “nuevo fármaco” se utiliza en las siguientes situaciones:

- a) Cuando se trata de un fármaco que no se ha utilizado en humanos para el tratamiento de enfermedades.
- b) Combinaciones de fármacos ya aprobados.
- c) Fármacos ya aprobados pero que requieren la evaluación en otro tipo de enfermedad.
- d) Para una nueva forma de dosificación de un fármaco aprobado previamente.

Durante los estudios preclínicos no se descarta que el “nuevo fármaco” esté exento de producir reacciones adversas en el ser humano, sin embargo, permiten identificar potenciales riesgos de toxicidad, y así tratar de prevenirlos en la Fase Clínica.

La Fase Clínica tiene como objetivo principal asegurar que la administración del “nuevo fármaco” en los seres humanos sea segura y eficaz para tratar una patología en específico.

La Fase Clínica consta de cuatro etapas de investigación, las cuales serán descritas a continuación:

Fase I. Los estudios son realizados principalmente en un grupo de 20 a 80 voluntarios sanos, por investigadores capaces de evaluar datos farmacológicos y toxicológicos. Los principales objetivos de esta fase son:

- a) Revisar la seguridad al valorar la presencia de efectos dañinos.
- b) La tolerabilidad al establecer los límites probables de valores de dosis clínicas seguras.
- c) La farmacocinética al valorar la absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco en estudio.

En ocasiones en esta fase, las pruebas son realizadas en voluntarios enfermos, sobre todo cuando se espera toxicidad del fármaco, como ocurre con los agentes antineoplásicos, y no es ético exponer a voluntarios sanos a efectos tóxicos predecibles.

En la Fase I las pruebas no son ciegas, es decir tanto los sujetos en estudio como los investigadores conocen el medicamento que se está administrando, además los voluntarios que participan en los estudios han firmado el consentimiento informado, este documento es requerido por la ley y consta de:

- a) Una clara explicación de los propósitos del estudio.
- b) Los procedimientos a seguir, incluyendo los experimentales.
- c) La descripción de los riesgos y los beneficios anticipados.
- d) La revelación de procedimientos alternativos apropiados que pudieran ser una ventaja para el sujeto durante el estudio.

Fase II. Cuando en la fase I son obtenidos resultados confiables, por primera vez el fármaco es estudiado en pacientes con una enfermedad determinada a tratar. Los estudios de fase II en su mayoría, son estudios experimentales aleatorizados

y tienen como propósito valorar la eficacia del fármaco nuevo en la enfermedad para la cual es diseñado. En esta fase, el fármaco es administrado a un número relativamente reducido de pacientes con la enfermedad (20- 80), revisión cuidadosa de personal calificado para determinar la eficacia y seguridad del fármaco. En esta fase, el clínico necesita estar familiarizado con la patología que se está tratando, y diseña con frecuencia un estudio ciego en donde los pacientes desconocen el tratamiento. Además del grupo que recibe el fármaco nuevo, se incluye otro grupo que recibe el fármaco de referencia (control positivo). Probablemente esta fase es la prueba más crucial en el desarrollo y evaluación de un fármaco nuevo. La decisión para proceder con ensayos clínicos en grandes poblaciones, se toma en esta fase que emplea un número limitado de pacientes. La carencia de eficacia clínica es una razón común para continuar el estudio.

Fase III. En esta fase, los ensayos clínicos controlados son conducidos por investigadores calificados que controlan una gran población de pacientes, con el propósito de obtener datos que sustenten o no la eficacia y la seguridad del nuevo fármaco con respecto a un fármaco de referencia. Más de 150 clínicos pueden participar y supervisarán a más de 1,000 a 3,000 pacientes, por esta razón los ensayos que se diseñan tratan de disminuir los errores ocasionados por el sesgo de ambos. En consecuencia se diseñan estudios doble ciego y cruzado. Estos estudios son difíciles de organizar y extremadamente costosos, y a menudo duran de 2 a 10 años con un promedio de cinco, particularmente si el tratamiento es diseñado para retardar la progresión de una enfermedad crónica. Algunas reacciones adversas pueden observarse por primera vez en esta fase, como por ejemplo los efectos tóxicos producidos por procesos inmunológicos. Cuando el patrocinador está convencido de que los datos obtenidos en la fase III justifican aprobar el fármaco como eficaz y seguro para el uso propuesto, solicita una aplicación de un nuevo fármaco (NDA) ante las autoridades regulatorias correspondientes. Las agencias regulatorias requieren muestras del fármaco en estudio, el etiquetado y el inserto del envase que lo acompañará en todos los embarques a médicos y farmacias. Todo ello para satisfacer las normas de

manufactura, y proveer al público las guías aprobadas por las agencias regulatorias sobre cómo utilizar el nuevo medicamento.

Fase IV. La responsabilidad del patrocinador y de las agencias regulatorias sobre el medicamento aprobado, no termina con la comercialización y venta del producto, sino que continúa durante todo el periodo de su uso clínico. Aunque no hay una definición aceptada sobre la fase IV, este término comúnmente se aplica a todos los aspectos de investigación que son posteriores al otorgamiento de la aplicación NDA, y a la disponibilidad del nuevo fármaco para su extenso uso clínico en población abierta. Durante esta fase, las solicitudes del patrocinador de que la eficacia y seguridad del nuevo medicamento aparezcan en folletos en inglés y anuncios, son revisadas y aprobadas por las agencias regulatorias. Pero esta fase se refiere a la vigilancia continua de la seguridad del nuevo medicamento en las condiciones reales de uso en un gran número de pacientes. Es de gran importancia que el patrocinador informe a las agencias regulatorias cada 3 meses, durante el primer año, cada 6 meses durante el segundo y posteriormente cada año, sobre los estudios clínicos realizados con el nuevo medicamento, sobre la cantidad de medicamento distribuido y anuncios de los mismos, sobre los efectos colaterales, daños, reacciones alérgicas o tóxicas y fracasos que ha tenido el nuevo medicamento para ejercer su acción farmacológica esperada. También es importante señalar, que las publicaciones periódicas indizadas en el Med Line son la principal fuente de información clínica acerca de los nuevos medicamentos. Esta información puede incluir indicaciones, contraindicaciones o datos nuevos de toxicidad grave que debe ser reconocida no sólo por las compañías farmacéuticas y las agencias regulatorias, sino también por los clínicos que emplean el nuevo fármaco. El profesional de la medicina debe estar familiarizado con estas fuentes de información y capacitado para valorarlas. Toda la información recopilada por el patrocinador durante esta fase, debe ser transmitida a las agencias regulatorias, la Secretaría de Salud en la ciudad de México a través de COFEPRIS, tienen la responsabilidad de asegurar que los nuevos medicamentos son eficaces y seguros en el uso clínico cotidiano. El análisis de la presentación informada sobre

la identificación de importantes efectos adversos (farmacovigilancia), puede limitar el uso del nuevo medicamento a un grupo de pacientes particulares, o definitivamente retirarlo del mercado

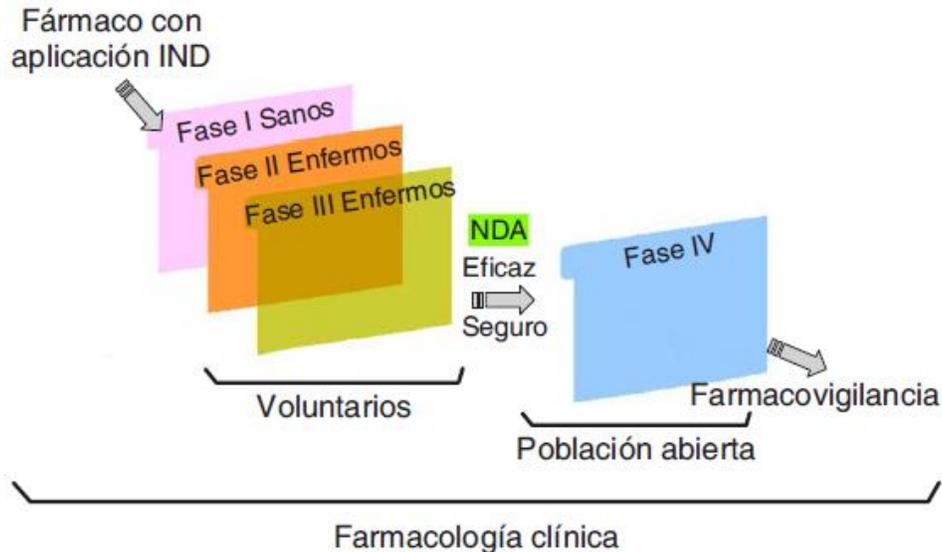


Figura 1. Las 4 fases secuenciales reconocidas en los estudios clínicos de nuevos fármacos. [9]

2.2 Éxito del “Nuevo Fármaco” [14] [15] [16] [17]

Durante el desarrollo de nuevos fármacos y medicamentos es fundamental asegurar que estos sean seguros, eficaces y cuenten con una biodisponibilidad adecuada para que ejerzan su acción farmacológica.

La biodisponibilidad de los fármacos se define como la cantidad y velocidad con que un fármaco inalterado llega a la circulación general, a partir del medicamento en el que fue administrado, ya que hay una relación entre la acción farmacológica y las concentraciones del fármaco en la circulación general y en el sitio de acción.

Surge la necesidad de estudiar las interacciones entre el fármaco y el organismo, las cuales están en función de las propiedades fisicoquímicas propias o intrínsecas de cada fármaco y la capacidad para ser transportado a través del organismo para llegar al sitio de acción.

La evolución de los fármacos en el organismo es descrita por el proceso ADME que consta de las siguientes etapas: absorción, distribución, metabolismo (biotransformación) y excreción

Absorción.

Implica el paso de las moléculas del fármaco desde el sitio de administración del medicamento hacia la circulación general y a través de una barrera fisiológica (membranas) para poder llegar al sitio de acción, para que esto ocurra el fármaco primero deberá ser liberado de los excipientes que lo acompañan y posteriormente solubilizado en los fluidos fisiológicos.

Para que la absorción de los fármacos sea la adecuada se deben evaluar las siguientes propiedades biofarmacéuticas:

- a) Liberación de la forma farmacéutica a la solución en el lugar de absorción.
- b) Estabilidad del fármaco libre en los fluidos fisiológicos.
- c) Permeabilidad a través de las membranas biológicas.
- d) Metabolismo presistémico.

Como parte de la caracterización de la molécula de interés durante el desarrollo de nuevos fármacos y de los medicamentos, para desarrollar formulaciones farmacéuticas con calidad y eficiencia ya que la absorción es el proceso limitante del éxito del desarrollo de un “Nuevo Fármaco”.

Distribución.

Las moléculas del fármaco disueltas en la corriente sanguínea, son susceptibles de ser transportadas hacia todas las regiones del organismo, en función de factores como el coeficiente de partición, su grado de unión a proteínas plasmáticas y tisulares entre otros.

Biotransformación y excreción.

La presencia de moléculas exógenas en el organismo desencadena fenómenos que llevan a la eliminación de las mismas. Un fármaco puede ser excretado como tal o biotrasnformado.

La biotransformación de fármacos se da principalmente por hígado con el objetivo de inactivar y aumentar la polaridad de la molécula para ser eliminado principalmente en orina, sin embargo, algunos productos de la biotransformación de los fármacos han resultado tener actividad farmacológica. Además de la excreción renal hay otras vías de eliminación como la excreción fecal, pulmonar, y dérmica entre otras.

2.3 Sistema de Clasificación Biofarmacéutica. [2] [5] [6] [7] [16] [17]

Después de describir el proceso ADME sabemos que la absorción es de suma importancia para el éxito del desarrollo de un “Nuevo Fármaco”, a la vez la absorción depende de varios factores por ejemplo la solubilidad, permeabilidad y estabilidad del “Nuevo Fármaco” a continuación se describe una herramienta muy importante que emplea la biofarmacia para descartar que estos factores sean un problema durante el desarrollo de nuevos medicamentos.

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico fue introducido por Amidon en 1995, nos permite clasificar a una sustancia en base a su solubilidad acuosa a los diferentes pH del tubo digestivo y a su permeabilidad intestinal, consta de cuatro clases (figura 1), nos ayuda a evaluar cuál de estas propiedades tiene mayor influencia en la absorción de los fármacos dentro del organismo, por lo que nos ayuda a predecir problemas de biodisponibilidad.

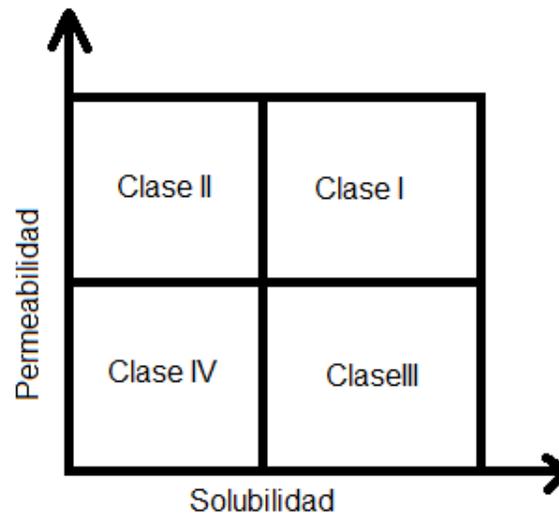


Figura 2. Sistema de Clasificación Biofarmacéutico, Clase I alta solubilidad y alta permeabilidad, Clase II baja solubilidad y alta permeabilidad, Clase III alta solubilidad y baja permeabilidad, Clase IV baja solubilidad y baja permeabilidad.

Se considera que un fármaco es muy soluble cuando la dosis más alta es soluble en 250 mL o menos de un medio acuoso a pH de 1 a 8, cuando se requiere de un volumen mayor a 250 mL se considera que el fármaco es de baja solubilidad. Se considera que el fármaco es muy permeable cuando se espera que su absorción en seres humanos sea de más del 90% de la dosis administrada, cuando la absorción es menor al 90 % y mayor al 50% se considera que el fármaco es moderadamente permeable, cuando la absorción es menor al 50% se considera que el fármaco es de baja permeabilidad.

2.4 Permeabilidad y Tipos de Transporte de los Fármacos en el organismo.

Permeabilidad. [14] [15] [17]

La permeabilidad se define como la capacidad y velocidad de las moléculas para transportarse a través de una membrana biológica ya que de acuerdo a su función y características será su estructura.

Los factores que influyen en la permeabilidad son la liposolubilidad, tamaño, polaridad y carga eléctrica de la molécula así como su similitud a sustancias endógenas ya que de estos depende que la molécula atraviese o no las

diferentes membranas del organismo y así se transporte hasta el sitio de acción farmacológica.

Tipos de Transporte de los fármacos en el organismo.

La forma en que los fármacos se trasladan a través de las diferentes membranas biológicas son las siguientes.

a) Difusión Pasiva.

Este tipo de transporte, se da por gradientes de concentración de un lado a otro de la membrana.

Los parámetros que afectan la facilidad para que las moléculas del fármaco puedan moverse al interior lipofílico de la membrana son los siguientes:

- Coeficiente de partición
- Tamaño y forma molecular
- Grado de ionización.

Este tipo de transporte consta de dos rutas la ruta transcelular y la paracelular.

La ruta paracelular implica el movimiento de las moléculas entre los espacios intercelulares y representa la principal vía de acceso para fármacos en su forma hidrosolubles.

La ruta transcelular implica el movimiento de las moléculas a través de las membranas celulares y representa la principal vía de acceso para muchos fármacos liposolubles.

b) Transporte activo.

Es un proceso que transporta al fármaco contra una gradiente de concentración. Para que se lleve a cabo es necesario el aporte de energía. Por lo regular se utilizan tres tipos de transportadores:

Uniportadores: son proteínas que transportan a las moléculas en un solo sentido a través de la membrana.

Antiportadores: son proteínas que transportan a las moléculas en un sentido a través de la membrana, mientras que simultáneamente transportan en sentido opuesto.

Simportadores: son proteínas que transportan a una molécula junto con otra a través de la membrana.

Puede ser bloqueado por inhibidores del metabolismo y por niveles de ATP.

Es un proceso saturable.

Puede entrar y retirar fármacos de una célula.

c) Difusión facilitada.

En este caso el transporte transmembrana es facilitado por moléculas transportadoras relativamente específicas presentes en la membrana celular.

Se forman complejos entre el transportador y el fármaco, los cuales difunden más rápidamente que el fármaco libre a través de la membrana; luego de atravesar, el fármaco se disocia del transportador y de esta forma se libera en el interior de la célula.

Este transporte principalmente ocurre para fármacos muy similares a sustancias endógenas.

d) Endocitosis/exocitosis

Es la forma de internalización en las células de los fármacos de alto peso molecular.

Estos fármacos son endocitados y así entran a la célula donde son digeridas por las enzimas lisosomales; el contenido digerido presente en las vesículas digestivas entra a la circulación por exocitosis.

e) Filtración pasiva.

Este es el mecanismo a través del cual el fármaco libre y/o sus metabolitos (no unidos) se eliminan a través del glomérulo renal y por tanto se conoce como filtración glomerular.

2.5 Modelos para determinar la Permeabilidad. [2] [16] [17]

Existen numerosos modelos para determinar la permeabilidad de las moléculas, que pueden emplearse para estudiar la absorción oral en seres humanos.

Estas técnicas van desde predicciones por programas informáticos, métodos fisicoquímicos y biológicos.

a) Modelos Informáticos.

Calculan el coeficiente de partición octanol/agua mediante análisis de la molécula en fragmentos, método Leo-Hansch. También está el método de Moriguchi que determina el LogP.

b) Modelo Fisicoquímico.

b.1) Coeficiente de partición.

Mide la lipofilia de un fármaco mediante el método del matraz en agitación con octanol y un medio acuoso.

b.2) Membranas Artificiales inmovilizadas.

Mide la partición de una fase lipídica más sofisticada, sobre una columna de HPLC.

c) Modelos Biológicos.

Los métodos biológicos pueden dividirse en métodos in vivo, in situ e in vitro.

c.1) Modelos In vitro

c.1.1) Tejidos Extirpados.

Mide la captación de las moléculas por los tejidos, se emplean diferentes tejidos como por ejemplo Células, células recién aisladas, vesículas de membrana, bolsas evertidas, anillos intestinales evertidos, placas aisladas del intestino.

c.1.2) Cultivo Celular.

Mide el transporte a través de monocapas celulares.

La FDA acepta los modelos in vitro empleando cultivos celulares para evaluar la absorción intestinal de los fármacos, por lo que a continuación se describirá más a fondo en qué consisten estos modelos. [18]-[31]

Los modelos de absorción a través de cultivos celulares consisten en lo siguiente:

Se emplean celdas formadas por dos compartimentos divididas por un soporte de policarbonato o celulosa, en los cuales se cultivan células epiteliales tales como las Caco-2, HT-29, TC-7, T-84, ECV304, MDCKR1-MDCK y MDCK a 37°C, 5% CO₂ y 95 % de humedad relativa en medio de cultivo suplementado, para formar una monocapa celular que simula la membrana intestinal (Figura 3).

Ya que se tiene este sistema con la monocapa celular formada, se cambia el medio de cultivo por solución amortiguadora de Hank con un pH: 7.4, porque esta simula al fluido intersticial. Se administran soluciones del fármaco en la cámara donadora y se muestrea en la cámara receptora, para después cuantificar el fármaco que ha sido transportado a través ella por un determinado tiempo.

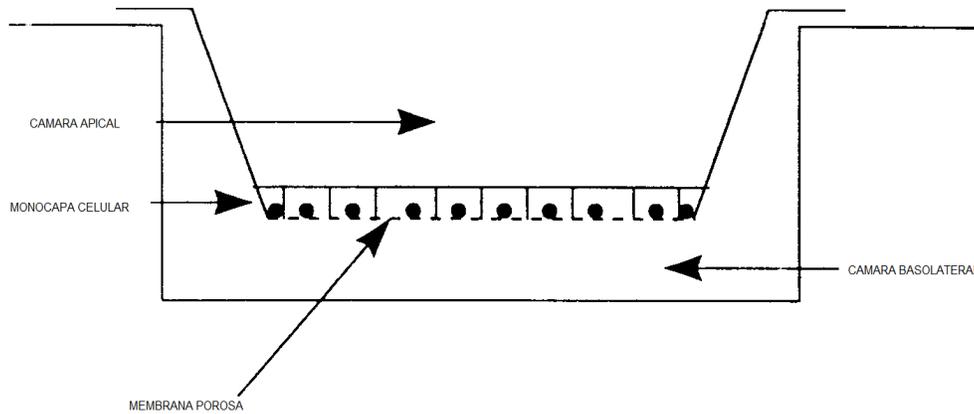


Figura 3. Esquema del sistema de cultivo para determinar la permeabilidad aparente.

Con los resultados se obtiene el coeficiente de permeabilidad aparente mediante el siguiente cálculo:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} * \frac{V}{CoA}$$

Donde:

P_{app} = es el coeficiente de permeabilidad aparente (cm/s).

dQ/dt =es la velocidad de transporte del fármaco ($\mu\text{g/s}$).

V = Volumen de la cámara receptora (mL).

C_o =concentración inicial en la cámara donadora ($\mu\text{g/mL}$).

A =es la superficie de la monocapa celular (cm^2).

Si se observa que el coeficiente de permeabilidad aparente aumenta linealmente al aumentar la concentración del fármaco, el transporte no está saturado, si no varía sin importar la dirección, se puede concluir que el transporte es pasivo.

Si el transporte es significativamente mayor en el sentido basolateral a apical que en el sentido apical basolateral, existe la posibilidad de que el fármaco este expulsado activamente de las células por un transportador de membrana como por ejemplo la glicoproteína-P.

Para aclarar si otros transportadores de membrana participan en la absorción, se pueden realizar estudios de inhibición competitiva con inhibidores conocidos para cada transporte.

Para evaluar si un compuesto se absorbe a través de la vía paracelular o de la transcelular, se pueden abrir artificialmente las uniones celulares con sustancias como EDTA; si la permeabilidad aparente no se ve afectada, se puede suponer que el fármaco se transporta por la ruta transcelular.

c.2) Modelos In situ.

c.2.1) Perfusión in situ.

Mide la desaparición del fármaco de una perfusión de asa cerrada o abierta de segmentos intestinales de animales anestesiados.

c.2.2) Intestino Perfundido vascularmente.

Mide la desaparición del fármaco de la perfusión y su aparición en sangre.

c.3) Modelos In vivo.

c.3.1) Asa intestinal.

Mide la desaparición del fármaco de la perfusión de asa intestinal en un animal despierto.

c.3.2) Loc-I-Gut.

Mide la desaparición del fármaco de la perfusión en el intestino humano.

c.3.3) Capsula de alta frecuencia.

Método no invasivo; mide el fármaco en la circulación sistémica.

c.3.4) Capsula Inteli Site.

Método no invasivo; mide el fármaco en la circulación sistémica.

c.3.5) Biodisponibilidad.

Análisis de datos Farmacocinéticos.

2.6 Línea Celular Madin Darby Canine Kidney (MDCK). [23] [24] [31] [32]

Las células que principalmente se emplean para los modelos de permeabilidad en general son las células Caco-2, estas son células diferenciadas de adenocarcinoma colorrectal humano que forman una monocapa de enterocitos polarizados parecidos a los del intestino delgado.

La desventaja de emplear estas células, es que su proliferación y la formación de la monocapa celular requieren de aproximadamente 1 mes, por lo que son muy susceptibles a contaminaciones, ya que su cultivo requiere de mucha manipulación, porque el cambio del medio de cultivo es aproximadamente cada tercer día.

Las células MDCK son células de epitelio renal, aislada en 1958 por S. H. Madin y N.B. Darby de una hembra cocker spaniel, es una de las líneas celulares más ampliamente estudiada con respecto a su composición lipídica, genética, expresión de proteínas. Posee una morfología epitelial distintiva, características anatómicas y funcionales de células tubulares normales de mamífero como la formación de uniones estrechas y la presencia de microvellosidades.

Las células MDCK alcanzan su confluencia en membranas de policarbonato en 2 días, logrando llegar a la fase estacionaria en 5 días con una densidad celular de 5×10^5 células/mL lo cual es una gran ventaja frente a las Caco-2 porque son de fácil manejo, al proliferarse más rápido que las Caco-2 su manipulación es menor y la posibilidad de sufrir contaminación, los experimentos de permeabilidad pueden realizarse entre 5 y 10 días después de inocular las células.

Al formar uniones estrechas y las microvellosidades simulan adecuadamente la superficie de absorción del intestino humano, se ha demostrado que el uso de esta línea celular para los estudios de permeabilidad arroja resultados confiables,

reproducibles muy similares a los estudios en los que se emplean células Caco-2 y en menor tiempo.

Además hay una variante de esta línea celular que se puede emplear para evaluar el eflujo de las moléculas, esta variante son las células MDR1-MDCK a las cuales se les transfirió el gen *mdr-1* que codifica para producir grandes cantidades de glicoproteína-P, la cual es un transportador de membrana que activamente expulsa a los fármacos al exterior celular.

2.7 Ranitidina. [3] [32]

Nombre y sinónimos: Ranitidina, Clorhidrato de Ranitidina, HCL Ranitidina.

Nombre Sistemático IUPAC: *E*-*N*-(2-((5-((dimetilaminometil) furano-2-il)metiltio)etil)- *N*'-metil-2-nitroetano-1,1-diamina.

Fórmula Molecular: C₁₃H₂₂N₄O₃S

Peso molecular: 314.404 g/mol

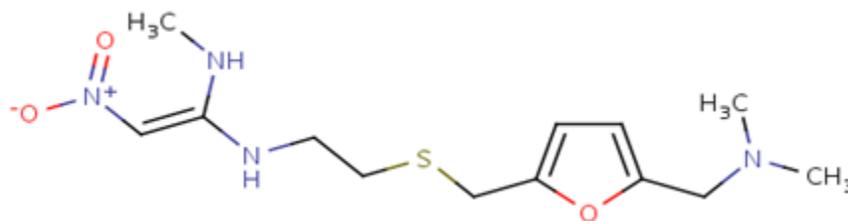


Figura 4. Estructura química de Ranitidina.

Descripción: Polvo ligeramente amarillo pálido, con característico olor a azufre, soluble en agua (24.7 mg/mL), metanol y etanol, insoluble en cloroformo, tiene un punto de fusión de 60-70 ° C, un log P de 1.3 y consta de dos pKa 8.2 y 2.7.

Indicaciones terapéuticas:

La ranitidina es un antagonista de la histamina en el receptor H₂, está indicada en el tratamiento de desórdenes gastrointestinales en los que la secreción gástrica de ácido está incrementada tales como gastritis, ardor de estómago, reflujo gastroesofágico y úlcera duodenal, también está indicada en la profilaxis de las úlceras inducidas por los fármacos anti-inflamatorios no esteroideos, y la profilaxis de la gastritis por estrés.

Dosis

Vía Oral

Comprimidos efervescentes que contienen el equivalente a 25 mg

Comprimidos recubiertos que contienen el equivalente a 50 mg, 150 mg y 300 mg.

Capsulas que contienen el equivalente a 300 mg.

Vía intramuscular:

Ampolletas con el equivalente a 50 mg

Farmacocinética:

La ranitidina se puede administrar por vía oral o parenteral, la administración intramuscular muestra una biodisponibilidad del 90-100%, mientras que por vía oral la biodisponibilidad es del 50-60% debido a que el fármaco experimenta un metabolismo de primer paso.

El fármaco se distribuye ampliamente en el organismo, encontrándose niveles significativos del mismo en el líquido cefalorraquídeo y en la leche materna. El fármaco se une a las proteínas del plasma, en un 15%.

Los efectos inhibidores sobre la secreción gástrica de ácido duran entre 8 y 12 horas. La ranitidina se metaboliza parcialmente en el hígado y se excreta a través

de la orina y en las heces. La semi-vida del fármaco es de 2 a 3 horas, aumentando hasta las 5 horas en los pacientes con insuficiencia renal (aclaramiento de creatinina < 35 ml). La secreción renal de la ranitidina se lleva a cabo por secreción tubular y por filtración glomerular.

Mecanismo de Acción:

La ranitidina inhibe de forma competitiva la unión de la histamina a los receptores de la células parietales gástricas (denominados receptores H2) reduciendo la secreción de ácido basal estimulada por los alimentos, la cafeína, la insulina o la pentagastrina, reduce el volumen de ácido excretado en respuesta a los estímulos con lo cual, de forma indirecta, reduce la secreción de pepsina, también muestra un efecto cicatrizante sobre la mucosa gastrointestinal, protegiéndola de la acción irritante del ácido acetilsalicílico y de otros fármacos anti-inflamatorios no esteroideos.

Efectos Adversos

Las reacciones adversas más frecuentes comunicadas son diarrea o constipación, náuseas, vómitos y dolor abdominal. En raras ocasiones se han comunicado hepatitis, ictericia, y aumento de las transaminasas. También se ha comunicado algún caso aislado de pancreatitis.

Se han comunicado reacciones adversas sobre el sistema nervioso central, aunque su relación con la ranitidina es dudosa por tratarse de enfermos críticos de edades avanzadas. Estos efectos adversos suelen ser visión borrosa, vértigo, insomnio, malestar y mareos y suelen variar de un estudio a otro.

También son muy raras las reacciones dermatológicas eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson y necrólisis epidérmica. Igualmente raras son las reacciones de hipersensibilidad incluyendo las reacciones anafilácticas, el angiodema, los broncoespasmos, la fiebre o la eosinofilia.

Al igual que ha ocurrido con otros antagonistas H₂ se han producido casos de taquicardia sinusal, bradicardia sinusal, bloqueo A-V y contracciones ventriculares prematuras.

2.8 Propranolol. [3] [32]

Nombre y sinónimos: Propranolol, Clorhidrato de Propranolol, Propranolol HCl, y Clorhidrato de Propranolol R,S.

Nombre Sistemático IUPAC: (RS)-1-(isopropilamino)-3-(naftalen-1-iloxi)propan-2-ol

Fórmula Molecular: C₁₆H₂₁NO₂

Peso molecular: 259.3434 g/mol

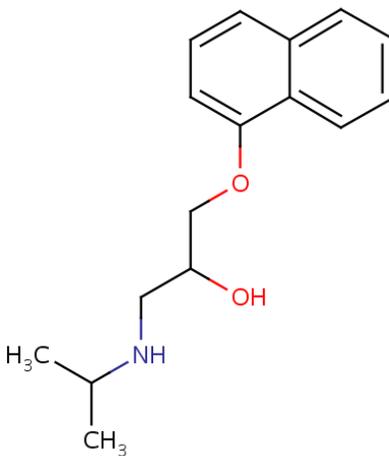


Figura 5. Estructura química de Propranolol

Descripción: Polvo blanco, inodoro y cristalino, soluble en agua (0.07 mg/mL) alcohol, ligeramente soluble en cloroformo; prácticamente insoluble en éter, es una base débil con un punto de fusión de 163-164 ° C, un log P de 3.0 y un pKa de 9.5.

Indicaciones terapéuticas:

Propranolol es un antagonista competitivo de los receptores adrenérgicos beta 1 y beta 2, está indicado en control de la hipertensión, manejo de la angina de pecho, control de arritmias cardíacas, control de la ansiedad y de la taquicardia por ansiedad, profilaxis a largo plazo después de la recuperación de infarto agudo del miocardio, profilaxis de la hemorragia gastrointestinal alta en pacientes con hipertensión portal y várices esofágicas, manejo auxiliar de la tirotoxicosis y crisis tirotóxica, manejo de la cardiopatía hipertrófica obstructiva.

Mecanismo de Acción

El propranolol compite con los neurotransmisores simpaticomiméticos como las catecolaminas para la unión a beta (1)-adrenérgicos en el corazón, inhibe la estimulación simpática. Esto resulta en una reducción de la frecuencia cardíaca en reposo, el gasto cardíaco, presión arterial sistólica y diastólica.

Dosis:

- Vía Oral.

Comprimidos que contienen el equivalente a 10 y 40 mg.

Comprimidos de liberación sostenida que contienen el equivalente a 160 mg.

- Vía Intravenosa.

Solución inyectable que contiene el equivalente a 1mg/mL.

Farmacocinética

El propranolol se administra por vía oral o intravenosa. Después de la administración de un comprimido de la formulación normal de propranolol, la dosis se absorbe casi por completo alcanzándose las concentraciones máximas en 60-90 minutos. Después de una dosis intravenosa, los efectos farmacológicos se manifiestan de inmediato y se mantienen durante 2 a 4 horas.

El propranolol es un fármaco muy lipófilico y, en consecuencia, se distribuye ampliamente por todo el cuerpo. Atraviesa fácilmente la placenta y la barrera hematoencefálica y se excreta en la leche materna. El fármaco se une notablemente a las proteínas del plasma, siendo superior al 90% su unión a la albúmina.

El propranolol experimenta un extenso metabolismo hepático de primer paso, siendo dependiente del flujo de sangre en el hígado. Antes de alcanzar la circulación sistémica. El principal metabolito del propranolol, el 4-hidroxiopropranolol es farmacológicamente equipotente al fármaco inicial, pero su eliminación es mucho más rápida, especialmente al comienzo de un tratamiento oral. Por vía intravenosa o después de un tratamiento crónico, este metabolito es producido en menor cantidad.

El propranolol se elimina principalmente por vía renal, sólo del 1 al 4% de la dosis del fármaco sin alterar se recupera en las heces. El tiempo vida media de eliminación del propranolol oscila entre 2 y 6 horas, aumentando durante las administraciones crónicas, debido probablemente a un efecto de saturación hepática y/o a una reducción del aclaramiento renal. En los pacientes con extensa disfunción renal, la reducción de la excreción urinaria queda compensada por un aumento de la eliminación fecal.

Efectos Adversos

La bradicardia sinusal, la hipotensión, fatiga, mareos y depresión, otras reacciones adversas sobre el sistema nervioso central son las pesadillas y las alucinaciones que se presentan con mayor frecuencia en los ancianos.

Los efectos adversos gastrointestinales más frecuentes son las náuseas, vómitos y diarrea.

En los pacientes asmáticos el propranolol puede exacerbar la disnea o el broncoespasmo.

Son raros los efectos adversos hematológicos, aunque se han comunicado ocasionalmente agranulocitosis. Igualmente son raras las reacciones dermatológicas aunque se han descrito prurito, hiperpigmentación de la piel, alopecia reversible, dermatitis exfoliativa. Estas reacciones suelen ser ligeras y pasajeras

Otros efectos adversos descritos son mialgias, dolor musculo esquelético, disfunción sexual, impotencia y disminución de la libido.

2.9 Validación de Métodos Bioanalíticos. [1] [2] [3] [4]

Para la validación de métodos analíticos existen varias guías, como por ejemplo la Guía para la industria: Validación de Métodos Bioanalíticos que proporciona la FDA, también la Secretaria de Salud nos proporciona a través de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos los parámetros y especificaciones que debe cumplir la validación de un método analítico de acuerdo al propósito del método analítico, y la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen pruebas.

En este proyecto se considero lo descrito en la guía para Validación de Metodos Bioanaliticos de la FDA y la NOM-177-SSA1-1998 para realizar las validaciones de los métodos bioanalíticos considerando los siguientes parámetros:

2.9.1 Validación.

Es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el cual fue diseñado.

2.9.2 Linealidad

Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener respuestas directamente proporcionales con la concentración del compuesto en la muestra.

Criterio de aceptación. La respuesta debe ser continua y reproducible a lo largo del rango de trabajo y el coeficiente de regresión mayor o igual a 0.99.

2.9.3 Precisión.

Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto.

Criterio de aceptación. Debe cumplir con la repetibilidad y reproducibilidad.

2.9.3.1 Repetibilidad.

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones.

Criterio de aceptación. El coeficiente de variación no debe ser mayor al 15 %.

2.9.3.2 Reproducibilidad.

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo diferentes condiciones de análisis.

Criterio de aceptación. El coeficiente de variación no debe ser mayor al 15 %.

2.9.4 Selectividad.

Es la capacidad de un método analítico para cuantificar específicamente un compuesto en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

Criterio de aceptación. No deben presentarse interferencias en la respuesta obtenida del compuesto de interés, en dado caso esta no debe producir un error mayor al aceptado en precisión y exactitud.

2.9.5 Limite de detección.

Es la concentración mínima de un compuesto en una muestra que puede ser detectada bajo las condiciones de análisis establecidas.

2.9.6 Limite de Cuantificación.

Es la concentración más baja de un compuesto en una muestra que puede ser cuantificado bajo las condiciones de análisis establecidas cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

Criterio de aceptación. El valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal, y el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15% .

2.9.7 Exactitud

Es la concordancia entre el valor experimental y el valor teórico o de referencia.

Criterio de aceptación. El valor promedio de las determinaciones de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal.

2.9.8 Recobro Absoluto

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

Criterio de aceptación. El % de Recuperación absoluta no necesariamente debe ser del 100% pero si debe ser reproducible en cada nivel de concentración evaluada.

2.9.9 Estabilidad

Es la propiedad de un compuesto de mantener sus características desde el momento del muestreo hasta su análisis y bajo las condiciones de almacenamiento.

Criterio de aceptación. Los resultados obtenidos deben cumplir con los criterios de exactitud y repetibilidad.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General.

Evaluar la permeabilidad aparente de Clorhidrato de Ranitidina y Clorhidrato de Propranolol a través de células MDCK de manera independiente, con el propósito de establecer una técnica para desarrollar estudios de permeabilidad comparativos de dichos compuestos con compuestos nuevos, como parte de su caracterización biofarmacéutica.

3.2 Objetivos Particulares.

3.2.1 Evaluar el efecto en la proliferación celular de la administración de Clorhidrato de Ranitidina y Clorhidrato de Propranolol de manera independiente en la viabilidad de la línea celular MDCK en un rango de de 0.1 a 100 µg/mL concentraciones para ambos compuestos, para asegurar la formación de las monocapas celulares.

3.2.2. Desarrollar y validar los métodos bioanalíticos para cuantificar Clorhidrato de Ranitidina y Clorhidrato de Propranolol de manera independiente en solución amortiguadora de Hank empleada como medio de transporte en los estudios de permeabilidad.

3.2.3 Desarrollar la metodología para realizar los estudios de permeabilidad aparente de Clorhidrato de Ranitidina y Clorhidrato de Propranolol de manera independiente

4. METODOLOGIA

4.1 Equipo y Material.

4.1.1 Cultivo Celular

- Agitador oscilatorio LAB- LINE
- Agitador tipo vortex thermo scientific MaxiMix* I
- Bomba de vacío Cole Palmer L-79200-0
- Cajas de cultivo de 25 y 75 cm² Costar
- Cámara Neu Bauer Marienfeld
- Campana de flujo laminar clase II Telstar mini-V/PCR
- Centrifuga Becton Dickinson J 600
- Criotubos estériles de 2 mL Corning
- Fluorómetro Perkin Elmer LS 50B
- Gasas estériles
- Gradillas para microtubos
- Gradillas para tubos Cónicos
- Incubadora con CO₂ LAB-LINE
- Lector de microplacas Labsystems Multiskan MS
- Manguera para vacío
- Matraz Kitazato de 1 L Kimax
- Micropipeta de 10 a 100 µL Eppendorf
- Micropipeta de 100 a 1000 µL Eppendorf
- Microscopio invertido Iroscope SI-PH
- Microscopio óptico Olympus CH-2
- Microtubos de 1.5 mL Eppendorf
- Multimetro Digital Truper
- Pipeta automática multicanal de 20 a 100 µL Eppendorf
- Pipetas Pasteur de vidrio estériles
- Pipetas serológicas estériles de 1.0,5.0, 10.0 y 25.0 mL Corning

- Placas con 12 celdas Transwell estériles Corning No Cat. 341
- Placas de 96 pozos tipo ELISA estériles Costar
- Puntas de plástico para pipetas de 10 a 200 μL y 100 a 1000 μL estériles
- Refrigerador
- Sistema de filtración de 250 mL con membrana de acetato de celulosa de 0.22 μm estéril Corning
- Termómetro de -10 a 100 $^{\circ}\text{C}$
- Tinas estériles de 25 mL Corning
- Tubos cónicos de polipropileno estériles de 15 mL y 50 mL
- Ultracongelador (-70 $^{\circ}\text{C}$) REVCO

4.1.2 Método Bioanalítico

- Agitador Vortex Mixer UNICO
- Agitador Magnético
- Balanza Analítica modelo Sartorius A-210 P
- Baño de Ultrasonido Branson modelo 5510
- Columna Zorbax Eclipse Plus C18 100 mm x 3.0 mm, 3.5 μm Agilent
- Columna Zorbax SB-C18 150 mm x 4.6 mm, 3.5 μm Agilent
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Agilent Technologies series 1100.
 - Desgasificador
 - Bomba cuaternaria/isocrática
 - Automuestreador
 - Detector UV-Vis de Arreglo de Diodos
 - Sistema de recolección de datos HP- Chemstation para sistemas Agilent LC y LC/MS
- Equipo de filtración Millipore
- Equipo de purificación de Agua Milli-Q
- Espátula de cromo-níquel
- Espectrofotometro UV-Vis Shimadzu modelo UV-1601

- Gradilla para tubos de ensaye
- Gradilla para viales
- Manguera para vacío
- Matraces volumétricos de 5, 10, 1000 mL
- Membranas Millipore tipo HA 0.45 μm
- Membranas Millipore tipo HVLP 0.45 μm
- Micropipeta automática de 100 a 1000 μL
- Micropipeta automática de 1000 a 5000 μL
- Micropipeta automática de 20 a 200 μL eppendorf
- Papel Aluminio
- Parafilm "M"
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Piseta de plástico 500 mL
- Potenciómetro Thermo Orion Modelo 410
- Probeta de vidrio de 100 mL
- Septas para viales Agilent
- Tapas para viales Agilent
- Tubos cónicos de 15 mL Corning
- Tubos de ensaye
- Vasos de precipitados de 50, 100, 250 y 500 mL
- Viales de 1.5 mL Agilent

4.2 Reactivos.

4.2.1 Cultivo Celular

- Ácido Acético al 1%
- Ácido Acético Glacial J.T. Baker
- Ácido Tricloroacético al 10 %
- Agua Destilada
- Aminoácidos no esenciales GIBCO

- Antibióticos GIBCO
- Azul Tripano al 0.4% GIBCO
- Dimetilsulfoxido J.T. Baker
- Etanol al 70%
- Etanol J. T. Baker
- HEPES sal de sodio reactivo J. T. Baker
- Medio de Cultivo DMEM GIBCO
- Medio de lavado Ham's F-12
- Solución Amortiguadora de Hank sin bicarbonato MP Biomedical
- Solución inyectable de glucosa al 5% Dextrabott
- Suero Fetal Bovino GIBCO
- Sulforrodamina B 0.4%
- Tripsina-EDTA 0.25% GIBCO
- Tris- base 10 mM
- Ácido Clorhídrico RA, J. T. Baker
- Hidróxido de Sodio RA, J. T. Baker

4.2.2 Método Bionalítico.

- Ácido Fosfórico J. T. Baker
- Agua Desionizada
- Fosfato de Sodio Dibásico Anhidro J.T. Baker
- Fosfato Monobásico de Sodio Monohidratado J. T. Baker
- Metanol Grado HPLC Tecnolab
- Solución reguladora de Biftalatos pH:4.0 Grado RA, J. T. Baker
- Solución reguladora de Boratos pH:10.0 Grado RA, J. T. Baker
- Solución reguladora de Fosfatos pH:7.0 Grado RA, J. T. Baker

4.2.3 Estándares

- Clorhidrato de Ranitidina
Pureza 100.1%.

- Clorhidrato de Propranolol
Pureza 99.6%
- Lucifer Yellow,
Pureza 100%

4.2.4 Material Biológico

- Línea celular Madin Darby Canine Kidney (MDCK) donada por la Dra. Lilián Yépes Mulia de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría, Laboratorio de Parasitología en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social.

4.3 Preparación de Soluciones.

4.3.1 Cultivo Celular.

➤ ***Cultivo y Proliferación Celular (todas las soluciones son estériles).***

- **Etanol al 70%.**

Medir un volumen de 700 mL de Alcohol Etilico Absoluto, transferir a un matraz volumétrico de 1L y llevar a volumen con agua desionizada.

- **Medio de Cultivo Suplementado (D-MEM).**

Agregar a un frasco de medio D-MEM no suplementado 50 mL de Suero Fetal Bovino, 5 mL de aminoácidos no esenciales, 5 mL de antibióticos, agitar hasta homogenizar el medio de cultivo. Realizar bajo condiciones asépticas en la campana de flujo laminar.

- **Medio de Lavado (Ham F-12).**

Disolver un sobre del medio F-12 en un matraz volumétrico de 1L, adicionar bicarbonato de sodio y ajustar pH a 7.4 con HCl 0.01M o NaOH 0.01M, filtrar por un sistema de filtración Corning con membrana de 0.22µm en condiciones asépticas en la campana de flujo laminar para esterilizar.

➤ **Ensayos de Inhibición de la Proliferación Celular.**

• **Ácido Acético al 1%.**

Medir 10 mL de Ácido Acético Glacial, transferir a un matraz volumétrico de 1L y llevar a volumen con agua destilada.

• **Ácido Tricloroacético al 10% (p/v).**

Pesar 10.0000 g de ácido tricloroacético, transferir a un matraz de 100 mL, disolver y llevar a volumen con agua destilada.

• **Solución Tris-Base 10 mM pH:10.5**

Pesar 1.2100 g de Tris Base, transferir a un matraz volumétrico de 1 L, disolver con agua destilada y llevar a un volumen aproximado de 900 mL, ajustar pH 10.5 con NaOH 0.01 M o HCl 0.01 M según sea el caso y llevar a volumen con agua destilada.

• **Sulforrodamina B al 0.4 %.**

Pesar 1.0000 g de Sulforrodamina B, transferir a un matraz volumétrico de 250 mL y llevar a volumen con ácido acético al 1%.

• **Solución Stock de Propranolol para Ensayo de toxicidad (Solución A 1000 µg/mL)**

Pesar lo equivalente a 0.00100 g de Propranolol, transferir a un microtubo de 2 mL disolver y llevar a volumen de 1 mL con agua desionizada estéril.

• **Solución de Propranolol para Ensayo de toxicidad (Solución B 100 µg/mL)**

Medir 100 µL de la Sol. A y transferir a un microtubo de 2 mL y llevar a volumen de 1 mL con agua desionizada estéril.

• **Solución de Propranolol para Ensayo de toxicidad (Solución C 10 µg/mL)**

Medir 100 µL de la Sol. B y transferir a un microtubo de 2 mL y llevar a volumen de 1 mL con agua desionizada estéril.

- **Solución de Propranolol para Ensayo de toxicidad (Solución D 1 µg/mL)**

Medir 100 µL de la Sol. C, transferir a un microtubo de 2 mL y llevar a volumen de 1 mL con agua desionizada estéril.

- **Solución Stock de Ranitidina para Ensayo de toxicidad (Solución E 1000 µg/mL)**

Pesar lo equivalente a 0.00100g de Ranitidina, transferir a un microtubo de 2mL disolver y llevar a volumen de 1 mL con agua desionizada estéril.

- **Solución de Ranitidina para Ensayo de toxicidad (Solución F 100 µg/mL)**

Medir 100 µL de la Sol. E, transferir a un microtubo de 2 mL y llevar a volumen de 1 mL con agua desionizada estéril.

- **Solución de Ranitidina para Ensayo de toxicidad (Solución G 10 µg/mL)**

Medir 100 µL de la Sol. F, transferir a un microtubo de 2 mL y llevar a volumen de 1 mL con agua desionizada estéril.

- **Solución de Ranitidina para Ensayo de toxicidad (Solución H 1 µg/mL)**

Medir 100 µL de la Sol. G, transferir a un microtubo de 2 mL y llevar a volumen de 1 mL con agua desionizada estéril.

➤ ***Estudios de Permeabilidad***

- **Solución Amortiguadora de Hank adicionada con Glucosa 10 mM y HEPES 10mM (Medio de transporte Estéril M.T.E.)**

Transferir a un matraz volumétrico de 1L el contenido de un frasco para preparar solución amortiguadora de Hank, pesar 2.6029 g de HEPES y transferir al matraz, disolver con agua desionizada estéril y adicionar 36 mL de solución inyectable de glucosa al 5%, llevar a volumen aproximado de 900 mL con agua desionizada y ajustar a pH: 7.4 con NaOH 0.01 M o HCl 0.01 M según sea el caso, llevar a volumen con agua desionizada, en condiciones asépticas dentro de la campana de flujo laminar pasar por un sistema de filtración Corning para esterilizar.

- **Solución Stock de Propranolol para Estudio de Permeabilidad (Solución de 1000 µg/mL)**

Pesar con exactitud el equivalente a 0.0100 g de Propranolol, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver con metanol y llevar a volumen.

- **Solución de Propranolol para Estudio de Permeabilidad (Solución I 100 µg/mL)**

Medir con exactitud 1 mL de la solución Stock de Propranolol, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, y llevar a volumen con Solución Amortiguadora de Hank (M.T.E.).

- **Solución de trabajo de Propranolol para Estudio de Permeabilidad (Solución II 16 µg/mL)**

Medir con exactitud 1.6 mL de la solución I de Propranolol, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, y llevar a volumen con Solución Amortiguadora de Hank (M.T.E.).

- **Solución de trabajo de Propranolol para Estudio de Permeabilidad (Solución III 8 µg/mL)**

Medir con exactitud 800 µL de la solución I de Propranolol, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, y llevar a volumen con Solución Amortiguadora de Hank (M.T.E.).

- **Solución de trabajo de Propranolol para Estudio de Permeabilidad (Solución IV 4 µg/mL)**

Medir con exactitud 400 µL de la solución I de Propranolol, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, y llevar a volumen con Solución Amortiguadora de Hank (M.T.E.).

- **Solución Stock de Ranitidina para Estudio de Permeabilidad (Solución de 1000 µg/mL)**

Pesar con exactitud el equivalente a 0.00100 g de Ranitidina, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver con metanol y llevar a volumen.

- **Solución de Ranitidina para Estudio de Permeabilidad (Solución V 100 µg/mL)**

Medir con exactitud 1 mL de la solución Stock de Ranitidina, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, y llevar a volumen con Solución Amortiguadora de Hank (M.T.E.).

- **Solución de trabajo de Ranitidina para Estudio de Permeabilidad (Solución VI 16 µg/mL)**

Medir con exactitud 1.6 mL de la solución V de Ranitidina, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, y llevar a volumen con Solución Amortiguadora de Hank (M.T.E.).

- **Solución de trabajo de Ranitidina para Estudio de Permeabilidad (Solución VII 8 µg/mL)**

Medir con exactitud 800 µL de la solución V de Ranitidina, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, y llevar a volumen con Solución Amortiguadora de Hank (M.T.E.).

- **Solución de trabajo de Ranitidina para Estudio de Permeabilidad (Solución VIII 4 µg/mL)**

Medir con exactitud 400 µL de la solución V de Ranitidina, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, y llevar a volumen con Solución Amortiguadora de Hank (M.T.E.).

- **Solución de Lucifer Yellow 100 µg/mL.**

Pesar con exactitud 0.0020 g de Lucifer Yellow, transferir a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con la Solución Amortiguadora de Hank (M.T.E.).

4.3.2 Método Bioanalítico.

- **Solución Amortiguadora de Hank adicionada con Glucosa 10 mM y HEPES 10mM (Medio de transporte).**

Transferir a un matraz volumétrico de 1L el contenido de un frasco para preparar solución amortiguadora de Hank, pesar 2.6029 g de HEPES y transferir al matraz, disolver con agua desionizada y adicionar 36 mL de solución inyectable de

glucosa al 5%, llevar a volumen aproximado de 900 mL con agua desionizada y ajustar a pH: 7.4 con NaOH 0.01 M o HCl 0.01 M según sea el caso, llevar a volumen con agua desionizada.

- **Solución Amortiguadora de Fosfato Monobásico de Sodio 1 M**

Pesar 1.3799 g fosfato monobásico de sodio monohidratado, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver con agua desionizada y llevar a volumen.

- **Solución Amortiguadora de Fosfato Dibásico de Sodio 0.5 M**

Pesar 7.098 g fosfato monobásico de sodio monohidratado, transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con agua desionizada y llevar a volumen.

- **Solución Amortiguadora de Fosfatos 0.01 M pH:7.6**

Medir 5.2 mL de la solución de Fosfato Monobásico de Sodio 1 M, medir 63.2 mL de la solución de Fosfato Dibásico de Sodio 0.5 M y transferir a un matraz volumétrico de 1L, mezclar y llevar a volumen con agua desionizada, determinar el pH, si es necesario, ajustar a pH: 7.6 con H₃PO₄ diluido o con NaOH 0.01M, según sea el caso, filtrar por una membrana de 0.45 µm y degasificar por 15 minutos en el baño de ultrasonido.

- **Solución de Metanol grado HPLC.**

Medir 1L de Metanol grado HPLC, filtrar por una membrana de 45 µm y degasificar por 15 minutos en el baño de ultrasonido.

- **Solución de Fase Móvil para preparar las soluciones de Propranolol.**

Medir con exactitud 700 mL de Metanol grado HPLC, medir con exactitud 300 mL de Solución Amortiguadora de Fosfatos 0.01M pH: 7.6 y mezclar

- **Solución de Fase Móvil para preparar las soluciones de Ranitidina.**

Medir con exactitud 600 mL de Metanol grado HPLC, medir con exactitud 400 mL de Solución Amortiguadora de Fosfatos 0.01M pH: 7.6 y mezclar.

- **Solución Stock de Propranolol en Metanol, (Solución de 100 µg/mL).**

Pesar con exactitud el equivalente a 0.0100 g de Propranolol, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con metanol y llevar a volumen.

- **Solución Stock de Ranitidina en Metanol, (Solución de 100 µg/mL).**

Pesar con exactitud el equivalente a 0.0100 g de Ranitidina, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con metanol y llevar a volumen.

- **Solución Stock de Propranolol en Solución Amortiguadora de Hank, (Solución de 100 µg/mL).**

Pesar con exactitud el equivalente a 0.0100 g de Propranolol, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a volumen con Solución Amortiguadora de Hank.

- **Solución Stock de Ranitidina en Solución Amortiguadora de Hank, (Solución de 100 µg/mL).**

Pesar con exactitud el equivalente a 0.0100 g de Ranitidina, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a volumen con Solución Amortiguadora de Hank.

4.4 Procedimiento Experimental.

4.4.1 Cultivo Celular

- **Descongelamiento de la Línea Celular.**

Retirar el criotubo que contiene las células del ultracongelador (-70°C), frotar el criotubo hasta descongelar las células y obtener una suspensión, en condiciones asépticas, verter la suspensión celular en un tubo falcón de 10 mL que contiene 10 mL de medio de lavado F12, homogenizar y centrifugar a 1500 rpm por 5 min, retirar el sobrenadante y resuspender con 1 mL de medio de cultivo DMEM.

- **Conteo Celular.**

Transferir 20 µL de la suspensión celular a un microtubo, adicionar 80 µL de azul tripano, mezclar y colocar la suspensión entre el cubre objetos y el portaobjetos de la cámara de Neubauer cuidando que no se salga la suspensión por los bordes, observar en el microscopio óptico con el objetivo de 10x, contar las células no teñidas por mm² en los cuatro cuadrantes de la cámara, obtener el promedio de

los cuatro cuadrantes y calcular el número de células por mL con la siguiente fórmula:

$$\text{Cel/mL} = N \times F_d \times F_c$$

Donde:

N=Promedio de las células obtenido de los 4 cuadrantes.

Fd= Factor de dilución (20:80)

Fc= Factor de conversión de la cámara (10000)

- **Proliferación Celular.**

Medir y transferir a la caja de cultivo 5 mL de medio de cultivo DMEM, medir y transferir a la caja de cultivo el equivalente a 500 000 células de la suspensión celular, homogenizar e incubar a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa por una hora, una vez transcurrido ese tiempo cambiar el medio de cultivo y mantener en incubación el tiempo necesario para llegar a una confluencia del 80 %, el medio de cultivo debe cambiarse cada 48 horas.

- **Disociación Celular.**

Retirar el medio de cultivo de la caja de cultivo, adicionar Tripsina- EDTA al 25% de 1 a 4 mL (depende de la superficie a cubrir) incubar a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa por aproximadamente 5 minutos, agitar suavemente la caja de cultivo para favorecer la disociación, observar al microscopio para ver si las células ya se desprendieron, en seguida adicionar 10 mL de medio de lavado F-12 de tal forma que resbale por la caja y arrastre todas las células desprendidas para formar una suspensión, transferir con ayuda de una pipeta estéril la suspensión celular a un tubo falcón de 15 mL, centrifugar a 2500 rpm durante 5 minutos, retirar el sobrenadante y resuspender el paquete celular con 1 mL de medio de cultivo.

4.4.2 Ensayos de Inhibición de la Proliferación Celular.

- En condiciones estériles adicionar 100 µL de medio de cultivo suplementado DMEM por pozo a una placa de 96 pozos tipo elisa. Preparar una suspensión celular de 1.0×10^6 células/mL (volumen necesario aproximadamente 2 mL para una placa), adicionar a cada pozo el volumen equivalente a 20 000 células, incubar a 37°C, 5% CO₂ y 95% de Humedad Relativa durante 24 horas.
- Preparar las soluciones “A” a “H” de acuerdo a lo indicado en la sección de preparación de soluciones. Las soluciones se preparan 10 veces más concentradas para que la concentración real en el pozo sea de 100.0, 10.0, 1.0, 0.10 µg/mL para cada uno de los analitos a evaluar (Propranolol y Ranitidina).
- Una vez transcurrido el tiempo de incubación, retirar el medio de cultivo de cada pozo cuidadosamente para no retirar las células, adicionar 90 µL de medio de cultivo fresco a los pozos a emplear y 10 µL de la solución a evaluar. A los pozos que se emplearan como blancos de proliferación se les adiciona 100 µL de medio de cultivo suplementado DMEM fresco.

La administración de las soluciones a evaluar será de la siguiente forma:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BP	0.1	1	10	100		BP	0.1	1	10	100	
B	BP	0.1	1	10	100		BP	0.1	1	10	100	
C	BP	0.1	1	10	100		BP	0.1	1	10	100	
D												
E	BP	0.1	1	10	100		BP	0.1	1	10	100	
F	BP	0.1	1	10	100		BP	0.1	1	10	100	
G	BP	0.1	1	10	100		BP	0.1	1	10	100	
H												

Figura 6. Distribución de las soluciones del analito a evaluar en la placa de 96 pozos (Una placa para cada analito Propranolol o Ranitidina por cuatuplicado).

- Al terminar de adicionar las soluciones correspondientes, incubar a 37°C, 5% CO₂ y 95% de Humedad Relativa durante 24 horas.

- Después del tiempo de incubación, retirar el medio de cultivo cuidadosamente y adicionar 100 µL de ácido tricloroacético al 10 % para fijar las células, someter a refrigeración durante 1 hora a 4°C, posteriormente lavar con agua destilada hasta retirar todo el ácido tricloroacético y dejar secar a temperatura ambiente.
- Una vez seca la placa adicionar 50 µL de sulforrodamina B al 0.4 % a cada pozo e incubar por 40 minutos a temperatura ambiente, retirar la sulforrodamina B y lavar con ácido acético al 1% las veces que sean necesarias para retirar el exceso de sulforrodamina B (aproximadamente 5 veces) y dejar secar a temperatura ambiente.
- Adicionar 50 µL de Tris Base 10mM a cada pozo, agitar hasta solubilizar y homogenizar la sulforrodamina B por completo, realizar las determinaciones de las absorbancias de la placa a una longitud de onda de 564 nm en el lector de microplacas Labsystems Multiskan MS.
- Obtener el % de proliferación de cada uno de los pozos por concentración y obtener los promedios para determinar la capacidad de inhibir la proliferación celular.

$$\% \text{ Proliferación: } (AP * 100\%) / AB \text{ promedio}$$

Donde:

AP= absorbancia del pozo

AB= absorbancia del blanco de proliferación= 100% de proliferación celular.

4.4.3 Selección de las condiciones cromatográficas para implementar los métodos bioanalíticos para cuantificar Clorhidrato de Propranolol y Clorhidrato de Ranitidina en Solución Amortiguadora de Hank.

De acuerdo a lo reportado en la bibliografía se probó lo siguiente para ambos analitos:

- Fase Móvil.

Fase orgánica: acetonitrilo y metanol

Fase acuosa: agua desionizada y solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.6.

- Proporciones de Fase Móvil:

Acetonitrilo:Agua (60:40).

Acetonitrilo:Fosfatos. (80:20), (60:40), (70:30), (40:60), (30:70).

Metanol:Agua 60:40

Metanol: Fosfatos.60:40, 40:60, 80:20, 73:27

- Longitud de onda.

Se realizaron barridos de absorción de 200 a 400 nm en el espectrofotómetro, de las soluciones de Clorhidrato de Propranolol y Clorhidrato de Ranitidina para obtener lo máximos de absorción y compararlos con lo reportado en la bibliografía (290 nm para Propranolol y 322 nm para Ranitidina).

- Columna cromatográfica.

a) Agilent Zorbax SB - C18, 4.6 x150 mm, 3.5 µm.

b) Agilent Zorbax Eclipse Plus C18, 4.6 x150 mm, 3.5 µm.

c) Agilent Zorbax Eclipse XDB- C8, 4.6 x150 mm, 5 µm.

- Velocidad de Flujo: 0.5 mL/min, 1.0mL/min y 1.5 mL/min.
- Volumen de inyección: 10, 20 y 25 µL
- Temperatura de la Columna: Temperatura Ambiente.

4.4.4 Validación del Método Bioanalítico para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina en Solución Amortiguadora de Hank.

Para la validación de los Métodos Analíticos se tomo como referencia la Guía de Validación para Metodos Bioanalíticos que nos proporciona la FDA.

4.4.4.1 Validación del Sistema.

- *Adecuabilidad del sistema.*

Preparar una solución de 8 µg/mL en sistema a partir de la solución Stock de Ranitidina en metanol.

Realizar seis inyecciones de 20 µL cada una y obtener el %CV.

- *Linealidad en Sistema.*

Preparar dos curvas patrón a partir del mismo stock de Ranitidina en metanol de acuerdo con la siguiente tabla:

Tabla 1. Preparación de la Curva Patrón conteniendo Ranitidina en Fase Móvil.

Punto	Concentración (µg/mL)	Alícuota de la Sol. Stock de Ranitidina de (100 µg/mL) (µL)	Aforo con Fase Móvil (mL)
1	0.50	25.0	5
2	4.00	200.0	5
3	6.00	300.0	5
4	8.00	400.0	5
5	10.00	500.0	5
6	18.00	900.0	5

Calcular el coeficiente de correlación (r), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b).

- *Precisión en Sistema*

Calcular factor de respuesta de cada punto de las curvas realizadas para la linealidad del sistema y calcular el %CV.

4.4.4.2 Validación del Método.

- *Selectividad.*

Para evaluar este parámetro se inyectaron en el Cromatógrafo las siguientes soluciones:

- Solución de 8 µg/mL en fase móvil a partir de la solución stock de Ranitidina en Fase Móvil.

- b) Solución Amortiguadora de Hank.
- c) Solución de 8 µg/mL en solución amortiguadora de Hank a partir de la solución stock de Ranitidina en metanol.

Comparar las respuestas obtenidas y los tiempos de retención.

- *Linealidad del Método.*

Preparar tres curvas patrón llevando al aforo con solución amortiguadora de Hank de acuerdo a la tabla 1 utilizando la solución stock en solución amortiguadora de Hank.

- *Limite de Cuantificación.*

Preparar por quintuplicado el punto más bajo de la curva de patrón y analizar, obtener el valor promedio de las 5 muestras y el %CV.

- *Precisión del Método.*
- *Repetibilidad*

Preparar en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta en Solución Amortiguadora de Hank de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 2. Preparación de los Puntos Control conteniendo Ranitidina en Solución Amortiguadora de Hank

Punto	Concentración (µg/mL)	Alícuota de la Sol. Stock de Ranitidina de (100 µg/mL) (µL)	Aforo con Sol. Amortiguadora de Hank (mL)
Bajo	1.00	50.0	5
Medio	9.00	450.0	5
Alto	17.00	850.0	5

Calcular la concentración recuperada para cada nivel de concentración interpolando la respuesta de los puntos control en la curva de calibración y determinar %CV para cada nivel de concentración.

- *Reproducibilidad.*

Preparar dos días por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta en Solución Amortiguadora de Hank de acuerdo a la tabla 2.

Calcular la concentración recuperada, el %CV para cada nivel de concentración.

- *Exactitud*

A partir de los resultados de reproducibilidad se determina el % Desviación estándar absoluta.

- *Recobro Absoluto*

Preparar por triplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta en Solución Amortiguadora de Hank y en Fase móvil de acuerdo a la tabla 2.

Calcular el % de Recobro Absoluto y el %CV para cada nivel de concentración.

- *Estabilidad*

- *Estabilidad en condiciones de Temperatura Ambiente.*

Preparar por duplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta en Solución Amortiguadora de Hank de acuerdo a la tabla 2 y someter a condiciones de Temperatura ambiente por 24 Horas, después analizar y comparar contra puntos control frescos.

Calcular el % de Desviación Estándar Absoluta para cada nivel de concentración y % CV.

- Estabilidad de los ciclos de congelación y descongelación.

Preparar por duplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta en Solución Amortiguadora de Hank de acuerdo a la tabla 2 y someter a 3 ciclos de congelación y descongelación, cada 24 Horas descongelar y congelar las muestras, después analizar y comparar contra puntos control frescos.

Calcular el % de Desviación Estándar Absoluta para cada nivel de concentración y su % CV.

4.4.5 Validación del Método Bioanalítico para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol en Solución Amortiguadora de Hank.

Se evaluaron los mismos parámetros que para la Validación del Método Bioanalítico para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina en Solución de Hank con los siguientes cambios:

La siguiente solución se empleo para evaluar la Adecuabilidad del sistema y la selectividad.

Preparar una solución de 10 µg/mL en sistema a partir de la solución Stock de Propranolol en fase móvil.

Se empleo la siguiente curva patrón para evaluar la linealidad.

Tabla 3. Preparación de la Curva Patrón conteniendo Propranolol.

Punto	Concentración (µg/mL)	Alícuota de la Sol. Stock de Propranolol de(100 µg/mL). (µL)	Aforo (mL)
1	0.5	25	5
2	1	50	5
3	5	250	5
4	8	400	5
5	10	500	5
6	15	750	5
7	20	1000	5

Se emplearon los siguientes puntos control:

Tabla 4. Preparación de los Puntos Control conteniendo Propranolol.

Punto	Concentración (µg/mL)	Alícuota de la Sol. Stock de Propranolol de (100 µg/mL) (µL)	Aforo (mL)
Bajo	2.00	200.0	5
Medio	9.00	450.0	5
Alto	19.00	950.0	5

4.4.6 Estudios de Permeabilidad.

- **Preparación de la Monocapa Celular en las Celdas Tipo Transwell.**

Adicionar a la cámara apical 500 µL de medio de cultivo DMEM suplementado y a la cámara basolateral 1500 µL de medio de cultivo DMEM suplementado incubar a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa, durante 1 hora, transcurrido este tiempo sembrar 67 200 células en la cámara apical e incubar a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa.

Cambiar el medio de cultivo DMEM suplementado cada 24 horas durante 5 días o hasta la formación de la monocapa celular.

- **Medición de la Resistencia Eléctrica Transepitelial.**

A los tres días de haber sembrado las células, medir la resistencia eléctrica transepitelial empleando un multímetro de la siguiente forma:

Retirar el medio de cultivo de la celda transwell, adicionar solución amortiguadora de Hank estéril previamente atemperada a 37°C, medir la resistencia eléctrica transepitelial a través de la monocapa celular sumergiendo la sonda corta en la cámara apical sin tocar la monocapa celular y la sonda larga en la cámara basolateral.

Repetir tres veces la lectura en cada una de las celdas transwell, obtener el promedio de la lectura y calcular la resistencia eléctrica transepitelial por cm².

La resistencia promedio por cm² debe encontrarse en el siguiente rango 180 a 250 Ωcm², ya que en este rango es posible emplear la monocapa celular para los

estudios de permeabilidad porque nos indica que la monocapa celular tiene una alta cantidad de uniones celulares.

Al terminar las lecturas, si estas aun no cumplen con la resistencia eléctrica transepitelial necesaria, retirar la solución amortiguadora de Hank, sustituirla con medio de cultivo DMEM suplementado atemperado a 37 °C y seguir incubando las celdas transwell hasta su siguiente lectura (cada 24 horas).

- **Transporte en el sentido Apical / Basolateral.**

Cuando las monocapas celulares se han formado y la resistencia eléctrica transepitelial cumple realizar lo siguiente:

Retirar el medio de cultivo de las celdas transwell, sustituirlo con 1500 µL solución amortiguadora de Hank estéril atemperada a 37°C en la cámara basolateral (receptora), adicionar en la cámara apical (donadora) 500 µL de la solución de trabajo correspondiente para el estudio de permeabilidad (soluciones de 4.0, 8.0, 16.0 µg/mL de Propranolol o Ranitidina según corresponda). Colocar la placa en agitación orbital a 80 rpm y a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad relativa. Durante un periodo de 2 horas tomar una muestra a los 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 120 minutos de la cámara basolateral y sustituir el volumen de la muestra con solución amortiguadora de Hank estéril atemperada a 37°C en la cámara basolateral.

- **Transporte en el sentido Basolateral / Apical.**

Cuando las monocapas celulares se han formado y la resistencia eléctrica transepitelial cumple realizar lo siguiente:

Retirar el medio de cultivo de las celdas transwell, sustituirlo con 500 µL solución amortiguadora de Hank estéril atemperada a 37°C en la cámara apical (receptora), adicionar en la cámara basolateral (donadora) 1500 µL de la solución de trabajo correspondiente para el estudio de permeabilidad (soluciones de 4.0, 8.0, 16.0 µg/mL de Propranolol o Ranitidina según corresponda). Colocar la placa en agitación orbital a 80 rpm y a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad relativa. Durante un periodo de 2 horas tomar una muestra a los 15, 30, 45, 60, 75, 90 y 120 minutos

de la cámara apical y sustituir el volumen de la muestra con solución amortiguadora de Hank estéril atemperada a 37°C en la cámara apical.

Al terminar el estudio medir la resistencia eléctrica transepitelial para verificar la integridad de la monocapa celular.

- **Evaluación de la Integridad de la monocapa celular con Lucifer Yellow.**

Retirar la solución amortiguadora de Hank de las celdas transwell, colocar 1500 µL de la solución amortiguadora de Hank estéril atemperada a 37°C en la cámara basolateral y en la cámara apical colocar 500 µL de la solución de Lucifer yellow 100 µg/mL. Colocar la placa en agitación orbital a 80 rpm y a 37°C, 5% CO₂ y 95% humedad relativa durante 2 horas.

Al finalizar el ensayo, tomar el volumen total de la cámara basolateral y leer en el fluorómetro a una longitud de 485 nm de excitación y 538 nm de emisión.

Las muestras se leen en el fluorómetro localizado en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en el departamento de Neuroquímica del edificio de investigación en neurofisiología con la ayuda de la Dra. Sonia Galván.

5. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS.

5.1 Ensayos de Inhibición de la Proliferación Celular.

Evaluación de la inhibición de la proliferación celular por efecto de la adición de Clorhidrato de Propranolol.

Tabla 5. Porcentaje de Inhibición de la Proliferación Celular de la línea celular MDCK por efecto del Clorhidrato de Propranolol.

Concentración (µg/mL)	% Proliferación Celular			Promedio	Desviación Estándar
0.00	103.69	98.16	98.16	100.00	2.61
0.10	100.92	96.77	101.61	99.77	2.14
1.00	85.02	86.41	97.47	89.63	5.57
10.00	82.95	85.02	92.63	86.87	4.16
100.00	85.71	83.64	89.17	86.18	2.28

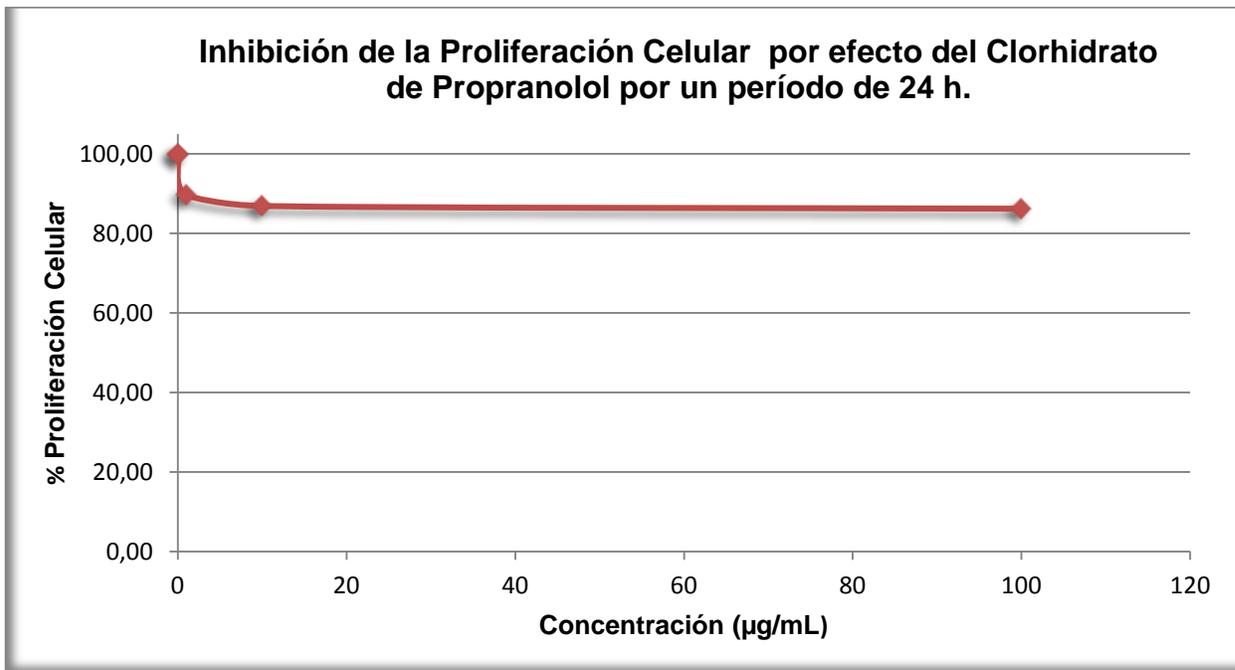


Figura 7. Grafica Porcentaje de Inhibición de la Proliferación Celular de la línea celular MDCK por efecto del Clorhidrato de Propranolol.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Como se puede observar en la tabla 5 y figura 7 la disminución de la proliferación celular de la línea celular MDCK por efecto de la administración de Clorhidrato de Propranolol no fue mayor al 13.82 % en ninguna de las concentraciones evaluadas, por lo que podemos asegurar la viabilidad celular en los estudios de permeabilidad al administrar el Clorhidrato de Propranolol en un rango de concentraciones de 0.10 a 100.00 µg/mL.

Evaluación de la inhibición de la proliferación celular por efecto de la administración de Clorhidrato de Ranitidina.

Tabla 6. Porcentaje de Inhibición de la Proliferación Celular de la línea celular MDCK por efecto del Clorhidrato de Ranitidina.

Concentración (µg/mL)	% Proliferación Celular			Promedio	Desviación Estándar
0.00	103.38	98.92	97.70	100.00	2.44
0.10	107.43	110.27	114.73	110.81	3.00
1.00	119.59	112.70	100.54	110.95	7.88
10.00	103.38	107.84	112.70	107.97	3.81
100.00	98.11	103.78	95.27	99.05	3.54

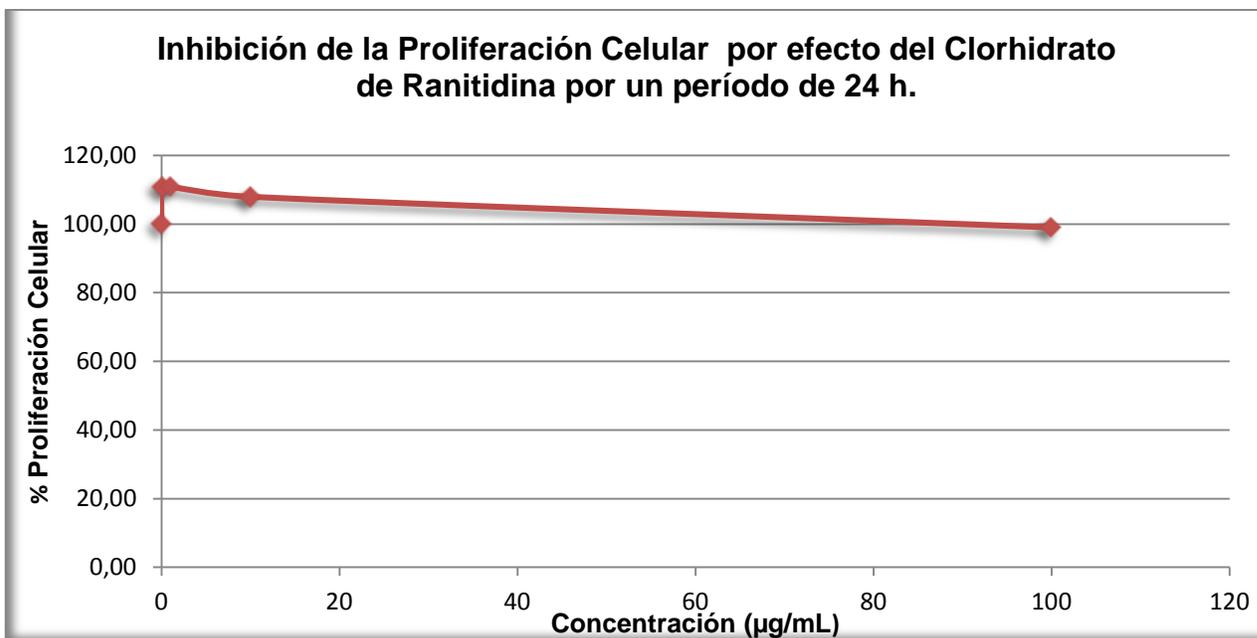


Figura 8. Grafica Porcentaje de Inhibición de la Proliferación Celular de la línea celular MDCK por efecto del Clorhidrato de Ranitidina.

Como se puede observar en la tabla y figura anterior la disminución de la proliferación celular de la línea celular MDCK por efecto de la administración de clorhidrato de Ranitidina no fue mayor al 0.95 % en ninguna de las concentraciones evaluadas, por el contrario se observan porcentajes mayores al 100%, podemos asegurar la viabilidad celular en los estudios de permeabilidad al administrar el clorhidrato de Ranitidina en un rango de concentraciones de 0.10 a 100.00 µg/mL.

5.2 Selección de las condiciones cromatográficas para implementar los métodos bioanalíticos para cuantificar Clorhidrato de Propranolol y Clorhidrato de Ranitidina en Solución Amortiguadora de Hank. [34][35][36][37].

Las condiciones cromatográficas para el Método bioanalítico para cuantificar Clorhidrato de Ranitidina en Solución Amortiguadora de Hank son las siguientes:

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 7. Condiciones Cromatográficas para cuantificar Clorhidrato de Ranitidina en Solución Amortiguadora de Hank.

Condición	Resultado
Fase Móvil	Metanol:Solución Amortiguadora de Fosfatos 10 mM pH:7.6
Proporciones	60:40 v/v
Columna Cromatografica	Agilent Zorbax SB - C18, 4.6 x150 mm, 3.5 µm.
Velocidad de Flujo	1.0mL/min
Volumen de Inyección	25 µL
Temperatura de la columna	Temperatura Ambiente.
Tiempo de Retención	2.45 min ± 1 min
Tiempo de Corrida	3.5 min

Las condiciones cromatográficas para el Método bioanalítico para cuantificar Clorhidrato de Propranolol en Solución de Hank son las siguientes:

Tabla 8. Condiciones Cromatográficas para cuantificar Clorhidrato de Propranolol en Solución Amortiguadora de Hank.

Condición	Resultado
Fase Móvil	Metanol:Solución Amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 7.6
Proporciones	70:30 v/v
Columna Cromatográfica	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18, 4.6 x150 mm, 3.5 µm
Velocidad de Flujo	0.5 mL/min
Volumen de Inyección	25 µL
Temperatura de la columna	Temperatura Ambiente.
Tiempo de Retención	3.25 min ± 1 min
Tiempo de Corrida	4.5 min

5.3 Validación del Método Bioanalítico para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina en Solución Amortiguadora de Hank.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

5.3.1 Validación del sistema.

- *Adecuabilidad del sistema.*

Todos los días de análisis se evaluó la adecuabilidad del sistema y en la siguiente tabla se muestra la adecuabilidad de un día de análisis.

Tabla 9. Adecuabilidad del sistema

Concentración (8µg/mL) Replica	Área
1	339.7
2	338.7
3	339.2
4	339.2
5	338.9
6	338.5
Promedio	339.033
Desviación Estándar	0.427
%CV	0.126

Al obtener porcentajes de coeficientes de variación menores al 2%, nos aseguramos de que el sistema cromatografico se encuentra acondicionado para iniciar el análisis de muestras.

- *Linealidad en Sistema.*

Se puede observar en la tabla 10 y figura 9 que hay una relación directamente proporcional entre la concentración y la respuesta determinadas en la fase móvil.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se cumple con los coeficientes de correlación mayores a 0.99 y las pendientes son muy parecidas, por lo que podemos decir que se cumple con la linealidad en sistema en el intervalo de trabajo evaluado.

Tabla 10. Linealidad del sistema para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Curva Patrón		
	1	2	Promedio
	Área	Área	Área
0.500	20.300	20.300	20.300
4.000	171.900	160.800	166.350
6.000	245.300	249.900	247.600
8.000	329.100	335.800	332.450
10.000	409.700	418.500	414.100
18.000	744.000	746.500	745.250
pendiente	41.190	41.638	41.414
Ordenada al origen	0.829	-0.731	0.049
r	0.9999	0.9999	0.999996
r^2	0.9998	0.9998	0.999991

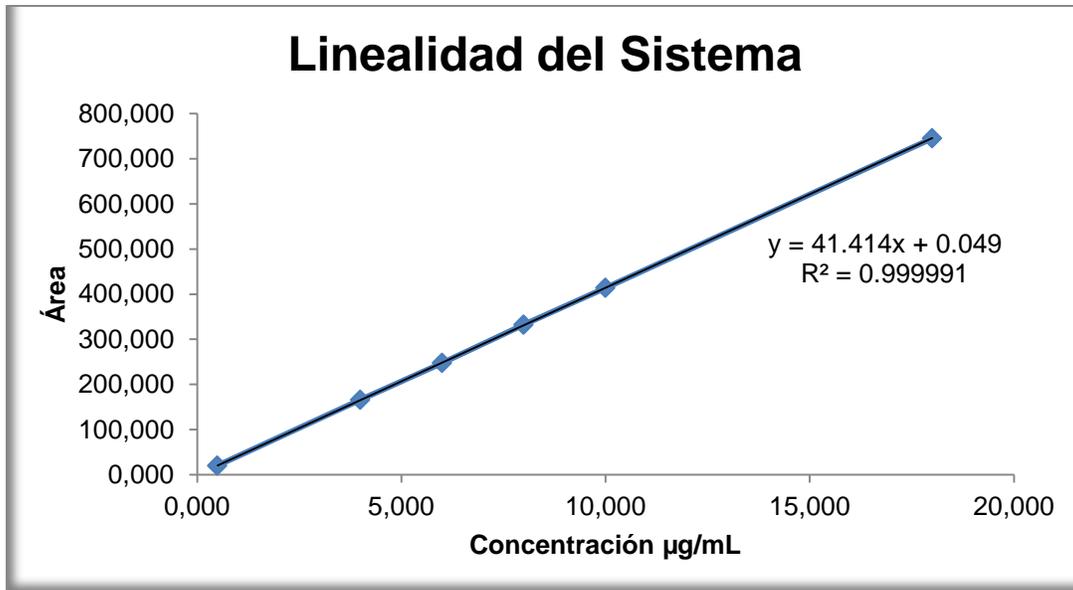


Figura 9. Linealidad del sistema para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.

- *Precisión en Sistema.*

En la tabla 11 se observa que el factor de respuesta es muy similar en todos los niveles de concentración para la linealidad del sistema, así se comprueba que los resultados son precisos al obtener un %CV global menor al 2%.

Tabla 11. Precisión del sistema.

Concentración (µg/mL)	Factor de Respuesta	
	Curva1	Curva 2
0.500	40.600	40.600
4.000	42.975	40.200
6.000	40.883	41.650
8.000	41.138	41.975
10.000	40.970	41.850
18.000	41.333	41.472
Promedio	41.304	
Desviación Estándar	0.752	
%CV	1.820	

5.3.2 Validación del Método.

- *Selectividad.*

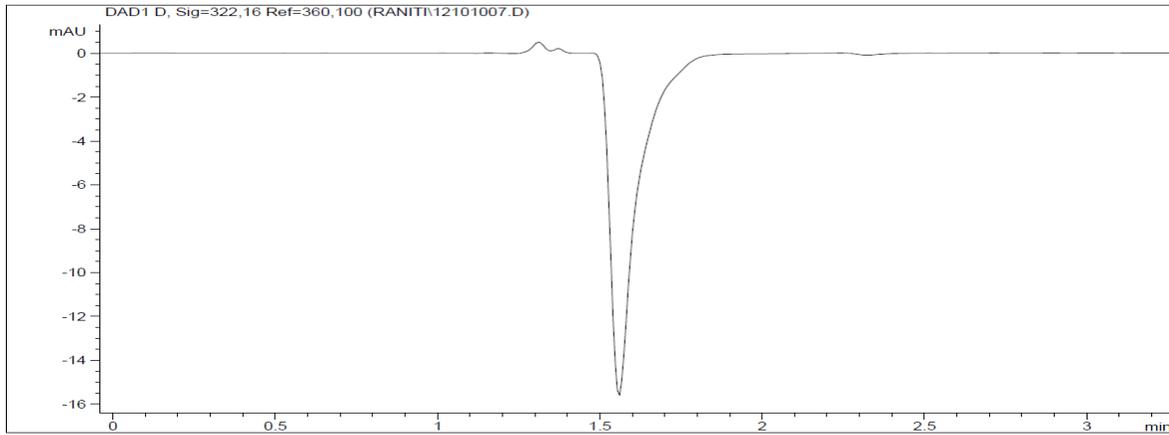


Figura 10. Cromatograma de la Solución Amortiguadora de Hank bajo las condiciones cromatograficas

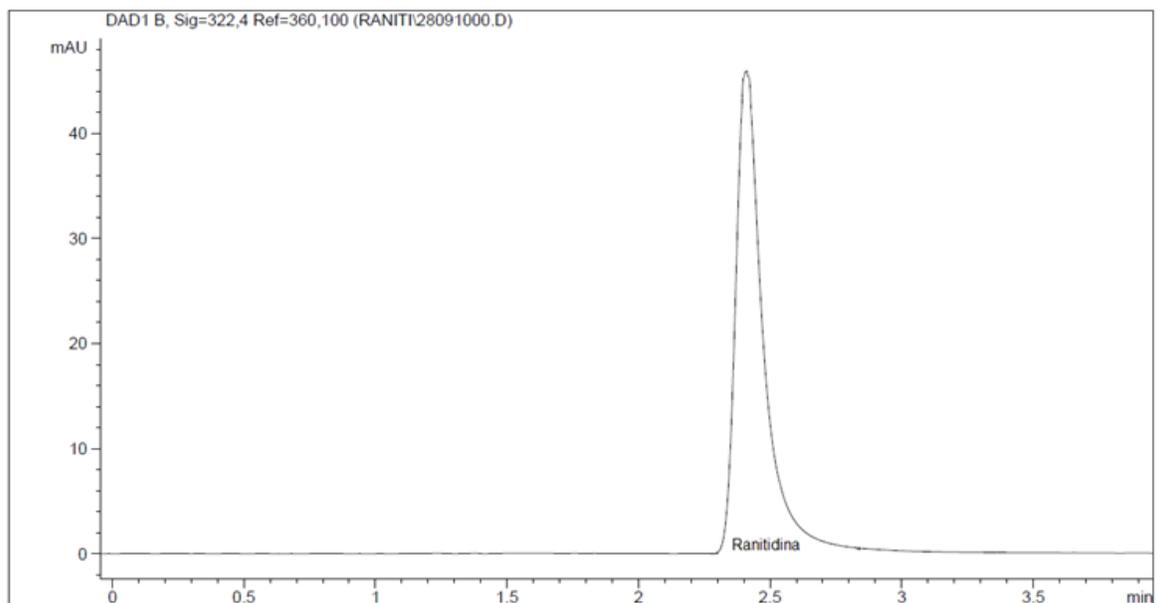
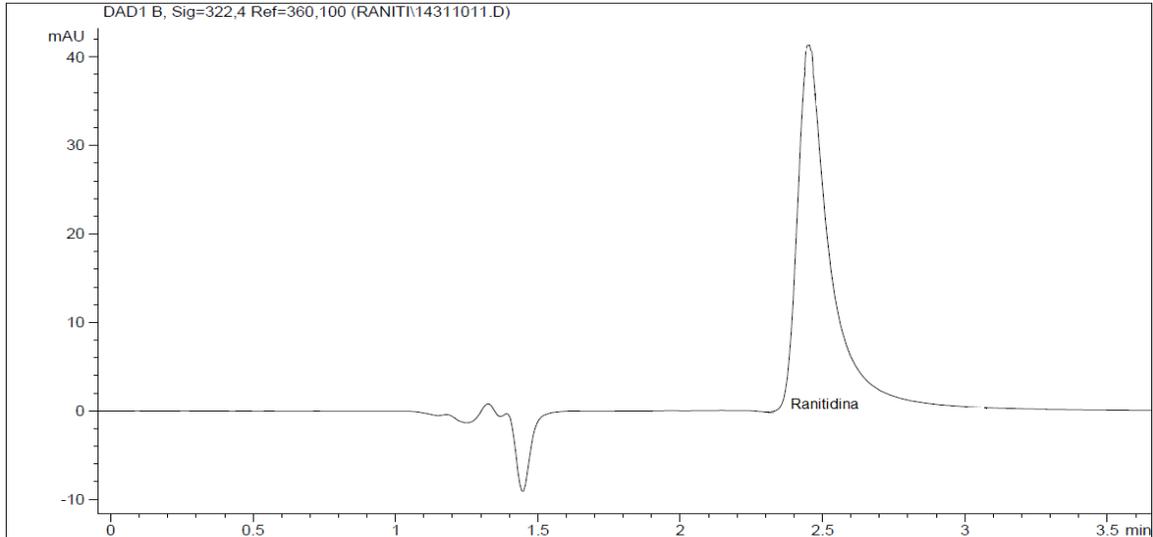


Figura 11. Cromatograma de la Solución de 8 µg/mL en fase móvil a partir de la solución stock de Ranitidina en metanol bajo las condiciones cromatograficas.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



.Figura 12. Cromatograma de la Solución de 8 µg/mL en solución amortiguadora de Hank a partir de la solución stock de Ranitidina en metanol.

Como se puede observar en las figuras 10,11 y 12 no hay interferencias en el tiempo de retención de la ranitidina por parte de la solución de hank, por lo que podemos afirmar que el método es selectivo.

- *Linealidad del Método.*

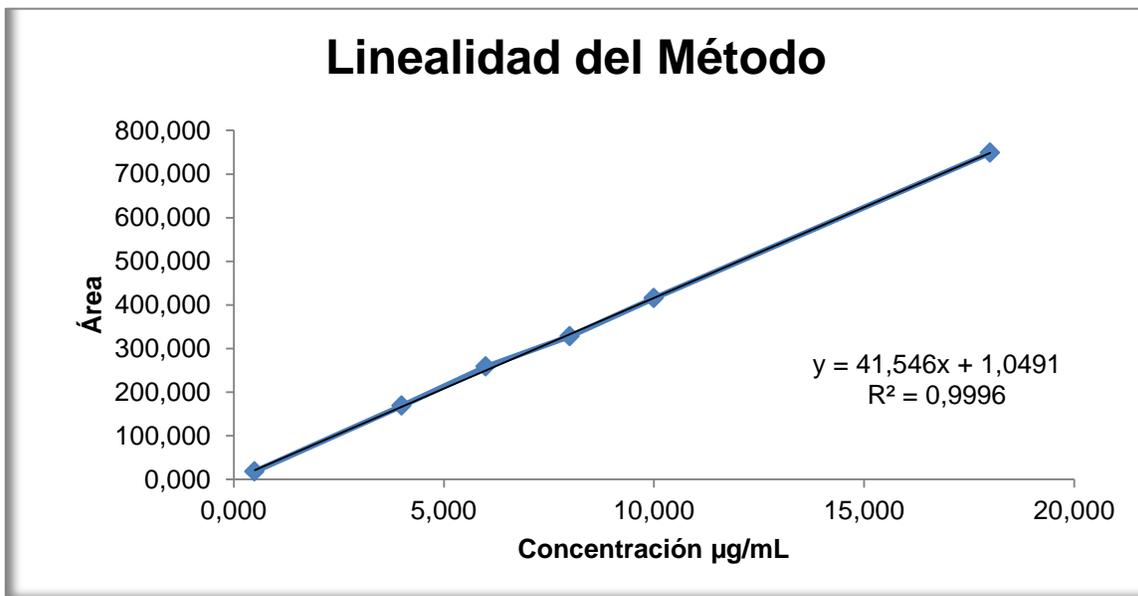


Figura13. Linealidad del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 12. Linealidad y precisión del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Curva Patrón				Desviación Estándar	%CV
	1	2	3	Promedio		
	Área	Área	Área	Área		
0.500	18.2	18.1	18.9	18.400	0.436	2.369
4.000	163.2	173.9	169.7	168.933	5.391	3.191
6.000	263.1	241	271.4	258.500	15.713	6.079
8.000	321	330.9	332.6	328.167	6.264	1.909
10.000	416.1	419.9	410	415.333	4.994	1.202
18.000	751	745.4	750.2	748.867	3.029	0.404
Pendiente	41.750	41.489	41.400	41.546		
Ordenada al origen	-1.466	-0.003	4.616	1.049		
r	0.9995	0.9997	0.9992	0.9998		
r^2	0.9989	0.9995	0.9985	0.9996		

En la tabla 12 y la figura 13 se observa que se mantiene una relación directamente proporcional entre la concentración y la respuesta obtenida en la solución amortiguadora de Hank.

Se obtuvieron pendientes muy similares y coeficientes de correlación mayores 0.9992, además coeficientes de variación menores al 6.1% para cada nivel de concentración.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

- *Límite de Cuantificación.*

Tabla 13. Respuesta obtenida para el Límite de Cuantificación.

Muestra	Área	Concentración
		(0.5 µg/mL)
1	18.9	0.577
2	19.74	0.596
3	19.89	0.599
4	17.9	0.555
5	19.2	0.584
Promedio	19.126	0.5822
Desviación Estándar	0.794	0.018
%CV	4.150	3.028

En la tabla 13 observamos que se obtuvieron concentraciones menores a 0.599 y mayores a 0.555 para el límite de cuantificación, la norma nos indica que este valor debe encontrarse en \pm el 20 % del valor nominal del límite, lo cual se cumple porque estos valores deben encontrarse en un rango de 0.400 a 0.600 µg/mL, además el %CV es menor al 4.2% este valor nos indica que la respuesta es precisa.

- *Precisión del Método.*

- *Repetibilidad.*

En la tabla 14 se observa que todos los puntos control evaluados mantienen un valor experimental dentro de lo permitido con respecto al valor nominal, además son resultados precisos porque el %CV para cada nivel de los punto control se obtuvieron valores menores a 0.92%

Con esto comprobamos que el método es repetible.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 14. Repetibilidad del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.

Replica No.	Concentración Experimental ($\mu\text{g/mL}$)		
	Control Bajo ($1.0\mu\text{g/mL}$)	Control Medio ($9.0\mu\text{g/mL}$)	Control Alto ($17.0\mu\text{g/mL}$)
1	1.035	8.602	16.460
2	1.029	8.634	16.346
3	1.034	8.650	16.403
4	1.018	8.689	16.422
5	1.014	8.614	16.401
Promedio	1.026	8.638	16.407
Desviación Estándar	0.009	0.034	0.041
%CV	0.922	0.394	0.251
%DEA	3.106	4.025	3.490

- *Reproducibilidad y Exactitud.*

En la tabla 15 se observa que todos los puntos control evaluados mantienen un valor experimental dentro de lo permitido con respecto al valor nominal, además son resultados precisos porque el %CV para cada nivel de los punto control se obtuvieron valores menores a 4.7% para ambos días de análisis, además las desviaciones estándar absolutas son menores al 7.32% cumpliendo así con lo establecido en la norma.

Con esto comprobamos que el método es reproducible y exacto.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 15. Reproducibilidad del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.

		Concentración Experimental ($\mu\text{g/mL}$)		
	Replica	Control Bajo (1.0 $\mu\text{g/mL}$)	Control Medio (9.0 $\mu\text{g/mL}$)	Control Alto (17.0 $\mu\text{g/mL}$)
Día 1	1	1.035	8.602	16.460
	2	1.029	8.634	16.346
	3	1.034	8.650	16.403
	4	1.018	8.689	16.422
	5	1.014	8.614	16.401
Día 2	6	1.126	9.090	17.150
	7	1.128	8.988	17.284
	8	1.120	8.961	17.122
	9	1.114	8.932	17.142
	10	1.115	8.976	17.264
	Promedio	1.073	8.814	16.800
	Desviación Estándar	0.051	0.191	0.418
	%CV	4.712	2.166	2.489
	%DEA	7.319	1.883	1.179

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

- *Recobro Absoluto.*

Tabla 16. Recobro Absoluto del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.

Concentración (µg/mL)	Fase Móvil	Solución de Hank	%Recobro Absoluto	%Recobro Absoluto	Desviación Estándar	%CV
Control Bajo (1.0 µg/mL)	39.100	40.640	103.939	103.175	0.704	0.683
	39.200	40.390	103.036			
	39.200	40.200	102.551			
Control Medio (9.0 µg/mL)	355.900	360.400	101.264	99.649	1.714	1.720
	363.000	355.200	97.851			
	356.400	355.800	99.832			
Control Alto (17.0 µg/mL)	682.100	684.000	100.279	101.052	1.442	1.427
	681.800	682.900	100.161			
	670.400	688.600	102.715			
Global				101.292	1.934	1.910

En la tabla 16 se observa que el % de Recobro Absoluto para el Clorhidrato de Ranitidina en solución amortiguadora de Hank es mayor al 99.65% para cada nivel de concentración evaluada, los %CV demuestran que los resultados obtenidos son reproducibles y precisos.

En términos globales el % de Recobro Absoluto es reproducible, al obtenerse un %CV global menor a 1.91%.

- *Estabilidad.*

Las condiciones evaluadas para la estabilidad fueron elegidas porque si durante los experimentos se presentaran algunos contratiempos para la cuantificación de las muestras, estas se someterían a dichas condiciones dependiendo de cuál sea el contratiempo y en cuanto tiempo se solucionaría el problema.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

a. Estabilidad en condiciones de Temperatura Ambiente por 24 h.

Tabla 17. Estabilidad a Temperatura Ambiente del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.

Condiciones	Concentración Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)		
	Control Bajo (1.0 $\mu\text{g/mL}$)	Control Medio (9.0 $\mu\text{g/mL}$)	Control Alto (17.0 $\mu\text{g/mL}$)
Frescos	0.938	9.060	17.438
	0.989	8.986	17.289
Temperatura Ambiente por 24 h	1.040	8.302	16.409
	1.044	8.602	15.303
Promedio	1.003	8.737	16.610
Desviación Estándar	0.050	0.353	0.983
%CV	4.993	4.042	5.916
%DEA	0.284	2.918	2.295

En la tabla 17 se observa que todos los puntos control evaluados mantienen un valor experimental dentro de lo permitido con respecto al valor nominal, independientemente de que unos fueron sometidos a temperatura ambiente por 24 h. además son resultados precisos porque el %CV para cada nivel de los punto control se obtuvieron valores menores a 6.0 % para todas las muestras, además las desviaciones estándar absolutas son menores al 3.0% cumpliendo así con lo establecido en la norma.

Con esto comprobamos que las muestras toleran estar sometidas a temperatura ambiente por 24 hrs los resultados son precisos y exactos.

En caso de que se nos presente un problema durante la cuantificación de las muestras que se pueda solucionar rápido (tiempo menor a 24 hrs.) no será necesario refrigerar o congelar las muestras.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

b. Estabilidad de los ciclos de congelación y descongelación.

Tabla 18. Estabilidad a 3ciclos de Congelación y Descongelación en un periodo de 24hrs x 3 del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Ranitidina.

Condiciones	Concentración Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)		
	Control Bajo (1.0 $\mu\text{g/mL}$)	Control Medio (9.0 $\mu\text{g/mL}$)	Control Alto (17.0 $\mu\text{g/mL}$)
Frescos	1.026	9.090	17.150
	0.937	8.737	16.240
3 Ciclos de Congelación y Descongelación	0.959	8.599	16.500
	0.958	8.785	16.830
Promedio	0.970	8.803	16.680
Desviación Estándar	0.039	0.207	0.395
%CV	3.984	2.352	2.371
%DEA	2.974	2.189	1.884

En la tabla 18 se observa que todos los puntos control evaluados mantienen un valor experimental dentro de lo permitido con respecto al valor nominal, independientemente de que unos fueron sometidos tres ciclos de congelación y descongelación cada ciclo se realizó cada 24 hrs. además son resultados precisos porque los %CV para cada nivel de los puntos control se obtuvieron valores menores a 4.0 % para todas las muestras, además las desviaciones estándar absolutas son menores al 3.0% cumpliendo así con lo establecido en la norma.

Con esto comprobamos que las muestras toleran estar sometidas a tres ciclos de congelación y descongelación, los resultados son precisos y exactos.

En caso de que se nos presente un problema durante la cuantificación de las muestras que no se pueda solucionar rápido (tiempo mayor a 24 hrs.) será

necesario congelar las muestras y descongelarlas hasta haber solucionado el problema con la seguridad de que las muestras se mantendrán estables.

5.4 Validación del Método Bioanalítico para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol en Solución de Hank.

5.4.1 Validación del Sistema.

- *Adecuabilidad del sistema.*

Todos los días de análisis se evaluó la adecuabilidad del sistema y en la siguiente tabla se muestra la adecuabilidad de un día de análisis.

Tabla 19. Adecuabilidad del sistema.

Concentración (10 µg/mL) Replica No.	Área
10	594
10	594
10	593.4
10	591.4
10	593.2
10	592.5
Promedio	593.083
Desviación Estándar	0.997
%CV	0.168

Al obtener porcentajes de coeficientes de variación menores al 2%, nos aseguramos de que el sistema cromatografico se encuentra acondicionado para iniciar el análisis de muestras.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

- *Linealidad en Sistema.*

Se puede observar en la tabla 20 y figura 14 que hay una relación directamente proporcional entre la concentración y la respuesta determinadas en la fase móvil.

Se cumple con los coeficientes de correlación mayores a 0.99 y las pendientes son muy parecidas, por lo que podemos decir que se cumple con la linealidad en sistema en el intervalo de trabajo evaluado.

Tabla 20. Linealidad del sistema para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol en fase móvil.

Concentración µg/mL	Curva Patrón		
	1	2	Promedio
	Área	Área	Área
0.5	20.000	20.000	20.000
1	39.900	39.000	39.450
5	195.300	202.000	198.650
8	323.000	326.400	324.700
10	393.400	401.300	397.350
15	580.000	597.300	588.650
20	784.400	785.100	784.750
m	39.019	39.387	39.203
b	2.052	3.937	-0.888
r	0.9998	0.9998	0.9999
r ²	0.9997	0.9997	0.9998

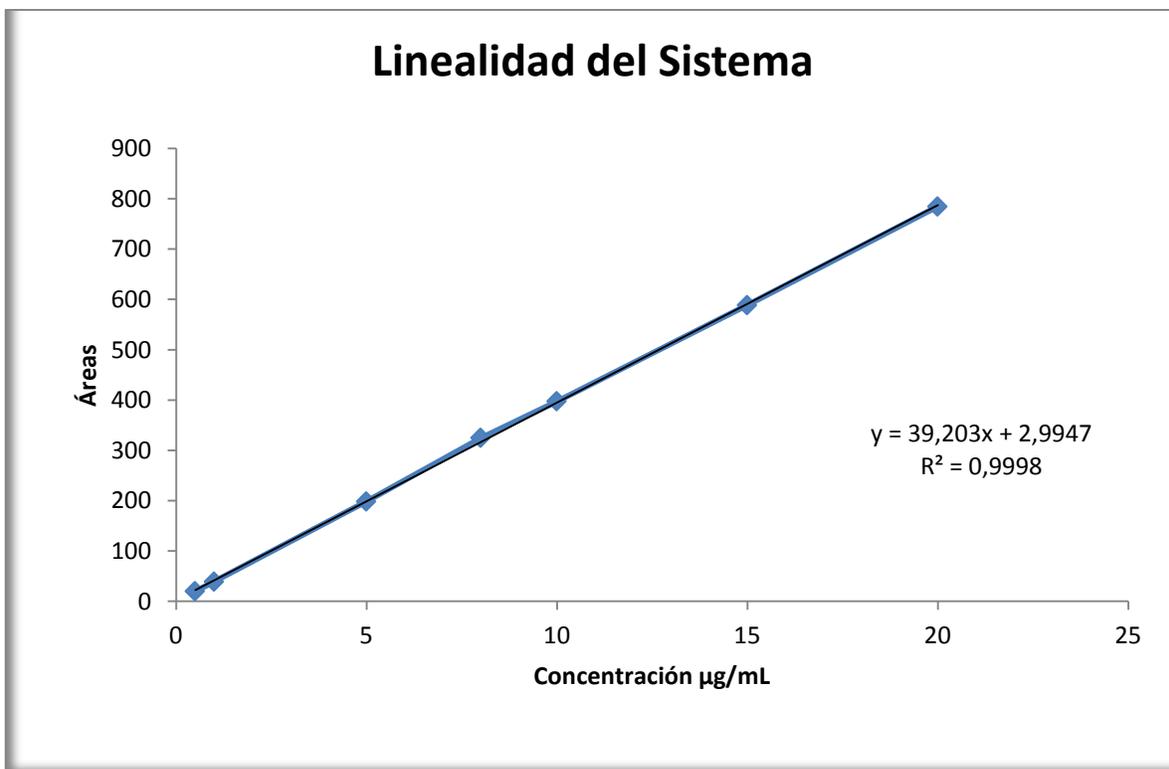


Figura 14. Linealidad del sistema para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol en fase móvil

- *Precisión en Sistema.*

En la tabla 21 se observa que el factor de respuesta es muy similar en todos los niveles de concentración para la linealidad del sistema, así se comprueba que los resultados son precisos al obtener un %CV global menor al 2.

Tabla 21. Precisión del sistema para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol en fase móvil.

Concentración (µg/mL)	Factor de Respuesta	
	Curva 1	Curva 2
0.5	40.000	40.000
1	39.900	39.000
5	39.060	40.400
8	40.375	40.800
10	39.340	40.130
15	38.667	39.820
20	39.220	39.255
Promedio	39.712	
Desviación Estándar	0.626	
%CV	1.577	

5.4.2 Validación del Método.

- *Selectividad.*

Como se puede observar en las figuras 15,16 y 17 no hay interferencias en el tiempo de retención del propranolol por parte de la solución de hank, por lo que podemos afirmar que el método es selectivo

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

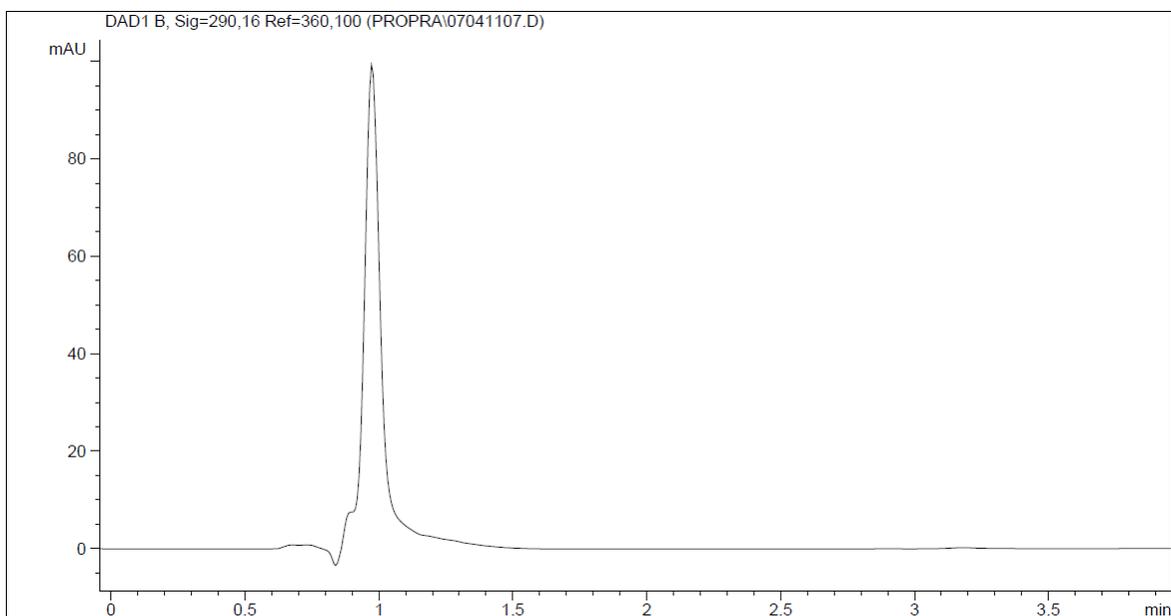


Figura 15. Cromatograma de la Solución Amortiguadora de Hank bajo las condiciones cromatograficas..

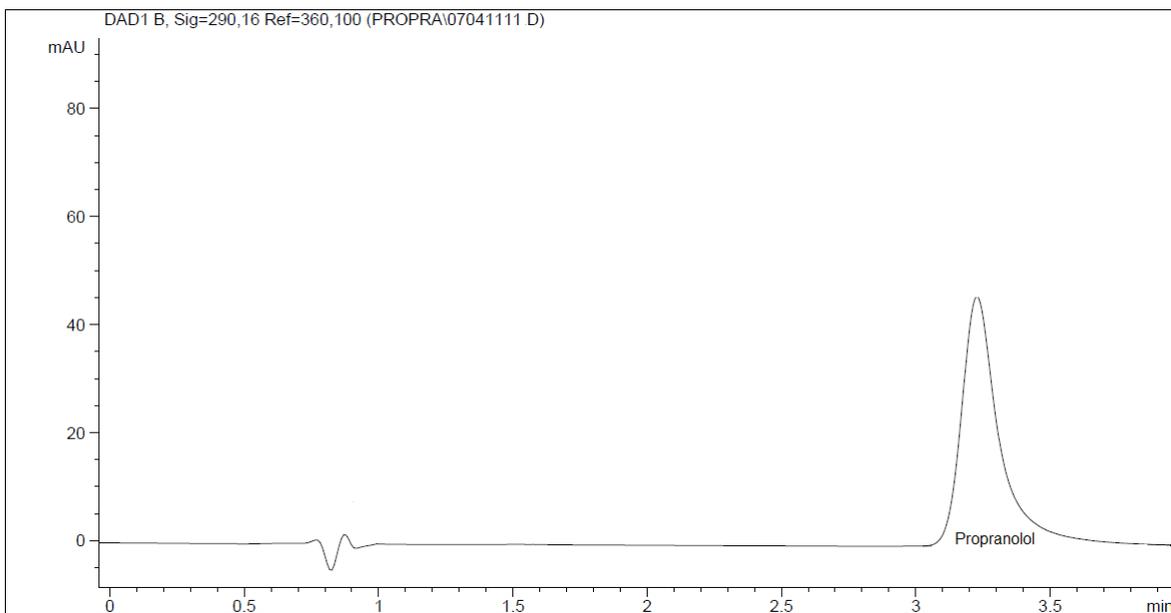


Figura 16. Cromatograma de la Solución de 10 µg/mL en fase móvil a partir de la solución stock de Propranolol en metanol.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

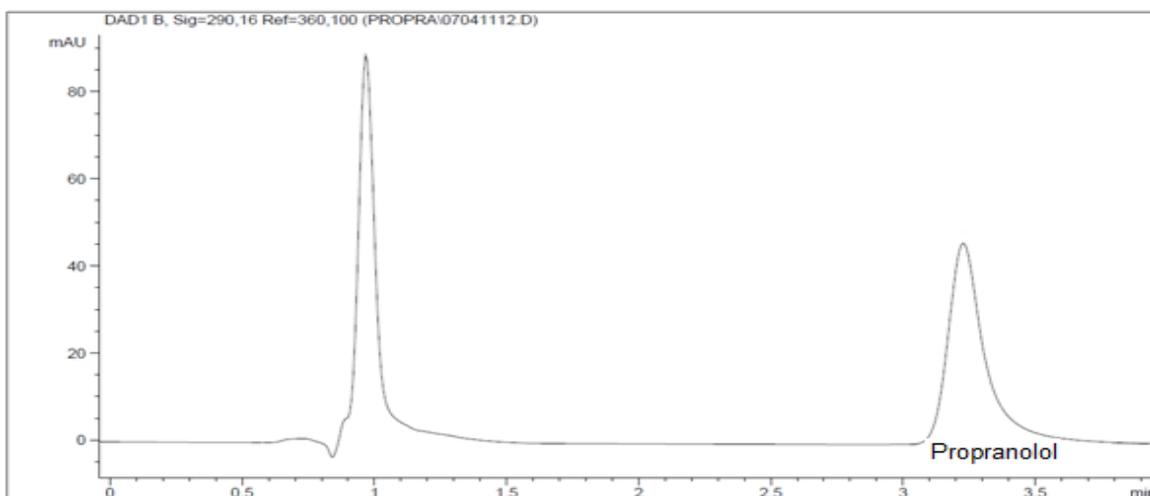


Figura 17. Cromatograma de la Solución de 10 $\mu\text{g/mL}$ en solución amortiguadora de Hank a partir de la solución stock de Propranolol en metanol.

- *Linealidad del Método.*

Tabla 22. Linealidad del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Curva Patrón				Desviación Estándar	%CV
	1	2	3	Promedio		
	Área					
0.5	19.5	19.7	19.6	19.600	0.100	0.510
1	39.1	39.4	39.2	39.233	0.153	0.389
5	199.8	202	201.6	201.133	1.172	0.583
8	325.5	357	352.3	344.933	16.993	4.926
10	414.8	415.6	414.6	415.000	0.529	0.128
15	614.9	626.5	625.7	622.367	6.479	1.041
20	815.1	844.7	834.9	831.567	15.079	1.813
m	40.974	42.233	41.867	41.691		
b	-1.320	-1.137	-0.453	-0.970		
r	0.9999	0.9995	0.9996	0.9998		
r^2	0.9999	0.9990	0.9993	0.9996		

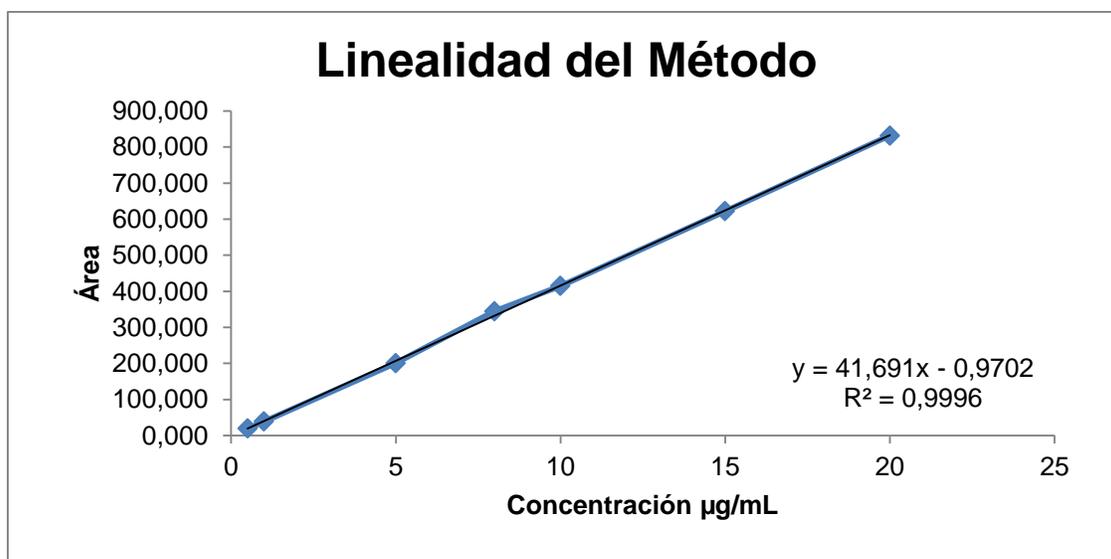


Figura 18. Linealidad del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.

En la tabla 22 y la figura 18 se observa que se mantiene una relación directamente proporcional entre la concentración y la respuesta obtenida en la solución amortiguadora de Hank.

Se obtuvieron pendientes muy similares y coeficientes de correlación mayores 0.9995, además coeficientes de variación menores al 4.926 para cada nivel de concentración.

- *Limite de Cuantificación.*

En la tabla 23 observamos que se obtuvieron concentraciones menores a 0.495 y mayores a 0.486 para el límite de cuantificación, la norma nos indica que este valor debe encontrarse en \pm el 20 % del valor nominal del límite, lo cual se cumple porque estos valores deben encontrarse en un rango de 0.400 a 0.600 µg/mL, además el %CV es menor al 0.661 este valor nos indica que la respuesta es precisa.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 23. Limite de cuantificación del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.

Muestra	Área	Concentración (0.5 µg/mL)
1	19.550	0.489
2	19.700	0.492
3	19.600	0.490
4	19.800	0.495
5	19.450	0.486
Promedio	19.620	0.490
Desviación Estándar	0.135	0.003
%CV	0.689	0.661

- *Precisión del Método.*
 - a. Repetibilidad

Tabla 24. Repetibilidad del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.

Replica	Concentración Experimental (µg/mL)		
	Control Bajo (2.0µg/mL)	Control Medio (9.0µg/mL)	Control Alto (19.0µg/mL)
1	2.016	8.836	18.449
2	1.941	8.788	18.512
3	1.862	8.982	18.637
4	2.010	8.937	18.438
5	1.976	8.942	18.427
Promedio	1.961	8.897	18.493
Desviación Estándar	0.063	0.081	0.087
%CV	3.207	0.911	0.471
%DEA	1.953	1.144	2.670

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la tabla 24 se observa que todos los puntos control evaluados mantienen un valor experimental dentro de lo permitido con respecto al valor nominal, además son resultados precisos porque el %CV para cada nivel de los punto control se obtuvieron valores menores a 3.207%

Con esto comprobamos que el método es repetible.

b. Reproducibilidad y Exactitud

Tabla 25. Reproducibilidad y Exactitud del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.

		Concentración Experimental ($\mu\text{g/mL}$)		
	Replica	Control Bajo ($2.0\mu\text{g/mL}$)	Control Medio ($9.0\mu\text{g/mL}$)	Control Alto ($19.0\mu\text{g/mL}$)
Día 1	1	2.016	8.836	18.449
	2	1.941	8.788	18.512
	3	1.862	8.982	18.637
	4	2.010	8.937	18.438
	5	1.976	8.942	18.427
Día 2	6	2.021	10.344	22.293
	7	2.107	10.424	21.901
	8	2.118	10.342	22.270
	9	2.090	10.367	21.895
	10	2.110	10.359	21.819
	Promedio	2.025	9.632	20.264
	Desviación Estándar	0.084	0.777	1.874
	%CV	4.133	8.067	9.250
	%DEA	1.252	7.023	6.653

En la tabla 25 se observa que todos los puntos control evaluados mantienen un valor experimental dentro de lo permitido con respecto al valor nominal, además

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

son resultados precisos porque el %CV para cada nivel de los punto control se obtuvieron valores menores 9.250% para ambos días de análisis, además las desviaciones estándar absolutas son menores al 7.023 cumpliendo así con lo establecido en la norma.

Con esto comprobamos que el método es reproducible y exacto.

- *Recobro Absoluto*

Tabla 26. Recobro Absoluto del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.

Concentración (µg/mL)	Fase Móvil	Solución de Hank	%Recobro Absoluto	%Recobro Absoluto	Desviación Estándar	%CV
Control Bajo (2.0 µg/mL)	82.600	73.900	89.467	87.771	1.477	1.683
	82.400	71.500	86.772			
	82.000	71.400	87.073			
Control Medio (9.0 µg/mL)	371.500	306.700	82.557	81.986	0.521	0.636
	371.100	303.800	81.865			
	369.900	301.600	81.536			
Control Alto (19.0 µg/mL)	795.300	765.500	96.253	94.922	1.574	1.658
	791.800	754.800	95.327			
	789.400	735.600	93.185			
			Global	88.226	5.721	6.484

En la tabla 26 se observa que el % de Recobro Absoluto para el Clorhidrato de Propranolol en solución amortiguadora de hank es mayor al 82.0 para cada nivel de concentración evaluada, los %CV demuestran que los resultados obtenidos son reproducibles y precisos.

En términos globales el % de Recobro Absoluto es reproducible, al obtenerse un %CV global menor a 6.5.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

• Estabilidad

Las condiciones evaluadas para la estabilidad fueron elegidas porque si durante los experimentos se presentaran algunos contratiempos para la cuantificación de las muestras, estas se someterían a dichas condiciones dependiendo de cuál sea el contratiempo y en cuanto tiempo se solucionaría el problema.

a) Estabilidad en condiciones de Temperatura Ambiente

Tabla 27. Estabilidad a Temperatura Ambiente del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.

Condiciones	Concentración Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)		
	Control Bajo (2.0 $\mu\text{g/mL}$)	Control Medio (9.0 $\mu\text{g/mL}$)	Control Alto (19.0 $\mu\text{g/mL}$)
Frescos	2.067	8.739	18.639
	2.070	8.941	18.230
Temperatura Ambiente por 24 h	2.058	8.654	17.823
	2.027	8.645	17.744
Promedio	2.056	8.745	18.109
Desviación Estándar	0.020	0.137	0.412
%CV	0.951	1.571	2.278
%DEA	2.780	2.838	4.690

En la tabla 27 se observa que todos los puntos control evaluados mantienen un valor experimental dentro de lo permitido con respecto al valor nominal, independientemente de que unos fueron sometidos a temperatura ambiente por 24 hrs. además son resultados precisos porque el %CV para cada nivel de los punto control se obtuvieron valores menores a 2.3% para todas las muestras, además las desviaciones estándar absolutas son menores al 4.7% cumpliendo así con lo establecido en la norma.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con esto comprobamos que las muestras toleran estar sometidas a temperatura ambiente por 24 hrs los resultados son precisos y exactos.

En caso de que se nos presente un problema durante la cuantificación de las muestras que se pueda solucionar rápido (tiempo menor a 24 hrs.) no será necesario refrigerar o congelar las muestras.

b) Estabilidad de los ciclos de congelación y descongelación.

Tabla 28. Estabilidad a 3 ciclos de Congelación y Descongelación en un periodo de 24hrs x 3 del Método para la Cuantificación de Clorhidrato de Propranolol.

Condiciones	Concentración Recuperada ($\mu\text{g/mL}$)		
	Control Bajo (2.0 $\mu\text{g/mL}$)	Control Medio (9.0 $\mu\text{g/mL}$)	Control Alto (19.0 $\mu\text{g/mL}$)
Frescos	2.067	8.739	18.639
	2.070	8.941	18.230
3 Ciclos de Congelación y Descongelación	2.191	7.816	16.441
	1.809	7.906	17.090
Promedio	2.034	8.351	17.600
Desviación Estándar	0.161	0.572	1.013
%CV	7.908	6.850	5.757
%DEA	1.706	7.215	7.369

En la tabla 28 se observa que todos los puntos control evaluados mantienen un valor experimental dentro de lo permitido con respecto al valor nominal, independientemente de que unos fueron sometidos tres ciclos de congelación y descongelación cada ciclo se realizó cada 24 h además son resultados precisos porque los %CV para cada nivel de los punto control se obtuvieron valores menores a 7.91% para todas las muestras, además las desviaciones estándar absolutas son menores al 7.4% cumpliendo así con lo establecido en la norma.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Con esto comprobamos que las muestras toleran estar sometidas a tres ciclos de congelación y descongelación, los resultados son precisos y exactos.

En caso de que se nos presente un problema durante la cuantificación de las muestras que no se pueda solucionar rápido (tiempo mayor a 24 hrs.) será necesario congelar las muestras y descongelarlas hasta haber solucionado el problema con la seguridad de que las muestras se mantendrán estables.

5.5 Estudios de Permeabilidad.

En los estudios de transporte se evaluaron las siguientes concentraciones 4.0, 8.0 y 16.0 $\mu\text{g/mL}$, en dos sentidos Apical a Basolateral y Basolateral a Apical para cada uno de los analitos Propranolol y Ranitidina de manera independiente. Se realizaron tres estudios para cada analito.

Para obtener los coeficientes de permeabilidad aparente es necesario determinar la velocidad de transporte (dQ/dt), la cual se obtiene de relacionar la cantidad acumulada (μg) contra el tiempo (s) para cada concentración de cada uno de los analitos y en ambos sentidos.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 29. Cantidad Acumulada Promedio de Ranitidina en cada intervalo de tiempo para tres concentraciones 4.0, 8.0 y 16.0 µg/mL, en ambos sentidos.

tiempo (s)	Sentido					
	Apical/Basolateral (A/B)			Basolateral/Apical (B/A)		
	Concentración (µg/mL)					
	4.0	8.0	16.0	4.0	8.0	16.0
	Cantidad Acumulada Promedio (µg)					
0	0	0	0	0	0	0
900	0.472	0.609	1.203	0.326	0.606	1.412
1800	0.748	1.209	2.052	0.706	1.419	3.111
2700	1.083	1.696	2.970	1.094	2.242	4.867
3600	1.321	2.137	3.881	1.511	3.049	6.489
4500	1.622	2.557	4.620	1.908	3.887	7.723
5400	1.855	3.038	5.410	2.285	4.701	9.259
7200	2.207	3.875	6.525	2.871	5.958	11.808
Pendiente (dQ/dt)	0.000304	0.000532	0.00091	0.000412	0.000856	0.0016686
R	0.990	0.997	0.994	0.999	0.999	0.998
r ²	0.980	0.995	0.988	0.997	0.998	0.997

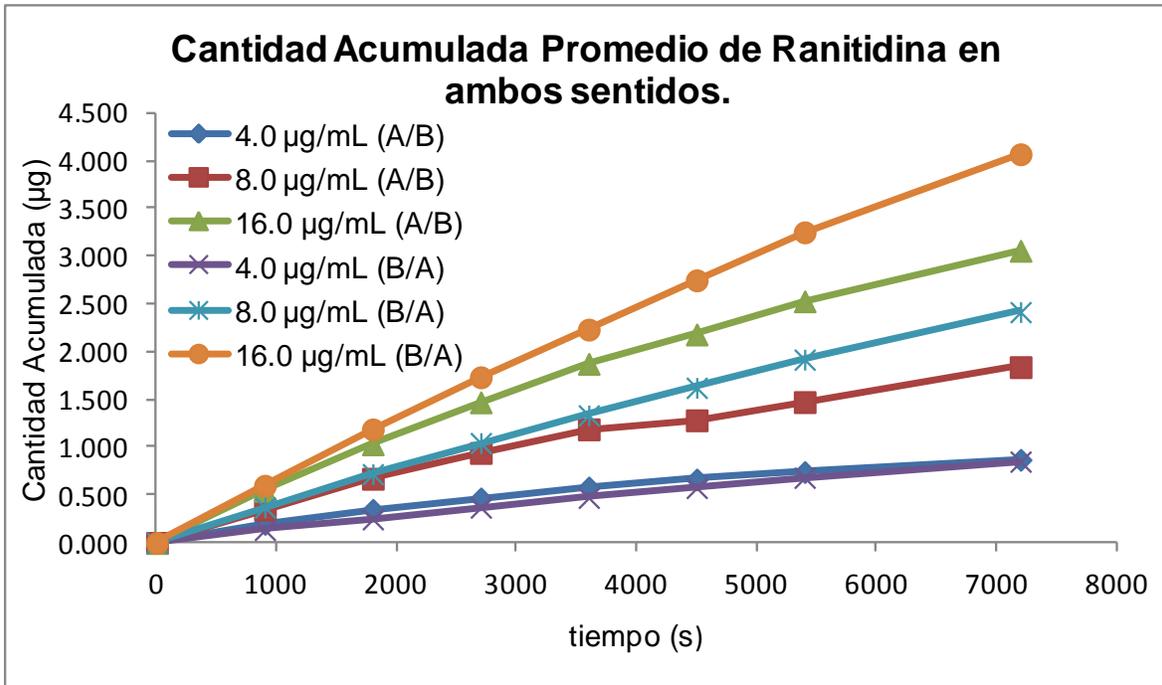


Figura 19. Cantidad Acumulada Promedio de Ranitidina en cada intervalo de tiempo para tres concentraciones 4.0, 8.0 y 16.0 µg/mL, en ambos sentidos.

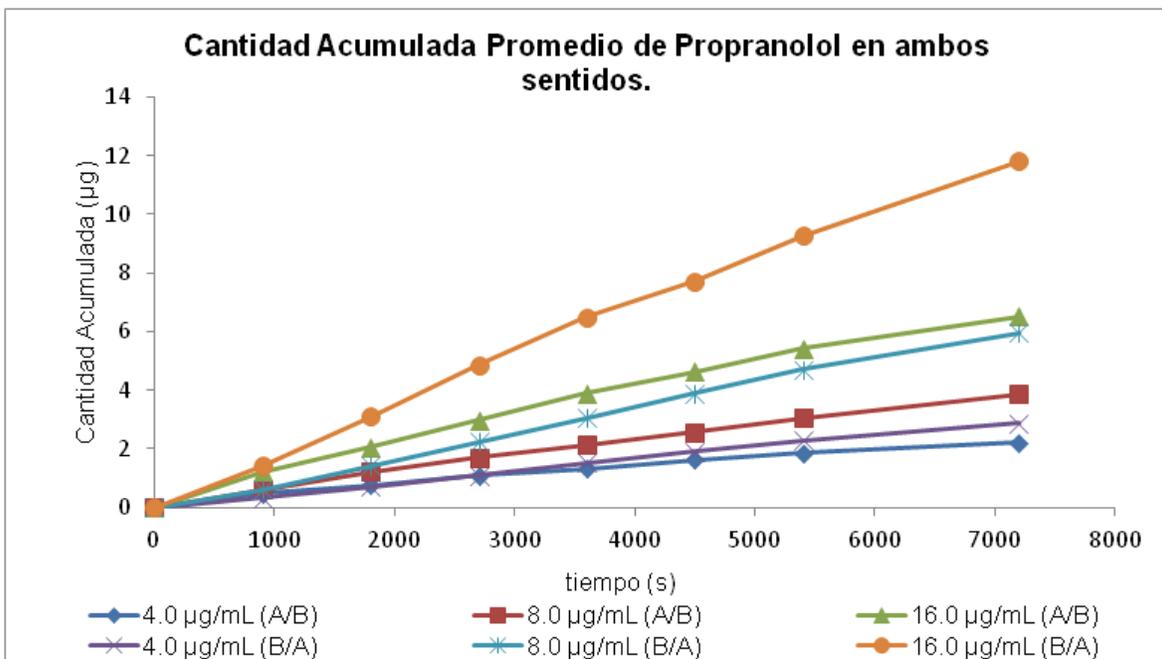


Figura 20. Cantidad Acumulada Promedio de Propranolol en cada intervalo de tiempo para tres concentraciones 4.0, 8.0 y 16.0 µg/mL, en ambos sentidos.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 30. Cantidad Acumulada Promedio de Propranolol en cada intervalo de tiempo para tres concentraciones 4.0, 8.0 y 16.0 µg/mL, en ambos sentidos.

Tiempo (s)	Sentido					
	Apical/basolateral (A/B)			Basolateral/Apical (B/A)		
	Concentración (µg/mL)					
	4.0	8.0	16.0	4.0	8.0	16.0
	Cantidad Acumulada Promedio (µg)					
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
900	0.199	0.348	0.545	0.136	0.372	0.598
1800	0.346	0.672	1.033	0.248	0.720	1.189
2700	0.466	0.943	1.473	0.370	1.045	1.735
3600	0.581	1.190	1.876	0.473	1.336	2.235
4500	0.664	1.285	2.184	0.576	1.625	2.751
5400	0.742	1.475	2.531	0.683	1.920	3.254
7200	0.870	1.842	3.061	0.852	2.418	4.072
Pendiente (dQ/dt)	0.000119	0.000249	0.000425	0.000119	0.000336	0.000570
R	0.980	0.986	0.991	0.997	0.998	0.998
r2	0.960	0.971	0.983	0.995	0.995	0.996

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En las tablas 29 y 30, se observa que la cantidad transportada de ambos analitos es directamente proporcional a la concentración para ambos analitos, esto se hace más evidente si observamos las figuras 19 y 20 además se observa que hay mayor transporte en el sentido Basolateral al apical, este comportamiento nos dice que probablemente el transporte no se lleve a cabo por difusión simple para ambos analitos.

Tabla 31. Coeficientes de Permeabilidad Aparente (cm/s).

		Papp ($\times 10^{-5}$ cm/s)			
		Propranolol		Ranitidina	
		Apical/ Basolateral	Basolateral/ Apical	Apical/ Basolateral	Basolateral/ Apical
($\mu\text{g/mL}$)	4.0	10.18429	4.59698	3.97259	1.32442
	8.0	8.89803	4.77641	4.16887	1.87405
	16.0	7.61849	4.65560	3.55798	1.58994

En la tabla 31 y la figura 21 se observa que los coeficientes de permeabilidad aparente son del orden de 10^{-5} , lo cual coincide con lo reportado en la bibliografía, también se observa que en el caso del propranolol en el sentido apical a basolateral los coeficientes de permeabilidad son mayores a menor concentración, esto representa que probablemente exista saturación en la membrana, aunque en el sentido basolateral a apical los coeficientes de permeabilidad para el propranolol son muy similares a pesar de que son diferentes concentraciones, lo mismo ocurre con la Ranitidina para ambos sentidos.

El comportamiento del transporte de ranitidina nos hace pensar que su transporte no es por difusión simple.

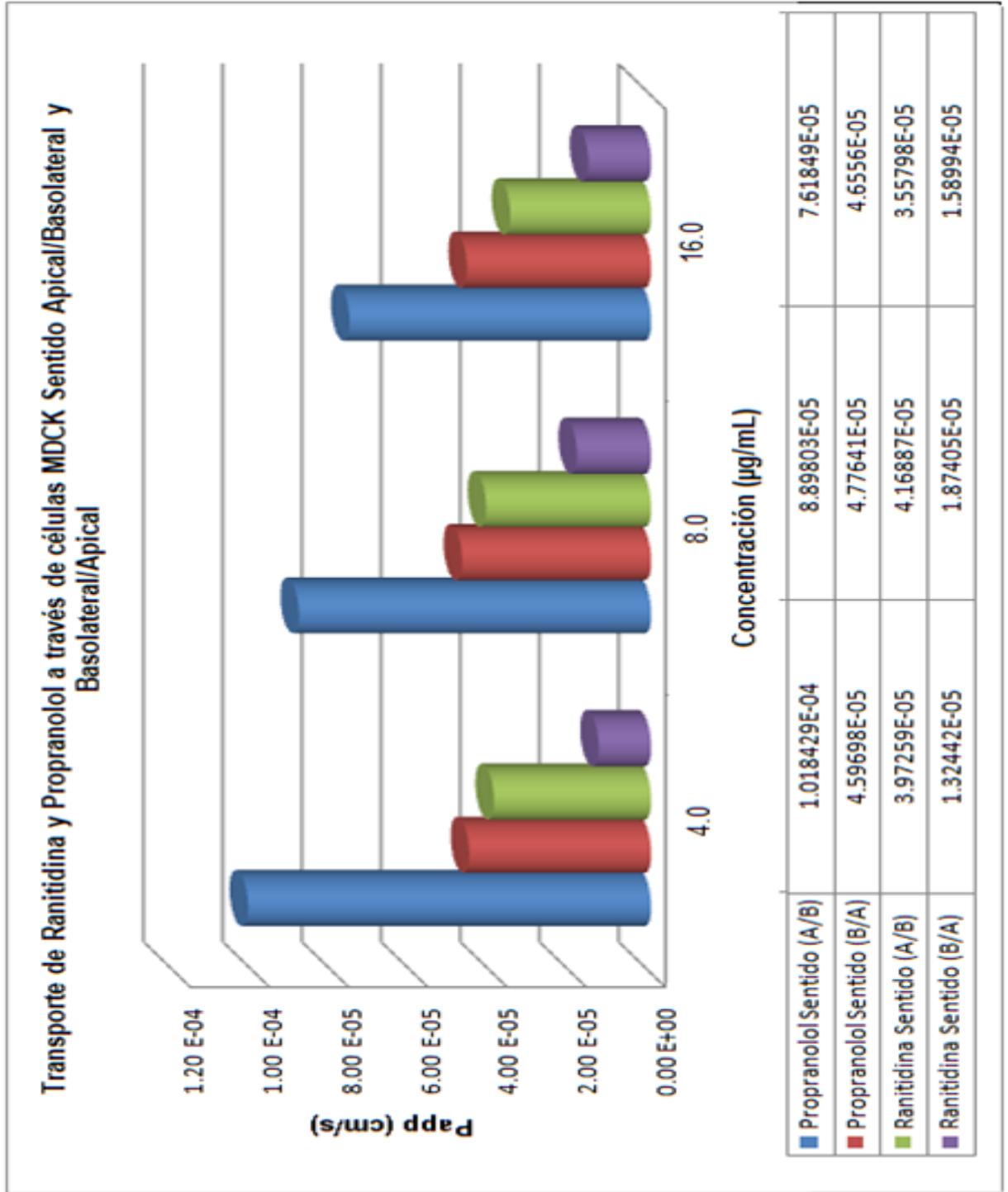


Figura 21. Coeficientes de Permeabilidad Aparente (cm/s) del Transporte de Ranitidina y Propranolol a través de células MDCK en sentido Apical/Basolateral (A/B) y Basolateral/Apical (B/A)

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Tabla 32. Determinación de la Relación de los Coeficientes de Permeabilidad Aparente (cm/s) del Transporte de Ranitidina y Propranolol a través de células MDCK.

		Relación de los Coeficientes de Papp (cm/s)				
		Analito	Propranolol		Ranitidina	
		Relación	(B/A)/(A/B)	(A/B)/(B/A)	(B/A)/(A/B)	(A/B)/(B/A)
($\mu\text{g/mL}$)	4		0.451	2.215	0.333	2.999
	8		0.537	1.863	0.450	2.225
	16		0.611	1.636	0.447	2.238

En vista de que los coeficientes de permeabilidad aparente obtenidos nos indican la posibilidad de que el transporte de estos analitos no sea por difusión simple, se obtuvieron los cocientes reportados en la tabla 32.

En casi todos los casos se obtuvieron cocientes iguales o mayores a 3.0, con esto descartamos que exista otro tipo de transporte diferente al transporte por difusión pasiva para estos analitos. Se observa que la ranitidina a la concentración de 4.0 $\mu\text{g/mL}$ pudiera presentar un transporte diferente del pasivo en estas condiciones trabajadas.

Todas las monocapas celulares empleadas para los ensayos de permeabilidad cumplieron con la prueba de integridad de la membrana, pues en ninguna se obtuvieron % de Lucifer Yellow mayores al 1 % en la cámara basolateral.

6. CONCLUSIONES.

- La metodología desarrollada en este proyecto, para evaluar la Permeabilidad aparente empleando células MDCK, arroja resultados confiables y reproducibles, por lo que se puede aplicar para evaluar la permeabilidad de moléculas nuevas o para evaluar diferentes formulaciones para un mismo fármaco.
- La administración de los analitos de estudio en la línea celular MDCK es segura en un rango de concentraciones 0.1 a 100 µg/mL, no hay una inhibición de la proliferación celular significativa.
- Los Métodos Bioanalíticos desarrollados y validados cumplen con el propósito para el cual fueron implementados, ya que todos los parámetros evaluados cumplen con lo establecido por la NOM-177-SSA1-1998 y la guía para validación de métodos bioanalíticos establecida por la FDA.
- Ambos analitos son transportados por difusión pasiva, los resultados obtenidos coinciden con la absorción oral reportada en humanos, 90% para el Propranolol y menor al 50% para la Ranitidina.

Perspectivas.

- Realizar Estudios de Permeabilidad de moléculas nuevas, empleando el mismo diseño y comparar los resultados con los obtenidos en este proyecto.
- Evaluar mediante la implementación de esta metodología diferentes formulaciones para un mismo fármaco, comparar los resultados con los obtenidos en este proyecto.
- Fomentar el uso de este tipo de estudios para evitar el sacrificio de animales.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Secretaria de Salud. 1999. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen pruebas. DOF, 7 de Mayo de 1999.
2. FDA. 1999 Guidance for the industry: Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. <http://www.fda.gov/>
3. Secretaria de Salud. 2008. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) 9ª Edición.
4. FDA. 2001 Guidance for the industry: Bioanalytical Method Validation. <http://www.fda.gov/>
5. Yu LX, Amidon GL, et al. Biopharmaceutics Classification System: The scientific basis for biowaiver extensions. *Pharmaceutical Research*. 19 (7):921-925
6. Ku MS. 2008. Use of Biopharmaceutical Classification System in Early Drug Development. *The AAPS Journal*. 10(1): 208-212.
7. Löbenberg R, Amidon GL. 2000. Modern Bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutical classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 50:3-12,
8. Emilio John, Dan Luckabaugh. 1998. Manual of Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Food and Drug Administration. <http://www.fda.gov/cder>.
9. Gil Alfonso Magos Guerrero, Marte Lorenzana-Jiménez. 2009. Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos, *Revista Facultad de Medicina UNAM*. 52:260-264
10. Pauwels, R. 2006. Aspects of successful drug Discovery and Development, *Antiviral Research*. 71:77-89.
11. Di L, Kerns E. 2003. Profiling drug-like properties in discovery research. *Current Opinion in Chemical Biology* 7:402-408

12. Aulton Michel. E, 2004. La Ciencia del Diseño de las Formas Farmacéuticas 2ª Edición Elsevier España, S. A, 257-260
13. Li, AP. 2005. Preclinical in vitro screening assays for drug-like properties. *Drug Discovery Today* 2(2):179-185.
14. Alfonso, V. M. 2003. *Farmacología Fundamental*. España: Mc Graw Hill Interamericana.13-17
15. Carmen A. L, 2001. Introducción a la Química Farmacéutica. Mc Graw Hill, 2ª Edición. 144-150.
16. Marianne A. 2000. Principios Biofarmaceuticos de la Administración de Fármacos. Mc Graw Hill. 254-274
17. Hilda C. R, Alma C. A. 1996. Aspectos Biofarmaceuticos de la Evaluación de Medicamentos.UAM. 19-29
18. Artursson P. et al, 2001. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Advance Drug Delivery Reviews*. 46:27-43
19. Camenish Gian, et al., 1997. Comparison of passive drug transport through Caco-2 cells and artificial membranes. *International journal of pharmaceutics*.147:61-70
20. Lennernäs H. et al, 1996 Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *International journal of pharmaceutics*.127:103-107
21. Artursson P. et al, 1991. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 175:880-885.
22. Artursson P.1990. Epithelial Transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal Absorbive (caco-2) cells.
23. Jennifer D. Irvine, et al.,1999. MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Cells: A tool for membrane permeability screening. *Journal of Pharmaceutical Sciences*.88:28-33.

24. Praveen V. Balimane, et al, 2000. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological methods*. 44:301-312..
25. Braun Annette, et al, 2000. Cell cultures as tools in biopharmacy. *Pharmaceutical Sciences*. 11 Suppl. 2 S51-S60.
26. Lawrence X. Yu. Amidon G. L. 1999. A compartmental absorption and transit model for estimating oral drug absorption. *International journal of pharmaceutics*. 186:119-125.
27. X. C. Wu, et al, The TC7 Cell mon layer is a valuable in vitro intestinal epithelial model for membrane permeability Screening. Cerep, .Inc. WA 98052 Redmon USA.
28. D.J. MC Cool, et al, 1990. The T84 human colonic adenocarcinoma cell line produces mucine in culture and releases it in response to various secretagogues. Research Institute, Hospital for sick children, toronto, Ontario, Canada *Biochemical Journal*. 276:491-500
29. R, Ian Freshney. 2005. *Culture of animals cells a manual of basic technique*. 5a Edition, John Wiley & Sons, Inc.
30. Yee S. 1997. In vitro permeability across Caco-2 Cells (colonic) can predict in vivo (small intestine) absorption in man-fact or myth. *Pharmaceutical Research* 14(6):763-766.
31. Kovbasnjuk o. et al, 1998. Water does not flow across the tight junctions of MDCK cell epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Physiology* 95:6526-6525.
32. Diccionario de especialidades Farmacéuticas 2011. <http://www.medicamentosplm.com/index.html> consulta Diciembre 2012.
33. Moo J. Cho. et al, 1989. The Madin Darby Canine Kidney (MDCK) epithelial cell monolayer as a model cellular transport barrier. *Pharmaceutical Research*. 6:71-81
34. Choy Fun Wong, et al, 1998. Simple determination High-Performance Liquid Chromatographic method for the determination of ranitidine in human plasma. *Journal of Chromatography* 718:205-210

35. L. G. Hare et al, 2004. Liquid Chromatographic determination including simultaneous "on-cartridge" separation of ranitidine cisapride drug combinations from pediatric plasma samples using an automated solid-phase extraction procedure. *Journal of Chromatography* 806:263-269.
36. Y.S El-Saharty, 2003. Simultaneous high-performance liquid chromatographic assay of furosemide and propranolol HCl and its application in a pharmacokinetic study. 33:699-709.
37. Ramesh Panchagnula, et al 2004. Reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet detection for simultaneous quantitation of indinavir and propranolol from ex vivo rat permeability studies. *Journal of Chromatography* 806:277-282.