



## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

ESTUDIO DE PERMEABILIDAD DE LOS FLAVONOIDES ACACETINA Y  
PINOCEMBRINA A TRAVÉS DE LA MONOCAPA CELULAR Caco-2: UN  
MODELO *IN VITRO* DE ABSORCIÓN INTESTINAL

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:  
DIANA ALEJANDRA MARTÍNEZ CHÁVEZ

TUTORA: DRA. BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D. F. JUNIO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

**ESTUDIO DE PERMEABILIDAD DE LOS FLAVONOIDES  
ACACETINA Y PINOCEMBRINA A TRAVÉS DE LA MONOCAPA CELULAR Caco-2:  
UN MODELO *IN VITRO* DE ABSORCIÓN INTESTINAL**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

QFB DIANA ALEJANDRA MARTÍNEZ CHÁVEZ



TUTORA: DRA. BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ

2015

Jurado Asignado:

Presidente	Dra. Lilián Yopez Mulia
Vocal	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Vocal	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal	Dra. Flora Adriana Ganem Rondero
Secretario	Dra. Helgi Jung Cook

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios 113 y de Cultivo Celular de la Unidad de Estudios Preclínicos (UNIPREC), ambos ubicados en el Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM.

Tutora:

---

Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

Sustentante:

---

QFB Diana Alejandra Martínez Chávez

Parte de este trabajo se presentó en la 10ª Reunión Internacional de Investigación de Productos Naturales en Mérida, Yucatán. Mayo, 2014.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme el privilegio de recibir una educación de calidad y una formación humana, y por permitirme nuevamente completar una etapa más en mi vida académica.

A la Dra. Blanca Estela Rivero Cruz por su apoyo incondicional para lograr la realización de este proyecto de investigación, por su gran disposición para ayudarme en cualquier momento, por su asesoría y sus consejos que han contribuido de manera especial en mi formación.

Al CONACyT por la beca otorgada para realizar los estudios de Maestría (Número de becario 288996).

A los miembros del jurado: Dra. Helgi Jung Cook, Dra. Adriana Ganem Rondero, Dra. Isabel Aguilar Laurents, Dr. Ricardo Reyes Chilpa y Dra. Lilián Yépez Mulia por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por sus valiosas aportaciones para la corrección y mejora de esta tesis.

A la Dra. Inés Fuentes Noriega por todo el apoyo brindado para la realización de este proyecto de investigación.

Al personal de la UNIPREC, en especial a los M en C Isabel Gracia y Francisco Sánchez por permitirme realizar parte del trabajo experimental en el laboratorio de cultivo celular; también a Lidia Barrón por sus consejos y la asesoría técnica brindada.

Al Dr. José Pedraza Chaverri por permitirme el uso del fluorómetro para la lectura de las muestras.

A todas las personas que de alguno u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo, en especial a Lulú, Pablo, Quetzal, Alí y Jonathan gracias por su infinito apoyo, sus consejos, su amistad y su compañerismo.

*Dedicatoria*

*A mi mamá y mi papá, mis abuelitos, Ilse y toda mi familia*

*A Alan*

*A todos mis amigos*

## ÍNDICE GENERAL

	Página
<i>Lista de Figuras</i>	viii
<i>Lista de Gráficas</i>	x
<i>Lista de Tablas</i>	xi
<i>Lista de Siglas, Abreviaturas y Símbolos</i>	xiv
1. Introducción	1
2. Objetivos	3
3. Antecedentes	4
3.1 Propóleo	4
3.2 Flavonoides	5
3.2.1 Generalidades	5
3.2.2 Clasificación de los flavonoides	6
3.2.3 Biogénesis de los flavonoides	7
3.2.4 Actividad biológica de los flavonoides	9
3.3 Pinocebrina	9
3.3.1 Fuentes naturales de pinocebrina	10
3.3.2 Actividad biológica de la pinocebrina	11
3.3.2.1 Actividad antimicrobiana	11
3.3.2.2 Actividad antiinflamatoria	12
3.3.2.3 Actividad anticancerosa	12
3.3.2.4 Actividad neuroprotectora	13
3.3.2.5 Actividad antiangiogénica	14
3.3.2.6 Actividad vasorrelajante	14
3.3.2.7 Actividad como antiagregante plaquetario	14
3.3.2.8 Actividad antimutagénica	14
3.4 Acacetina	15
3.4.1 Fuentes naturales de acacetina	15
3.4.2 Actividad biológica de la acacetina	16
3.4.2.1 Actividad anticancerosa	16
3.4.2.2 Actividad neuroprotectora	17
3.4.2.3 Actividad antiinflamatoria y antinociceptiva	18
3.4.2.4 Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora	18
3.4.2.5 Actividad hepatoprotectora y cardioprotectora	18
3.4.2.6 Actividad antiplasmódica y antiviral	19
3.4.2.7 Actividad hipoglicémica e hipouricémica	19
3.5 Absorción de fármacos	20
3.5.1 Transporte de fármacos a través de membranas	23
3.5.1.1 Transporte pasivo transcelular	23

3.5.1.2 Transporte pasivo paracelular	24
3.5.1.3 Transporte mediado por acarreadores	25
3.5.1.3.1 Transportadores o acarreadores	26
3.5.1.4 Endocitosis	28
3.5.2 Sistema de clasificación biofarmacéutica	28
3.5.3 Modelos para evaluar la permeabilidad	29
3.5.3.1 Métodos fisicoquímicos	30
3.5.3.2 Métodos <i>in vitro</i>	31
3.5.3.2.1 Métodos basados en tejidos animales	31
3.5.3.2.2 Métodos basados en cultivos celulares	31
3.5.3.3 Métodos <i>in situ</i>	33
3.5.3.4 Métodos <i>in vivo</i>	33
3.5.3.5 Métodos <i>in silico</i>	33
4. Metodología	35
4.1 Determinación de las características fisicoquímicas de la pinocembrina y la acetina	35
4.2 Método bioanalítico para cuantificar atenolol y propranolol (marcadores de permeabilidad) en estudios de transporte <i>in vitro</i> con células Caco-2	35
4.2.1 Desarrollo del método	35
4.2.2 Evaluación del sistema	36
4.2.2.1 Precisión	36
4.2.2.2 Linealidad	36
4.2.3 Validación del método bioanalítico	36
4.2.3.1 Selectividad	37
4.2.3.2 Linealidad	37
4.2.3.3 Exactitud, precisión y recobro	37
4.2.3.4 Límite de cuantificación	38
4.2.3.5 Estabilidad de la muestra	38
4.3 Método bioanalítico para la cuantificación de Acetina y Pinocembrina en estudios de transporte <i>in vitro</i> con células Caco-2	39
4.3.1 Diseño experimental para el desarrollo del método cromatográfico	39
4.3.2 Evaluación del sistema	40
4.3.2.1 Precisión	41
4.3.2.2 Linealidad	41
4.3.3 Validación del método	41
4.3.3.1 Selectividad	41
4.3.3.2 Linealidad	42
4.3.3.3 Exactitud, precisión y recobro	42
4.3.3.4 Límite de cuantificación	42



4.3.3.5 Estabilidad de la muestra	42
4.4 Cultivo celular	42
4.4.1 Preparación de medios utilizados para el cultivo celular	43
4.4.2 Descongelamiento y proliferación celular	43
4.4.3 Tripsinización y conteo celular	43
4.4.4 Subcultivo y criopreservación de la línea celular	44
4.5 Ensayo de citotoxicidad de los flavonoides sobre la línea celular Caco-2	45
4.6 Estudio de permeabilidad	46
4.6.1 Preparación de los medios requeridos para el estudio	46
4.6.2 Formación de la monocapa de la línea celular Caco-2 en las placas Transwell	46
4.6.3 Medición de la Resistencia Transepitelial (TEER)	47
4.6.4 Adecuabilidad del modelo de permeabilidad	47
4.6.4.1 Transporte en dirección Apical-Basolateral	47
4.6.4.2 Transporte en dirección Basolateral-Apical	47
4.6.5 Estudios de transporte de la acetina y la pinocembrina	48
4.6.6 Determinación de la integridad de la monocapa	49
4.6.7 Análisis de las muestras	49
4.6.8 Cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente	49
5. Resultados y Discusión	50
5.1 Propiedades fisicoquímicas de la Pinocembrina y la Acetina	50
5.2 Método bioanalítico para la cuantificación de Atenolol y Propranolol en estudios de transporte <i>in vitro</i> con células Caco-2	51
5.2.1 Desarrollo del método	51
5.2.2 Evaluación del sistema	54
5.2.2.1 Precisión	54
5.2.2.2 Linealidad	54
5.2.3 Validación del método	56
5.2.3.1 Selectividad	57
5.2.3.2 Linealidad del método	59
5.2.3.3 Precisión y Exactitud	62
5.2.3.4 Recobro	63
5.2.3.5 Límite de cuantificación	64
5.2.3.6 Estabilidad de la muestra	65
5.3 Método bioanalítico para la cuantificación de Acetina y Pinocembrina en estudios de transporte <i>in vitro</i> con células Caco-2	66
5.3.1 Desarrollo del método	66
5.3.2 Evaluación del sistema	72
5.3.2.1 Precisión	72

5.3.2.2 Linealidad	72
5.3.3 Validación del método	74
5.3.3.1 Selectividad	75
5.3.3.2 Linealidad del método	77
5.3.3.3 Precisión y exactitud	79
5.3.3.4 Recobro	81
5.3.3.5 Límite de cuantificación	82
5.3.3.6 Estabilidad de la muestra	83
5.4 Cultivo celular	84
5.5 Ensayo de citotoxicidad	85
5.6 Estudio de permeabilidad	87
5.6.1 Adecuabilidad del modelo de permeabilidad	87
5.6.2 Estudios de permeabilidad de la Pinocembrina y la Acacetina	90
6. Conclusiones	94
7. Perspectivas	95
8. Bibliografía	96
9. Anexo I	103

## Lista de Figuras

		Página
<b>Figura 3.1</b>	Recolección del material vegetal para la formación del propóleo.	4
<b>Figura 3.2</b>	Fenilbenzopiranos (esqueleto C6-C3-C6): Flavonoides <b>(1)</b> , Isoflavonoides <b>(2)</b> y Neoflavonoides <b>(3)</b> .	7
<b>Figura 3.3</b>	Principales subgrupos de los flavonoides	7
<b>Figura 3.4</b>	Formación del 4-coumaroil CoA a partir de los aminoácidos L-Fenilalanina y L-Tirosina.	8
<b>Figura 3.5</b>	Formación de los flavonoides	8
<b>Figura 3.6</b>	Estructura y fuentes naturales de la pinocembrina (Rasul <i>et al.</i> , 2013)	10
<b>Figura 3.7</b>	Estructura y fuentes naturales de la acetina	15
<b>Figura 3.8</b>	Características de las células epiteliales intestinales (Avdeef, 2003)	22
<b>Figura 3.9</b>	Estructuras químicas del propranolol <b>(a)</b> y el atenolol <b>(b)</b>	29
<b>Figura 4.1</b>	Estudio de transporte bidireccional empleando una monocapa celular en una placa Transwell	48
<b>Figura 5.1</b>	Diagramas de solubilidad en función del pH. <b>(a)</b> : pinocembrina <b>(b)</b> : acetina	50
<b>Figura 5.2</b>	Diagrama de distribución de especies de la pinocembrina <b>(a)</b> y la acetina <b>(b)</b>	51
<b>Figura 5.3</b>	Cromatograma obtenido con los estándares de atenolol y propranolol a una concentración de 100 $\mu$ M	53
<b>Figura 5.4</b>	Cromatogramas obtenidos para evaluar la selectividad del método para cuantificar atenolol a 224 nm: HBSS <b>(a)</b> , blanco de HBSS en contacto con células Caco-2 <b>(b)</b> , atenolol a una concentración de 100 $\mu$ M <b>(c)</b>	58
<b>Figura 5.5</b>	Cromatogramas obtenidos para evaluar la selectividad del método para cuantificar propranolol a 290 nm: HBSS <b>(a)</b> , HBSS en contacto con la monocapa celular Caco-2 <b>(b)</b> , propranolol a una concentración de 100 $\mu$ M <b>(c)</b>	59
<b>Figura 5.6</b>	Cromatograma de acetina y pinocembrina obtenido con MeOH: TFA 0.01% (60:40) y flujo de 1.5 mL/min	67
<b>Figura 5.7</b>	Diagramas de Pareto de los factores evaluados para cada respuesta	69-70
<b>Figura 5.8</b>	Cromatograma obtenido con el método desarrollado para pinocembrina y acetina a una concentración de 100 $\mu$ g/mL	71
<b>Figura 5.9</b>	Cromatogramas obtenidos para evaluar la selectividad del método para cuantificar pinocembrina a 290 nm: HBSS <b>(a)</b> , HBSS en contacto con la monocapa celular Caco-2 <b>(b)</b> , pinocembrina a una concentración de 40 $\mu$ M <b>(c)</b>	76
<b>Figura 5.10</b>	Cromatogramas obtenidos para evaluar la selectividad del método para cuantificar acetina a 320 nm: HBSS <b>(a)</b> , HBSS en contacto con la monocapa celular Caco-2 <b>(b)</b> ,	77

acacetina a una concentración de 40  $\mu$ M (c)  
**Figura 5.11** Células Caco-2 (100X) en proliferación: (a) en  
subconfluencia y (b) en confluencia

85

## Lista de Gráficas

	Página
<b>Gráfica 5.1</b>	Linealidad del sistema para cuantificar atenolol 55
<b>Gráfica 5.2</b>	Linealidad del sistema para cuantificar propranolol 56
<b>Gráfica 5.3</b>	Linealidad del método para cuantificar atenolol 60
<b>Gráfica 5.4</b>	Linealidad del método para cuantificar propranolol 61
<b>Gráfica 5.5</b>	Superficie de respuesta estimada de los factores evaluados para establecer las condiciones cromatográficas del método para cuantificar pinocembrina y acacetina 70
<b>Gráfica 5.6</b>	Linealidad del sistema para cuantificar pinocembrina 73
<b>Gráfica 5.7</b>	Linealidad del sistema para cuantificar acacetina 74
<b>Gráfica 5.8</b>	Linealidad del método para cuantificar pinocembrina 78
<b>Gráfica 5.9</b>	Linealidad del método para cuantificar acacetina 79
<b>Gráfica 5.10</b>	Viabilidad de las células Caco-2 con un tiempo de exposición a los compuestos evaluados de 24 h. 87
<b>Gráfica 5.11</b>	Transporte de propranolol y atenolol en las direcciones Apical-Basolateral (a) y Basolateral-Apical (b) 89
<b>Gráfica 5.12</b>	Correlación entre la fracción absorbida (FA) en humanos y la permeabilidad a través de las monocapas celulares Caco-2 (Hubatsch <i>et al.</i> , 2007) 89
<b>Gráfica 5.13</b>	Transporte de la pinocembrina en las direcciones Apical-Basolateral (a) y Basolateral-Apical (b), y de la acacetina en las direcciones Apical-Basolateral (c) y Basolateral-Apical (d) en la monocapa celular Caco-2 91
<b>Gráfica 5.14</b>	Coefficientes de permeabilidad aparente de los flavonoides y de los marcadores de permeabilidad 93

## Lista de Tablas

		Página
<b>Tabla 3.1</b>	Parámetros biológicos y fisicoquímicos del tracto gastrointestinal humano (Balimane <i>et al.</i> , 2000)	21
<b>Tabla 3.2</b>	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica	28
<b>Tabla 4.1</b>	Factores evaluados en el diseño experimental	39
<b>Tabla 4.2</b>	Diseño experimental 2 <sup>3</sup>	40
<b>Tabla 4.3</b>	Condiciones cromatográficas del método para cuantificar acetina y pinocembrina	40
<b>Tabla 5.1</b>	Propiedades fisicoquímicas de la pinocembrina y la acetina <i>in silico</i>	50
<b>Tabla 5.2</b>	Parámetros cromatográficos obtenidos para el atenolol y el propranolol con el método desarrollado	53
<b>Tabla 5.3</b>	Precisión del sistema para la cuantificación de atenolol y propranolol	54
<b>Tabla 5.4</b>	Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del sistema para cuantificar atenolol	55
<b>Tabla 5.5</b>	Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del sistema para cuantificar atenolol	55
<b>Tabla 5.6</b>	Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del sistema para cuantificar propranolol	56
<b>Tabla 5.7</b>	Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del sistema para cuantificar propranolol	56
<b>Tabla 5.8</b>	Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del método para cuantificar atenolol	60
<b>Tabla 5.9</b>	Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del método para cuantificar atenolol	61
<b>Tabla 5.10</b>	Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del método para cuantificar propranolol	61
<b>Tabla 5.11</b>	Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del método para cuantificar propranolol	61
<b>Tabla 5.12</b>	Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad y la exactitud del método para cuantificar atenolol y propranolol	62
<b>Tabla 5.13</b>	Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método para cuantificar atenolol	63
<b>Tabla 5.14</b>	Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método para cuantificar propranolol	63
<b>Tabla 5.15</b>	Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método de cuantificación del atenolol	64
<b>Tabla 5.16</b>	Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método de cuantificación del propranolol	64

<b>Tabla 5.17</b>	Precisión y exactitud del límite inferior de cuantificación del atenolol y del propranolol	65
<b>Tabla 5.18</b>	Resultados de estabilidad para las muestras de atenolol	65
<b>Tabla 5.19</b>	Resultados de estabilidad para las muestras de propranolol	66
<b>Tabla 5.20</b>	Factores evaluados en el diseño experimental 2 <sup>2</sup>	67
<b>Tabla 5.21</b>	Optimización de respuesta múltiple	68
<b>Tabla 5.22</b>	Precisión del sistema para cuantificar pinocembrina y acetina	72
<b>Tabla 5.23</b>	Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del sistema para cuantificar pinocembrina	73
<b>Tabla 5.24</b>	Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del sistema para cuantificar pinocembrina	73
<b>Tabla 5.25</b>	Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del sistema para cuantificar acetina	74
<b>Tabla 5.26</b>	Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del sistema para cuantificar acetina	74
<b>Tabla 5.27</b>	Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del método para cuantificar pinocembrina	78
<b>Tabla 5.28</b>	Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del método para cuantificar pinocembrina	78
<b>Tabla 5.29</b>	Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del método para cuantificar acetina	79
<b>Tabla 5.30</b>	Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del método para cuantificar acetina	79
<b>Tabla 5.31</b>	Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad y la exactitud del método para cuantificar pinocembrina y acetina	80
<b>Tabla 5.32</b>	Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método para cuantificar pinocembrina	81
<b>Tabla 5.33</b>	Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método para cuantificar acetina	81
<b>Tabla 5.34</b>	Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método de cuantificación de pinocembrina	82
<b>Tabla 5.35</b>	Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método de cuantificación de acetina	82
<b>Tabla 5.36</b>	Precisión y exactitud del límite inferior de cuantificación de la pinocembrina y la acetina	83
<b>Tabla 5.37</b>	Resultados de estabilidad para las muestras de pinocembrina	83
<b>Tabla 5.38</b>	Resultados de estabilidad para las muestras de acetina	84
<b>Tabla 5.39</b>	Porcentaje de viabilidad promedio obtenido con cada muestra	87

<b>Tabla 5.40</b>	Permeabilidad aparente de los compuestos marcadores para evaluar la adecuabilidad del modelo	88
<b>Tabla 5.41</b>	Coefficientes de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) de los flavonoides y de los marcadores de permeabilidad	90
<b>Tabla 5.42</b>	Análisis de varianza de los coeficientes de $P_{app}$ de pinocembrina obtenidos en la dirección A-B a diferentes concentraciones	92
<b>Tabla 5.43</b>	Análisis de varianza de los coeficientes de $P_{app}$ de acacetina obtenidos en la dirección A-B a diferentes concentraciones	92



## Lista de siglas, abreviaturas y símbolos

Å	Ångström
ABC	ATP-binding cassette
A-B	Apical-Basolateral
ADP	Adenosin Difosfato
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin Trifosfato
B-A	Basolateral-Apical
BCPR	Proteína de resistencia de cáncer de mama
BSC	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
°C	Grados celcius
CI <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria 50
cm	Centímetro
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CoA	Coenzima A
ConA	Concavalina A
CV	Coefficiente de variación
Da	Dalton
DI <sub>50</sub>	Dosis Inhibitoria 50
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
FA	Fracción absorbida
FADH <sub>2</sub>	Flavín Adenin dinucleótido
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramos
GI	Gastrointestinal
GL	Grados de libertad
h	Horas
HBSS	Solución Amortiguadora de Hank
HEPES	Ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazina-1-etanosulfónico
HPLC/CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
IP	Intraperitoneal
IAM	Membrana artificial inmovilizada
IL-6	Interleucina 6
ISO	Interntational Organization for Standardization
IVIVC	Correlaciones <i>in vivo-in vitro</i>
kg	Kilogramo
LC	Límite de cuantificación
LDH	Lactato deshidrogenasa

L	Litro
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
M	Molar
m	Metro
mAU/mUA	Miliunidades de absorbancia
µg	Microgramo
min	Minuto
µL	Microlitro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
µmol	Micromol
µM	Micromolar
N	Normal
MPR2	Proteína asociada a la multiresistencia a fármacos
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotido
nm	Nanómetro
Ω	Ohm
OATP	Polipéptido transportador de aniones orgánicos
OCT	Transportador de cationes orgánicos
PAMPA	Permeabilidad en una membrana artificial paralela
P <sub>app</sub>	Permeabilidad aparente
PepT	Transportador peptídico
P-gp	Glicoproteína P
QC	Control de calidad
rpm	Revoluciones por minuto
S	Desviación estándar
s	Segundo
SLC	Solute carrier
SFB	Suero Fetal Bovino
TEER	Resistencia Transepitelial
TFA	Ácido Trifluoroacético
TFN-α	Factor de necrosis tumoral α
TLR4	Receptor tipo toll 4
TPA	12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato)
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VO	Vía oral
$\bar{X}$	Promedio

## 1. INTRODUCCIÓN

En los países desarrollados existe un marcado interés por los organismos regulatorios para incluir formulaciones de medicina tradicional en sus programas de salud. La seguridad, la eficacia y la calidad de estos insumos dependen de factores como la formulación y su proceso de manufactura. De manera general, los factores de la formulación que afectan la biodisponibilidad de los fármacos se clasifican en dos categorías: factores que afectan la disolución o liberación de los fármacos a partir de su forma farmacéutica y; factores relacionados con los excipientes que afectan la estabilidad del fármaco, su absorción y/o sus procesos metabólicos. Sí bien, para los medicamentos alopáticos se encuentran bien establecidos los factores en la formulación que afectan la biodisponibilidad, para los productos vegetales esta información no se conoce aún. Por lo tanto, para establecer cómo las diferentes formulaciones afectan la biodisponibilidad de los fármacos de origen natural se necesita conocer la relación que guardan sus propiedades fisicoquímicas y farmacológicas con sus propiedades farmacocinéticas y el desempeño *in vitro* del producto farmacéutico.

En este marco de referencia, el sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS) es una base científica que permite clasificar a los fármacos dependiendo de su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal (FDA, 2000). Para clasificar a los fármacos de acuerdo con su permeabilidad, la FDA, aprueba el empleo de estudios farmacocinéticos de balance de masa, de biodisponibilidad absoluta y métodos de permeabilidad intestinal (perfusión intestinal, *in vivo*, en humanos; perfusión intestinal, en animales, *in vivo* o *in situ*; en tejidos intestinales aislados de humano o animales y en monocapas celulares epiteliales *in vitro*). Debido a que los estudios de biodisponibilidad absoluta o de perfusión intestinal en humanos son costosos y difíciles de realizar, la guía emitida por la FDA proporciona, además, una alternativa para extrapolar la velocidad de absorción del fármaco utilizando correlaciones *in vivo-in vitro* (IVIVC) (Thiel-Demby, 2008).

Entre las numerosas técnicas descritas para evaluar la permeabilidad intestinal, la línea celular Caco-2, representa el modelo de barrera intestinal más empleado y mejor caracterizado para predecir la absorción de fármacos (Kratz, 2011). Las células Caco-2 derivan del carcinoma del colon humano y durante su cultivo, van adquiriendo y/o expresando algunas características de las células intestinales como son las microvellosidades; los transportadores de proteínas, las proteínas de eflujo, los sistemas enzimáticos de conjugación correspondientes a la fase II del metabolismo y los sistemas de transformación metabólico de fármacos. A diferencia de las células normales, la línea Caco-2 no expresa la isoenzima del citocromo P450 denominada CYP3A4; la cual se expresa en una alta concentración en el intestino. Sin embargo, durante el cultivo puede inducirse su

expresión adicionando vitamina D<sub>3</sub> al medio de cultivo. La línea celular Caco-2 también, posee similitud morfológica y bioquímica con las células intestinales (Sevin, *et al.*, 2013; Thomas, *et al.*, 2008). En otras palabras, la permeabilidad de los fármacos a través de la monocapa de células Caco-2 se correlaciona con la absorción de la membrana intestinal *in vivo* haciendo posible los estudios de relación estructura-absorción (Hubatsch, *et al.*, 2007; Ma, *et al.*, 2009).

Para demostrar la adecuabilidad de un método enfocado a determinar la BCS de fármacos se requiere establecer una relación orden-categoría entre los valores de permeabilidad y el grado de absorción del fármaco en humanos. Para establecer esta relación, la FDA recomienda utilizar veinte fármacos modelo para métodos *in vitro* con células epiteliales. De acuerdo con la variabilidad del estudio se deberá justificar el número de sujetos y de monocapas celulares empleadas que proporcione un cálculo confiable de la permeabilidad del fármaco. Una vez demostrada la aptitud del método se puede emplear para clasificar fármacos utilizando como patrones internos un fármaco modelo de alta y baja permeabilidad.

En el marco de los productos naturales se ha descrito el mecanismo de difusión pasiva de la partenólida utilizando como modelo de permeabilidad las células Caco-2 (Khan *et al.*, 2003). También, se ha investigado la permeabilidad de las antraquinonas emodina y crisofanol (Zeng-hui *et al.*, 2007) y de las diantronas mayoritarias presentes en las especies *Cassia angustifolia* y *Cassia senna* (Waltenberger *et al.*, 2008); el transporte de los alcaloides derivados de las semillas de la nuez vómica y de la especie *Stemona tuberosa*; la absorción de las alcanidas contenidas en los preparados de algunas especies de Equinacea; de las antocianinas aisladas de *Ribes nigrum* y del ginkgólido B (Ma, *et al.*, 2009; Hua *et al.*, 2008; Steinert *et al.*, 2008). Asimismo, se ha caracterizado el transporte del astragalósido IV, de la quercetina y la crisina y sus metabolitos conjugados (Walle *et al.*, 1998 y 1999; Gu *et al.*, 2004).

Con base en estas consideraciones, el presente trabajo fue diseñado para determinar la permeabilidad aparente de la acacetina y la pinocembrina (compuestos aislados del propóleo) mediante un modelo *in vitro* utilizando la línea celular Caco-2, y empleando el atenolol y el propranolol como marcadores de alta y baja permeabilidad, respectivamente, para determinar la adecuabilidad del modelo. Para ello, se definieron las condiciones experimentales de cultivo de la línea celular Caco-2 para la formación de la monocapa, asimismo los parámetros experimentales del estudio de transporte en las direcciones apical-basolateral y basolateral-apical y, finalmente, las concentraciones a las que se evaluó la permeabilidad de los compuestos.

## 2. OBJETIVOS

El objetivo primordial del presente trabajo de investigación consistió en determinar la permeabilidad aparente de la pinocembrina y la acacetina, dos flavonoides aislados del propóleo proveniente de la región del altiplano mexicano, utilizando como modelo una monocapa formada con la línea celular Caco-2.

Para el cumplimiento del objetivo principal se formularon los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar y validar un método bioanalítico apropiado para cuantificar a los marcadores de alta y baja permeabilidad en la matriz biológica, mediante la evaluación de la linealidad, la precisión; la selectividad, la exactitud, el recobro y la estabilidad de la muestra como parámetros de desempeño.
- Desarrollar y validar un método bioanalítico apropiado para cuantificar a los flavonoides en la matriz biológica. Para establecer las condiciones de separación óptimas entre los flavonoides se empleó un diseño de experimentos. Los parámetros de desempeño del método que se evaluaron fueron: linealidad, precisión, selectividad, exactitud, recobro y estabilidad de la muestra.
- Generar un banco celular maestro y uno de trabajo para la línea celular Caco-2 para asegurar el suministro uniforme y adecuado de las células.
- Demostrar la adecuabilidad de un modelo *in vitro* con la línea celular Caco-2 enfocado a determinar la permeabilidad aparente de la pinocembrina y la acacetina, estableciendo una relación orden-categoría entre los valores de permeabilidad obtenidos experimentalmente con dos fármacos modelo (atenolol y propanolol) y sus correspondientes valores reportados en la literatura.
- Evaluar la citotoxicidad de la acacetina y la pinocembrina sobre la línea celular Caco-2 en un intervalo que considere las concentraciones de exposición de los compuestos durante el estudio de permeabilidad.
- Evaluar el transporte apical-basolateral y basolateral-apical para ambos flavonoides empleando tres diferentes concentraciones.
- Determinar el coeficiente de permeabilidad aparente de la pinocembrina y la acacetina.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Propóleo

El propóleo en su estado natural es una sustancia resinosa de color amarillo verdoso o pardo rojizo (según su origen) y es generado por las abejas a partir del material vegetal que colectan de diferentes plantas (**Figura 3.1**) (Bankova, 2005; Salatino, 2011).



**Figura 3.1** Recolección del material vegetal para la formación del propóleo

El propóleo es la mezcla de sustancias más importante que tienen las abejas en contra de los microorganismos patógenos, protege a la colmena de enfermedades microbianas y es usado para fortalecer las paredes dentro del panal y sellar los agujeros (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006; Sforcin y Bankova, 2011).

Por otra parte, el propóleo ha sido usado por el hombre en la medicina tradicional desde la época antigua, donde se describe su uso como agente antiséptico y cicatrizante, entre otros. Actualmente, en la literatura científica se ha documentado que el propóleo posee algunos efectos farmacológicos que han sido confirmados mediante estudios *in vitro* y/o *in vivo*, donde se ha demostrado su actividad antimicrobiana, antiviral, antiséptica, antiinflamatoria, antioxidante, inmunomoduladora y antitumoral (Kumazawa, 2004; Sforcin y Bankova, 2011).

Hoy en día, el propóleo se comercializa para consumo humano en preparados y jarabes para tratar la tos, el reumatismo y los esguinces; también se utiliza en productos de higiene como la pasta dental y el enjuague bucal; ambos son de utilidad para el tratamiento contra la gingivitis y la estomatitis. Finalmente, en dermatología, se emplea para elaborar productos farmacéuticos y cosméticos como cremas faciales, ungüentos y lociones debido a sus propiedades para regenerar tejidos, tratar quemaduras y enfermedades de la piel (Salatino, 2011).

De manera general, el propóleo se compone aproximadamente de un 50% de resinas, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales, 5% de polen y 5% de otras

sustancias orgánicas. De ellos, la resina es la de mayor interés ya que es la fuente natural de los compuestos activos, entre los que destacan los compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres). Estos compuestos se consideran las moléculas farmacológicamente más importantes del propóleo debido a que son capaces de inhibir enzimas específicas, estimular algunas hormonas y neurotransmisores y capturar radicales libres (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006; Hrbonorá *et al.*, 2009).

Sin embargo, la composición del propóleo varía de acuerdo con la vegetación local donde las abejas realizan la recolección, así como también de su especie, de la época del año y de las características geográficas y climáticas de estos sitios (Gómez, *et al.*, 2006; Salatino, 2011).

A pesar de las numerosas investigaciones realizadas sobre propóleos colectados en diferentes países con climas templados y tropicales existe un número limitado de publicaciones sobre la composición química y la actividad biológica de propóleos provenientes México. En este marco de referencia en el año 2007 Hernández y colaboradores estudiaron tres propóleos del estado de Sonora, México. En esta investigación, los autores identificaron y cuantificaron a la pinocembrina, la crisina y el 3-acetato de la pinobanksina como los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los propóleos estudiados. En el año 2010, Lotti y colaboradores describieron la presencia de isoflavonoides, flavanonas y pterocarpanos en una muestra de propóleo rojo recolectada en el estado de Yucatán. Recientemente, en el año 2014 Rivero y Martínez realizaron un estudio con propóleos provenientes de diferentes apiarios de la región del altiplano mexicano, en donde la acacetina, la 4',7-dimetilnaringenina y la 4',7-dimetilapigenina fueron identificadas en varias muestras y, en algunas, también fueron cuantificados. En estudios posteriores realizados por el mismo grupo de investigación con propóleos pertenecientes a esta región también se identificó a la pinocembrina como uno de los compuestos mayoritarios del propóleo (Granados, 2014).

## 3.2 Flavonoides

### 3.2.1 Generalidades

Las plantas sintetizan una gran cantidad de metabolitos secundarios, de los cuales una parte considerable pertenecen a las categorías de compuestos fenólicos y flavonoides. Estos fitoquímicos presentan gran diversidad estructural y algunos de ellos están distribuidos en un número limitado de especies dentro del reino *plantae*, permitiendo así, su empleo como compuestos marcadores en

estudios quimiotaxonómicos. Los flavonoides, al parecer, llevan a cabo funciones suplementarias en el ciclo de vida de las plantas, tienen un papel importante en su protección y están involucrados en estrategias de defensa, también sirven como atrayentes de polinizadores y como agentes alelopáticos, además de proteger a la planta contra la luz UV y de las interacciones con el medio ambiente (Fraga, 2009).

Algunos metabolitos secundarios, además de ser para las plantas un arma para la supervivencia y la adaptación, son de gran significancia para la humanidad, ya que han sido utilizados como colorantes, fibras, pegamentos, aceites, ceras, saborizantes, fármacos, antibióticos, insecticidas y herbicidas. En los últimos años el estudio de los flavonoides ha sido de gran importancia, ya que se ha encontrado que su consumo regular está asociado con la prevención de enfermedades crónicas incluyendo el cáncer, enfermedades cardiovasculares y desórdenes neurodegenerativos (Kozłowska y Szostak-Wegierek, 2014).

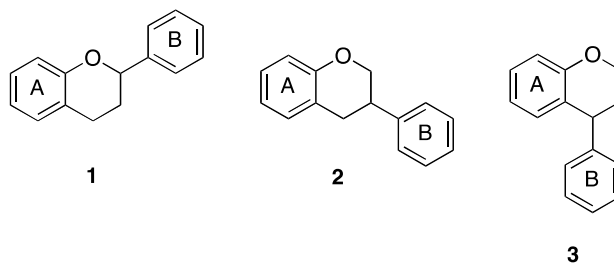
Se encuentran distribuidos en una gran diversidad de plantas especialmente en las angiospermas, sin embargo se ha descrito su presencia en algunos hongos y algas. Los flavonoides se localizan principalmente en los tejidos superficiales de las partes aéreas de las plantas (hojas, frutos y flores), en forma de agliconas y de glicósidos (Kozłowska, 2014; Törrönen, 1997).

### 3.2.2 Clasificación de los flavonoides

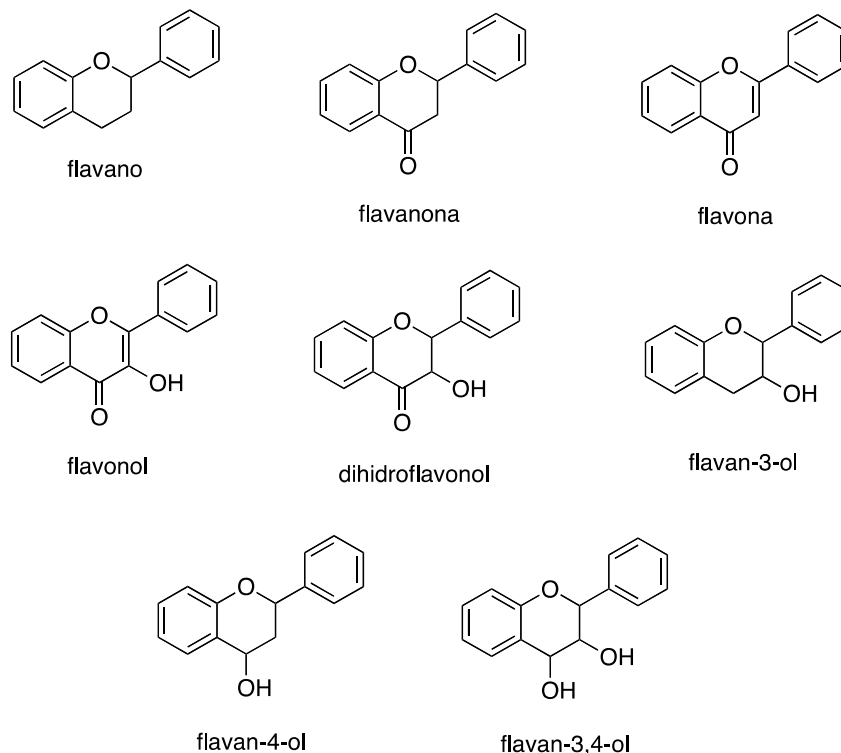
El término flavonoide se usa generalmente para describir a una amplia agrupación de productos naturales que incluyen en su estructura un esqueleto de carbono de tipo  $C_6-C_3-C_6$ ; dicha estructura consiste en dos anillos aromáticos conectados por un puente de 3 carbonos conocido como fenilbenzopirano. Dependiendo de la posición en la que se une el anillo aromático al benzopirano se dividen en tres clases: los flavonoides (2-fenilbenzopiranos), los isoflavonoides (3-fenilbenzopiranos) y los neoflavonoides (4-fenilbenzopiranos) (**Figura 3.2**). Estos compuestos se relacionan estructural y biogénicamente debido a que comparten como precursor a la chalcona (Grotewold, 2006).

Por otra parte, los 2-fenilbenzopiranos o flavonoides se subdividen en grupos dependiendo del grado de oxidación y de saturación presente en el anillo heterocíclico (**Figura 3.3**).





**Figura 3.2** Fenilbenzopiranos (esqueleto C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>): Flavonoides (1), Isoflavonoides (2) y Neoflavonoides (3)

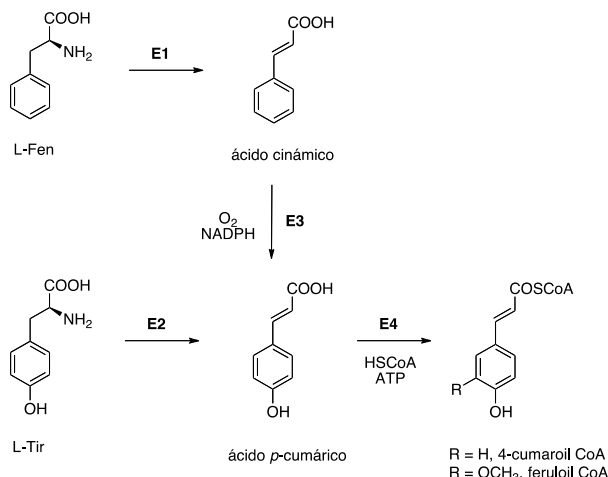


**Figura 3.3** Principales subgrupos de los flavonoides.

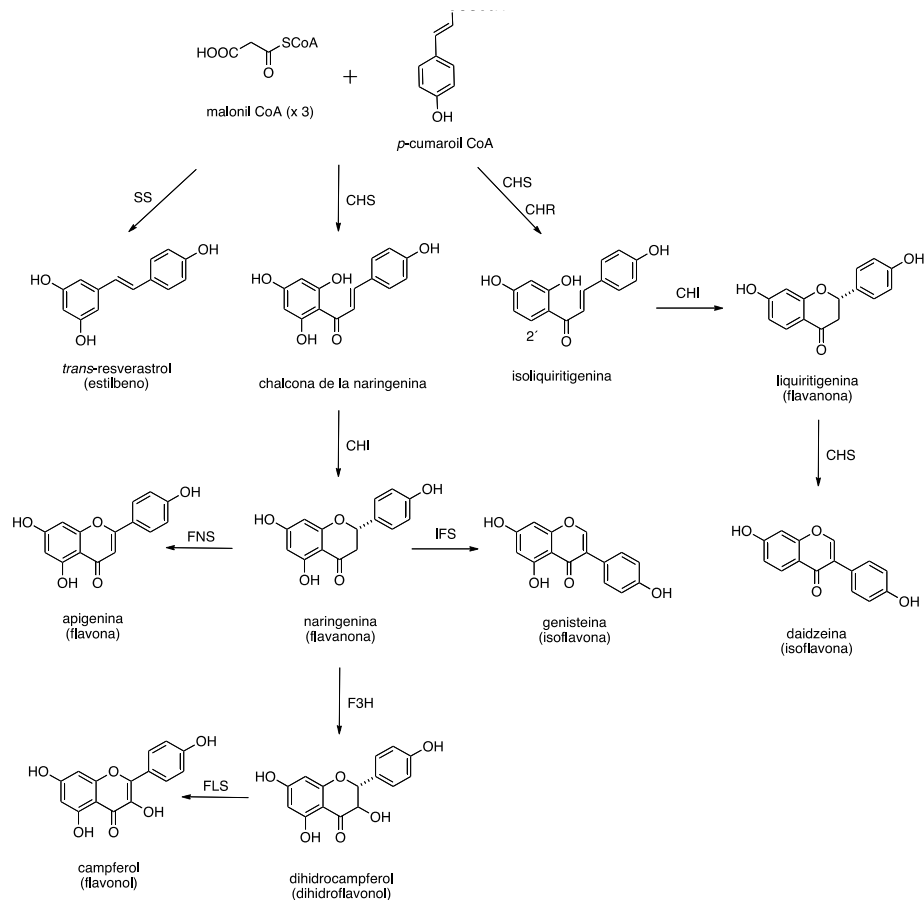
### 3.2.3 Biogénesis de los flavonoides

Los flavonoides se producen por una biogénesis mixta en donde participan las rutas del ácido siquímico y de los policétidos. La primera inicia con la condensación del fosfoenolpiruvato y la eritrosa-4-fosfato, ambos provenientes de vías metabólicas primarias, cuyo producto resultante, a través de una serie de reacciones enzimáticas, forma el ácido siquímico: intermediario central de la ruta. Enseguida, una molécula de fosfoenolpiruvato se incorpora al ácido siquímico y después de un par de reacciones se forma el ácido corísmico; metabolito necesario para la formación de los aminoácidos tirosina y fenilalanina. Luego, éstos sufren una desaminación y otras reacciones para formar 4-hidroxicinamoil CoA (**Figura 3.4**); éste último se une con 3 moléculas de malonil CoA (ruta de los policétidos).

Una vez incorporadas las moléculas de malonil CoA, ocurre una condensación para formar el anillo aromático B. Finalmente, ocurre una ciclación formando el heterociclo y de esta manera es como ocurre la biogénesis de los flavonoides (Figura 3.5) (Dewick, 2009).



**Figura 3.4.** Formación del 4-cumaril CoA a partir de los aminoácidos L-Fenilalanina y L-Tirosina. E1: Fenilalanina amonía liasa (PAL), E2: Tirosina amonía liasa (TAL), E3: Cinamato 4-hidroxilasa y E4: CoA ligasa (Dewick, 2009).



**Figura 3.5** Formación de los flavonoides. CHS: chalcona sintasa, SS: estilbeno sintasa, CHR: chalcona reductasa, CHI: chalcona isomerasa, IFS: isoflavona sintasa, FNS: flavona sintasa, F3H: flavanona 3-hidroxilasa, FLS: flavonol sintasa.

### 3.2.4 Actividad biológica de los flavonoides

La primera evidencia de la actividad biológica de los flavonoides fue presentada por el fisiólogo Albert Szent-Gyorgyii, galardonado en 1937 con el Premio Nobel de Medicina, quien reportó la eficacia de los flavonoides de la cáscara de los cítricos en la prevención de la hemorragia capilar y la fragilidad asociada con el escorbuto. Desde entonces, una gran cantidad de efectos biológicos han sido atribuidos a los flavonoides (Romano *et al.*, 2013).

Se ha especulado que las células responden a los fitoquímicos a través de interacciones directas con receptores o enzimas involucradas en señales de transducción. El efecto protector de los flavonoides en los sistemas biológicos se ha atribuido a su capacidad para transferir radicales libres, activar enzimas antioxidantes, reducir los radicales alfa-tocoferol e inhibir a las enzimas oxidasas, por tan solo mencionar los más importantes (Grotewold, 2006).

En general, se ha encontrado que los flavonoides son inhibidores enzimáticos. De acuerdo con los estudios realizados *in vitro*, los flavonoides inhiben de manera no específica a la catecol-O-metiltransferasa, incrementando la cantidad de catecolaminas disponibles y ocasionando una disminución de la fragilidad vascular. También, inhiben a la fosfodiesterasa, explicando, entre otras, su efecto sobre la inhibición de la agregación plaquetaria (Bruneton, 1999).

Desde el punto de vista farmacológico la literatura científica describe las propiedades antiinflamatorias, antilipídicas, antihiperlipidémicas, antivirales, hepatoprotectoras, antiulcéricas, cardioprotectoras, neuroprotectoras, antioxidantes y anticancerosas, aunque se ha encontrado que esta última depende de factores, tales como la estructura química y la concentración de los flavonoides, así como del tipo de cáncer y la sensibilidad de las células cancerosas (Romano *et al.*, 2013; Sak, 2014).

A pesar de los numerosos efectos farmacológicos descritos en el párrafo anterior, es necesario determinar la relación entre la concentración de los flavonoides con su actividad biológica para poder establecer su potencial como agentes terapéuticos; también es necesario evaluar la calidad de las plantas medicinales que los contienen para poder predecir su seguridad y eficacia (Ghasemzadeh, 2011).

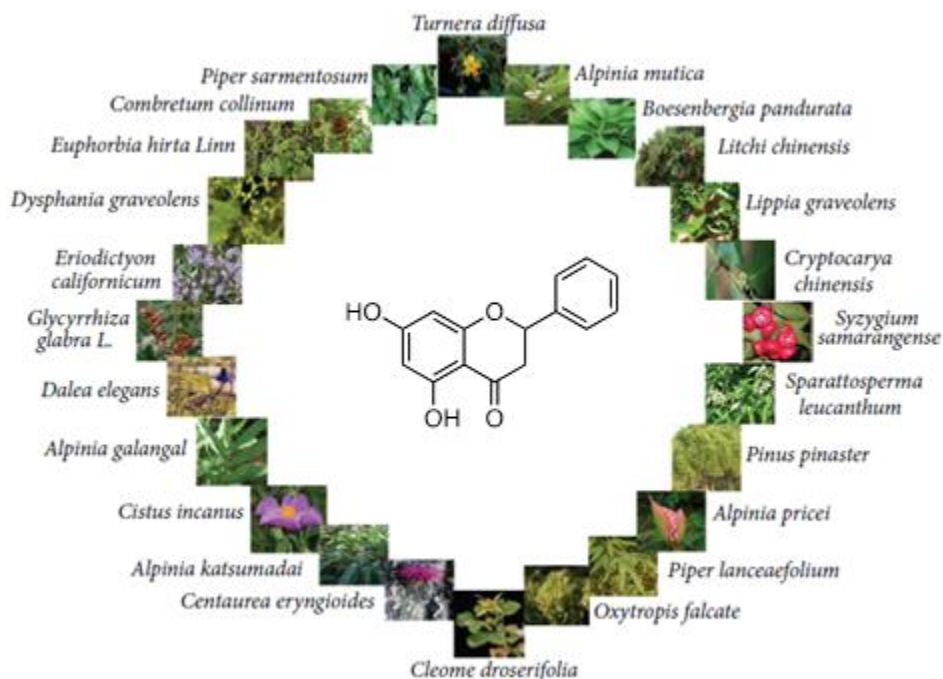
### 3.3 Pinocembrina

La pinocembrina (5,7-hidroxi-flavanona) es uno de los flavonoides con importantes efectos farmacológicos que incluyen: su actividad antiinflamatoria,

antioxidante, antimicrobiana, vasorrelajante, antimutagénica, antiagregante plaquetaria y antiangiogénica (Yan *et al.*, 2014).

Por otra parte, la pinocembrina es un compuesto bioactivo que está presente en algunos preparados herbolarios y suplementos alimenticios, particularmente aquellos elaborados con propóleo (Sayre *et al.*, 2013; Rasul *et al.*, 2013).

### 3.3.1 Fuentes naturales de pinocembrina



**Figura 3.6** Estructura y fuentes naturales de la pinocembrina (Rasul *et al.*, 2013)

La familia *Piperaceae* comprende 1950 especies agrupadas en 14 géneros. Esta familia se caracteriza por contener pinocembrina como metabolito secundario. Entre los géneros con mayor concentración de esta flavanona destacan *Peperomia* y *Piper* con 600 y 700 especies, respectivamente. También, se ha aislado de especies pertenecientes a las familias *Lauraceae* y *Asteraceae*, por ejemplo de las partes aéreas de la planta *Flourensia oolepis* (SF Blake) (Rasul *et al.*, 2013).

Finalmente, se ha descrito su presencia en la familia *Verbenaceae*, en las especies *Lippia graveolens* y *Lippia organoides*, así como en *Oxytropis falcate* y *Dalea elegans* de la familia *Fabaceae*. También se ha identificado en las especies *Alpinia mutica*, *Litchi chinensis*, *Glycyrrhiza glabra* L., *Sparattosperma leucanthum*, *Cleome droserifolia*, *Lychnophora markgravii*, *Helichrysum gymnocoum*, *Syzygium samarangense*, *Centaurea eryngioides*, *Cistus incanus*, *Turnera diffusa* y *Eriodictyon californicum* (**Figura 3.6**) (Rasul *et al.*, 2013).

La pinocembrina, presente en frutas, vegetales, nueces, semillas, hierbas, especias, té y vino tinto, se consume a través de la dieta. Adicionalmente, es considerada como el principal flavonoide encontrado en la miel y en los propóleos de diferentes regiones (Rasul *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2014).

Además de las fuentes naturales de pinocembrina, en los últimos años, se desarrolló un método biotecnológico para su producción empleando un plásmido pET de *E. coli* en el que se han incorporado genes de algunas plantas para codificar las siguientes enzimas: la fenilalanina amonía liasa (PAL) de la levadura *Rhodotorula rubra*, la 4-cumarato CoA ligasa (4CL) del actinomiceto *S. coelicolor*, la chalcona sintasa (CHS) de *Glycyrhiza echinata* y la chalcona isomerasa (CHI) de la especie *Pueraria lobata* (Rasul *et al.*, 2013).

### 3.3.2 Actividad biológica de la pinocembrina

#### 3.3.2.1 Actividad antimicrobiana

La pinocembrina es una flavanona bien reconocida por sus potentes propiedades antimicrobianas. En el 2011, Ruddock y colaboradores evaluaron el potencial antibacteriano de la pinocembrina en 26 cepas de *Neisseria gonorrhoeae*, agrupadas en 13 fenotipos. Los resultados obtenidos permitieron evidenciar que a una concentración de 32  $\mu\text{g/mL}$ , la flavona inhibió el 100% del crecimiento de la mayoría de las cepas y, a 64  $\mu\text{g/mL}$  inhibió el crecimiento de todas las cepas evaluadas (Ruddock, 2011).

También, se ha evaluado la actividad antimicrobiana de la pinocembrina en cepas de *S. aureus* resistentes a la metilicina. La CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) calculada fue de 128  $\mu\text{g/mL}$  (Alcaráz *et al.*, 2000). Finalmente, Park y colaboradores demostraron la actividad cariostática de una extracto de propóleo, cuyo componente mayoritario fue la pinocembrina, mediante la inhibición de la actividad de la enzima glucosiltransferasa de *Streptococcus mutans*.

Por otra parte, los ensayos para evaluar la actividad antifúngica de la pinocembrina revelaron que la flavanona inhibe el crecimiento de *Penicillium italicum* y *Candida albicans* con una  $\text{CI}_{50}$  (Concentración inhibitoria 50) de 100  $\mu\text{g/mL}$ . Además, se observó que también inhibe el crecimiento micelial de *P. italicum*, ocasionando un daño a la membrana celular del patógeno (Rasul *et al.*, 2013).

Por último, se sugiere que la actividad antimicrobiana de la pinocembrina puede deberse a su capacidad para ocasionar cambios en la composición de la

membrana bacteriana, induciendo la lisis celular, además de inhibir de manera considerable la actividad enzimática (Rasul *et al.*, 2013).

### 3.3.2.2 Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria de la pinocembrina ha sido demostrada por varios investigadores utilizando diversos modelos *in vivo* e *in vitro*.

Así, en un estudio de edema inducido, por la administración de sangre bovina en la extremidad de ratones, se estableció que la pinocembrina (administrada vía IP) a una dosis de 15 mg/kg redujo en un 48% el proceso inflamatorio. En otro modelo de edema inducido por la fosfolipasa A2, empleando una dosis de 80 mg/kg de pinocembrina administrada también por vía intraperitoneal, se observó una inhibición del 63% y una  $DI_{50}$  (Dosis inhibitoria 50) de 58.9 mg/kg. Asimismo, en modelos *in vivo*, empleando edemas inducidos con TPA (12-O-tetradecanoil forbol 13-acetato) en la oreja de la misma especie de animales se observó que, después de la administración de pinocembrina en el sitio afectado por vía tópica, en intervalos de dosificación de 15 a 500  $\mu\text{g}/\text{oreja}$ , se redujo el edema inducido de manera significativa. La  $DI_{50}$  calculada (61  $\mu\text{g}/\text{oreja}$ ) fue menor a la de la indometacina empleada como control positivo ( $DI_{50}$  125  $\mu\text{g}/\text{oreja}$ ) y el efecto observado fue dosis-dependiente.

Por último, en otro modelo *in vivo* donde se indujo un proceso inflamatorio en la oreja del ratón mediante la aplicación continua de TPA se evaluó el efecto sobre algunas respuestas inmunológicas. El ensayo permitió evidenciar que la administración de pinocembrina, a una dosis de 0.5 mg vía tópica reduce la infiltración de neutrófilos. Además, se observó en un modelo *in vitro* que el flavonoide, a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , suprime la producción de leucotrienos B4, ya que no estimula el metabolismo del ácido araquidónico. De acuerdo con los resultados obtenidos los autores concluyen que la pinocembrina es capaz de regular la respuesta alérgica a nivel celular (Sala *et al.*, 2003).

### 3.3.2.3 Actividad anticancerosa

A pesar de que varios estudios revelan la capacidad de la pinocembrina para inhibir, retrasar, bloquear o revertir el inicio de la carcinogénesis, la prevención de esta enfermedad requiere del empleo de otros factores (Rasul *et al.*, 2013).

En este sentido, la pinocembrina ha mostrado actividad citotóxica contra la línea celular HCT116 (carcinoma colorrectal) incrementando la actividad de las caspasas 3 y 9. Las  $CI_{50}$  calculadas para esta línea celular oscilan entre los 26.33 y los 143.09  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La pinocembrina también es activa sobre la línea HT-29 (cáncer de colon), reportando valores de  $CI_{50}$  entre 0.41 y 3.49  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , y la HL-60 (leucemia)

con  $CI_{50}$  menores a  $0.10 \mu\text{g/mL}$ . En esta última línea celular se encontró que la flavanona también aumenta la actividad de las caspasas 3, 8 y 9 (Rasul *et al.*, 2013).

Los estudios realizados hasta la fecha permiten concluir que la pinocembrina induce la apoptosis en varios tipos de células cancerosas sin embargo, los mecanismos de acción aún no han sido elucidados.

Finalmente, se ha encontrado que la pinocembrina presenta un efecto protector sobre la hepatocarcinogénesis inducida (Rasul *et al.*, 2013).

### 3.3.2.4 Actividad neuroprotectora

De acuerdo con la literatura científica la pinocembrina tiene un papel importante en la prevención y el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, el Parkinson y otras disfunciones neuronales. Actualmente, es considerada como un agente terapéutico novedoso para reducir el daño causado por la isquemia cerebral (Yan *et al.*, 2014).

En un estudio reciente conducente a evaluar el efecto de la pinocembrina en un cuadro de isquemia cerebral global/reperfusión y oclusión en ratas se demostró que la flavanona mejoró la actividad respiratoria cerebral a través de un aumento en las velocidades del índice de la respiración y de la fosforilación oxidativa por  $\text{NADH/FADH}_2$  en la cadena respiratoria. Asimismo, la pinocembrina aumentó el contenido de ATP en la mitocondria cerebral de acuerdo con un modelo *in vitro* con células SH-5Y5Y. Estos efectos pueden ser atribuidos a una disminución en la liberación de LDH, de especies reactivas de oxígeno, y de la óxido nítrico sintasa (Liu *et al.*, 2008; Guang *et al.*, 2006; Rasul *et al.*, 2013).

En otro estudio realizado por Meng y colaboradores (2011) se evaluó el efecto protector del flavonoide sobre el deterioro de la barrera sanguínea cerebral; una de las principales consecuencias de la isquemia cerebral. Esta prueba se fundamenta en la cuantificación del colorante Azul de Evans y la fluoresceína sódica en el tejido cerebral. El ensayo permitió evidenciar que la pinocembrina reduce la concentración de ambas sustancias en dicho tejido, debido a una disminución en la permeabilidad de la barrera sanguínea cerebral. También, se encontró que reduce los daños ultraestructurales producidos en los microvasos cerebrales y en las neuronas. Asimismo, durante este estudio, se evidenció que la pinocembrina aumenta el flujo sanguíneo cerebral mejorando, en cierta medida, el daño de la barrera sanguínea cerebral inducido por el modelo experimental. Por último, se realizó un ensayo para medir el puntaje neurológico en ratas, el cual muestra el grado de los déficits neurológicos generados; los hallazgos demostraron que la

pinocembrina disminuye los puntajes neurológicos ocasionando con ello una mejora en el proceso cognitivo.

### 3.3.2.5 Actividad antiangiogénica

En un trabajo realizado por Ahn y colaboradores (2009) se demostró la actividad antiangiogénica de la pinocembrina en un modelo *in vitro*. Para ello, se indujo la formación de tubos capilares en un gel de colágena tipo I y se observó que este flavonoide, a una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , tiene efectos inhibitorios en la formación de los túbulos de células endoteliales. Sin embargo, esta actividad no mostró correlación con su capacidad antioxidante.

### 3.3.2.6 Actividad vasorrelajante

Calderone y colaboradores (2004) evaluaron la actividad vasorrelajante de la pinocembrina en aorta aislada de rata. Los resultados observados indicaron una respuesta vasodilatadora máxima de  $88 \pm 12$  por ciento sobre las contracciones inducidas con KCl 20 mM y un nivel de potencia ( $p\text{Cl}_{50}$ ) de  $4.80 \pm 0.09$ . Además, se demostró que el mecanismo del efecto vasorrelajante de la flavanona no está involucrado con el canal  $K_{\text{ATP}}$ ; estos experimentos se realizaron empleando un bloqueador no selectivo como el cloruro de tetraetilamonio (TEA) 10 mM y un bloqueador selectivo como la glibenclamida 1  $\mu\text{M}$ .

### 3.3.2.7 Actividad como antiagregante plaquetario

La pinocembrina, a una concentración de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , presentó un efecto inhibitorio en la agregación plaquetaria de sangre total humana en dos modelos *in vitro*: el primero induciendo la agregación plaquetaria con ácido araquidónico 0.5 mM y el segundo con ADP (adenosin difosfato) 10  $\mu\text{M}$ . Los porcentajes de inhibición encontrados fueron de 100.0% y  $78.6 \pm 0.7\%$ , respectivamente (Jantan *et al.*, 2008).

### 3.3.2.8 Actividad antimutagénica

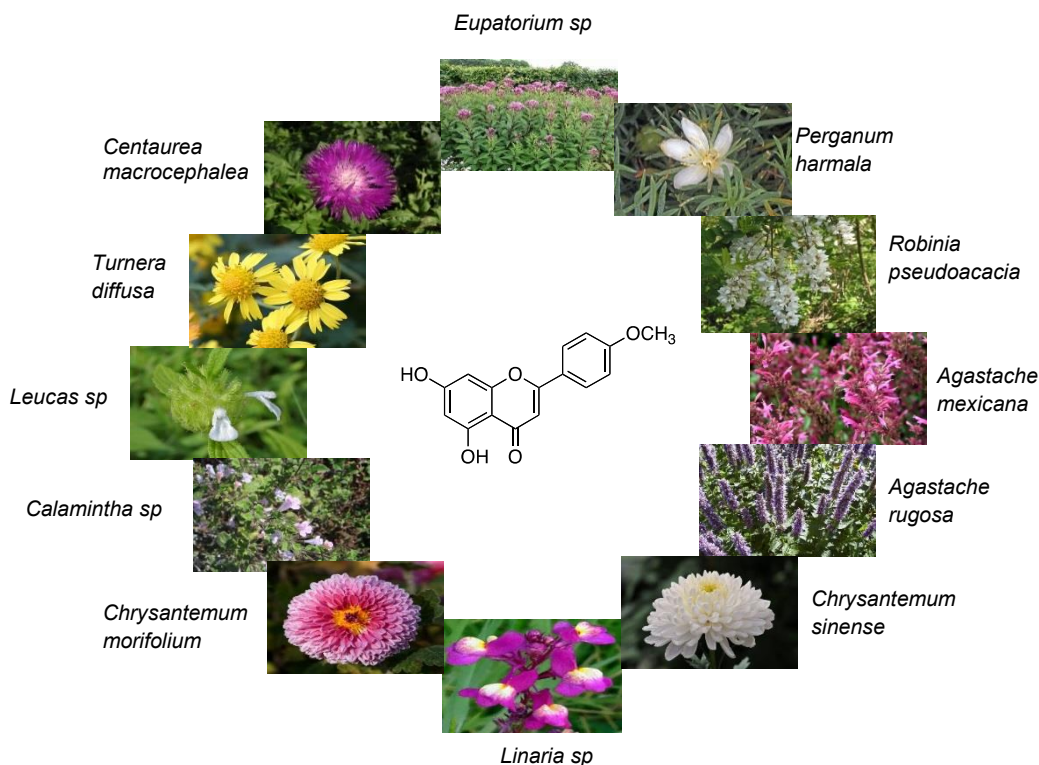
La actividad antimutagénica de la pinocembrina se evaluó empleando una cepa de *Euglena gracilis* Z con una mutagénesis inducida por ofloxacino. Los resultados generados indican que la pinocembrina, a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ , posee una actividad antimutagénica significativa. El efecto se midió calculando la potencia antimutagénica de la flavanona con respecto a la mutagenicidad inducida por el ofloxacino en concentraciones de 43 y 86  $\mu\text{M}$ ; los porcentajes de inhibición calculados fueron de  $56.43 \pm 14$  y  $32.53 \pm 22$  por ciento, respectivamente (Križková *et al.*, 1998).



### 3.4 Acacetina

La acacetina (4'-metoxi-5,7-dihidroxi-flavona) es un flavonoide de tipo flavona que ha sido aislado e identificado en varias especies vegetales (**Figura 3.7**), también ha sido objeto de diversos estudios científicos en los que se ha demostrado que posee algunos efectos farmacológicos, destacando su actividad anticancerosa.

#### 3.4.1 Fuentes naturales de acacetina



**Figura 3.7** Estructura y fuentes naturales de la acacetina

Dentro de la familia *Lamiaceae*, la acacetina ha sido identificada en algunas especies del género *Leucas*, en *A. mexicana* y *A. rugosa* del género *Agastache*. También, ha sido aislada de *Clerodendrum inerme* y de la parte aérea de *Ziziphora clinopodioides*, además, es considerada como uno de los marcadores del género *Calamintha* (**Figura 3.7**) (Carballo-Villalobos *et al.*, 2014; González-Trujano *et al.*, 2012; Monforte *et al.*, 2012; Zielińska y Matkowski, 2014).

En la familia *Asteraceae*, se ha descrito su presencia en especies del género *Eupatorium*; en las flores de dos especies del género *Chrysanthemum*: *C. morifolium* Ramat y *C. sinense* y en *Centaurea macrocephala*. Además, ha sido aislada de dos especies del género *Artemisia*: *A. vestitia* y *A. agra*, especies

utilizadas contra el agente causal de la malaria (Kraft *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2010; Wollenweber, 1991; Yin *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008).

Por último, se ha identificado en *Robinia pseudoacacia*, *Turnera diffusa*, *Peganum harmala*, *Scoparia dulcis* y en algunas especies de los géneros *Alnus* y *Linaria*, también ha sido aislada de *Anoda crisata* (Juárez-Reyes *et al.*, 2015; Mishra *et al.*, 2011; Sharaf, 1996; Smirnova *et al.*, 1975). La acacetina es uno de los flavonoides que se encuentran con mayor frecuencia y en altas concentraciones en los propóleos (Bankova, 2000).

Estudios recientes han logrado producir acacetina por un proceso de semisíntesis partiendo del flavonoide diosmina (Quintin y Lewin, 2004). En el 2011 Pandurangan reportó un método para su síntesis por transformación de Baker-Venkataram.

### 3.4.2 Actividad biológica de la acacetina

#### 3.4.2.1 Actividad anticancerosa

Diversos grupos de investigación han evaluado el efecto antiproliferativo de la acacetina sobre algunas líneas celulares cancerosas. En las células HepG2 (cáncer hepático humano) presentó un efecto máximo inhibitorio del 72%, a una concentración de 20  $\mu\text{g/mL}$ , durante un tiempo de exposición de 48 h. La  $\text{CI}_{50}$  calculada fue de 10.44  $\mu\text{g/mL}$ . De acuerdo con el análisis celular por citometría de flujo, el tratamiento durante 48 h empleando concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{g/mL}$ , propició un incremento en la fase celular G1 del 31.1% al 61.6% y del 31.1% al 76.5%, respectivamente. También, se observó bajo las mismas condiciones de ensayo un incremento de 4 y 8 veces más el número de células apoptóticas; debido probablemente al aumento en la producción de la proteína proapoptótica Bax.

En las células A549 (carcinoma humano pulmonar), la acacetina, mostró un efecto antiproliferativo dosis-dependiente con una  $\text{CI}_{50}$  de 9.46  $\mu\text{M}$ . De nueva cuenta, el análisis del ciclo celular a las concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{M}$ , ocasionó un incremento del 34.7% al 42.6% y al 61.2% de células en la fase G1, respectivamente. A la concentración 5  $\mu\text{M}$  las células apoptóticas aumentaron 3.2 veces su cantidad mientras que, a una concentración 10  $\mu\text{M}$  aumentaron 8.1 veces después de 48 h de tratamiento. Además, se encontró que la acacetina tiene un efecto antimetastásico en esta línea celular inducido con TPA (Jaganathan y Mandal, 2009).

Por otra parte, en el 2009 Szliszka y colaboradores evaluaron el efecto citotóxico de la acacetina en la línea celular HeLa (cáncer cervical humano). Los autores emplearon una concentración de 50  $\mu\text{M}$  y un tiempo de exposición de 48 h. El porcentaje de citotoxicidad obtenido fue menor al 15%. Sin embargo, se observó que esta flavona es capaz de inducir, una vez más, la apoptosis por diferentes rutas como: la activación de la cascada de las caspasas, la generación de especies reactivas de oxígeno y la señalización de muerte celular mediada por la mitocondria.

En la línea celular AG5 (carcinoma gástrico humano) se demostró que la acacetina inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis de una manera dependiente de la concentración y del tiempo de exposición; en el estudio también se encontró que la acacetina indujo la apoptosis de las células a través de la activación de la caspasa 3 y la regulación de las proteínas Bax y p53 (Pan *et al.*, 2005).

En el 2012, Watanabe y su grupo investigaron el efecto de la acacetina en células Jurkat, provenientes de los linfocitos T de un paciente con leucemia. Los autores encontraron un efecto inhibitorio de la proliferación celular mediante la inducción de la apoptosis a través de las caspasas 3, 8 y 9 de manera dependiente de la concentración.

Por último, se ha demostrado que la acacetina puede inhibir la invasión y la migración de las células DU-145 (cáncer de próstata humano antimetastásico) (Shen *et al.*, 2010).

#### 3.4.2.2 Actividad neuroprotectora

En el 2010 Lin y colaboradores (2010) realizaron un estudio para determinar el efecto de la acacetina sobre un modelo de neurotoxicidad *in vivo*; el daño neurológico en ratas fue inducido mediante la administración de ácido kaínico. Los resultados obtenidos indicaron que a una dosis de 50 mg/kg, la acacetina, inhibió la liberación del glutamato en los sinaptosomas del hipocampo previniendo la excitotoxicidad, un proceso por el cual las neuronas son dañadas y destruidas por la sobreactivación de receptores de glutamato; el exceso de glutamato ocasiona daño neuronal y está asociado con enfermedades neurológicas.

Para demostrar que la acacetina protege las neuronas dopaminérgicas se empleó un modelo en el que se administró a las ratas una dosis de 10 mg/kg (VO) previa administración del agente neuroinflamatorio 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina. Además de disminuir la degradación de las neuronas dopaminérgicas, se observó que la acacetina inhibe la producción de algunos factores proinflamatorios de manera dosis-dependiente. Debido a su acción antiinflamatoria, la acacetina podría servir como un agente para disminuir la

neurotoxicidad generada en la enfermedad de Parkinson, ya que uno de sus mecanismos patológicos es la neuroinflamación (Kim *et al.*, 2012).

### 3.4.2.3 Actividad antiinflamatoria y antinociceptiva

Se demostró que la acacetina tiene un efecto antinociceptivo y antiinflamatorio a través de un modelo en el que se empleó formalina para inducir el edema. El pretratamiento con la flavona inhibió parcialmente la formación del edema en una forma dosis-dependiente. Los resultados obtenidos permitieron concluir que los receptores 5HT<sub>1A</sub>, GABA/BZDs y los opioides están involucrados en el mecanismo de acción (Carballo-Villalobos *et al.*, 2014)

### 3.4.2.4 Actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora

La hipersensibilidad de tipo retardada o tipo 4 es una reacción inmune mediada por células T, las cuales juegan un papel esencial en la patogénesis y cronicidad de varios desórdenes inflamatorios debido a la producción de citosinas proinflamatorias. Para determinar el efecto inmunosupresor de la acacetina sobre la proliferación y activación de linfocitos T se empleó como inductor de la proliferación el mitógeno ConA (concaivalina A) en un modelo *in vitro*. Los resultados indicaron que la flavona inhibe la proliferación de linfocitos T con una IC<sub>50</sub> mayor a 10  $\mu$ M (Yin *et al.*, 2008).

En concordancia con estos resultados la acacetina podría contribuir al tratamiento de enfermedades relacionadas con reacciones de hipersensibilidad tipo 4 o tardía, tales como la esclerosis múltiple, el reumatismo y la artritis, entre otras.

### 3.4.2.5 Actividad hepatoprotectora y cardioprotectora

En un trabajo realizado por Cho y colaboradores (2014) se demostró que la acacetina fue el flavonoide más activo, como agente hepatoprotector, de la especie *Agastache rugosa*. Para demostrar este efecto se utilizó un modelo *in vivo* en donde se indujo una lesión hepática aguda, clínicamente similar a una falla hepática fulminante, mediante la administración de lipopolisacáridos con D-galactosamina sintetizada (GAIN/LPS). La administración de estas sustancias ocasiona la sobreexpresión de TLR4, estimulando la respuesta inflamatoria y provocando de esta manera la lesión hepática. Los resultados obtenidos revelaron que el pretratamiento con acacetina, a las dosis de 25, 50 y 100 mg/kg, disminuyó la mortalidad de los animales de manera dosis-dependiente; es decir a la dosis más alta la tasa de supervivencia fue del 80%. Como marcador del daño hepatocelular se cuantificaron los niveles de la enzima alanina aminotransferasa; los resultados obtenidos indicaron que al inducir el daño hepático la enzima aumentó de  $49.6 \pm 9.9$  U/L a  $618.4 \pm 43.7$  U/L su concentración. Sin embargo, el

aumento no fue tan grande en los grupos pretratados con acacetina, en donde, a una dosis de 100 mg/kg los niveles de la enzima fueron de  $361.3 \pm 48.1$  U/L. Finalmente, el efecto protector de la acacetina se confirmó mediante análisis histológicos observándose una disminución de la inflamación y de la necrosis hepática. También, la acacetina disminuyó los niveles de TFN- $\alpha$ , molécula asociada al proceso inflamatorio, y aumentó los niveles de IL-6; una citocina que puede actuar como proinflamatoria o antiinflamatoria para mantener la homeostasis y es esencial para la regeneración hepática.

Por otro lado, el estudio realizado por Monforte y colaboradores en el 2012 evidenció que la acacetina protege a los cardiomiocitos neonatales inducidos a estrés por hipoxia/reoxigenación, debido a la reducción de la peroxidación de lípidos y a su actividad antioxidante. A las dosis de 5, 10 y 25  $\mu\text{g/mL}$ , la acacetina disminuyó significativamente el contenido de malondialdehído en la lesión inducida por el modelo.

Por último, en el mismo estudio descrito en la sección **3.3.2.6** se determinó el efecto vasorrelajante de la acacetina obteniéndose una potencia ( $\text{pIC}_{50}$ ) de  $4.99 \pm 0.08$  y una respuesta máxima vasodilatadora de  $81 \pm 10$  por ciento (Calderone *et al.*, 2004).

#### **3.4.2.6 Actividad antiplasmódica y antiviral**

El potencial antipalúdico de la acacetina se evaluó utilizando dos cepas de *Plasmodium falciparum*, agente etiológico de la malaria, en un modelo *in vitro*. La  $\text{CI}_{50}$  calculada fue de 5.5  $\mu\text{g/mL}$  para la cepa sensible a la cloroquina y de 12.6  $\mu\text{g/mL}$  en la cepa resistente al mismo fármaco (Kraft *et al.*, 2003).

La actividad antiviral de la flavona se evaluó contra el virus del herpes simple tipo 1 (VSH-1). El tratamiento realizado en un modelo *in vitro* permitió determinar que la acacetina inhibe la replicación del virus de manera dosis-dependiente; el mecanismo de acción es selectivo debido a que inhibe la síntesis de proteínas en las células infectadas por el virus, pero no en las células normales (Hayashi *et al.*, 1993).

#### **3.4.2.7 Actividad hipoglicémica e hipouricémica**

El potencial antidiabético de la acacetina se evaluó mediante un modelo *in vivo* con ratones normoglucémicos y diabéticos. El modelo de diabetes mellitus tipo II empleado involucra la administración (IP) de 30 mg/kg de estreptozotocina y 50 mg/kg de nicotinamida. La flavona ocasionó una disminución en los niveles de glucosa sanguínea en ambas condiciones, siendo más significativa, en los ratones hiperglicémicos a las dosis de 3, 10 y 31.6 mg/kg; esta actividad se puede deber a

la capacidad que tiene la acacetina de inhibir las enzimas  $\alpha$ -glicosidasas (Juárez-Reyes *et al.*, 2015).

Por otra parte, en un modelo animal inducido con hiperuricemia se observó que la acacetina administrada por vía oral, a las dosis de 10 mg/kg y 50 mg/kg, redujo el nivel de ácido úrico en un 49.9% y 63.9%, respectivamente. Las mismas dosis fueron administradas por vía intraperitoneal obteniendo una reducción sérica del 63% y 95% en los niveles de ácido úrico. Por último, se demostró que la acacetina inhibe a la enzima xantina oxidasa con una  $CI_{50}$  de 2.22  $\mu$ M; mecanismo al cual puede deberse su actividad hipouricémica (Nguyen *et al.*, 2005).

### 3.5 Absorción de fármacos

A pesar de las innovaciones en los métodos de liberación de fármacos, la vía oral, sigue siendo la ruta más utilizada para administrar los fármacos debido a su bajo costo de producción y la gran aceptación que tiene por los pacientes. Se estima que cerca del 80% de los medicamentos son administrados por esta vía (Balimane *et al.*, 2000).

Uno de los pre-requisitos para que un fármaco, administrado de forma oral, presente un efecto sistémico es su absorción en el tracto gastrointestinal (Blaser, 2007). Este proceso implica generalmente, el paso del fármaco desde el tracto gastrointestinal, a través de una barrera fisiológica, hacia la circulación sanguínea. Para que este fenómeno ocurra el fármaco debe liberarse de la forma farmacéutica y disolverse en los fluidos fisiológicos (Herrera *et al.*, 2012). Así, la absorción de un compuesto depende principalmente de dos parámetros: la solubilidad y la permeabilidad gastrointestinal; factores críticos que determinan la biodisponibilidad *in vivo* (Russel, 2010).

Por otra parte, los fármacos que son administrados vía oral deben presentar propiedades compatibles con esta vía. Factores importantes que se deben tomar en cuenta son: la acidez del estómago y las enzimas que pueden metabolizar a los fármacos en la membrana intestinal para facilitar su eliminación. Ambas situaciones son consideradas como el primer obstáculo en el proceso de absorción (Blaser, 2007; Avdeef, 2003) debido a la degradación del fármaco. El tiempo de tránsito, el pH y el nivel de expresión de transportadores y enzimas son variables en el tracto gastrointestinal que, junto con las propiedades del fármaco, determinan la solubilidad, la penetrabilidad y la afinidad a los transportadores y enzimas (Hellinger y Vastag, 2011).

En la **Tabla 3.1** se resumen algunas de las características del tracto gastrointestinal que son relevantes en el proceso de absorción. Como se deduce de la información presentada, el pH varía desde 1 hasta 7.5 influyendo en la solubilidad de moléculas ionizables. Asimismo, el área superficial disponible para la absorción es mayor en el yeyuno y el íleon con más del 98% del área total (Avdeef, 2003).

**Tabla 3.1** Parámetros biológicos y fisicoquímicos del tracto gastrointestinal humano (Balimane *et al.*, 2000)

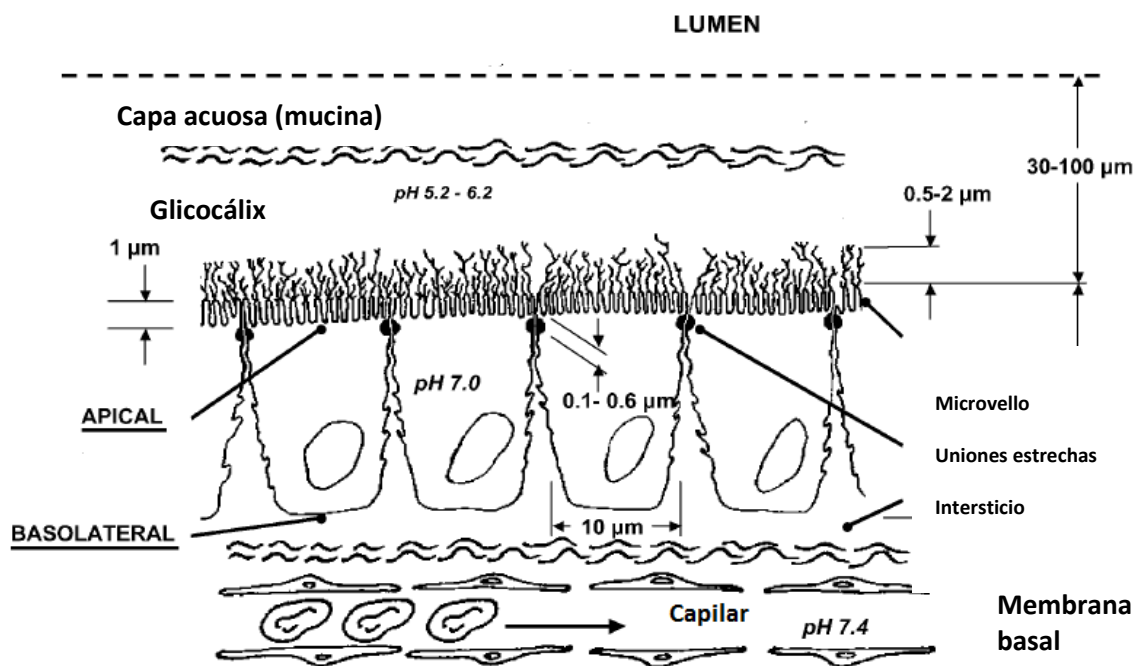
Segmento gastrointestinal	Área superficial (m <sup>2</sup> )	Longitud (cm)	Tiempo de residencia	pH
Cavidad oral	0.01 m <sup>2</sup>		Segundos a minutos	6.5
Esófago	0.02 m <sup>2</sup>	23-25	Segundos	
Estómago	3.5 m <sup>2</sup>	25	1.5 h	1-2
Duodeno	1.9 m <sup>2</sup>	35	0.5-0.75 h	4.0-5.5
Yeyuno	184 m <sup>2</sup>	280	1.5-2 h	5.5-7.0
Íleon	276 m <sup>2</sup>	420	5-7 h	7.0-7.5
Colon y recto	1.3 m <sup>2</sup>	150	1-60 h	7.0-7.5

La pared del intestino delgado consta de 4 capas: serosa, muscular, submucosa y mucosa. Esta última se encuentra en contacto con el lumen intestinal y su estructura constituye una enorme amplificación de la superficie debido a los pliegues circulares, también conocidos como válvulas de Kerckring, que rodean el interior de la luz intestinal e incrementan 3 veces el área superficial del intestino delgado. La superficie de estos pliegues circulares está recubierta por vellosidades, pequeñas prolongaciones de la mucosa de 1 mm, que están cubiertas por una capa de epitelio y son responsables de aumentar 30 veces el área superficial. Finalmente, los bordes libres de las células epiteliales contienen numerosas microvellosidades que forman un borde de cepillo, las cuales incrementan el área superficial 600 veces. En consecuencia, la absorción de un fármaco administrado por vía oral ocurre principalmente en el intestino delgado (Avdeef, 2003; Balimane *et al.*, 2000; Segarra, 2006).

Asimismo, la mucosa es la capa en donde se lleva a cabo la absorción y, a su vez, está constituida por tres capas: la mucosa muscularis, la lámina propia y las células epiteliales. La mucosa muscularis es una lámina de músculo uniforme y se encuentra en la unión entre la mucosa y la submucosa. La lámina propia es un tejido conectivo dentro de las vellosidades y provee soporte estructural a la capa de células epiteliales; esta estructura, a través de sus capilares, aporta nutrimentos a los enterocitos y permite el transporte de las sustancias absorbidas hacia la circulación sistémica. La capa de células epiteliales es considerada la

barrera más significativa para la absorción, ya que constituye una monocapa formada a partir de células que proliferan y migran a lo largo del eje cripta-villus, unidad funcional del epitelio intestinal (Herrera *et al.*, 2012; Segarra, 2006).

Además de las células madre, la monocapa está formada por cuatro tipos de células diferenciadas: las células de Paneth, las células epiteliales columnares o enterocitos, las células de goblet y las células enteroendócrinas. Las células de Paneth se encuentran en la parte más profunda de las criptas del intestino delgado y, principalmente, se encargan de sintetizar y secretar proteínas. Por su parte, las células de goblet, también llamadas calciformes, secretan mucina, mientras que las enteroendócrinas se localizan en la profundidad de las glándulas intestinales y secretan serotonina. Finalmente, los enterocitos constituyen el grupo celular más abundante de la monocapa (con un porcentaje del 80 al 90%) y su principal función es llevar a cabo el proceso de absorción; éstos se encuentran polarizados por las diferencias entre su membrana apical y basolateral (**Figura 3.8**). La membrana apical es la que presenta las microvellosidades, cuya superficie está recubierta por el glicocáliz (glicoproteínas sobresalientes del fluido luminal con carga negativa) el cual es recubierto por una capa de mucina. La capa de mucina se compone de un oligosacárido de alto peso molecular que es rico en residuos de ácido salicílico (**Figura 3.8**). El glicocáliz y la capa de mucina conforman una capa acuosa entre 30 y 100  $\mu\text{m}$  y se ha encontrado que puede retrasar la difusión de fármacos lipofílicos (Avdeef, 2003; Balimane *et al.*, 2000; McCracken y Lorenz, 2001; Segarra, 2006).



**Figura 3.8** Características de las células epiteliales (Avdeef, 2003)



### 3.5.1 Transporte de fármacos a través de membranas

Una de las características más importantes que tienen los fármacos para transportarse y distribuirse en el cuerpo humano es la capacidad de atravesar las membranas biológicas. El transporte a través de las membranas celulares se lleva a cabo principalmente por tres mecanismos: difusión transcelular, difusión paracelular y transporte mediado por un acarreador; aunque también se ha descrito la endocitosis como uno de ellos (Blaser, 2007).

Las propiedades más importantes de un fármaco que influyen en su difusión a través de las membranas biológicas son la lipofilidad, la estructura química, la naturaleza ácida o básica, la capacidad para formar puentes de hidrógeno, la carga y el tamaño o peso molecular. En general, se ha observado que los compuestos lipofílicos se absorben por difusión pasiva, mientras que los hidrofílicos se absorben a través de un acarreador y algunos compuestos pequeños pueden ser transportados a través de las uniones paracelulares (Blaser, 2007).

#### 3.5.1.1 Transporte pasivo transcelular

La difusión pasiva transcelular, a través de la membrana, es considerada como el principal mecanismo de absorción intestinal *in vivo* para fármacos. Las células epiteliales poseen una membrana apical distinta a la membrana basolateral (están polarizadas) debido a que están compuestas por diferentes lípidos y proteínas. Por consiguiente, presentan diferentes características para su permeabilidad. De manera general, se ha observado que la membrana apical contiene menos esfingolípidos que la basolateral (Blaser, 2007).

La naturaleza lipídica de la membrana celular restringe el transporte de iones y moléculas hidrofílicas pero permite que los fármacos lipofílicos sean capaces de atravesar las bicapas lipídicas de las membranas celulares. El transporte pasivo transcelular inicia cuando el soluto penetra en la membrana apical y se difunde a través del citoplasma. Si el soluto es muy lipofílico el transporte a través de la célula involucra una difusión lateral en la bicapa lipídica. Finalmente, la molécula sale de la célula a través de la membrana basolateral. La difusión de moléculas pequeñas a través del citoplasma es un proceso rápido, por lo que, en este mecanismo de transporte, la velocidad está determinada por la difusión a través de la membrana apical. Aunque la difusión transcelular está descrita para moléculas lipofílicas de tamaño moderado, numerosos estudios indican que la mayoría de los fármacos con alta permeabilidad se transportan atravesando las membranas de manera pasiva (Blaser, 2007).

Por otra parte y de acuerdo con la teoría del reparto en función pH, se sabe que solo las moléculas sin carga o no ionizadas podrán penetrar a través de la membrana; si una molécula se encuentra ionizada su transporte se altera, sin embargo, no se detiene por completo. Asimismo, entre mayor sea el tamaño molecular, la difusión disminuye, y entre mayor número de hidrógenos presente la molécula, la penetración a través de la membrana decrece (Hellinger y Vastag, 2012; Stenberg *et al.*, 2002).

Este tipo de transporte se lleva a cabo por difusión pasiva, por lo que la dirección de transferencia de masa depende del gradiente de concentración en ambos lados de la membrana. Además, presenta una cinética no saturable y no requiere de energía metabólica. El transporte pasivo está determinado por la primera Ley de Fick:

$$\frac{dm}{Adt} = P_m (C_e - C_i)$$

Donde  $dm/Adt$  es el flujo por unidad de área,  $P_m$  es la constante de permeabilidad, y  $C_e$  y  $C_i$  son las concentraciones respectivas en los compartimentos exterior e interior (Herrera, *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2008).

### 3.5.1.2 Transporte pasivo paracelular

Los enterocitos se agrupan entre sí por medio de cargas negativas formando uniones estrechas; el paso de los compuestos a través del espacio intercelular que existe entre los enterocitos se conoce como transporte paracelular. Las dimensiones del espacio paracelular generalmente miden entre 10 y 50 Å. Se ha calculado que el área superficial para el transporte intestinal paracelular es aproximadamente del 0.01% del área total de la membrana del intestino delgado, siendo una restricción para que ocurra este tipo de transporte (Blaser, 2007; Lennernäs, 2007).

La difusión transcelular de compuestos hidrofílicos está restringida o depende del pka de cada molécula y del pH fisiológico. Su absorción, entonces, puede llevarse a cabo de la misma manera que la filtración del agua a través de los espacios paracelulares, si se trata de moléculas pequeñas (<200 Da) (Blaser, 2007). De la misma manera que el transporte transcelular, el paracelular se lleva a cabo por una difusión pasiva.

De acuerdo con estudios realizados *in vitro* la vía paracelular es una importante vía para la absorción intestinal de varios fármacos hidrofílicos con un tamaño reducido (<200 Da). Sin embargo, estudios *in vivo* revelaron que este tipo de

transporte representa una contribución minoritaria para la absorción intestinal de fármacos (Blaser, 2007; Lennernäs, 2007).

### 3.5.1.3 Transporte mediado por acarreadores

Los enterocitos presentan proteínas que están embebidas en sus membranas celulares apicales y basolaterales, siendo las primeras las que presentan un mayor número de transportadores debido a las microvellosidades que aumentan el área superficial. La función fisiológica de algunas de estas proteínas es extraer del lumen intestinal nutrientes, vitaminas y otros compuestos esenciales para la vida, o bien, evitar la entrada de sustratos tóxicos a la circulación sistémica y facilitar su excreción (Blaser, 2007).

Dentro de las características más notables del transporte mediado por acarreadores se encuentran: la especificidad hacia el sustrato, la saturabilidad y la variabilidad en la expresión de los transportadores entre diferentes regiones del tracto gastrointestinal. Los fármacos que se transportan por este mecanismo deben presentar gran afinidad hacia las proteínas transportadoras intestinales. Por lo tanto, está limitado a los fármacos cuya estructura es similar a los sustratos naturales como los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, los inhibidores de la ECA (enzima convertidora de angiotensina) y los análogos de fosfato. Por otra parte, la saturabilidad se presenta cuando existen grandes concentraciones de sustrato (Blaser, 2007; Lennernäs, 2007; Stenberg *et al.*, 2002).

Dependiendo de la dirección y el número de solutos el transporte regulado por acarreadores se puede clasificar en: uniporte, simporte y antiporte. El uniporte es cuando se transporta un soluto; en el simporte se facilita el transporte de dos solutos en la misma dirección y, en el antiporte se facilita el transporte de dos solutos con direcciones opuestas (Cao *et al.*, 2008).

De acuerdo con el gradiente de concentración de los solutos y con la energía involucrada en el proceso, el transporte mediado por acarreadores también se puede clasificar en difusión facilitada y en transporte activo. La difusión facilitada es un proceso que no requiere energía y la dirección del transporte depende del gradiente de concentración de los solutos (similar a la difusión pasiva). Por otra parte, en el transporte activo las moléculas son transportadas en contra de un gradiente de concentración eléctrico o químico; presenta una cinética saturable y requiere energía. El transporte activo involucra la formación de un complejo formado por la unión reversible del sustrato y la proteína acarreadora, este complejo se une a un sitio específico y ocasiona un cambio conformacional que permite traslocar a la molécula hacia el otro lado de la membrana; además el

transporte del fármaco puede ser inhibido competitivamente por otros sustratos (Cao *et al.*, 2008; Tavelin *et al.*, 2002).

### 3.5.1.3.1 Transportadores o acarreadores

De manera general, las proteínas transportadoras que tienen un papel importante en la absorción de fármacos se clasifican en dos grupos importantes: los acarreadores de soluto (SLC) y ABC (ATP-binding cassette). A pesar de que estos transportadores se expresan principalmente en el intestino, el hígado y el riñón, también se distribuyen ampliamente en todo el cuerpo (Russel, 2010).

Por otra parte, dependiendo de la dirección en la que las proteínas acarreadoras traslocan al sustrato a través de la membrana celular, se pueden dividir en transportadores de influjo o de eflujo. Los acarreadores ABC son, por definición, transportadores de eflujo debido a que usan energía derivada de la hidrólisis de ATP para mediar la exportación de fármacos del medio intracelular al extracelular, limitando su proceso de absorción. En cambio, los acarreadores SLC facilitan la captura de sustratos o el influjo, ya sea por difusión facilitada a través de un gradiente electroquímico por medio de un proceso uniporte, o bien, por un transporte activo acoplado a un proceso simporte o antiporte. Sin embargo, algunos transportadores SLC presentan propiedades de eflujo o pueden ser bidireccionales, dependiendo de los gradientes de concentración de los sustratos (Blaser, 2007; Russel, 2010).

- **Transportadores de influjo**

Se han identificado un gran número de transportadores de tipo SLC en el borde del cepillo de la membrana de los enterocitos humanos, incluyendo el PEPT1 (transportador di-tripéptido), el OATP1A2, el OATP2B1 (OATP: polipeptido transportador de aniones orgánicos), el OCTN1 y el OCTN2 (OCT: transportador de cationes orgánicos), cuyo nivel de expresión varía a lo largo del tracto intestinal.

El PEPT1 se expresa predominantemente en el intestino delgado y reconoce a varios fármacos de tipo peptídico, por ejemplo los antibacterianos  $\beta$ -lactámicos y los inhibidores de la ECA. Además, ha sido usado para mejorar la biodisponibilidad de fármacos poco absorbidos a través de un profármaco afín al transportador.

Por otra parte, el transporte de fármacos catiónicos del lumen intestinal es mediado por OCTN1 y OCTN2, los cuales obtienen energía a través del intercambio catión-catión. Sin embargo, existen OCTNs que se localizan en la membrana basolateral y regulan el transporte de la circulación sanguínea al

enterocito y en éste, por medio de transportadores de eflujo, se regresa la molécula al lumen intestinal.

Finalmente, los OATP1A2 y OATP2B1 son responsables del transporte de una gran cantidad de fármacos anfipáticos (Rusel, 2010).

- **Transportadores de eflujo**

Los transportadores de eflujo del grupo ABC como la P-gp (glicoproteína P), el MRP2 (proteína asociada a la resistencia de multifármacos) y el BCRP (proteína de resistencia de cáncer de mama) se expresan en la membrana del borde de cepillo de los enterocitos y representan una barrera en la absorción de muchos sustratos. La modulación de su actividad con inhibidores selectivos puede ser una estrategia útil para incrementar la biodisponibilidad (Blaser, 2007; Rusel, 2010).

La Pgp es uno de los primeros transportadores de eflujo que fueron identificados en el intestino; se expresa principalmente en el yeyuno, seguido del íleon y del colon. A la fecha, se han encontrado una gran cantidad de compuestos con diferencias estructurales que son sustratos de esta proteína. De manera general, se ha visto que es capaz de transportar fármacos hidrofóbicos cargados positivamente de regreso al lumen intestinal, y que pudieron haber sido transportados al enterocito por difusión pasiva (por ejemplo los fármacos anticancerígenos, los inhibidores de proteasa del VIH y algunos antibióticos) (Blaser, 2007; Rusel, 2010; Yang, 2013).

La MRP2 transporta, en general, fármacos aniónicos y compuestos endógenos. Algunos de sus sustratos son la doxorubicina, la mitomicina C, el cisplatino, el 5-fluorouracilo y el etopósido (Rusel, 2010; Yang, 2013).

La BCPR no sólo se expresa en tumores y en células cancerosas sino también en varios tejidos normales, entre ellos, la membrana del borde de cepillo de los enterocitos. Entre los fármacos que forman parte de sus sustratos se encuentran la mitoxantrona, la daunorrubicina, la doxorubicina, el cisplatino y el topotecán (Yang, 2013).

Por otra parte, la interacción entre los transportadores ABC y las enzimas metabolizadores hacen que esta barrera sea más efectiva. La P-gp y las enzimas del citocromo P450 (CYP3A4) parecen compartir los mismos sustratos, mientras que MRP2 y BCRP expulsan del enterocito conjugados de fármacos aniónicos formados por enzimas metabolizadores de la fase II, como la UDP-glucuronosiltransferasa (UGTs), sulfoniltransferasas (SULTs) y glutatióntransferasas (GSTs) (Rusel, 2010).

### 3.5.1.4 Endocitosis

Es un proceso en el que un sustrato o compuesto logra entrar a la célula sin atravesar la membrana lipídica celular. Dependiendo de los mecanismos y las moléculas involucradas, este proceso se puede dividir en pinocitosis, fagocitosis y endocitosis mediada por un receptor; en cada caso ocurre la formación de una vesícula por invaginación de la membrana plasmática y por la fusión membranal (Cao *et al.*, 2008).

### 3.5.2 Sistema de clasificación biofarmacéutica

La permeabilidad, la solubilidad y la disolución son los principales factores que influyen en la absorción de un fármaco. La permeabilidad refleja las propiedades fisiológicas de la membrana hacia los solutos; la fracción de fármaco absorbida está determinada entonces por la permeabilidad del fármaco a través de la pared intestinal. Por otra parte, la solubilidad es una de las propiedades fisicoquímicas del fármaco que afectan la absorción, debido a que es necesario que el fármaco se encuentre en disolución para que se lleve a cabo dicho proceso (Cao *et al.*, 2008).

Estas características biofarmacéuticas influyen, además, en la distribución, el metabolismo y la excreción y son adecuadas para lograr el efecto terapéutico *in vivo*. En el año 2000, la FDA implementó en una de sus guías, el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB): una pauta para clasificar los fármacos con base en su solubilidad acuosa y su permeabilidad intestinal (**Tabla 3.2**). Este documento considera además la exención de pruebas de bioequivalencia entre diferentes formulaciones de fármacos pertenecientes a la clase 1. Por otra parte, también establece que en el desarrollo de nuevos fármacos es adecuado catalogar a las moléculas de acuerdo con el SCB para poder predecir sus características de absorción (FDA, 2000).

**Tabla 3.2** Sistema de Clasificación Biofarmacéutica

	Solubilidad	Permeabilidad
Clase 1	Alta	Alta
Clase 2	Baja	Alta
Clase 3	Alta	Baja
Clase 4	Baja	Baja

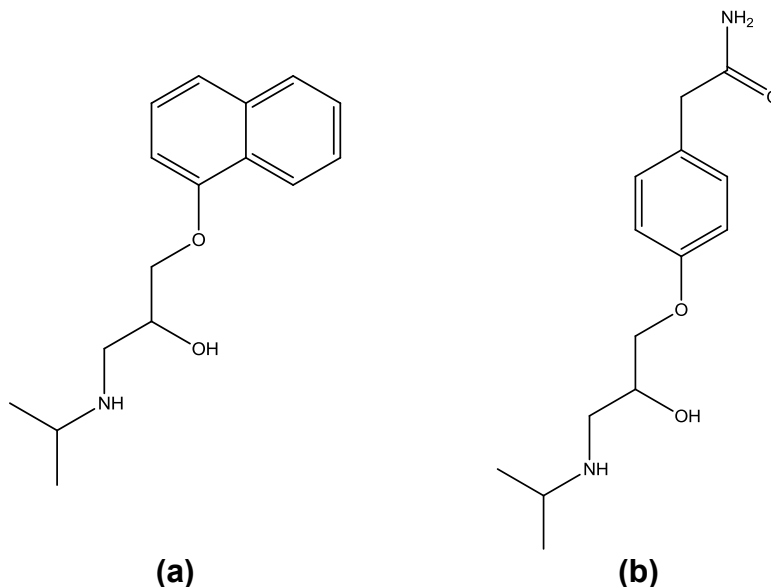
En este sentido, se considera que un fármaco es altamente soluble cuando la dosis más alta se disuelve en 250 mL o menos en un medio acuoso dentro de un

intervalo de pH de 1 a 7.5 (FDA, 2000). Con respecto a la permeabilidad se sabe que un fármaco es altamente permeable cuando su absorción, en humanos, es del 90% o más de una dosis administrada con una determinación del balance de masa. El límite se basa indirectamente en el grado de absorción del fármaco en humanos y, directamente en las mediciones de la proporción de transferencia de masa a través de la membrana intestinal humana o en modelos alternativos (FDA, 2000).

### 3.5.3 Modelos para evaluar la permeabilidad

Se han desarrollado diversos métodos para determinar la permeabilidad de los fármacos. De manera general, se pueden clasificar como métodos fisicoquímicos, *in silico*, *in vitro*, *in situ* e *in vivo*. De éstos, los métodos recomendados por la FDA para evaluar la permeabilidad de una molécula son las metodologías por perfusión intestinal *in situ* con modelos animales adecuados, o bien, métodos *in vitro* empleando tejidos intestinales o monocapas de células epiteliales adecuadas.

Asimismo, dentro de esta guía, la FDA establece un listado con 20 compuestos que pueden ser utilizados para determinar la adecuabilidad del modelo de permeabilidad elegido. Entre éstos, se encuentran el atenolol y el propranolol (**Figura 3.9**), dos fármacos antihipertensivos que pertenecen al grupo de los  $\beta$ -bloqueadores y que han sido clasificados como marcadores de baja y alta permeabilidad.



**Figura 3.9** Estructuras químicas del propranolol (a) y el atenolol (b)

### 3.5.3.1 Métodos fisicoquímicos

En general, las propiedades fisicoquímicas de fármacos administrados por vía oral son los principales factores que determinan la permeabilidad de un fármaco. El análisis de propiedades fisicoquímicas básicas como los enlaces de hidrógeno, el tamaño molecular, la polaridad y la ionización son de utilidad para estimar parámetros fisicoquímicos más complicados que permiten predecir la absorción de los fármacos. Estos métodos son atractivos por su eficacia y su reproducibilidad para predecir el transporte pasivo de un fármaco. Sin embargo, su alcance está limitado y no se toman en cuenta los factores fisiológicos que en ocasiones pueden modificar las propiedades fisicoquímicas, ocasionando que se realicen falsas predicciones (Balimane *et al.*, 2000).

Dentro de este grupo se encuentran la determinación de la lipofobicidad (medida de la interacción entre fármaco-membrana), del potencial de absorción (parámetro propuesto que incorpora varios parámetros fisicoquímicos en una ecuación y es capaz de predecir la fracción absorbida) y las técnicas IAM (ensayo de membrana artificial inmovilizada) y PAMPA (ensayo de permeabilidad en una membrana artificial paralela).

La técnica IAM emplea una membrana artificial como fase estacionaria cromatográfica, la cual se forma a través de la inmovilización por enlaces covalentes, de fosfolípidos con partículas de sílica. Esta membrana se acopla a un HPLC y se clasifica con base en el tiempo de retención de la molécula. El factor de capacidad ( $k'$ ) obtenido por este método ha mostrado correlación con la permeabilidad a través de las monocapas de la línea celular Caco-2. Sin embargo, estas membranas carecen de poros paracelulares y de proteínas transportadoras, por lo tanto, su uso se limita a compuestos que son transportados por difusión pasiva transcelular (Balimane *et al.*, 2000; Hellinger y Vastag, 2012).

Las membranas PAMPA involucran la formación de una membrana lipídica artificial por medio de un filtro hidrofóbico cubierto por una mezcla de lecitina y fosfolípidos disueltos en un disolvente orgánico inherente. El fármaco en solución se agrega a los filtros y, posteriormente, se determina la velocidad con la que el fármaco atraviesa la membrana. Actualmente, existen diversos modelos PAMPA desarrollados con varios tipos de membranas. Esta técnica es mucho menos laboriosa que los métodos *in vitro* o *in vivo* y parece tener la misma predicción. Una limitante del modelo es que subestima la absorción de compuestos transportados por acarreadores y de compuestos hidrofílicos (Balimane *et al.*, 2000; Hellinger y Vastag, 2012).



### 3.5.3.2 Métodos *in vitro*

Las técnicas *in vitro* son menos laboriosas y costosas comparadas con los estudios *in vivo* en animales. Sin embargo, un inconveniente que presentan todos estos modelos es que no toman en cuenta los factores fisiológicos en la interpretación de los datos. Cada método *in vitro* tiene diferentes ventajas y desventajas por lo que, su selección dependerá del objetivo que se tenga (Balimane *et al.*, 2000).

#### 3.5.3.2.1 Métodos basados en tejidos animales

Estos métodos se usan debido a la similitud en los tejidos animales formados por el mismo tipo de células endoteliales, sin embargo, es difícil mantener la viabilidad de tejidos extirpados, principalmente por la falta de administración de sangre y de oxigenación constante. Dentro de estos métodos se encuentran la técnica de intestino invertido, el transporte *in vitro* a través de segmentos intestinales y las vesículas de membrana aisladas (Balimane *et al.*, 2000).

Las vesículas de membrana han sido aisladas a partir de la membrana del borde del cepillo de los enterocitos de varias especies. Estos compartimentos membranosos ofrecen una oportunidad única para estudiar las propiedades del transporte de fármacos a nivel celular, facilitando la identificación y el aislamiento de proteínas transportadoras que son expresadas específicamente en las membranas apical y basolateral. Una desventaja que presentan es que, la mayoría de las veces, contienen fragmentos de organelos y durante su aislamiento pueden dañarse las proteínas transportadoras y las enzimas (Balimane *et al.*, 2000).

#### 3.5.3.2.2 Métodos basados en cultivos celulares

Existen diversos modelos de monocapas celulares que mimetizan el epitelio intestinal humano. A diferencia de los enterocitos, las células humanas inmortalizadas o tumorales crecen rápidamente en monocapas confluentes seguidas de una diferenciación espontánea formando un sistema ideal para estudios de transporte. Comparadas con los modelos IAM y PAMPA, los modelos celulares, presentan una mayor similitud a las condiciones *in vivo*. Algunas de estas células epiteliales son las Caco-2, la HT-29 y la T-84; todas provenientes de colon humano, también se emplean la línea MDCK, de riñón canino, y la 2/4/A/1 de intestino de rata fetal (Balimane *et al.*, 2000).

El modelo de las células Caco-2 es el más utilizado para evaluar la permeabilidad de fármacos. Cuando el cultivo alcanza la confluencia en un filtro poroso

semipermeable, se forman uniones estrechas y una polaridad celular. Sin embargo, una de sus desventajas es que los datos que arroja el modelo pueden presentar variabilidad debido a diferencias en las condiciones de cultivo y en la composición de la subpoblación celular. Con este modelo celular se puede determinar el transporte pasivo tanto transcelular como paracelular. El ensayo también es capaz de determinar la permeabilidad en dirección absorbente (apical-basolateral) y secretor (basolateral-apical). Aunque se ha encontrado que las células Caco-2 expresan transportadores importantes para la absorción de fármacos como los P-gp, MRP-2, BCRP, OCTN-1, -2, PepT1 y OATP-B, su concentración es menor respecto a las condiciones *in vivo* por lo que, el modelo podría generar falsos positivos con los fármacos que se permean por un transporte activo. Otra desventaja que presenta el modelo es el tiempo requerido para generar la monocapa, ya que se forma en un periodo de 3 semanas (Balimane *et al.*, 2000).

Las células TC-7 son una subclona aislada de las células Caco-2; presentan una morfología similar con respecto a la expresión de la membrana del borde de cepillo, las microvellosidades y las uniones estrechas. Los resultados de permeabilidad por transporte pasivo obtenidos con estas células se correlacionan de la misma manera que las células Caco-2 con la absorción en humanos (Balimane *et al.*, 2000; Hellinger y Vastag, 2012).

La línea intestinal HT-29 solo se diferencia modificando el medio de cultivo; la presencia de galactosa, en lugar de la glucosa, ocasiona la polarización de las células (Hellinger y Vastag, 2012).

Por otra parte, la línea celular T84 se diferencia espontáneamente después de alcanzar la confluencia y aunque expresan la glicoproteína P, los marcadores bioquímicos y morfológicos para su diferenciación son pocos (Hellinger y Vastag, 2012).

Las células MDCK se diferencian en células epiteliales columnares y también forman uniones estrechas cuando se cultivan en membranas semipermeables. Sin embargo, al ser células de riñón canino, el tipo y el nivel de expresión de transportadores difiere mucho de las Caco-2. Una de sus principales ventajas sobre las células Caco-2 es que requieren de un periodo de cultivo de 3 días (Balimane *et al.*, 2000).

Por último, las 2/4/A/1 son útiles sólo para evaluar compuestos que se transportan pasivamente (Hellinger y Vastag, 2012).

### 3.5.3.3 Métodos *in situ*

Frecuentemente, se ha usado la perfusión *in situ* de segmentos intestinales de roedores para estudiar la permeabilidad y la cinética de absorción de fármacos. La ventaja más grande respecto a los métodos *in vitro* es la presencia de sangre y la inervación que tienen los animales experimentales. Se han evaluado varias modificaciones de la técnica de perfusión: como la recirculante, la oscilatoria y el método del loop cerrado. En general, estos experimentos involucran la perfusión de un fármaco disuelto en buffer fisiológico a través de segmentos intestinales aislados canulados; la diferencia en la concentración de los flujos de entrada y de salida es utilizada para calcular la permeabilidad. La presencia de un suministro de sangre, de inervaciones y el aclaramiento en el sitio de absorción mimetiza las condiciones *in vivo* por lo que se considera un excelente modelo experimental. Sin embargo, la manera en la que se realiza la perfusión del fármaco no siempre representa la proporción del fármaco en la circulación sistémica, además es costoso y requiere un gran número de animales para obtener datos estadísticamente significativos. También, se ha demostrado que la manipulación quirúrgica combinada con la anestesia causa un cambio significativo en el flujo sanguíneo del intestino y tiene un efecto en la absorción (Balimane *et al.*, 2000).

### 3.5.3.4 Métodos *in vivo*

Existen factores fisiológicos tales como el pH, la motilidad GI, el tiempo de tránsito y la expresión y distribución de enzimas y transportadores que pueden afectar la absorción ocasionando variabilidad entre especies, por lo que es necesario que los datos de absorción obtenidos con modelos animales sean extrapolados con precaución a los humanos. Por lo general, los métodos *in vivo* se basan en la comparación de los valores obtenidos del ABC (área bajo la curva obtenida de la relación entre la concentración plasmática vs. tiempo) de una administración intravenosa, intraportal o intraperitoneal y de una oral (Balimane *et al.*, 2000).

### 3.5.3.5 Métodos *in silico*

Los modelos *in silico* que pueden predecir la permeabilidad de un fármaco se basan en la lipofilicidad, la unión a hidrógenos, el tamaño molecular, el área superficial polar y las propiedades cuánticas. Estos modelos son de utilidad ya que pueden dirigir la síntesis de nuevos fármacos y predecir la absorción intestinal humana con base en la relación estructura-propiedad cuantitativa sin necesidad de la síntesis del compuesto. Sin embargo, muchos de estos modelos se desarrollan para compuestos de estructura similar, por lo que el modelo resulta ineficiente cuando se aplica a compuestos con mayor variabilidad estructural. Una de sus

principales desventajas es la falta de información confiable en su base de datos, por lo que estos métodos no son tan confiables como los datos obtenidos experimentalmente (Balimane *et al.*, 2000).

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Determinación de las características fisicoquímicas de la pinocembrina y la acacetina

Las características fisicoquímicas de los flavonoides fueron determinadas empleando los softwares Estimate Program Interface Suit (versión 4.11) desarrollado por la United States Environmental Protection Agency (2012), para determinar el Log Pow, y el MarvinSketch (versión 15.2.9) desarrollado por Chem Axon Ltd, el cual se usó para determinar la solubilidad y el pka de los compuestos.

### 4.2 Método bioanalítico para cuantificar Atenolol y Propranolol (marcadores de permeabilidad) en estudios de transporte *in vitro* con células Caco-2

#### 4.2.1 Desarrollo del método

El desarrollo y la validación del método bioanalítico se realizó en un cromatógrafo de líquidos marca SHIMADZU (Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japón) equipado con un detector UV-visible dual SPD-10A; un inyector automático SIL-10AD (VP); una bomba LC-10AT (VP); un horno para columna CTO-10A; un desgasificador DGU14A y un sistema de control SCL-10A (VP) acoplado a un equipo de cómputo. El control del equipo y el procesamiento de los datos se realizaron utilizando el software LC solution.

El análisis cromatográfico cuantitativo por CLAR se realizó en una columna Fortis H<sub>2</sub>O C<sub>18</sub>, 5 µm, 150 x 4.6 mm (Fortis Technologies Ltd.). Como sistema de elución, se utilizó un gradiente de ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich) al 0.03% en agua (Merck Milli Q) [A] y Acetonitrilo (grado HPLC, Merck) [B] en las siguientes proporciones: 0-3.5 min 87% A y 13% B; 3.6-8.0 min 55% A y 45% B; 8.1-10.0 min 87% A y 13% B a un flujo de 1.0 mL/min y un volumen de inyección de 20 µL. Las longitudes de onda utilizadas para el atenolol y el propranolol fueron de 224 nm y 290 nm, respectivamente.

Las disoluciones de atenolol y propranolol empleadas en todos los ensayos fueron preparadas utilizando estándares marca Sigma Aldrich (98.0% y 99.0% de pureza, respectivamente).

## 4.2.2 Evaluación del sistema

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas, se evaluaron la linealidad y la precisión del sistema. Para ello, se preparó una disolución stock de cada compuesto a una concentración de 500  $\mu\text{M}$  usando como diluyente la mezcla etanol-agua 1:10. A partir de ésta se realizaron las diluciones correspondientes usando fase móvil (TFA 0.03%-ACN (87:13) como diluyente.

### 4.2.2.1 Precisión

La precisión del sistema se determinó mediante el análisis, de cinco réplicas, de disoluciones preparadas en tres niveles de concentración (3, 20 y 75  $\mu\text{M}$ ) para cada fármaco. Cada nivel se preparó diluyendo la disolución stock (500  $\mu\text{M}$ ) con fase móvil. Una vez registrada la respuesta analítica se determinó el coeficiente de variación para cada nivel de concentración.

### 4.2.2.2 Linealidad

La linealidad se determinó preparando dos curvas de calibración, con siete niveles de concentración (1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ ) para el atenolol y el propranolol. Cada curva se preparó con diluciones independientes a partir de una disolución stock para cada compuesto a una concentración de 500  $\mu\text{M}$ . Una vez que las muestras fueron analizadas con el método cromatográfico se realizó una regresión lineal, por el método de mínimos cuadrados, con los datos obtenidos.

## 4.2.3 Validación del método bioanalítico

La validación del método se realizó de acuerdo con los criterios establecidos en la revisión 1 de la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos emitida por la FDA en el 2013. De acuerdo con esta guía, los parámetros de desempeño que se deben evaluar para validar los métodos bioanalíticos cromatográficos son: la selectividad, la linealidad, la precisión, la exactitud, el recobro, el límite de cuantificación y la estabilidad de la muestra. La validación de los métodos se realizó de manera simultánea para el atenolol y el propranolol.

Todas las disoluciones empleadas en la validación del método se realizaron diluyendo la disolución stock (500  $\mu\text{M}$ ; preparada en etanol-agua 1:10), de cada analito, con la solución amortiguadora de Hank pH 7.4 (numeral 4.6.1).

#### 4.2.3.1 Selectividad

Se analizaron seis blancos de muestra que contenían la matriz biológica: la solución amortiguadora de Hank pH 7.4 (HBSS) en contacto directo con la monocapa celular Caco-2 en placas Transwell a 37°C por 3 h; también, se analizaron la HBSS sin estar en contacto con las células y soluciones de atenolol y propranolol a las concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  (límite de cuantificación) y 100  $\mu\text{M}$  (límite máximo de cuantificación), disueltos en la solución amortiguadora de Hank, la cual fue preparada de acuerdo con el numeral 4.6.1. Una vez obtenidos los cromatogramas correspondientes, se buscó la presencia de alguna interferencia sobre la respuesta generada por el atenolol y el propranolol.

#### 4.2.3.2 Linealidad

Se determinó preparando, en diferentes días, seis curvas de calibración en el intervalo de 1  $\mu\text{M}$  (límite de cuantificación) a 100  $\mu\text{M}$  para cada analito. Los niveles de concentración empleados fueron: 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu\text{M}$ . Cada curva se inyectó al sistema cromatográfico. Una vez obtenidos los datos analíticos se realizó una regresión lineal con el software estadístico Statgraphics Centurion XVI para evaluar este parámetro de desempeño del método.

#### 4.2.3.3 Exactitud, precisión y recobro

Para evaluar estos parámetros de desempeño se preparó, por quintuplicado, una muestra que contenía ambos fármacos (en la matriz biológica) en concentraciones de 3  $\mu\text{M}$  (bajo), 20  $\mu\text{M}$  (medio) y 75  $\mu\text{M}$  (alto).

Con los datos obtenidos se determinó la exactitud del método mediante el cálculo de la concentración recuperada, y del promedio de ésta, se obtuvo la desviación absoluta respecto al valor nominal de las concentraciones evaluadas.

La precisión se estimó a través de la repetibilidad y la precisión intermedia. La primera, se evaluó mediante el cálculo del coeficiente de variación obtenido con la concentración recuperada en las muestras a cada nivel de concentración. El segundo parámetro de desempeño se determinó evaluando la variación de la concentración recuperada, en cada nivel, a partir de muestras preparadas por dos analistas y en dos días diferentes.

Finalmente, para evaluar el recobro se preparó adicionalmente una segunda serie de muestras, en los mismos niveles de concentración, y utilizando fase móvil como disolvente. El recobro fue evaluado comparando las respuestas analíticas entre las muestras preparadas con la fase móvil y las muestras preparadas con la matriz biológica.

#### 4.2.3.4 Límite de cuantificación

Para estimar el límite de cuantificación se realizaron diluciones seriales de cada fármaco hasta encontrar la concentración mínima que presentara una respuesta identificable de por lo menos cinco veces señal de ruido (comparada con el blanco), con un coeficiente de variación menor al 20% y una exactitud en la concentración recuperada del  $\pm 20\%$ . Para ello, las muestras se prepararon por quintuplicado y se analizaron en el sistema cromatográfico.

#### 4.2.3.5 Estabilidad de la muestra

Se evaluó la estabilidad de cada compuesto en HBSS pH 7.4 a corto y a largo plazo y también, la estabilidad después de tres ciclos de congelación-descongelación.

- **Estabilidad de las muestras a corto plazo**

En este parámetro se prepararon las muestras, por triplicado, en tres niveles de concentración: 3, 20 y 75  $\mu\text{M}$ . Previo a su análisis cromatográfico las muestras se almacenaron a temperatura ambiente durante 24 h. Con los resultados obtenidos se calculó la concentración recuperada, su desviación absoluta respecto al valor nominal y la desviación estándar.

- **Estabilidad de las muestras a largo plazo**

Para evaluar este parámetro se empleó la misma estrategia metodológica descrita en el párrafo anterior. La única diferencia reside en las condiciones de almacenamiento de las muestras:  $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 30 días.

- **Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación**

En esta condición, la estabilidad se evaluó en tres ciclos. De nueva cuenta, se prepararon tres series de muestras utilizando la misma metodología que para la estabilidad a corto y largo plazo. El primer ciclo se evaluó congelando las series a  $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Una vez que se congelaron las muestras se retiraron del congelador y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su descongelación total. Al término de este ciclo una alícuota de la muestra se analizó empleando el método bioanalítico desarrollado; el resto de la solución se almacenó a  $-47\text{ }^{\circ}\text{C}$  para iniciar el segundo ciclo. El procedimiento se repitió hasta completar los tres ciclos. Con los datos analíticos obtenidos, en cada ciclo, se determinó la concentración recuperada, su desviación absoluta respecto al valor nominal y la desviación estándar.



### 4.3 Método bioanalítico para la cuantificación de Pinocebrina y Acacetina en estudios de transporte *in vitro* con células Caco-2

El método fue desarrollado empleando el sistema cromatográfico descrito en el numeral 4.2.

Para el desarrollo y la validación del método bioanalítico se utilizaron estándares de acacetina y pinocebrina previamente aislados por técnicas cromatográficas de una fuente natural, identificados y caracterizados por técnicas espectroscópicas y espectrométricas convencionales (Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas); en el Anexo I se ilustran los espectros obtenidos de resonancia magnética protónica para cada flavonoide. La pureza fue determinada por HPLC con estándares comerciales de pinocebrina (95%) y acacetina (97%) (Sigma Aldrich).

#### 4.3.1 Diseño experimental para el desarrollo del método cromatográfico

Para establecer las condiciones cromatográficas óptimas para la cuantificación de los flavonoides se realizó un diseño de experimentos 2<sup>3</sup>. Los factores evaluados fueron la proporción de MeOH (Merck) en la fase móvil, el flujo y la concentración de ácido trifluoroacético. Los niveles para cada factor se enlistan en la **Tabla 4.1**.

**Tabla 4.1** Factores evaluados en el diseño experimental

Factor	Nivel alto	Nivel bajo
Proporción de MeOH (%)	60	55
Flujo (mL/min)	1.0	1.5
Concentración de TFA (%)	0.1	0.01

La aleatorización del diseño (**Tabla 4.2**) se realizó utilizando el software estadístico STATGRAPHICS Centurion XVI. En todos los experimentos se preparó una disolución que contenía ambos flavonoides en una concentración de 100 µg/mL disueltos en MeOH.

Tabla 4.2 Diseño experimental 2<sup>3</sup>

Número de análisis	Proporción MeOH (%)	Flujo (mL/min)	Concentración TFA (%)
1	60	1.0	0.10
2	55	1.0	0.01
3	55	1.5	0.10
4	55	1.0	0.10
5	60	1.0	0.01
6	60	1.5	0.01
7	55	1.5	0.01
8	60	1.5	0.10
9	55	1.5	0.01
10	60	1.5	0.10
11	55	1.5	0.10
12	55	1.0	0.10
13	60	1.0	0.01
14	55	1.0	0.01
15	60	1.0	0.10
16	60	1.5	0.01

Las respuestas evaluadas a partir del diseño experimental fueron: el tiempo de retención, el ancho de la base del pico, el área, la altura y la resolución entre ambos compuestos. La influencia de cada uno de los factores sobre las respuestas mencionadas se determinó a través del software estadístico mencionado. Adicionalmente, se realizó un análisis de optimización de respuesta múltiple, con el que se establecieron, finalmente, las condiciones cromatográficas (Tabla 4.3) del método para cuantificar la acetina y la pinocembrina.

Tabla 4.3. Condiciones cromatográficas del método para cuantificar acetina y pinocembrina

Fase móvil	MeOH : TFA 0.1% (60:40)
Columna	XBridge C18, 5 µm, 4.6 x 50 mm, Waters
Flujo	1.0 mL/min
Volumen de inyección	20 µL
Longitud de onda de detección	Pinocembrina 290 nm y Acetina 320 nm

#### 4.3.2 Evaluación del sistema

Para evaluar la linealidad y la precisión del sistema se preparó una disolución stock, de cada flavonoide, a una concentración de 10 mM disueltos en dimetilsulfóxido (JT Baker). A partir de cada disolución se realizó una dilución (1:100) en agua a pH 12 (ajustada con NaOH). La concentración final de cada

compuesto fue de 100  $\mu\text{M}$ . Esta solución se utilizó para preparar todas las disoluciones involucradas en la validación del sistema y del método. Para la evaluación del sistema, todas las disoluciones se llevaron a volumen con la fase móvil.

#### 4.3.2.1 Precisión

Para evaluar la precisión se analizaron, por quintuplicado, disoluciones para cada compuesto en tres niveles de concentración: 0.6, 15 y 30  $\mu\text{M}$ . Con los resultados obtenidos se calculó el coeficiente de variación para cada producto natural.

#### 4.3.2.2 Linealidad

Este parámetro se evaluó preparando, para cada flavonoide, una curva de calibración por duplicado, con los siguientes niveles de concentración: 0.2, 1, 2.5, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$ . Los resultados obtenidos se analizaron mediante una regresión lineal por el método de mínimos cuadrados.

#### 4.3.3 Validación del método

La validación del método analítico se realizó empleando los criterios descritos en el inciso 4.2.2. El protocolo experimental se realizó de manera independiente para cada flavonoide.

Las disoluciones empleadas para la validación del método se prepararon a partir de la solución stock 100  $\mu\text{M}$  descrita en la sección 4.3.2. Para la pinocembrina las diluciones se llevaron a volumen con la solución amortiguadora de Hank pH 7.4 y para la acacetina las diluciones se realizaron con la solución amortiguadora de Hank pH 7.4 adicionada con 4% de SFB.

##### 4.3.3.1 Selectividad

Se analizaron seis blancos de muestra que contenían la matriz biológica: la disolución de transporte (HBSS) en contacto directo con la monocapa celular con las condiciones descritas en la sección 4.2.2.1; asimismo, se analizaron la HBSS sin contacto con las células y las soluciones de cada flavonoide disueltos en la matriz biológica a las concentraciones de 0.2  $\mu\text{M}$  (límite de cuantificación) y 40  $\mu\text{M}$  (límite máximo de cuantificación). El medio de transporte fue preparado de acuerdo al numeral 4.6.1. Una vez obtenidos los cromatogramas correspondientes, se determinó la presencia de interferentes sobre la respuesta generada por la pinocembrina y la acacetina.

#### 4.3.3.2 Linealidad

Se evaluó con un total de 6 curvas que fueron preparadas y analizadas en días diferentes. Los niveles de concentración empleados fueron: 0.2, 1, 2.5, 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$  para cada compuesto. Con la respuesta analítica obtenida se realizó una regresión lineal usando el software Statgraphics Centurion XVI.

#### 4.3.3.3 Exactitud, precisión y recobro

Estos parámetros de desempeño se evaluaron a través de la preparación de muestras por quintuplicado a 3 niveles de concentración: 0.6  $\mu\text{M}$  (bajo), 15  $\mu\text{M}$  (medio) y 30  $\mu\text{M}$  (alto).

La determinación de la exactitud, precisión y recobro se realizó de la misma manera que en la validación del método para el atenolol y el propranolol, la cual se describe en el numeral 4.2.3.3.

#### 4.3.3.4 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se realizó estimando la concentración mínima de cada flavonoide que pudiera ser detectable y que, además, presentara una exactitud y precisión aceptables de acuerdo a los criterios establecidos por la Guía emitida por la FDA,  $\pm 20\%$  y  $\leq 20\%$ , respectivamente. Para esta estimación, se realizaron diluciones sucesivas hasta que se encontró la mínima concentración que cumpliera con los requerimientos, la cual se preparó por quintuplicado para evaluar su precisión y exactitud.

#### 4.3.3.5 Estabilidad de la muestra

La estabilidad de la muestra se evaluó de la misma manera y con las mismas condiciones descritas en el numeral 4.2.2.5, determinándose la estabilidad a corto y largo plazo y la estabilidad en ciclos de congelación-descongelación. Para ello, se prepararon muestras a tres niveles de concentración: alto (30  $\mu\text{M}$ ), medio (15  $\mu\text{M}$ ) y bajo (0.6  $\mu\text{M}$ ) tanto para la acetina como para la pinocembrina.

### 4.4 Cultivo celular

Las células de adenocarcinoma de colon humano [Caco-2] (ATCC<sup>®</sup> HTB-37<sup>™</sup>) fueron adquiridas en la American Type Culture Collection con el número de lote 61777387. Las células se encontraban en el número de pase 18.

La manipulación de la línea celular se realizó en condiciones de esterilidad empleando para ello una Campana de Flujo Laminar Clase II Nuair Labguard modelo UN-425-300.

#### **4.4.1 Preparación de medios utilizados para el cultivo celular**

Para la proliferación de la línea celular se empleó el medio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) con L-Glutamina (ATCC<sup>®</sup> 30-2003) adicionado con 20% de suero fetal bovino (SFB, ATCC<sup>®</sup> 30-2020) y 1% de mezcla de antibióticos y antimicóticos Anti-Anti 100 x (Gibco 15240-062).

Por otro lado, para preparar el medio de lavado Ham's F12 se disolvió, en 1 L de agua, el contenido de un sobre y se agregaron 1.1760 g de NaHCO<sub>3</sub> (JT Baker). El pH de la disolución se ajustó a 7.2 con HCl (JT Baker) 1 N o NaOH (JT Baker) 1N. Finalmente, se esterilizó empleando un sistema de filtración con una membrana de acetato de celulosa de 0.22 μm de tamaño de poro.

#### **4.4.2 Descongelamiento y proliferación celular**

La línea celular se descongeló en el menor tiempo posible para asegurar un mayor porcentaje de viabilidad. La suspensión celular obtenida se vertió en un tubo con 9 mL de medio de cultivo y se centrifugó utilizando una centrifuga marca Hettich Rotina a 1500 rpm y 20 °C, durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró usando una bomba de vacío (Welch) y el botón celular se resuspendió en 1 mL de medio. La suspensión celular resultante se dividió en dos alícuotas de 500 μL y se colocaron, por separado, en botellas de 25 cm<sup>2</sup> (Corning) con medio de cultivo, para su proliferación. Las botellas se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda y con 5% de CO<sub>2</sub> (Estufa Shel Lab modelo 3552). El medio de cultivo se cambió cada 48 horas hasta que las células llegaron a una confluencia del 80-90%, la cual se determinó mediante la observación del cultivo en un microscopio invertido marca Olympus CKX49.

#### **4.4.3 Tripsinización y conteo celular**

Una vez que el cultivo llegó a confluencia las células se desprendieron de la botella de cultivo mediante la adición de tripsina. Para ello, se realizó lo siguiente: en primer lugar se aspiró el medio; enseguida las células se lavaron con 3 mL de medio Ham's F12, en dos ocasiones, aspirando en cada lavado el medio. A

continuación, se adicionó 1 mL de Tripsina-EDTA [0.25% / 0.53 mM] (ATCC, 30-2101) por cada 25 cm<sup>2</sup> de superficie de la botella. Ésta se incubó por 5 minutos y se comprobó el desprendimiento celular a través del microscopio. Finalmente, se agregaron 3 mL de medio EMEM suplementado y el contenido total de la botella se transfirió a un tubo de centrifuga. Cuando se emplearon botellas de 75 cm<sup>2</sup> se utilizó el triple de los volúmenes descritos. Previa homogeneización de la suspensión celular en un vórtex (IKA MS2) se tomó una alícuota de 20 µL y se mezcló con 80 µL de Azul Tripano al 0.4% (Gibco) en un tubo Eppendorff de 0.5 mL de capacidad. El conteo de células no teñidas se realizó en una cámara de Neubauer empleando 20 µL de la suspensión y el objetivo 10x del microscopio. La concentración de células se determinó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = N \times Fd \times Fc$$

Donde:

N = Promedio de células no teñidas

Fd = Factor de dilución (5)

Fc = Factor de conversión de la cámara (10,000)

#### 4.4.4 Subcultivo y criopreservación de la línea celular

Previa centrifugación del tubo que contenía la suspensión celular y, una vez eliminado el sobrenadante, el botón celular obtenido se resuspendió en medio EMEM, empleando el volumen necesario para obtener una concentración celular conocida. Una parte de esta suspensión se empleó para continuar con la proliferación de la línea y la otra se congeló para conformar el banco celular maestro.

Para realizar el subcultivo, la línea celular se proliferó en botellas de 25 o 75 cm<sup>2</sup> (Corning), con 5 y 15 mL de medio, respectivamente. La cantidad de células que se colocó en éstas fue de 4000-16000 células/cm<sup>2</sup>.

Por otro lado, la criopreservación de la línea se realizó en crioviales de 1.5 mL, los cuales contenían la suspensión celular (1x10<sup>6</sup> a 1.5x10<sup>6</sup> células/mL), medio de cultivo EMEM necesario para completar 950 µL y 50 µL de DMSO (ATCC). Una parte de los crioviales se almacenaron en un ultra congelador (Norlake NSSUF191WWW/O) a -70 °C y la otra parte en un tanque de nitrógeno líquido (International Cryogenincs Inc.).

#### 4.5 Ensayo de citotoxicidad de los flavonoides sobre la línea celular Caco-2

Para evaluar la citotoxicidad de los flavonoides, las muestras se prepararon a partir de una disolución 10 mM de cada compuesto en DMSO. De esta solución, se realizaron diluciones subsecuentes hasta obtener concentraciones de 400, 200, 100 y 10  $\mu$ M empleando como diluyente agua a pH 12, consideradas como soluciones de prueba.

Por otra parte, para evaluar el efecto del cosolvente (DMSO) y el diluyente se realizó una disolución 1:10 de DMSO en agua a pH 12. De la solución resultante se prepararon 4 diluciones adicionales (4:10, 2:10, 1:10 y 0.1:10), empleando en todos los casos, agua a pH 12 como diluyente.

El ensayo se realizó en placas de 96 pozos. Para ello, se transfirieron, a cada pozo, 100  $\mu$ L de medio y 20  $\mu$ L de una suspensión celular a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL ( $2 \times 10^4$  células/pozo). Posteriormente, la placa se incubó a 37 °C, con 5% de CO<sub>2</sub> y, 95% de humedad relativa durante 24 h. Al finalizar el tiempo de incubación se agregaron, a cada pozo, 90  $\mu$ L de medio y 10  $\mu$ L de las soluciones de prueba, evaluando para cada flavonoide concentraciones finales de 40, 20, 10 y 1  $\mu$ M. En los pozos empleados como blanco se adicionaron 10  $\mu$ L de medio en lugar de la solución de prueba y en los pozos empleados como control positivo, 100  $\mu$ L del agente citotóxico (DMSO al 30% en medio de cultivo). De nueva cuenta, las placas se incubaron durante 24 h bajo las condiciones descritas anteriormente. Al término de este segundo periodo de incubación se retiró la disolución de cada pozo y las células se fijaron con 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético al 10% (JT Baker); las placas se dejaron en reposo a 4 °C durante 1 h. Posteriormente, se lavaron 5 veces con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Enseguida, se agregaron 50  $\mu$ L de Sulforrodamina B al 0.4% (Sigma Aldrich), en ácido acético al 1% (JT Baker), y se mantuvieron a temperatura ambiente por 30 minutos. El exceso de colorante se lavó en 5 ocasiones con ácido acético al 1 % y se llevó a cabo un segundo proceso de secado a temperatura ambiente. A continuación, se adicionaron 100  $\mu$ L de una solución Tris Base 10 mM (pH 10.5) y las placas se mantuvieron en agitación constante hasta lograr la disolución homogénea del colorante. Finalmente, se registró la absorbancia de cada pozo en un lector de placas Agile Reader (Avans, AMPR-900) a 564 nm.

El porcentaje de viabilidad celular se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \frac{\text{Absorbancia disolución de prueba}}{\text{Absorbancia del blanco}} \times 100$$

## 4.6 Estudio de permeabilidad

Para la realización del estudio de permeabilidad se siguió la Guía de Exención de Estudios *in vivo* de Biodisponibilidad y Bioequivalencia para formas de dosificación oral sólidas de liberación inmediata basada en el sistema de clasificación biofarmacéutica (FDA, 2000). Como marcador de alta permeabilidad se utilizó propranolol, y el atenolol como marcador de baja permeabilidad.

### 4.6.1 Preparación de los medios requeridos para el estudio

#### a) Solución Amortiguadora de Hank pH 7.4

La pre-mezcla de sales de Hank (MP Biomedicals, 1710126); 0.35 g de bicarbonato de sodio (JT Baker) y 5.96 g de HEPES (Sigma Aldrich) se disolvieron en 980 mL de agua desionizada (Merck Milli Q). Enseguida, se ajustó el pH a 7.4 con NaOH o HCl 1 M y se completó el volumen a 1 L con agua desionizada. La solución anterior se esterilizó por filtración a través de una membrana de acetato de celulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

#### b) Lucifer Yellow

2.0 mg de Lucifer Yellow (Sigma Aldrich) se disolvieron en 20 mL de solución amortiguadora de Hank (concentración final de 100  $\mu\text{g/mL}$ ).

### 4.6.2 Formación de la monocapa de la línea celular Caco-2 en las placas Transwell

Para realizar los estudios de permeabilidad se emplearon placas Transwell de 12 pozos con membranas de politetrafluoroetileno recubiertas con colágeno y con un tamaño de poro de 0.4  $\mu\text{m}$  (Corning, 3493). Las células Caco-2 empleadas para el ensayo de permeabilidad se encontraban entre los pases 23 y 33. En cada pozo de las placas Transwell, se colocó el soporte permeable en condiciones de esterilidad, enseguida se humectó con 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo EMEM suplementado, se colocaron 1.5 mL del mismo medio del lado basolateral y se incubaron a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$  durante 30 minutos. Una vez preparada y homogeneizada la suspensión celular de  $6 \times 10^5$  células/mL, se colocaron 500  $\mu\text{L}$  del lado apical de cada celda (**Figura 4.1**). Las placas se incubaron durante 6 horas a 37 °C en 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad relativa para permitir la adherencia de las células al filtro, pasado este tiempo, se aspiró el medio del lado apical y se sustituyó con medio de cultivo fresco para evitar la formación de



multicapas. Posteriormente, el medio de cultivo fue cambiado cada 48 horas colocando 0.5 mL y 1.5 mL del lado apical y basolateral, respectivamente durante 21 días. Pasado este tiempo, se cambió cada 24 horas.

#### 4.6.3 Medición de la Resistencia Transepitelial (TEER)

A partir del día 21 se midió, diariamente, la resistencia transepitelial (TEER) usando un voltímetro epitelial EVOM<sup>2</sup> (World Precision Instruments) equipado con un electrodo STX2 (World Precision Instruments) hasta obtener una TEER mayor a 150  $\Omega$  cm<sup>2</sup>. Antes de realizar la lectura, el electrodo se esterilizó empleando luz UV durante 20 min; enseguida se sumergió en etanol durante 10 minutos y finalmente en una disolución de cloruro de potasio 0.1 M. Para registrar la TEER el medio de cada pozo se sustituyó por solución HBSS. Al finalizar la lectura se reemplazó la HBSS por el medio y nuevamente se incubaron las placas.

#### 4.6.4 Adecuabilidad del modelo de permeabilidad

Para demostrar la adecuabilidad del modelo empleado se evaluó la permeabilidad de fármacos ya caracterizados (inciso 4.6).

Así, para evaluar la permeabilidad del propranolol y del atenolol se prepararon disoluciones a 100  $\mu$ M y 300  $\mu$ M, respectivamente en HBSS. Para ello, se empleó la disolución stock indicada en el numeral 4.2.2.

El transporte se evaluó en las direcciones apical-basolateral (A→B) y basolateral-apical (B→A).

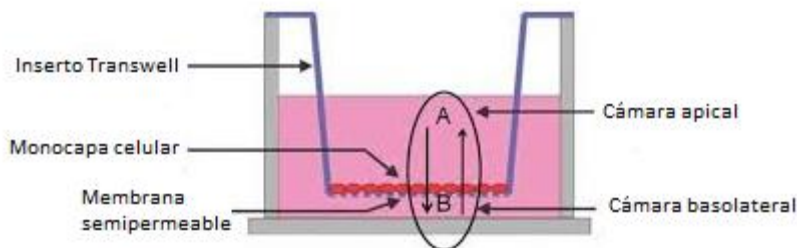
##### 4.6.4.1 Transporte en dirección Apical-Basolateral

En celdas independientes, se colocaron 0.5 mL de cada marcador en el lado apical y 1.5 mL del medio de transporte del lado basolateral (**Figura 4.1**). Posteriormente, la placa Transwell se colocó en un agitador orbital (Major Science, MW-23) acoplado a un baño de agua (Major Science, MW-23) y se mantuvo, durante todo el ensayo, a 37 °C y 50 rpm. Se tomaron muestras de 200  $\mu$ L a los 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 minutos del lado basolateral. En cada muestreo se reemplazó el volumen con medio de transporte.

##### 4.6.4.2 Transporte en dirección Basolateral-Apical

Para ello, se colocó en celdas independientes un volumen de 1.5 mL de cada compuesto en el lado basolateral y 0.5 mL de la disolución amortiguadora de Hank

en el lado apical, (**Figura 4.1**). Para iniciar el estudio, la placa se colocó en las condiciones indicadas en el inciso **4.6.4.1**. En esta ocasión se muestrearon 200  $\mu\text{L}$  del lado apical restituyendo el volumen tomado con el medio de transporte.



**Figura 4.1** Estudio de transporte bidireccional empleando una monocapa celular en una placa Transwell

#### 4.6.5 Estudios de transporte de la acacetina y la pinocembrina

Una vez demostrada la adecuabilidad del modelo de permeabilidad, se realizaron los estudios de transporte para los flavonoides. Para evitar problemas de solubilidad de la pinocembrina y la acacetina, los marcadores de alta y baja permeabilidad, no se usaron como estándares internos, sin embargo, cada vez que se realizó el ensayo se determinó la permeabilidad de ambos marcadores de la misma manera que se describe en la sección **4.6.4**.

Para la acacetina y la pinocembrina, la permeabilidad se evaluó en tres diferentes concentraciones: 40, 30 y 20  $\mu\text{M}$ , en las direcciones Apical-Basolateral y Basolateral-Apical. Las disoluciones fueron preparadas partiendo de una disolución stock 100  $\mu\text{M}$  de cada flavonoide (sección **4.3.3**). Las disoluciones de pinocembrina fueron llevadas a volumen con la HBSS y las de acacetina con HBSS adicionada con SFB al 4% para favorecer su solubilidad en medios acuosos.

El estudio de transporte se realizó en las mismas condiciones empleadas para los marcadores (secciones **4.6.4.1** y **4.6.4.2**); la metodología y los tiempos de muestreo también fueron los mismos. Cada una de las determinaciones fue realizada por triplicado.

#### 4.6.6 Determinación de la integridad de la monocapa

Una vez terminados los estudios de transporte, se sustituyeron las soluciones por la HBSS y se midió de nueva cuenta la TEER de la misma manera en la que se describe en la sección 4.6.3. Al finalizar, se colocaron en cada celda, 0.5 mL de la disolución de la Lucifer Yellow (preparada de acuerdo a la sección 4.6.1) en el lado apical, y 1.5 mL de medio de transporte en el lado basolateral. Las placas se colocaron en el baño acoplado al agitador a 37 °C y 50 rpm durante una hora. Al finalizar el tiempo, se recolectó como muestra todo el medio del lado basolateral. Las muestras se analizaron en un fluorómetro (BioTek Synergy HT) usando una longitud de onda de excitación de 485 nm y de emisión de 538 nm. Se cuantificó la concentración de Lucifer Yellow transportada comparando la respuesta de la concentración inicial con cada una de las muestras.

#### 4.6.7 Análisis de las muestras

Las muestras de atenolol y propranolol se analizaron en el HPLC de acuerdo con el método validado (sección 4.2.2), mientras que las muestras de acacetina y pinocembrina se analizaron empleando el método descrito en el numeral 4.3.3.

El análisis se realizó de acuerdo con las recomendaciones de la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos emitida por la FDA. Es decir, en cada corrida analítica y para cada método se inyectaron: un blanco, una adecuabilidad, una curva de calibración (preparada de igual manera que en la linealidad del método), y las muestras tomadas del estudio de permeabilidad combinadas con las muestras de control de calidad (QC). Éstas últimas se prepararon por triplicado para cada compuesto en tres niveles de concentración: alto, medio y bajo y corresponden a las mismas concentraciones con las que se evaluaron la precisión y la exactitud para la validación de cada uno de los métodos (secciones 4.2.3 y 4.3.3).

#### 4.6.8 Cálculo del coeficiente de permeabilidad aparente

El coeficiente de permeabilidad aparente se determinó con la siguiente fórmula:

$$P_{app} = \left( \frac{dQ}{dt} \right) \left( \frac{V}{ACo} \right)$$

Dónde:

dQ/dt es la velocidad de transporte del compuesto ( $\mu\text{M}/\text{s}$ )

V es el volumen de la celda receptora ( $\text{cm}^3$ )

A es el área superficial del soporte permeable donde se formó la monocapa ( $\text{cm}^2$ )

Co es la concentración inicial en la celda del donador ( $\mu\text{M}$ ).

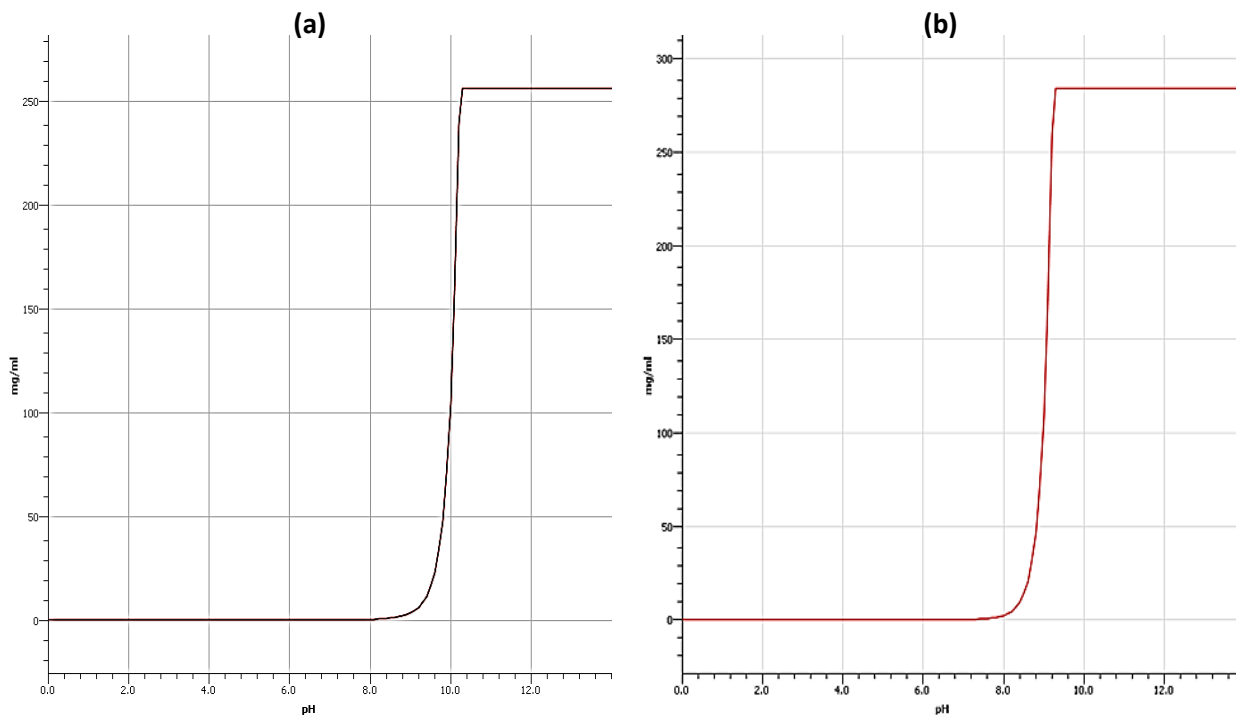
## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Propiedades fisicoquímicas de la Pinocembrina y la Acacetina

En la **Tabla 5.1** se resumen las propiedades fisicoquímicas de los flavonoides calculadas con el software Estimation Program Interface, versión 4.1, desarrollado por la agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA). Los valores de solubilidad y pKa, así como los diagramas de solubilidad y distribución de especies en función del pH (**Figuras 5.1** y **5.2**) se obtuvieron utilizando el software MarvinSketch versión 15.2.9 (Chem Axon Ltd.).

**Tabla 5.1** Propiedades fisicoquímicas de la pinocembrina y la acacetina *in silico*

	Pinocembrina	Acacetina
<b>Fórmula condensada</b>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
<b>Peso molecular (g/mol)</b>	256.26	284.26
<b>Solubilidad intrínseca en agua (mg/L) a 25°C</b>	185.6	54.2
<b>Log P<sub>ow</sub></b>	3.09	3.41
<b>pKa</b>	7.87 y 9.51	6.58 y 8.18



**Figura 5.1** Diagramas de solubilidad en función del pH. **(a)**: pinocembrina; **(b)**: acacetina

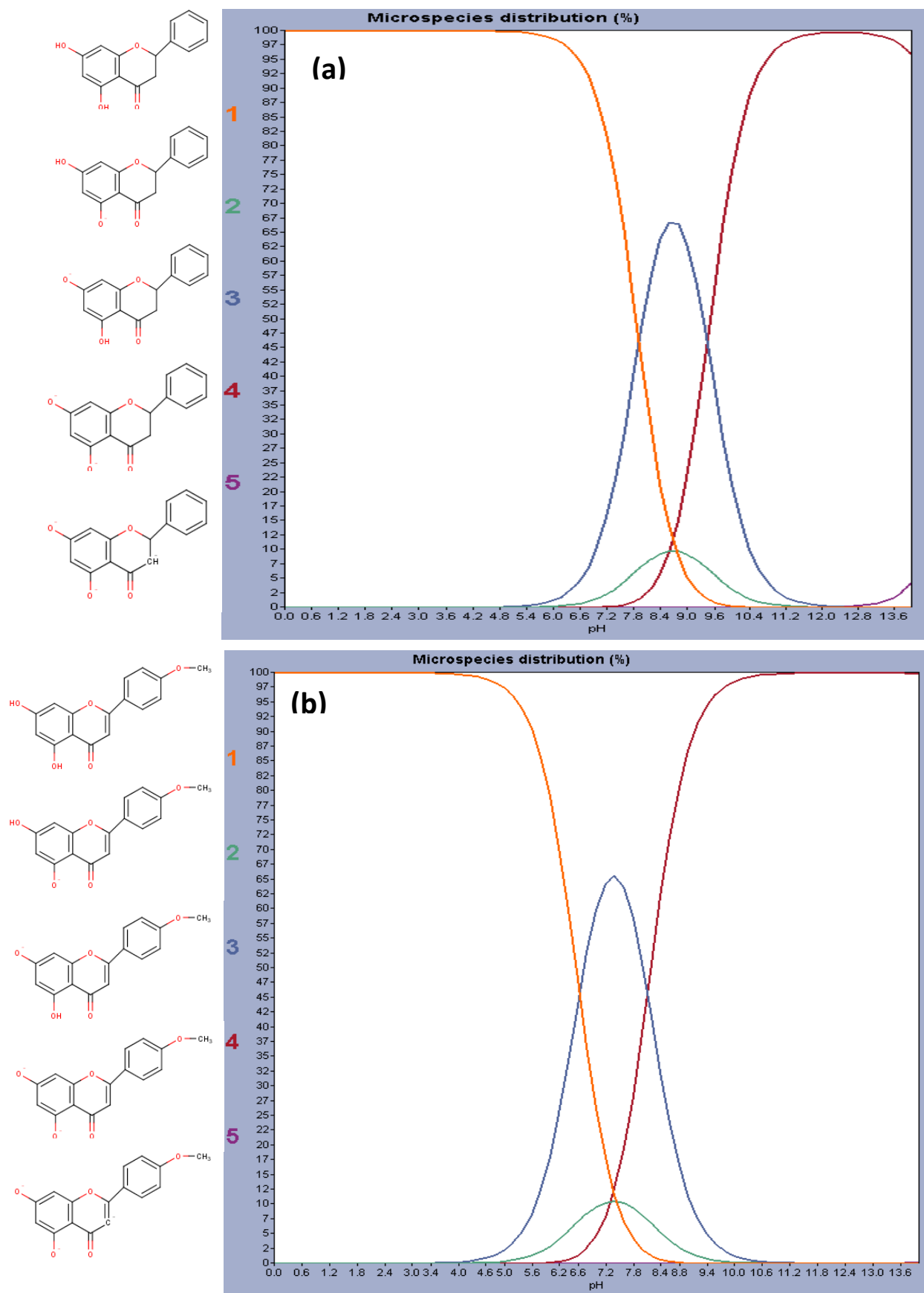


Figura 5.2 Diagrama de distribución de especies de la pinocembrina (a) y la acetina (b)

## 5.2 Método bioanalítico para la cuantificación de Atenolol y Propranolol en estudios de transporte *in vitro* con células Caco-2

### 5.2.1 Desarrollo del método

Para demostrar la aptitud del modelo de permeabilidad empleado para clasificar a los flavonoides se seleccionó, en primer lugar, dos fármacos modelo con características de alta y baja absorción. Para ambos fármacos, la literatura farmacológica describe sus mecanismos de absorción y el orden de los valores del coeficiente de permeabilidad.

Así, para evaluar el transporte en dos direcciones: apical-basolateral y basolateral apical se desarrolló un método bioanalítico por cromatografía de líquidos de alta resolución, en el modo fase reversa, con detección UV, para los marcadores seleccionados. Para ello, se tomaron como base algunos métodos cromatográficos descritos en la literatura (Basci *et al.*, 1998; Delamoye *et al.*, 2004; Mondamio *et al.*, 1996; Ranta *et al.*, 2002). De acuerdo con las condiciones cromatográficas reportadas, se probaron distintas columnas y fases móviles de diferente composición, en las que fue necesario agregar un ácido orgánico, como modificador de pH, para disminuir el coqueo generado por la interacción de los analitos con los silanoles libres de la fase estacionaria (Sadek, 2002). La óptima resolución de los constituyentes en la muestra se obtuvo con las siguientes condiciones cromatográficas:

Fase móvil:

Gradiente:

Tiempo (min)	TFA 0.03%	MeCN
0-3.5	87	13
3.6-8.0	55	45
8.1-10.0	87	13

Columna:

Fortis H<sub>2</sub>O C<sub>18</sub> 150x4.6 mm 5 μm

Flujo:

1.0 mL/min

Volumen de inyección:

20 μL

Longitud de onda de detección:

Atenolol 224 nm y Propranolol 290 nm

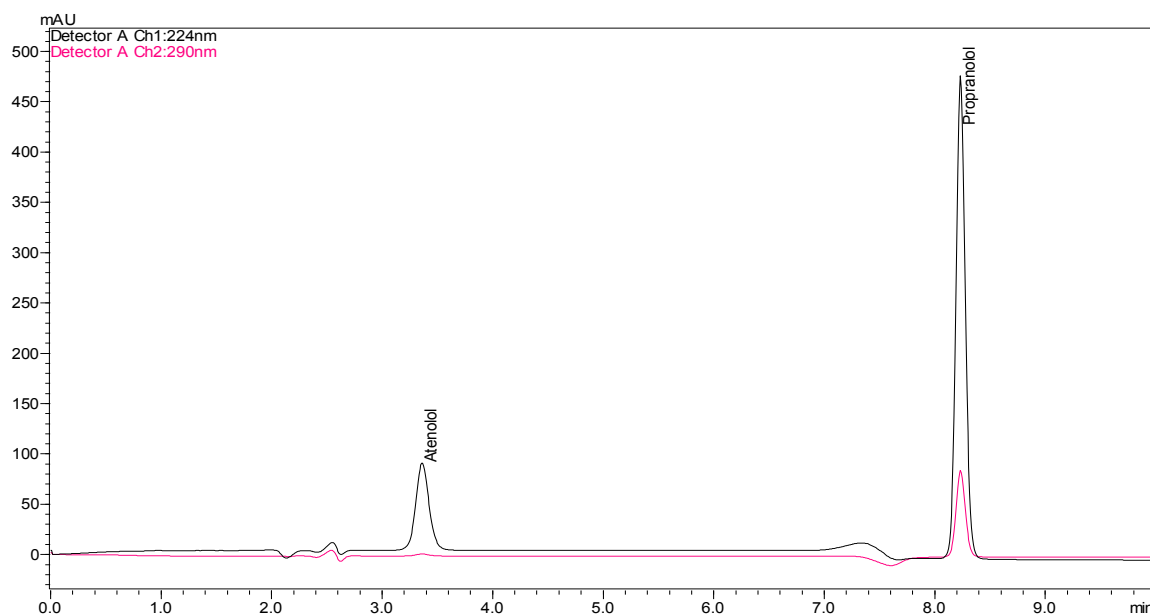
Los parámetros cromatográficos obtenidos para cada compuesto se resumen en la **Tabla 5.2**. Como se deduce de la información presentada, la resolución (*R*) entre las señales indica una buena separación entre ambos compuestos.

**Tabla 5.2.** Parámetros cromatográficos obtenidos para el atenolol y el propranolol con el método desarrollado

	Atenolol	Propranolol
Tiempo de retención(tr):	3.36 min	8.23 min
Factor de retención (k')	0.35	2.31
Resolución (R)	24.46	
Ancho a la base al 5% de altura (W <sub>b5%</sub> ):	0.297 min	0.202 min
Factor de coileo	1.11	1.13

Cabe mencionar, que la señal del propranolol se registró a 224 nm, en lugar de 290 nm, considerando que con esta última longitud de onda se obtuvo una menor variabilidad en la respuesta debida a la disminución del ruido en la línea base del cromatograma.

En la **Figura 5.3** se ilustra el cromatograma obtenido con una disolución de atenolol y el propranolol empleando el método cromatográfico desarrollado.



**Figura 5.3** Cromatograma obtenido con los estándares de atenolol y propranolol a una concentración de 100  $\mu$ M

## 5.2.2 Evaluación del sistema

### 5.2.2.1 Precisión

La precisión del sistema se evaluó a través del coeficiente de variación obtenido con la respuesta de 5 muestras. Este valor estadístico representa la variabilidad inherente asociada con la respuesta analítica y que puede ser originada por el analista, el equipo y los instrumentos de medición, entre otros (ICH, 2005). En la **Tabla 5.3** se observa que el coeficiente de variación obtenido fue menor al 1.6% para ambos compuestos, en los tres niveles de concentración evaluados. Por lo tanto, el sistema demuestra buena precisión.

**Tabla 5.3** Precisión del sistema para la cuantificación de atenolol y propranolol

No. muestra	Área (mUA)					
	Atenolol			Propranolol		
	Muestra control baja 3 µM	Muestra control media 20 µM	Muestra control alta 75 µM	Muestra control baja 3 µM	Muestra control media 20 µM	Muestra control alta 75 µM
1	28968	196805	739329	122480	785432	2842585
2	28429	193884	740110	122325	775225	2835380
3	29127	193772	739482	123117	779102	2833634
4	29310	195679	737072	121493	782942	2827348
5	27913	197137	737351	121143	787100	2838810
Promedio	28749.4	195455.4	738668.8	122111.6	781960.2	2835551.4
S	571.6	1581.3	1365.7	792.6	4821.0	5724.8
CV (%)	1.99	0.81	0.19	0.65	0.62	0.20

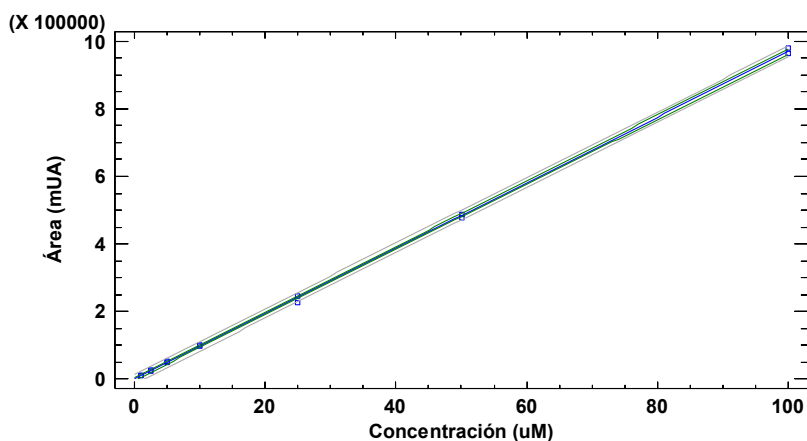
### 5.2.2.2 Linealidad

El ajuste de las respuestas obtenidas para los analitos en función de su concentración se realizó mediante una regresión lineal. El comportamiento observado al relacionar la concentración con la respuesta obtenida se ilustra en las **Gráficas 5.1 y 5.2**. En ambos casos, el coeficiente de correlación calculado fue mayor a 0.999, indicando con ello, que existe una relación relativamente fuerte entre las variables. Asimismo, en las **Tablas 5.4 y 5.6** se muestran los valores estimados del intercepto y la pendiente, así como sus intervalos de confianza.

Por otra parte, el análisis de varianza, para ambos modelos, permitió estimar a través de un valor-P menor a 0.05 (**Tablas 5.5 y 5.7**), que existe una relación lineal estadísticamente significativa entre el área del pico cromatográfico y la concentración con un nivel de confianza del 95.0%. También, se observa que de acuerdo con los valores de los coeficientes de determinación ( $r^2$ ), las ecuaciones que describen los modelos lineales explican más del 99.9% de la variabilidad en la respuesta (área).



Con base en estos resultados se concluye que el sistema es lineal en el intervalo de concentraciones establecido (1-100  $\mu\text{M}$  para el atenolol y el propranolol).



**Gráfica 5.1** Linealidad del sistema para cuantificar atenolol

Ecuación que describe el modelo:  $\text{Área} = -628.11 + 9705.28 \cdot \text{Concentración}$

Coefficiente de correlación ( $r$ ) = 0.9998

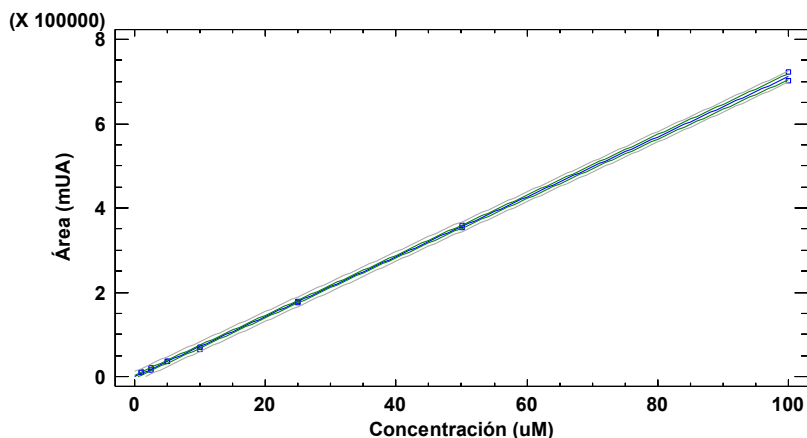
Coefficiente de determinación ( $r^2$ ) = 99.97%

**Tabla 5.4** Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del sistema para cuantificar atenolol

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
Intercepto	-628.11	2193.62	-5407.61	4151.38
Pendiente	9705.28	50.41	9595.45499	9815.10616

**Tabla 5.5** Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del sistema para cuantificar atenolol

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-calculada	Valor P
Modelo	1.4898E12	1	1.4898E12	37072.25	<0.05
Residual	4.82242E8	12	4.01868E7		
Total (Corr.)	1.4903E12	13			



**Gráfica 5.2** Linealidad del sistema para cuantificar propranolol

Ecuación que describe al modelo:  $\text{Área} = -424.14 + 7118.43 \cdot \text{Concentración}$   
 Coeficiente de correlación ( $r$ ) = 0.9998  
 Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) = 99.96 %

**Tabla 5.6** Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del sistema para cuantificar propranolol

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
Intercepto	-424.14	1761.56	-3908.2667	3767.94289
Pendiente	7118.43	39.40	7025.18393	7201.57197

**Tabla 5.7** Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del sistema para cuantificar propranolol

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F-Calculada	Valor P
Modelo	8.01466E11	1	8.01466E11	32646.37	<0.05
Residual	2.94599E8	12	2.45499E7		
Total (Corr.)	8.0176E11	13			

### 5.2.3 Validación del método

La validación del método se realizó de acuerdo con la revisión número 1 de la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos emitida por la FDA en el 2013. Las recomendaciones que se proporcionan en este documento son útiles para procedimientos bioanalíticos donde se aplique, entre otras, la técnica de HPLC para la determinación cuantitativa de fármacos y/o metabolitos en matrices biológicas. El empleo de métodos analíticos selectivos, sensibles y validados para evaluar cuantitativamente los fármacos y sus metabolitos es crítico para conducir exitosamente los estudios preclínicos, biofarmacéuticos y clínicos. La validación

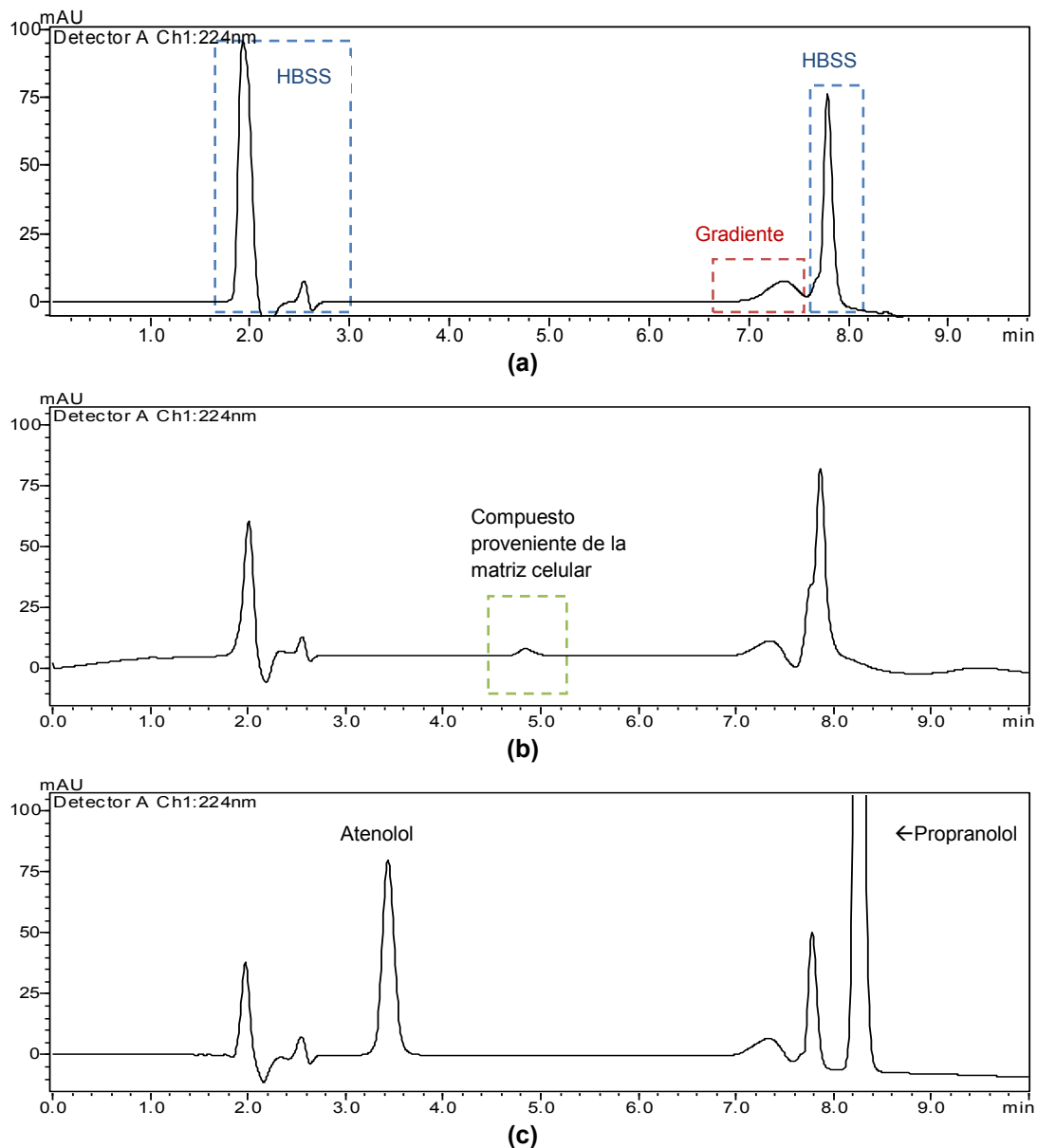
de métodos bioanalíticos incluye la demostración de que todos los procedimientos de un método en particular, usado para la medición cuantitativa de analitos en una matriz biológica dada, son confiables y reproducibles para el uso que se pretende (FDA, 2013).

A continuación se describen los resultados obtenidos para cada uno de los parámetros de desempeño evaluados:

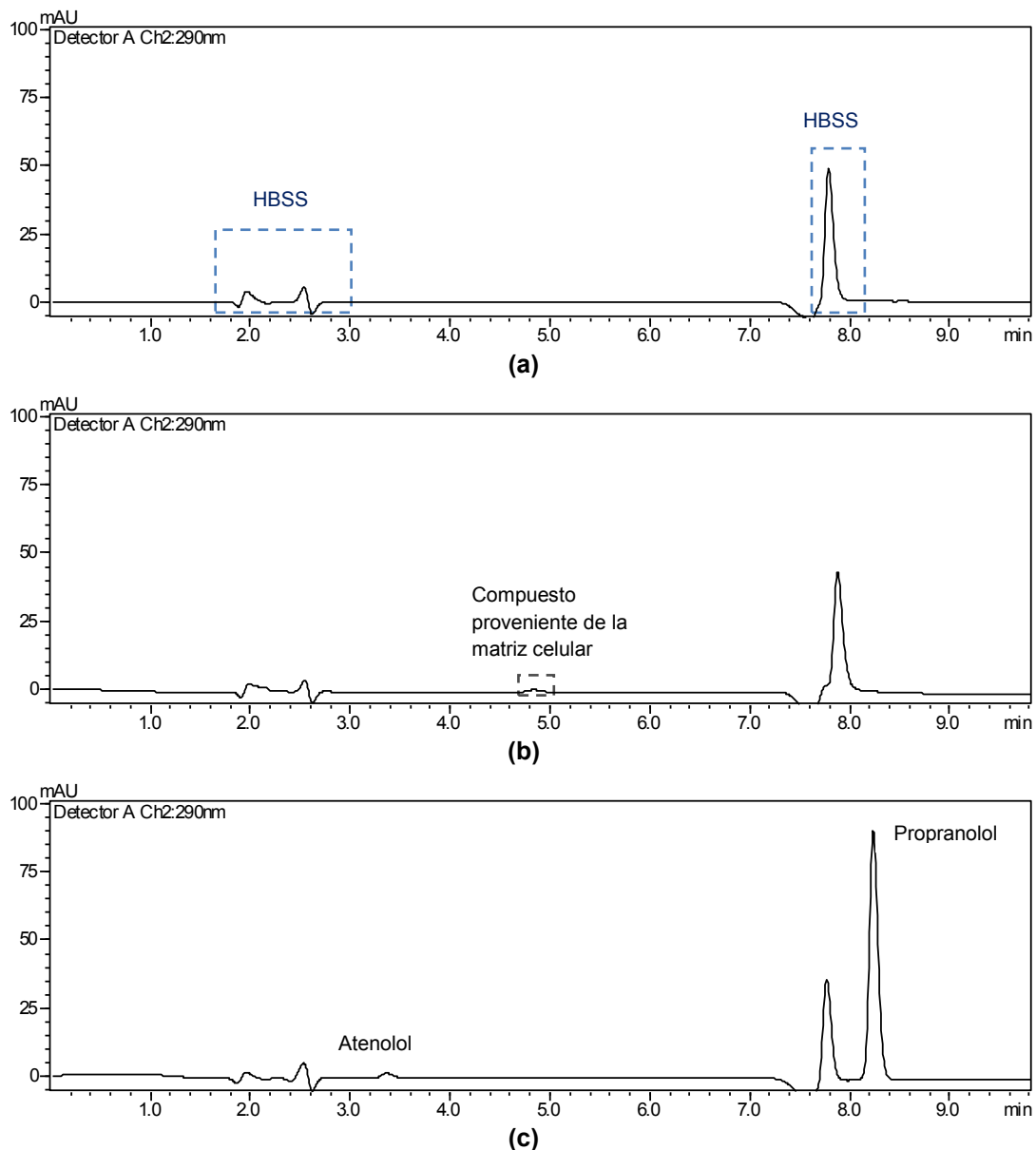
#### 5.2.3.1 Selectividad

La selectividad es la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el analito en presencia de otros compuestos contenidos en la muestra. Entre las sustancias que pueden interferir en una matriz biológica se encuentran los componentes endógenos de la matriz y los productos de degradación, por tan solo mencionar algunos (FDA, 2013).

En las **Figuras 5.4** y **5.5** se ilustran los cromatogramas obtenidos con la solución amortiguadora de Hank (**a**), la matriz de la muestra, es decir, la solución amortiguadora de Hank en contacto directo con la monocapa celular formada en las placas Transwell (**b**) y el atenolol y el propranolol a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  (**c**). Como se observa en los cromatogramas las señales debidas a los diluyentes y a la matriz celular no interfieren con las señales generadas por el propranolol y el atenolol. Cabe mencionar que en los cromatogramas obtenidos con las disoluciones al límite inferior de cuantificación tampoco se observó ninguna interferencia con la respuesta de los compuestos. Por lo tanto, la respuesta medida en este método se debe únicamente a los analitos de interés.



**Figura 5.4** Cromatogramas obtenidos para evaluar la selectividad del método para cuantificar atenolol a 224 nm: HBSS (a), HBSS en contacto con la monocapa celular Caco-2 (b), atenolol a una concentración de 100  $\mu$ M (c)



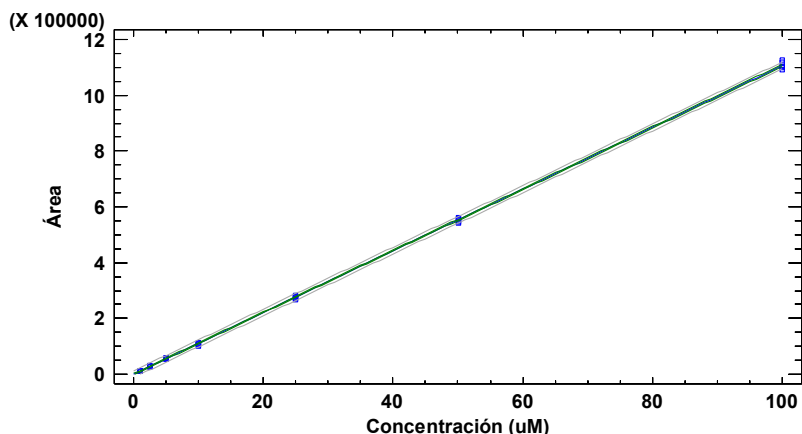
**Figura 5.5** Cromatogramas obtenidos para evaluar la selectividad del método para cuantificar propranolol a 290 nm: HBSS (a), HBSS en contacto con la monocapa celular Caco-2 (b), propranolol a una concentración de 100  $\mu$ M (c)

### 5.2.3.2 Linealidad del método

El intervalo de concentraciones en el que se evaluó la linealidad se estableció con base en la concentración máxima evaluada o esperada en los estudios de permeabilidad y la concentración mínima cuantificable en el equipo cromatográfico de manera exacta y precisa. En las **Gráficas 5.3** y **5.4** se ilustra la relación existente entre el área y la concentración para el atenolol y el propranolol,

respectivamente. Como se observa, la respuesta obtenida para cada compuesto es directamente proporcional a su concentración. En las **Tablas 5.8** y **5.10** se muestran los valores estimados del intercepto y de la pendiente, así como los intervalos de confianza obtenidos para cada uno.

El análisis de los datos mediante una regresión lineal permitió estimar un coeficiente de correlación mayor a 0.999 para ambos fármacos, indicando una relación relativamente fuerte entre las variables. Asimismo, el análisis de varianza de cada modelo (**Tablas 5.9** y **5.11**), permitió calcular un valor P menor a 0.05 en ambos casos corroborando, con ello, que existe una relación lineal estadísticamente significativa entre el área y la concentración. Finalmente, los coeficientes de determinación resultantes de los análisis estadísticos indican que más del 99.9% de la variabilidad obtenida en la respuesta está explicada por el modelo de linealidad ajustado para el atenolol y el propranolol.



**Gráfica 5.3** Linealidad del método para cuantificar atenolol

Ecuación que describe el modelo:  $-120.549 + 11067.5 \cdot \text{Concentración}$

Coefficiente de correlación ( $r$ ) = 0.99989

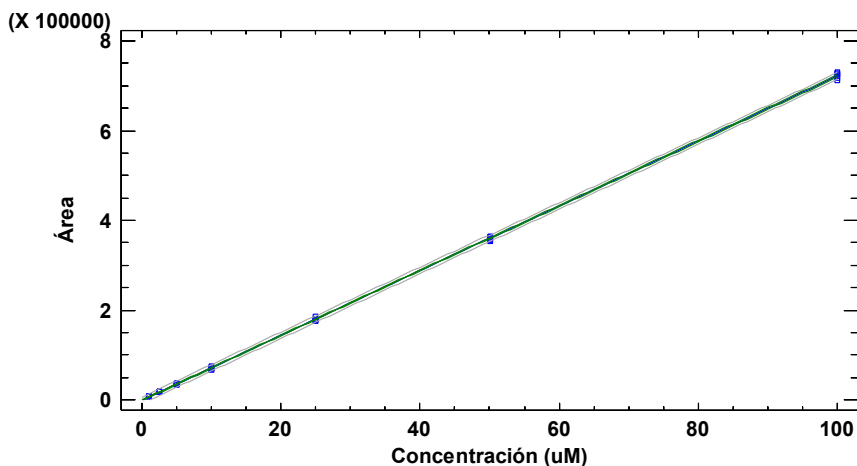
Coefficiente de determinación ( $r^2$ ) = 99.98 %

**Tabla 5.8** Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del método para cuantificar atenolol

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
Intercepto	-120.549	1186.18	-2517.92	2276.82
Pendiente	11067.5	27.2568	11012.46	11122.63

**Tabla 5.9** Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del método para cuantificar atenolol

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F calculado	Valor-P
Modelo	5.81219E12	1	5.81219E12	164874.60	<0.05
Residual	1.41009E9	40	3.52522E7		
Total (Corr.)	5.8136E12	41			



**Gráfica 5.4** Linealidad del método para cuantificar propranolol

Ecuación que describe al modelo:  $-1125.1 + 7227.75 \cdot \text{Concentración}$

Coefficiente de correlación ( $r$ ) = 0.99990

Coefficiente de determinación ( $r^2$ ) = 99.98 %

**Tabla 5.10** Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo para cuantificar propranolol

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
Intercepto	-1125.10	689.17	-2580.32	579.73
Pendiente	7227.75	15.84	7192.89	7261.37

**Tabla 5.11** Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del método para cuantificar propranolol

Fuente de variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F calculado	Valor-P
Modelo	2.47882E12	1	2.47882E12	208308.86	<0.05
Residual	4.75989E8	40	1.18997E7		
Total (Corr.)	2.47929E12	41			

### 5.2.3.3 Precisión y Exactitud

La precisión del método fue evaluada a través de la repetibilidad y la precisión intermedia. En la **Tabla 5.12** se resumen los valores de los coeficientes de variación calculados para el análisis de las muestras de atenolol y propranolol en cada nivel de concentración. En todos los casos, el coeficiente de variación obtenido fue menor al 3%. Por consiguiente, la variación obtenida está dentro del límite establecido por la Guía de Validación, el cual debe ser menor o igual al 15%. Asimismo, la variación obtenida en diferentes días y con diferentes analistas (precisión intermedia), en cada nivel de concentración, es menor que el límite especificado (**Tablas 5.13 y 5.14**).

En la **Tabla 5.12** también se resumen los resultados para evaluar la exactitud del método. La diferencia absoluta entre el promedio del porcentaje recuperado y el valor nominal es menor del 3%, en los tres niveles de concentración evaluados, para ambos analitos. De esta manera los resultados obtenidos cumplen satisfactoriamente con la especificación establecida en la guía (la diferencia absoluta debe ser menor al 15%).

En concordancia con los resultados obtenidos, se deduce que el método presenta buena precisión y exactitud para cuantificar el atenolol y el propranolol en los estudios de transporte *in vitro*.

**Tabla 5.12** Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad y la exactitud del método para cuantificar atenolol y propranolol

No. muestra	Concentración Recuperada ( $\mu\text{M}$ )					
	Atenolol			Propranolol		
	Muestra control baja 3 $\mu\text{M}$	Muestra control media 20 $\mu\text{M}$	Muestra control alta 75 $\mu\text{M}$	Muestra control baja 3 $\mu\text{M}$	Muestra control media 20 $\mu\text{M}$	Muestra control alta 75 $\mu\text{M}$
1	3.01	20.98	76.52	3.00	20.25	75.77
2	2.97	20.17	74.68	3.03	20.07	76.18
3	3.04	20.24	77.13	2.96	20.20	76.24
4	3.05	20.80	76.15	3.12	19.83	77.25
5	2.94	20.30	77.96	3.07	19.93	76.00
Promedio	3.00	20.50	76.49	3.04	20.06	76.29
S	0.05	0.37	1.22	0.06	0.18	0.57
CV (%)	<b>1.55</b>	<b>1.79</b>	<b>1.60</b>	<b>1.98</b>	<b>0.87</b>	<b>0.74</b>
Exactitud (%)	<b>100.07</b>	<b>102.49</b>	<b>101.98</b>	<b>101.22</b>	<b>100.29</b>	<b>101.72</b>
Diferencia respecto al valor nominal	<b>0.07</b>	<b>2.49</b>	<b>1.98</b>	<b>1.22</b>	<b>0.29</b>	<b>1.72</b>



**Tabla 5.13** Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método para cuantificar atenolol

Concentración (µM)	Concentración recuperada (µM)				X	S	CV (%)
	Día 1		Día 2				
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2			
75	77.84	77.13	76.86	76.95	77.15	1.03	1.33
	77.65	77.96	78.44	77.77			
	76.52	74.68	76.15	77.87			
20	21.05	20.17	20.75	20.82	20.73	0.34	1.64
	21.01	20.30	20.76	20.79			
	20.98	20.94	21.05	20.13			
3	2.92	3.04	2.79	3.06	2.96	0.07	2.34
	3.01	2.94	3.00	2.93			
	2.97	2.94	2.95	2.97			

**Tabla 5.14** Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método para cuantificar propranolol

Concentración (µM)	Concentración recuperada (µM)				$\bar{X}$	S	CV (%)
	Día 1		Día 2				
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2			
75	75.77	74.71	75.11	74.03	74.91	0.77	1.03
	76.18	75.09	73.95	74.14			
	76.00	74.90	74.94	74.14			
20	20.25	20.25	19.87	20.04	19.94	0.29	1.47
	19.83	19.48	20.10	20.26			
	19.93	19.32	20.01	19.96			
3	3.00	3.06	2.94	3.03	3.00	0.05	1.80
	3.03	3.04	2.88	3.03			
	2.96	3.05	2.99	2.97			

#### 5.2.3.4 Recobro

En las **Tablas 5.15** y **5.16** se presentan los resultados obtenidos para evaluar el recobro del atenolol y el propranolol en la matriz biológica, respectivamente. Como se deduce de la información presentada, los promedios obtenidos con las respuestas de cada analito en la matriz biológica y en la fase móvil son similares; por consiguiente, los porcentajes de recobro calculados son cercanos al 100% en los tres niveles de concentración. De acuerdo con los valores de los coeficientes de variación calculados, se observa además, que el recobro es

preciso y consistente para los dos fármacos. De esta manera, el conjunto de resultados descritos cumple con lo establecido en la guía emitida por la FDA.

**Tabla 5.15** Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método de cuantificación del atenolol

Concentración (µM)	$\bar{X}$ Área del analito en Fase Móvil (mUA)	$\bar{X}$ Área del analito en HBSS (mUA)	$\bar{X}$ Recobro Absoluto (%)
75	738954	739107.8	100.02
20	198402	201519.6	101.58
3	29109.4	29276.8	100.58
			100.04
		S	0.78
		CV	0.77

**Tabla 5.16** Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método de cuantificación del propranolol

Concentración (µM)	$\bar{X}$ Área del analito en Fase Móvil (mUA)	$\bar{X}$ Área del analito en HBSS (mUA)	$\bar{X}$ Recobro Absoluto (%)
75	539526.2	545928.2	100.20
20	146750.8	146905.8	101.11
3	22355.4	22008.2	98.45
			99.91
		S	1.38
		CV	1.38

### 5.2.3.5 Límite de cuantificación

La concentración mínima a la cual fue posible cuantificar el atenolol y el propranolol de manera reproducible y exacta fue de 1 µM para cada fármaco. En la **Tabla 5.17** se sintetizan los resultados obtenidos para evaluar la precisión y la exactitud de las disoluciones preparadas para cada analito en esta concentración. Para los dos fármacos, la variación obtenida fue menor al 20% y la desviación de la media de la concentración recuperada respecto a su valor nominal también es menor al 20%. Por lo tanto, los resultados cumplen con los requerimientos especificados en la guía de validación para establecer esta concentración como límite de cuantificación.

**Tabla 5.17** Precisión y exactitud del límite inferior de cuantificación del atenolol y el propranolol

No. muestra	Concentración Recuperada ( $\mu\text{M}$ )	
	Atenolol 1 $\mu\text{M}$	Propranolol 1 $\mu\text{M}$
1	1.06	1.01
2	1.03	1.03
3	1.07	1.02
4	1.07	1.03
5	1.03	1.04
Promedio	1.05	1.03
S	0.02	0.01
CV (%)	1.65	0.99
Exactitud (%)	105.22	102.78
Diferencia absoluta respecto al Valor Real (%)	5.22	2.78

### 5.2.3.6 Estabilidad de la muestra

En las **Tablas 5.18** y **5.19** se presentan los resultados generados para evaluar la estabilidad de las muestras de los analitos en las diferentes condiciones. La media de la diferencia absoluta respecto al valor nominal para ambos compuestos se encuentra entre 8.17% y 0.02%. De acuerdo con la guía de validación de métodos bioanalíticos la muestra es estable si el porcentaje de variación es menor al 15%. En consecuencia, se deduce que las muestras de atenolol y propranolol son estables durante 24 h a temperatura ambiente, después de 3 ciclos de congelación-descongelación y en congelación durante 30 días.

**Tabla 5.18** Resultados de estabilidad para las muestras de atenolol

	Muestra control alta 75 $\mu\text{M}$		Muestra control media 20 $\mu\text{M}$		Muestra control baja 3 $\mu\text{M}$	
	Media Conc. recuperada $\pm$ S ( $\mu\text{M}$ )	Diferencia respecto al VN (%)	Media Conc. recuperada $\pm$ S ( $\mu\text{M}$ )	Diferencia respecto al VN (%)	Media Conc. recuperada $\pm$ S ( $\mu\text{M}$ )	Diferencia respecto al VN (%)
Estabilidad 24h en automuestreador	72.85 $\pm$ 0.35	2.87	19.73 $\pm$ 0.23	1.35	2.83 $\pm$ 0.00	5.73
Ciclo 1 Congelación-Descongelación	72.33 $\pm$ 0.30	3.56	19.60 $\pm$ 0.05	1.99	2.80 $\pm$ 0.02	6.62
Ciclo 2 Congelación-Descongelación	72.62 $\pm$ 0.07	3.18	19.32 $\pm$ 0.00	3.41	2.75 $\pm$ 0.01	8.17
Ciclo 3 Congelación-Descongelación	74.09 $\pm$ 0.09	1.21	19.07 $\pm$ 0.94	4.67	3.11 $\pm$ 0.07	3.76
Estabilidad a largo plazo	74.69 $\pm$ 0.41	0.42	19.10 $\pm$ 0.10	4.48	3.06 $\pm$ 0.03	1.91

**Tabla 5.19** Resultados de estabilidad para las muestras de propranolol

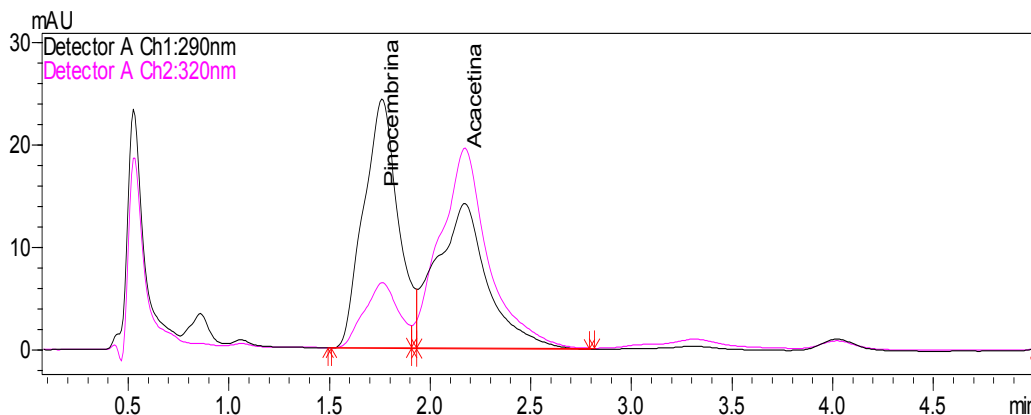
	75 $\mu$ M		20 $\mu$ M		3 $\mu$ M	
	Media Conc. recuperada $\pm$ S ( $\mu$ M)	Diferencia respecto al VN (%)	Media Conc. recuperada $\pm$ S ( $\mu$ M)	Diferencia respecto al VN (%)	Media Conc. recuperada $\pm$ S ( $\mu$ M)	Diferencia respecto al VN (%)
Estabilidad 24h en automuestreador	76.18 $\pm$ 0.53	2.07	21.09 $\pm$ 0.44	5.45	3.19 $\pm$ 0.15	6.29
Ciclo 1 Congelación-Descongelación	74.98 $\pm$ 0.22	0.03	21.20 $\pm$ 0.05	5.98	2.93 $\pm$ 0.08	4.96
Ciclo 2 Congelación-Descongelación	74.98 $\pm$ 0.27	0.02	21.12 $\pm$ 0.03	5.58	2.85 $\pm$ 0.04	2.48
Ciclo 3 Congelación-Descongelación	75.31 $\pm$ 0.09	0.42	21.23 $\pm$ 0.04	6.17	2.92 $\pm$ 0.00	0.72
Estabilidad a largo plazo	74.86 $\pm$ 0.29	0.19	19.10 $\pm$ 0.10	3.55	3.16 $\pm$ 0.10	5.35

### 5.3 Método bioanalítico para la cuantificación de pinocembrina y acetina en estudios de transporte *in vitro* con células Caco-2

#### 5.3.1 Desarrollo del método

Para desarrollar el método bioanalítico se utilizó una columna XBridge C<sub>18</sub> (Waters, tamaño de partícula de 5  $\mu$ m), de 4.6 mm de diámetro interno y 50 mm de longitud. De acuerdo con la literatura científica, para el análisis de flavonoides por HPLC en el modo de fase reversa, se utiliza una fase móvil compuesta por algún disolvente orgánico (MeOH o MeCN), agua y algún ácido como supresor iónico para lograr una mayor retención. Entre los ácidos más utilizados destacan el ácido acético, el fórmico, el cítrico y el trifluoroacético (Waksmundzka *et al.*, 2011). Con base en estas consideraciones, para el desarrollo del método se seleccionó el ácido trifluoroacético por disponibilidad y considerando su respuesta al UV (cutoff = 210 nm) y metanol como disolvente orgánico (Sadek, 2002).

Para encontrar el flujo y las proporciones óptimas de MeOH y TFA en la fase móvil, se realizó un diseño de experimentos factorial 2<sup>3</sup>. Los cromatogramas registrados en 8 de los experimentos del diseño permitieron establecer que una concentración de TFA al 0.01% no permitía una separación eficiente de los flavonoides (**Figura 5.6**). Considerando estos hallazgos se generó entonces un diseño factorial 2<sup>2</sup> eliminando la concentración de TFA como factor y manteniéndolo en una concentración fija (0.1%). En la **Tabla 5.20** se resumen los factores y los niveles evaluados en el diseño.



**Figura 5.6** Cromatograma de acacetina y pinocembrina obtenido con MeOH:TFA 0.01% (60:40) y flujo de 1.5 mL/min

**Tabla 5.20** Factores evaluados en el diseño experimental  $2^2$

Factor	Nivel alto	Nivel bajo
Proporción de MeOH (%):	60	55
Flujo (mL/min):	1.0	1.5

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el empleo del programa STATGRAPHICS Centurion XV. Para obtener las condiciones cromatográficas óptimas de cuantificación para ambos analitos en la matriz biológica se analizaron los diagramas de Pareto y se realizó un análisis de superficie de respuesta estimada.

En la **Figura 5.7** se ilustran los diagramas de Pareto de los factores evaluados sobre cada una de las respuestas seleccionadas. De manera general, se observa que para los dos analitos el área es afectada únicamente por el flujo; la altura por la proporción de MeOH y el flujo y, finalmente, ambos factores y su interacción ejercen un efecto significativo sobre el ancho del pico y la resolución. La mayoría de los factores evaluados tuvo un efecto negativo sobre la respuesta (a medida que se incrementa cada factor la respuesta disminuye) excepto, la proporción de metanol sobre la altura ya que, entre mayor porcentaje de MeOH se utilice en la fase móvil la altura de los picos aumenta.

Posteriormente, se realizó una optimización de respuesta múltiple con el objetivo de encontrar la óptima combinación entre los dos factores evaluados para obtener la mayor área, altura y resolución y picos menos anchos.

En la **Gráfica 5.5** se presenta la Superficie de Respuesta Estimada, donde se ilustra la respuesta pretendida en función del flujo y el porcentaje de MeOH; asimismo, en la **Tabla 5.21** se resumen los valores óptimos para obtener la respuesta deseada. En concordancia con ambos factores se necesita emplear 60% de MeOH en la fase móvil y un flujo de 1.0 mL/min para obtener los resultados buscados. Por lo tanto, estas fueron las condiciones cromatográficas consideradas para desarrollar el método bioanalítico. Además, se seleccionaron las longitudes de onda de máxima absorción para cada flavonoide: 290 nm para la pinocembrina y 320 nm para la acacetina.

**Tabla 5.21** Optimización de respuesta múltiple

<b>Factor</b>	<b>Nivel alto</b>	<b>Nivel bajo</b>	<b>Nivel Óptimo</b>
Proporción de MeOH (%):	60	55	60
Flujo (mL/min):	1.0	1.5	1.0

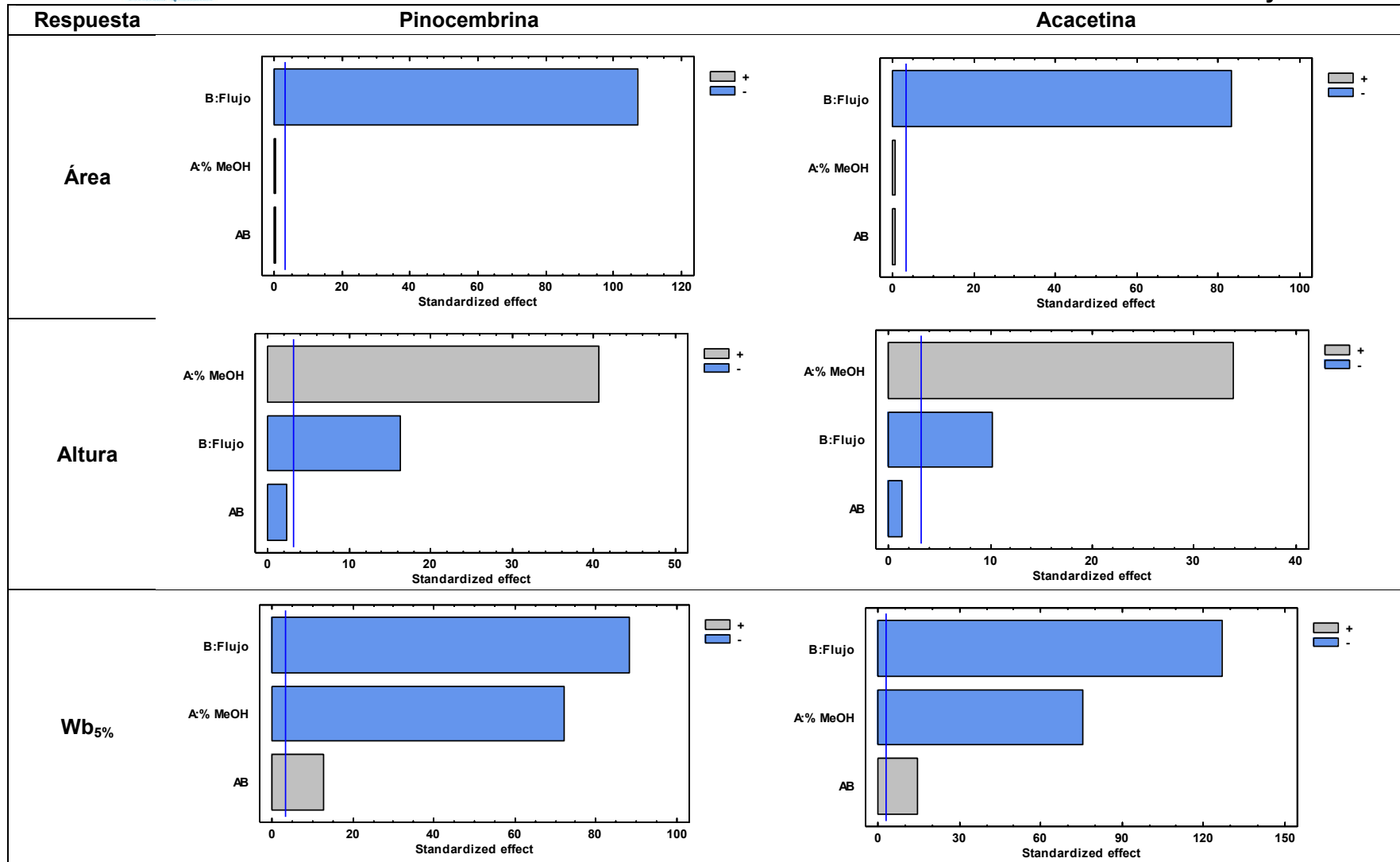


Figura 5.7 Diagramas de Pareto de los factores evaluados para cada respuesta

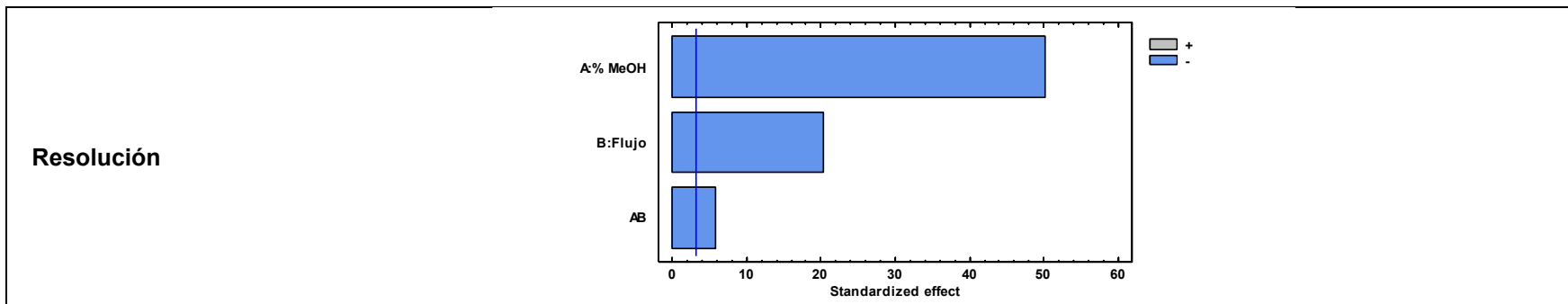
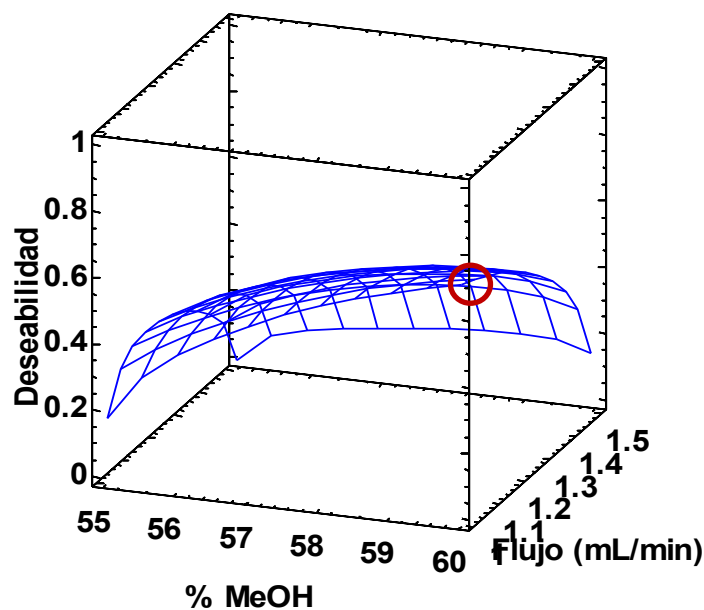


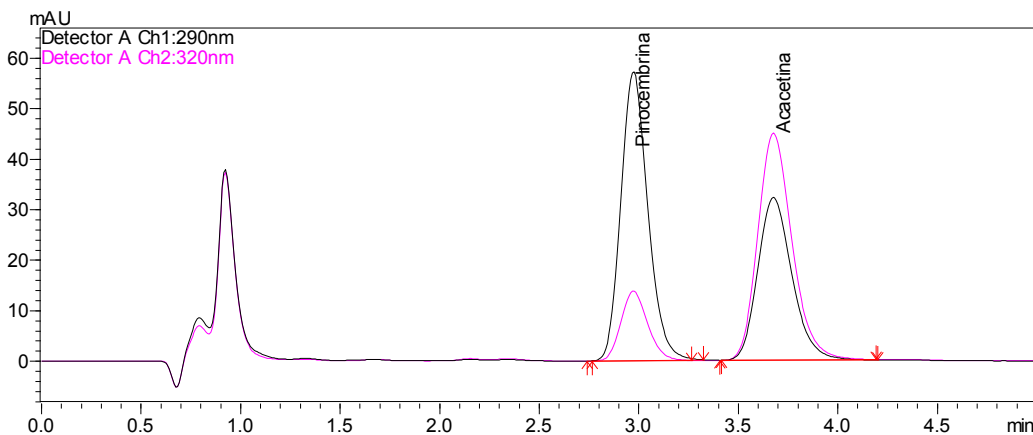
Figura 5.7 Diagramas de Pareto de los factores evaluados para cada respuesta (continuación)



Grafica 5.5 Superficie de respuesta estimada de los factores evaluados para establecer las condiciones cromatográficas del método para cuantificar pinocembrina y acetina



Finalmente, en la **Figura 5.8** se ilustra el cromatograma obtenido con el método bioanalítico desarrollado para cuantificar pinocembrina y acetina.



**Figura 5.8** Cromatograma obtenido con el método desarrollado para pinocembrina y acetina a una concentración de 100 µg/mL.

Por otra parte, y de acuerdo con las propiedades fisicoquímicas calculadas para los flavonoides (sección 5.1), ambos productos naturales presentan una baja solubilidad intrínseca en agua. Por lo tanto, para lograr su disolución total en el medio de transporte de Hank, los compuestos se disolvieron inicialmente con dimetilsulfóxido. Enseguida, se realizó una dilución en medio acuoso, empleando agua a pH=12 (ajustada con NaOH). El disolvente básico se seleccionó considerando la naturaleza ácida de los flavonoides y su capacidad de ionizarse a pH's por encima de su pka, de esta forma se incrementó considerablemente su solubilidad acuosa. Como se observa en la **Figura 5.1**, a este valor de pH, se tiene la máxima solubilidad acuosa para ambos compuestos y predominan las especies en las que los hidroxilos se encuentran ionizados (diagrama de distribución de especies en función del pH; **Figura 5.2**). Finalmente, la última dilución se realizó con la solución amortiguadora de Hank pH 7.4. La concentración de DMSO en las disoluciones finales, que estarían en contacto directo con las células, fue máximo de 0.4%. Esta concentración no rebasa el límite recomendado por los protocolos de permeabilidad, donde se sugiere emplear como cosolvente DMSO en una concentración final máxima del 1% para evitar el daño a la monocapa celular (Hubatsch, *et al.*, 2007).

### 5.3.2 Evaluación del sistema

#### 5.3.2.1 Precisión

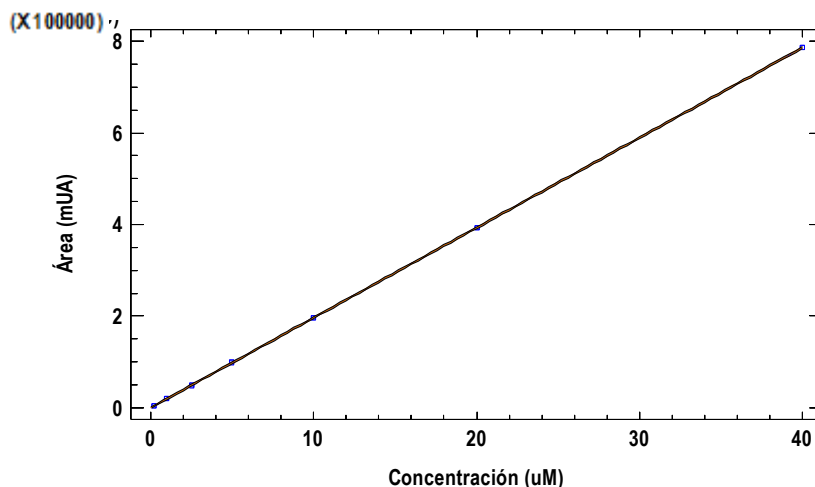
Se determinó la precisión del sistema, para cada flavonoide, en tres niveles de concentración: alto, medio y bajo. Los resultados obtenidos se sintetizan en la **Tabla 5.22**. En la información presentada el coeficiente de variación obtenido en todos los casos no es mayor al 1.5 %. Por lo tanto, se deduce que el sistema presenta buena precisión para cuantificar tanto a la pinocembrina como a la acacetina.

**Tabla 5.22** Precisión del sistema para cuantificar pinocembrina y acacetina

No. muestra	Área (mUA)					
	Pinocembrina			Acacetina		
	Muestra control baja 0.6 µM	Muestra control media 15 µM	Muestra control alta 30 µM	Muestra control baja 0.6 µM	Muestra control media 15 µM	Muestra control alta 30 µM
1	10985	266194	527970	11048	289508	594299
2	10602	267544	529392	11038	290539	587825
3	10781	267259	527426	11235	290397	591219
4	10805	267402	529174	10954	291828	589473
5	10598	266861	530545	10886	289599	590493
Promedio	10754.2	267052	528901.4	11032.2	290374.2	590661.8
S	161.3	543.2	1230.9	131.2	934.4	2399.4
CV (%)	1.50	0.20	0.23	1.19	0.32	0.41

#### 5.3.2.2 Linealidad

En las **Gráficas 5.6** y **5.7** se observa que las respuestas obtenidas, con diferentes concentraciones de cada flavonoide, presentan una tendencia lineal. Por otro lado, las **Tablas 5.23** y **5.25** resumen los valores estimados del intercepto y de la pendiente de la ecuación que describe a ambos modelos y sus respectivos intervalos de confianza. Esta aseveración se confirma con el análisis de varianza de cada modelo de regresión lineal (**Tablas 5.24** y **5.26**) en donde los valores estadísticos P son menores que el error ( $\alpha=5\%$ ), indicando que existe una relación lineal estadísticamente significativa entre las variables. Asimismo, los coeficientes de determinación calculados permiten concluir que más del 99% de la variabilidad en los datos de pinocembrina y de acacetina está explicada por los modelos lineales estimados.



**Gráfica 5.6** Linealidad del sistema para cuantificar pinocembrina

Ecuación que describe al modelo:  $\text{Área} = 65.21 + 19648.3 \cdot \text{Concentración}$

Coefficiente de correlación ( $r$ ) = 0.99999

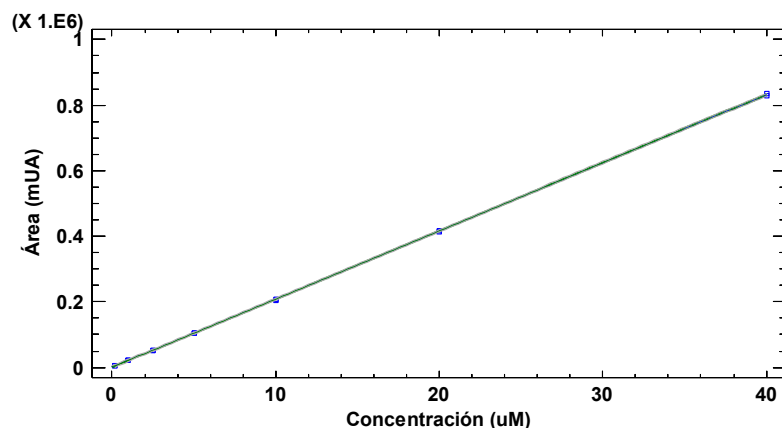
Coefficiente de determinación ( $r^2$ ) = 99.99%

**Tabla 5.23** Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del sistema para cuantificar pinocembrina

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
Intercepto	65.21	310.68	-611.70	742.13
Pendiente	19648.3	17.80	19609.47	19687.04

**Tabla 5.24** Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del sistema para cuantificar pinocembrina

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-calculada	Valor P
Modelo	9.63187E11	1	9.63187E11	1218328.13	<0.05
Residual	9.48697E6	12	790581.		
Total (Corr.)	9.63196E11	13			



**Gráfica 5.7** Linealidad del sistema para cuantificar acetina

Ecuación que describe al modelo:  $\text{Área} = 541.67 + 20787.1 \cdot \text{Concentración}$   
 Coeficiente de correlación ( $r$ )= 0.99998  
 Coeficiente de determinación ( $r^2$ )= 99.997%

**Tabla 5.25** Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del sistema para cuantificar acetina

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
Intercepto	541.67	565.863	-691.235507	1774.58412
Pendiente	20787.1	32.42	20716.4464	20857.7285

**Tabla 5.26** Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del sistema para cuantificar acetina

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-calculada	Valor P
Modelo	1.07808E12	1	1.07808E12	411067.12	<0.05
Residual	3.14716E7	12	2.62263E6		
Total (Corr.)	1.0781112	13			

### 5.3.3 Validación del Método

El método se validó de manera independiente para cada compuesto siguiendo el mismo documento mencionado en el numeral **5.2.3** y evaluando los mismos parámetros de desempeño.

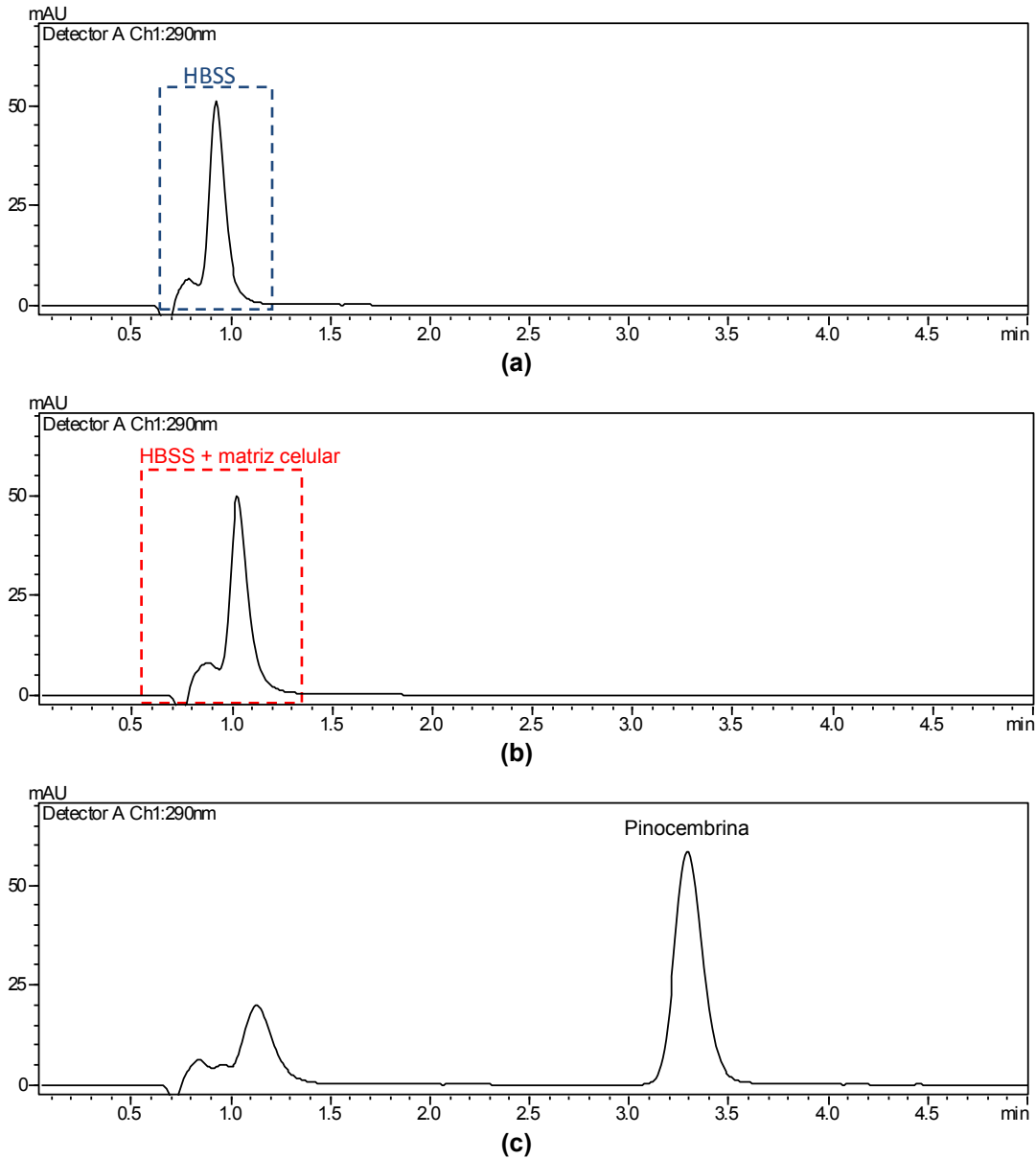
Es importante señalar que cuando se determinó el recobro de la acetina se observó que la respuesta del flavonoide en la solución amortiguadora de Hank era considerablemente menor a la obtenida con el compuesto disuelto en la fase

móvil. Aún más, la concentración recuperada fue diferente en cada nivel de concentración indicando, además, una precipitación del producto en la HBSS. De acuerdo con la literatura, muchos de los fármacos desarrollados son altamente lipofílicos y generalmente, son insolubles o poco solubles en soluciones amortiguadoras como la de Hank

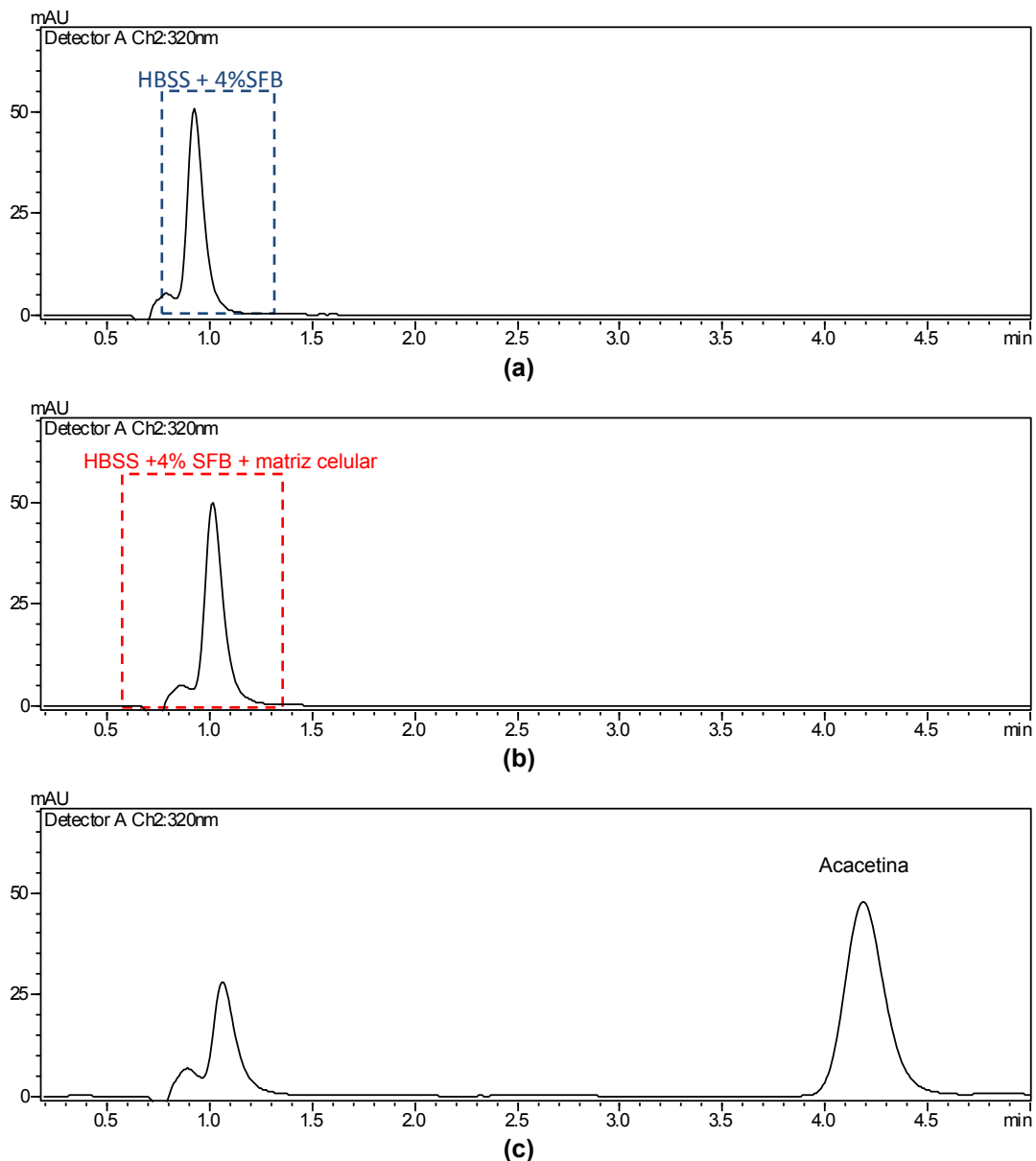
En este sentido, Fossati y colaboradores (2008) describen que el uso de medios biorrelevantes y de albúmina de suero bovino, a una concentración del 4%, en la HBSS mejora los resultados de recobro y mantiene inalterados los valores de permeabilidad aparente de compuestos marcadores de permeabilidad como el manitol y el propranol. Con base en estas consideraciones se adicionó Suero Fetal Bovino a la solución amortiguadora de Hank, a una concentración del 4%, para aumentar la solubilidad y el recobro de la acetina.

#### 5.3.3.1 Selectividad

En las **Figuras 5.9** y **5.10** se ilustran los cromatogramas obtenidos al evaluar la selectividad del método a 290 y 320 nm para cuantificar la pinocembrina y la acetina, respectivamente. En todos los casos se observa que la respuesta generada por la matriz y los diluyentes empleados no interfiere con la respuesta atribuida a los flavonoides, por lo que el método es selectivo para cuantificar estos analitos en esta matriz biológica.



**Figura 5.9** Cromatogramas obtenidos para evaluar la selectividad del método para cuantificar pinocembrina a 290 nm: HBSS (a), HBSS en contacto con la monocapa celular Caco-2 (b), pinocembrina a una concentración de 40  $\mu$ M (c)

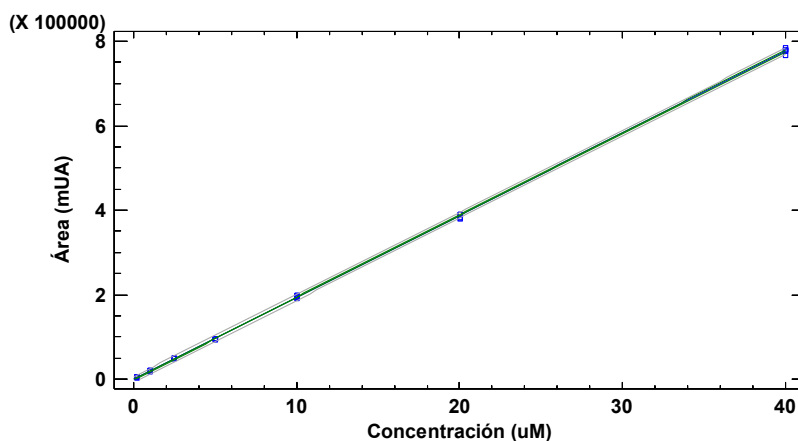


**Figura 5.10** Cromatogramas obtenidos para evaluar la selectividad del método para cuantificar acacetina a 320 nm: HBSS + 4% SFB (a), HBSS en contacto con la monocapa celular Caco-2 (b), acacetina a una concentración de 40  $\mu$ M (c)

### 5.3.3.2 Linealidad del método

El intervalo de concentraciones evaluado en este parámetro de desempeño se estableció con base en la concentración mínima cuantificable de manera precisa y exacta con este método y la concentración máxima evaluada de los flavonoides en los estudios de permeabilidad. En las **Gráficas 5.8** y **5.9** se ilustra la relación lineal entre la respuesta cromatográfica y la concentración de cada

compuesto; el coeficiente de correlación calculado es mayor a 0.999 indicando que existe una relación relativamente fuerte entre las variables. Asimismo, en las **Tablas 5.28 y 5.30** se resume el análisis de varianza de los modelos de regresión lineal para la pinocembrina y la acacetina, respectivamente. En ambos casos el valor estadístico P es menor al error  $\alpha$  (0.05) revelando que existe una relación lineal estadísticamente significativa entre el área y la concentración. Por otra parte, en las **Tablas 5.27 y 5.29** se resumen los coeficientes del intercepto y de la pendiente, así como sus intervalos de confianza. De acuerdo con los coeficientes de determinación del modelo obtenido para cada flavonoide, más del 99% de los datos se encuentran explicados por el modelo lineal correspondiente.



Ecuación que describe al modelo:  $\text{Área} = -438.32 + 19422 \cdot \text{Concentración}$   
 Coeficiente de correlación ( $r$ ) = 0.9997  
 Coeficiente de determinación ( $r^2$ ) = 99.95%

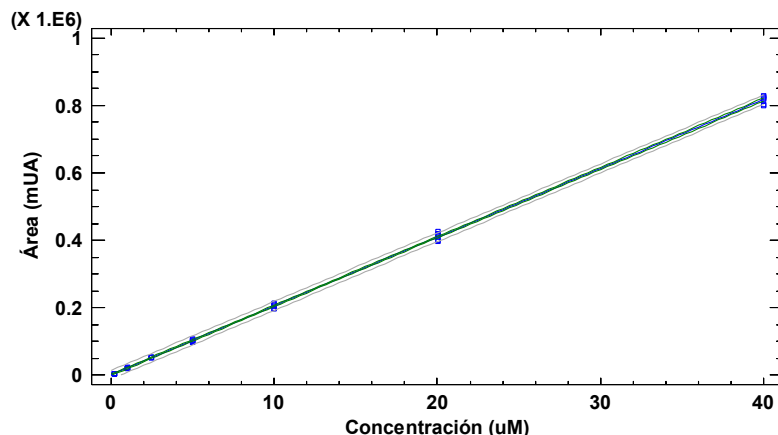
**Tabla 5.27** Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del método para cuantificar pinocembrina

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
Intercepto	-438.32	666.54	-1785.45	908.81
Pendiente	19422.0	38.19	19344.85	19499.23

**Tabla 5.28** Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del método para cuantificar pinocembrina

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-calculada	Valor P
Modelo	2.82341E12	1	2.82341E12	258631.24	<0.05
Residual	4.36669E8	40	1.09167E7		
Total (Corr.)	2.82384E12	41			





Ecuación que describe al modelo:  $\text{Área} = 140.37 + 20451.5 \cdot \text{Concentración}$   
 Coeficiente de correlación ( $r$ )= 0.9997  
 Coeficiente de determinación ( $r^2$ )= 99.95%

**Tabla 5.29** Coeficientes e intervalos de confianza del intercepto y la pendiente del modelo de linealidad del método para cuantificar acetina

Parámetro	Estimado	Error Estándar	Intervalo de confianza al 95%	
			Inferior	Superior
Intercepto	140.37	1301.79	-2490.66	2771.39
Pendiente	20451.5	74.58	20300.71	20602.20

**Tabla 5.30** Análisis de varianza del modelo para evaluar la linealidad del método para cuantificar acetina

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	F-calculada	Valor P
Model	3.13063E12	1	3.13063E12	75181.64	<0.05
Residual	1.66564E9	40	4.16409E7		
Total (Corr.)	3.1323E12	41			

### 5.3.3.3 Precisión y Exactitud

De nueva cuenta, la precisión se evaluó a través de la repetibilidad y la precisión intermedia. En la **Tabla 5.31** se resumen los resultados para evaluar la repetibilidad. Para ambos compuestos, los coeficientes de variación calculados son menores al 2.5% en los tres niveles de concentración que se evaluaron. Con base en estos resultados se deduce que el método desarrollado es repetible y cumple satisfactoriamente con los criterios establecidos en la Guía de Validación (máximo 15% de variabilidad).

Por otro lado, la precisión intermedia se evaluó mediante el análisis de muestras preparadas por dos analistas en dos días diferentes. En las **Tablas 5.32 y 5.33** se sintetizan las concentraciones recuperadas de las muestras analizadas de pinocembrina y acacetina, respectivamente. Los resultados obtenidos permiten concluir que, cuando se aplica el método en diferentes días y por distintos analistas, la variabilidad generada es menor al 15%.

La exactitud de un método analítico se refiere a la concordancia absoluta entre el resultado obtenido con el método y la cantidad verdadera del analito presente en la muestra (ICH, 1996). En la **Tabla 5.31** se resumen los resultados obtenidos para evaluar la exactitud del método. De manera general, todos los porcentajes de exactitud están dentro del intervalo del rango de 98.0-104.0%. La diferencia absoluta obtenida al comparar la concentración recuperada con la concentración nominal, en todos los niveles de concentración, es menor al 15% para ambos analitos. Consiguientemente, el método es exacto para cuantificar acacetina y pinocembrina en la matriz biológica.

**Tabla 5.31** Resultados obtenidos para evaluar la repetibilidad y la exactitud del método para cuantificar pinocembrina y acacetina

No. muestra	Concentración Recuperada ( $\mu\text{M}$ )					
	Pinocembrina			Acacetina		
	Muestra control baja 0.6 $\mu\text{M}$	Muestra control media 15 $\mu\text{M}$	Muestra control alta 30 $\mu\text{M}$	Muestra control baja 0.6 $\mu\text{M}$	Muestra control media 15 $\mu\text{M}$	Muestra control alta 30 $\mu\text{M}$
1	0.61	15.30	29.17	0.61	14.77	29.94
2	0.58	15.08	30.18	0.62	15.11	29.97
3	0.58	14.77	30.22	0.61	15.09	30.32
4	0.60	15.22	29.20	0.65	15.12	30.24
5	0.60	15.34	29.45	0.62	15.10	29.64
Promedio	0.59	15.14	29.65	0.62	15.04	30.02
S	0.01	0.23	0.52	0.01	0.15	0.27
CV (%)	<b>2.34</b>	<b>1.52</b>	<b>1.75</b>	<b>2.37</b>	<b>1.01</b>	<b>0.90</b>
Exactitud (%)	<b>99.04</b>	<b>100.96</b>	<b>98.82</b>	<b>103.74</b>	<b>100.26</b>	<b>100.07</b>
Diferencia respecto al valor nominal (%)	<b>0.96</b>	<b>0.96</b>	<b>1.18</b>	<b>3.74</b>	<b>0.26</b>	<b>0.07</b>

**Tabla 5.32** Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método para cuantificar pinocebrina

Concentración (µM)	Concentración recuperada (µM)				$\bar{X}$	S	CV (%)
	Día 1		Día 2				
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2			
30	29.42	30.074	30.22	29.58	29.83	0.54	1.82
	29.54	29.286	29.80	29.66			
	30.01	31.302	29.62	29.45			
15	15.08	14.86	15.07	14.70	14.96	0.29	1.94
	14.77	15.25	15.11	15.02			
	15.22	15.26	14.24	14.94			
0.6	0.61	0.63	0.58	0.64	0.61	0.02	3.56
	0.58	0.62	0.59	0.58			
	0.60	0.64	0.61	0.60			

**Tabla 5.33** Resultados obtenidos para evaluar la precisión intermedia del método para cuantificar acetina

Concentración (µM)	Concentración recuperada (µM)				$\bar{X}$	S	CV (%)
	Día 1		Día 2				
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2			
30	29.94	29.99	30.31	29.51	29.96	0.45	1.51
	30.32	30.04	30.42	29.14			
	30.24	30.13	30.32	29.14			
15	14.77	14.87	15.09	14.72	15.01	0.21	1.38
	15.10	15.25	15.38	14.73			
	15.09	15.15	15.03	14.97			
0.6	0.61	0.59	0.63	0.59	0.61	0.02	2.63
	0.61	0.61	0.59	0.61			
	0.62	0.62	0.64	0.61			

### 5.3.3.4 Recobro

El recobro, para cada flavonoide, en los tres niveles de concentración evaluados fue cercano al 100% (**Tablas 5.34 y 5.35**). Los coeficientes de variación calculados a partir del porcentaje de recobro en cada nivel de concentración (cociente de la respuesta del analito en la matriz biológica y el analito disuelto en la fase móvil) fueron menores al 1.2 % en todos los casos, por lo que se puede establecer que los porcentajes fueron consistentes en todos los niveles de concentración.

**Tabla 5.34** Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método de cuantificación de pinocebrina

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	$\bar{X}$ Área del analito en Fase Móvil (mUA)	$\bar{X}$ Área del analito en HBSS (mUA)	$\bar{X}$ Recobro Absoluto (%)
30	538836.8	538556	99.95
15	286703.2	288125.2	100.50
0.6	11306.8	11109.4	98.25
		S	99.57
		CV	1.17
			1.17 %

**Tabla 5.35** Resultados obtenidos para evaluar el recobro del método de cuantificación de acacetina

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	$\bar{X}$ Área del analito en Fase Móvil (mUA)	$\bar{X}$ Área del analito en HBSS (mUA)	$\bar{X}$ Recobro Absoluto (%)
30	637615.6	638606	100.16
15	322732.2	321286.6	99.55
0.6	12839.8	12887.4	100.37
		S	100.03
		CV	0.42
			0.42 %

### 5.3.3.5 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se refiere a la concentración mínima del analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptable. Para este parámetro de desempeño se ha establecido que para que un límite de cuantificación preciso debe tener un CV menor al 20% y una recuperación que esté dentro del 20% del valor nominal para que sea exacto (FDA, 2013). El conjunto de resultados para ambas condiciones se encuentran resumidos en la **Tabla 5.36**. Por ende, el valor de límite de cuantificación calculado para ambos flavonoides corresponde a una concentración de 0.2  $\mu\text{M}$ .

**Tabla 5.36** Precisión y exactitud del límite inferior de cuantificación de la pinocembrina y la acetina

No. muestra	Concentración Recuperada ( $\mu\text{M}$ )	
	Pinocembrina 0.2 $\mu\text{M}$	Acetina 0.2 $\mu\text{M}$
1	0.198	0.201
2	0.203	0.214
3	0.198	0.201
4	0.192	0.207
5	0.190	0.211
Promedio	0.196	0.207
S	0.005	0.006
CV (%)	2.75	2.87
Exactitud (%)	98.06	103.32
Diferencia absoluta respecto al Valor Real (%)	1.94	3.32

### 5.3.3.6 Estabilidad de la muestra

La estabilidad del analito se refiere a la capacidad de mantener inalterada su estructura química, en una matriz dada, bajo condiciones específicas de almacenamiento por un tiempo determinado (FDA, 2013). En las **Tablas 5.37** y **5.38** se resumen los resultados obtenidos para evaluar la estabilidad de la muestra en diferentes condiciones para la pinocembrina y la acetina, respectivamente. De manera general, se observa que la diferencia absoluta de la concentración recuperada respecto al valor nominal en algunos casos es alta, sin embargo, en todos es menor del 15% (límite máximo permitido para considerar que la muestra es estable). Considerando estos resultados es posible concluir que las muestras de acetina y pinocembrina son estables: a temperatura ambiente durante 24 h, después de 3 ciclos de congelación-descongelación y en congelación durante 1 mes.

**Tabla 5.37** Resultados de estabilidad para las muestras de pinocembrina

	Muestra control alta 30 $\mu\text{M}$		Muestra control media 15 $\mu\text{M}$		Muestra control baja 0.6 $\mu\text{M}$	
	Media Conc. recuperada $\pm$ S ( $\mu\text{M}$ )	Diferencia respecto al VN (%)	Media Conc. recuperada $\pm$ S ( $\mu\text{M}$ )	Diferencia respecto al VN (%)	Media Conc. recuperada $\pm$ S ( $\mu\text{M}$ )	Diferencia respecto al VN (%)
Estabilidad 24h en automuestreador	29.32 $\pm$ 0.18	2.26	15.10 $\pm$ 0.23	0.66	0.60 $\pm$ 0.02	0.12
Ciclo 1 Congelación-Descongelación	29.90 $\pm$ 0.80	0.34	14.97 $\pm$ 0.33	0.23	0.61 $\pm$ 0.02	1.35
Ciclo 2 Congelación-Descongelación	28.94 $\pm$ 1.13	3.52	14.05 $\pm$ 0.12	6.35	0.54 $\pm$ 0.04	10.32
Ciclo 3 Congelación-Descongelación	29.78 $\pm$ 0.03	0.72	14.42 $\pm$ 0.03	3.86	0.55 $\pm$ 0.01	8.89
Estabilidad a largo plazo	30.03 $\pm$ 0.73	0.11	15.15 $\pm$ 0.17	1.00	0.58 $\pm$ 0.01	3.08

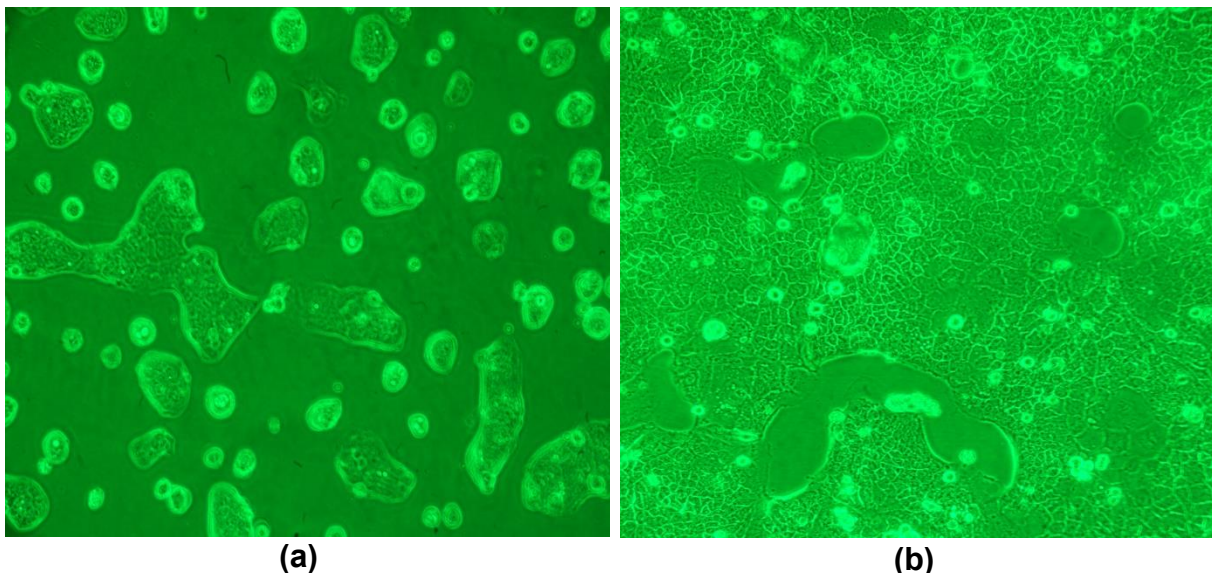
**Tabla 5.38** Resultados de estabilidad para las muestras de acacetina

	Muestra control alta 30 $\mu$ M		Muestra control media 15 $\mu$ M		Muestra control baja 0.6 $\mu$ M	
	Media Conc. recuperada $\pm$ S ( $\mu$ M)	Diferencia respecto al VN (%)	Media Conc. recuperada $\pm$ S ( $\mu$ M)	Diferencia respecto al VN (%)	Media Conc. recuperada $\pm$ S ( $\mu$ M)	Diferencia respecto al VN (%)
Estabilidad 24h en automuestreador	31.10 $\pm$ 0.06	3.55	15.30 $\pm$ 0.02	1.97	0.59 $\pm$ 0.02	3.71
Ciclo 1 Congelación- Descongelación	30.08 $\pm$ 0.32	0.28	14.69 $\pm$ 0.15	2.06	0.62 $\pm$ 0.02	3.71
Ciclo 2 Congelación- Descongelación	29.98 $\pm$ 0.25	0.06	14.92 $\pm$ 0.06	0.51	0.61 $\pm$ 0.01	2.31
Ciclo 3 Congelación- Descongelación	30.42 $\pm$ 0.14	3.55	14.54 $\pm$ 0.23	3.05	0.63 $\pm$ 0.01	5.69
Estabilidad a largo plazo	29.95 $\pm$ 1.16	0.16	13.71 $\pm$ 0.64	8.60	0.52 $\pm$ 0.01	14.00

#### 5.4 Cultivo celular

El desarrollo de un ensayo con líneas celulares comienza con la selección o generación de una línea celular. Uno de los primeros pasos consiste en generar un banco de células que asegure un abastecimiento uniforme y adecuado de las mismas. La caracterización de células y la vigilancia relacionada con el desempeño del ensayo refleja el estado de las células. Es decir, la salud y el estado metabólico del cultivo celular al momento del ensayo pueden influir de manera positiva o negativa en los resultados de las evaluaciones. Cuando una línea celular ha sido caracterizada y está lista para su inclusión en el banco de células es factible preparar un banco de dos niveles: uno maestro y otro de trabajo, siendo el primero el que sirve como fuente para el banco de células de trabajo. Así, el banco de células de trabajo se obtiene a partir de la expansión de uno o más viales del banco de células maestro. El tamaño de los bancos depende de las características de crecimiento de las células, del número de células requerido para cada ensayo y de la frecuencia con la que se realiza el ensayo (USP, 2014).

En este marco de referencia, el banco celular maestro se formó con 53 crioviales, conteniendo, cada uno de ellos, de 1 a  $1.5 \times 10^6$  células entre los pases 20 al 33. Cada criovial se formó a partir de la proliferación de las células adquiridas en la ATCC® (lote 61777384, pase 18) siguiendo las condiciones de cultivo mencionadas en el inciso 4.4.2. Una vez que el cultivo llegó a confluencia (**Figura 5.11**), se realizó la disociación de las células y se criopreservaron para formar el banco celular maestro. A partir de éste se proliferó la línea celular para conformar el banco celular de trabajo con el que se realizaron los ensayos de citotoxicidad y de permeabilidad.



**Figura 5.11** Células Caco-2 (100x) en proliferación: **(a)** en subconfluencia y **(b)** en confluencia

### 5.5 Ensayo de citotoxicidad

Es importante determinar la citotoxicidad de los compuestos y los cosolventes utilizados en los estudios de permeabilidad con el objetivo de aumentar la seguridad en los resultados obtenidos de los experimentos *in vitro*; ya que el obtener valores considerados como de alta permeabilidad pueden deberse a la muerte de células y a la subsecuente pérdida de la integridad de la monocapa celular (Adams *et al.*, 2003). Existen varios métodos estándar para evaluar la toxicidad de los compuestos sobre las células Caco-2 en los que la sustancia a evaluar permanece en contacto directo con las células y posteriormente, se cuantifican los cambios celulares resultantes por diversas técnicas. La viabilidad celular es el parámetro más común que se evalúa para determinar la citotoxicidad, ésta última puede determinarse por una gran variedad de técnicas (Fernandes *et al.*, 2012). Una de ellas es la tinción con sulforodamina B, un aminoxanteno de color rosa brillante, con dos grupos sulfónicos que se enlazan a los residuos básicos de los aminoácidos en condiciones ligeras de acidez, y se disocia en pH básico. La sulforodamina B se une a las proteínas de membrana de las células viables que fueron previamente adheridas en un soporte; la cantidad de colorante unido es directamente proporcional al número de células y se puede cuantificar por espectrofotometría UV a una longitud de 564 nm (Vanicha *et al.*, 2006).

En la **Gráfica 5.10** se presentan los resultados obtenidos para evaluar la citotoxicidad de los compuestos y de los cosolventes mediante la técnica de tinción con sulforodamina; la gráfica representa el porcentaje de viabilidad celular obtenido en cada caso y la desviación estándar correspondiente a las 6 réplicas.

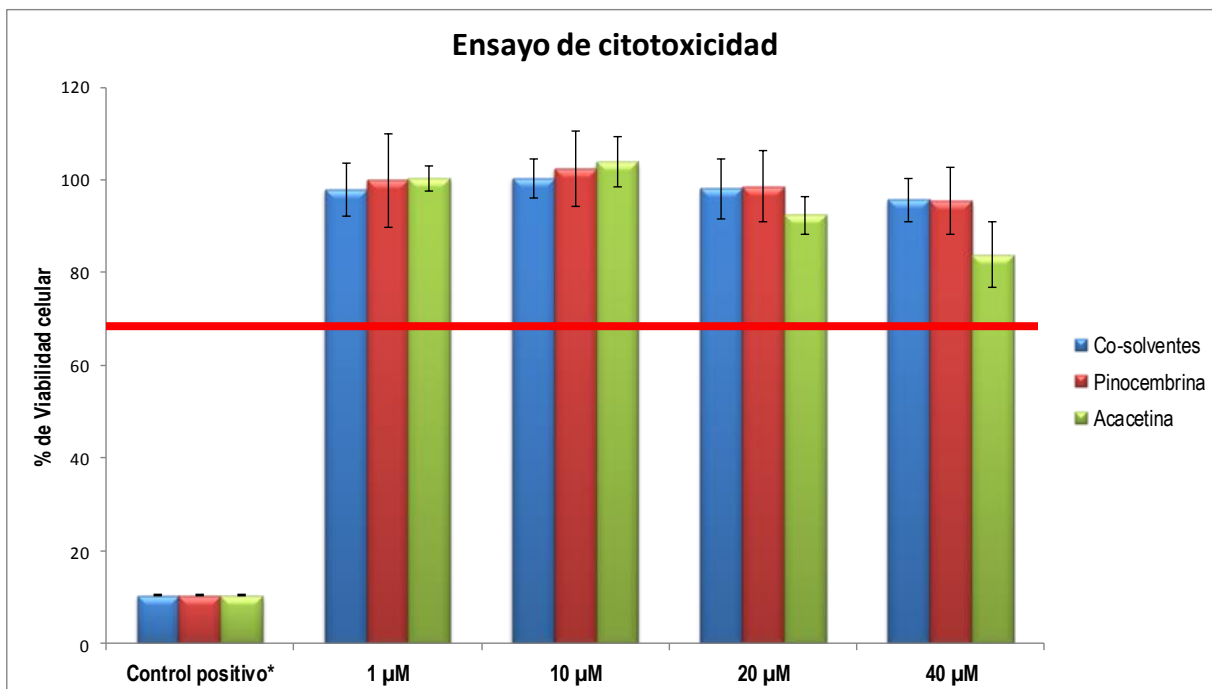
De acuerdo con la Guía ISO 10993-5 la reducción de un 30% o más en la viabilidad celular se considera como efecto citotóxico; por lo tanto, se tomó este valor como referencia para determinar la citotoxicidad de las sustancias evaluadas.

En concordancia con la **Gráfica 5.10** y con la **Tabla 5.39**, ninguno de los compuestos ni los cosolventes evaluados resultaron citotóxicos para las células Caco-2. El porcentaje de viabilidad de las células en contacto con los flavonoides fue superior al 70% en contraste con el 10% de viabilidad observado con el DMSO, empleado como control positivo.

Cabe mencionar que la acacetina, a una concentración de 40  $\mu\text{M}$ , presentó un menor porcentaje de viabilidad sin embargo, el valor obtenido y su desviación estándar (menor al 15%) se encuentran por encima de la viabilidad mínima aceptada para considerar que un compuesto no es tóxico. Asimismo, para este ensayo la exposición de los compuestos sobre las células se evaluó durante 24 h en contraste con los ensayos de permeabilidad que se realizan en un tiempo menor a 3 h.

Los resultados obtenidos indican que la pinocembrina y la acacetina a una concentración máxima de 40  $\mu\text{M}$  y los cosolventes empleados para su disolución en la solución amortiguadora de Hank no dañan la integridad de la monocapa durante los estudios de permeabilidad. Este parámetro se verifica de nueva cuenta mediante la medida de la resistencia transepitelial (TEER).





**Gráfica 5.10** Viabilidad de las células Caco-2 con un tiempo de exposición a los compuestos evaluados de 24 h

(Cada concentración se evaluó por sextuplicado)

\*El control positivo empleado fue DMSO al 30% en medio de disolución.

\*\*Las barras de error representan la desviación estándar de cada resultado.

**Tabla 5.39** Porcentaje de viabilidad promedio obtenido con cada muestra

	Control positivo	Blanco				Pinocembrina				Acacetina			
		Concentración (μM)											
		1	10	20	40	1	10	20	40	1	10	20	40
Promedio	10.29	97.95	100.32	98.04	95.70	99.90	102.54	98.60	95.46	100.33	103.83	92.33	83.80
CV	1.10	5.77	4.13	6.47	4.96	10.00	7.94	7.70	7.45	2.73	5.20	4.41	8.45

## 5.6 Estudio de permeabilidad

### 5.6.1 Adecuabilidad del modelo de permeabilidad

La FDA, a través de la guía de exención de estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia *in vivo* para formas farmacéuticas orales sólidas de liberación inmediata está basada en un sistema de clasificación biofarmacéutica y establece que para poder clasificar a un fármaco con base en su permeabilidad es necesario emplear modelos cuya adecuabilidad ha sido demostrada. Entre los métodos aceptados por esta guía para evaluar la permeabilidad de una sustancia se

encuentran los modelos *in vitro* empleando cultivos celulares, y para demostrar su adecuabilidad la FDA recomienda evaluar la permeabilidad de 20 fármacos modelo antes (FDA, 2000).

En este trabajo, la adecuabilidad del modelo de permeabilidad se demostró sólo con dos fármacos: el atenolol, un marcador de baja permeabilidad, y el propranolol, uno de alta permeabilidad. En la **Gráfica 5.11** se observa una notable diferencia en el transporte de ambos marcadores a través de la monocapa celular; la concentración acumulada del propranolol en función del tiempo es mayor que la del atenolol a pesar de que la concentración de este último es 3 veces más que la del propranolol.

Asimismo, en la **Tabla 5.40** se resumen los coeficientes de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ) obtenidos para cada uno de los marcadores. Es importante destacar que dichos valores se encuentran dentro de los intervalos reportados en la literatura tanto en la dirección apical-basolateral como en la basolateral-apical (Cerep, 2013).

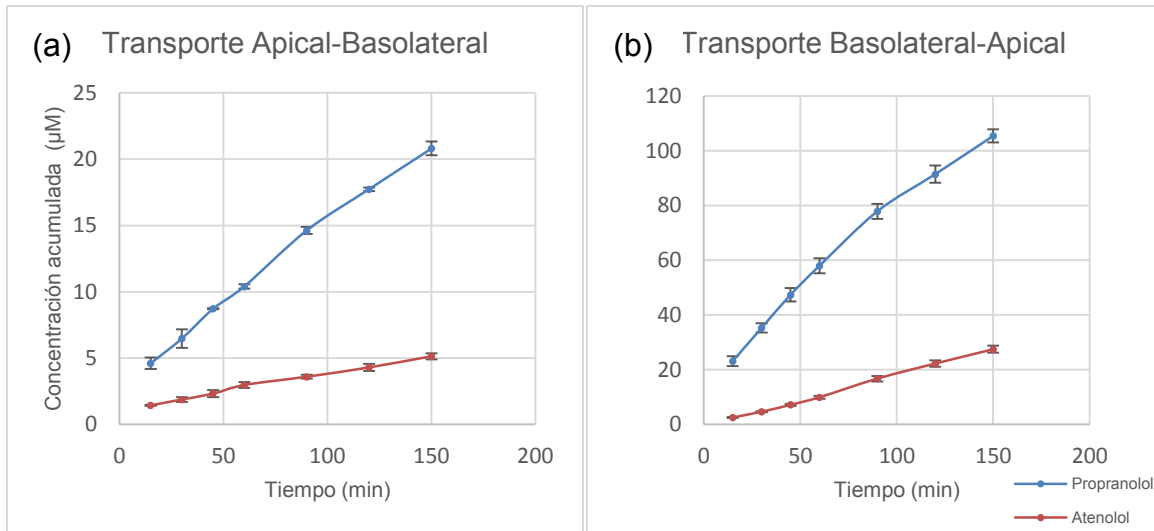
**Tabla 5.40** Permeabilidad aparente de los compuestos marcadores para evaluar la adecuabilidad del modelo

	<b>Papp (A-B) ± S (cm/s)</b>	<b>Papp (B-A) ± S (cm/s)</b>	<b>Clasificación según el valor de <math>P_{app}</math></b>
<b>Atenolol</b>	$1.63 \pm 0.02 \times 10^{-6}$	$1.99 \pm 0.04 \times 10^{-6}$	Baja ( $P_{app} < 2 \times 10^{-6}$ cm/s)*
<b>Propranolol</b>	$26.36 \pm 0.51 \times 10^{-6}$	$34.77 \pm 0.26 \times 10^{-6}$	Alta ( $P_{app} > 20 \times 10^{-6}$ cm/s)*

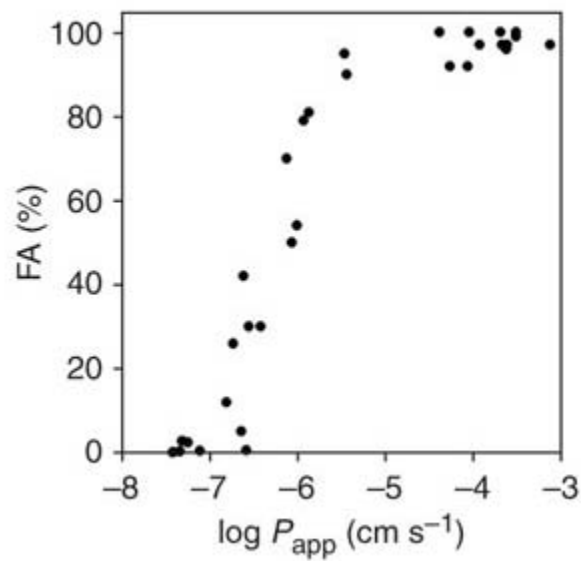
\*Cerep, 2013.

Los logaritmos de la permeabilidad aparente A-B fueron de -5.8 y de -4.6 para el atenolol y propranolol, respectivamente. De acuerdo con la correlación  $\log P_{app}$  vs FA descrita por Hubatsch y colaboradores (2007) (**Gráfica 5.12**), el valor obtenido para el atenolol se relaciona con una fracción de dosis absorbida (FA) menor al 50%, mientras que el obtenido con el propranolol con una FA mayor al 90%. Por otra parte, la FDA establece que los compuestos de baja permeabilidad presentan una FA menor al 50%, los de permeabilidad moderada entre el 50 y el 89% y los de alta permeabilidad una FA mayor al 90% (FDA, 2000). Debido a lo anterior, se puede deducir que la FA del atenolol corresponde a un compuesto de baja permeabilidad, y la del propranolol a un compuesto de alta permeabilidad.

De acuerdo con los coeficientes de permeabilidad aparente obtenidos *in vitro*, es posible deducir que el modelo es adecuado para evaluar la permeabilidad de los flavonoides.



**Gráfica 5.11** Transporte de propranolol y atenolol en las direcciones Apical-Basolateral (a) y Basolateral-Apical (b)



**Gráfica 5.12** Correlación entre la fracción absorbida (FA) en humanos y la permeabilidad a través de las monocapas celulares Caco-2 (Hubatsch *et al.*, 2007).

### 5.6.2 Estudios de permeabilidad de la pinocembrina y la acacetina

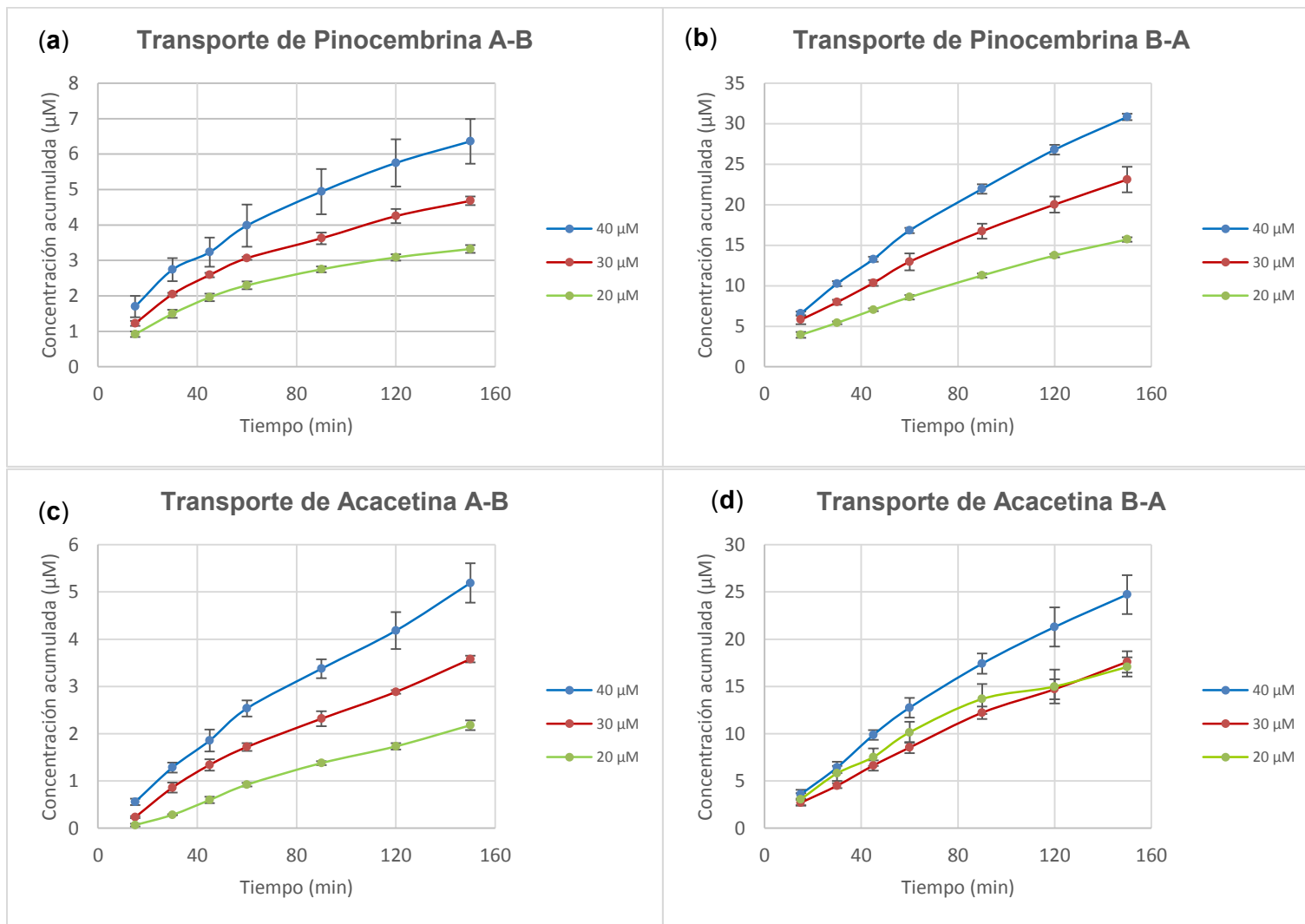
En la **Gráfica 5.13** se ilustra la concentración acumulada transportada en función del tiempo de la pinocembrina y la acacetina en cada nivel de concentración. En ésta Gráfica se observa que en ninguno de los dos casos se alcanza una saturación en el transporte.

Los coeficientes de permeabilidad aparente para ambos flavonoides, en cada nivel de concentración, se resumen en la **Tabla 5.41**. En la misma, se observa que los cocientes obtenidos de los transportes A-B/B-A y B-A/A-B para los compuestos es cercano a 1; excepto para la acacetina a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, todos los cocientes se encuentran entre 0.2 y 3.0 indicando con ello, que los transportadores no se involucran en el transporte de estos flavonoides.

Por otra parte, el valor logarítmico de los coeficientes de permeabilidad aparente calculados para la pinocembrina y la acacetina son superiores a -4.72; por lo tanto, corresponden a una FA mayor del 80% (**Gráfica 5.12**). Con base en estos resultados es posible clasificar a la pinocembrina y la acacetina como compuestos de alta permeabilidad.

**Tabla 5.41** Coeficientes de Permeabilidad Aparente ( $P_{app}$ ) de los flavonoides y de los marcadores de Permeabilidad

	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	$P_{app}$ (A-B) $\pm$ d.e. (cm/s)	$P_{app}$ (B-A) $\pm$ d.e. (cm/s)	Cociente (B-A)/(A-B)	Cociente (A-B)/(B-A)
<b>Pinocembrina</b>	20	$(1.89 \pm 0.03) \times 10^{-5}$	$(3.33 \pm 0.07) \times 10^{-5}$	1.730	0.580
	30	$(1.80 \pm 0.10) \times 10^{-5}$	$(3.20 \pm 0.35) \times 10^{-5}$	1.772	0.564
	40	$(1.87 \pm 0.26) \times 10^{-5}$	$(3.28 \pm 0.03) \times 10^{-5}$	1.779	0.562
<b>Acacetina</b>	20	$(1.75 \pm 0.05) \times 10^{-5}$	$(3.80 \pm 0.27) \times 10^{-5}$	2.171	0.461
	30	$(1.74 \pm 0.01) \times 10^{-5}$	$(2.74 \pm 0.17) \times 10^{-5}$	1.576	0.635
	40	$(1.85 \pm 0.17) \times 10^{-5}$	$(2.91 \pm 0.34) \times 10^{-5}$	1.576	0.562
<b>Atenolol</b>	300	$(0.19 \pm 0.03) \times 10^{-5}$	$(0.20 \pm 0.17) \times 10^{-5}$	1.026	0.974
<b>Propranolol</b>	100	$(2.60 \pm 0.05) \times 10^{-5}$	$(3.52 \pm 0.03) \times 10^{-5}$	1.35	0.739



**Gráfica 5.13** Transporte de la pinocembrina en las direcciones Apical-Basolateral (a) y Basolateral-Apical (b), y de la acacetina en las direcciones Apical-Basolateral (c) y Basolateral-Aapical (d) en la monocapa celular Caco-2

**Tabla 5.42** Análisis de varianza de los coeficientes  $P_{app}$  de Pinocebrina obtenidos en la dirección A-B a diferentes concentraciones

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F-calculada	Valor-P
Entre grupos	1.26889E-12	2	1.03444E-12	0.23	0.7996
Dentro de grupos	1.63933E-11	6	2.73222E-12		
Total (Corr.)	1.76622E-11	8			

**Tabla 5.43** Análisis de varianza de los coeficientes  $P_{app}$  de Acacetina obtenidos en la dirección A-B a diferentes concentraciones

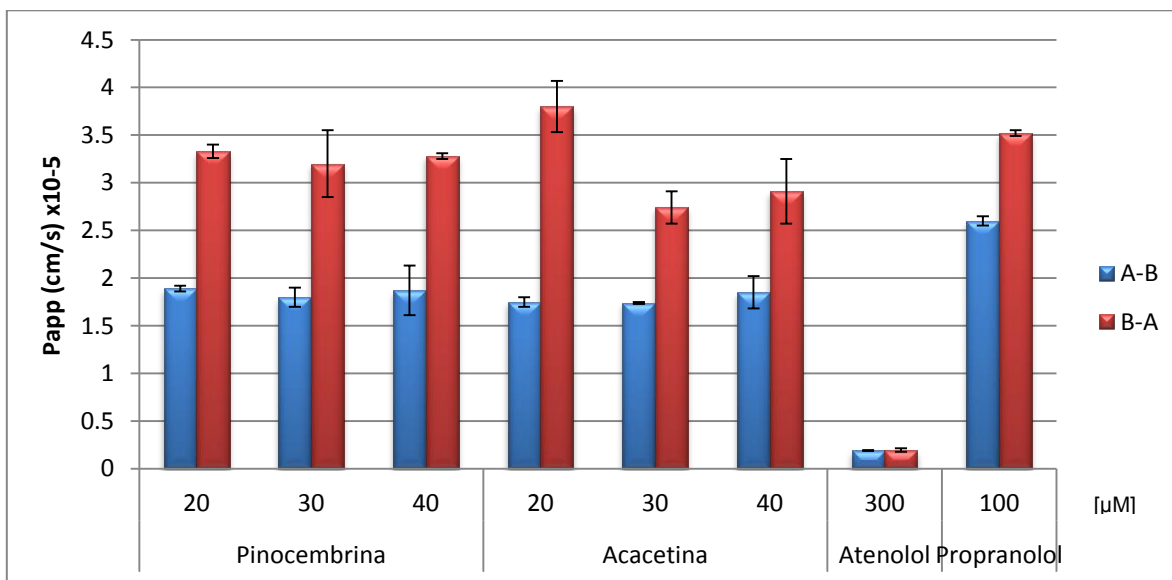
Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F-calculada	Valor-P
Entre grupos	2.06889E-12	2	1.03444E-12	0.96	0.4345
Dentro de grupos	6.46E-12	6	1.07667E-12		
Total (Corr.)	8.52889E-12	8			

De acuerdo con el análisis de varianza presentado en las **Tablas 5.42 y 5.43**, para la pinocebrina y la acacetina, respectivamente, los valores P son mayores que 0.05, lo cual implica que, con un nivel de confianza del 95%, no existe diferencia estadísticamente significativa entre los coeficientes de permeabilidad aparente obtenidos con diferentes concentraciones de pinocebrina y de acacetina. Con este análisis estadístico se demuestra que el transporte de acacetina y de pinocebrina no es dependiente de las concentraciones evaluadas, lo cual es característico del transporte pasivo (Tavelin *et al.*, 2002).

El peso molecular de la pinocebrina y la acacetina es de 256 y 284 g/mol (sección 5.1), respectivamente, por lo que su tamaño es mayor al necesario para que su principal transporte sea el paracelular, lo cual implica que probablemente la acacetina y la pinocebrina sean transportados por difusión pasiva transcelular. Asimismo, los valores de  $\log P_{o/w}$  (sección 5.1) de la pinocebrina (3.09) y de la acacetina (3.41) indican que los flavonoides son más afines a moléculas lipofílicas, sugiriendo con ello que podrían difundir a través de la membrana lipídica de los enterocitos (Blaser, 2007).

Por otra parte, en la **Gráfica 5.14** se observa, de manera general, que la permeabilidad aparente es similar para la acacetina y la pinocebrina. Sin embargo, se ha encontrado que la quercetina, un flavonoide muy estudiado, se une a las proteínas plasmáticas; principalmente a la albúmina (Manach *et al.*, 2003). Con base en este hallazgo y considerando que en el presente trabajo se empleó SFB para mejorar la solubilidad de la acacetina en la cámara donadora se

sugiere repetir el modelo para evaluar la permeabilidad de este flavonoide. En lugar de SFB podría emplearse otra sustancia para lograr la disolución de la acacetina en la cámara donadora, como las sales biliares o los medios biorrelevantes, y determinar si la concentración de albúmina presente en el SFB afectó el estudio de permeabilidad de la acacetina (Avdeef, 2003).



**Gráfica 5.14** Coeficientes de permeabilidad aparente de los flavonoides y de los marcadores de permeabilidad

De nueva cuenta, en los estudios de transporte de los flavonoides se determinó el  $P_{app}$  de los marcadores de permeabilidad (**Tabla 5.41**). Como se deduce de la información presentada, el valor calculado para el atenolol corresponde a una molécula de baja permeabilidad y el del propranolol al de un fármaco de alta permeabilidad; ambos valores se encuentran en armonía con lo descrito en la literatura.

Cabe mencionar que al cuantificar las muestras de los estudios de transporte, las muestras de control de calidad o QC incorporadas a la corrida analítica arrojaron valores dentro del 15% de su valor nominal, por lo que los resultados obtenidos fueron aceptables.

Finalmente, para la determinación de la permeabilidad de los flavonoides y de los marcadores se utilizaron monocapas de la línea celular Caco-2 cuya integridad fue demostrada a través de los valores de resistencia obtenidos al finalizar el estudio y por la cantidad transportada de Lucifer Yellow siendo mayores a  $224 \Omega\text{cm}^2$  y menores al 0.1%, respectivamente.

## 6. CONCLUSIONES

Se desarrollaron dos métodos bioanalíticos por HPLC, uno para cuantificar atenolol y propranolol, y el otro para pinocembrina y acacetina en estudios de transporte a través de la monocapa celular Caco-2. Ambos métodos demostraron ser exactos, precisos y selectivos para cuantificar a cada uno de los fármacos en el intervalo de concentraciones de 1 a 100  $\mu\text{M}$  y de 0.2 a 40  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Asimismo, el recobro obtenido de las muestras con la matriz biológica fue consistente en los niveles de concentración evaluados. Por último, se encontró que las muestras de los marcadores de permeabilidad y de los flavonoides fueron estables a corto y largo plazo y en 3 ciclos de congelación-descongelación.

La pinocembrina y la acacetina no presentaron efecto citotóxico sobre la línea celular Caco-2 en un intervalo de concentraciones de 1 a 40  $\mu\text{M}$ .

Los coeficientes de permeabilidad aparente del atenolol y del propranolol obtenidos se encuentran dentro de los valores clasificados como baja y alta permeabilidad, respectivamente, por lo que se determinó la adecuabilidad del modelo de permeabilidad *in vitro* con células Caco-2.

Los coeficientes de permeabilidad aparente obtenidos a tres diferentes concentraciones fueron, para la pinocembrina de 1.80 a 1.89  $\times 10^5$  cm/s y para la acacetina de 1.74 a 1.85  $\times 10^5$  cm/s, con los cuales es posible clasificarlos como compuestos de alta permeabilidad.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los coeficientes de permeabilidad aparente obtenidos con diferentes concentraciones, para ambos flavonoides, sugiriendo que el mecanismo de transporte por el cual atraviesan la barrera epitelial es por difusión pasiva.

Al correlacionar los coeficientes de permeabilidad aparente obtenidos para la pinocembrina y la acacetina con la fracción absorbida, se estima que estos flavonoides se absorben en un porcentaje mayor al 80%.



## 7. PERSPECTIVAS

1. Evaluar el modelo de permeabilidad empleado con 20 marcadores de permeabilidad, de acuerdo a lo establecido por la Guía de Exención para Estudios de Biodisponibilidad y Bioequivalencia para Formas Farmacéuticas sólidas orales de liberación inmediata basado en un sistema de clasificación biofarmacéutica emitida por la FDA.
2. Determinar la influencia del SFB en la determinación del coeficiente de permeabilidad aparente de la acetina.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D. *et al.* (2003). Synthesis, structure, elucidation, *in vitro* biological activity, toxicity, and Caco-2 cell permeability. *Journal of Medicinal Chemistry*. **46**, 1266-1272.
- Ahn, M. *et al.* (2009). Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Molecular Nutrition and Food Research*. **53**(5), 643-651.
- Alcaráz, L. *et al.* (2000). Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Journal of Theoretical Biology*. **205**, 231-240.
- Avdeef, A. (2003). Absorption and drug development. Solubility, permeability and charge state. John Wiley & Sons Inc. USA. 77-23.
- Balimane, P., Chong, S. y Morrison, R. (2000). Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. **44**, 301-312.
- Bankova, V. *et al.* (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. **31**(1), 3-16.
- Bankova, V. (2005). Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*. **100**, 114-117.
- Basci, N. *et al.* (1998). Optimization on mobile phase in the separation of  $\beta$ -blockers by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **18**, 745-750.
- Blaser, D. (2007). Determination of drug absorption parameters in Caco-2 cell monolayers with a mathematical model encompassing passive diffusion, carrier mediated efflux, non-specific binding and phase II metabolism (Tesis Doctoral). University of Basel. Basilea Suiza.
- Bruneton, J. (1999). Pharmacognosy, Phitochemistry, Medicinal Plants. 2<sup>nd</sup> edition. Technique and Documentation. USA. 1119.
- Calderone, V. *et al.* (2004). Vasorelaxing effects of flavonoids: investigation on the possible involvement of potassium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. **370**, 290-298.
- Cao, X., Yu, L. y Sun, D. (2008). Drug absorption principles. En Krishna, R. y Yu, L. Biopharmaceutics application in drug development. Springer. USA. 75-100.
- Carballo-Villalobos, A. *et al.* (2014). Evidence of mechanism of action of anti-inflammatory/antinociceptive activities of acacetin. *European Journal of Pain (United Kingdom)*. **18**(3), 396-405.

- Cerep (2013). *In vitro* drug absorption. Application note. France.
- Cho, H. *et al.* (2014). Protective mechanisms of acacetin against d -galactosamine and lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure in mice. *Journal of Natural Products*. **77**(11), 2497-2503.
- Delamoye, M. *et al.* (2004). Simultaneous determination of thirteen  $\beta$ -blockers and one metabolite by gradient high performance liquid chromatography with photodiode array UV detection. *Forensic Science International*. **141**, 23-41.
- Dewick, P. (2009). Medicinal natural products. A biosynthetic approach. 3rd edition. John Wiley & sons. UK. 137-184.
- Food and Drug Administration (2000). Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System.
- Food and Drug Administration (2013). Bioanalytical Method Validation.
- Fossati, L. *et al.* (2008). Use of simulated intestinal fluid for Caco-2 permeability assay for lipophilic drug. *International Journal of Pharmaceutics*. **360**, 148-165.
- Fraga, C. G. (2009). Plant phenolics and human health: Biochemistry, nutrition and pharmacology. Canada. John Wiley & Sons.
- Ghasemzadeh, A. and Ghasemzadeh, N. (2011). Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. *Journal of Medicinal Plant Research*. **5**(31), 6697-6703.
- Gómez-Caravaca, A. *et al.* (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceuticals and Biomedical Analysis*. **41**, 1220-1234.
- González-Trujano, M. *et al.* (2012). Spasmolytic and antinociceptive activities of ursolic acid and acacetin identified in *Agastache mexicana*. *Planta Medica*. **78**(8), 793-799.
- Granados, J. (2014). Composición química de los extractos etanólicos de propóleos recolectados en los estados de Puebla y Guanajuato: actividad antioxidante de los compuestos aislados (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.
- Grotewold, E. (2006). The science of flavonoids. USA. Springer.
- Gu, Y. *et al.* (2004). Transport and bioavailability studies of astragaloside IV, an active ingredient in *Radix Astragali*. *Basics and Clinical Pharmacology and Toxicology*. **95**, 295-298.
- Guang, H. y Du G. (2006). Protections of pinocembrin on brain mitochondria contribute to cognitive improvement in chronic cerebral hypoperfused rats. *European Journal of Pharmacology*. **542**(1-3), 77-83.
- Hayashi, K. *et al.* (1993). Antiviral agents of plant origin. Antitherpetic activity of acacetin. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*. **4**(1), 49-53.

- Hellinger, E. y Vastag, M. (2011). Intestinal absorption and models of penetration. En Tihanyi, K. y Vastag, M (coord.). Solubility, delivery and ADME problems of drugs and drug candidates. Bentham e-books. Budapest, Hungría. 86-101.
- Hernández, J. *et al.* (2007). Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell line. *Planta Médica*. **73**, 1469-1474.
- Herrera, D. *et al.* (2012). Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. **43**(1), 18-32.
- Hrobonová, K., Lehotay, J. y Cizmárik, J. (2009). Determination of organic acids in propolis by HPLC using two columns with an On-line SPE system. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, **32**, 125-135.
- Hua, L. *et al.* (2008). Transport characteristics of ginkgolide B by Caco-2 cells and examination of ginkgolide B oral absorption potential using rat *in situ* intestinal loop method. *International Journal of Pharmaceutics*. **351**, 31-35.
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E., Artursson, P. (2007). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nature Protocols*. **2**(9), 2111-2119.
- International Conference on Harmonisation (2005). Validation of analytical procedures. Text and Methodology Q2 (R1).
- ISO-International Organization for Standardization (2009). ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices, part 5: testes for *in vitro* cytotoxicity. 3<sup>rd</sup> edition.
- Jaganathan, S. y Mandal M. (2009). Antiproliferative effects of honey and of its polyphenols: a review. *BioMed Research International*. **2009**.
- Jantan, I. *et al.* (2008). Inhibitory effect of compounds from *Zingiberaceae* species on human platelet aggregation. *Phytomedicine*. **15**(4), 306-309.
- Juárez-Reyes, K. *et al.* (2015). Hypoglycemic, antihyperglycemic, and antioxidant effects of the edible plant *Anoda cristata*. *Journal of Ethnopharmacology*. **161**, 36-45.
- Kim, H. *et al.* (2012). Acacetin protects dopaminergic cells against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neuroinflammation *in vitro* and *in vivo*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **35**(8), 1287-1294.
- Kozłowska, A. y Szostak-Wegierek, D. (2014). Flavonoids, food sources and health benefits. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. **65**(2), 79-85.
- Kraft, C. *et al.* (2003). *In vitro* antiplasmodial evaluation of medicinal plants from Zimbabwe. *Phytotherapy Research*. **17**(2), 123-128.
- Kratz, J. *et al.* (2011). An HPLC-UV method for the measurement of permeability of markers drugs in the Caco-2 cell assay. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **44**, 531-537.

- Križková, L. *et al.* (1998). The effect of flavonoids on ofloxacin-induced mutagenicity in *Euglena gracilis*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **416**(1–2), 85-92.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T. y Nakayama, T. (2004). Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry*. **84**, 319-339.
- Lennernäs, H. (2007). Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination. *Xenobiotica*. **37**(110-11), 1015-1051.
- Lin, L.-Z. y Harnly, J. (2010). Identification of the phenolic components of chrysanthemum flower (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Food Chemistry*. **120**(1), 319-326.
- Lin, T. *et al.* (2014). Acacetin inhibits glutamate release and prevents kainic acid-induced neurotoxicity in rats. *PLoS One*. **9**(2).
- Liu, R. *et al.* (2008). Pinocembrin protects rat brain against oxidation and apoptosis induced by ischemia–reperfusion both *in vivo* and *in vitro*. *Brain Research*. **1216** (0), 104-115.
- Lotti, C. *et al.* (2010). Chemical constituents of red Mexican propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **58**, 2209-2213.
- Ma, L., *et al.* (2009). Intestinal permeability of antitumor alkaloids from the processed seeds of *Strychnos nux-vomica* in a Caco-2 cell model. *Planta Medica*, **75**, 631-634.
- Manach, C. *et al.* (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*. **79**(5), 727-747.
- McCracken, V. y Lorenz, R. (2001). The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cellular Microbiology*, **3**(1), 1-11.
- Meng, F. *et al.* (2011). Pinocembrin attenuates blood–brain barrier injury induced by global cerebral ischemia–reperfusion in rats. *Brain Research*. **1391**(0), 93-101.
- Mishra, M. *et al.* (2011). A brief review on phytoconstituents and ethnopharmacology of *Scoparia dulcis* Linn (Scrophulariaceae). *International Journal of Phytomedicine* **3**(4), 422-438.
- Mondamio, P. (1996). Development and validation of liquid chromatography methods for the quantification of propranolol, metoprolol, atenolol and bisoprolol: application in solution stability studies. *International Journal of Pharmaceutics*. **130**, 137-140.
- Monforte, M. *et al.* (2012). Protective effect of *Calamintha officinalis* Moench leaves against alcohol-induced gastric mucosa injury in rats. Macroscopic, histologic and phytochemical analysis. *Phytotherapy Research*. **26**(6), 839-844.
- Nguyen, M. *et al.* (2005). Hypouricemic effects of acacetin and 4,5-O-dicaffeoylquinic acid methyl ester on serum uric acid levels in potassium

- oxonate-pretreated rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **28**(12), 2231-2234.
- Pal, D. y Dubey, P. (2013). Flavonoids: A powerful and abundant source of antioxidants. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **5**(3), 95-98.
- Pan, M. H. *et al.* (2005). Acacetin induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by activation of caspase cascades and production of reactive oxygen species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**(3), 620-630.
- Panduranga, N. (2014). A new synthesis for acacetin, chrysoeriol, diosmetin, tricetin and other hydroxylated flavones by modified Baker-Venkataraman transformation. *Letters in Organic Chemistry*. **11**(3), 225-229.
- Park, Y. *et al.* (1998). Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Current Microbiology*. **36**, 24-28.
- Quintin, J. y Lewin, G. (2004). Semisynthesis of linarin, acacetin, and 6-iodoapigenin derivatives from diosmin. *Journal of Natural Products*. **67**(9), 1624-1627.
- Ranta, V. *et al.* (2002). Simultaneous determination of eight  $\beta$ -blockers by gradient high performance liquid chromatography by combined ultra violet and fluorescence in corneal permeability studies *in vitro*. *Journal of Chromatography B*. **722**, 81-87.
- Rasul, A. *et al.* (2013). Pinocembrin: A novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. *BioMed Research International*. **2013**.
- Rivero-Cruz, B. y Martínez-Chávez, A. (2014). Development and validation of a RP-HPLC method for the simultaneous quantification of flavonoids markers in Mexican propolis. *Food Analytical Methods*. **8**(2), 413-419.
- Romano, B. *et al.* (2013). Novel insights into the pharmacology of flavonoids. *Phytotherapy Research*. **27**(11), 1588-1596.
- Ruddock, P. S. *et al.* (2011). Antimicrobial activity of flavonoids from *Piper lanceaefolium* and other Colombian medicinal plants against antibiotic susceptible and resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Sexually transmitted diseases*. **38**(2), 82-88.
- Russel, F. (2010). Transporters: Importance in drug absorption, distribution, and removal. En Pang, K. *et al.* Enzyme - and Transporter Based - Drug-Drug Interactions. American Association of Pharmaceutical Scientists. USA. 27-45.
- Sadek, P. (2002). The HPLC solvent guide. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley & Sons. USA.
- Sak, K. (2014). Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types. *Pharmacognosy Reviews*. **8**(16), 122-146.

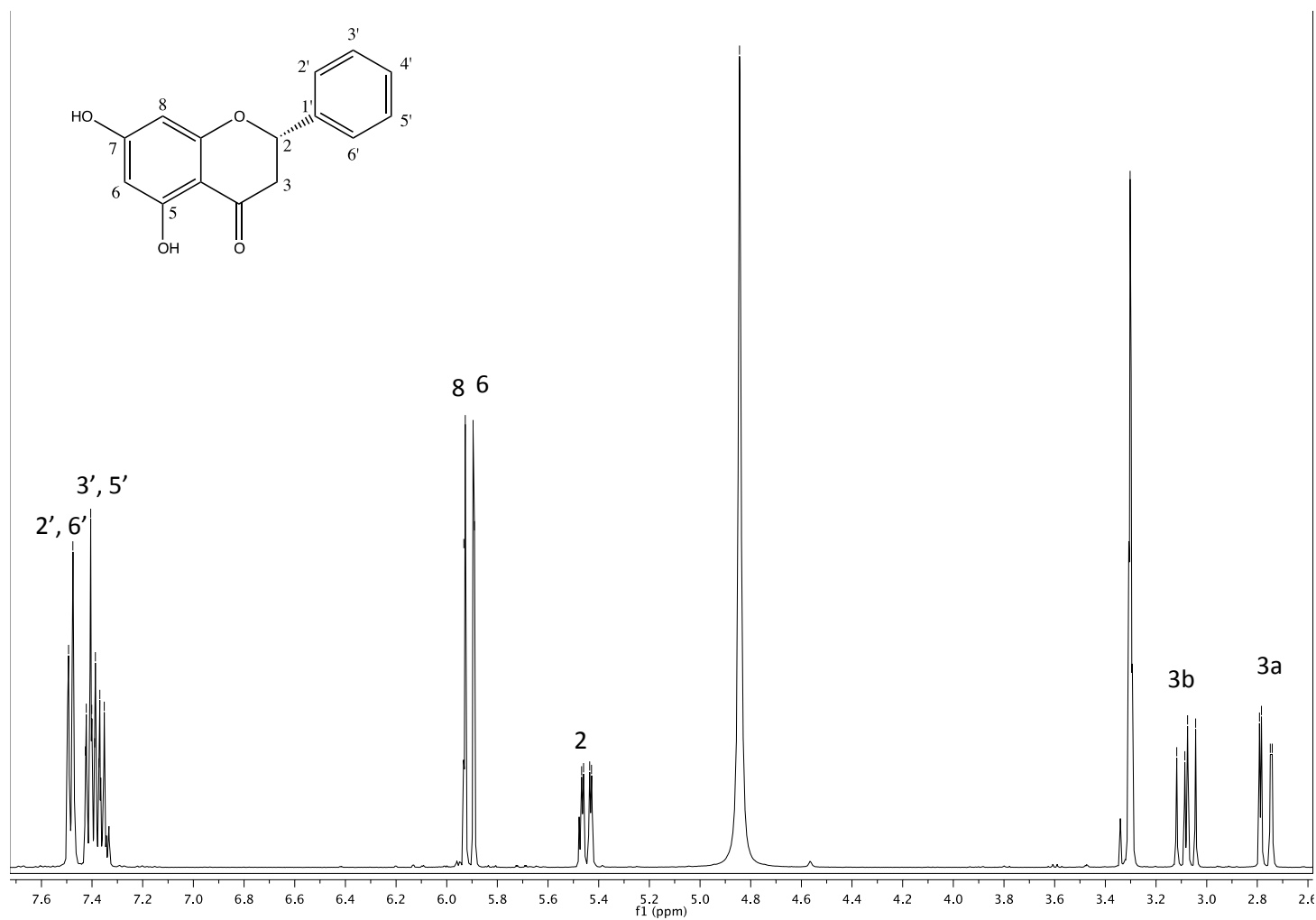
- Sala, A. *et al.* (2003). Assessment of the anti-inflammatory activity and free radical scavenger activity of tiliroside. *European Journal of Pharmacology*. **461**(1), 53-61.
- Salatino, A. *et al.* (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural Products Research*. **28**, 925-936.
- Sayre, C. L. *et al.* (2013). Chiral analytical method development and application to pre-clinical pharmacokinetics of pinocembrin. *Biomedical Chromatography*. **27**(6), 681-684.
- Segarra, E. (2006). Fisiología de los aparatos y sistemas. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Médicas. España. pp 119-125.
- Sevin, E., *et al.* (2013). Accelerated Caco-2 cell permeability model for drug discovery. *Journal of Pharmaceutical and Toxicological Methods*, **68**, 334-339.
- Sforcing, J. y Bankova, V. (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology*. **133**, 253-260.
- Sharaf, M. (1996). Isolation of an acacetin tetraglycoside from *Peganum harmala*. *Fitoterapia*. **67**(4), 294-296.
- Shen, K.-H. *et al.* (2010). Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway. *Molecular and cellular biochemistry*. **333**(1-2), 279-291.
- Smirnova, L. P. *et al.* (1975). Acacetin and its glycosides in plants of the genus *Linaria*. *Chemistry of Natural Compounds*. **10**(1), 100.
- Steinert, R. *et al.* (2008). Absorption of black currant anthocyanins by monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells mounted in using type chambers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**, 4995-5001.
- Stenber, P. *et al.* (2002). Theoretical predictions of drug absorption in drug discovery and development. *Clinical Pharmacokinetics*. **41**(11), 877-899.
- Szliszka, E. *et al.* (2009). Ethanolic extract of propolis (EEP) enhances the apoptosis-inducing potential of TRAIL in cancer cells. *Molecules*. **14**(2), 738-754.
- Tavelin, S. (2002) Applications of Epithelial Cell Culture in Studies of Drug Transport. En Wise, C (coord.). Methods in molecular biology. Epithelial cell culture protocols. Vol. 188. Humana Press. USA. 233-268.
- Thiel-Demby, V. *et al.* (2008). Biopharmaceutics classification system: validation and learnings of an *in vitro* permeability assay. *Molecular Pharmaceutics*. **6** (1), 11-18.
- Thomas, S. *et al.* (2008). Simulation modeling of human intestinal absorption using Caco-2 permeability and kinetic solubility data for early drug discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **97**(10), 4557-4574.
- Törrönen, R. *et al.* (1997). Flavonoids and phenolic acids in selected berries. *Cancer letters*. **114**(1), 191-192.

- United States Pharmacopeia (2014). USP 37-NF 32.a
- Vichai, V. y Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*. **1**(3), 1112-1116.
- Walgren, R. A., Walle, K. y Walle, T. (1998). Transport of quercetin and its glucosides across human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biochemical Pharmacology*, **55**, 1721-1727.
- Walle, U. K., Galijatovic, A. y Walle, T. (1999). Transport of the flavonoid chrysin and its conjugated metabolites by the human intestinal cell line Caco-2. *Biochemical Pharmacology*. **58**, 431-438.
- Waltenberger, B. *et al.* (2008). Transport of sennosides and sennidines from *Cassia angustifolia* and *Cassia senna* across Caco-2 monolayers- an *in vitro* model for intestinal absorption. *Phytomedicine*. **15**, 373-377.
- Wantabe, K. *et al.* (2012). Acacetin induces apoptosis in human T cell leukemia Jurkat cells via activation of caspase cascade. *Oncology Reports*. **27**(1), 204-209.
- Waksmundzka, M. *et al.* (2011). HPLC of flavonoids. En Waksmundzka, M. y Sherma, J. High performance liquid chromatography in phitochemical analysis. Chromatographics Science Series. Vol. 102. CRC Press. USA. 535-562.
- Wollenweber, E. (1991). External leaf flavonoids of *Centaurea macrocephala*. *Fitoterapia*. **62**(4), 364-365.
- Yan, B. *et al.* (2014). Determination of pinocembrin in human plasma by solid-phase extraction and LC/MS/MS: Application to pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography*. **28**(12), 1601-1606.
- Yang, Z. (2013). The roles of membrane transporters on the oral drug absorption. *Molecular Pharmaceutics and Organic Process Research*. **1**(1), 1-4.
- Yin, Y. *et al.* (2008). Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. *Journal of Ethnopharmacology*. **120**(1), 1-6.
- Zeng-hui, T. *et al.* (2007). Cellular absorption of anthraquinones emodin and chrysophanol in human intestinal Caco-2 cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **71** (7), 1636-1643.
- Zhang, M. L. *et al.* (2008). Chemical constituents of plants from the genus *Eupatorium*. *Chemistry and Biodiversity*. **5**(1), 40-55.
- Zielińska, S. y Matkowski, A. (2014). Phytochemistry and bioactivity of aromatic and medicinal plants from the genus *Agastache* (*Lamiaceae*). *Phytochemistry Reviews*. **13**(2), 391-416.



## 9. ANEXO I

Espectro de Resonancia Magnética Protónica de la Pinocembrina



Espectro de Resonancia Magnética Protónica de la Acacetina

