



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



**“Efecto de la administración oral del componente activo de
Peperomia hispidula sobre la farmacocinética del diclofenaco”**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

PRESENTA:

Torres Trejo Erik Arturo

Directora de tesis: Dra. Leticia Cruz Antonio

Asesor de tesis: Dr. Jesús Arrieta Valencia

PAPIIT IN 213918

Ciudad de México

JULIO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y darme las herramientas necesarias para poder terminar mi formación profesional satisfactoriamente.

Al programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por fomentar el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Leticia Cruz Antonio por todas sus enseñanzas y apoyo, y por haberme asesorado en cada una de mis dudas. Muchas gracias por darme la oportunidad de poder trabajar con usted.

Al Dr. Jesús Arrieta Valencia por su gran apoyo, recomendaciones y consejos para la realización de mi proyecto de tesis. Muchas gracias por haberme brindado tiempo tan valioso.

A los miembros de mi jurado, Q.F.B Mónica Elizabeth Mendoza Jacobo, Q.F.B. Jacqueline González Cervantes y Q.F.B Jesús Arroyo Rosales, gracias por apoyarme en este proyecto, sin sus comentarios y aportaciones no hubiera sido posible esto.

A todos los profesores que a lo largo de mi estancia académica me ayudaron a crecer de forma académica y profesionalmente.

A mi familia y amigos por su apoyo y consejos durante esta maravillosa etapa, muchas gracias por todo.

DEDICATORIA

A mis padres, María Teresa Trejo Serrano y Arturo Torres Camarillo, por todo el apoyo, amor y confianza. Por los consejos que me han brindado a lo largo de mi vida y por apoyarme en este proyecto, ya que sin ustedes no hubiera sido posible este gran sueño. Muchas gracias por su amor y apoyo incondicional.

A mi hermana, Wendy, por estar conmigo siempre en los momentos buenos y malos, por sus consejos y por ser cómplice de todas mis decisiones.

A mis amigas y compañeras de laboratorio, Joyce y Mariana, por sus consejos y ayuda, y por todo el apoyo incondicional que me brindaron a lo largo de la realización de este proyecto.

A mis amigos, Japhet, Carlos, Brandon, Rodrigo, Luis, Víctor, Octavio, Diego, Berenice, Alejandra, Sergio, Noé, Orlando, por acompañarme en todos estos años de estudio, pero sobre todo por regalarme momentos inolvidables llenos de aprendizajes y alegrías. Muchas gracias por su apoyo y amistad incondicional

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN	7
2. MARCO TEÓRICO.....	9
2.1 Úlceras pépticas.....	9
2.2 Anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's).....	10
2.3 Eventos adversos producidos por los AINE's.....	11
2.4 Mecanismos de defensa de la mucosa gástrica.....	12
2.5 Tratamientos terapéuticos para el daño gastrointestinal	13
2.6 Productos Naturales.....	13
2.7 Interacciones farmacológicas	15
2.8 Interacciones farmacocinéticas	17
2.9 Farmacocinética	18
2.10 Absorción	18
2.11 Distribución.....	19
2.12 Metabolismo	20
2.13 Eliminación.....	21
2.14 Parámetros farmacocinéticos	22
2.15 Diclofenaco.....	22
2.16 Metileugenol.....	23
2.17 Determinación cuantitativa de fármacos para estudios farmacocinéticos	24
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	26
4. OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos particulares.....	27
5. HIPÓTESIS	28
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	29
6.1 Equipo y materiales.....	29
6.2 Fármacos y reactivos	30
6.3 Material Biológico	30
6.4 Evaluación biológica.....	30
6.5 Método de Análisis	31

6.6 Soluciones.....	31
6.7 Tratamiento de muestras.....	32
6.8 Tratamiento de muestras para validación.....	32
6.9 Sistema Cromatográfico	32
6.10 Validación del método	33
6.11 Selectividad	33
6.12 Límite inferior de cuantificación.....	33
6.13 Curva de calibración.....	33
6.14 Precisión.....	34
6.15 Repetibilidad.....	34
6.16 Reproducibilidad.....	35
6.17 Exactitud.....	35
6.18 Estabilidad en el automuestreador.....	35
6.19 Estabilidad ciclos de congelación-descongelación.....	36
6.20 Tratamiento de datos.....	36
7. RESULTADOS	37
7.1 Validación.....	37
7.2 Selectividad.....	37
7.3 Límite inferior de cuantificación	39
7.4 Curva de calibración.....	39
7.5 Precisión.....	40
7.6 Exactitud.....	41
7.7 Estabilidad en el automuestreador.....	42
7.8 Estabilidad ciclos de congelación-descongelación.....	43
7.9 Perfil farmacocinético	43
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	45
9. CONCLUSIONES.....	50
10. REFERENCIAS.....	51

1. INTRODUCCIÓN

El diclofenaco sódico es uno de los analgésicos más utilizados en la clínica, su uso extenso es debido a que posee un amplio margen terapéutico y no requiere de receta médica para su adquisición, lo cual lo ha expuesto a acrecentar sus reacciones adversas, tal como el daño gastrointestinal. Se ha sugerido el componente activo de *Peperomia hispidula* (metileugenol) como alternativa para disminuir el daño gástrico atribuido a este AINE, ya que su constituyente activo a través de su actividad antioxidante e inmunomoduladora lo reduce. Sin embargo, la administración simultánea de estos dos componentes puede ser susceptible de presentar interacciones farmacológicas. Por este motivo el presente proyecto se desarrolló para poder evidenciar una posible interacción farmacocinética entre los dos activos, por lo cual se evaluó si el metileugenol compuesto identificado en *Peperomia hispidula* como gastroprotector, modifica la respuesta farmacocinética de diclofenaco sódico tras su administración oral en ratas macho wistar, obteniendo dos perfiles farmacocinéticos; con ausencia y presencia de metileugenol y determinando los parámetros farmacocinéticos correspondientes.

El método analítico utilizado (cromatografía de líquidos de alta resolución) para la determinación cuantitativa de los fármacos se validó de acuerdo a la NOM-177 y cumplió con los parámetros de selectividad, precisión, exactitud y linealidad; por lo que la medición de las concentraciones plasmáticas de diclofenaco sódico fue confiable, permitiendo un análisis farmacocinético adecuado. El análisis estadístico reveló que la Concentración máxima obtenida para el diclofenaco sódico disminuyó significativamente con la administración del metileugenol al modificar su respuesta farmacocinética, esto indica que hay una posible interacción farmacocinética entre

el diclofenaco sódico y el componente de *peperomia hispidula* cuando son administrados a esas dosis (15.078 y 3.996 mg/Kg respectivamente).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Úlceras pépticas

Las úlceras pépticas son llagas o lesiones en la mucosa gastrointestinal que se extienden por toda la *muscularis mucosae*, se caracterizan por presentar diferentes etapas de necrosis, reducción del flujo sanguíneo, aumento del estrés oxidativo e inflamación.¹ Las úlceras son causadas principalmente por un desequilibrio entre algunos factores endógenos agresivos y protectores en el estómago, como la secreción de ácido-pepsina, la integridad de la barrera mucosa, la secreción de moco, el flujo sanguíneo, la regeneración celular, las prostaglandinas, los factores de crecimiento y lesiones precipitadas en la capa de la mucosa², además algunos factores exógenos como el estrés emocional, el tabaquismo, el consumo excesivo de alcohol, la bacteria *Helicobacter pylori* y el uso prolongado de anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's) pueden provocar esta lesión.^{1,3} La úlcera péptica es la alteración gastrointestinal más común y afecta del 10 al 15% de la población en un momento dado², se caracteriza por la alteración de la integridad de la mucosa del esófago, el estómago o el duodeno, y aunque no es mortal, puede conducir a complicaciones más graves, como perforaciones, hemorragia gastrointestinal y obstrucción de la salida gástrica.⁴

El tratamiento farmacológico de las úlceras pépticas se dirige a factores agresivos que contrarrestan o que estimulan las defensas de la mucosa. Los objetivos ideales del tratamiento para las úlceras pépticas son; aliviar el dolor y curar o retrasar la recurrencia de la úlcera. Hasta la fecha, ningún fármaco cumple todos los objetivos de la terapia.⁵

La úlcera péptica es un trastorno crónico y recurrente muy extendido en todo el mundo con tasas de morbilidad y mortalidad crecientes.⁴ Es un efecto adverso bien documentado de los AINE's, que está relacionado con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas en tejidos en los cuales son responsables de la homeostasis fisiológica. Se estima que hasta el 30% de las personas que son sometidas a un tratamiento a largo plazo con AINE's padecen efectos adversos gastrointestinales relacionados con estos.⁶

2.2 Anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's)

Los AINE's son ampliamente utilizados en el tratamiento de varios trastornos agudos y crónicos, que incluyen artritis y dolor.⁷ Poseen propiedades analgésicas, anti-inflamatorias y antipiréticas: son un grupo heterogéneo de sustancias que comparten los mismos efectos terapéuticos colaterales.⁸

Se clasifican en dos grupos: Los convencionales, también conocidos como AINE's no selectivos ya que inhiben a la ciclooxigenasa (COX-1 y COX-2), y los nuevos que son inhibidores selectivos de la COX-2.⁷ Los AINE's convencionales ejercen sus efectos anti-inflamatorios y antipiréticos al inhibir las actividades de las isoenzimas COX-1 y COX-2 y con ello la síntesis de prostaglandinas⁶ (mediadoras de la inflamación y del mantenimiento de la integridad de la mucosa gastrointestinal).⁹

Los AINE's ampliamente utilizados a nivel mundial representan una de las categorías terapéuticas más prescritas.¹⁰ Su uso extendido se debe a que poseen un amplio margen terapéutico, por lo que varios no requieren de receta médica para su adquisición.¹¹ El uso de AINE's en dosis terapéutica es beneficioso y aconsejable

para la salud, pero en el uso frecuente y en dosis más altas está frecuentemente implicado en la aparición de eventos adversos, sobre todo a nivel digestivo.^{3,12}

2.3 Eventos adversos producidos por los AINE's

Pueden ser menores, como dispepsia, erosión, dolor abdominal y náuseas, o muy graves como perforaciones o hemorragia gastrointestinal. La administración oral de un AINE a largo plazo conducirá inicialmente a una lesión gástrica debido al daño en la mucosa, llevando a úlceras gástricas y duodenales. No obstante, muchos pacientes que pueden no presentar síntomas tienen un alto riesgo de desarrollar complicaciones severas, como sangrado y perforación del estómago. El riesgo anual de estas complicaciones severas es del 1 al 4%. Se indica que los pacientes que son adultos mayores, del sexo femenino, con artritis reumatoides, historia previa de sangrado gastroduodenal, en uso de agentes antitrombóticos o corticosteroides, altas dosis de AINE's y presencia de enfermedad sistémica severa, son los más susceptibles de presentar daños gástricos.^{3,10,11} Varios enfoques se han adoptado para reducir el riesgo de complicaciones gastrointestinales inducidas por AINE's, incluido la reducción de la dosis de AINE's, y el uso de agentes gastroprotectores concomitantes.^{7,13} Los tratamientos actuales para el daño gástrico son los inhibidores de la bomba de protones y el uso de AINE's inhibidores selectivos de la COX-2 (coxibs).³

Los AINE's dañan la mucosa gástrica por dos mecanismos: efecto tópico y efecto sistémico. El efecto tópico de determinados AINE's está bien estudiado en el ácido acetilsalicílico. Este como ácido débil, es liposoluble en el medio de baja acidez gástrica y por ello se difunde de forma pasiva en la mucosa gástrica, dañando las

células superficiales y permitiendo la retrodifusión de los iones H^+ y eventualmente provocando erosiones y ulceraciones. Es conocido que los fosfolípidos y la capa de gel mucoso son la defensa principal en el estómago que los protege de los problemas de los ácidos y mantiene la condición hidrofóbica. El uso de un AINE con características ácidas cambiará repentinamente la condición hidrofóbica a una condición hidrofílica, lo que resulta en una lesión gástrica. Otro de los mecanismos (el más generalizado a nivel sistémico) es el bloqueo de la COX-1 en la mucosa gastrointestinal con la subsecuente inhibición de la producción de las prostaglandinas PGE_2 y PGD_2 en el estómago. Estas prostaglandinas sirven como agentes citoprotectores de la mucosa gastrointestinal; inhiben la secreción ácida por el estómago, aumentan el flujo sanguíneo local y la secreción de moco citoprotector.^{14,15}

2.4 Mecanismos de defensa de la mucosa gástrica

El mecanismo de defensa de la mucosa gástrica contra factores agresivos, como el ácido clorhídrico, la bilis y los AINE's se compone principalmente de factores funcionales, humorales y neuronales.

- Factores funcionales: Secreción alcalina, microcirculación de la mucosa, motilidad y capa de fosfolípidos.
- Factores humorales: Prostaglandinas y óxido nítrico
- Factores neuronales: Neuronas sensoriales sensibles a la capsaicina¹⁶

2.5 Tratamientos terapéuticos para el daño gastrointestinal

Hoy en día, se usan varias clases de medicamentos para tratar de reducir el daño gastrointestinal producido por los AINE's incluyendo las úlceras pépticas, donde el uso de antiácidos, agentes citoprotectores y agentes antiseoretos (antagonistas del receptor H₂ e inhibidores de la bomba de protones) son algunas opciones. Sin embargo, también todos estos medicamentos están asociados con efectos secundarios indeseables, lo que hace necesario el desarrollo de tratamientos alternativos; las plantas medicinales al proporcionar una importante fuente de nuevas sustancias químicas con posibles efectos terapéuticos y en ocasiones desprovistos de eventos adversos severos en las dosis empleadas usualmente, son una alternativa adecuada para tratar de reducir los daños gastrointestinales mencionados anteriormente.⁴

Algunas de las plantas que tienen un papel benéfico contra la ulceración gástrica inducida por AINE's son: los antocianósidos, obtenidos de *Vaccinium myrtillus*, algunas plantas de la familia *Apiaceae* como *Apium graveolens* comúnmente conocida como apio y *Bupleurum falcatum*, además, numerosas investigaciones han informado sobre muchas otras plantas naturales como *Camellia sinensis*, *Phyllanthus emblica*, *Myristicamalabarica*, *Piper betle*, *Picrorhiza kurroa*.¹⁷

2.6 Productos Naturales

Existe un creciente interés y necesidad de buscar formulaciones no tóxicas y antiulcerosas de plantas medicinales para tratar la úlcera gástrica inducida por AINE's, ya que sus constituyentes activos a través de su actividad antioxidante e inmunomoduladora reducen dicho daño. Las especias y las hierbas son fuentes

reconocidas de antioxidantes naturales, muchos de los cuales son fenoles y aminas aromáticas. La actividad observada en estas plantas se atribuye a la presencia de flavonoides, alcaloides, terpenoides, taninos, saponinas y ácidos fenólicos.² Estos compuestos pueden actuar a nivel intracelular y extracelular, disminuyendo las concentraciones locales de oxígeno y la formación de superóxido, previniendo el inicio de la cadena de la generación de radicales libres inducida por metales y la peroxidación lipídica. La actividad antioxidante puede contribuir a proteger el cuerpo humano de varias enfermedades, incluida la úlcera gástrica. La curación de la úlcera gástrica es un proceso complejo que involucra la angiogénesis y la proliferación celular. Por lo tanto, una búsqueda entre las plantas medicinales se ha vuelto imprescindible a pesar del progreso y enfoques en química convencional y farmacología en la producción de medicamentos efectivos.¹⁷

Los productos naturales son conocidos por sus efectos secundarios mínimos, bajo costo y disponibilidad. Existe diversa evidencia que señala que algunos productos naturales o sus constituyentes purificados tienen una acción benéfica para contrarrestar los daños gástricos causados por los AINE's, entre ellas esta, *Vaccinium myrtillus* que ejerce una importante actividad preventiva y curativa antiulcerosa debido a que los antocianósidos obtenidos de ella, influyen en la biosíntesis de los mucopolisacáridos, mejorando la eficiencia de la barrera mucosa a nivel gástrico. Las saponinas aisladas del fruto de *Kochia scoparia* se le atribuyen propiedades gastroprotectoras, por la activación de los factores protectores de la membrana mucosa, en lugar de la inhibición de la secreción de ácido gástrico. *Lagenaria vulgaris* una verdura popular del tipo de calabazas, colocada bajo la

familia de las *cucurbitáceas*, es otra de las plantas que muestra actividad antiulcerosa a través de una vía antioxidante mediante la modulación del nivel de glutatión. La raíz del *P. Ginseng* es ampliamente usada en China para el tratamiento de desórdenes gastrointestinales, atribuyendo su actividad antiulcerosa a los polisacáridos solubles en agua y en álcali que se separaron de las raíces y hojas de *P. Ginseng*. El primer fármaco eficaz contra la úlcera gástrica fue la carbenoxolona, aislada de la planta, *Glycyrrhiza glabra*. Otros productos naturales reportan también efectos beneficiosos contra eventos adversos diferentes a los gastrointestinales atribuidos a los AINE's, tales como la *Salvia miltiorrhiza* que posee efectos beneficiosos contra el paracetamol administrado a ratas hepáticas, el *Saikosaponin-D* un compuesto activo en la planta medicinal *Bupleurum falcatum* es utilizado por sus efectos beneficiosos contra los trastornos hepáticos, o la hesperidina, un compuesto natural que tiene un efecto potencial contra la inflamación y las reacciones alérgicas, al poseer propiedades antioxidantes. ^{2,3,17}

2.7 Interacciones farmacológicas

Una interacción farmacológica se produce cuando la actividad o el efecto de un fármaco se ven alterados por la presencia o por la acción de otro. Una interacción es una de las causas más comunes de reacciones adversas, se clasifican en dos ramas: farmacocinética y farmacodinámica.¹⁸ En todas las interacciones hay por lo menos un fármaco objeto, cuya acción es modificada por la de otro y un fármaco precipitante, y en algunas ocasiones ambos fármacos pueden ser precipitantes y objetos a la vez.¹⁹

A pesar del uso generalizado de los AINE's y de los productos naturales, los reportes de interacciones entre estos dos son escasas, no obstante, el uso concomitante de ellos puede ser favorable o peligroso dependiendo del compuesto activo. El uso de productos naturales puede interferir en el efecto de los AINE's, aumentando la actividad anti-inflamatoria y reduciendo los daños en los tejidos, pero también pueden conducir al aumento de varios efectos adversos como nefro o hepatotoxicidad. Por ejemplo, *Ephedra* y *Ginkgo biloba* puede aumentar el riesgo de hemorragia cerebral y hemorragia por úlcera gastrointestinal promovida por los AINE's, la presencia de los compuestos hepato-tóxicos FKA y B en el extracto de kava puede potenciar el daño hepático cuando se administra conjuntamente con un AINE, por otra parte, el té verde, la *curcumina* y el *resveratrol* poseen una mejoría de la actividad anti-inflamatoria y protegen el riñón y el hígado del daño producido por los AINE's.²⁰ El uso concomitante de analgésicos opioides con los suplementos herbales sedantes, valeriana, kava y manzanilla, puede llevar a un aumento de la depresión del sistema nervioso central. El efecto analgésico de los opioides también puede ser inhibido por el ginseng. Los AINE's tienen el potencial de interactuar con los suplementos herbales que se sabe que poseen actividad antiplaquetaria (ginkgo, ajo, jengibre, arándano, dong quai, matricaria, ginseng, cúrcuma, adormidera y sauce), con los que contienen cumarina (manzanilla, motherwort, castaño de indias, fenogreco y trébol rojo) y con tamarindo, lo que aumenta el riesgo de sangrado. El uso concomitante de hierbas hepatotóxicas Echinacea y kava, y con hierbas que contienen salicilato (saucé, hoja de pradera), puede aumentar potencialmente las incidencias de hepatotoxicidad y nefrotoxicidad, es posible que los AINE's interactúen de manera aditiva con la cúrcuma en ciertos aspectos de su

farmacología, y la terapia concomitante con estas sustancias puede provocar trastornos de la coagulación y un mayor riesgo de sangrado, la administración de AINE's durante el tratamiento con motherworth pueda aumentar el riesgo de sangrado.²¹

En vista de la tendencia actual, es probable que los profesionales de la salud se encuentren con más frecuencia que antes, con pacientes que usan suplementos de productos naturales y que pueden presentar interacciones con el fármaco. Con el fin de abordar adecuadamente este problema y proporcionar un servicio de atención de salud más adecuado a dichos pacientes, los profesionales deben conocer al menos las interacciones que ocurren comúnmente o que pudieran presentarse y tener efectos benéficos o adversos. Las interacciones pueden ser, aditivas o sinérgicas, atribuyendo al producto natural el aumento o potencia de la acción del medicamento. Por el contrario, el producto natural también puede ser antagónica a la acción del fármaco. Si bien las interacciones producto natural-fármaco involucran mecanismos farmacodinámicos y/o farmacocinéticos.^{19,21}

2.8 Interacciones farmacocinéticas

Son aquellas debidas a la influencia que tiene un fármaco sobre el ciclo de otro en el organismo.¹⁹ A menudo se consideran sobre la base del conocimiento de cada fármaco y se identifican mediante el control de las manifestaciones clínicas del paciente cuando es posible, así como en los cambios en las concentraciones de fármaco en suero o plasma, y pueden incluir alteraciones en la liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación (LADME).¹⁸

2.9 Farmacocinética

La farmacocinética estudia los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación en el organismo del fármaco liberado de la forma medicamentosa, es decir, estudia que hace el organismo sobre los fármacos después de su administración. Este movimiento de los fármacos está regulado por leyes expresadas por modelos matemáticos. El conocimiento preciso de la farmacocinética tiene extraordinaria importancia y permite predecir la acción terapéutica o tóxica de los fármacos.²²

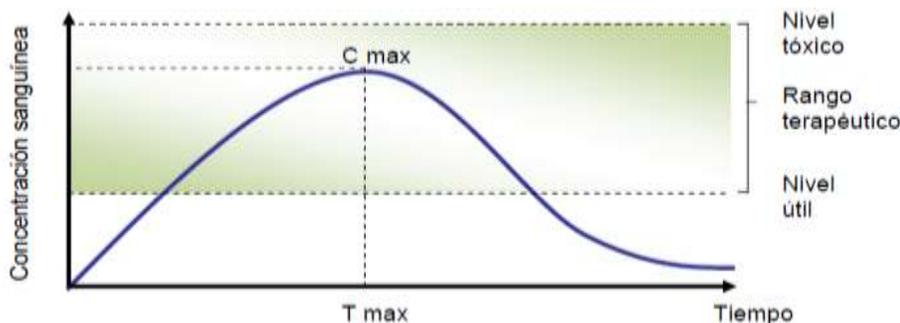


Figura 1. Administración oral de un fármaco.

2.10 Absorción

Los fármacos que se administran de forma oral deben disolverse para poder ser absorbidos, aunado a superar la complejidad que supone la barrera gastrointestinal para llegar al torrente sanguíneo. Las interacciones farmacocinéticas relacionadas con la absorción suelen modificar la biodisponibilidad del fármaco, por la cantidad total de medicamento absorbido o por la variación de la velocidad con que lo hace. Estos cambios pueden deberse a alteraciones en el pH gastrointestinal, a la formación de quelatos o compuestos no absorbibles, a la toxicidad gastrointestinal y a la alteración de la absorción.¹⁹ La cantidad de fármaco activo que entra en la

circulación sistémica tras la administración en el tubo digestivo es inferior (debido al efecto de primer paso) de la que se administra por otra vía.²³

2.11 Distribución

Tras la absorción, los fármacos entran en la circulación sistémica y se distribuyen ampliamente en el organismo, se desplazan de forma libre o unida reversiblemente a proteínas plasmáticas en equilibrio, la unión de fármacos a estas proteínas se determina mediante la afinidad entre el fármaco y la proteína y la capacidad de unión de la proteína. Después abandonan el torrente circulatorio y entran en las células, en una cantidad que depende del riego sanguíneo local, de la permeabilidad capilar y de la lipófila relativa del fármaco. Los fármacos hidrosolubles, los fármacos polares y las formas ionizadas de los fármacos no atraviesan esta barrera, ya que no pueden atravesar las uniones cortadas y presentan dificultades para atravesar la membrana celular lipídica. Los fármacos liposolubles pasan más fácilmente a través de membranas celulares.²³

Si dos o más fármacos presentan afinidad por los mismos sitios de unión, se unirá aquel que presente mayor afinidad y la concentración plasmática del fármaco desplazado aumentará.²³ La administración de dos fármacos con un alto grado de unión a proteínas puede causar toxicidad por aumento de exposición al fármaco con menor afinidad. Las interacciones que afectan a la distribución tienen cierta importancia cuando los fármacos desplazados tienen un intervalo terapéutico estrecho, como los anticoagulantes antagonistas, antiepilépticos, antidiabéticos orales, entre otros.¹⁹

2.12 Metabolismo

Los fármacos experimentan biotransformación mediante las mismas reacciones que los compuestos endógenos en muchos casos.²³ El metabolismo causa cambios en la estructura molecular de los medicamentos y produce metabolitos que, normalmente, son menos activos y más hidrosolubles, para facilitar su eliminación, aunque se pueden generar también metabolitos más activos.¹⁵ Aunque el metabolismo de los fármacos tiene lugar en casi todos los tejidos, incluido el tubo digestivo, el hígado es el lugar principal debido a su ubicación estratégica en la circulación portal y su cantidad de enzimas metabólicas.²³

Se producen dos tipos generales de reacciones metabólicas de los fármacos: fase 1, que comprende la modificación química, normalmente por oxidación, reducción o hidrólisis; y de fase 2, en la que se une covalentemente una sustancia química endógena, la más habitual es la conjugación de glucosa o glucoronidación. Un sistema enzimático que cataliza las reacciones metabólicas de tipo fase 1 es el sistema de la oxidasa microsómica de función mixta CYP450, estas enzimas catalizan los procesos de oxidación-reducción. Si los metabolitos resultantes de las reacciones de fase 1 tienen polaridad suficiente, los riñones pueden excretarlo, sin embargo, muchos metabolitos son demasiado lipofílicos por lo que es necesaria una segunda fase metabólica, la glucoronidación es la reacción más común e importante de esta fase. Las enfermedades hepáticas alteran el metabolismo de los fármacos, por lo que es necesario un ajuste de las dosis.²³

El metabolismo enzimático es el principal protagonista de las interacciones farmacocinéticas.¹⁹ La amplia gama de fármacos que se someten a la

biotransformación oxidativa mediada por CYP es responsable de la gran cantidad de interacciones medicamentosas clínicamente significativas durante la terapia con múltiples fármacos. Muchas interacciones farmacocinéticas están relacionadas con la inhibición o inducción de las enzimas CYP.¹⁸ Si dos fármacos se metabolizan por la misma isoenzima CYP, pueden interferir entre ellos en la vía normal o velocidad del metabolismo y una interacción farmacológica puede reducir o aumentar las concentraciones plasmáticas del fármaco.²³

2.13 Eliminación

Es el proceso por el cual un medicamento y/o sus metabolitos se expulsan del organismo. Las alteraciones de la excreción renal de medicamentos pueden deberse a la variación del pH de la orina, a variaciones de la secreción tubular de fármacos y la variación del flujo renal. Las interacciones referentes a la eliminación son menos frecuentes e importantes que las relacionadas con el metabolismo, o con la absorción, ya que las interacciones clínicamente significativas sólo se producirán si afectan a moléculas farmacológicamente activas.¹⁹

La vía principal de eliminación de fármacos es a través de riñones, que recibe de una cuarta a una quinta parte del gasto cardíaco. La tasa de eliminación de la mayoría de los fármacos sigue una cinética de primer orden.²³ Puesto que la mayoría de las interacciones farmacocinéticas sólo causan resultados adversos en una minoría de pacientes, el conocer los factores de riesgo es importante para reducir la probabilidad de aparición de la interacción y la gravedad del cuadro clínico.¹⁹

2.14 Parámetros farmacocinéticos

De las concentraciones que se alcanzan en el sitio de acción depende el éxito o fracaso del tratamiento, es aquí donde la farmacocinética es de gran importancia, para la interpretación de los datos sobre determinaciones en fluidos biológicos, la farmacocinética utiliza diferentes parámetros: 1) La concentración máxima ($C_{\text{máx}}$) de fármaco alcanzado después de la administración, 2) Tiempo requerido para alcanzar $C_{\text{máx}}$ (T_{max}), 3) Área bajo la curva (ABC), que depende de la cantidad de fármaco absorbido y permite una estimación de la biodisponibilidad, la cual es un índice del grado con el que un fármaco llega a su sitio de acción. También puede expresarse como una medida de la exposición sistémica total del fármaco. 4) La vida media ($t_{1/2}$), definida como el tiempo para que una concentración plasmática de fármaco alcance la mitad del valor inicial, siendo una estimación de la duración del efecto farmacológico. 5) El Aclaramiento (Cl) otro parámetro que refiere a la depuración de un fármaco y 6) El volumen de distribución (V_d), que indica el volumen aparente en el cual se distribuye el fármaco.^{23,24}

2.15 Diclofenaco

El diclofenaco es un potente anti-inflamatorio no esteroideo, cuya estructura se observa en la imagen 1, es uno de los analgésicos más utilizados en la clínica en el tratamiento de enfermedades inflamatorias reumáticas o no reumáticas. El diclofenaco es el AINE más recetado a nivel mundial²⁵ y el octavo medicamento más vendido en el mundo.²⁶ Inhibe la conversión del ácido araquidónico a las prostaglandinas que son responsables del proceso inflamatorio.²⁷

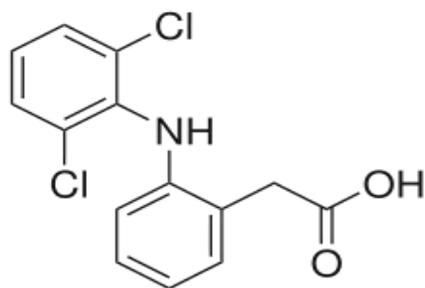


Figura 2. Estructura del diclofenaco sódico

El diclofenaco tiene una fuerte actividad antipirética y analgésica, por lo que es utilizado para el dolor agudo, dolor crónico e inflamación tal como en una cirugía bucal, dismenorrea, dolor de espalda, cólico renal, cólico biliar, como en condiciones post-traumáticas y post-operatorias.²⁸ La administración del diclofenaco suele presentar diversos efectos adversos, los más frecuentes son: las náuseas, vómito, dolor abdominal, eructos, pirosis, diarrea y erupción cutánea y con menos frecuencia produce anorexia, diarrea, ulceración gastrointestinal, edema de extremidades, zumbidos de oído, cefalea y visión borrosa.²⁹ Hoy día el diclofenaco es el segundo analgésico menos gastrolesivo.¹²

2.16 Metileugenol

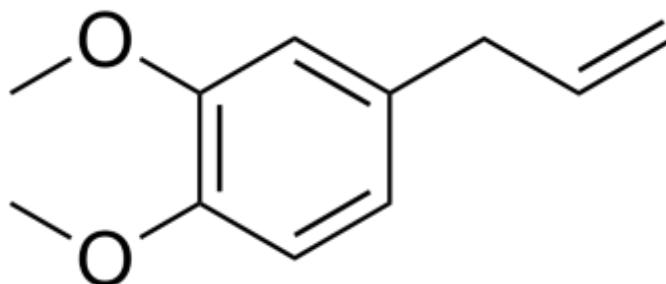


Figura 3. Estructura del metileugenol

Peperomia hispidula se utiliza en la medicina herbolaria tradicional mexicana para tratar las úlceras gástricas. El metileugenol fue identificado como uno de los

compuestos más activos en el extracto de esta planta, con efecto gastroprotector a una dosis de 3 mg/kg y alcanza el nivel máximo a 100 mg/kg. El mecanismo de acción farmacológico no se ha establecido completamente, sólo se indica que las vías de óxido nítrico, grupos sulfhídrido o prostaglandinas no están implicadas; sin embargo, se ha informado que el metileugenol tiene una actividad depuradora débil de radicales libres directa. El metileugenol es un alquenilbenceno distribuido ampliamente en una variedad de especies de plantas como la albahaca, la nuez moscada, la macis, el anís, las hojas de laurel y frutas, entre otros. Se utiliza como agente aromatizante en alimentos como jaleas, productos horneados y helados, y como fragancia en jabones, lociones y perfumes. Este compuesto también, es un depresor del sistema nervioso central con propiedades anestésicas, hipotérmicas, antianafilaxis, antinociceptivas, anti-inflamatorias, miorelajantes y anticonvulsivas, este no afecta la actividad de COX-1 o COX-2 y tiene un efecto antinociceptivo sobre la hiperalgesia inducida por formalina en ratones, también inhibe la liberación de histamina por los mastocitos e inhibe la contracción inducida por acetilcolina e histamina (involucradas en algunas de las rutas que regulan la secreción ácida).⁴

2.17 Determinación cuantitativa de fármacos para estudios farmacocinéticos

La magnitud de una interacción farmacológica del tipo farmacocinética puede establecerse por la determinación de las concentraciones plasmáticas del fármaco de interés, ya que éstas se relacionan con la concentración del fármaco en los lugares de acción y tiempo de permanencia.¹⁹ Motivo que, hace relevante la aplicación de la metodología, para la determinación cuantitativa del producto de interés. La cromatografía líquida es una de las técnicas que permite la separación

de sustancias que se encuentran en una mezcla y es ampliamente usada para la determinación de fármacos en fluidos biológicos para estudios farmacocinéticos. El éxito de la aplicación de la CLAR (cromatografía líquida de alta resolución) para la cuantificación de un compuesto depende no solo de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir: la preparación de la muestra, el tipo de la columna, la fase móvil, la longitud y diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil, el tipo de detección y el algoritmo de integración,³⁰ también de la caracterización correcta del método y la validación del mismo para obtener resultados confiables que puedan interpretarse satisfactoriamente.³¹ La validación del método incluye todos los procedimientos requeridos para demostrar que la determinación cuantitativa de la concentración de una sustancia de interés (o series de sustancias) en una matriz es confiable para la aplicación destinada.³²

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El diclofenaco sódico es un AINE perteneciente al conjunto químico de los fenilacéticos³³. Contrariamente a la acción de otros AINE's, su potencia inhibitoria es muy superior en la ciclooxigenasa COX-2 frente a la COX-1 y es uno de los AINE's más utilizados a nivel mundial por su amplio margen terapéutico y por no requerir receta médica para su adquisición.¹¹ Sin embargo, al igual que otros AINE's se encuentra relacionado con serios efectos gastrointestinales, cardiovasculares y renales.³⁴ Buscando contrarrestar lo anterior se han propuesto diversas alternativas, las cuales son susceptibles de presentar interacciones favorables o no. Una de ellas son las que involucran plantas o compuestos derivados de éstas. Ejemplo de esto es lo reportado para el diclofenaco sódico con *Ginkgo biloba*, donde se presentó una interacción metabólica en estudios in vitro pero en estudios in vivo tal interacción no fue evidenciada.³⁵ Se ha sugerido que la presencia de los compuestos hepatotóxicos (Flavokavainas A and B) presentes en el extracto de la planta kava (*Piper methysticum*) pueden potenciar el daño hepático cuando se administra concomitantemente con el diclofenaco sódico.²⁰ También se ha reportado en un caso preclínico que el extracto metánolico de Cuachalalate en dosis inferiores a 100mg/kg protege la mucosa gástrica del daño inducido por diclofenaco sódico sin alterar ni la actividad anti-inflamatoria ni la farmacocinética del AINE.⁸ Dado que las plantas, productos, extractos o infusiones medicinales son de uso tradicional y frecuente en México.³⁶ El presente proyecto pretende establecer si puede existir una interacción farmacocinética de diclofenaco sódico con el componente activo de *Peperomia hispidula* reportado como gastroprotector: metileugenol, cuando son administrados de forma oral.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar si el metileugenol compuesto identificado en *Peperomia hispidula* como gastroprotector, modifica la respuesta farmacocinética de diclofenaco sódico tras una administración oral.

4.2 Objetivos particulares

- Demostrar que el método analítico empleado por cromatografía líquida de alta resolución para la cuantificación de diclofenaco sódico es apropiado conforme lo establece la NOM-177-SSA1-2013.
- Obtener perfiles farmacocinéticos de diclofenaco sódico administrado por vía oral en presencia y ausencia del compuesto activo de la *Peperomia hispidula*.
- Determinar los parámetros farmacocinéticos del diclofenaco sódico administrado por vía oral en presencia y ausencia del compuesto activo de la *Peperomia hispidula*.

5. HIPÓTESIS

La administración oral del compuesto activo de *Peperomia hispidula* modifica el perfil farmacocinético del diclofenaco sódico tras su administración oral, disminuyendo parámetros como $C_{m\acute{a}x}$ y ABC, debido a las características gastroprotectoras que se han atribuido a metieugenol compuesto gastroprotector.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Equipo y materiales

- Bomba de vacío Welch 2522B0
- Equipo de filtración Milipore
- Sonicador Branson 1800
- Microcentrífuga Eppendorf 5424
- Vortex Genie 2 G-560
- Sistema cromatográfico Waters
- Micropipetas
- Vaso de precipitados 100mL
- Probeta 1000 mL
- Tabla de disección
- Estuche de disección
- Trampas para rata
- Jeringas de insulina
- Tubos eppendorf de 2mL
- Maskin tape
- Viales
- Alfileres
- Matraz aforado 10 y 25 mL
- Combitips 10, 100, 200, 1000 y 5000 μ L
- Frascos de vidrio de 1L.

6.2 Fármacos y reactivos

- Diclofenaco Sódico Sigma-Aldrich. D6899-10G
- Naproxeno Sódico Sigma-Aldrich. M1275-5G. 98-102%
- Metileugenol Sigma-Aldrich
- Éter etílico anhidro ACS marca Fermont
- Metanol grado HPLC marca Fermont
- Acetonitrilo grado HPLC marca Fermont
- Solución salina al 0.9%
- Tween 80
- Heparina

6.3 Material Biológico

Ratas macho Wistar de 8 semanas de edad y un peso de 250 a 280 g puestas previamente en ayuno por 12 h. Cada rata fue sacrificada al término del tratamiento.

6.4 Evaluación biológica

Los animales antes del tratamiento fueron anestesiados en un ambiente ligero de éter etílico, utilizando ungüento de petrolato para no dañar las mucosas respiratorias. Fueron colocados en posición decúbito dorsal para colocar dentro de la arteria caudal de la cola del animal un catéter de polietileno (0.1 mm de diámetro interno) y en el extremo libre se colocó una jeringa con el fin de facilitar la toma de las muestras durante todo el estudio.

Al grupo control se le administró por vía oral el diclofenaco sódico (15.078 mg/Kg).

Se tomaron muestras de 200 µL de sangre antes de la administración del

diclofenaco sódico (tiempo 0) y a los 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, y 360 minutos posteriores a su administración.^{7,23} Después de la toma de cada muestra se recuperaba el volumen tomado de sangre con solución fisiológica y se colocaba heparina. Las muestras recolectadas fueron centrifugadas durante 15 minutos a 15000 rpm, se tomaron 100 µL de plasma de cada muestra y fueron congeladas a -20°C para su posterior análisis.

Al grupo de tratamiento, se le administró por vía oral metileugenol (3.996mg/Kg) suspendido en el vehículo (solución de Tween 80, 0.5 %, 1 mL/250 g de peso) 30 minutos antes de la administración del diclofenaco sódico por vía oral en la misma dosis que el grupo control (15.078 mg/Kg). Se tomaron muestras bajo las mismas condiciones que en el grupo control y se pusieron bajo congelamiento -20°C para su posterior análisis.

6.5 Método de Análisis

6.6 Soluciones

- Soluciones estándar de diclofenaco sódico: Soluciones de diclofenaco sódico a una concentración de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 y 1.2 mg/mL, fueron preparadas en metanol a partir de una solución más concentrada de 1.2 mg/mL.
- Estándar interno (EI): Naproxeno sódico a una concentración de 1mg/mL disuelto en metanol.

6.7 Tratamiento de muestras

A 100 μL de plasma obtenido de los tratamientos una vez descongelados, se les adicionó 4 μL de estándar interno y 896 μL de metanol hasta completar 1000 μL , se agitó mecánicamente por 20 segundos con ayuda de un vortex y se centrifugó por 15 min a 15000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorff y se inyectó al sistema cromatográfico para su análisis bajo las condiciones cromatográficas descritas. ^{7,23}

6.8 Tratamiento de muestras para validación

A 100 μL de plasma se les adicionó solución de diclofenaco sódico en concentración correspondiente al parámetro de validación a evaluar, 4 μL de Naproxeno sódico (estándar interno), y metanol hasta completar 1000 μL , se agitó mecánicamente por 20 segundos con ayuda de un vortex y se centrifugó por 15 min a 15000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf y se inyectó al sistema cromatográfico para su análisis bajo las condiciones establecidas. ^{7,23}

6.9 Sistema Cromatográfico

- Bombas Waters 600 Controller
- Controlador de gradiente automático Waters modelo 600E
- Inyector automático (Loop) Waters modelo 717 Plus
- Detector de matriz de fotodiodos Waters modelo 2996
- Integrador Hewlett Packard HP 3396 Series II
- Longitud de onda: 275 nm.
- Columna: Symmetry C₁₈ Waters 045905 (150 x 4.6 mm, 5 μm)

- Fase móvil: Fosfato monobásico de sodio 0.01M pH 3-Acetonitrilo (49:51).
Previamente filtrada y desgasificada.
- Velocidad de flujo: 3 mL/min
- Temperatura: 50°C
- Presión: 2800psi
- Volumen de loop: 5 µL

6.10 Validación del método³⁷

6.11 Selectividad

Seis unidades de matriz biológica se analizaron individualmente siguiendo las condiciones descritas en el sistema cromatográfico, con el fin de determinar que la respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención del diclofenaco sódico sea menor al 20% para el límite inferior de cuantificación de la sustancia de interés y del 5% para el estándar interno.

6.12 Límite inferior de cuantificación.

Se hizo el análisis por sextuplicado de muestras procesadas independientemente a una concentración de diclofenaco sódico de 0.5 µg/mL la cual corresponde al límite inferior de cuantificación.

6.13 Curva de calibración

Se evaluaron por triplicado a seis niveles de concentración, muestras patrón que contenían el analito (diclofenaco sódico) y el estándar interno (naproxeno sódico) en plasma de rata, en un rango de concentración de 0.5 a 12 µg/mL como se indica en el cuadro 1. Las muestras fueron procesadas conforme se indica en el

tratamiento de muestras para validación, con el fin de determinar la relación que existe entre la concentración y la respuesta en cada punto, además de cumplir con los criterios de la concentración nominal, dando valores menores al 15% y para el límite inferior de cuantificación menores al 20%.

Concentración (µg/mL)	Plasma (µL)	Estándar interno (µL) (1 mg/mL)	Soluciones estándar(µL) (0.05, 0.1, 0.2,0.4, 0.8, 1.2 mg/mL)	Metanol (µL)
0.5	100	4	10	886
1.0	100	4	10	886
2.0	100	4	10	886
4.0	100	4	10	886
8.0	100	4	10	886
12.0	100	4	10	886

Cuadro 1. Tratamiento de muestras para la curva de calibración.

6.14 Precisión

6.15 Repetibilidad

Se analizaron en un mismo día por quintuplicado las siguientes muestras control: límite inferior de cuantificación (LIC, 0.5 µg/mL), muestra control baja (MCB, 0.75 µg/mL), muestra control media (MCM, 3 µg/mL), muestra control alta (MCA, 10 µg/mL) y muestra control diluida (MCD, 8 µg/mL), siguiendo las condiciones descritas en el sistema cromatográfico, con el fin de determinar que el CV% del valor promedio no sea mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de

cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%. La concentración se calculó interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración.

6.16 Reproducibilidad

Se analizaron por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes y en dos días diferentes, las muestras control LIC, MCB, MCM y MCA, siguiendo las condiciones descritas en el sistema cromatográfico con el fin de determinar que el CV% del valor promedio no sea mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%. La concentración se calculó interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración.

6.17 Exactitud

De los datos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación), empleando la siguiente ecuación: % de desviación= [(concentración adicionada) -(concentración obtenida) / (concentración adicionada)] (100), para determinar si el valor promedio del por ciento de desviación no fuera mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

6.18 Estabilidad en el automuestreador.

Se evaluó la estabilidad de la MCM por triplicado en el sistema cromatográfico a las 0, 1, 2, 4 y 6 horas, para determinar la variación en la respuesta analítica durante su permanencia en el automuestreador. La magnitud de la variación para el porcentaje de recobro fue determinada en la muestra control media

6.19 Estabilidad ciclos de congelación-descongelación.

Se evaluó la estabilidad de las muestras control MCB y MCM por duplicado, almacenadas a -20°C durante 12 horas, se descongelaron completamente a temperatura ambiente y se volvieron a congelar por al menos 12 h bajo las mismas condiciones. Se repitió el procedimiento 3 veces, con el fin de determinar si existía alguna variación en la respuesta analítica al someter a las muestras a estas condiciones. La concentración se calculó interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración.

6.20 Tratamiento de datos

A partir de los datos de concentración de diclofenaco sódico obtenidas en los tratamientos, se construyeron perfiles farmacocinéticos de diclofenaco sódico en presencia y ausencia de metileugenol, para obtener los parámetros farmacocinéticos: concentración máxima (C_{max}), tiempo al que se alcanza la C_{max} (t_{max}), el área bajo la curva al tiempo de 360 minutos (ABC_{0-360}), el área bajo la curva al tiempo infinito ($ABC_{0-\infty}$) y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$). Las comparaciones de los parámetros farmacocinéticos de diclofenaco sódico entre el grupo control y el tratado se realizó utilizando la prueba de t Student, se consideró diferencia significativa cuando $P \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Validación.

7.2 Selectividad.

Se obtuvo un cromatograma de una mezcla de matriz biológica de 6 fuentes independientes, uno de blanco cargado y uno con diclofenaco sódico más el estándar interno, se observó que no hay interferencias para la cuantificación del analito como se presenta en la figura 4 ya que no fueron observadas respuestas (picos cromatográficos) atribuidas a productos endógenos, en los tiempos de retención de los compuestos analizados, los tiempos de retención para diclofenaco sódico y naproxeno sódico (estándar interno) se observan en el cuadro 2 y figura 4.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Diclofenaco sódico	2.6
Estándar interno (Naproxeno sódico)	1.5

Cuadro 2. Tiempo de retención del diclofenaco sódico y naproxeno sódico

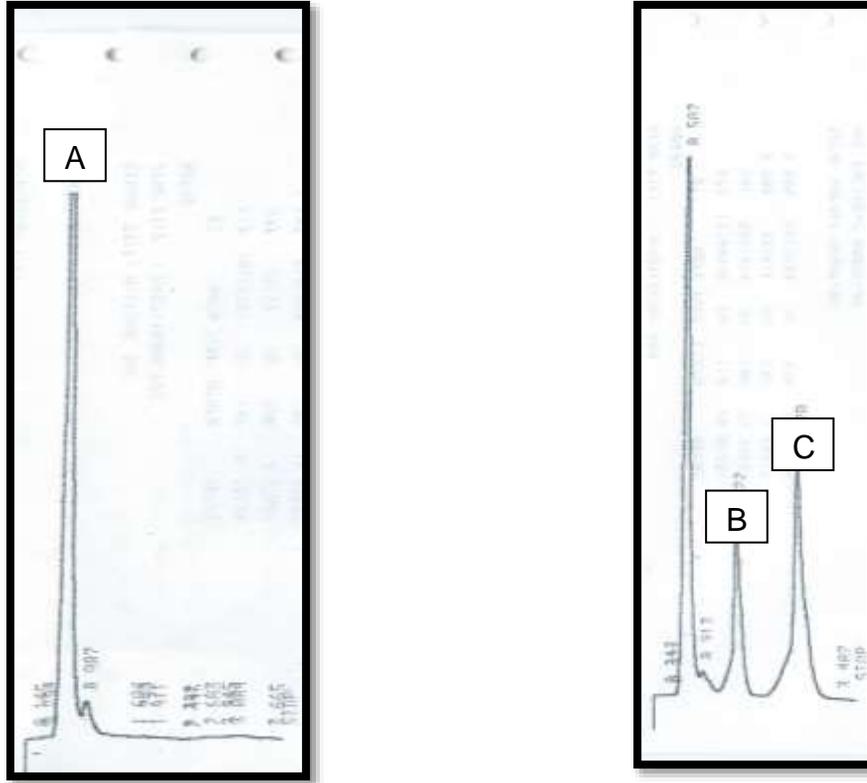


Figura 4. La imagen de la izquierda muestra un cromatograma típico de la muestra blanco de plasma y la de la derecha el diclofenaco sódico y el estándar interno (naproxeno sódico). A. Muestra blanco de plasma, B. Naproxeno sódico y C. Diclofenaco sódico.

7.3 Límite inferior de cuantificación

El análisis por sextuplicado de muestras a la concentración de 0.5 µg/mL, cumplió con el criterio de aceptación para la exactitud y precisión obtenidas para este nivel de concentración (ver cuadro 3).

Muestra control	Repetibilidad. C. obtenida. (µg/mL)	CV (%)	Reproducibilidad. C. obtenida. (µg/mL)	CV (%)	% de desviación para la exactitud
LIC (0.5 µg/mL)	0.43823	5.9157	0.4993	9.9484	9.7483

Cuadro 3. Resultados de precisión y exactitud obtenidos para el límite inferior de cuantificación.

7.4 Curva de calibración.

La relación de áreas entre el diclofenaco sódico y el naproxeno sódico en función a sus concentraciones, generaron una línea continua y reproducible con un coeficiente de determinación igual a 0.9986, como se observa en la figura 5. Cumpliendo con los criterios de la concentración nominal en cada nivel.

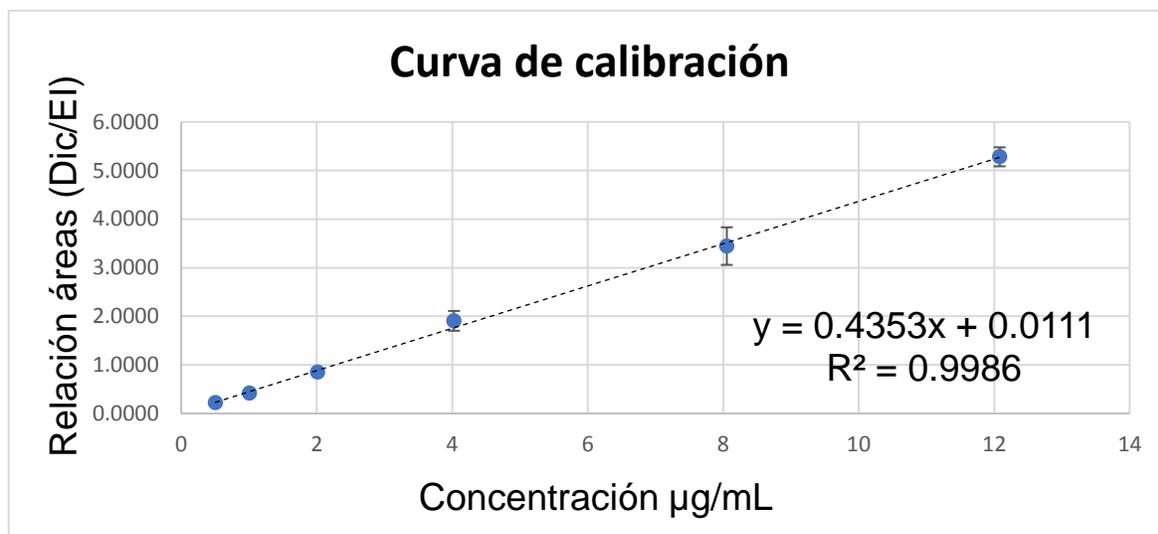


Figura 5. Curva de calibración para el diclofenaco sódico en un rango de concentraciones de 0.5 a 12 µg/mL. Cada punto representa el promedio de 3 determinaciones.

7.5 Precisión.

La precisión evaluada en términos de repetibilidad y reproducibilidad, no mostró un coeficiente de variación mayor al 15% para todas las muestras control y no mayor al 20% para el límite inferior de cuantificación como se observa en el cuadro 4.

Concentración teórica (µg/mL)	Repetibilidad. C. obtenida. (µg/mL)	CV (%)	Reproducibilidad. C. obtenida. (µg/mL)	CV (%)
LIC (0.5033)	0.43823	5.9157	0.4993	9.9484
MCB (0.755)	0.7978	3.8607	0.7490	5.9784
MCM (3.02)	2.7489	2.4498	2.9188	5.3368
MCA (10.066)	8.9571	3.0928	9.5805	5.9541
MCD (8.048)	9.2151	9.0361		

Cuadro 4. Resultados obtenidos para precisión. La concentración se obtuvo interpolando en la curva de calibración correspondiente al día de análisis y se calculó el coeficiente de variación. Todos los valores están dentro del límite permitido de <15% y <20% para el límite inferior de cuantificación.

7.6 Exactitud.

Este parámetro se determinó a partir los datos de repetibilidad y reproducibilidad, obteniendo el porcentaje de desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal menor al 15% para las muestras control analizadas y menor al 20% para el límite inferior de cuantificación como se observa en el cuadro 5.

Concentración teórica (µg/mL)	Promedio de C. recuperada (µg/mL)	Promedio de % Recobro	% de desviación
LIC (0.5033)	0.4841	96.1759	9.7483
MCB (0.755)	0.7612	100.8256	5.2477
MCM (3.02)	2.8763	95.2439	5.5372
MCA (10.066)	9.4247	93.6236	7.0803
MCD (8.048)	9.2151	115.1889	14.5019

Cuadro 5. Promedio del porcentaje de desviación de la concentración recuperada de acuerdo con el valor nominal, obtenidos en las muestras control. Todos los valores están dentro del límite permitido de <15% y <20% para el límite inferior de cuantificación.

7.7 Estabilidad en el automuestreador.

La variación para el porcentaje de recobro obtenido para este parámetro está dentro del valor del 15% de la concentración nominal para cada tiempo (ver cuadro 6), excepto para el valor de 6 h donde se observa un CV de 19.47% (ver figura 6).

MCM (3.02 µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)	% de recobro	CV (%)
0 HORAS	2.8071	92.9505	4.9083
1 HORA	2.8748	95.1933	2.28261
2 HORAS	2.9626	98.0997	2.13015
4 HORAS	2.8698	95.0289	6.21555
6 HORAS	2.9475	97.6016	19.4735

Cuadro 6. Por ciento de recobro y coeficiente de variación obtenidas para evaluar la estabilidad de las muestras control en el automuestreador durante un periodo de 6 horas.

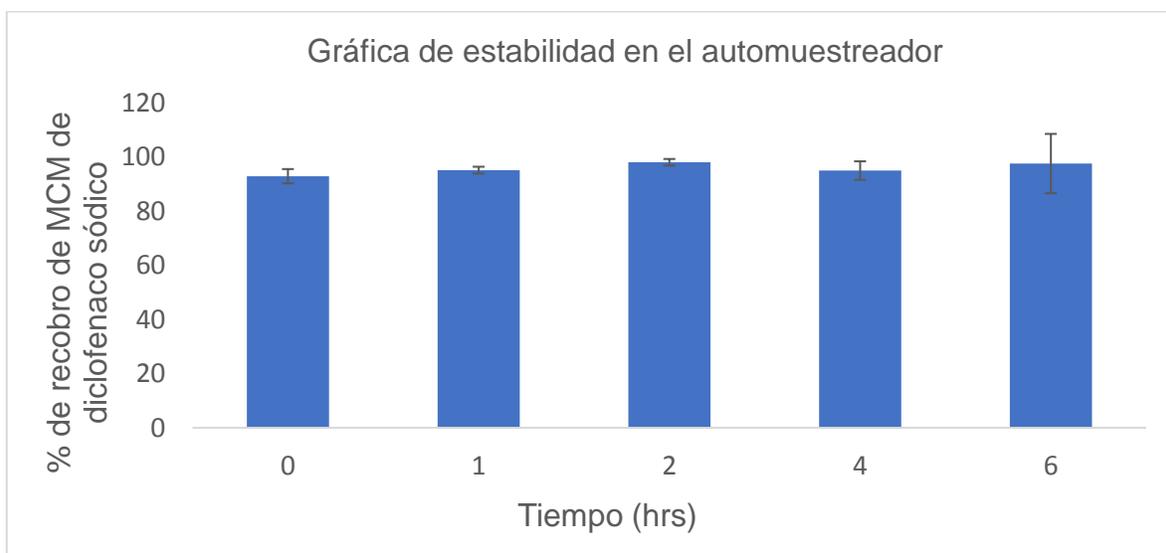


Figura 6. Gráfica de estabilidad en el automuestreador. Cada barra representa la media de tres determinaciones \pm ee.

7.8 Estabilidad ciclos de congelación-descongelación.

La estabilidad evaluada en 3 de ciclos de congelación-descongelación mostró una variación alta en el porcentaje de la cantidad recuperada comparada con la concentración inicial en los dos niveles de concentración estudiados, como se observa en el cuadro 7.

Muestra control	% de recobro
MCB (0.755)	180.701434
MCM (3.02)	77.7127221

Cuadro 7. Porcentaje de recobro de la concentración nominal obtenida de las muestras control en la evaluación por duplicado de su estabilidad en 3 ciclos de congelación-descongelación.

7.9 Perfil farmacocinético

El perfil y los parámetros farmacocinéticos obtenidos para el diclofenaco sódico y diclofenaco sódico + metileugenol luego de su administración oral, están representados en la figura 7 y cuadro 8, respectivamente. El análisis estadístico de la comparación de los parámetros farmacocinéticos de los grupos estudiados obtenidos con la ayuda del programa Sigma Plot 12.0 (cuadro 8), reveló que no hay diferencia significativa en ellos, a excepción de la concentración máxima (C_{máx}).

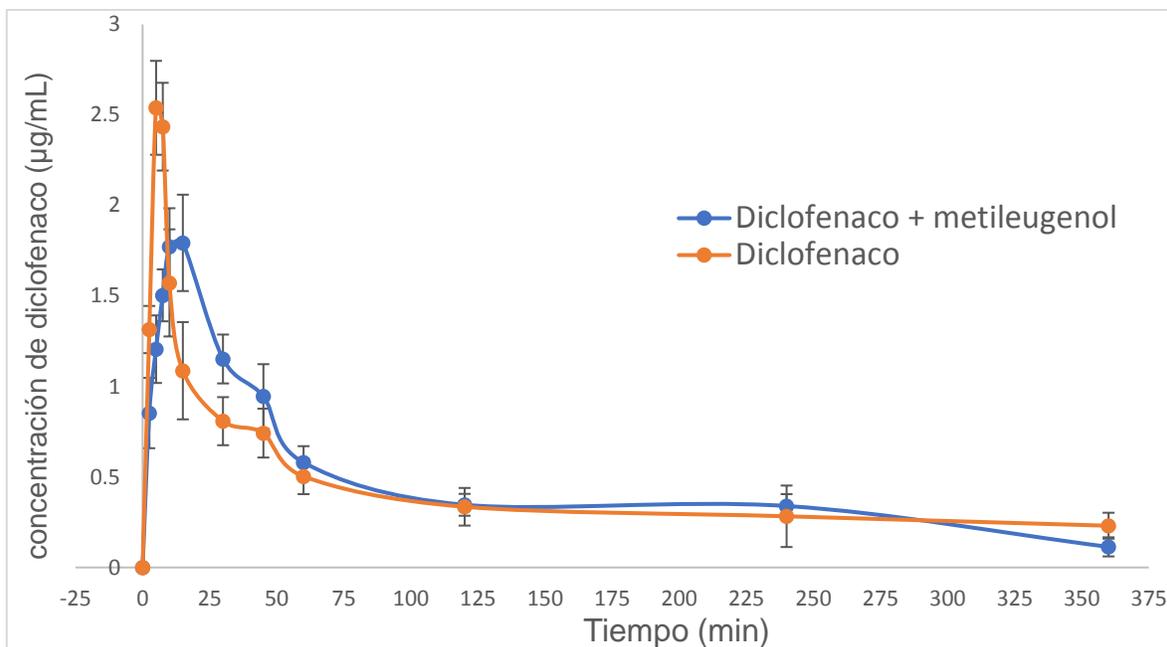


Figura 7. Perfil farmacocinético de diclofenaco sódico obtenido para el control grupo control (vehículo + diclofenaco sódico a 15.078 mg/Kg p.o) y grupo de tratamiento (metileugenol 3.99mg/Kg + diclofenaco sódico a 15.078 mg/Kg p.o). Cada punto representa la media de 6 animales \pm ee.

Tratamiento	C _{máx} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	T _{máx} (min)	ABC ₀₋₃₆₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)	ABC _{0-\alpha} ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{mL}$)	T _{1/2} (min)
Control (Diclofenaco sódico)	2.81 \pm 0.11	6 \pm 0.61	142.91 \pm 32.1	181.3871 \pm 49.6	119.2908 \pm 21.4
Tratamiento (Diclofenaco sódico + metileugenol)	1.98 \pm 0.18*	10.83 \pm 2.1	154.58 \pm 18.9	181.8464 \pm 25.4	97.2690 \pm 9.3

Cuadro 8. Parámetros farmacocinéticos obtenidos para el grupo control (administración oral de diclofenaco sódico) y para el grupo de tratamiento (administración de metileugenol + diclofenaco sódico), con ayuda del programa Win Nonlin versión 3.1. Cada parámetro representa la media de 5 y de 6 \pm su ee. * Comparado con el grupo control, $p > 0.05$

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los AINE's son un grupo farmacológico que posee acciones terapéuticas para el control del dolor, la inflamación y la fiebre, estos medicamentos constituyen uno de los grupos más utilizados en el mundo. En muchas ocasiones se abusa de ellos debido a su fácil adquisición, siendo a veces innecesaria su prescripción. El uso de AINE's está frecuentemente implicado en la aparición de reacciones adversas, lo que hace necesario el desarrollo de tratamientos alternativos que favorezcan su uso.³⁸

En México actualmente el uso de las plantas medicinales es una práctica común como alternativa terapéutica para diversos síntomas o enfermedades y para tratar los daños gastrointestinales producidos por los AINE's¹⁷ esto gracias a que sus constituyentes activos a través de su actividad antioxidante e inmunomoduladora reducen dicho daño. El número de pacientes que recurre a la medicina alternativa es de entre el 15 y 20% del total de la población. La herbolaria es considerada una de las alternativas terapéuticas más usadas,³⁹ sin embargo la administración concomitante de plantas medicinales y AINE's puede ser susceptible de presentar interacciones farmacológicas. Con el fin de garantizar que no se genera alguna interacción farmacocinética entre el diclofenaco sódico y el metileugenol, se realizó este estudio.

La magnitud de una interacción farmacocinética puede establecerse por la determinación de las concentraciones plasmáticas del fármaco de interés utilizando un método analítico. La cromatografía líquida de alta resolución es una de las técnicas más usada para la determinación de fármacos en fluidos biológicos para estudios farmacocinéticos, razón por la cual se implementó y validó un método

analítico para la determinación de diclofenaco sódico como primera etapa en este estudio.

El método analítico por CLAR en fase reversa aplicado, logró determinar la respuesta analítica del diclofenaco sódico a los 2.6 minutos y al estándar interno propuesto (naproxeno sódico) a los 1.5 minutos, estos tiempos de retención permitieron una resolución adecuada entre los compuestos mostrando cromatogramas sin alguna interferencia que pudieran afectar en la cuantificación de cada fármaco. Para obtener lo anteriormente descrito, fue necesario hacer primeramente una extracción líquido-líquido utilizando metanol con la finalidad de precipitar las proteínas contenidas en las muestras plasmáticas analizadas y poder inyectar un sobrenadante limpio en el sistema cromatográfico. El sistema cromatográfico usó como fase móvil una mezcla de fosfato monobásico de sodio 0.01M a pH 3 y acetonitrilo en una proporción 49:51 v/v, y como fase estacionaria apolar una columna Symetry C18, que favoreció la obtención de un tiempo de retención mayor para nuestra molécula de diclofenaco sódico con características mayormente apolares en comparación con el estándar interno utilizado.

Este método es selectivo ya que no se observaron interferencias próximas al tiempo de retención del diclofenaco sódico y del naproxeno sódico, discriminando a otros compuestos presentes en la matriz biológica, como se observa en la figura 4, el compuesto endógeno visualizado tiene un tiempo de retención muy cercano al frente del solvente y diferente a los analitos de interés. El método es lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas (0.5 a 12 µg/mL), debido a que la respuesta (relación de áreas entre el diclofenaco sódico y el estándar interno) es directamente proporcional a la concentración produciendo una línea continua y reproducible como

se observa en la fig. 5, la cual cumplió con los criterios de aceptación para este parámetro.³⁷ El método es preciso en términos de repetibilidad y reproducibilidad ya que se obtuvo un coeficiente de variación de la concentración obtenida menor al 15% en todas las muestras control³⁷ como se observa en el cuadro 4, evidenciando un alto grado de concordancia entre los resultados obtenidos para cada determinación.⁴⁰ También es exacto ya que se obtuvo un porcentaje de desviación menor al 15% respecto al valor nominal en todas las muestras control³² (ver cuadro 5), indicando una proximidad de los resultados obtenidos con los valores verdaderos.⁴⁰ Las muestras conservadas en el automuestreador del equipo a las 0,1, 2, 4 y 6 horas hasta antes de su análisis son estables hasta las 4 horas, en virtud a que se obtuvo una variación para el porcentaje de recobro menor al 15% de la concentración nominal³⁷ (ver cuadro 6). El análisis de la muestra conservada en el automuestreador por 6 horas no es confiable, ya que sus resultados mostraron una variación muy grande con respecto a un análisis recién en el automuestreador (coeficiente de variación de 19.47%). Con base a estos resultados, los análisis de las muestras fueron realizadas en un intervalo de tiempo menor 4 horas en el automuestreador y no pueden soportar dos ciclos de congelamiento-descongelamiento (cuadro 7). De acuerdo con los resultados obtenidos el método es válido con base en la NOM-177 y es aplicable para el estudio farmacocinético propuesto en este proyecto.

En la figura 7 se puede observar que desde que se administra 15.078mg/Kg de diclofenaco sódico en forma oral al grupo control, y a medida que se absorbe, el fármaco va apareciendo en la sangre hasta alcanzar una concentración máxima (C_{máx}) de $2.81 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$ a un tiempo máximo (T_{máx}) de 6 ± 0.61 minutos.

Posteriormente se visualiza la distribución del fármaco a todos los tejidos del organismo y se suman los procesos de eliminación (metabolismo y excreción), observándose con el paso del tiempo la desaparición del fármaco de la sangre hasta ser indetectable. El comportamiento farmacocinético típico observado para el diclofenaco sódico no contradice lo previamente reportado en la literatura para este fármaco y bajo condiciones de estudio similares.⁴¹

Cuando se administró metileugenol (3.996 mg/kg) de forma oral 30 minutos antes de la administración oral del diclofenaco sódico en la misma dosis que en el grupo control, el perfil farmacocinético promedio obtenido (figura 7) contempla los mismos procesos fármacocinéticos que el grupo control, pero se observa una disminución en las concentraciones de diclofenaco sódico. La disminución en las concentraciones de diclofenaco sódico en el grupo tratado con metileugenol no alcanzó significancia estadística que impactara en los parámetros farmacocinéticos del área bajo la curva parcial, al infinito, la vida media o el tiempo al que se alcanza la concentración máxima. Sólo impacto en el $C_{m\acute{a}x}$, disminuyendo ésta en casi un 70 % (ver cuadro 8). La disminución significativa de la $C_{m\acute{a}x}$ del diclofenaco sódico por la administración previa del metileugenol, sugiere una interacción farmacocinética entre el diclofenaco sódico y el componente de *peperomia hispidula* cuando son administrados a las dosis en este estudio. Los AINE's poseen una rápida y buena absorción⁴², el diclofenaco sódico se absorbe eficientemente después de su administración oral⁴³, cuando son administrados por vía oral requieren un pH gástrico entre 2.5 y 3 para poder absorberse, por lo tanto, los compuestos capaces de aumentar el pH gástrico pueden cambiar la cinética de otros fármacos coadministrados, disminuyendo su absorción al modificar valores

como $C_{m\acute{a}x}$ y ABC. Es posible que el metileugenol esté aumentando el valor del pH gástrico lo que ocasiona una disminución en la absorción y en la concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$) del diclofenaco sódico.¹⁸ Estudios previos reportan que, compuestos de origen natural tal como el cuachalalate, disminuyen el valor del $C_{m\acute{a}x}$ del diclofenaco sódico al ser administrados simultáneamente.⁷

9. CONCLUSIONES

- El método analítico empleado para la cuantificación de diclofenaco sódico es válido con base en la NOM-177-SSA1-2013.
- El metileugenol compuesto identificado en *Peperomia hispidula* como gastropotector modificó la respuesta farmacocinética del diclofenaco sódico tras su administración oral, afectando la absorción de éste al disminuir su concentración máxima (C_{máx}).
- La alteración farmacocinética observada pudiera impactar en el efecto farmacológico del diclofenaco sódico sin embargo se requieren más estudios para soportar este dicho.

10. REFERENCIAS.

1. Sharifi-Rad M, Fokou PV, Sharopov F, Martorell M, Ademiluyi AO, Rajkovic J, Salehi B, Martins N, Iriti M, Sharifi-Rad J. Antiulcer agents: from plant Extracts to Phytochemicals in Healing Promotion. *Molecules*. 2018; 23 (7): E1751
2. Paguigan ND, Castillo DH, Chichioco-Hernandez C. Anti-ulcer activity of leguminosae plants. *Archivos de Gastroenterologia*. 2014; 51: 64-67.
3. Simon JP, Prince SE. Natural remedies for non-steroidal anti-inflammatory drug-induced toxicity. *J. Appl Toxicol*. 2016; 37(1): 71-83.
4. Sánchez-Mendoza ML, et al. Gastroprotective Activity of Methyleugenol from *Peperomia hispidula* on Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats. *Int. J Pharmacol*. 2015; 11(7): 697-704.
5. Borrelli F, Izzo A. The Plant Kingdom as a Source of Anti-ulcer Remedies. *Phytother. Res*. 2000; 14: 581–591.
6. Narsinghani T, Sharma R. Lead Optimization on Conventional Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: An Approach to Reduce Gastrointestinal Toxicity. *Chem Bio Drug Des*. 2014; 84(1): 1-23
7. Navarrete A, Oliva I, Sánchez Méndoza ME, Arrieta J, Cruz-Antonio L, Castañeda-Hernández G. Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. *J Pharm Pharmacol*. 2005; 57(12): 1629–1636.
8. Steinmeyer J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Res*. 2000; 2(5): 379–385

9. Takeuchi K, Amagase K. Roles of cyclooxygenase, prostaglandin E2 and EP receptors in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract. *Curr. Pharm. Des.* 2018; 24 (18): 2002-2011.
10. Traversa G, Walker A, Ippolito F, Caffari B, Capurso L, Dezi A, et al. Gastroduodenal toxicity of different nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Epidemiology.* 1995; 6(1): 49-54.
11. Saldaña A, Vergara N. *Farmacovigilancia y farmacia comunitaria.* Instituto de salud pública. Chile: 2015; No. 6.
12. Información farmacoterapéutica de la comarca. Selección de aine: entre el riesgo cardiovascular y el gastrointestinal. 2008; 16 (4): 17-21.
13. Harirforoosh S, Asghar W, Jamali F. Adverse Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs: An Update of Gastrointestinal, Cardiovascular and Renal Complications. *Pharm Pharm Sci.* 2013; 16(5): 821 –847.
14. Lanas A, Scheiman J. Low-dose aspirin and upper gastrointestinal damage: epidemiology, prevention and treatment. *Curr Med Res Opin.* 2007; 23: 163-73.
15. Ofman JJ, MacLean CH, Straus WL, Morton SC, Berger ML, Roth EA, et al. A meta-analysis of severe upper gastrointestinal complications of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Rheumatol.* 2002; 29: 804-12.
16. Tsukimi Y, Okabe S. Recent advances in gastrointestinal pathophysiology: role of heat Shock Proteins in Mucosal Defense and Ulcer Healing. *Biol Pharm Bull.* 2001; 24(1); 1-9

17. Chatterjee A, Bandyopadhyay A. Herbal Remedy: An Alternate Therapy of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug Induced Gastric Ulcer Healing. Hindawi Publishing Corporation, Ulcers. 2014: 13
18. Palleria C, et al. Pharmacokinetic Drug Interaction and their Implication in Clinical Management. J Res Med Sci. 2013; 18(7):601-610.
19. Aldaz A, Arocas V, Delgado O, Gil G, Ibañez C, Juárez JJ, et al. Introducción a las interacciones farmacológicas. España: Sociedad Española de farmacia hospitalaria; 2013.
20. Scarim C, Oliveira E, Dos Santos L, Chin C. NSAIDs and Natural Products Interactions: Mechanism and Clinical Implications. J Immunol Clin Res. 2017; 4(2): 1040
21. Abebe W. Herbal medication: potential for adverse interactions with analgesic drugs. J Clin Pharm Ther. 2002; 27(6): 391-401.
22. Lorenzo P, Moreno A, Lizasoain I, Leza JC, Moro MA, Portolés A. Farmacología básica y clínica. 18ª ed. España: Editorial médica panamericana; 2008.
23. Raffa R, Rawls S, Beyzarov E. Farmacología ilustrada. España: Editorial elsevier masson; 2008.
24. León-Reyes MD. Efecto de la glibenclamida sobre la farmacocinética y la farmacodinamia de diclofenaco en el modelo de la formalina en rata. [Tesis de maestría]. México: Escuela superior de medicina, Instituto politécnico nacional; 2007.

25. Altman R., Bosch B., Brune K., Patrignani P., Young C. Advances in NSAID Development: Evolution of diclofenac products using pharmaceutical technology. *Drugs*. 2015; 75: 859-877.
26. Gan T.J. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current Medical Research & Opinion*. 2010; 26 (7): 1715- 1731.
27. Wang Z, Chen D, Wang Z. Effects of diclofenac on the pharmacokinetics of celastrol in rats and its transport. *Pharmaceutical Biology*. 2018; 56(1): 269-274
28. Ortiz M, Torres J, Castañeda G, Rosas R, Guadalupe C, Vidal C, et al. Pharmacological evidence for the activation of K⁺ channels by diclofenac. *Eur J pharmacol*. 2002; 438: 85-91.
29. Mendoza N. *Farmacología médica*. México: Editorial Médica Panamericana; 2008.
30. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 11a ed. México: Secretaría de Salud Pública, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 11 ed. México; 2014.
31. Vinod P, Kamal K, Shrikant D, Jain J, Jerome P, Avraham Y, et al. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies. *J pharm sci*. 1992; 81 (3): 309-312.
32. Arellano MA. Desarrollo y validación de un método de cuantificación de tacrolimus, cápsulas de 5 mg, por cromatografía de líquidos de alta resolución aplicado a perfiles de disolución. [Tesis de licenciatura]. México:

Facultad de estudios superiores Zaragoza. Universidad Nacional autónoma de México; 2013.

33. Davies NM, Anderson KE. Clinical pharmacokinetics of diclofenac. Therapeutic insights and pitfalls. *Clin Pharmacokinet.* 1997;33 (3):184-21
34. Levy RA, Smith DL. Clinical differences among non-steroidal antiinflammatory drug: Implications for therapeutic substitution in ambulatory patients. *Drug intel Clin Pharm.* 1989;23(1): 76-85
35. Mohutsky MA, Anderson GD, Miller J, Elmer GW. Ginkgo biloba: Evaluation of CYP2C9 Drug Interactions In Vitro and In Vivo. *Am J Ther.* 2006; 13(1): 24-31.
36. González A. Use of Medicinal Plants in Monterrey. *Not Sci Biol.* 2010; 2 (4): 07-11.
37. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. *Diario oficial de la federación.* 20 de septiembre del 2013.
38. Prieto JM. Anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's). ¿Dónde estamos y hacia donde nos dirigimos? (Primera parte). *Cient Dient.* 2007; 4; 3: 203-212.
39. Martínez AL. Herbolaria mexicana para el tratamiento del dolor. *Ciencia.* 2015 jul-sep; 60-67
40. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México A.C. Guía de validación de métodos analíticos. 2002.
41. Torres-López JE, Robles MB, Pérez-Urizar J, Flores-Murrieta FJ, Granados-Soto V. Determination of diclofenac in Micro-Whole blood samples by high-

performance liquid chromatography with electrochemical detection.
ArzneimForsch Drug Res. 1997; 47: 1040-1043.

42. Duarte de Prato AM. Reacciones de hipersensibilidad a los antiinflamatorios no esteroideos. [Tesis doctoral]. España. Facultad de medicina. Universidad de Murcia; 2010.

43. Todd PA, Sorkin EM. Diclofenac Sodium A Reappraisal of its Pharmacodynamic and Phannacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy. Drugs Evaluation. 1988; 35: 244-285.