



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN FARMACÉUTICA

ESTANDARIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA  
PARA DETERMINAR LA CINÉTICA DE  
HIDRÓLISIS DE FÁRMACOS EN SOLUCIÓN  
DE ESTERASA O PLASMA DE RATA.

### T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA.**

PRESENTA:  
**ANILÚ NAVA NAVA**

DIRECTOR:  
**DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD**

ASESORA:  
**DRA. ELIZABETH SÁNCHEZ GONZÁLEZ.**





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.

## **AGRADECIMIENTO.**

El desarrollo de este proyecto fue financiado en su totalidad con recursos del proyecto PAPIME PEZ08718 “Mejora de la enseñanza y el aprendizaje de los procesos de absorción, distribución, biotransformación y excreción de fármacos mediante el desarrollo e implementación de materiales educativos innovadores”, por lo que se agradece el apoyo de la Universidad Nacional Autónoma de México, a través de la dirección General de Asuntos del Personal Académico.

## **AGRADECIMIENTOS.**

En primer lugar quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México que abre sus puertas a todos los jóvenes con deseos de obtener una carrera universitaria y a quienes brinda una diversidad de apoyos para que podamos culminar de forma íntegra. Y en especial agradezco a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza que me permitió recibir una gran formación académica, que me proporcionó el sustento suficiente para concluirla y que generó en mí el sentimiento de pertenencia a la comunidad zaragozana.

Agradezco profundamente al Dr. Vicente Jesús Hernández Abad quien me dio la oportunidad de formar parte del Laboratorio de Investigaciones Farmacéuticas, a quien reconozco como un excelente profesor, investigador y persona. También agradezco inmensamente a la Dra. Elizabeth Sánchez González por su paciencia y disposición en el tiempo que me asesoró.

Agradezco en general al equipo del Laboratorio de Investigaciones Farmacéuticas, principalmente a la Mtra. Cynthia Espinoza Contreras y al Q.FB. José Ignacio Vázquez Olvera, quienes fueron de gran apoyo para el desarrollo y término de este proyecto.

Agradezco a la MVZ. Adriana Altamirano Bautista por proporcionar el servicio de Bioterio de la facultad las ocasiones que el proyecto lo necesitó.

Agradezco finalmente a mi familia por su comprensión y por el apoyo que me brindó durante el transcurso de este periodo.

## **DEDICATORIA.**

A mi madre María Estela Nava Juárez, la persona que es el impulso y razón de esta lucha por la superación personal y que además fue un sostén durante mis estudios de licenciatura, pero sobre todo por serlo lo que llevo de vida.

A mi hermana Aylin Nava Nava que desde el inicio de este trayecto ha estado ahí ayudándome de todas las maneras posibles a su corta edad y de quien admiro su enorme fortaleza, la cual ha sido motivo de mi perseverancia.

A mis compañeros de casa, quienes además de amigos son la segunda familia que me acogió cálidamente durante esta etapa y que gracias a su compañía fuera de la escuela, me resultó amena la estancia en la universidad.

A mis amigos de la universidad, que me han dejado recuerdos maravillosos por las aventuras que hemos vivido dentro y fuera de la facultad y con quienes comparto los sentimientos que genera haber cursado esta bella licenciatura.

Y a mi mejor amiga quien siempre que lo necesité me escuchó y aconsejó sobre los asuntos tanto de mi vida escolar como personal, impulsándome así a superar cualquier situación adversa para no claudicar durante esta travesía.

A todos ustedes.... Muchas gracias.

## ÍNDICE.

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>10</b>
2.1 DESARROLLO DE FÁRMACOS.....	10
2.1.1 Etapas del desarrollo de fármacos.....	11
2.2 FARMACOCINÉTICA.....	12
2.2.1 Metabolismo de fármacos.....	12
2.3 BIOTRANSFORMACIÓN.....	12
2.3.1 Tipos de procesos de biotransformación.....	13
2.4 ESTERASAS.....	15
2.5 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOTRANSFORMACIÓN.....	15
2.6 TÉCNICAS PARA MEDIR LA BIOTRANSFORMACIÓN.....	16
2.6.1 Otras técnicas de detección.....	17
2.7 PROPIEDADES DE LOS FÁRMACOS MODELO DE ESTUDIO.....	18
<b>3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>20</b>
<b>6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>21</b>
<b>7. METODOLOGÍA.....</b>	<b>22</b>
7.1 MATERIAL.....	22
7.2 REACTIVOS.....	23
7.3 PROCEDIMIENTO.....	24
7.3.1 Preparación de la SA de fosfatos pH 7.4 [0.02 M].....	24
7.3.2 Preparación del reactivo de Biuret.....	24
7.3.3 Preparación de las soluciones para la curva patrón.....	24
7.3.4 Cuantificación de proteínas.....	24
7.3.5 Determinación de cinética de hidrólisis.....	26

<b>8. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....</b>	<b>30</b>
8.1 CURVAS PATRÓN. ....	31
8.1.1 Curva patrón de Indometacina.....	31
8.1.2 Curva patrón de Glibenclamida.....	33
8.1.3 Curva patrón de Proteínas.....	35
8.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	37
8.2.1 Ensayo de identidad.....	37
8.2.2 Repetibilidad y exactitud.....	40
8.2.3 Linealidad.....	41
8.2.4 Precisión intermedia.....	45
8.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	47
8.3.1 Proteínas en plasma de rata.....	47
8.3.2 Proteínas en solución de esterasa.....	48
8.4 CINÉTICA DE HIDRÓLISIS.....	50
8.4.1 Indometacina en plasma de rata.....	50
8.4.2 Indometacina en solución de esterasa.....	54
8.4.3 Glibenclamida en plasma de rata.....	58
8.4.4 Glibenclamida en solución de esterasa.....	62
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>11. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>12. REFERENCIAS.....</b>	<b>70</b>

## ÍNDICE DE TABLAS.

<b>TABLA 1.</b> Reacciones de la FASE I y LA FASE II. ....	13
<b>TABLA 2.</b> Propiedades químicas de la Indometacina y la Glibenclamida. ....	18
<b>TABLA 3.</b> Clasificación del estudio. ....	21
<b>TABLA 4.</b> Materiales utilizados en la metodología experimental ....	22
<b>TABLA 5.</b> Reactivos utilizados en la metodología bexperimental. ....	23
<b>TABLA 6.</b> Volúmenes utilizados para preparar la curva patrón y muestras para la cuantificación de proteínas en solución de esterasa y plasma de rata. ....	25
<b>TABLA 7.</b> Esquema de la curva patrón para cuantificar GLIBENCLAMIDA en solución de esterasa de hígado bovino. ....	26
<b>TABLA 8.</b> Esquema de la curva patrón para cuantificar INDOMETACINA en solución de esterasa de hígado bovino. ....	27
<b>TABLA 9.</b> Esquema de la curva patrón para cuantificar GLIBENCLAMIDA en plasma de rata. ....	28
<b>TABLA 10.</b> Esquema de la curva patrón para cuantificar INDOMETACINA en plasma de rata. ....	29
<b>TABLA 11.</b> Resultados de la curva patrón de INDOMETACINA. ....	31
<b>TABLA 12.</b> Análisis estadístico de las concentraciones recuperadas de INDOMETACINA. ....	32
<b>TABLA 13.</b> Resultados de la curva patrón de GLIBENCLAMIDA. ....	33
<b>TABLA 14.</b> Análisis estadístico de las concentraciones recuperadas de GLIBENCLAMIDA. ....	34
<b>TABLA 15.</b> Resultados de la curva patrón de PROTEÍNAS. ....	35
<b>TABLA 16.</b> Análisis estadístico de las concentraciones recuperadas de PROTEÍNAS. ....	36
<b>TABLA 17.</b> Resultados de la exactitud y repetibilidad de INDOMETACINA. ....	40
<b>TABLA 18.</b> Resultados de la exactitud y repetibilidad de GLIBENCLAMIDA. ....	40
<b>TABLA 19.</b> Resultados de la curva patrón de INDOMETACINA. ....	41
<b>TABLA 20.</b> Análisis estadístico de las concentraciones recuperadas de INDOMETACINA. ....	42
<b>TABLA 21.</b> Resultados de la curva patrón de GLIBENCLAMIDA. ....	43
<b>TABLA 22.</b> Análisis estadístico de las concentraciones recuperadas de GLIBENCLAMIDA. ....	44
<b>TABLA 23.</b> Concentraciones de INDOMETACINA obtenidas del 100% por analista y día. ....	45
<b>TABLA 24.</b> Análisis de varianza de 2 factores de los resultados de Glibenclamida. ....	45
<b>TABLA 25.</b> Concentraciones de GLIBENCLAMIDA obtenidas del 100% por analista y día. ....	46
<b>TABLA 26.</b> Análisis de varianza de 2 factores de los resultados de GLIBENCLAMIDA. ....	46
<b>TABLA 27.</b> Cantidad de proteínas en plasma de rata. ....	47
<b>TABLA 28.</b> Cantidad de proteínas en solución de esterasa. ....	48
<b>TABLA 29.</b> Hidrólisis de INDOMETACINA en plasma de rata a la concentración de 5E-05 M. ....	50
<b>TABLA 30.</b> Hidrólisis de INDOMETACINA en plasma de rata a la concentración de 1E-04 M. ....	51



<b>TABLA 31.</b> Hidrólisis de INDOMETACINA en plasma de rata a la concentración de 2E-04 M.....	52
<b>TABLA 32.</b> Hidrólisis de INDOMETACINA en sln. de esterasa a la concentración de 5E-05 M.....	54
<b>TABLA 33.</b> Hidrólisis de INDOMETACINA en sln. de esterasa a la concentración de 1E-04 M.....	55
<b>TABLA 34.</b> Hidrólisis de INDOMETACINA en sln. de esterasa a la concentración de 2E-04 M.....	56
<b>TABLA 35.</b> Hidrólisis de GLIBENCLAMIDA en plasma de rata a la concentración de 5E-05 M. ....	58
<b>TABLA 36.</b> Hidrólisis de GLIBENCLAMIDA en plasma de rata a la concentración de 1E-04 M. ....	59
<b>TABLA 37.</b> Hidrólisis de GLIBENCLAMIDA en plasma de rata a la concentración de 2E-04 M. ....	60
<b>TABLA 38.</b> Hidrólisis de GLIBENCLAMIDA en sln. de esterasa a la concentración de 5E-05 M. ....	62
<b>TABLA 39.</b> Hidrólisis de GLIBENCLAMIDA en sln. de esterasa a la concentración de 1E-04 M. ....	63
<b>TABLA 40.</b> Hidrólisis de GLIBENCLAMIDA en sln. de esterasa a la concentración de 2E-04 M. ....	64
<b>TABLA 41.</b> Resultados generales de la cinética de hidrólisis enzimática. ....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS.

<b>FIGURA 1.</b> Etapas principales en el desarrollo de fármacos.....	11
<b>FIGURA 2.</b> Expresión de Lineweaver-Burk.....	16
<b>FIGURA 3.</b> Representación gráfica de Lineweaver-Burk.....	16
<b>FIGURA 4.</b> Curva patrón para la cuantificación de INDOMETACINA.....	31
<b>FIGURA 5.</b> Curva de Concentración Adicionada vs. Concentración Recuperada de INDOMETACINA. .....	32
<b>FIGURA 6.</b> Curva patrón para la cuantificación de GLIBENCLAMIDA.....	33
<b>FIGURA 7.</b> Curva de Concentración Adicionada vs. Concentración Recuperada de GLIBENCLAMIDA.....	34
<b>FIGURA 8.</b> Curva patrón para la cuantificación de PROTEÍNAS.....	35
<b>FIGURA 9.</b> Curva de Concentración Adicionada vs. Concentración Recuperada de PROTEÍNAS.....	36
<b>FIGURA 10.</b> Barrido espectral UV-VIS de 200 a 400 nm de Metanol.....	37
<b>FIGURA 11.</b> Barrido espectral UV-VIS de 200 a 400 nm de Indometacina Referencia.....	37
<b>FIGURA 12.</b> Barrido espectral UV-VIS de 200 a 400 nm de Indometacina Materia Prima.....	37
<b>FIGURA 13.</b> Barrido espectral UV-VIS de 200 a 400 nm de Indometacina Materia Prima y Referencia (50:50).....	38
<b>FIGURA 14.</b> Barrido espectral UV-VIS de 200 a 400 nm de Glibenclamida Referencia.....	38
<b>FIGURA 15.</b> Barrido espectral UV-VIS de 200 a 400 nm de Glibenclamida Materia Prima.....	38
<b>FIGURA 16.</b> Barrido espectral UV-VIS de 200 a 400 nm de Glibenclamida Materia Prima y Referencia (50:50).....	39
<b>FIGURA 17.</b> Curva patrón para la cuantificación de INDOMETACINA.....	41
<b>FIGURA 18.</b> Curva de Concentración Adicionada vs. Concentración Recuperada de INDOMETACINA.....	42
<b>FIGURA 19.</b> Curva patrón para la cuantificación de GLIBENCLAMIDA.....	43
<b>FIGURA 20.</b> Curva de Concentración Adicionada vs. Concentración Recuperada de GLIBENCLAMIDA.....	44
<b>FIGURA 21.</b> Hidrólisis enzimática de Indometacina en plasma de rata.....	53
<b>FIGURA 22.</b> Hidrólisis enzimática de Indometacina en solución de esterasa.....	57
<b>FIGURA 23.</b> Hidrólisis enzimática de Glibenclamida en plasma de rata.....	61
<b>FIGURA 24.</b> Hidrólisis enzimática de Glibenclamida en solución de esterasa.....	65

## 1. INTRODUCCIÓN.

En su mayoría los fármacos son moléculas ajenas al cuerpo humano, por lo que son considerados xenobióticos o agentes extraños. Estas moléculas pasan por un complejo proceso metabólico en el organismo hasta que llevan a cabo su acción farmacológica y son eliminados. El metabolismo es un proceso farmacocinético que involucra varias etapas y una de ellas es la biotransformación del fármaco, en esta etapa sufre un cambio estructural, por lo que la molécula obtenida se denomina metabolito secundario.

Este cambio de productos químicos de un grupo químico a otro es realizado por una enzima. Las principales enzimas metabolizadoras de fármacos son oxidasas, reductasas e hidrolasas. Estas enzimas se encuentran en el hígado, componen un sistema denominado citocromo P450 situado en el hepatocito, específicamente en los microsomas del Retículo Endoplásmico Rugoso de ésta célula. El citocromo P450 participa en más de un 50 % de fármacos recientemente desarrollados como ruta metabólica, sin embargo, existen enzimas esterasas, que no forman parte del citocromo P450, y que participan en el metabolismo de un 20 a 35 % de fármacos, estas esterasas son un grupo de enzimas que actúan directamente en fármacos que incluyen algún grupo funcional amida o éster.

Los estudios cinéticos de biotransformación en el desarrollo de fármacos permiten estimar en qué medida se obtiene la formación de un metabolito secundario en el cuerpo humano y como consecuencia en qué cantidad es dañino para la salud. Además de lo anterior, las esterasas participan en la activación de profármacos de mayor biodisponibilidad, muchos de ellos sirven para prevenir padecimientos de alto riesgo como el cáncer y patologías hepáticas que a la larga afectan a este grupo de enzimas.

En la presente investigación se busca caracterizar con datos experimentales el proceso de biotransformación de fármacos, específicamente la hidrólisis llevada a cabo por enzimas esterasas, contribuyendo como fundamento experimental comprobado.

## **2. MARCO TEÓRICO.**

### **2.1 DESARROLLO DE FÁRMACOS.**

El desarrollo de fármacos se centra en la evaluación de la seguridad: toxicidad y eficacia de nuevas moléculas de fármacos.<sup>6</sup>

El objetivo clave del desarrollo de fármacos es la generación de una base de datos científicos que respalde el perfil de eficacia y seguridad de los regímenes de dosificación destinados a la comercialización. En promedio, cada nueva molécula de fármaco requiere de 12 a 15 años para llegar al paciente y cuesta una cantidad asombrosa de US \$ 400-650 millones.<sup>6</sup>

Aunque se están utilizando nuevos métodos, el método clásico de elección de fármacos potenciales para el desarrollo en la industria farmacéutica aún depende de una evaluación de la actividad farmacodinámica in vitro y/o en modelos con animales.

Depende en gran medida de las propiedades biofarmacéuticas (por ejemplo, solubilidad, estabilidad, permeabilidad y primer paso) y farmacocinéticas (tasa de eliminación, vida media biológica, grado de unión a proteínas y volumen de distribución) del fármaco, ya que estas propiedades controlan la velocidad y la medida en que el medicamento puede llegar a su sitio de acción, es decir, biofase.<sup>6</sup>

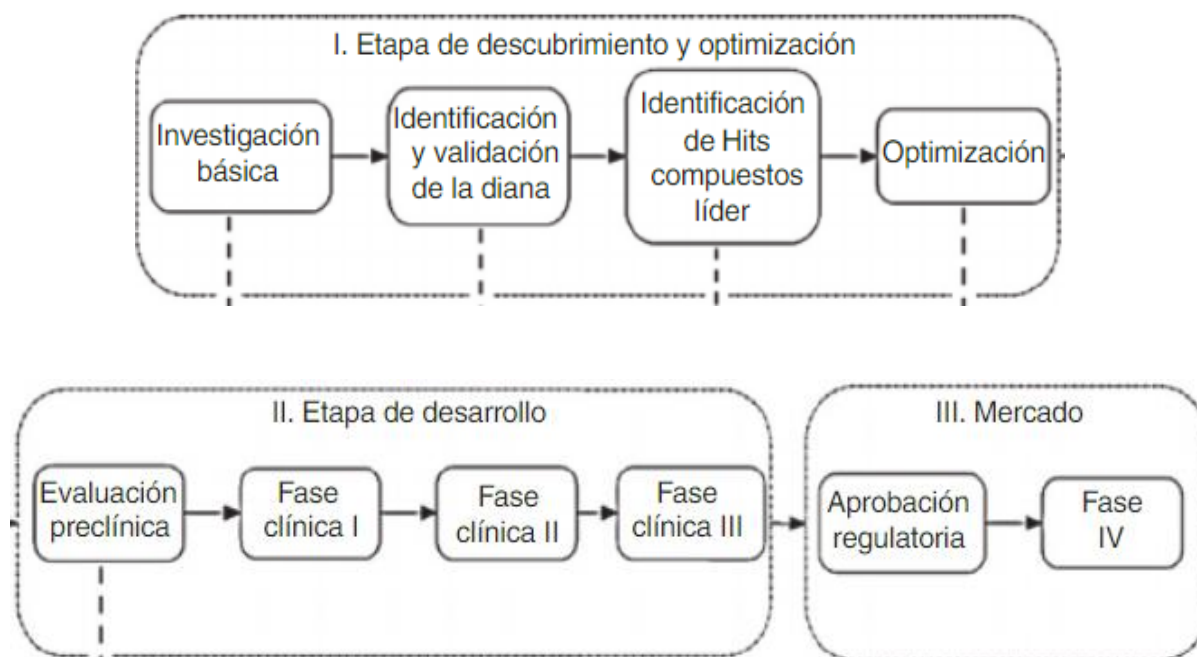
Aunque la industria farmacéutica se involucra en muchas formas de innovación, en general la más importante es el descubrimiento y desarrollo de nuevas entidades químicas biofarmacéuticas puesto que pueden convertirse en nuevas terapias.

Para establecer la seguridad de los fármacos como nuevas terapias se requiere la cuantificación de metabolitos cuando el metabolito es tóxico, farmacológicamente activo y cuando la concentración del metabolito alcanza o excede la concentración del fármaco precursor en el plasma.

La demanda de análisis de fármacos con bajos niveles en muestras biológicas complejas, ha aumentado significativamente en los últimos años. Los nuevos fármacos tienen típicamente alta potencia, por lo que se administran dosis pequeñas, y por lo tanto, los límites de detección de estos fármacos y sus metabolitos son de gran importancia.<sup>7</sup>

### 2.1.1 Etapas del desarrollo de fármacos.

La **FIGURA 1** muestra las etapas principales de un modelo clásico para el desarrollo de un fármaco. El proceso comienza con la investigación sobre las causas de una enfermedad, que en algunos casos puede llevar a la identificación de una o varias dianas moleculares asociadas con esa enfermedad. Los pasos siguientes involucran la identificación de compuestos activos con la diana molecular y la optimización de su actividad biológica. Estos ensayos se hacen in vitro con blancos moleculares aislados de las células. Los compuestos activos se someten a varias evaluaciones experimentales que implican ensayos en líneas celulares, en animales y pruebas clínicas en humanos. Los compuestos que pasan satisfactoriamente por todas las etapas son aprobados para uso clínico por un agente regulatorio, por ejemplo, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en México o la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos.<sup>8</sup>



**FIGURA 1.** Etapas principales en el desarrollo de fármacos.

----- Reposicionamiento de fármacos.

## **2.2 FARMACOCINÉTICA.**

La farmacocinética puede definirse como el estudio del comportamiento o evolución temporal, desde un punto de vista cuantitativo, de los fármacos en el organismo, desde que son administrados hasta que se eliminan.<sup>9</sup>

Abarca el estudio de los procesos de entrada del fármaco en el organismo, llegada al lugar de acción, metabolismo y salida del mismo. Los componentes básicos de la farmacocinética se abrevian en la serie ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Eliminación).<sup>9</sup>

### **2.2.1 Metabolismo de fármacos.**

El metabolismo de los fármacos se refiere a la transformación bioquímica de los compuestos en formas químicas más polares. Aunque el metabolismo mediado por el citocromo P450 es la ruta más común del metabolismo de los fármacos (más del 50%), las enzimas que no son P450 también juegan un papel importante en el metabolismo de fármacos recientemente desarrollados (20-35%). Entre las enzimas que no son P450, las esterasas contribuyen significativamente al metabolismo de fármacos (aproximadamente 35%). Las esterasas están involucradas en la bioactivación farmacológica de profármacos que contienen éster, enlaces de amida y tioéster, o inactivación de fármacos.<sup>2</sup>

El metabolismo está involucrado con los procesos químicos de biotransformación como mecanismo de desintoxicación o activación. El metabolismo de fármacos es un proceso complejo que involucra el sistema hepático y otros sistemas enzimáticos. El hígado es el principal sitio metabólico.<sup>4</sup>

## **2.3 BIOTRANSFORMACIÓN.**

La biotransformación de fármacos consiste en la modificación química de la molécula, por medios enzimáticos, que permite la pérdida total o parcial de la actividad farmacológica del compuesto. Cuando la pérdida de la actividad es parcial, se considera la producción de los metabolitos activos.<sup>10</sup>

### 2.3.1 Tipos de procesos de biotransformación.

Las reacciones metabólicas de biotransformación de acuerdo a la **TABLA 1** se dividen en:<sup>11</sup>

<b>TABLA 1. Reacciones de la FASE I y LA FASE II.</b>	
<b>FASE I</b>	<b>FASE II</b>
<p>a) Oxidación.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Hidroxilación (Aromática y alifática).</li><li>• (O, N, S)-Desalquilación.</li><li>• (N, S)-Oxidación.</li><li>• Desulfuración.</li><li>• Desaminación.</li><li>• Deshalogenación.</li></ul> <p>b) Reducción.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Azorreducción.</li><li>• Nitrorreducción.</li></ul> <p>c) Hidrólisis</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Ésteres.</li><li>• Amidas.</li></ul>	<p>a) Conjugación.</p> <ul style="list-style-type: none"><li>• Con el ácido glucurónico.</li><li>• Con sulfatos activos.</li><li>• Acetilación.</li><li>• Metilación.</li><li>• Con glutatión.</li><li>• Con glicina o glutamina.</li></ul>

Las reacciones de la FASE I implican modificaciones químicas del fármaco y la aparición de nuevos grupos funcionales en la molécula o, eventualmente fragmentación de su estructura. La mayoría de las reacciones de FASE I son catalizadas por reacciones redox por una familia de hemoproteínas llamadas citocromo P450 dependientes de monooxigenasa.<sup>5</sup> El resultado es un nuevo metabolito o metabolitos que generalmente son más polares y reactivos. Los metabolitos generados durante las reacciones de FASE I con frecuencia se conjugan con moléculas endógenas (es decir, ácido glucurónico, glutatión, sulfato, aminoácidos, etc.) mediante las reacciones de FASE II.<sup>5</sup>

### *Hidrólisis*

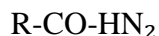
Este tipo de reacciones se producen habitualmente por hidrolasas de localización microsomal hepática, en los eritrocitos, plasma y otros tejidos. Dependiendo del enlace hidrolizado, las enzimas pueden ser una esterasa, amidasa, glucosidasa o peptidasa.<sup>12</sup>

Cuando se produce una hidrólisis, la concentración del principio activo disminuye, mientras que la de los productos aumenta. El efecto de este cambio sobre la velocidad de reacción depende del orden de la reacción.

Con las reacciones de primer orden, que ocurren frecuentemente en la hidrólisis de los fármacos, la velocidad de cambio es directamente proporcional a la concentración de la sustancia reactiva. Así que es que, los cambios en la concentración del principio activo no tienen ninguna influencia sobre el porcentaje de descomposición.<sup>13</sup>

### *Hidrólisis de amidas.*

El proceso de hidrólisis de un grupo amida consiste en la ruptura del siguiente enlace:



Este proceso de hidrólisis puede llevarse a cabo de diversas maneras:

- Hidrólisis química, la cual se hace en presencia de álcalis o ácidos.
- Hidrólisis enzimática, la cual se hace en presencia de enzimas.

El proceso de hidrólisis enzimática está comprendido en 3 etapas:

- Formación del complejo enzima-sustrato.
- Ruptura del enlace amídico dando como resultado la liberación de un producto.
- Separación del producto restante después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua.<sup>14</sup>

### *Cinética de hidrólisis enzimática.*

Debido al uso potencial del plasma y otras proteínas de la sangre, existe hoy día gran interés por modelar el comportamiento de sistemas que involucran reacciones de hidrólisis enzimática, con el fin de dimensionar equipos industriales, pronosticar comportamientos dinámicos, controlar tiempos de proceso y otras variables cinéticas.

Las principales enzimas que actúan rompiendo enlaces tipo amida, se producen en el hígado y también se encuentran circulando en el torrente sanguíneo. Éstas son las esterasas.<sup>15</sup>



## **2.4 ESTERASAS.**

Las esterasas son enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis (FASE I de la biotransformación) de ésteres, amidas e hidrazidas.<sup>16</sup>

El plasma humano contiene solo 2 esterasas, la butirilcolinesterasa y la paraoxonasa en cantidades significativas y la acetilcolinesterasa en niveles bajos. A diferencia de los animales, el plasma humano no contiene carboxilesterasa; sin embargo, se ha informado que la albúmina tiene actividad de esterasa, aunque solo como reacción a medias.<sup>17</sup>

La esterasa hepática, que cataliza la hidrólisis de ésteres alifáticos, es de gran interés por la oportunidad que ofrece para comparar su acción en relación con sustratos simples. El comportamiento cinético de esterasa de hígado de cerdo en función de la concentración de sustrato nunca ha sido investigado en un entorno libre de los efectos inhibidores de los almacenamientos intermedios y de indicadores de pH.<sup>6</sup>

En general, la cinética de estado estacionario (sus características no varían con el tiempo) de las esterasas se describe mediante la ecuación de Michaelis-Menten.<sup>17</sup>

## **2.5 CARACTERIZACIÓN DE LA BIOTRANSFORMACIÓN.**

Por su naturaleza las enzimas abarcan un amplio espectro de estudio que va desde su implicación en el metabolismo hasta su estructura pasando por su cinética.

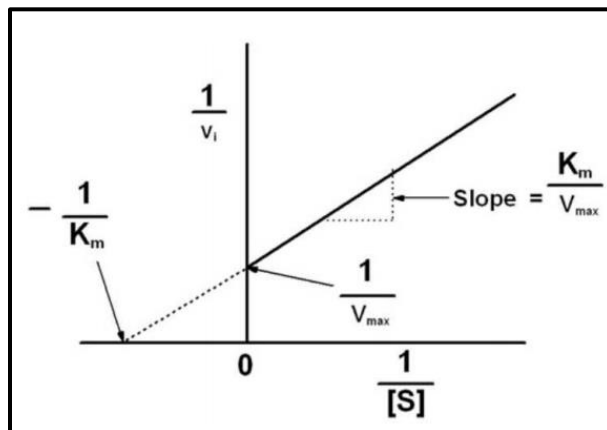
Los modelos para la reacción de la hidrólisis enzimática se pueden clasificar dentro de dos categorías: tipo de modelo (empírico o mecanístico) y tipo de sustrato (puro o impuro). La mayoría de los modelos mecanísticos para esta reacción son modelos Michaelis-Menten.

Al poner en práctica la cinética de Michaelis-Menten se recurre al diagrama de Lineweaver-Burk que se emplea como herramienta gráfica para calcular los parámetros cinéticos de una enzima. La representación gráfica de Lineweaver-Burk permite identificar:

- Pendiente ( $K_m/V_{max}$ )
  - $K_m$  (constante de Michaelis-Menten)
  - $V_{max}$  (velocidad máxima)
- Intersección en el eje y ( $1/V_{max}$ )
- Intersección en el eje x ( $-1/K_m$ )

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

**FIGURA 2.** Expresión de Lineweaver-Burk.



**FIGURA 3.** Representación gráfica de Lineweaver-Burk.

Es cierto que la representación de Lineweaver-Burk presenta algunos inconvenientes ya que, al requerir de dobles inversos, pequeños errores experimentales pueden conducir a grandes errores. Además, el hecho de que a altas concentraciones los puntos se aglutinen al principio de la gráfica puede dar lugar a cálculos erróneos. Sin embargo, si los experimentos se plantean correctamente desde el punto de vista metodológico, los resultados son totalmente confiables.<sup>18</sup>

## 2.6 TÉCNICAS PARA MEDIR LA BIOTRANSFORMACIÓN.

El estudio del destino metabólico de los fármacos es una parte esencial e importante del proceso de desarrollo de fármacos, la investigación de las vías metabólicas de los fármacos, las interacciones medicamentosas, la influencia de polimorfismos genéticos y otros factores que influyen en la FASE I y/o II del metabolismo de un fármaco.

El análisis de metabolitos en matrices biológicas complejas es una tarea desafiante, por lo tanto, se utilizan varios métodos analíticos para la calificación y cuantificación de metabolitos de fármacos. La cromatografía líquida junto con la espectrometría de masas (LC-MS) se ha convertido en la herramienta analítica más poderosa para el cribado y la identificación de metabolitos de fármacos en matrices biológicas.

Sin embargo, la preparación adecuada de la muestra es un aspecto de requisito previo clave del bioanálisis cuantitativo y cualitativo exitoso.

Se utilizan propuestas diferentes de la cuantificación directa para la evaluación de metabolitos en muestras biológicas; por ejemplo, la cuantificación indirecta a través del fármaco original después de la hidrólisis del metabolito es frecuentemente utilizada. El método más utilizado para este tipo de ensayos es la cromatografía líquida acoplada a diferentes detectores como el espectrómetro de masas o el detector UV. Los métodos LC-MS se consideran los más apropiados para la determinación de fármacos y sus metabolitos, y también son los más adecuados para el análisis de alto rendimiento. Sin embargo, en los ensayos de LC-MS, el efecto de la matriz y la selección de estándares internos adecuados deberían abordarse adecuadamente.<sup>19</sup>

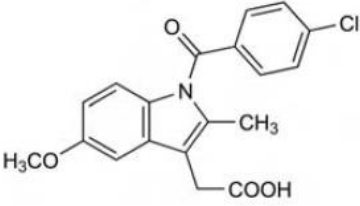
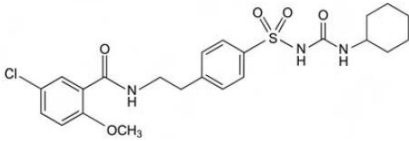
#### 2.6.1 Otras técnicas de detección.

Los detectores UV, de fluorescencia y electroquímicos generalmente se acoplan con un cromatógrafo líquido para la determinación de los fármacos y sus metabolitos. El tiempo de análisis total de estos métodos es a menudo largo porque se requiere una separación cromatográfica de referencia para fines de cuantificación. En términos de reproducibilidad y robustez, la detección de UV y fluorescencia tiene una ventaja sobre la espectrometría de masas. Sin embargo, los métodos son menos sensibles y específicos, lo que requiere una preparación de muestras extensa invirtiendo mucho tiempo en comparación con la espectrometría de masas.

Antes del advenimiento de la espectrometría de masas, la UV era la principal técnica de detección utilizada en farmacocinética para la cuantificación de fármacos y sus metabolitos en matrices biológicas. Aunque robusto, confiable, simple y fácil de usar, la detección UV proporciona una sensibilidad relativamente baja, especialmente cuando el compuesto de interés no tiene cromóforo significativo.<sup>20</sup>

## 2.7 PROPIEDADES DE LOS FÁRMACOS MODELO DE ESTUDIO.

Muchos fármacos que contienen un grupo amida o éster tienen utilidad terapéutica como analgésicos, anestésicos locales y antiinflamatorios por lo cual es de gran importancia estudiar su proceso de hidrólisis (FASE I de la biotransformación).<sup>21</sup> La Indometacina y la Glibenclamida son fármacos cuya frecuencia de uso ha aumentado los últimos años, motivo para ser objeto de estudio.

TABLA 2. Propiedades químicas de la Indometacina y la Glibenclamida.		
PROPIEDAD	INDOMETACINA	GLIBENCLAMIDA
Estructura química		
Solubilidad	Etanol, éter, acetona, aceite de castor, insoluble en agua, 1 g/30 mL en cloroformo. <sup>22</sup>	Escasamente soluble en agua, insoluble en éter, Soluble en etanol, cloroformo y metanol. <sup>23</sup>
Coefficiente de absortividad (E)	20800, 16200, 6290. <sup>22</sup>	17686. <sup>24</sup>
Coefficiente de partición (Log P)	4.27. <sup>23</sup>	4.7. <sup>23</sup>
Longitud de onda (λ)	230, 260, 319 nm. <sup>23</sup>	242 nm. <sup>24</sup>
Peso molecular	357.79 g/mol. <sup>23</sup>	494.003 g/mol. <sup>23</sup>
pKa	4.5. <sup>22</sup>	5.3. <sup>23</sup>

### 3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

- PLANTEAMIENTO:

La investigación del proceso de biotransformación de fármacos surge desde el año 1977, pero desde ese entonces no se generó evidencia de su evaluación hasta muy recientemente en 2016 estudiándose el efecto del pH, temperatura y la presencia de sales en procesos de hidrólisis sobre diversos tipos de sustratos.

Durante esos periodos de tiempo se ha olvidado valorar los efectos que pueden ocurrir por la hidrólisis de esterasas de acuerdo a su matriz biológica y las posibles influencias existentes en la formación de metabolitos secundarios o profármacos.

Y la importancia de caracterizar la actividad hidrolítica de las esterasas radica en que su análisis permite conocer en qué medida un metabolito secundario produce daño a la salud, así como también mejorar propiedades farmacocinéticas de los fármacos. Un ejemplo de lo segundo es la activación favorable de profármacos por acción de esterasas.

Gracias a la evidencia documental que esta investigación generará

#### **4. OBJETIVOS.**

- **GENERAL:**

Optimizar una metodología que permita determinar la cinética de hidrólisis de fármacos por esterasas en solución y en plasma de rata para llevar a cabo estudios relacionados con el desarrollo de fármacos.

- **PARTICULAR:**

Estandarizar las condiciones para la hidrólisis de los fármacos en estudio.

#### **5. HIPÓTESIS.**

A partir de la cuantificación de fármaco no hidrolizado se determinará la cinética enzimática del proceso metabólico de hidrólisis de fármacos para estandarizar una metodología en solución de esterasa y plasma de rata.

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

**TABLA 3.** Clasificación del estudio.

<b>6.1 TIPO DE ESTUDIO.</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- Finalidad.</li><li>- Factores de estudio.</li><li>- Secuencia temporal.</li><li>- Cronología de hechos.</li></ul>	Descriptivo. Experimental. Longitudinal. Retrospectivo.
<b>6.2 POBLACIÓN A ESTUDIAR.</b>	Alícuotas de fármacos en plasma de rata y solución de esterasa tomadas a los tiempos 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 90 min.
<b>6.3 CRITERIOS DE PARTICIPACIÓN.</b> <ul style="list-style-type: none"><li>- De inclusión.</li> <li>- De exclusión.</li> <li>- De eliminación.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Fármacos con amidas hidrolizables.</li><li>- Alícuotas de 1 mL de cada tiempo.</li><li>- Muestras cumplan con condiciones de incubación.</li> <li>- Alícuotas tomadas a diferentes tiempos.</li><li>- Mal aforo de la solución inicial.</li> <li>- Plasma de otro animal.</li><li>- Fármacos no hidrolizables por esterasas.</li><li>- Alícuotas de volumen incorrecto.</li></ul>

## 7. METODOLOGÍA.

### 7.1 MATERIAL.

<b>TABLA 4. Materiales utilizados en la metodología experimental</b>		
<b>INSTRUMENTO/EQUIPO/MATERIAL</b>	<b>MARCA</b>	<b>SERIE</b>
Microbalanza.	Mettler.	MT5
Parrilla de Agitación y Calentamiento.	Barnstead Thermolyne	13100509989
Módulo de Destilación.	Merck Millipore	F7CA94436Q
Sonicador.	Branson	3800
Acrodiscos	Merck Millipore	R3BA22292
Pipeta Pasteur	Brand	747715
Agitador Magnético	Veravitrum	N/E
Gradilla	Nalgene	13MN
Matraz Erlenmeyer 500 mL	Pyrex	4980
Potenciómetro	Hanna Instruments	HI2210
Matraz Erlenmeyer 100 mL	Pyrex	4980
Matraces Aforados 10 mL	Kimax	28014
Pipeta Volumétrica 1 mL	Pyrex	7102
Matraz Aforado 100 mL	Pyrex	5640
Pipeta Volumétrica 5 mL	Kimax	37000
Pipeta Micrométrica 10-100 µL	Socorex	12011981
Pipeta Micrométrica 100-1000 µL	Eppendorf	I35049F
Puntas Azules	Eppendorf	E164805R
Puntas Amarillas	Eppendorf	U1230450
Celda de Vidrio	Agilent	6610000800
Espectrofotómetro UV-Visible	Varian	IF-060
Tubos de Ensaye	Kimble Chase	94500660001
Vórtex	Thermolyne	1271050891543
Centrífuga	Eppendorf	5417C



## 7.2 REACTIVOS.

<b>TABLA 5. Reactivos utilizados en la metodología experimental.</b>		
<b>REACTIVO</b>	<b>MARCA</b>	<b>LOTE</b>
Fosfato Monobásico de Potasio	J.T. Baker	3818-05
Agua Destilada	Merck Millipore	146654
Hidróxido de Sodio	J.T. Baker	PE0659
Ácido Fosfórico	Merck	605309
Sulfato Cúprico	Sigma	83H-3417
Tartrato de potasio sódico	Reasol	8732
Yoduro de Potasio	Sigma	94F-3432
Ácido Acético	J.T. Baker	9508-02
Metanol	J.T. Baker	Y07C07
Glibenclamida	Sigma-Aldrich	SLBG3358V
Indometacina	Neolpharma	60-03-11
Albúmina de Huevo	Sigma-Aldrich	N/E
Esterasa de Hígado Bovino	Sigma-Aldrich	SLBM5397V
Plasma de Rata Wistar Hembra	Ninguna	Ninguno
Solución Salina Isotónica	Pisa Farmacéutica	P18Y546
Acetonitrilo	Tecsiquim	TEC-096-REH

### **7.3 PROCEDIMIENTO.**

#### 7.3.1 Preparación de la SA de fosfatos pH 7.4 [0.02 M].

Pesar 108.8 mg de fosfato monobásico de potasio. Agregar la pesada a un matraz Erlenmeyer de 500 mL, disolver con 100 mL de agua destilada. Agregar agua destilada hasta el volumen de 400 mL. Calibrar el potenciómetro con las soluciones pH 7 y pH 10. Medir el pH de la SA de fosfatos. En caso de ser necesario ajustar el pH de la SA con hidróxido de sodio o ácido fosfórico hasta 7.4.

#### 7.3.2 Preparación del reactivo de Biuret.

Disolver 150 mg de sulfato cúprico y 600 mg de tartrato de potasio sódico en 50 mL de agua en un matraz Erlenmeyer de 100 mL. Aforar con solución de hidróxido de sodio (1:10). Mezclar. Se agregaron 250 mg de yoduro de potasio.

#### 7.3.3 Preparación de las soluciones para la curva patrón.

PATRÓN 1: Pesar 5 mg de GLIBENCLAMIDA. Colocar pesada en un matraz aforado de 10 mL. Mezclar con un poco de metanol. Aforar con metanol. Realizar diluciones para obtener las concentraciones de 36, 33, 30, 27 y 24 mg/dL para preparar la curva patrón. Preparar curva de albúmina por triplicado.

PATRÓN 2: Pesar 5 mg de INDOMETACINA. Colocar pesada en un matraz aforado de 10 mL. Mezclar con un poco de metanol. Aforar con metanol. Realizar diluciones para obtener las concentraciones de 24, 22, 20, 18 y 16 mg/dL para preparar la curva patrón. Preparar curva de albúmina por triplicado.

#### 7.3.4 Cuantificación de proteínas.

##### *Stock de albúmina bovina.*

Pesar 100 mg de albúmina. Colocar en un matraz aforado de 10 mL. Aforar con SA de Fosfatos pH 7.4 [0.02 M]. Realizar diluciones para obtener las concentraciones de 400, 200, 160, 120 y 80 mg/dL para preparar la curva patrón. Preparar curva de albúmina por triplicado.

##### *Muestras de solución de esterasa.*

Vaciar el contenido total de esterasa sin raspar paredes del frasco. Disolver el contenido restante del frasco de esterasa en 100 mL de SA de Fosfatos pH 7.4 [0.02 M]. Tomar una alícuota de 5 mL. Colocar alícuota en matraz aforado de 10 mL. Aforar con SA de Fosfatos pH 7.4 [0.02 M]. Dejar reposar soluciones 30 minutos. Preparar 10 veces la muestra.

*Muestras de plasma de rata.*

Tomar una alícuota de 1 mL de plasma. Colocar en un matraz aforado de 10 mL. Aforar con SA de Fosfatos pH 7.4 [0.02 M]. Dejar reposar las soluciones 30 minutos. Preparar 10 veces la muestra. Leer a una longitud de onda de 540 nm en el espectrofotómetro.

Datos teóricos previamente encontrados de una cuantificación de proteínas:

PROTEÍNAS EN PLASMA: 121 mg/mL

PROTEÍNAS EN SOLUCIÓN DE ESTERASA: 327 mg/mL<sup>25</sup>

**TABLA 6.** Volúmenes utilizados para preparar la curva patrón y muestras para la cuantificación de proteínas en solución de esterasa y plasma de rata.

<b>TUBOS</b>	<b>SA (μL)</b>	<b>STOCK (μL)</b>	<b>BIURET (mL)</b>	<b>MUESTRA (mL)</b>	<b>CURVA (mg/dL)</b>
1 - 3	0	2000	3	0	400
4 - 6	0	1000	4	0	200
7 - 9	200	800	4	0	160
10 - 12	400	600	4	0	120
13 - 15	600	400	4	0	80
16 - 18	800	200	4	0	40
19	1000	0	4	0	Blanco
20 - 29	0	0	4	1	Esterasa
30 - 39	0	0	4	1	Plasma

### 7.3.5 Determinación de cinética de hidrólisis.

#### *Cinética de GLIBENCLAMIDA en solución de esterasa.*

Pesar 10 mg de Glibenclamida. Colocar en un matraz aforado de 10 mL. Aforar con METANOL. De la solución anterior tomar 200, 400 o 800  $\mu\text{L}$ . Colocar la alícuota anterior en un tubo de ensaye. Adicionar suficiente solución de esterasa al 80 % diluido con solución salina isotónica (2 mL). Llevar a 10 mL (Concentración 80, 40 o 20  $\mu\text{g/mL}$  o 2, 1 o 0.5  $\times 10^{-4}$  M). Preparar cada solución por triplicado. Someter inmediatamente las soluciones a incubación con agitación (60 rpm) y calentamiento ( $37 \pm 0.5$  °C). Tomar muestras de 1 mL de cada tubo a los 0, 10, 20, 40, 50, 60 y 90 minutos. Depositar las muestras tomadas en tubos de polipropileno. Agregar 2 mL de acetonitrilo a cada muestra de cada tiempo. Agitar en vórtex durante 20 segundos. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos. Tomar 0.5 mL sobrenadante y depositar en celda de vidrio. Leer sobrenadante a 254 nm en Espectrofotómetro UV-Visible. Se realizaron curvas patrón de acuerdo a la **TABLA 7**. Las curvas se leyeron de manera conjunta con las muestras.

**TABLA 7.** Esquema de la curva patrón para cuantificar GLIBENCLAMIDA en solución de esterasa de hígado bovino.

<b>PATRÓN 1 (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>AFORO (mL)</b>	<b>CURVA (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
720	10	36
660	10	33
600	10	30
540	10	27
480	10	24

*Cinética de INDOMETACINA en solución de esterasa.*

Pesar 10 mg de Indometacina. Colocar en un matraz aforado de 10 mL. Aforar con METANOL. De la solución anterior tomar 200, 400 o 800  $\mu\text{L}$ . Colocar la alícuota anterior en un tubo de ensaye. Adicionar suficiente solución de esterasa al 80 % diluido con solución salina isotónica (2 mL). Llevar a 10 mL (Concentración 80, 40 o 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  o 2, 1 o 0.5  $\times 10^{-4}$  M). Preparar cada solución por triplicado. Someter inmediatamente las soluciones a incubación con agitación (60 rpm) y calentamiento ( $37 \pm 0.5$  °C). Tomar muestras de 1 mL de cada tubo a los 0, 10, 20, 40, 50, 60 y 90 minutos. Depositar las muestras tomadas en tubos de polipropileno. Agregar 2 mL de acetonitrilo a cada muestra de cada tiempo. Agitar en vórtex durante 20 segundos. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos. Tomar 0.5 mL sobrenadante y depositar en celda de vidrio. Leer sobrenadante a 285 nm en Espectrofotómetro UV-Visible. Se realizaron curvas patrón de acuerdo a la **TABLA 8**. Las curvas se leyeron de manera conjunta con las muestras.

**TABLA 8.** Esquema de la curva patrón para cuantificar INDOMETACINA en solución de esterasa de hígado bovino.

<b>PATRÓN 2 (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>AFORO (mL)</b>	<b>CURVA (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>
480	10	24
440	10	22
400	10	20
360	10	18
320	10	16

*Cinética de GLIBENCLAMIDA en plasma de rata.*

Pesar 10 mg de Glibenclamida. Colocar en un matraz aforado de 10 mL. Aforar con METANOL. De la solución anterior tomar 200, 400 o 800  $\mu\text{L}$ . Colocar la alícuota anterior en un tubo de ensaye. Adicionar suficiente plasma de rata al 80 % diluido con solución salina isotónica (2 mL). Llevar a 10 mL (Concentración 80, 40 o 20  $\mu\text{g/mL}$  o 2, 1 o 0.5  $\times 10^{-4}$  M). Preparar cada solución por triplicado. Someter inmediatamente las soluciones a incubación con agitación (60 rpm) y calentamiento ( $37 \pm 0.5$  °C). Tomar muestras de 1 mL de cada tubo a los 0, 10, 20, 40, 50, 60 y 90 minutos. Depositar las muestras tomadas en tubos de polipropileno. Agregar 2 mL de acetonitrilo a cada muestra de cada tiempo. Agitar en vórtex durante 20 segundos. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos. Tomar 0.5 mL sobrenadante y depositar en celda de vidrio. Leer sobrenadante a 254 nm en Espectrofotómetro UV-Visible. Se realizaron curvas patrón de acuerdo a la **TABLA 9**. Las curvas se leyeron de manera conjunta con las muestras.

**TABLA 9.** Esquema de la curva patrón para cuantificar GLIBENCLAMIDA en plasma de rata.

<b>PATRÓN 1 (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>AFORO (mL)</b>	<b>CURVA (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
720	10	36
660	10	33
600	10	30
540	10	27
480	10	24

*Cinética de INDOMETACINA en plasma de rata.*

Pesar 10 mg de Indometacina. Colocar en un matraz aforado de 10 mL. Aforar con METANOL. De la solución anterior tomar 200, 400 o 800  $\mu\text{L}$ . Colocar la alícuota anterior en un tubo de ensaye. Adicionar suficiente plasma de rata al 80 % diluido con solución salina isotónica (2 mL). Llevar a 10 mL (Concentración 80, 40 o 20  $\mu\text{g/mL}$  o 2, 1 o 0.5  $\times 10^{-4}$  M). Preparar cada solución por triplicado. Someter inmediatamente las soluciones a incubación con agitación (60 rpm) y calentamiento ( $37 \pm 0.5$  °C). Tomar muestras de 1 mL de cada tubo a los 0, 10, 20, 40, 50, 60 y 90 minutos. Depositar las muestras tomadas en tubos de polipropileno. Agregar 2 mL de acetonitrilo a cada muestra de cada tiempo. Agitar en vórtex durante 20 segundos. Centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos. Tomar 0.5 mL sobrenadante y depositar en celda de vidrio. Leer sobrenadante a 285 nm en Espectrofotómetro UV-Visible. Se realizaron curvas patrón de acuerdo a la **TABLA 10**. Las curvas se leyeron de manera conjunta con las muestras.

**TABLA 10.** Esquema de la curva patrón para cuantificar INDOMETACINA en plasma de rata.

<b>PATRÓN 2 (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>AFORO (mL)</b>	<b>CURVA (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
480	10	24
440	10	22
400	10	20
360	10	18
320	10	16

## 8. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

Previo a la obtención de estos resultados finales se realizó un análisis estructural de los posibles metabolitos por hidrólisis de los fármacos y se determinó su longitud de onda máxima aproximada, de los cuales solo el metabolito denominado M23 de la Glibenclamida tendría la posibilidad de leerse a la misma longitud de onda que el fármaco.<sup>32</sup>

Para obtener el coeficiente de correlación (r) se aplicó la raíz cuadrada al coeficiente de determinación ( $r^2$ ) en los cálculos de las linealidades de las curvas empleadas, siendo el criterio que se debe cumplir de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013.<sup>33</sup>

También para la elaboración de las TABLAS y FIGURAS obtenidas se realizó el cálculo de las velocidades y la regresión lineal para establecer la constante de Michaelis ( $K_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ).<sup>34</sup>

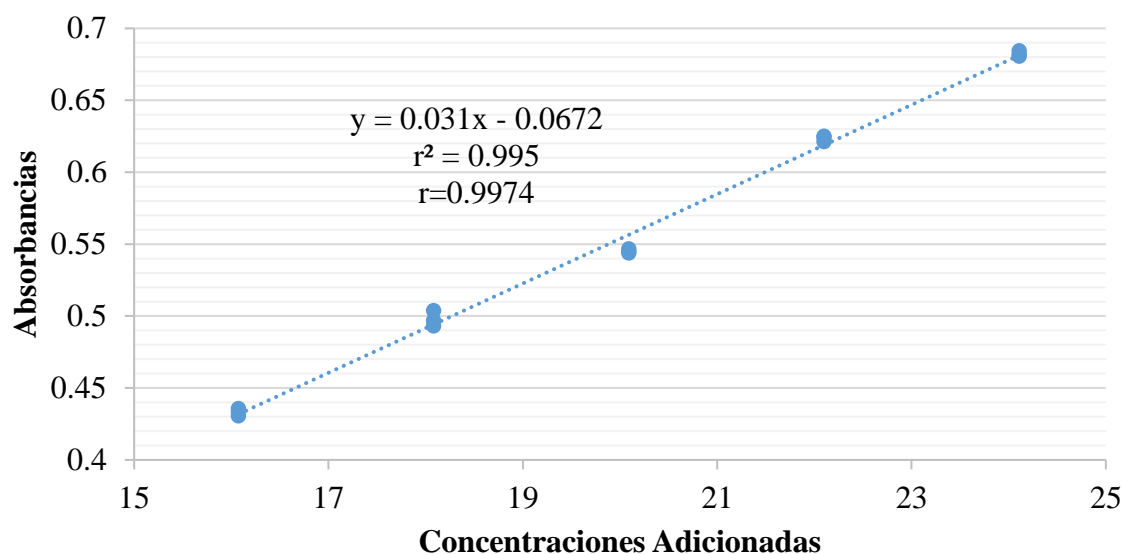


## 8.1 CURVAS PATRÓN.

### 8.1.1 Curva patrón de Indometacina.

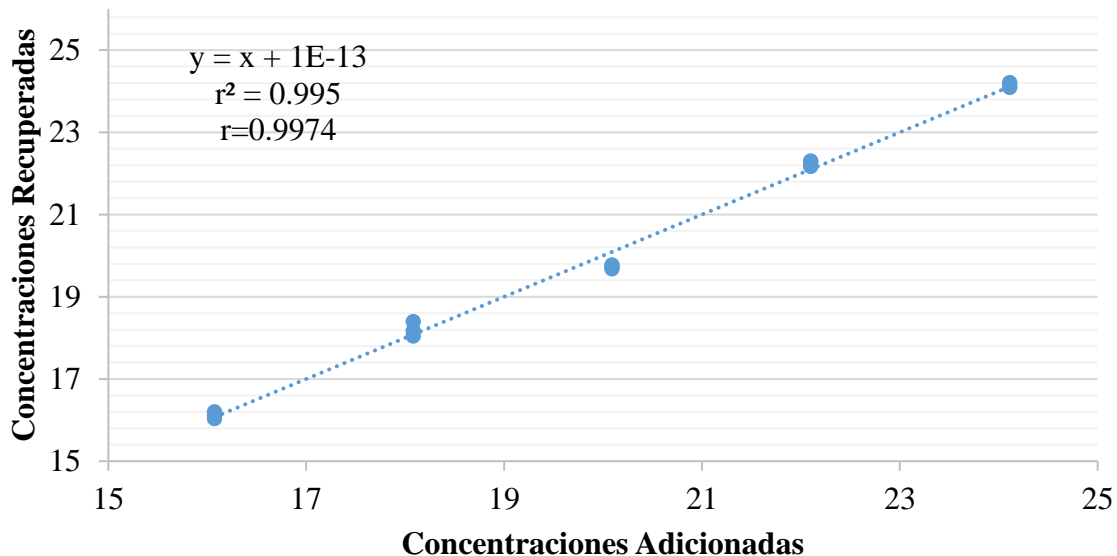
**TABLA 11. Resultados de la curva patrón de INDOMETACINA.**

REPETICIÓN	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN ADICIONADA (µg/mL)	CONCENTRACIÓN RECUPERADA (µg/mL)
1	0.4358	16.0736	16.2024
	0.497	18.0828	18.1739
	0.5439	20.0920	19.6846
	0.6244	22.1012	22.2777
	0.6808	24.1104	24.0945
2	0.4308	16.0736	16.0414
	0.4932	18.0828	18.0514
	0.5453	20.0920	19.7297
	0.6252	22.1012	22.3035
	0.6845	24.1104	24.2137
3	0.4334	16.0736	16.1251
	0.5039	18.0828	18.3961
	0.5468	20.0920	19.7780
	0.6213	22.1012	22.1779
	0.6819	24.1104	24.1299



**FIGURA 4.** Curva patrón para la cuantificación de INDOMETACINA.

PENDIENTE (m)	ORDENADA AL ORIGEN (b)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)
0.031	-0.0672	0.9974



**FIGURA 5.** Curva de Concentración Adicionada vs. Concentración Recuperada de INDOMETACINA.

**TABLA 12.** Análisis estadístico de las concentraciones recuperadas de INDOMETACINA.

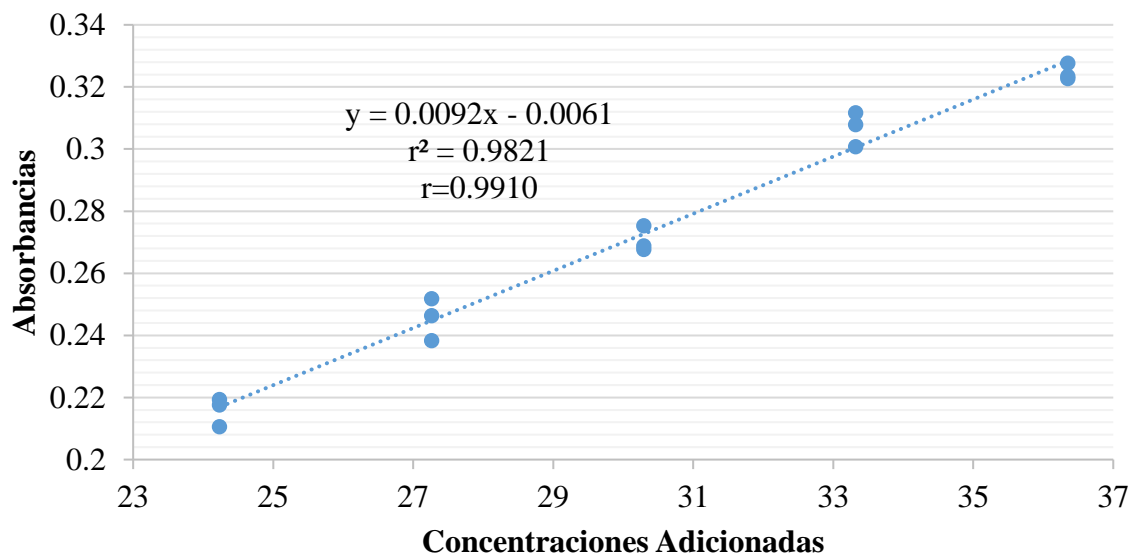
CONC. RECUPERADA 1 (µg/mL)	CONC. RECUPERADA 2 (µg/mL)	CONC. RECUPERADA 3 (µg/mL)	$\bar{X}$ (µg/mL)	DS	CV (%)
16.2024	16.0414	16.1251	16.1230	0.0806	0.4996
18.1739	18.0514	18.3961	18.2071	0.1747	0.9597
19.6846	19.7297	19.7780	19.7308	0.0467	0.2368
22.2777	22.3035	22.1779	22.2530	0.0664	0.2982
24.0945	24.2137	24.1299	24.1460	0.0612	0.2535

La concentración del 100% para la curva de Indometacina resultó 20 µg/mL. La curva con mayor linealidad fue la de Indometacina debido a que su coeficiente de correlación (r) fue de 0.9974 lo anterior puede deberse a la alta solubilidad de Indometacina en Metanol y a la precisión en la pesada del fármaco para preparar la solución Stock. La interpretación de las TABLAS y FIGURAS indican un ejemplo de resultados estadísticamente confiables.

### 8.1.2 Curva patrón de Glibenclamida.

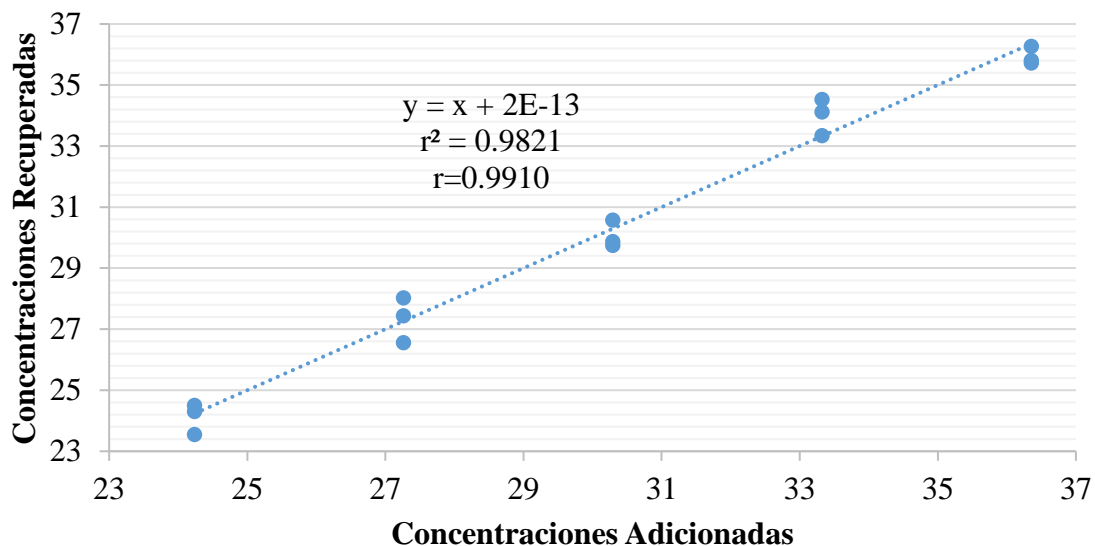
**TABLA 13.** Resultados de la curva patrón de GLIBENCLAMIDA.

REPETICIÓN	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN ADICIONADA (µg/mL)	CONCENTRACIÓN RECUPERADA (µg/mL)
1	0.2106	24.2352	23.5484
	0.2464	27.2646	27.4388
	0.2677	30.2940	29.7535
	0.3079	33.3234	34.1221
	0.3234	36.3528	35.8065
2	0.2194	24.2352	24.5047
	0.2518	27.2646	28.0257
	0.2688	30.2940	29.8731
	0.3117	33.3234	34.5351
	0.3277	36.3528	36.2738
3	0.2176	24.2352	24.3091
	0.2383	27.2646	26.5586
	0.2753	30.2940	30.5794
	0.3008	33.3234	33.3506
	0.3227	36.3528	35.7305



**FIGURA 6.** Curva patrón para la cuantificación de GLIBENCLAMIDA.

PENDIENTE (m)	ORDENADA AL ORIGEN (b)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)
0.0092	-0.0061	0.9910



**FIGURA 7.** Curva de Concentración Adicionada vs. Concentración Recuperada de GLIBENCLAMIDA.

**TABLA 14.** Análisis estadístico de las concentraciones recuperadas de GLIBENCLAMIDA.

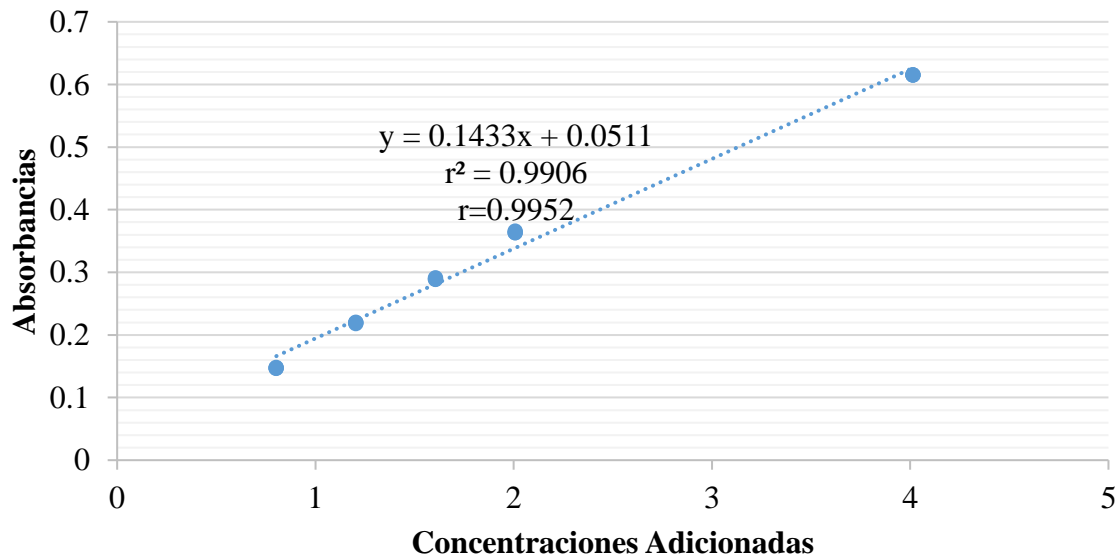
CONC. RECUPERADA 1 ( $\mu\text{g/mL}$ )	CONC. RECUPERADA 2 ( $\mu\text{g/mL}$ )	CONC. RECUPERADA 3 ( $\mu\text{g/mL}$ )	$\bar{X}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	DS	CV (%)
23.5484	24.5047	24.3091	24.1207	0.5052	2.0945
27.4388	28.0257	26.5586	27.3410	0.7384	2.7007
29.7535	29.8731	30.5794	30.0687	0.4463	1.4844
34.1221	34.5351	33.3506	34.0026	0.6012	1.7682
35.8065	36.2738	35.7305	35.9370	0.2942	0.8187

El nivel central obtenido fue de 30  $\mu\text{g/mL}$ . La Glibenclámda tuvo que pasar por un periodo de 10 min sonicación para la completa disolución en Metanol, lo que puede ser la razón de su menor coeficiente de correlación siendo éste de 0.9910. Como se observa en la **TABLA 14** los CV de los 2 primeros niveles son elevados con respecto a los demás valores, esto también influyó en la linealidad de esta curva. La variación existente es debida a que los primeros niveles son concentraciones muy pequeñas, lo que produce imprecisión inherente del volumen de las alícuotas tomadas y que no es controlada por el analista (se debe probablemente por la dispersión de las partículas en solución).<sup>35</sup>

### 8.1.3 Curva patrón de Proteínas.

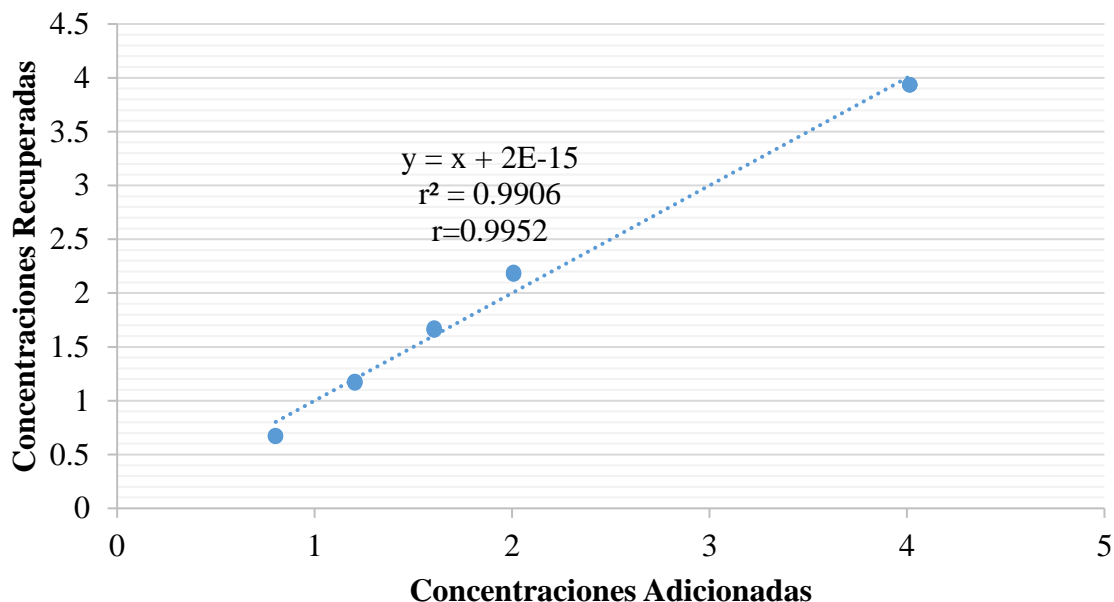
**TABLA 15. Resultados de la curva patrón de PROTEÍNAS.**

REPETICIÓN	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN ADICIONADA (mg/mL)	CONCENTRACIÓN RECUPERADA (mg/mL)
1	0.1484	0.8029	0.2991
	0.2200	1.2043	0.9310
	0.2891	1.6058	1.5409
	0.3657	2.0072	2.2170
	0.6152	4.0144	4.4190
2	0.1469	0.8029	0.2859
	0.2202	1.2043	0.9328
	0.2915	1.6058	1.5621
	0.3636	2.0072	2.1984
	0.6154	4.0144	4.4208
3	0.1474	0.8029	0.2903
	0.2184	1.2043	0.9169
	0.2888	1.6058	1.5383
	0.3635	2.0072	2.1975
	0.6155	4.0144	4.4217



**FIGURA 8.** Curva patrón para la cuantificación de PROTEÍNAS.

PENDIENTE (m)	ORDENADA AL ORIGEN (b)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)
0.1433	0.0511	0.9952



**FIGURA 9.** Curva de Concentración Adicionada vs. Concentración Recuperada de PROTEÍNAS.

**TABLA 16.** Análisis estadístico de las concentraciones recuperadas de PROTEÍNAS.

CONC. RECUPERADA 1 (µg/mL)	CONC. RECUPERADA 2 (µg/mL)	CONC. RECUPERADA 3 (µg/mL)	$\bar{X}$ (µg/mL)	DS	CV (%)
0.2991	0.2859	0.2903	0.2917	0.0067	2.3105
0.9310	0.9328	0.9169	0.9269	0.0087	0.9393
1.5409	1.5621	1.5383	1.5471	0.0130	0.8442
2.2170	2.1984	2.1975	2.2043	0.0109	0.4974
4.4190	4.4208	4.4217	4.4205	0.0013	0.0304

La curva de proteínas se estableció de acuerdo al método de Biuret siendo 1 mg/mL la concentración central. La linealidad de la curva de proteínas resultó ser  $r=0.9952$  como se observa en las **FIGURAS 8 y 9**, que pudo deberse a que las concentraciones de la curva y las muestras caen dentro del intervalo de cuantificación más preciso que va de 20 a 40 mg/mL.<sup>36</sup> Además de lo anterior la reacción de Biuret involucra la formación directa de un complejo con las proteínas que son el principal componente del plasma y la solución de esterasas por lo que se reduce la interferencia. De tal manera que al ser éstas el analito de interés se descarta tal interferencia, ya que las proteínas son causantes de la mayor variabilidad en los métodos analíticos por su compleja estructura.

## 8.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

### 8.2.1 Ensayo de identidad.

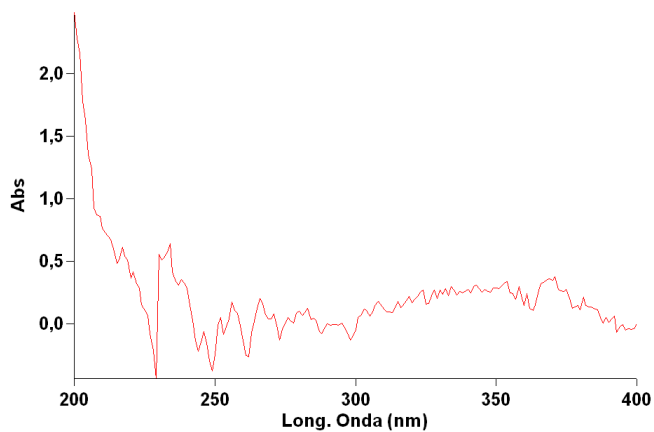


FIGURA 10. Barrido espectral UV-VIS de 200 a 400 nm de Metanol.

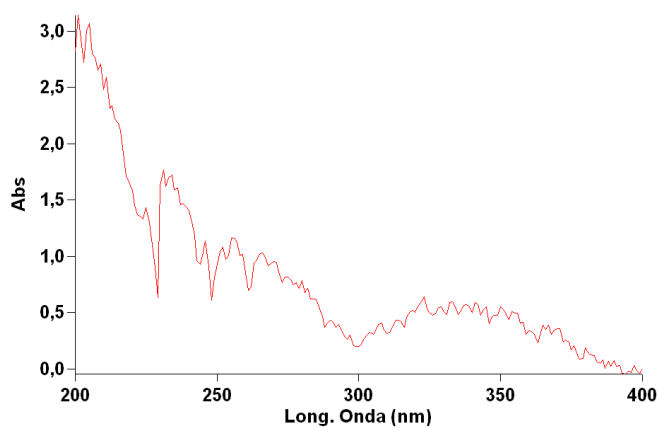


FIGURA 11. Barrido espectral UV-VIS de 200 a 400 nm de Indometacina Referencia.

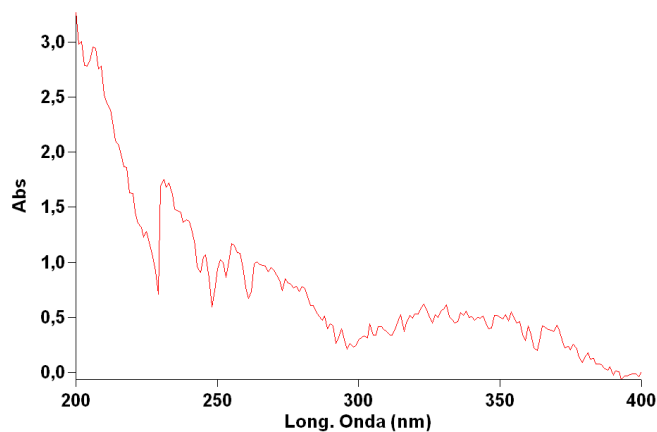
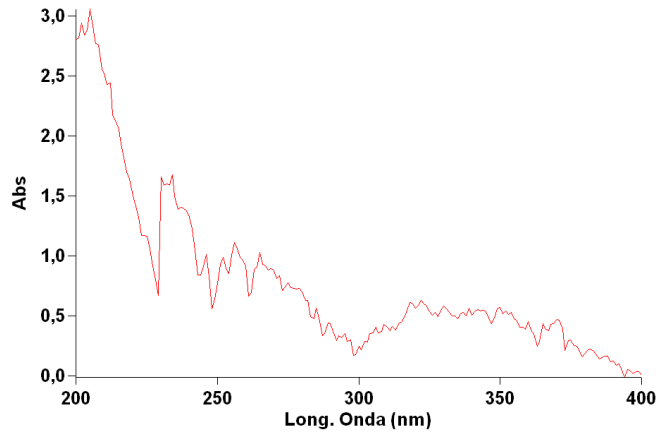
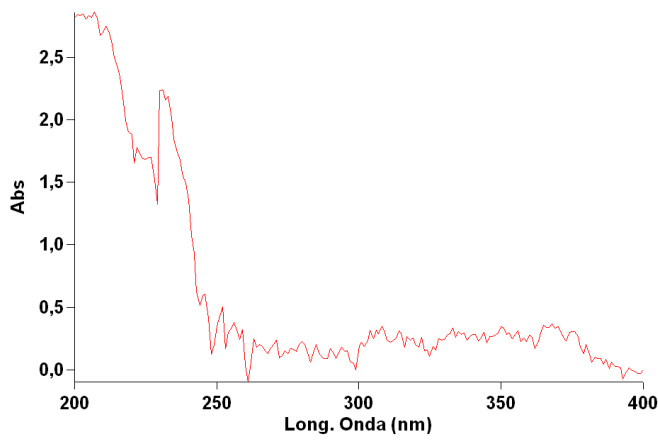


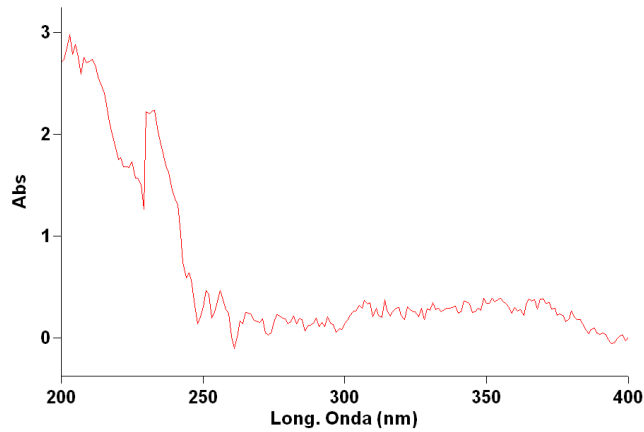
FIGURA 12. Barrido espectral UV-VIS de 200 a 400 nm de Indometacina Materia Prima.



**FIGURA 13.** Barrido espectral UV-VIS de 200 a 400 nm de Indometacina Materia Prima y Referencia (50:50).

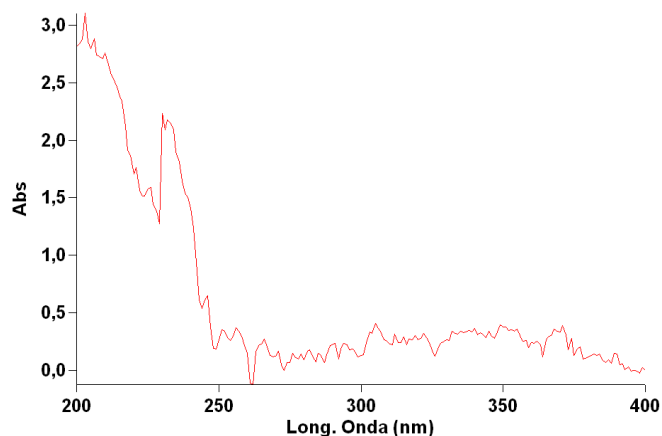


**FIGURA 14.** Barrido espectral UV-VIS de 200 a 400 nm de Glibenclamide Referencia.



**FIGURA 15.** Barrido espectral UV-VIS de 200 a 400 nm de Glibenclamide Materia Prima





**FIGURA 16.** Barrido espectral UV-VIS de 200 a 400 nm de Glibenclamida Materia Prima y Referencia (50:50).

Se realizó un ensayo de identidad para la especificidad de ambos fármacos, con el fin de demostrar estructuras análogas. En las **FIGURAS 11 y 12** observamos el barrido espectral de Indometacina Referencia e Indometacina Materia Prima respectivamente, ambos espectros tienen picos de absorción idénticos, por lo que se asegura la similitud estructural buscada. Esta interpretación es la misma para las **FIGURAS 14 y 15** que son los barridos espectrales de Glibenclamida Materia Prima y Glibenclamida Referencia respectivamente. Observando que en ambos barridos los picos de absorción se hallan a las mismas longitudes de onda.

### 8.2.2 Repetibilidad y exactitud.

<b>TABLA 17. Resultados de la exactitud y repetibilidad de INDOMETACINA.</b>			
ABS	CONC. ADIC	CONC. REC	% RECOBRO
0.5682	20.2800	21.0526	103.8098
0.5547	20.2800	20.5451	101.3073
0.5532	20.2800	20.4887	101.0292
0.5554	20.2800	20.5714	101.4370
0.5539	20.2800	20.5150	101.1590
0.5574	20.2800	20.6466	101.8078
<b>PROMEDIO</b>	20.2800	20.6346	101.7485
<b>DS</b>	0.0000	0.2358	1.1625
<b>CV</b>	0.0000	1.1425	1.1425

<b>TABLA 18. Resultados de la exactitud y repetibilidad de GLIBENCLAMIDA.</b>			
ABS	CONC. ADIC	CONC. REC	% RECOBRO
0.2740	30.3000	30.4382	100.4560
0.2799	30.3000	31.0793	102.5721
0.2741	30.3000	30.4490	100.4919
0.2654	30.3000	29.5036	97.3716
0.2764	30.3000	30.6990	101.3168
0.2753	30.3000	30.5794	100.9223
<b>PROMEDIO</b>	30.3000	30.4338	100.4417
<b>DS</b>	0.0000	0.5815	1.9191
<b>CV</b>	0.0000	1.9107	1.9107

El cálculo de estos parámetros se realizó con los mismos datos de % de recobro para los 2 fármacos de estudio de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013, el criterio establecido a cumplir es que el coeficiente de variación (CV) debe ser menor a 15%, con lo que se comprobaría que la dispersión de los datos obtenidos experimentalmente son lo suficientemente cercanos al valor del 100% de la concentración aceptada, asumiendo así que serán obtenidos en posteriores ensayos bajo las mismas condiciones.

### 8.2.3 Linealidad.

TABLA 19. Resultados de la curva patrón de INDOMETACINA.			
REPETICIÓN	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN ADICIONADA (µg/mL)	CONCENTRACIÓN RECUPERADA (µg/mL)
1	0.4358	16.0736	16.2024
	0.497	18.0828	18.1739
	0.5439	20.0920	19.6846
	0.6244	22.1012	22.2777
	0.6808	24.1104	24.0945
2	0.4308	16.0736	16.0414
	0.4932	18.0828	18.0514
	0.5453	20.0920	19.7297
	0.6252	22.1012	22.3035
	0.6845	24.1104	24.2137
3	0.4334	16.0736	16.1251
	0.5039	18.0828	18.3961
	0.5468	20.0920	19.7780
	0.6213	22.1012	22.1779
	0.6819	24.1104	24.1299

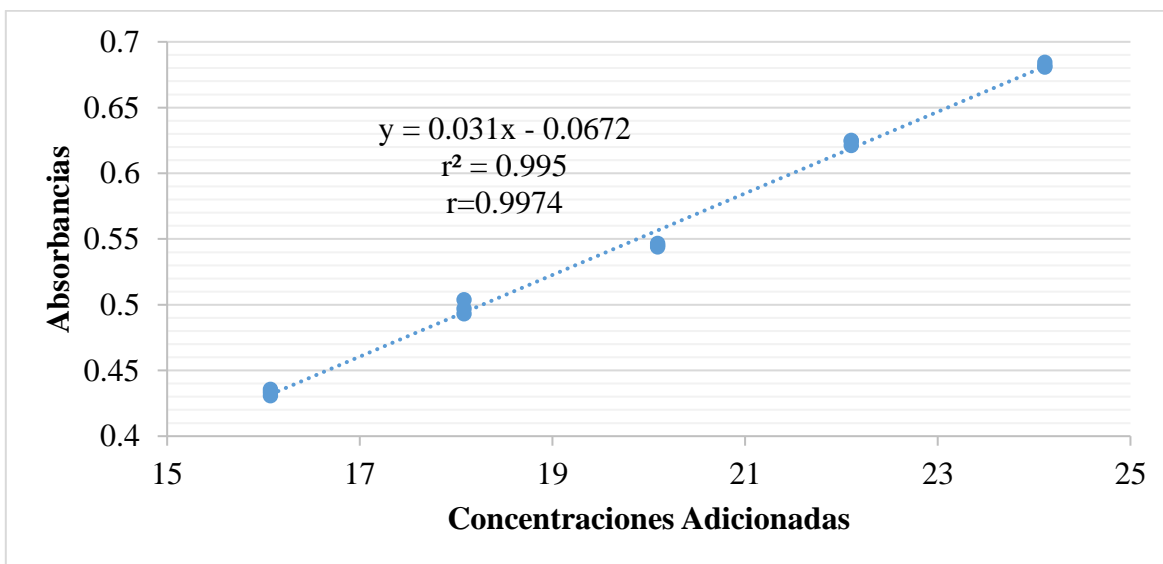
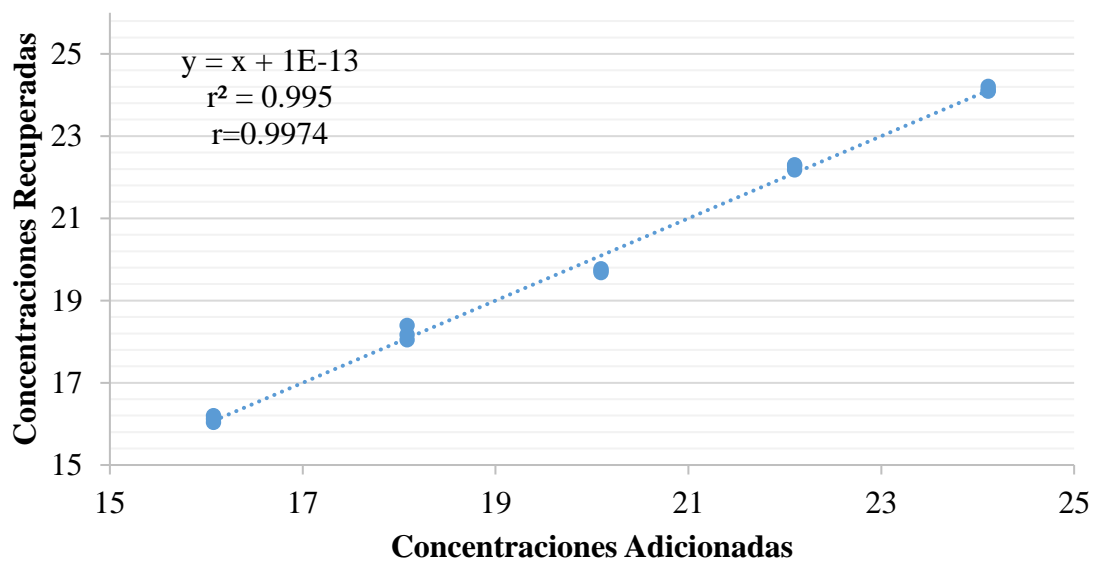


FIGURA 17. Curva patrón para la cuantificación de INDOMETACINA.

PENDIENTE (m)	ORDENADA AL ORIGEN (b)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)
0.031	-0.0672	0.9974



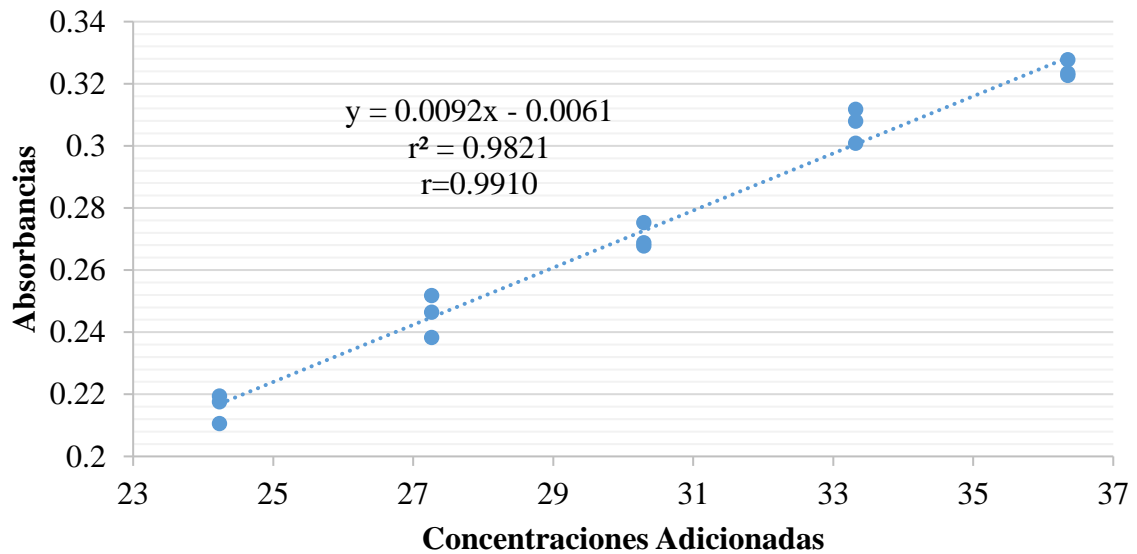
**FIGURA 18.** Curva de Concentración Adicionada vs. Concentración Recuperada de INDOMETACINA.

**TABLA 20.** Análisis estadístico de las concentraciones recuperadas de INDOMETACINA.

CONC. RECUPERADA 1 (µg/mL)	CONC. RECUPERADA 2 (µg/mL)	CONC. RECUPERADA 3 (µg/mL)	$\bar{X}$ (µg/mL)	DS	CV (%)
16.2024	16.0414	16.1251	16.1230	0.0806	0.4996
18.1739	18.0514	18.3961	18.2071	0.1747	0.9597
19.6846	19.7297	19.7780	19.7308	0.0467	0.2368
22.2777	22.3035	22.1779	22.2530	0.0664	0.2982
24.0945	24.2137	24.1299	24.1460	0.0612	0.2535

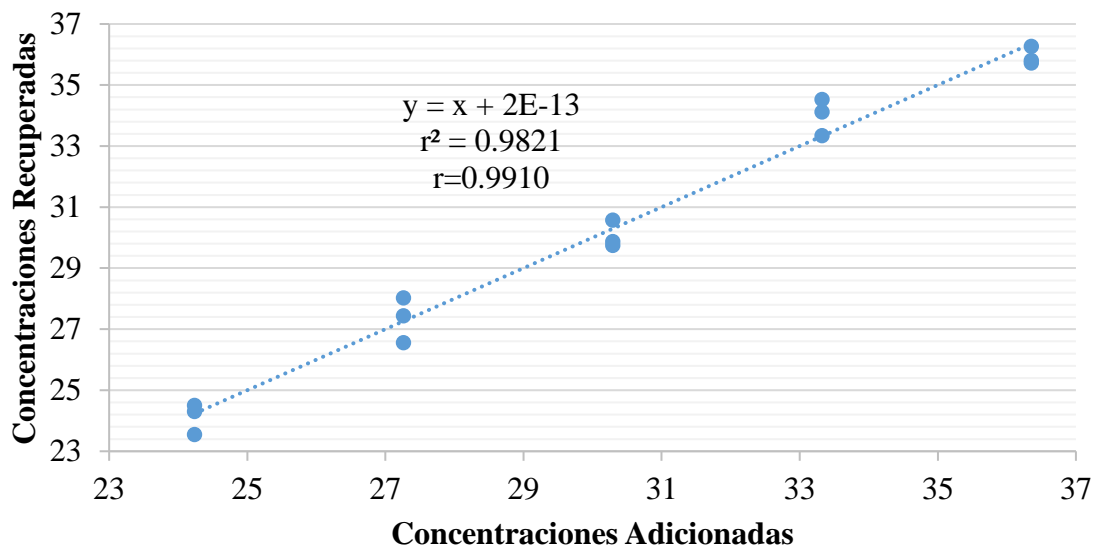
**TABLA 21.** Resultados de la curva patrón de GLIBENCLAMIDA.

REPETICIÓN	ABSORBANCIA	CONCENTRACIÓN ADICIONADA (µg/mL)	CONCENTRACIÓN RECUPERADA (µg/mL)
1	0.2106	24.2352	23.5484
	0.2464	27.2646	27.4388
	0.2677	30.2940	29.7535
	0.3079	33.3234	34.1221
	0.3234	36.3528	35.8065
2	0.2194	24.2352	24.5047
	0.2518	27.2646	28.0257
	0.2688	30.2940	29.8731
	0.3117	33.3234	34.5351
	0.3277	36.3528	36.2738
3	0.2176	24.2352	24.3091
	0.2383	27.2646	26.5586
	0.2753	30.2940	30.5794
	0.3008	33.3234	33.3506
	0.3227	36.3528	35.7305



**FIGURA 19.** Curva patrón para la cuantificación de GLIBENCLAMIDA.

PENDIENTE (m)	ORDENADA AL ORIGEN (b)	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN (r)
0.0092	-0.0061	0.9910



**FIGURA 20.** Curva de Concentración Adicionada vs. Concentración Recuperada de GLIBENCLAMIDA.

**TABLA 22.** Análisis estadístico de las concentraciones recuperadas de GLIBENCLAMIDA.

CONC. RECUPERADA 1 (µg/mL)	CONC. RECUPERADA 2 (µg/mL)	CONC. RECUPERADA 3 (µg/mL)	$\bar{X}$ (µg/mL)	DS	CV (%)
23.5484	24.5047	24.3091	24.1207	0.5052	2.0945
27.4388	28.0257	26.5586	27.3410	0.7384	2.7007
29.7535	29.8731	30.5794	30.0687	0.4463	1.4844
34.1221	34.5351	33.3506	34.0026	0.6012	1.7682
35.8065	36.2738	35.7305	35.9370	0.2942	0.8187

Se consideraron los mismos criterios de regresión lineal para los 2 fármacos, tomando en cuenta el coeficiente de variación (CV), coeficiente de correlación (r) y pendiente (m). En las **FIGURAS 13** y **14** se observa la curva y los valores de la regresión lineal para la Indometacina, en tanto que en las **FIGURAS 17** y **18** se observa lo mismo para la Glibenclámda. Para ambos fármacos se satisfacen las condiciones de linealidad pues se cumplen con los criterios establecidos de  $r \geq 99$ , un  $CV < 15\%$  y una  $m \neq 0$  en la curva respuesta VS concentración adicionada o  $m \neq 1$  en la curva concentración recuperada VS concentración adicionada. Cumplir con estos criterios significa que la variabilidad de la respuesta con respecto a la media arroja datos confiables.

### 8.2.4 Precisión intermedia.

<b>TABLA 23.</b> Concentraciones de INDOMETACINA obtenidas del 100% por analista y día.					
CONCENTRACIÓN 100% (30 µg)		DÍA			
		1			2
ANALISTA	1	20.1968			20.1163
		19.9616			20.0293
		20.0132			20.1485
		19.9939			19.9294
		19.8811			20.1324
		20.1839			20.0905
	2	19.9423			20.0712
		20.0164			20.0841
		19.9778			20.0132
		19.9488			20.1066
		19.9520			20.1324
		19.9810			19.8940

Ho: No hay variación entre analistas VERDADERO  
 Ho: No hay variación entre días VERDADERO  
 Ho: No hay interacción VERDADERO

<b>TABLA 24.</b> Análisis de varianza de 2 factores de los resultados de Glibenclamida.					
FUENTE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F <sub>calculada</sub>	F <sub>tablas</sub>
Analistas	0.0129	1	0.01294	1.6741	5.7498
Días	0.0204	1	0.02036	2.6340	0.1739
Interacción	0.0030	1	0.00298	0.3853	-
Error	0.1546	20	0.00773	-	-
Total	0.1909	23	-	-	-

**TABLA 25.** Concentraciones de GLIBENCLAMIDA obtenidas del 100% por analista y día.

CONCENTRACIÓN 100% (30 µg)		DÍA	
		1	2
ANALISTA	1	32.7963	32.4051
		32.8181	32.6659
		32.4595	32.8615
		32.4486	32.6116
		32.7529	32.6768
		32.5464	32.8615
	2	32.9485	31.1771
		33.4266	32.3725
		33.3832	32.7203
		33.0572	33.3506
		32.9702	33.0680
		32.7094	32.2856

Ho: No hay variación entre analistas VERDADERO  
 Ho: No hay variación entre días VERDADERO  
 Ho: No hay interacción VERDADERO

**TABLA 26.** Análisis de varianza de 2 factores de los resultados de GLIBENCLAMIDA.

FUENTE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	MEDIA DE CUADRADOS	F <sub>calculada</sub>	F <sub>tablas</sub>
Analistas	0.1020	1	0.1020	0.5702	5.7498
Días	0.4429	1	0.4429	2.4746	0.1739
Interacción	0.5959	1	0.5959	3.3299	-
Error	3.5791	20	0.1790	-	-
Total	4.7199	23	-	-	-

Se plantearon 3 hipótesis nulas que resultaron verdaderas, lo cual representa que no hay diferencia significativa entre los datos que se obtengan si se realiza el método un día u otro, por un analista u otro, confirmándose que entre analista y día no hay influencia recíproca que modifique la aceptabilidad de los datos obtenidos. Para verificar el cumplimiento de las hipótesis propuestas se realizó un estadígrafo de Fisher (**TABLA 13** para Indometacina y **TABLA 18** para Glibenclamida) donde con un 95% de confianza los valores de F<sub>calculada</sub> se encontraron dentro del intervalo de F<sub>tablas</sub>.



### 8.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

#### 8.3.1 Proteínas en plasma de rata.

<b>TABLA 27. Cantidad de proteínas en plasma de rata.</b>		
<b>ABS</b>	<b>mg/mL</b>	<b>g/100 mL</b>
0.2977	86.0433	8.6043
0.3060	88.9393	8.8939
0.3048	88.5206	8.8521
0.3001	86.8807	8.6881
0.2989	86.4620	8.6462
0.3050	88.5904	8.8590
0.3020	87.5436	8.7544
0.2933	84.5080	8.4508
0.3026	87.7530	8.7753
0.3007	87.0900	8.7090
<b>PROMEDIO</b>	87.2331	8.7233
<b>DS</b>	1.3482	0.1348
<b>CV</b>	1.5455	1.5455

En los datos obtenidos en la cuantificación de proteínas podemos observar en la **TABLA 27** que la concentración de proteínas es de 8.7233 g/100 mL en plasma de rata, cuyo intervalo de concentración normal de proteínas oscila entre 5.5 y 8 g/100 mL.<sup>27</sup> Lo cual demuestra que la concentración en plasma está ligeramente por encima del límite superior, sin embargo no es significativa esa diferencia ya que dentro de las proteínas cuantificadas no solo se incluye la albúmina, sino también otras como las globulinas y cuya concentración también es variable, afectando al resultado obtenido.<sup>37</sup>

### 8.3.2 Proteínas en solución de esterasa.

<b>TABLA 28. Cantidad de proteínas en solución de esterasa.</b>		
<b>ABS</b>	<b>mg/mL</b>	<b>g/100 mL</b>
0.1858	469.9930	46.9993
0.1821	457.0830	45.7083
0.1801	450.1047	45.0105
0.1844	465.1082	46.5108
0.1829	459.8744	45.9874
0.1826	458.8276	45.8828
0.1820	456.7341	45.6734
0.1803	450.8025	45.0803
0.1857	469.6441	46.9644
0.1830	460.2233	46.0223
<b>PROMEDIO</b>	459.8395	45.9839
<b>DS</b>	6.8462	0.6846
<b>CV</b>	1.4888	1.4888

Para la cuantificación de proteínas en solución de esterasa en la **TABLA 28** encontramos que el promedio general de la concentración proteínas es de 45.9839 g/100 mL que es mayor a 32.68 g/100 mL encontrados en un previo estudio de farmacocinética en solución de esterasa. Esto puede deberse a que la preparación de la stock de las muestras tuvo que prepararse a una concentración que fuera legible dentro del margen de absorbancias aceptable. Además la pureza proteica de polvo es del 91 % lo que significa que aproximadamente un 9 % de polvo no son las enzimas esterases y cabe la posibilidad que se cuantificaran en las lecturas espectrofotométricas, el proveedor no especifica de que naturaleza sea ese 9 % de polvo. De manera que lo anterior acercaría el resultado de proteínas en solución de esterasa al previamente encontrado.<sup>38</sup>

Haciendo una comparación de resultados es muy superior la cantidad de proteínas en solución de esterasa sobre la cantidad de proteínas en plasmas, existiendo una diferencia de 37.2606 g/100 mL entre ambas. Esto se debe a que el plasma de rata cuenta con una cantidad fija por fisiología y la solución de esterasa es ajustable a los requerimientos del estudio.

En cuanto al contenido de proteínas en plasma de rata y solución de esterasa no existe diferencia significativa entre los resultados obtenidos con el previo estudio de Evaluación Biofarmacéutica del Ibuprofenato de Ibuprofeno citado en las referencias y durante el desarrollo de la presente investigación.

## 8.4 CINÉTICA DE HIDRÓLISIS.

### 8.4.1 Indometacina en plasma de rata.

**TABLA 29.** Hidrólisis de INDOMETACINA en plasma de rata a la concentración de 5E-05 M.

TIEMPO (min)	M	M	M	PROMEDIO	DS	CV
0	5.5866E-05	5.5866E-05	5.5866E-05	5.5866E-05	0.0000	0.0000
10	4.9180E-05	4.8495E-05	4.9613E-05	4.9096E-05	5.6339E-07	1.1475
20	4.8279E-05	5.4604E-05	4.8856E-05	5.0580E-05	3.4974E-06	6.9147
30	4.9468E-05	4.9649E-05	4.9793E-05	4.9637E-05	1.6252E-07	0.3274
40	4.8639E-05	5.1865E-05	5.2712E-05	5.1072E-05	2.1491E-06	4.2079
50	4.8369E-05	4.7648E-05	4.7270E-05	4.7762E-05	5.5847E-07	1.1693
60	4.6369E-05	5.1307E-05	5.0730E-05	4.9468E-05	2.6998E-06	5.4577
90	4.5720E-05	4.8207E-05	4.8567E-05	4.7498E-05	1.5504E-06	3.2641

DATO	ORDEN CERO	ORDEN UNO
k	6.2375E-05 mol/L	1.22274E-03 mol/L
r <sup>2</sup>	0.3486	0.3507

K <sub>m</sub>	7.5324E+07 mol/L
V <sub>máx</sub>	1.0760E-05 mol/L*min

En la **TABLA 29** para la concentración de 5E-05 M de acuerdo al coeficiente de determinación aplicado a las 3 repeticiones de concentraciones con respecto al tiempo, el modelo se ajusta más a un modelo de cinética **ORDEN UNO**, siendo que para  $r^2$   $0.3507 > 0.3486$ . Las constantes de velocidad de reacción indican que a 37.5 °C la reacción se lleva más rápido siguiendo la cinética de orden uno siendo que  $1.22274E-03 \text{ mol/L} > 6.2375E-05 \text{ mol/L}$ . La K<sub>m</sub> tiene un valor grande, lo que se traduce en baja afinidad de la enzima por el sustrato.

**TABLA 30.** Hidrólisis de INDOMETACINA en plasma de rata a la concentración de 1E-04 M.

TIEMPO (min)	M	M	M	PROMEDIO	DS	CV
0	1.1173E-04	1.1173E-04	1.1173E-04	1.1173E-04	0.0000	0.0000
10	8.9944E-05	9.0593E-05	1.1676E-04	9.9099E-05	1.5298E-05	15.4373
20	1.1348E-04	1.0943E-04	1.0624E-04	1.0971E-04	3.6309E-06	3.3094
30	1.0822E-04	1.0624E-04	1.0497E-04	1.0648E-04	1.6352E-06	1.5358
40	1.0795E-04	1.0998E-04	1.0930E-04	1.0908E-04	1.0362E-06	0.9500
50	1.1097E-04	1.0699E-04	1.1617E-04	1.1138E-04	4.5996E-06	4.1298
60	1.0953E-04	1.0575E-04	1.0485E-04	1.0671E-04	2.4862E-06	2.3299
90	1.0890E-04	1.1276E-04	1.0317E-04	1.0828E-04	4.8241E-06	4.4553

DATO	ORDEN CERO	ORDEN UNO
k	1.96215E-05 mol/L	2.2948E-04 mol/L
r <sup>2</sup>	0.0073	0.0105

K <sub>m</sub>	3.2467E-05 mol/L
V <sub>máx</sub>	1.3422E+08 mol/L*min

En la **TABLA 30** para la concentración de 1E-04 M de acuerdo al coeficiente de determinación aplicado a las 3 repeticiones de concentraciones con respecto al tiempo, el modelo se ajusta más a un modelo de cinética **ORDEN UNO**, siendo que para  $r^2$   $0.0105 > 0.0073$ . Las constantes de velocidad de reacción indican que a 37.5 °C la reacción se lleva más rápido siguiendo la cinética de orden uno siendo que  $2.2948E-04 \text{ mol/L} > 1.96215E-05 \text{ mol/L}$ . La K<sub>m</sub> tiene un valor pequeño, que significa una alta afinidad de la enzima por el sustrato.

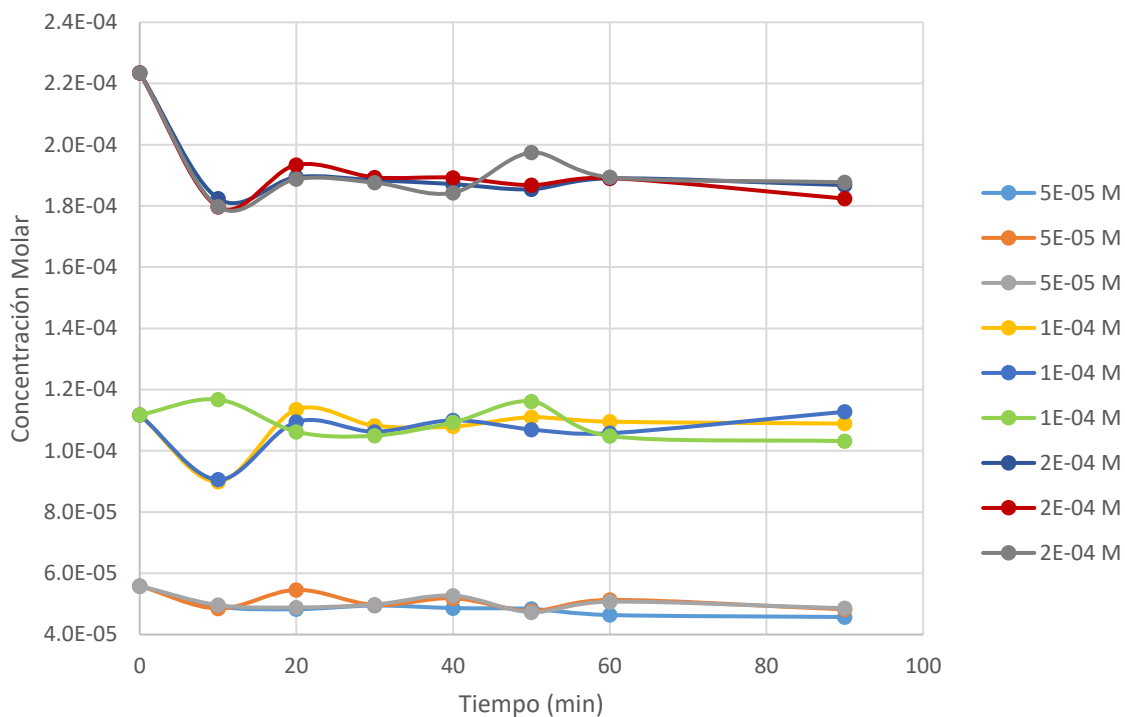
**TABLA 31.** Hidrólisis de INDOMETACINA en plasma de rata a la concentración de 2E-04 M.

TIEMPO (min)	M	M	M	PROMEDIO	DS	CV
0	2.2346E-04	2.2346E-04	2.2346E-04	2.2346E-04	0.0000	0.0000
10	1.8245E-04	1.7969E-04	1.7982E-04	1.8065E-04	1.5568E-06	0.8618
20	1.8940E-04	1.9340E-04	1.8879E-04	1.9053E-04	2.5055E-06	1.3150
30	1.8841E-04	1.8935E-04	1.8762E-04	1.8846E-04	8.6602E-07	0.4595
40	1.8713E-04	1.8924E-04	1.8430E-04	1.8689E-04	2.4777E-06	1.3257
50	1.8544E-04	1.8679E-04	1.9746E-04	1.8990E-04	6.5845E-06	3.4674
60	1.8901E-04	1.8912E-04	1.8937E-04	1.8916E-04	1.8496E-07	0.0978
90	1.8681E-04	1.8239E-04	1.8776E-04	1.8566E-04	2.8649E-06	1.5431

DATO	ORDEN CERO	ORDEN UNO
k	2.10349E-07 mol/L	1.01736E-03 mol/L
r <sup>2</sup>	0.2095	0.2016

K <sub>m</sub>	2.9851E+07 mol/L
V <sub>máx</sub>	3.3154E-05 mol/L*min

En la **TABLA 31** para la concentración de 2E-04 M de acuerdo al coeficiente de determinación aplicado a las 3 repeticiones de concentraciones con respecto al tiempo, el modelo se ajusta más a un modelo de cinética **ORDEN CERO**, siendo que para  $r^2$   $0.2095 > 0.2016$ . Las constantes de velocidad de reacción indican que a 37.5 °C la reacción se lleva más rápido siguiendo la cinética de orden uno siendo que  $1.01736E-03 \text{ mol/L} > 2.10349E-07 \text{ mol/L}$ . La K<sub>m</sub> tiene un valor grande, lo que se traduce en baja afinidad de la enzima por el sustrato.



**FIGURA 21.** Hidrólisis enzimática de Indometacina en plasma de rata.

Se observa en la **FIGURA 21** la variación de las 3 concentraciones empleadas en el estudio con sus respectivas repeticiones de la Indometacina con respecto al tiempo, observándose que hay un mayor decrecimiento a la concentración de 2E-04 M lo cual podría deberse a que existe mayor actividad enzimática conforme mayor sea la concentración. Existen también algunos puntos muy separados a los tiempos de 10 min para la concentración de 1E-04 M, a los 50 min de la misma concentración y a los 50 min de la concentración de 2E-04 M que pueden deberse al error de la preparación de dichas muestras.

#### 8.4.2 Indometacina en solución de esterasa.

**TABLA 32.** Hidrólisis de INDOMETACINA en sln. de esterasa a la concentración de 5E-05 M.

TIEMPO (min)	M	M	M	PROMEDIO	DS	CV
0	5.5866E-05	5.5866E-05	5.5866E-05	5.5866E-05	0.0000	0.0000
10	5.8104E-05	5.7693E-05	5.9306E-05	5.8367E-05	8.3852E-07	1.4366
20	5.7677E-05	5.9595E-05	5.7221E-05	5.8164E-05	1.2601E-06	2.1664
30	5.6947E-05	5.5668E-05	5.7023E-05	5.6546E-05	7.6117E-07	1.3461
40	5.6840E-05	5.8819E-05	5.8454E-05	5.8038E-05	1.0530E-06	1.8144
50	5.8758E-05	5.7023E-05	5.8621E-05	5.8134E-05	9.6479E-07	1.6596
60	5.6216E-05	5.7495E-05	5.8073E-05	5.7261E-05	9.5031E-07	1.6596
90	5.8743E-05	5.6764E-05	5.7373E-05	5.7627E-05	1.0136E-06	1.7588

DATO	ORDEN CERO	ORDEN UNO
k	7.3106E-06 mol/L	1.2978E-04 mol/L
r <sup>2</sup>	0.0315	0.0328

K <sub>m</sub>	4.5927E-04 mol/L
V <sub>máx</sub>	1.6777E+07 mol/L*min

En la **TABLA 32** para la concentración de 5E-05 M de acuerdo al coeficiente de determinación aplicado a las 3 repeticiones de concentraciones con respecto al tiempo, el modelo se ajusta más a un modelo de cinética **ORDEN UNO**, siendo que para r<sup>2</sup> 0.0328 > 0.0315. Las constantes de velocidad de reacción indican que a 37.5 °C la reacción se lleva más rápido siguiendo la cinética de orden uno siendo que 1.2978E-04 mol/L > 7.3106E-06 mol/L. La K<sub>m</sub> tiene un valor pequeño, que significa una alta afinidad de la enzima por el sustrato.



**TABLA 33.** Hidrólisis de INDOMETACINA en sln. de esterasa a la concentración de 1E-04 M.

TIEMPO (min)	M	M	M	PROMEDIO	DS	CV
0	1.1173E-04	1.1173E-04	1.1173E-04	1.1173E-04	0.0000	0.0000
10	8.8183E-05	8.9781E-05	9.0801E-05	8.9588E-05	1.3197E-06	1.4731
20	9.0710E-05	9.2004E-05	8.9614E-05	9.0776E-05	1.1963E-06	1.3179
30	9.2719E-05	9.1319E-05	9.1227E-05	9.1755E-05	8.3617E-07	0.9113
40	9.2156E-05	9.2460E-05	9.2582E-05	9.2399E-05	2.1954E-07	0.2376
50	9.2339E-05	8.9477E-05	9.0908E-05	9.0908E-05	1.4309E-06	1.5740
60	9.1973E-05	9.2034E-05	9.0755E-05	9.1588E-05	7.2131E-07	0.7876
90	9.3480E-05	9.2978E-05	9.2080E-05	9.2846E-05	7.0949E-07	0.7642

DATO	ORDEN CERO	ORDEN UNO
k	1.055E-04 mol/L	1.01851E-03 mol/L
r <sup>2</sup>	0.1775	0.1680

K <sub>m</sub>	1.8288E-06 mol/L
V <sub>máx</sub>	5.3687E+08 mol/L*min

En la **TABLA 33** para la concentración de 1E-04 M de acuerdo al coeficiente de determinación aplicado a las 3 repeticiones de concentraciones con respecto al tiempo, el modelo se ajusta más a un modelo de cinética **ORDEN CERO**, siendo que para  $r^2$   $0.1775 > 0.1680$ . Las constantes de velocidad de reacción indican que a 37.5 °C la reacción se lleva más rápido siguiendo la cinética de orden uno siendo que  $1.01851E-03 \text{ mol/L} > 1.0550E-04 \text{ mol/L}$ . La K<sub>m</sub> tiene un valor pequeño, que significa una alta afinidad de la enzima por el sustrato.

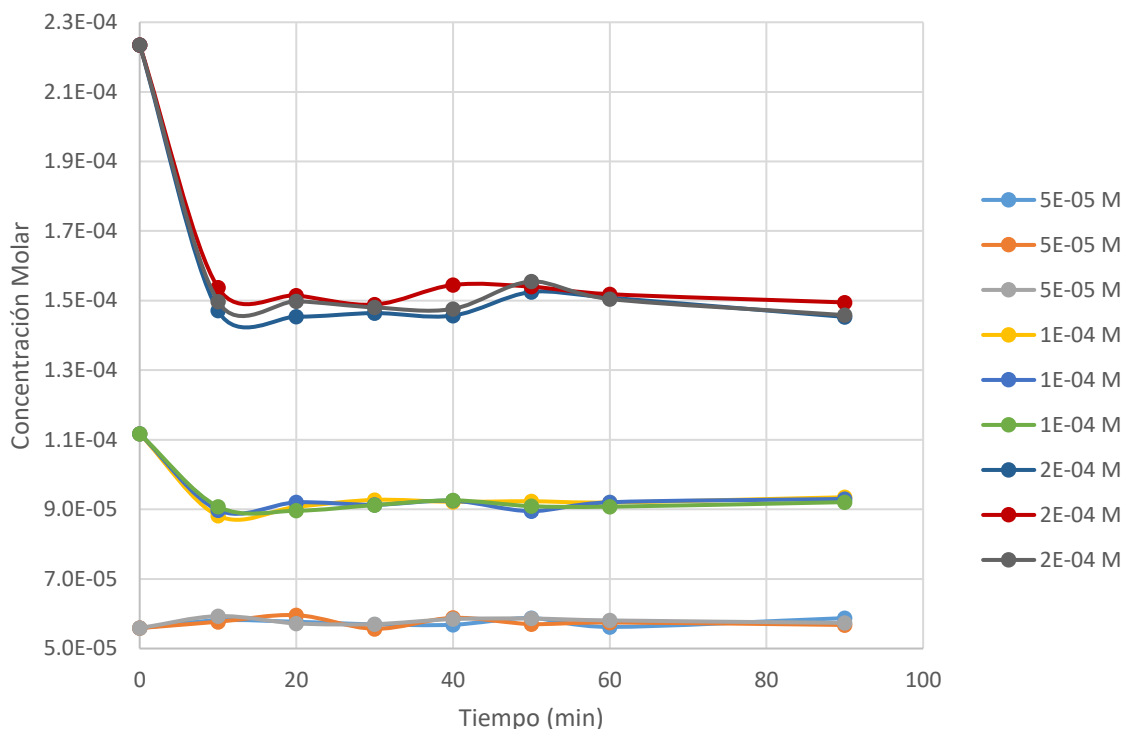
**TABLA 34.** Hidrólisis de INDOMETACINA en sln. de esterasa a la concentración de 2E-04 M.

TIEMPO (min)	M	M	M	PROMEDIO	DS	CV
0	2.2346E-04	2.2346E-04	2.2346E-04	2.2346E-04	0.0000	0.0000
10	1.4709E-04	1.5372E-04	1.4976E-04	1.5019E-04	3.3319E-06	2.2185
20	1.4540E-04	1.5148E-04	1.4982E-04	1.4890E-04	3.1393E-06	2.1083
30	1.4641E-04	1.4886E-04	1.4804E-04	1.4777E-04	1.2473E-06	0.8441
40	1.4569E-04	1.5449E-04	1.4761E-04	1.4927E-04	4.6266E-06	3.0996
50	1.5250E-04	1.5400E-04	1.5550E-04	1.5400E-04	1.4994E-06	0.9736
60	1.5084E-04	1.5184E-04	1.5046E-04	1.5105E-04	7.1567E-07	0.4738
90	1.4531E-04	1.4947E-04	1.4583E-04	1.4687E-04	2.2647E-06	1.5420

DATO	ORDEN CERO	ORDEN UNO
k	4.734E-04 mol/L	2.5838E-03 mol/L
r <sup>2</sup>	0.2763	0.2768

K <sub>m</sub>	1.8022E-07 mol/L
V <sub>máx</sub>	2.1475E+09 mol/L*min

En la **TABLA 34** para la concentración de 2E-04 M de acuerdo al coeficiente de determinación aplicado a las 3 repeticiones de concentraciones con respecto al tiempo, el modelo se ajusta más a un modelo de cinética **ORDEN UNO**, siendo que para  $r^2$   $0.2768 > 0.2763$ . Las constantes de velocidad de reacción indican que a 37.5 °C la reacción se lleva más rápido siguiendo la cinética de orden uno siendo que  $2.5838E-03 \text{ mol/L} > 4.7340E-04 \text{ mol/L}$ . La K<sub>m</sub> tiene un valor pequeño, que significa una alta afinidad de la enzima por el sustrato.



**FIGURA 22.** Hidrólisis enzimática de Indometacina en solución de esterasa

Se observa en la **FIGURA 22** la variación de las 3 concentraciones empleadas en el estudio con sus respectivas repeticiones de la Indometacina con respecto al tiempo, observándose que hay un mayor decrecimiento a la concentración de 2E-04 lo cual podría deberse a que existe mayor actividad enzimática conforme mayor sea la concentración. Existen puntos por encima de la concentración inicial para concentración de 5E-05 que pueden deberse al momento de la toma de alícuotas un error de pipeteo y a la actividad de la enzima a esa concentración.

### 8.4.3 Glibenclamida en plasma de rata.

**TABLA 35.** Hidrólisis de GLIBENCLAMIDA en plasma de rata a la concentración de 5E-05 M.

TIEMPO (min)	M	M	M	PROMEDIO	DS	CV
0	5.0607E-05	5.0607E-05	5.0607E-05	5.0607E-05	0.0000	0.0000
10	5.0167E-05	4.3038E-05	3.8594E-05	4.3933E-05	5.8385E-06	13.2895
20	5.2544E-05	5.0519E-05	4.2158E-05	4.8407E-05	5.5055E-06	11.3735
30	3.6129E-05	3.5161E-05	3.9518E-05	3.6936E-05	2.2876E-06	6.1935
40	4.0354E-05	3.8065E-05	3.8814E-05	3.9078E-05	1.1668E-06	2.9858
50	5.4656E-05	5.6856E-05	5.1399E-05	5.4304E-05	2.7454E-06	5.0556
60	5.9409E-05	5.1707E-05	5.0651E-05	5.3922E-05	4.7804E-06	8.8653
90	4.0266E-05	4.1630E-05	5.0343E-05	4.4080E-05	5.4671E-06	12.4028

DATO	ORDEN CERO	ORDEN UNO
k	1.2413E-05 mol/L	2.2889E-04 mol/L
r <sup>2</sup>	0.0024	0.0017

K <sub>m</sub>	2.2155E-05 mol/L
V <sub>máx</sub>	1.3422E+08 mol/L*min

En la **TABLA 35** para la concentración de 5E-05 M de acuerdo al coeficiente de determinación aplicado a las 3 repeticiones de concentraciones con respecto al tiempo, el modelo se ajusta más a un modelo de cinética **ORDEN CERO**, siendo que para  $r^2$   $0.0024 > 0.0017$ . Las constantes de velocidad de reacción indican que a 37.5 °C la reacción se lleva más rápido siguiendo la cinética de orden uno siendo que  $2.2889E-04 \text{ mol/L} > 1.2413E-05 \text{ mol/L}$ . La K<sub>m</sub> tiene un valor pequeño, que significa una alta afinidad de la enzima por el sustrato.

**TABLA 36.** Hidrólisis de GLIBENCLAMIDA en plasma de rata a la concentración de 1E-04 M.

TIEMPO (min)	M	M	M	PROMEDIO	DS	CV
0	1.0121E-04	1.0121E-04	1.0121E-04	1.0121E-04	0.0000	0.0000
10	7.5471E-05	7.9519E-05	8.2996E-05	7.9329E-05	3.7662E-06	4.7475
20	8.1676E-05	8.0664E-05	7.8683E-05	8.0341E-05	1.5221E-06	1.8945
30	8.4756E-05	7.9563E-05	7.5515E-05	7.9945E-05	4.6325E-06	5.7946
40	8.5328E-05	8.4008E-05	8.1720E-05	8.3685E-05	1.8258E-06	2.1817
50	8.8717E-05	8.8409E-05	9.9498E-05	9.2208E-05	6.3155E-06	6.8492
60	8.2028E-05	9.0169E-05	8.6252E-05	8.6150E-05	4.0716E-06	4.7261
90	9.7826E-05	9.6726E-05	9.9674E-05	9.8075E-05	1.4899E-06	1.5192

DATO	ORDEN CERO	ORDEN UNO
k	7.8404E-05 mol/L	9.3811E-04 mol/L
r <sup>2</sup>	0.0630	0.0714

K <sub>m</sub>	3.9710E-06 mol/L
V <sub>máx</sub>	2.6844E+08 mol/L*min

En la **TABLA 36** para la concentración de 1E-04 M de acuerdo al coeficiente de determinación aplicado a las 3 repeticiones de concentraciones con respecto al tiempo, el modelo se ajusta más a un modelo de cinética **ORDEN UNO**, siendo que para  $r^2$   $0.0714 > 0.0630$ . Las constantes de velocidad de reacción indican que a 37.5 °C la reacción se lleva más rápido siguiendo la cinética de orden uno siendo que  $9.3811E-04 \text{ mol/L} > 7.8404E-05 \text{ mol/L}$ . La K<sub>m</sub> tiene un valor pequeño, que significa una alta afinidad de la enzima por el sustrato.

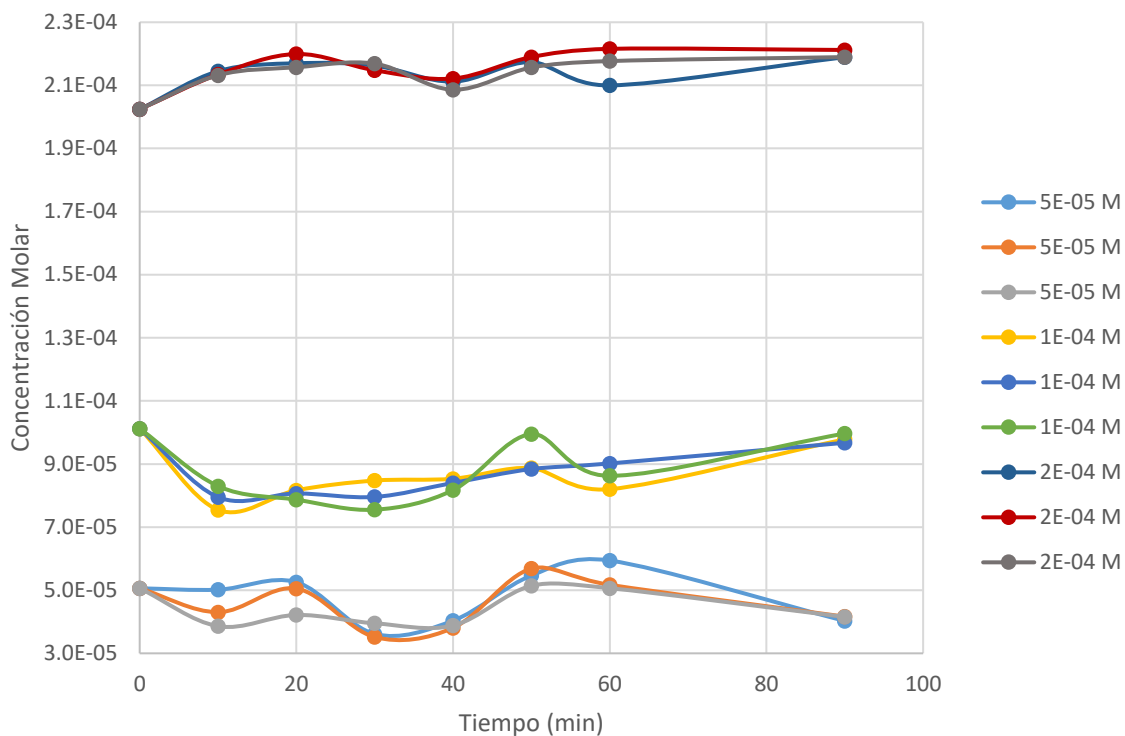
**TABLA 37.** Hidrólisis de GLIBENCLAMIDA en plasma de rata a la concentración de 2E-04 M.

TIEMPO (min)	M	M	M	PROMEDIO	DS	CV
0	2.0243E-04	2.0243E-04	2.0243E-04	2.0243E-04	0.0000	0.0000
10	2.1449E-04	2.1343E-04	2.1321E-04	2.1371E-04	6.8222E-07	0.3192
20	2.1700E-04	2.1994E-04	2.1573E-04	2.1756E-04	2.1606E-06	0.9931
30	2.1625E-04	2.1479E-04	2.1689E-04	2.1598E-04	1.0744E-06	0.4974
40	2.1119E-04	2.1215E-04	2.0863E-04	2.1066E-04	1.8187E-06	0.8633
50	2.1739E-04	2.1898E-04	2.1568E-04	2.1735E-04	1.6507E-06	0.7595
60	2.1000E-04	2.2157E-04	2.1770E-04	2.1642E-04	5.8914E-06	2.7222
90	2.1893E-04	2.2122E-04	2.1896E-04	2.1970E-04	1.3128E-06	0.5975

DATO	ORDEN CERO	ORDEN UNO
k	1.2643E-04 mol/L	5.9623E-04 mol/L
r <sup>2</sup>	0.3907	0.3886

K <sub>m</sub>	1.8744E-05 mol/L
V <sub>máx</sub>	8.9478E+07 mol/L*min

En la **TABLA 37** para la concentración de 2E-04 M de acuerdo al coeficiente de determinación aplicado a las 3 repeticiones de concentraciones con respecto al tiempo, el modelo se ajusta más a un modelo de cinética **ORDEN CERO**, siendo que para  $r^2$   $0.3907 > 0.3886$ . Las constantes de velocidad de reacción indican que a 37.5 °C la reacción se lleva más rápido siguiendo la cinética de orden uno siendo que  $2.5838E-03 \text{ mol/L} > 4.7340E-04 \text{ mol/L}$ . La K<sub>m</sub> tiene un valor pequeño, que significa una alta afinidad de la enzima por el sustrato.



**FIGURA 23.** Hidrólisis enzimática de Glibenclamida en plasma de rata.

Se observa en la **FIGURA 23** la variación de las 3 concentraciones empleadas en el estudio con sus respectivas repeticiones de la Glibenclamida con respecto al tiempo, hay una mayor variabilidad de los puntos de todas las gráficas y que existen puntos superiores a la concentración inicial, lo que puede deberse a un error de pipeteo o bien a que en plasma de rata se obtenga el metabolito M23 cuantificable cercano a la longitud de onda que la Glibenclamida o simplemente a la interferencia de algún componente en el plasma de rata.<sup>32</sup>

#### 8.4.4 Glibenclamida en solución de esterasa.

**TABLA 38.** Hidrólisis de GLIBENCLAMIDA en sln. de esterasa a la concentración de 5E-05 M.

TIEMPO (min)	M	M	M	PROMEDIO	DS	CV
0	6.9832E-05	6.9832E-05	6.9832E-05	6.9832E-05	0.0000	0.0000
10	4.1542E-05	4.1009E-05	4.1298E-05	4.1283E-05	2.6672E-07	0.6461
20	4.2333E-05	4.2348E-05	4.2425E-05	4.2369E-05	4.8933E-08	0.1155
30	4.1252E-05	4.1740E-05	4.1496E-05	4.1496E-05	2.4356E-07	0.5869
40	4.0537E-05	4.0735E-05	4.1968E-05	4.1080E-05	7.7534E-07	1.8874
50	4.5560E-05	4.4678E-05	4.3947E-05	4.4728E-05	8.0798E-07	1.8064
60	4.4449E-05	4.1313E-05	4.0841E-05	4.2201E-05	1.9609E-06	4.6466
90	4.3216E-05	4.3018E-05	4.3551E-05	4.3262E-05	2.6931E-07	0.6225

DATO	ORDEN CERO	ORDEN UNO
k	1.5531E-04 mol/L	2.73609E-03 mol/L
r <sup>2</sup>	0.2127	0.1964

K <sub>m</sub>	6.8077E-07 mol/L
V <sub>máx</sub>	5.3687E+08 mol/L*min

En la **TABLA 38** para la concentración de 5E-05 M de acuerdo al coeficiente de determinación aplicado a las 3 repeticiones de concentraciones con respecto al tiempo, el modelo se ajusta más a un modelo de cinética **ORDEN CERO**, siendo que para  $r^2$   $0.2127 > 0.1964$ . Las constantes de velocidad de reacción indican que a 37.5 °C la reacción se lleva más rápido siguiendo la cinética de orden uno siendo que  $2.73609E-03 \text{ mol/L} > 1.5531E-04 \text{ mol/L}$ . La K<sub>m</sub> tiene un valor pequeño, que significa una alta afinidad de la enzima por el sustrato.



**TABLA 39.** Hidrólisis de GLIBENCLAMIDA en sln. de esterasa a la concentración de 1E-04 M.

TIEMPO (min)	M	M	M	PROMEDIO	DS	CV
0	1.3966E-04	1.3966E-04	1.3966E-04	1.3966E-04	0.0000	0.0000
10	5.0340E-05	5.1010E-05	5.0599E-05	5.0650E-05	3.3776E-07	0.6669
20	5.0797E-05	5.1802E-05	4.8514E-05	5.0371E-05	1.6849E-06	3.3451
30	5.1497E-05	5.0492E-05	5.2456E-05	5.1482E-05	9.8193E-07	1.9073
40	4.9214E-05	4.9625E-05	4.9762E-05	4.9533E-05	2.8519E-07	0.5758
50	5.1908E-05	5.1604E-05	5.0492E-05	5.1335E-05	7.4517E-07	1.4516
60	4.9138E-05	4.8909E-05	4.8864E-05	4.8970E-05	1.4680E-07	0.2998
90	4.7646E-05	4.6824E-05	4.6976E-05	4.7149E-05	4.3732E-07	0.9275

DATO	ORDEN CERO	ORDEN UNO
k	5.9752E-04 mol/L	7.1367E-03 mol/L
r <sup>2</sup>	0.3008	0.3246

K <sub>m</sub>	1.3050E-07 mol/L
V <sub>máx</sub>	1.0737E+09 mol/L*min

En la **TABLA 39** para la concentración de 1E-04 M de acuerdo al coeficiente de determinación aplicado a las 3 repeticiones de concentraciones con respecto al tiempo, el modelo se ajusta más a un modelo de cinética **ORDEN UNO**, siendo que para  $r^2$   $0.3246 > 0.3008$ . Las constantes de velocidad de reacción indican que a 37.5 °C la reacción se lleva más rápido siguiendo la cinética de orden uno siendo que  $7.1367E-03 \text{ mol/L} > 5.9752E-04 \text{ mol/L}$ . La K<sub>m</sub> tiene un valor pequeño, que significa una alta afinidad de la enzima por el sustrato.

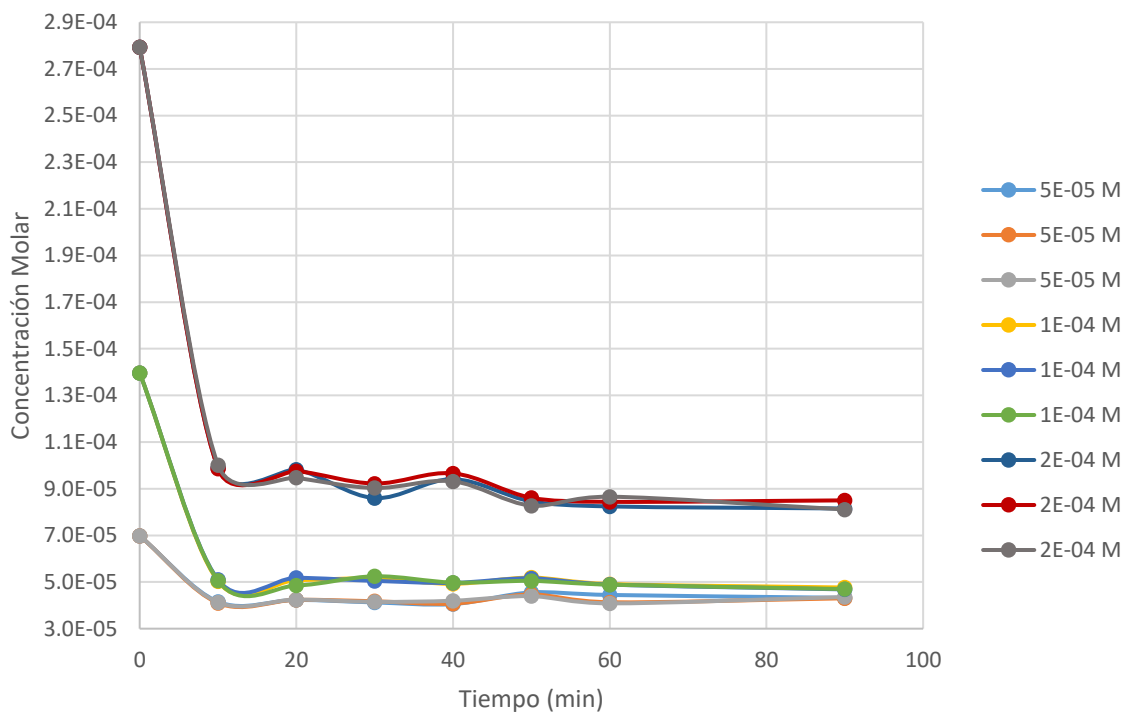
**TABLA 40.** Hidrólisis de GLIBENCLAMIDA en sln. de esterasa a la concentración de 2E-04 M.

TIEMPO (min)	M	M	M	PROMEDIO	DS	CV
0	2.7933E-04	2.7933E-04	2.7933E-04	2.7933E-04	0.0000	0.0000
10	9.8884E-05	9.8625E-05	1.0016E-04	9.9224E-05	8.2318E-07	0.8296
20	9.8199E-05	9.7575E-05	9.4713E-05	9.6829E-05	1.8588E-06	1.9197
30	8.6006E-05	9.2217E-05	9.0314E-05	8.9512E-05	3.1820E-06	3.5548
40	9.4089E-05	9.6601E-05	9.3176E-05	9.4622E-05	1.7736E-06	1.8744
50	8.4560E-05	8.6097E-05	8.2703E-05	8.4453E-05	1.6998E-06	2.0127
60	8.2414E-05	8.4377E-05	8.6569E-05	8.4453E-05	2.0789E-06	2.4616
90	8.1516E-05	8.5001E-05	8.1105E-05	8.2541E-05	2.1411E-06	2.5940

DATO	ORDEN CERO	ORDEN UNO
k	1.35186E-03 mol/L	8.91595E-03 mol/L
r <sup>2</sup>	0.3444	0.4085

K <sub>m</sub>	1.6668E+06 mol/L
V <sub>máx</sub>	6.5860E-05 mol/L*min

En la **TABLA 40** para la concentración de 2E-04 M de acuerdo al coeficiente de determinación aplicado a las 3 repeticiones de concentraciones con respecto al tiempo, el modelo se ajusta más a un modelo de cinética **ORDEN UNO**, siendo que para r<sup>2</sup> 0.4085 > 0.3444. Las constantes de velocidad de reacción indican que a 37.5 °C la reacción se lleva más rápido siguiendo la cinética de orden cero siendo que 8.91595E-03 mol/L > 1.35186E-03 mol/L. La K<sub>m</sub> tiene un valor grande, lo que se traduce en baja afinidad de la enzima por el sustrato.



**FIGURA 24.** Hidrólisis enzimática de Glibenclamida en solución de esterasa.

Se observa en la **FIGURA 24** la variación de las 3 concentraciones empleadas en el estudio con sus respectivas repeticiones de la Indometacina con respecto al tiempo, observándose que hay una disminución más amplia en todas las concentraciones, debido a que se consumió más reactivo en menos tiempo, lo cual se confirma puesto que las 3 concentraciones tienen las velocidades más altas en comparación con el resto ya sean de Indometacina o en plasma de rata. Es también que ocurre esto gracias a la actividad enzimática, aunque según la constante de Michaelis a la concentración de 2E-04.<sup>39, 40, 41.</sup>

**TABLA 41.** Resultados generales de la cinética de hidrólisis enzimática.

<b>INDOMETACINA EN PLASMA DE RATA.</b>			
<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>ORDEN DE REACCIÓN</b>	<b>VELOCIDAD MÁXIMA (<math>V_{m\acute{a}x}</math>)</b>	<b>AFINIDAD A PROTEÍNAS (<math>K_m</math>)</b>
5E-05	UNO	BAJA	ALTA
1E-04	UNO	ALTA	BAJA
2E-04	CERO	BAJA	ALTA
<b>INDOMETACINA EN SOLUCIÓN DE ESTERASA.</b>			
<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>ORDEN DE REACCIÓN</b>	<b>VELOCIDAD MÁXIMA (<math>V_{m\acute{a}x}</math>)</b>	<b>AFINIDAD A PROTEÍNAS (<math>K_m</math>)</b>
5E-05	UNO	ALTA	BAJA
1E-04	CERO	ALTA	BAJA
2E-04	UNO	ALTA	BAJA
<b>GLIBENCLAMIDA EN PLASMA DE RATA.</b>			
<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>ORDEN DE REACCIÓN</b>	<b>VELOCIDAD MÁXIMA (<math>V_{m\acute{a}x}</math>)</b>	<b>AFINIDAD A PROTEÍNAS (<math>K_m</math>)</b>
5E-05	UNO	ALTA	BAJA
1E-04	UNO	ALTA	BAJA
2E-04	CERO	ALTA	BAJA
<b>GLIBENCLAMIDA EN SOLUCIÓN DE ESTERASA.</b>			
<b>CONCENTRACIÓN</b>	<b>ORDEN DE REACCIÓN</b>	<b>VELOCIDAD MÁXIMA (<math>V_{m\acute{a}x}</math>)</b>	<b>AFINIDAD A PROTEÍNAS (<math>K_m</math>)</b>
5E-05	CERO	ALTA	BAJA
1E-04	UNO	ALTA	BAJA
2E-04	UNO	BAJA	ALTA

Existe una disminución de las concentraciones iniciales con respecto al tiempo en todas las concentraciones tanto en plasma de rata como en solución de esterasa lo que representa un orden de reacción uno, además de que todas las concentraciones en plasma de rata y en solución de esterasa son más eficientes en las velocidades de reacción a este orden. Dado lo anterior se lleva a cabo la conversión de sustrato en producto, lo cual significa que la enzima tiene un sitio activo sobre las moléculas de los fármacos y que sí ocurre la hidrólisis sobre los grupos amidas presentes en la estructura de los fármacos.

La  $V_{m\acute{a}x}$  independientemente ya sea alta o baja indica que a esa velocidad todas las condiciones son óptimas para que una enzima pueda catalizar una reacción.<sup>31</sup> Todas las reacciones en las concentraciones utilizadas para Indometacina y Glibenclamida en plasma de rata o solución de esterasa se encontraban debajo del valor de la  $V_{m\acute{a}x}$ . Este parámetro permite además estimar la cantidad de centros activos e indica que todos ellos ya se encuentran ocupados, es decir indica cuando toda la enzima se encuentra formando el complejo con el sustrato.<sup>42</sup>

Las concentraciones en las cuales se encontró una  $K_m$  grande significa una baja afinidad a la enzima y por lo tanto que una mayor concentración de sustrato es necesaria para saturar a la mitad de la enzima. De manera contraria ocurre para una  $K_m$  pequeña.

Los coeficientes de variación de las concentraciones son menores en solución de esterasa que en plasma de rata, tanto en Indometacina como en Glibenclamida y se encuentran debajo del criterio de variación del 15-25 % establecido por la NOM-177-SSA1-2013. Lo cual probablemente sucede por la presencia de mayores interferencias en plasma de rata.

La baja afinidad a proteínas permite que se lleve a cabo la reacción de hidrólisis, de acuerdo a la **TABLA 41** en plasma de rata para Indometacina a las concentraciones de 5E-05 M y 2E-04 M, y en solución de esterasa para Glibenclamida a la concentración de 2E-04 M, cuentan con alta afinidad a proteínas.

Los resultados obtenidos durante el proyecto permitieron modelar el comportamiento de la reacción enzimática de proteínas en plasma cuya importancia y utilidad radica en lo indicado en el punto *Cinética de hidrólisis enzimática*.

## 10. CONCLUSIONES.

Las 3 curvas patrón utilizadas para cuantificar a los fármacos no hidrolizados son lineales, por lo tanto, son confiables para interpolar resultados. Además, la metodología desarrollada es también selectiva, precisa y exacta, por lo que se considera validada.

Se comprobó que la concentración proteica (esterasas) influye en la precisión de los resultados, en la cantidad de sustrato hidrolizado y por ende en la velocidad de reacción, pero no así en la  $K_m$  o la  $V_{m\acute{a}x}$ , las reacciones siguen una cinética de ORDEN UNO y los fármacos con grupo amida tienen una alta afinidad a la enzima.

Se estandarizaron las condiciones para la hidrólisis de Indometacina y Glibenclamida, posiblemente funcional para otros fármacos que incluyan grupos amidas.

Lo anterior conduce a que el proyecto logró su objetivo, ya que se perfeccionó una técnica de evaluación de fármacos para estudios farmacocinéticos que conlleva una gran aportación científica fundamentada para el estudio, investigación y desarrollo de fármacos a nivel mundial, debido a que el proceso de biotransformación es un tema poco abordado en la divulgación farmacológica y muy relevante en temas de salud.

## 11. RECOMENDACIONES.

- La solución stock de esterasa muy diluida arroja resultados con mucha variabilidad en el contenido de proteínas por lo que es útil una concentración mínima de 10 mg/mL.
- Si se requiere puede utilizarse un efector positivo (sustancia que incrementa la afinidad de la enzima por el sustrato) donde la  $K_m$  indicó baja afinidad.
- Puede complementarse el estudio realizando una comparación de poblaciones utilizando herramientas estadísticas de Diseño Experimental.

## 12. REFERENCIAS.

1. Aiache JM. *Biofarmacia*. 2da Edición. México, D.F: Editorial El Manual Moderno; 1982. Pág 75.
2. Yoshida T, Fukamia T, Kurokawa T, Gotoha S, Odab A, Nakajima M. *Difference in substrate specificity of carboxylesterase and arylacetamide deacetylase between dogs and humans*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 2017 [Citado 31/01/2018]; 111 (2018): 167–176. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928098717305328?via%3Dihub>
3. Kodani SD, Barthélemy M, Kamita SG, Hammock B, Morisseau C. *Development of amide-based fluorescent probes for selective measurement of carboxylesterase 1 activity in tissue extracts*. Analytical Biochemistry. 2017 [Citado 31/01/2018]; 539 (2017): 81–89. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269717303998?via%3Dihub>
4. Lee CJ, Lee LH. & Lu CH. *Development and Evaluation of Drugs*. 2da Edición. USA, Florida: CRC PRESS. 2003. Pág 63.
5. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Donato MT. *Hepatocytes: in vitro pharmacology, toxicology and drug metabolism*. Animal Cell Technology: Products of Today, Prospects for Tomorrow. España, Valencia: Butterworth Heinemann; 1994. Pág 711-722.
6. Domenech Berrozpe J., Martínez Lanao J., Pla Delfina J.M. *Biofarmacia y Farmacocinética*. Vol. I: Biofarmacia. España, Madrid: Ed. Síntesis; 1998. Pág 20.
7. DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. *The price of innovation: new estimates of drug development costs*. Journal of Health Economics. 2002 [Citado 02/08/2018]; 22-28 (2): 151–185. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167629602001261?via%3Dihub>
8. Saldívar González F, Prieto Martínez FD, Medina Franco JL. *Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional*. Educación Química. 2016 [Citado 02/08/2018]; 28 (1): 51-58. Disponible en: <http://revistas.unam.mx/index.php/req/article/view/63892>
9. Panchagnula R., Sunil Thomas N. *Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research*. International Journal of Pharmaceutics. 2000 [Citado 21/02/2018]; 201 (2000): 131–150. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517300003446?via%3Dihub>



10. Sáenz Campos D. *Principios de Farmacología General y Administración de Fármacos*. 1ra Edición. Costa Rica, San José: Editorial de la Universidad de Costa Rica; 1993. Pág 57-58.
11. Hernández Chávez A. *Farmacología General: Una guía de estudio*. México, D.F: McGraw-Hill Education; 2014. Pág 59-70.
12. Lorenzo P, Moreno A, Cerro JC, Lizasoain I, Moro MA, Portolés A. et al. *Velázquez. Farmacología Básica y Clínica*. 18va. Edición. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2008. Pág 43.
13. Gennaro AR. *Remington: Farmacia*. 20va Edición. Tomo 1. Argentina, Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003. Pág 1149.
14. Fernández Alonso R. *Hidrólisis enzimática de Seroalbúmina Bovina. Producción de péptidos bioactivos* [TESIS]. Oviedo, España: Universidad de Oviedo; 2015.
15. Figueroa OA, Zapata JE, Gutiérrez GA. *Modelamiento de la cinética de hidrólisis enzimática de proteínas del plasma bovino*. Revista EIA. 2012 [Citado 10/06/2018]; 2017 (17): 71-84. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=149224285006>
16. Mendoza Martínez E. *Toxicología de los alimentos*. 1ra. Edición. México, D.F: Mc-Graw Hill Education; 2012. Pág 55.
17. McQueen MA. *Comprehensive Toxicology*. 2da Edición. Reino Unido, Oxford: Elsevier; 2010. Pág 243-261.
18. López Nicolás JM, García Carmona F. *Los cuatro mosqueteros de la cinética enzimática*. Revista Eubacteria. 2015 [Citado 02/08/2018]; 2015 (34): 39-43. Disponible en: <https://digitum.um.es/xmlui/handle/10201/48171>
19. Roskar R, Trdan Lusin T. *Analytical Methods for Quantification of Drug Metabolites in Biological Samples*. Eslovenia, Liubliana: INTECH Open Access Publisher; 2012. Pág 79.
20. Wright P, Miao Z, Shilliday B. *Metabolite quantitation: detector technology and MIST Implications*. Bioanalysis. 2009 [Citado 02/08/2018]; 1(4): 831-45. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21083141>
21. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Farmacología Básica y Clínica*. 1ra. Edición. México, D.F: Editorial El Manual Moderno; 1990. Pág 27-30.

22. O'Neil MJ. *The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 15va Edición. UK, Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2013. Pág 922.
23. Moffat AC. *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material*. 4ta Edición. USA, Chicago: Pharmaceutical Press; 2011. Pág 1459.
24. Eapen C, Prasanth VG, Rai A. *Development of UV Spectrometric Method of Glibenclamide (Glyburide) in Bulk and Pharmaceutical Formulations*. International Journal of ChemTech Research. 2012 [Citado 02/05/2018]; 4 (1): 356-360. Disponible en: [http://sphinxsai.com/2012/chem/CHEM/CT=55\(356-360\)JM12.pdf](http://sphinxsai.com/2012/chem/CHEM/CT=55(356-360)JM12.pdf)
25. Hernández Abad VJ. *Evaluación Biofarmacéutica del Ibuprofenato de Ibuprofeno, un nuevo profármaco del Ibuprofeno* [TESIS]. D.F., México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1999.
26. Álvarez-Guerra ED, Parkes HG, Bell JD. *Estudio comparado de dos métodos de desproteinización para la evaluación de sangre total y plasma mediante espectroscopia de resonancia magnética*. Bioquímica. 2006 [Citado 02/05/2018]; 31 (2): 59-68. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57631204>
27. Gennaro AR. *Remington Farmacia*. Tomo 2. 20va Edición. Argentina, Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2003. Pág 660.
28. "Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2 (R1)". International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use, 27 de octubre de 1994.
29. "Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos". Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura. Secretaría de Salud, 16 de febrero de 2011.
30. "Guideline on bioanalytical method validation". EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. European Medicines Agency, 21 de julio de 2011.
31. "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 de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados, centros de investigación o instituciones hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad". Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013. Diario Oficial de la Federación, 20 de septiembre de 2013.

32. Fischer V, Rodríguez-Gascón A, Heitz F, Tynes R, Hauck C, Cohen D, Vickers A. et al. *The Multidrug Resistance Modulator Valspodar (PSC 833) is metabolized by human Cytochrome P450*. 3ra Edición. USA, Novartis pharmaceuticals, 1998. [Citado 03/04/2019]; 26 (8): 802-811. Disponible en: <http://dmd.aspetjournals.org/content/26/8/802.full>
33. Álvarez R. *Estadística aplicada a las ciencias de la salud*. 1ra Edición. España, Madrid; Ediciones Díaz Santos: 2007. Pág. 562-564.
34. Pretsch E, Bülimann P, Badertscher M. *Structure Determination of Organic Compounds*. Suiza, Zurich: Springer; 2009. Pág 46-156.
35. Harris DC. *Análisis químico cuantitativo*. 3ra Edición. España, Barcelona; Editorial Reverté: 2006. Pág. 49-51.
36. Bolaños NV, *Química de Alimentos: Manual de laboratorio*. 1ra Edición. Costa Rica, San José; Editorial de la Universidad de Costa Rica: 2003. Pág 36-37.
37. Centro de Investigación. Hospital General Universitario de Valencia. *Hematología y Bioquímica de la Rata. Parte 2*. 1990.
38. Sigma-Aldrich. *Certificate of Analysis. Esterase from porcine liver. Lyophilized poder  $\geq$  15 units/mg solid (E3019)*. Release Date: FEB 2015. Retest Date: FEB 2021
39. Manzoul SM, Mohammed H. *Bioquímica*. México, DF; Editorial El Manual Moderno: 2011. Pág 16-22.
40. Levine IN. *Principios de Fisicoquímica*. 6ta Edición. Mc-Graw Hill Education; México, DF: 2014. Pág 479-531.
41. Blanco A. *Química Biológica*. 10ma Edición. Argentina, Buenos Aires: Editorial El Ateneo; 2016. Pág 122-134.
42. Melo V., Cuamatzi O. *Bioquímica de los procesos metabólicos*. 2da Edición. México, DF; Editorial Reverté: 2007. Pág 110-116.