

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS  
AMÉRICAS**

**ESCUELA DE FARMACIA**

**FÁRMACO LIBRE EN PLASMA DEBIDO A SU  
AFINIDAD A PROTEÍNA PLASMÁTICA; UNA  
SIMULACIÓN *IN VITRO* DEL DESPLAZAMIENTO DE**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR  
EL GRADO DE LICENCIATURA EN FARMACIA**

**AUTOR: KAROL TATIANA MORA AGÜERO**

**TUTOR: ADAM AMEY WILLIAMS**

**SAN JOSÉ, DICIEMBRE, 2018**

## **Agradecimientos**

La gratitud es simplemente el acto más grande de humildad, tener la dicha de expresarla y disfrutarla es algo único. Agradezco a Dios por el don de la vida, por la salud y bienestar para lograr concluir una meta tan importante.

A mis padres, que son los pilares en mi vida, les agradezco su apoyo incondicional, su constante lucha para verme crecer como persona y profesional, y cada momento en que sus oraciones iban dirigidas a mí. A mi hermano mayor, por su apoyo desde el inicio de mi carrera y por su ejemplo de perseverancia. A mi hermana menor, por estar siempre pendiente de mí, por ser mi motivo para mejorar y llegar a ser un buen ejemplo.

Agradezco infinitamente a mi novio, quién ha sido mi sostén y mi complemento. Su motivación, siempre en el mejor momento, fue uno de mis detonantes hacia el éxito. Gracias por su paciencia y compromiso.

A mi segunda familia, Muñoz Mora, quiénes han puesto muchos granitos de arena representados a través de sus consejos, enseñanzas y amor. Gracias por la motivación y la incentivación.

A mi hermana, no de sangre sí de corazón; los años pasan y sigue ahí, ofreciendo lo mejor que tiene, gracias por su apoyo y por cada oportunidad que aprovecha para mantener nuestra amistad.

Agradezco a mis compañeras, todo el apoyo y la compañía, Jer, Ari, Pau y Vane, que con la travesía durante varios años se convirtieron en grandes amigas.

## **Dedicatoria**

Este trabajo ha sido posible gracias a mis dos motores de vida. De quienes conozco el alcance de su amor, su entrega, y confianza en mí. Por quienes, agradezco a Dios, la bendición de compartir cada momento de mi vida a su lado. Quienes con enorme esfuerzo me dieron la mejor de las herencias, mi educación. A quienes dedicaré cada triunfo de mi vida, mami y papi.

## Resumen

El presente trabajo de investigación consiste en una simulación *in vitro* de la unión de fármacos a la proteína plasmática. Su objetivo principal es implementar un sistema de simulación *in vitro* que simule el desplazamiento de la warfarina por el ibuprofeno en la albúmina y que facilite la comprensión del proceso.

Lo anterior con la intención de contestar la pregunta central. ¿Es posible visualizar el proceso de la unión de la warfarina y el ibuprofeno a la proteína plasmática y sus consecuencias farmacocinéticas?

La investigación se realizará a nivel de laboratorio, con un enfoque cuantitativo. La estrategia para obtener la información necesaria para la resolver el problema planteado, dando seguimiento a los objetivos es por medio de un método experimental. Se inicia con la recopilación de datos importantes para el desarrollo del tema y realizando pruebas experimentales para obtener los resultados.

Los resultados experimentales obtenidos ilustran de forma satisfactoria los conceptos estudiados teóricamente, referentes a la unión de fármacos a las proteínas plasmáticas y la capacidad de desplazamiento.

Se propone la simulación del desplazamiento de la warfarina por el ibuprofeno en la albúmina, la cual por medio de sistemas *in vitro*, permite el análisis y comprensión del proceso de unión de los fármacos a la proteína plasmática. Se recomienda a estudiantes y profesores, la utilización de dichos sistemas como método de enseñanza en áreas farmacéuticas, para comprender la importancia de la formación de complejos fármaco-proteína.

## Contenido

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....	12
Planteamiento del Problema.....	12
Hipótesis.....	13
Objetivo General .....	13
Objetivos específicos .....	13
Justificación.....	14
Antecedentes .....	15
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	20
Plasma Humano.....	20
pH en sangre.....	22
Proteínas plasmáticas .....	22
Sitios de unión en la HSA .....	28
Unión a Proteínas Plasmáticas .....	30
Fijación a proteínas plasmáticas.....	30
Afinidad de fijación.....	31
Cinética de la unión a proteínas .....	34
Constantes de unión. ....	35
Grado de unión a proteína. ....	35
Volumen de distribución. ....	36
Factores que modifican la unión a proteínas.....	41
Variaciones en la concentración de proteínas plasmáticas. ....	41
Alteraciones en la estructura molecular de la proteína. ....	43
Interacciones con sustancias endógenas o fármacos.....	43
Desplazamiento de fármacos. ....	44
Anticoagulantes Cumarínicos .....	48

Warfarina.....	48
Mecanismo de acción.....	48
Propiedades farmacocinéticas.....	52
Interacciones entre medicamentos.....	52
Antiinflamatorios No Esteroideos.....	53
Mecanismo de acción.....	55
Ibuprofeno.....	56
Propiedades farmacocinéticas.....	57
Afinidad de Fijación de la Warfarina e Ibuprofeno en la HSA.....	57
Sitios de unión en la HSA de la warfarina e ibuprofeno.....	59
CaPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	61
Enfoque.....	61
Método.....	61
Curva de Calibración de Ibuprofeno.....	62
Equipo y reactivos.....	62
Procedimiento.....	62
Preparación del buffer de fosfatos de pH 7.4.....	62
Preparación estándar madre de ibuprofeno.....	63
Preparación de la curva de calibración de ibuprofeno.....	63
Lecturas de las disoluciones estándar.....	63
Curva de Calibración de Warfarina.....	64
Equipo y reactivos.....	64
Procedimiento.....	64
Preparación de la disolución madre de warfarina.....	64
Preparación de la curva de calibración de warfarina.....	65
Lecturas de las disoluciones estándar.....	66

Curva de Calibración de la Albúmina Sérica Humana (HSA) .....	67
Equipo y reactivos .....	67
Procedimiento .....	67
Preparación de la disolución madre de albúmina sérica humana (HSA). .....	67
Preparación de la curva de calibración de la HSA. ....	67
Lecturas de las disoluciones estándar. ....	68
Optimización de las Concentraciones de los Fármacos .....	69
Equipo y reactivos .....	69
Procedimiento .....	69
Preparación de la muestra de ibuprofeno. ....	69
Preparación de la muestra de warfarina. ....	70
Preparación de la disolución de albúmina al 0.1%. ....	71
Realización experimental: Sistema sin eliminación.....	71
Modelo para Simulación de la Unión de Fármacos a Proteína Plasmática: Sistema con Eliminación .....	73
Equipo .....	73
Reactivos .....	73
Preparación de la muestra de ibuprofeno. ....	74
Ensamblaje del modelo .....	74
Modelo para Simulación del Desplazamiento de la Warfarina por el Ibuprofeno: Sistema sin Eliminación .....	77
Equipo .....	77
Reactivos .....	77
Ensamblaje del modelo .....	78
Procedimiento de Recolección y Análisis de los Datos .....	80
Hojas de cálculo Microsoft Excel 2016 .....	80
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	82

Optimización del Medio de Disolución a Emplear en el Análisis .....	82
Curvas de Calibración .....	84
Optimización de la Concentración de Albúmina .....	88
Verificación de la Unión de Warfarina a la Albúmina en un Sistema sin Eliminación .....	89
Verificación de la Unión de Ibuprofeno a la Albúmina en un Sistema sin Eliminación .....	91
Simulación de la Unión de Fármacos a la HSA en un Sistema con Eliminación .....	93
Simulación de la unión de warfarina a la albúmina, sistema con eliminación.....	94
Simulación de la unión de ibuprofeno a la albúmina, sistema con eliminación .....	97
Simulación del Desplazamiento de la Warfarina por el Ibuprofeno .....	101
Optimización del modelo .....	101
Verificación del desplazamiento de la warfarina por el ibuprofeno, sistema sin eliminación .....	104
Capítulo V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	114
Recomendaciones.....	115
Referencias .....	116

## Tablas

Tabla 1. Principales Funciones de la Sangre.....	21
Tabla 2. Principales Proteínas Plasmáticas que Intervienen en la Fijación a Fármacos .....	30
Tabla 3. Sustancias Unidas a los Sitios de Fijación de la HSA .....	33
Tabla 4. Fármacos que se unen a la $\alpha$ 1-glicoproteína Ácida.....	34
Tabla 5. Valores de la Fracción Unida (fu).....	36
Tabla 6. Volumen de Distribución de Fármacos en Individuo Adulto Sano .....	38
Tabla 7. Factores Patológicos Asociados a Cambios en Niveles Plasmáticos de Proteínas .....	42
Tabla 8. Aumento o Disminución de la HSA.....	43
Tabla 9. Efecto del Desplazamiento de Fármacos Sobre su Concentración Libre.....	46
Tabla 10. Interacciones Medicamentosas con la Warfarina.....	53
Tabla 11. Curva de Calibración del Ibuprofeno Obtenida Mediante Análisis de Espectrofotometría UV-VIS.....	85
Tabla 12. Curva de Calibración de la Warfarina Obtenida Mediante Análisis de Espectrofotometría UV-VIS.....	87
Tabla 13. Optimización de la Concentración de Albúmina a Emplear .....	89
Tabla 14. Verificación de la Unión de Warfarina a la HSA, Sistema sin Eliminación.....	90
Tabla 15. Verificación de la Unión de Ibuprofeno a la HSA, Sistema sin Eliminación .....	92
Tabla 16. Concentraciones de Warfarina con y sin Presencia de Albúmina, Sistema con Eliminación .....	96
Tabla 17. Concentraciones de Ibuprofeno con y sin Presencia de Albúmina, Sistema con Eliminación .....	99
Tabla 18. Simulación 2: Concentraciones Plasmáticas de Warfarina e Ibuprofeno, por Efecto del Desplazamiento .....	106
Tabla 19. Simulación 3: Concentraciones Plasmáticas de Warfarina e Ibuprofeno, por Efecto del Desplazamiento .....	109
Tabla 20. Cálculo del Orden de la Cinética de Unión y de la Constante de velocidad de Unión de la Warfarina.....	111
Tabla 21. Cálculo del Orden de la Cinética de Unión de la Constante de Velocidad de Unión de los fármacos.....	113

## Figuras

Figura 1. Dimensiones Relativas y Masas Moleculares Aproximadas de Proteína en la Sangre ..	23
Figura 2. Vista 3D: Proteína Globular y Monomérica Albúmina Sérica Humana.....	25
Figura 3. Estructura Molecular de la Albúmina Sérica Humana .....	26
Figura 4. Albúmina Humana. Solución Inyectable para Infusión .....	28
Figura 5. Capacidad de Unión de la Albúmina Sérica Humana al Ligando .....	29
Figura 6. Volumen de Distribución Aparente de Distintos Fármacos .....	39
Figura 7. Distribución de un Medicamento con Respecto a la Unión a Proteínas Plasmáticas (UPP).....	40
Figura 8. Aumento de la Concentración Libre del Fármaco según su Desplazamiento .....	47
Figura 9. Mecanismo de Acción de la Warfarina.....	50
Figura 10. Estructura de los Antagonistas de Vitamina K .....	51
Figura 11. Isómeros S y R de la Warfarina Sódica .....	51
Figura 12. Clasificación de los AINEs por Similitud Química.....	54
Figura 13. Mecanismo de Acción de los Derivados del Ácido Propiónico .....	55
Figura 14. Estructura del Ibuprofeno .....	57
Figura 15. Variabilidad en la Unión de los Fármacos a las Proteínas.....	58
Figura 16. Fijación de la Warfarina e Ibuprofeno en la HSA .....	59
Figura 17. Características de Algunos Fármacos con Alta Unión a las Proteínas del Plasma.....	60
Figura 18. Disolución Madre de Warfarina .....	65
Figura 19. Preparación de la Curva de Calibración de Warfarina.....	66
Figura 20. Soluciones de Albúmina a Diferentes Concentraciones .....	68
Figura 21. Muestra de Ibuprofeno 0.6 mg/mL.....	70
Figura 22. Verificación de la Unión de Fármacos a la Proteína: Sistema sin Eliminación.....	72
Figura 23. Reactivos.....	74
Figura 24. Modelo Físico para la Simulación <i>In Vitro</i> de la Unión a Proteína: Sistema con Eliminación .....	75
Figura 25. Modelo Físico para la Simulación <i>In Vitro</i> del Desplazamiento de la Warfarina por el Ibuprofeno: Sistema sin Eliminación .....	79

Figura 26. Hoja de Cálculo Microsoft Excel 2016.....	81
Figura 27. Baja Solubilidad del Ibuprofeno en Agua.....	83
Figura 28. Representación de la Absorbancia en Función de la Concentración de Ibuprofeno ....	85
Figura 29. Representación de la Absorbancia en Función de la Concentración de la Warfarina ..	87
Figura 30. Verificación de la Unión de la Warfarina a la Albúmina, Sistema sin Eliminación ....	91
Figura 31. Verificación de la Unión de Ibuprofeno a la Albúmina, Sistema sin Eliminación.....	93
Figura 32. Sistema de Simulación <i>In Vitro</i> de la Unión de Fármacos a la Proteína, con Eliminación .....	94
Figura 33. Simulación de la Unión de la Warfarina a la Proteína Plasmática: Sistema con Eliminación .....	95
Figura 34. Verificación de la Unión de Warfarina a la Albúmina, Sistema con Eliminación .....	97
Figura 35. Simulación de la Unión de Ibuprofeno a la Proteína Plasmática: Sistema con Eliminación .....	98
Figura 36. Verificación de la Unión de Ibuprofeno a la Albúmina, Sistema con Eliminación....	100
Figura 37. Sistema de Simulación <i>In Vitro</i> del Desplazamiento, Sin Eliminación.....	102
Figura 38. Presencia de Partículas en la Disolución de Warfarina e Ibuprofeno.....	103
Figura 39. Disolución de Warfarina e Ibuprofeno en Buffer de Fosfatos, sin Presencia de Partículas .....	104
Figura 40. Modelo Físico para la Simulación <i>In Vitro</i> del Desplazamiento de la Warfarina por el Ibuprofeno .....	105
Figura 41. Simulación 2: Verificación del Desplazamiento de la Warfarina por el Ibuprofeno..	107
Figura 42. Simulación 3: Verificación del Desplazamiento de la Warfarina por el Ibuprofeno..	110

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### Planteamiento del Problema

La construcción de sistemas no biológicos es de gran importancia, debido a que permiten extrapolar los resultados a seres humanos y aplicarlos en el momento de tomar decisiones de característica científica y profesional, siguiendo los criterios aprendidos y adquiridos según la experiencia.

A lo largo la formación del futuro profesional en Farmacia, se habla de procesos biológicos importantes; entre ellos se encuentra la unión de fármacos a la albúmina, proteína más abundante en el cuerpo humano, y sus consecuencias farmacológicas. “La albúmina sérica humana, es la mejor selección para estudios cinéticos y termodinámicos *in vitro* de unión a proteína, con el fin de explicar la naturaleza de la interacción entre el ligando y la albúmina sérica humana” (Esmaeilzadeh, Valizadeh, Zakeri, 2016, p. 982). Sin embargo, estos conceptos son aprendidos desde el punto de vista teórico, quedando ausente la representación práctica y sencilla del proceso.

Ceballos, Holguín, González y Amariles (2013) mencionan que las interacciones medicamentosas pueden causar problemas de efectividad o seguridad de la farmacoterapia. Por ejemplo, medicamentos de uso común (analgésicos) pueden ser utilizados por pacientes en tratamiento crónico con warfarina, con aumento del riesgo de hemorragia. El uso simultáneo de fármacos requiere conocer el mecanismo de la interacción; en este caso, existe evidencia de la capacidad de interacción que tienen los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) con la warfarina, por diferentes mecanismos, lo que facilita a los profesionales de la salud definir la estrategia farmacoterapéutica efectiva y segura para los pacientes (p. 23).

No contar con un sistema no biológico que represente fenómenos que surgen en el organismo conlleva a abundar en conceptos abstractos y que pueden ser muy numéricos,

específicamente la parte farmacocinética y biofarmacia, de la formación profesional. Dado lo anterior, se ve necesario establecer una forma en la cual se pueda visualizar, a nivel experimental, lo que se habla en varios cursos a lo largo de la carrera y que ejemplifique los conceptos específicos.

Para solventar dicha situación surge la iniciativa del desarrollo de una simulación *in vitro* que se implemente como una práctica para reforzar la formación profesional. Ante la situación expuesta, se plantea la siguiente interrogante:

¿Es posible visualizar el proceso de la unión de la warfarina y el ibuprofeno a la proteína plasmática y sus consecuencias farmacocinéticas?

### **Hipótesis**

Es posible la visualización de las consecuencias farmacocinéticas de la unión de la warfarina y el ibuprofeno a proteína plasmática, mediante una simulación *in vitro*.

### **Objetivo General**

Facilitar la comprensión del proceso de la unión de fármacos a la proteína plasmática mediante una simulación *in vitro* del desplazamiento de la warfarina por el ibuprofeno en la albúmina.

### **Objetivos específicos**

-Exponer, mediante un sistema de simulación *in vitro* optimizado, la unión de fármaco a proteína plasmática.

-Mostrar, a nivel experimental, la disminución de la concentración de fármaco libre en plasma en presencia de albúmina humana.

-Evidenciar, a nivel experimental *in vitro*, el proceso de desplazamiento de la warfarina por el ibuprofeno según su afinidad a proteína plasmática.

### **Justificación**

La investigación de la farmacocinética y biofarmacia es de vital importancia en la explicación del comportamiento de los fármacos en el ser humano; además, influye tanto en el diseño de los fármacos como en las consideraciones para su administración al prever la acción terapéutica o tóxica de los medicamentos. Representar la interacción entre el ligando y la proteína haciendo uso de la albúmina sérica humana (HSA) es un factor significativo, ya que esta es la mejor selección para estudios cinéticos y termodinámicos *in vitro* de unión a proteína (Esmailzadeh, Valizadeh y Zakeri, 2016, p. 982).

En cuanto a interacciones farmacológicas, Yurgaky y Rodríguez (2009) establecen que la unión a proteínas es constituyente importante, debido a que solo la fracción libre es capaz de ejercer efecto terapéutico (p.107). Con una simulación *in vitro* del proceso de unión de fármaco a la proteína se logra que el futuro profesional en Farmacia pueda comprender, no de manera tan abstracta, este concepto. De tal manera el profesional se vuelve más íntegro y de mayor competencia, ya que logra tener un razonamiento y no solo un proceso memorístico.

El cuerpo cuenta con gran variedad de proteínas, y la más abundante en el plasma, representando alrededor del 60% de la proteína plasmática total, es la HSA. El desarrollo de prácticas de laboratorio, además de hacer posible la visualización de distintos procesos que sufren los fármacos en el organismo, logra un contexto más real de lo que puede ocurrir en él si se utiliza dicha proteína (Bi, Yan, Sun, Zhang, 2011, p. 410).

El desplazamiento de fármacos de su sitio de unión a proteínas plasmáticas, de manera *in vitro*, es una variable poco estudiada a nivel nacional. Yurgaky y Rodríguez (2009) hacen

referencia a la capacidad de un fármaco de ocupar un sitio en la albúmina y desplazar a otro previamente unido (p.108). Por lo tanto, realizar un modelo *in vitro* que reproduzca estas circunstancias de la forma más sencilla posible y que permita la percepción del cuerpo humano, es una alternativa para recrear lo que sucede en él sin causar daño a un ser humano y, consecuentemente, un complemento de la parte teórica.

Este proyecto presenta la conveniencia práctica de emplear recursos básicos de laboratorio, que son de bajo costo económico, además de contribuir a la comprensión práctica de conceptos sobre farmacocinética y biofarmacia, específicamente la unión de fármaco a proteína. De esta forma, se pueden ligar los temas impartidos en la carrera de Farmacia y permitir un mejor aprovechamiento de la parte experimental.

### **Antecedentes**

Para mostrar los procesos de cambio de las concentraciones de fármacos en el organismo humano o animal, Dost utilizó por primera vez el término farmacocinética en 1953. Según Wagner (1983), la farmacocinética se define como: “El estudio de las velocidades de cambio de la concentración de fármaco en los fluidos biológicos, tejidos y excretas, así como también el de la respuesta farmacológica y la construcción de modelos adecuados para la interpretación de tales datos” (p. 2).

La albúmina es la proteína más abundante en el plasma, cuya estructura primaria completa se conoce desde 1975, la cual consiste en una sola cadena peptídica de 585 residuos de aminoácidos. Fue investigada por Goldstein por primera vez en 1947, y en 1954 Scatchard, por medio de preguntas básicas, permitió que documentos actuales fundamenten la importancia de la unión a proteínas plasmáticas para la distribución y el efecto farmacológico (Fehske, Müller y Wollert, 1981, p. 687).

Ciertos fármacos presentan alta capacidad de unión a la proteína plasmática común, la albúmina, y un ejemplo de ello es la warfarina. En 1941, Link, Campbell y un grupo de químicos

investigadores de la Universidad de Wisconsin aislaron un agente hemorrágico encontrado en la planta de trébol dulce, ya que esta causó muertes de ganado por hemorragias. Los investigadores caracterizaron el agente como un potente anticoagulante llamado dicumarol, y basados en su estructura molecular desarrollaron anticoagulantes sintéticos, y fue en 1948 que lograron obtener la warfarina, la cual se registró para uso comercial como raticida por primera vez en los Estados Unidos. Su uso clínico en humanos fue aprobado en 1954 (Quintero, 2010, p. 270).

Las investigaciones y proyectos en el área de la farmacología, biofarmacia y farmacocinética permiten el análisis del comportamiento de un fármaco en el cuerpo humano, de esta manera a nivel internacional se destacan los siguientes:

En el 2013 De Sousa presentó, en la Universidad Federal de Río Grande del Norte, en Natal, la tesis llamada: “Estudo *in silico* da interação da albumina de soro humano com o ibuprofeno” (“Estudio *in silico* de la interacción de la albúmina de suero humano con el ibuprofeno”). Su principal objetivo fue caracterizar, a través de la energía de interacción, cómo ocurre la interacción del ibuprofeno con la albúmina, y establecer cuáles son los principales aminoácidos e interacciones moleculares involucradas en el proceso. El estudio *in silico* se desarrolló mediante cálculos de mecánica cuántica. Los resultados indicaron como el principal sitio de unión al Sudlow II (I-FA3) y el sitio I-FA6 (Sudlow I) como sitio secundario, lo cual coincide con la literatura. En estos dos sitios la interacción ocurre a través del grupo carboxilo del ibuprofeno, que posee una mayor electronegatividad. Sin embargo, la energía de interacción total en el sitio II es mayor que el sitio I. El método cuántico es eficiente para la descripción de sistemas biológicos, debido a la variedad de detalles sobre las energías individuales de interacción.

Se cuenta con un artículo de los autores Tedesco, Pistolozzi, Zanasi y Bertucci, publicado en el 2014, titulado: “Characterization of the species dependent ketoprofen/albumin binding modes by induced CD spectroscopy and TD-DFT calculations” (“Caracterización de los modos de unión ketoprofeno/albúminas dependientes de especies mediante espectroscopía de CD inducida y cálculos TD-DFT”). Investigar acerca de los tipos de enlace dependientes del

ketoprofeno a las albúminas séricas fue su principal objetivo; para ello realizaron métodos de espectroscopía de dicroísmo circular inducido (CD) y cálculos mecánicos basados en su formulación dependiente del tiempo (TD-DFT). Se observaron, como resultado, distintas conformaciones al unirse el fármaco a la albúmina sérica humana o a la albúmina sérica de rata, por lo que se concluye que la unión es dependiente de la especie.

Otro ejemplo de afinidad del fármaco a proteína se explica en el estudio bioquímico *in vitro* llamado: “Drug–drug plasma protein binding interactions of ivacaftor” (“Interacciones de unión a proteína plasmática del fármaco ivacaftor”), donde se utilizaron ensayos de unión fluorimétrica y de resonancia de plasmón superficial (SPR), además de técnicas de acoplamiento molecular. Debido a sus altas afinidades de unión, montelukast, ibuprofeno, omeprazol, y loratadina son capaces de desplazar fuertemente ivacaftor de sus sitios de unión AGP y HSA. In vivo, el uso concomitante de estos medicamentos podría aumentar la concentración plasmática de ivacaftor libre (Schneidera, Huangc, Carboned, Bakere, Azada, Cooperc, Lia y Velkov, 2015).

La warfarina es un fármaco con gran capacidad de unión a proteínas; su concentración plasmática libre no solo varía por la interacción con otros medicamentos; por ejemplo, Shao, Ai, Xu y Fan (2016) presentan como objetivo demostrar el papel contribuyente de la unión de HSA en las interacciones de hierbas y medicamentos como *Salvia miltiorrhiza* y warfarina, en el artículo “Exploring the interaction between *Salvia miltiorrhiza* and human serum albumin: Insights from herb–drug interaction reports, computational analysis and experimental studies” (“Explorando la interacción entre *Salvia miltiorrhiza* y la albúmina de suero humano: información de informes de interacción de hierbas y medicamentos, análisis computacional y estudios experimentales”). Se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular y técnica de fluorescencia, donde la cinética warfarina-HSA se vio afectada, por lo que se propuso que el uso concomitante de ellos causa desplazamiento de la warfarina más rápidamente, lo que podría aumentar su concentración libre en el plasma.

En la investigación de “The effects of pH, temperature and protein concentration on the *in vitro* binding of flutamide to human serum albumin” (“Los efectos del pH, la temperatura y la

concentración de proteínas en la unión *in vitro* de la flutamida a la albúmina sérica humana”), los autores Esmailzadeh, Valizadeh y Zakeri publicaron, en el 2016, que el objetivo principal del estudio fue investigar la cinética, termodinámica y cambios de pH de la unión de flutamida y albúmina sérica humana. Para ello se utilizó un método de ultrafiltración, cuyo resultado reveló que los parámetros cinéticos son alterados por la temperatura, pH y concentración de albúmina; además de que la unión fármaco-albúmina se da de manera espontánea. Se concluyó que dicha unión se vio afectada por el pH, temperatura del porcentaje de albúmina utilizado.

En el 2017 Yamasaki, et al., en el artículo publicado: “The Binding of Silibinin, the Main Constituent of Silymarin, to Site I on Human Serum Albumin” (“La unión de Silibinin, el constituyente principal de silimarina, al sitio I en la albúmina sérica humana”), mencionaron como objetivo informar sobre la unión de silibinina a las proteínas plasmáticas. Se realizaron análisis termodinámicos y experimentos de desplazamiento mutuo utilizando ligandos que se unen principalmente a los sitios I y II, obteniendo como resultado que la silibinina se une estrecha y selectivamente al sitio I. En conclusión, la evidencia obtenida indica que la silibinina se une al sitio I de la HSA con ayuda de múltiples fuerzas, y puede desplazar a los fármacos del sitio I, como warfarina o ibuprofeno.

Además, con el fin de fundamentar la realización de la investigación, se visitaron las universidades que imparten la carrera de Farmacia: Universidad de Costa Rica, Universidad de Ciencias Médicas, Universidad Latina de Costa Rica, Universidad de Iberoamérica; sin embargo, no se logró obtener información suficiente. A continuación, se mencionan las investigaciones farmacocinéticas pioneras en estudios *in vitro*.

En la Universidad Internacional de las Américas, Marín (2010) presentó la tesis titulada: “Establecimiento de Ensayos *In Vitro*, para el Laboratorio de Farmacocinética, que simulen los Modelos Extravasales: Monocompartimental con y sin Periodo de Latencia y Bicompartimental en la Universidad Internacional de las Américas”. Su objetivo fue facilitar el entendimiento de los conceptos farmacocinéticos a los estudiantes de Farmacia, mediante prácticas optimizadas. Se llevó a cabo a través de un modelo extravasal monocompartimental administrando solución de

azul de bromotimol (ABT), y en otro modelo se utilizó una solución inyectable de Cianocobalamina. Se logró obtener parámetros farmacocinéticos con ambos modelos, al utilizar tanto ABT o cianocobalamina como fármaco. Con el estudio se observó la necesidad de crear modelos que permitan la administración extravasal de un fármaco.

En ese mismo año también se presentó el proyecto titulado “Establecimiento de Ensayos *In Vitro*, para el Laboratorio de Farmacocinética, que simulen los Modelos Intravenosos: Monocompartimental con y sin Periodo de Latencia y Bicompartimental en la Universidad Internacional de las Américas”, por Gutiérrez, cuyo objetivo fue estudiar los conceptos fundamentales y variables farmacocinéticas más representativas de los modelos y, al igual que la investigación anterior, tuvo un impacto positivo al desarrollo del curso de farmacocinética, ya que a través del empleo de las prácticas optimizadas los estudiantes logran mayor comprensión de estas.

Adicionalmente, se cuenta con el trabajo de Ramos, quien presentó su proyecto de graduación en 2015: “Diseño de una práctica de laboratorio que ilustre los conceptos de biodisponibilidad absoluta y relativa en el curso de farmacocinética, simulando de forma *in vitro* la administración del dimenhidrinato vía oral, intravenosa e intramuscular, en la Universidad Internacional de las Américas, de abril a noviembre del 2015”. El enfoque de esta investigación es cuantitativo, utilizando un modelo monocompartimental para la administración oral, intramuscular e intravenosa. Se logró el diseño y desarrollo de una práctica de laboratorio que ejemplifica, a nivel *in vitro*, los conceptos de biodisponibilidad absoluta y relativa, empleando como fármaco el dimenhidrinato.

Finalmente, todos estos aportes presentan gran valor para el desarrollo y fortalecimiento de los temas abarcados en la trayectoria de la carrera, que contribuyen con la formación integral de los profesionales en Farmacia.

## **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

Con el presente capítulo se pretende sustentar teóricamente el estudio. Se desarrollará la base teórica para la realización de la investigación mediante la definición de conceptos de importancia, abarcando temas de plasma humano, afinidad a proteínas plasmáticas y el desplazamiento de fármacos de su sitio de unión.

### **Plasma Humano**

La sangre es un líquido complejo que, gracias a la función circulatoria, permanece en constante movimiento. Según su estado de oxigenación, contenido en los vasos sanguíneos y en las cavidades cardíacas, el color de la sangre varía, del rojo claro y brillante, al rojo oscuro y negruzco. Este líquido se trata de un vehículo de comunicación vital, entre los distintos tejidos del organismo. Entre sus funciones (véase la tabla 1) destacan: suministrar nutrientes y oxígeno, eliminar productos de desecho, transportar hormonas y defender contra microorganismos infecciosos (Ávila, 2010).

**Tabla 1. Principales Funciones de la Sangre**

<b>1. Respiración.</b> Transporte de oxígeno de los pulmones a los tejidos, y de CO <sub>2</sub> de los tejidos a los pulmones
<b>2. Nutrición.</b> Transporte de materiales alimentarios absorbidos
<b>3. Excreción.</b> Transporte de desechos metabólicos a los riñones, los pulmones, la piel y los intestinos para eliminación
<b>4.</b> Mantenimiento del <b>equilibrio acidobásico</b> normal en el organismo
<b>5.</b> Regulación del <b>equilibrio de agua</b> por medio de los efectos de la sangre sobre el intercambio de agua entre el líquido circulante y el líquido tisular
<b>6.</b> Regulación de la <b>temperatura corporal</b> por medio de la distribución del calor corporal
<b>7. Defensa</b> contra infección mediante los leucocitos y los anticuerpos circulantes
<b>8.</b> Transporte de <b>hormonas</b> y regulación del metabolismo
<b>9.</b> Transporte de <b>metabolitos</b>
<b>10. Coagulación</b>

Nota: Kennelly et al. (2016).

La sangre es una mezcla viscosa, compuesta por una porción líquida llamada *plasma*. Un conjunto diverso de elementos celulares, como eritrocitos, leucocitos y plaquetas y el agua, componen el plasma. Las funciones mencionadas son llevadas a cabo por estos elementos celulares. En el plasma, el agua constituye de 90 al 92%, por lo que se considera su componente principal. En ella están disueltas sustancias como: iones minerales (sodio, potasio, calcio y otros), moléculas inorgánicas (cloruros, sulfatos, fosfatos y otros), moléculas orgánicas: carbohidratos, lípidos, aminoácidos, proteínas (albúmina, globulinas) y otras (Kennelly, Murray, Jacob y Varghese, 2016).

## pH en sangre

Fox (2016) menciona que las células del cuerpo producen ácido láctico y otros ácidos orgánicos, y los secretan hacia la sangre. Aunque se da la liberación de  $H^+$  por parte de estos ácidos, el pH de la sangre arterial generalmente no disminuye, sino que permanece constante. El valor de pH es igual al logaritmo de 1 sobre la concentración de  $H^+$  (ecuación 1):

$$pH = \frac{\log 1}{[H^+]} \quad (1)$$

Donde  $[H^+]$  corresponde a la concentración de  $H^+$  molar. Esto también puede expresarse como  $pH = -\log [H^+]$ . Generalmente la concentración de  $H^+$  de una solución se indica en unidades de pH, en una escala que va de 0 a 14.

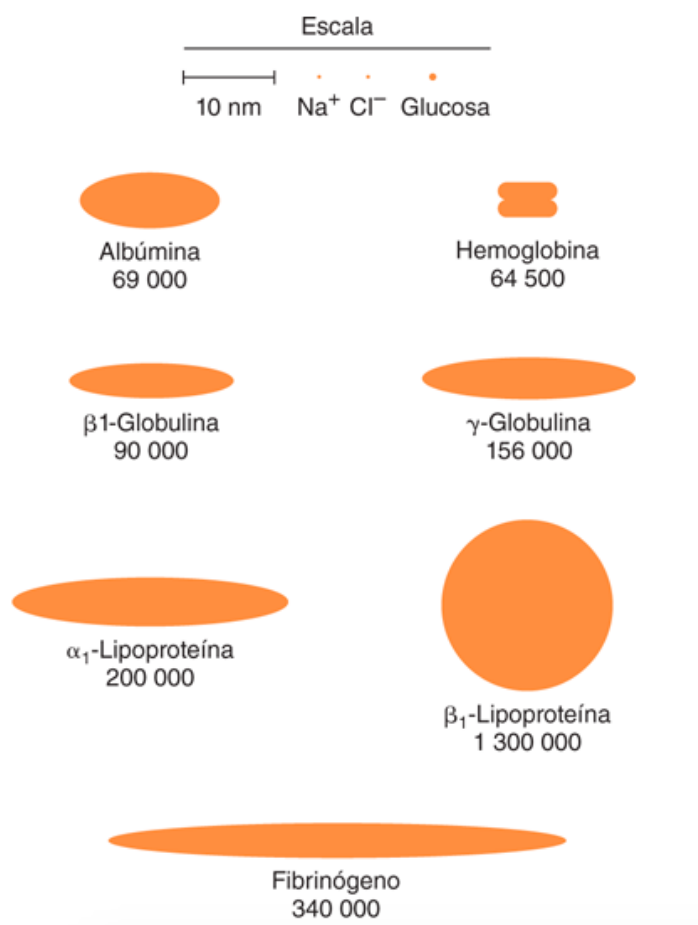
El plasma sanguíneo normalmente se mantiene dentro de un rango de valores estrecho mediante las funciones de los pulmones y los riñones. Tiene un pH de 7.35 a 7.45, con un promedio de 7.40. Es decir, la sangre arterial tiene una concentración de  $H^+$  de  $10^{-7.4}$  molar aproximadamente; esa constancia se logra cuando los pulmones regulan la concentración de dióxido de carbono de la sangre y los riñones regulan la concentración de bicarbonato (Fox, 2016).

## Proteínas plasmáticas

Como se mencionó, el plasma es un líquido de color amarillo claro que consta de agua y solutos disueltos. Contiene una mezcla compleja 7 al 9% de proteínas. Estas son un conjunto de

moléculas formadas por la unión de diversos aminoácidos, y la mayoría de ellas se sintetizan en el hígado y otras en el sistema inmunitario y otros tejidos. Se dice que los tres tipos de proteínas principales son albúminas, globulinas y fibrinógeno; sus masas moleculares aproximadas se muestran en la figura 1 (Kennelly et al., 2016).

**Figura 1. Dimensiones Relativas y Masas Moleculares Aproximadas de Proteína en la Sangre**



Nota: Kennelly et al. (2016).

Fox (2016) también hace referencia a los tres subtipos de globulinas: alfa globulinas, beta globulinas y gamma globulinas, las cuales representan el 38% de proteínas totales. Las globulinas alfa y beta se producen en el hígado y se encargan de transportar vitaminas liposolubles y hormonas. Por otra parte, las globulinas gamma son anticuerpos producidos por linfocitos; es decir, forman parte del sistema de defensa del organismo.

Este mismo autor menciona que otra proteína fabricada por el hígado es el fibrinógeno, un importante factor de la coagulación. Durante el proceso de la formación del coágulo, el fibrinógeno se convierte en hebras insolubles de fibrina, por lo que sin ella el cuerpo sería incapaz de detener una hemorragia. Esta proteína integra alrededor del 4% de las proteínas plasmáticas totales.

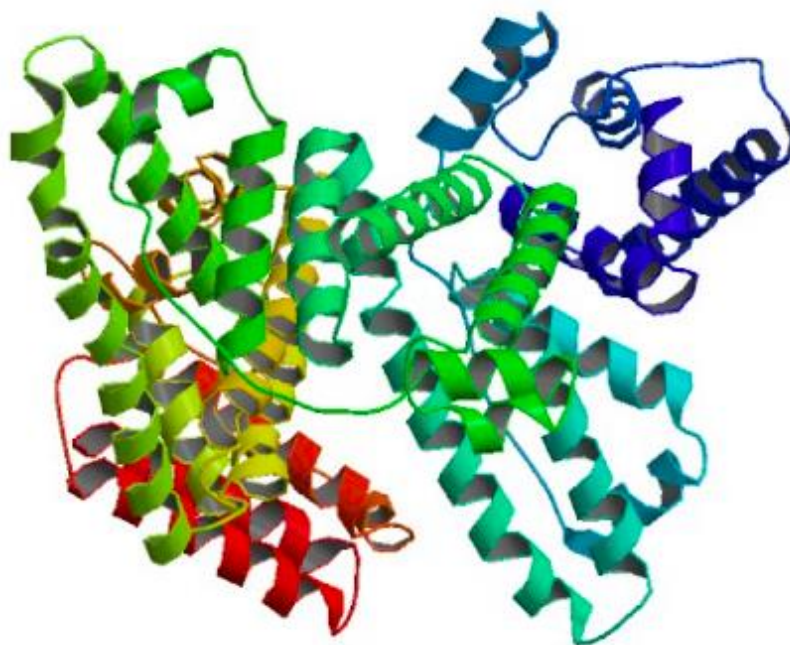
Es importante conocer que la mayor parte de las proteínas del plasma es representada por la albúmina. Como se muestra en la figura 1, las albúminas son las proteínas de menor tamaño.

### **Albúmina**

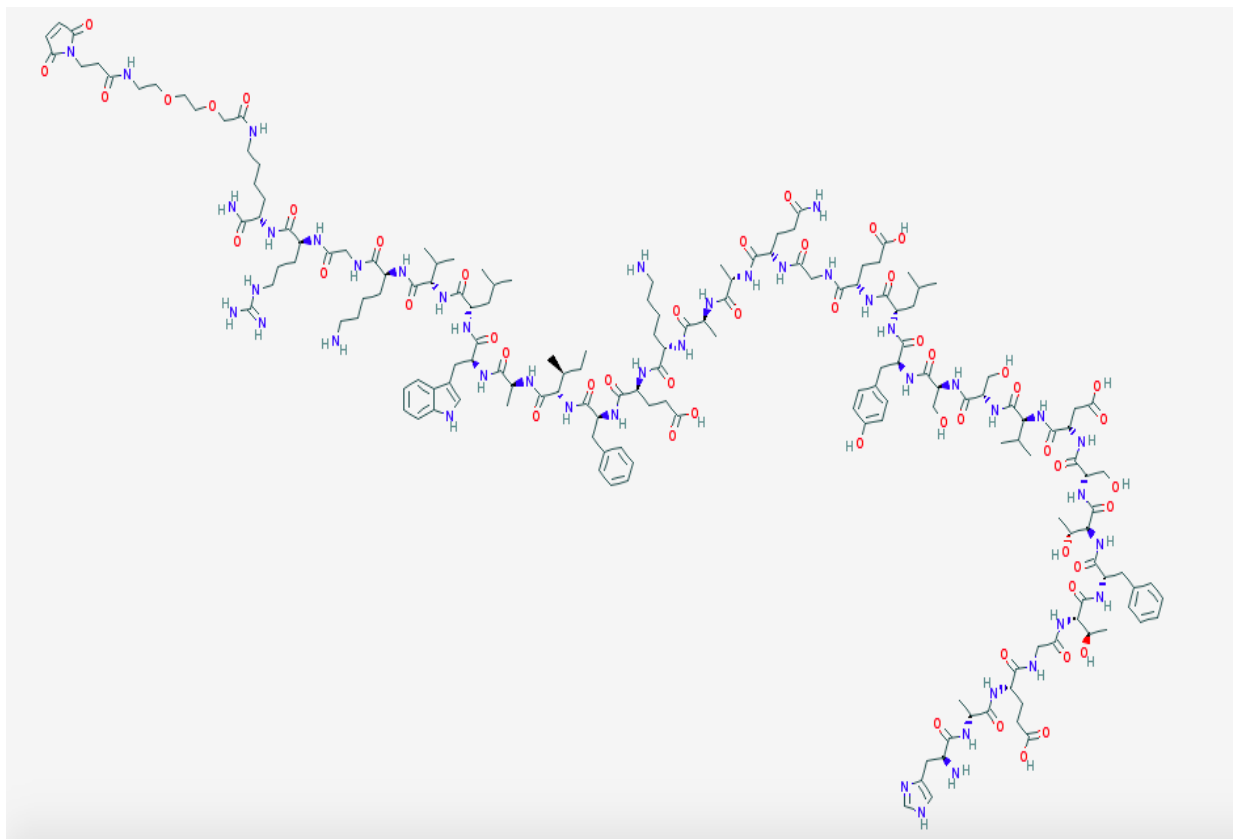
En vista de sus características y funcionalidad, la albúmina ocupa una posición sustancial entre las proteínas totales del plasma. En condiciones normales, la concentración de proteínas plasmáticas varía entre 6,2 y 7,9 g/dl. La albúmina es la proteína de mayor concentración en este medio líquido, siendo su concentración entre 3,6 y 5,2 g/dl, y presenta un pH fisiológico de 7.4. Su estructura y propiedades físicas están bien determinadas. (Vargas, 2006, p. 15).

Es una proteína globular y monomérica (véase la figura 2), de cadena sencilla, constituida por 585 aminoácidos no glicosilados de aproximadamente 69 000 Dalton peso molecular; y con cierta estabilidad brindada por 17 puentes disulfuro entrecruzados en su molécula (véase la figura 3) (Vargas, 2006, p. 15).

**Figura 2. Vista 3D: Proteína Globular y Monomérica Albúmina Sérica Humana**



Nota: Protein Data Bank.

**Figura 3. Estructura Molecular de la Albúmina Sérica Humana**

Nota: PubChem (2018).

En igual forma, Vargas (2006) menciona que la síntesis de albúmina sérica humana (HSA, por sus siglas en inglés) se efectúa en el hígado, específicamente en los polirribosomas unidos al retículo endoplasmático. Se encarga de transportar muchas moléculas pequeñas en la sangre, tanto endógenas como exógenas; por ejemplo: bilirrubina, iones metálicos, calcio, hormonas (cortisol, sexuales y otras), enzimas, ácidos grasos libres y toxinas, así como numerosos medicamentos. Dicho transporte se debe a la alta afinidad, generalmente de tipo hidrofóbico, que se da entre albúmina y moléculas (p.16).

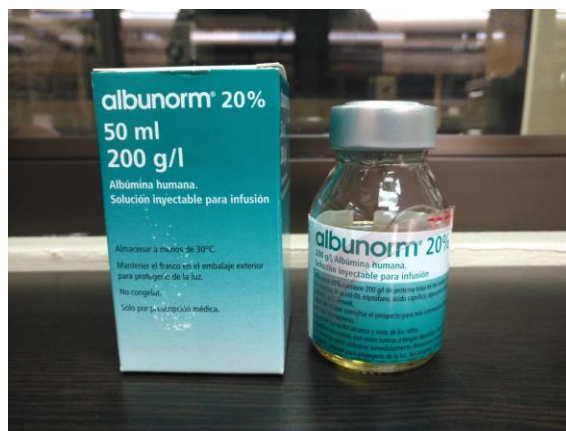
Esta proteína también es de vital importancia para el mantenimiento del 80% de la presión osmótica de la sangre (evita la fuga de líquidos a los tejidos). El peso molecular elevado de las proteínas hace que estas tiendan a acumularse en el plasma sanguíneo, resultando menos abundantes en el líquido intersticial. A diferencia de las moléculas pequeñas como el sodio y el cloro, la concentración de albúmina en la sangre es mucho mayor en el líquido extracelular (Ávila, 2010; Fox, 2016; Vargas, 2006, p. 17).

Cabe aclarar que se denomina *presión osmótica* o *presión coloidosmótica* al efecto osmótico en el conjunto de las proteínas; esto significa que no es más que el gradiente que establecen las proteínas en un determinado compartimiento para arrastrar agua, ya que, por su carácter químico, estas no pueden atravesar membranas, pero tienen carga polar negativa, por lo que atraen moléculas de agua (Kennelly et al., 2016).

Asimismo, la HSA posee otras funciones como: generar un balance ácido-base, ya que tiene función de amortiguador en la sangre, capturar radicales libres al unirlos a sus grupos sulfhidrilo, tiene efecto antioxidante y anticoagulante y afecta la permeabilidad vascular. Debido a la gran variedad de funciones de esta proteína, es importante conocer que la albúmina se aísla, purifica y se concentra del plasma humano para obtener presentaciones de ella en frascos de 50 a 100 mL, en soluciones al 5%, 20% y 25% que son muy estables, con el fin de emplear en indicaciones de uso clínico (Maíz, 1993, pp. 204-205).

En Costa Rica, Alburnorm<sup>®</sup> 20% es el nombre comercial de una solución de albúmina inyectable para infusión (véase la figura 4). Este producto pertenece al grupo farmacoterapéutico: Sustitutos de la sangre y fracciones de proteínas plasmáticas, el cual se administra a los pacientes para restablecer y mantener el volumen de sangre circulante, donde está identificada una deficiencia de volumen.

**Figura 4. Albúmina Humana. Solución Inyectable para Infusión**



Nota: Elaboración propia, 2018.

Por lo tanto, entre sus indicaciones de uso clínico se encuentran: hipoalbuminemia ( $<2,5$  g/dL), síndrome de distress respiratorio del adulto (cuadro caracterizado por edema pulmonar por aumento de la permeabilidad capilar, asociado a hipoalbuminemia generalmente), quemaduras extensas asociadas a hipovolemias, además de intolerancia a nutrición enteral (malabsorción y diarrea debido a hipoalbuminemia grave) (Maíz, 1993, p. 205).

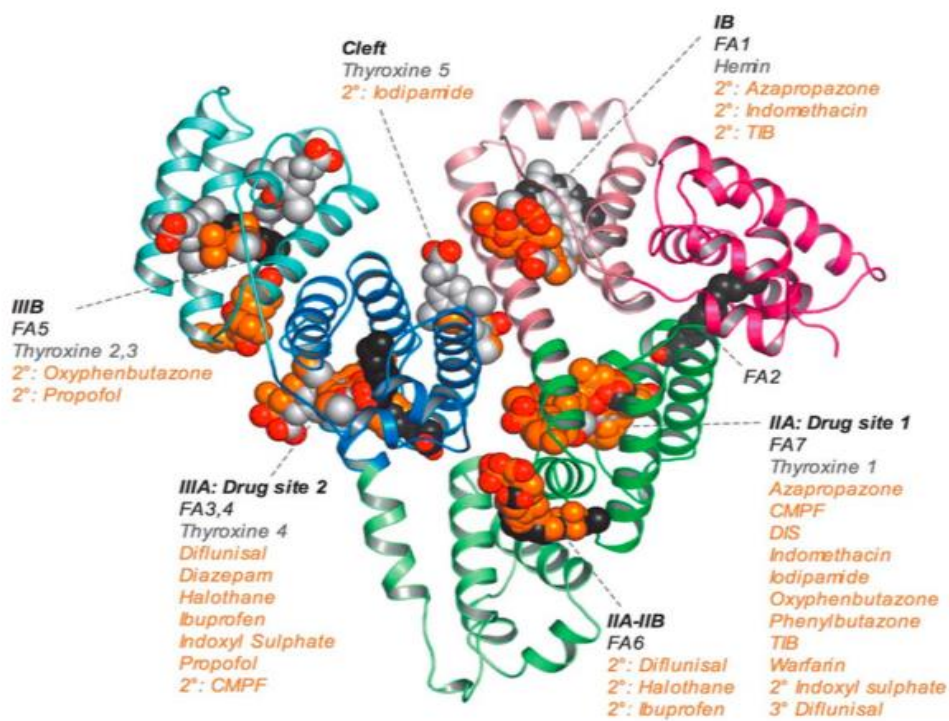
### **Sitios de unión en la HSA**

Muchos fármacos circulan en el torrente sanguíneo unidos a ciertas proteínas plasmáticas. Para el desarrollo de esta investigación, es necesario tomar en cuenta que la albúmina sérica humana es la máxima responsable de la fijación a fármacos. Además, Buxton y Benet (2012) la describen como el transportador fundamental para los fármacos ácidos y mencionan que, del fármaco total, la fracción plasmática que se une a la proteína depende de la concentración del fármaco, su afinidad por los sitios de unión y el número de estos últimos.

La cadena de 585 aminoácidos de la HSA contiene tres dominios helicoidales homólogos (I, II y III) y cada uno de ellos dividido en subdominios (A y B). La HSA tiene 2 sitios principales de unión y, como ya se ha aclarado, la proteína se encarga de transportar sustancias tanto endógenas como exógenas. Dicha proteína (véase la figura 5) se une en múltiples sitios a una amplia variedad de estos ligandos endógenos (ácidos grasos, bilirrubina y tiroxina), todos ellos compuestos ácidos, lipófilos. (Ghuman et al, 2005, p. 38; Márquez et al., 2013, p. 46; Otsu et al., 2010, p. 191).

Muchos fármacos de uso común con características ácidas o electronegativas (warfarina, diazepam, ibuprofeno) también se unen a la albúmina, generalmente en uno de los dos sitios principales (1 y 2), ubicados en los subdominios IIA y IIIA, respectivamente (Ghuman et al, 2005, p. 38; Márquez et al., 2013, p. 46; Otsu et al., 2010, p. 191).

**Figura 5. Capacidad de Unión de la Albúmina Sérica Humana al Ligando**



Nota: Ghuman et al., 2005, p. 48.

### Unión a Proteínas Plasmáticas

Una vez que el fármaco llega a circulación sistémica, la fracción libre es capaz de abandonar el espacio vascular y alcanzar los distintos órganos y tejidos, donde se fijará con mayor o menor intensidad a las proteínas u otros componentes tisulares (Ritschel y Kearns, 2004).

La unión de fármacos a proteínas plasmáticas no solo influye de manera importante en su comportamiento farmacocinético, al limitar la distribución y eliminación de un medicamento, sino también su farmacodinamia, ya que solamente la fracción libre se encuentra disponible para alcanzar a los receptores, con el fin de lograr un efecto farmacoterapéutico (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 85).

#### Fijación a proteínas plasmáticas

A pesar de que el plasma sanguíneo contiene más de 60 proteínas con múltiples funciones, las más importantes desde el punto de vista de fijación a fármacos se encuentran incluidas en la siguiente tabla:

**Tabla 2. Principales Proteínas Plasmáticas que Intervienen en la Fijación a Fármacos**

<b>Proteína</b>	<b>Masa molecular (Da)</b>	<b>Niveles plasmáticos normales (g/L)</b>
<b>Albúmina</b>	65.000-69.000	35-50
<b><math>\alpha</math>1-glicoproteína ácida</b>	41.000-44.000	0,4-1,0
<b>Lipoproteínas</b>	200.000-3.400.000	variable

Nota: Doménech et al., 2013, p. 86.

Los autores Ritschel y Kearns (2004) indican que, en el torrente sanguíneo, la interacción más importante se produce a nivel de proteínas plasmáticas; los fármacos se pueden fijar a ellas mediante uniones físicas reversibles, por ejemplo: puentes de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals. Los grupos hidroxilo y carboxilo que componen la cadena de aminoácidos de las proteínas son los responsables de dicha interacción reversible.

Cuando la unión a proteínas es reversible, la cantidad de fármaco unido actúa como un almacén, del cual se va liberando el fármaco activo lentamente y reemplazando al que ha sido eliminado, según lo mencionan Doménech et al. (2013) (p.85).

Por otro lado, la unión irreversible de un fármaco a una proteína es mucho menos frecuente y ocurre mediante un enlace covalente. A este proceso se le atribuye la responsabilidad de ciertos tipos de toxicidad que se presentan a corto o largo plazo. Doménech, Martínez y Plá Delfina (2001b) describen, como ejemplo, la hepatotoxicidad que se produce por la administración de dosis elevadas de acetaminofén, cuando metabolitos formados interaccionan con las proteínas hepáticas (p. 468).

### **Afinidad de fijación**

Es importante tener en cuenta que la mayoría de los fármacos son ácidos o bases débiles, por los cuales las proteínas del plasma tienen afinidad. Estos fármacos son electrólitos que en solución acuosa se encuentran en forma ionizada y no ionizada. La fracción ionizada es hidrosoluble y muy poco difusible (si el tamaño del ion es grande). Por el contrario, la fracción no ionizada es liposoluble y, por ende, es la única que difunde bien a través de la membrana celular (Aleixandre y Puerro, 2009, p. 16).

En el caso de un ácido (AH), este se disocia en su forma ionizada ( $A^-$ ) y libera, además, protones según la ecuación:  $AH \rightleftharpoons A^- + H^+$ , que es bidireccional. Si es una base (BOH), esta se disocia en su forma ionizada ( $B^+$ ) y genera aniones hidroxilo según la ecuación:  $BOH \rightleftharpoons B^+ +$

$\text{OH}^-$ , que es también bidireccional. Al aplicar la ley de acción de masas puede establecerse la  $pK$  (que se define como el logaritmo negativo de su constante de disociación) y su relación con el pH (ecuación 2: Henderson-Hasselbalch) (Aleixandre y Puerro, 2009, p. 16).

Para ácidos:

$$pKa = \log \frac{[\text{ácido no ionizado}]}{[\text{ácido ionizado}]} + pH$$

Para bases:

$$pKa = \log \frac{[\text{base ionizada}]}{[\text{base no ionizada}]} + pH$$

(2)

Esto permite deducir cuándo un fármaco es ácido o base, débil o fuerte. Por ejemplo, un ácido con un  $pKa$  bajo es un ácido muy disociable y, por lo tanto, muy fuerte. Un ácido con un  $pKa$  alto es, por el contrario, un ácido débil que se ioniza con dificultad. En el caso cuyos ácidos conjugados cuentan con un  $pKa$  alto son bases fuertes muy disociables, y los ácidos conjugados con  $pKa$  bajo son bases débiles que se ionizan con dificultad (Aleixandre y Puerro, 2009, p. 17).

Al considerar lo anterior, y recordando que la albúmina presenta afinidad por fármacos ácidos débiles, se han descrito sitios de unión en la molécula de la albúmina, en lo que a fijación de fármacos se refiere. Como se puede observar en la tabla 3, al sitio I se unen fármacos de estructura diversa y, como criterio de unión a este sitio, se utiliza la capacidad para desplazar a la warfarina. Las benzodiazepinas y ácidos carboxílicos se unen al sitio II, y el diazepam se ha utilizado como marcador de este sitio de unión (Doménech et al., 2013; Armijo, 2005).

**Tabla 3. Sustancias Unidas a los Sitios de Fijación de la HSA**

<i>Sitio I</i>	<i>Sitio II</i>
Warfarina	Diazepam
Flurbiprofeno	Ibuprofeno *
Furosemida	Ketoprofeno *
Fenilbutazona	Indometacina
Ketoprofeno	Flurbiprofeno *
Ibuprofeno	
Indometacina	
Ácido valproico	
Ácido salicílico	
Fenitoína	
Bilirrubina	

\*Sitio de unión principal de los fármacos que se unen a más de un lugar.

Nota: Doménech et al., 2013; Armijo, 2005.

La  $\alpha 1$ -glicoproteína tiene un único sitio de unión con elevada afinidad por medicamentos básicos muy liposolubles (véase la tabla 4). Sin embargo, se debe recordar que los niveles de esta proteína en plasma son bajos, en comparación con los niveles de albúmina; además, pueden saturarse a concentraciones terapéuticas del fármaco. Por lo tanto, se puede decir que la  $\alpha 1$ -glicoproteína tiene gran afinidad y baja capacidad de unión, y caso contrario ocurre con la albúmina, la cual presenta alta capacidad (Doménech et al., 2001b).

**Tabla 4. Fármacos que se unen a la  $\alpha$ -glicoproteína Ácida**

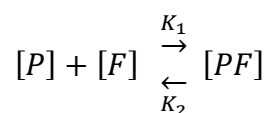
Betabloqueadores	Antiarrítmicos	Opiáceos	Antidepresivos	Otros
Propranolol	Verapamilo	Metadona	Amitriptilina	Eritromicina
Timolol	Bupivacaína	Petidina	Imipramina	Metoclopramida
	Lidocaína			Prednisona

Nota: Doménech et al., 2001b.

La tabla 2 señala que los valores de las lipoproteínas en plasma son muy variables; los factores causantes de esto son el sexo, edad, dieta y procesos patológicos, entre otros. Las grandes cantidades de lípidos que contienen estas proteínas explican su baja densidad al compararlas con otras proteínas del plasma. Fármacos altamente liposolubles con elevado volumen de distribución y generalmente básicos, son los que se fijan a estas proteínas. Entre ellos se destacan imipramina, diclofenaco, ciclosporina A (Armijo, 2005; Doménech et al., 2013, p. 88).

### Cinética de la unión a proteínas

Armijo (2005) brinda información sobre la fijación de fármacos a proteínas, un proceso reversible que sigue la ley de acción de masas, la cual se considera una de las fundamentales leyes de la química, y se describe en la ecuación 3. Se dice que esta ley establece la relación entre las concentraciones de reactivos y productos en un equilibrio químico a una temperatura determinada.



(3)

### Constantes de unión.

Armijo (2005), Buxton y Benet (2012) coinciden en que la cantidad de fármaco unido a proteínas (PF) depende de la concentración de fármaco libre (F), de la constante de asociación ( $K_1$ ) y disociación ( $K_2$ ) del complejo proteína-fármaco y de la concentración molar de proteína libre (P). Al alcanzar el equilibrio se tiene que:  $Ka = [PF] / [P][F]$ , donde Ka es la constante de afinidad que permite conocer el grado de unión del fármaco a la proteína y se define en la ecuación 4.

$$Ka = \frac{K_1}{K_2}$$

(4)

Cuando un fármaco presenta valores de Ka entre  $10^5$  y  $10^7$  L/mol significa que cuenta con una alta capacidad de fijación, mientras que valores entre  $10^2$  y  $10^4$  L/mol corresponden a fármacos con baja o moderada capacidad de unión a proteínas.

### Grado de unión a proteína.

La eficiencia de un medicamento puede verse afectada por el grado de unión a las proteínas, también llamada *fracción de fármaco unida* ( $f_u$ ). Este relaciona la concentración de fármaco unido ( $C_u$ ) y la concentración total de fármaco ( $C_t$ ) (véase la tabla 5). Es importante recalcar que, en los fármacos con alto grado de unión, un cambio pequeño en la fracción de fármaco unido produce grandes cambios en la fracción libre ( $f_l$ ) (Doménech et al., 2013, p. 93).

**Tabla 5. Valores de la Fracción Unida (fu)**

<b>Grado de unión a proteínas</b>	
<b>F<sub>u</sub> &gt; 0,9</b>	Unión a proteína alta
<b>F<sub>u</sub> &lt; 0,2</b>	Unión a proteína escasa

Nota: Datos recopilados de Doménech et al., 2013, p. 93.

Esto significa que, si la  $f_u$  cambia de 0,99 a 0,98, la fracción libre del medicamento ( $f_i$ ) se duplica, de modo que su valor pasa de 0,01 a 0,02. Esto en porcentaje es un aumento del 1 al 2% de fármaco libre en plasma. Desde el punto de vista farmacoterapéutico, se tiene más interés en la concentración de fármaco libre ( $C_l$ ) que en la concentración unida ( $C_u$ ), ya que el fármaco capaz de atravesar la mayor cantidad de membranas y ejercer efecto farmacológico es el libre. Dicha fracción de fármaco libre se puede calcular mediante la ecuación 5:

$$f_i = \frac{1}{1 + K_a[P]} \quad (5)$$

Donde se puede observar que la fracción libre depende de la constante de afinidad ( $K_a$ ) y de la concentración de proteína libre ( $P$ ) (Doménech et al., 2013, p. 96).

### **Volumen de distribución.**

Un proceso necesario para que el fármaco, una vez absorbido, alcance su sitio de acción, es su distribución. Desde que las moléculas del fármaco ingresan a circulación experimentan transporte pasivo mediante proteínas plasmáticas hacia todas las regiones del organismo. La distribución del fármaco en los diferentes sitios del organismo depende de sus propiedades fisicoquímicas, así como del flujo sanguíneo con que son irrigadas las diferentes estructuras del organismo y de la unión del fármaco a las proteínas del plasma, debido a que solo se puede difundir a los tejidos el fármaco libre (Aïache et al., 1983, p.487; Armijo, 2005, p. 48).

Teóricamente, el volumen de distribución ( $V_d$ ) simboliza el volumen acuoso del organismo, en el cual cierta cantidad de fármaco es capaz de distribuirse según sus características fisicoquímicas. Esto quiere decir que cuantifica la distribución de un medicamento en todo el cuerpo luego de ser administrado vía oral o parenteral (Doménech, J., Martínez, J. y Plá Delfina, J., 2001a, p. 64).

Otra definición está dada por Winter (1994), quien anota que el volumen de distribución simplemente es el tamaño de un compartimento, indispensable para contener la cantidad de fármaco en el cuerpo, si estuviera en todo el organismo a la misma concentración que se encuentra en el plasma. Dicho en otra forma, si el organismo estuviera organizado como un compartimento único en cuya agua se distribuyera el fármaco uniformemente, se podría calcular ese volumen dividiendo la cantidad administrada entre la concentración plasmática alcanzada, que sería la misma que en el resto del organismo (p. 24).

Pero en realidad, el fármaco que hay en nuestro cuerpo no solo está disuelto en el agua corporal, sino que también puede estar unido a los tejidos y a las proteínas del plasma. Debido a esto, el volumen de distribución ( $V_d$ ) no es un volumen real, sino un volumen aparente que relaciona la cantidad total del fármaco, que hay en el organismo, con la concentración plasmática en un momento determinado (Armijo, 2005, p. 62).

Su ecuación se expresa de la siguiente manera:

$$V_d = \frac{Q}{C} \quad (6)$$

En la que Q es la cantidad de fármaco en el cuerpo y C la concentración de fármaco en el plasma. Es decir, el  $V_d$  aparente de un fármaco es el volumen en que tendría que disolverse la dosis que fue administrada de un medicamento para alcanzar la concentración plasmática observada (Armijo, 2005, p. 62; Doménech et al., 2001a, p. 65). Mencionado esto, el  $V_d$  real de los fármacos en un individuo adulto sano podría tomar los siguientes valores:

**Tabla 6. Volumen de Distribución de Fármacos en Individuo Adulto Sano**

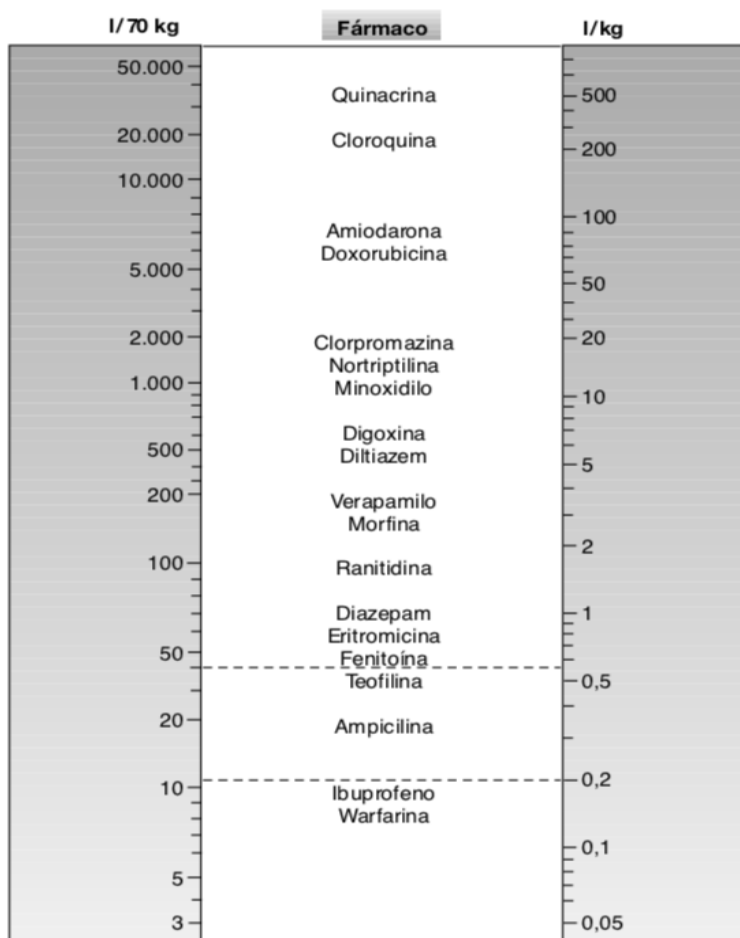
<b>Volumen (L)</b>	<b>Distribución</b>
<b>3,5 L</b>	Fármacos sin capacidad de paso a través de las membranas vasculares ni celulares (confinados en espacio vascular)
<b>15,5 L</b>	Fármacos con capacidad de atravesar membranas vasculares, pero no celulares
<b>42 L</b>	Fármacos con capacidad de atravesar todo tipo de membranas biológicas del organismo

Nota: Información tomada de Doménech et al., 2013, p. 78.

La formación de complejos fármaco-proteína puede condicionar la distribución y eliminación del fármaco. Esto significa que, cuando un fármaco presenta alto grado de fijación a proteínas plasmáticas, el volumen de distribución se reduce al quedar confinado el complejo fármaco-proteína en el compartimento vascular. Caso contrario ocurre con los fármacos que no se unen a proteínas plasmáticas, o lo hacen poco; sus valores de volumen de distribución suelen ser elevados (Doménech et al., 2001b, p. 467).

Armijo (2005) menciona que la unión a las proteínas plasmáticas aumenta la concentración total del fármaco en plasma, la que se mide generalmente; esto ocasiona que el fármaco se distribuya en un volumen menor del volumen real. Un ejemplo de esto es un fármaco con un volumen de distribución real de 40 L (0,6 L/kg), con alta capacidad de unión a las proteínas plasmáticas, dará la impresión de distribuirse en tan solo 7 L (0,1 L/kg) (p. 62). En la siguiente figura se muestran ejemplos de valores correspondientes al Vd aparente de diferentes fármacos:

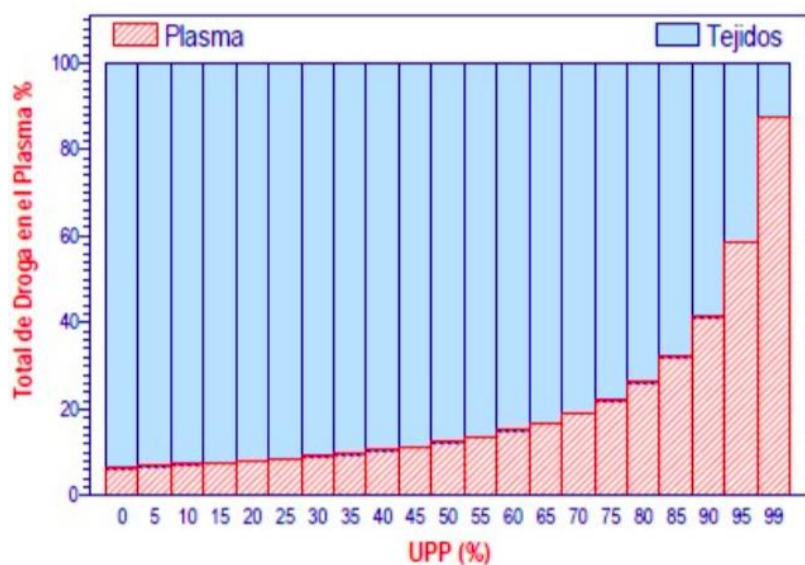
**Figura 6. Volumen de Distribución Aparente de Distintos Fármacos**



Nota: Armijo, 2005, p. 63.

Las líneas discontinuas en la figura 5 indican el volumen real del plasma (3 L), el líquido intersticial (12 L) y el agua intracelular (40 L) aproximadamente. Adicionalmente, se observa que el volumen de distribución de los fármacos es mucho menor que el real, debido a su fuerte fijación a las proteínas (Armijo, 2005, p. 63). Esto se logra visualizar de manera gráfica en la figura 7, donde se muestra cómo varía la distribución de un medicamento con respecto a la unión a proteínas plasmáticas (UPP), asumiendo una distribución monocompartimental; es decir, un único compartimento que represente en el organismo una distribución homogénea (Pascuzzo, 2008, p. 46).

**Figura 7. Distribución de un Medicamento con Respecto a la Unión a Proteínas Plasmáticas (UPP)**



Nota: Pascuzzo, 2008, p. 46.

Más del 80 % del fármaco administrado pasa a los tejidos cuando se presentan valores de UPP menores al 70 %, lo que significa que se acumula la mayor parte del fármaco en el plasma solamente cuando la UPP es mayor al 90 % (Pascuzzo, 2008, p. 46).

## **Factores que modifican la unión a proteínas**

Se ha mencionado que la unión fármaco-proteína, la afinidad de fijación y el grado de unión dependen de ciertos factores como propiedades fisicoquímicas, constantes de asociación y disociación, sitios de unión, entre otros. Sin embargo, el grado de unión de los fármacos a proteínas del plasma también puede alterarse por una o varias causas. Entre ellas Doménech et al. (2001b) puntualizan:

### **Variaciones en la concentración de proteínas plasmáticas.**

Las variaciones en la concentración proteica, como consecuencia de alteraciones en su síntesis, catabolismo o su distribución relacionados con problemas fisiológicos o patológicos, es considerada factor principal de modificación de la fracción de fármaco unido o grado de unión. Por ejemplo: la edad, la gestación y aspectos relacionados con el estilo de vida se consideran factores fisiológicos que afectan la concentración de proteínas plasmáticas (pp. 485-486).

El organismo, al reaccionar ante un proceso patológico agudo, puede producir niveles bajos de albúmina y elevados de gamma-globulinas. En la tabla 7 se ejemplifican casos que producen variaciones en los niveles plasmáticos de proteínas (Armijo, 2005, p. 64).

**Tabla 7. Factores Patológicos Asociados a Cambios en Niveles Plasmáticos de Proteínas**

<b>Disminuyen</b>	<b>Aumentan</b>
<b><i>Albúmina</i></b>	
Cirrosis hepática	Ejercicio
Cirugías	Hipotiroidismo
Insuficiencia renal	Psicosis
Quemaduras	
Traumatismos	
<b><i>gamma-globulinas</i></b>	
	Artritis reumatoide
Anticonceptivos orales	Estrés
Síndrome nefrótico	Infarto de miocardio
	Insuficiencia renal
<b><i>Lipoproteínas</i></b>	
Hipertiroidismo	Diabetes
Traumatismos	Hipotiroidismo

Nota: Información recopilada de Armijo, 2005, p. 64.

En la tabla 8, de manera más específica, Doménech et al. (2001b) hacen referencia a factores patológicos que conllevan a modificaciones en la concentración de albúmina plasmática.

**Tabla 8. Aumento o Disminución de la HSA**

<b>Nivel de proteína en plasma</b>	<b>Factor patológico</b>	
<b>Albúmina baja</b>	IAM	Fiebre reumática
	Neumonía	Peritonitis
<b>Albúmina muy baja</b>	Tumores malignos	Fibrosis quística
	Quemaduras	IH, IR
<b>Albúmina alta</b>	Enfermedades mentales (esquizofrenia, psicosis)	

Nota: Datos recopilados de Doménech et al., 2001b, pp. 486-487.

### **Alteraciones en la estructura molecular de la proteína.**

Alteraciones estructurales conducen a cambios en la afinidad del fármaco por la proteína, y también pueden ser consecuencia de diversos procesos patológicos (enfermedades renales, hepáticas, artritis reumatoide) o por fármacos. Tal es el caso de la unión covalente del grupo acetilo del ácido acetilsalicílico al aminoácido lisina de la albúmina; este proceso se conoce como acetilación de la albúmina y puede afectar, ya sea aumentando o disminuyendo la afinidad de otros fármacos por la albúmina (p. 487).

### **Interacciones con sustancias endógenas o fármacos.**

Según la información que ofrecen Linares et al. (2002), cuando se habla de interacción medicamentosa se hace referencia a la modificación que sufre el efecto de un fármaco por la presencia simultánea de otro u otros fármacos, sustancias fisiológicas y sustancias exógenas no

medicamentosas en el organismo, lo que se traduce en una disminución de la eficacia del medicamento o aumento de la toxicidad (p. 139).

La interacción entre un fármaco y sustancias endógenas o entre dos fármacos distintos provoca un desplazamiento de la sustancia unida a proteínas, debido a una competencia por los mismos sitios de unión. Tal es el caso de la bilirrubina, los salicilatos, la fenilbutazona, el ácido hidroxifenilazobenzóico, el tiopental y el triptófano, con los que se han encontrado aumento en sus fracciones libres en plasma por interacción con ácidos grasos (tras una ingesta abundante de grasas) (Doménech et al., 2001b, p. 488; San Miguel, Vargas y Martínez, 2004, p. 165).

Doménech et al. (2001b) también hacen mención a otro ejemplo de interacción entre un fármaco y hormonas como la tiroidea y el cortisol, e indican que un pequeño desplazamiento de estas hormonas raramente produce problemas, porque se dan mecanismos de control fisiológicos de feedback, lo que quiere decir que estos mecanismos de retroalimentación logran que nuestro organismo se autorregule, para tratar de mantener el estado de equilibrio frente a las alteraciones externas, y así no surjan afectaciones (p. 488).

Generalmente, el desplazamiento de sustancias endógenas unidas a proteínas por fármacos no es de gran relevancia. No obstante, específicamente en niños, el desplazamiento de la bilirrubina unida y, por ende, el aumento de su fracción libre en plasma puede causar retraso mental e incluso la muerte, ya que en recién nacidos se dificulta la eliminación de esta sustancia endógena (p.488).

### ***Desplazamiento de fármacos.***

Pascuzzo (2008) habla de un acontecimiento de gran importancia en cuanto a interacciones medicamentosas. La posible competencia entre dos fármacos administrados de

manera simultánea es causa de modificación de la fracción libre de uno de ellos, siendo de gran repercusión, puesto que ciertos fármacos logran desplazar a otros de su unión a proteínas plasmáticas, incrementando la fracción libre del desplazado y, como consecuencia, obteniendo mayor efecto farmacológico (p. 45).

Ahora bien, una serie de circunstancias indican que se puede producir un desplazamiento significativo en la proteína: cuando hay un alto grado de unión del fármaco desplazado, pues el fármaco desplazante y el desplazado compiten por los mismos puntos de unión, cuando la suma de la concentración de ambos fármacos es similar a la capacidad de unión de la proteína, y cuando el fármaco desplazante presenta mayor afinidad que el desplazado (Doménech et al., 2001b, p. 488).

En relación con lo anterior, se puede decir que el efecto del desplazamiento de un fármaco por otro no está determinado únicamente por la magnitud del desplazamiento, sino que también depende de cuál sea la unión a proteína plasmática (UPP) original que presente el fármaco que es desplazado (Pascuzzo, 2008, p. 46). La tabla 9 ejemplifica, con 3 fármacos distintos, el efecto del desplazamiento.

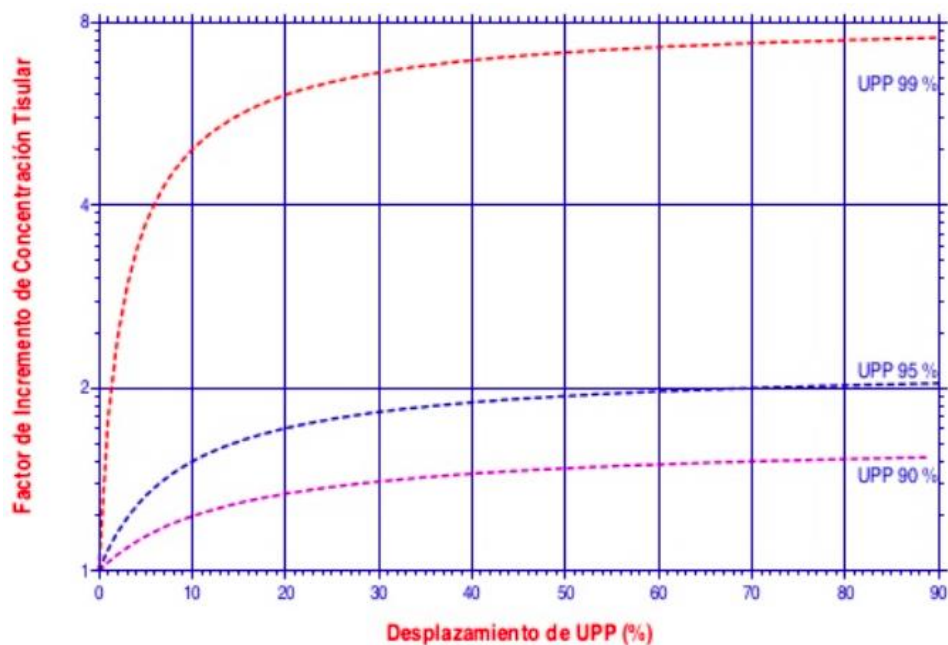
**Tabla 9. Efecto del Desplazamiento de Fármacos Sobre su Concentración Libre**

<b>Fármaco</b>	<b>% UPP original</b>	<b>% desplazamiento</b>	<b>Concentración fármaco libre</b>
<b>1</b>	99 %	2 %	duplicada
<b>2</b>	95 %	70 %	duplicada
<b>3</b>	90 %	100 %	no hay aumento considerable

Nota: Datos recopilados de Pascuzzo, 2008, p. 47.

En caso de que el fármaco cuente con un valor de UPP bastante alto, incluso desplazamientos limitados podrían ser capaces de aumentar notablemente la concentración tisular o libre del fármaco desplazado (fármaco 1). Un valor de UPP del 95 % requiere de un desplazamiento del 70 % para solamente duplicar la concentración libre del fármaco (fármaco 2). Pero si el fármaco se une a la proteína en un 90 %, ni siquiera desplazarlo en su totalidad de la proteína puede afectar de manera importante su concentración tisular (fármaco 3). Para ilustrar esto se tiene la figura 8.

**Figura 8. Aumento de la Concentración Libre del Fármaco según su Desplazamiento**



Nota: Pascuzzo, 2008, p. 47.

Por esta razón, solo cuando la unión a proteína plasmática (UPP) original del fármaco desplazado es sumamente alta, se puede esperar que su concentración tisular (libre) muestre aumento significativo y, como consecuencia, también incremente el riesgo de reacción adversa y toxicidad (Pascuzzo, 2008, p. 47).

Es preciso señalar que, en esta investigación, se toman en cuenta medicamentos de dos grupos farmacológicos distintos, pero con características fisicoquímicas similares que llevan a interacciones medicamentosas por desplazamiento. Dichos fármacos son la warfarina y el ibuprofeno.

## **Anticoagulantes Cumarínicos**

El uso clínico de los anticoagulantes cumarínicos se inició con el descubrimiento de una sustancia anticoagulante formada en la planta de trébol dulce de olor podrido, que causaba enfermedad hemorrágica en el ganado. En 1940, un químico en la Universidad de Wisconsin identificó al agente tóxico como bishidroxycumarina (dicumarol), del cual desarrollaron derivados sintéticos, siendo la warfarina el más importante. En ese momento se empezaron a utilizar como eliminadores de roedores. Posteriormente, se identificó la capacidad de la warfarina como anticoagulante terapéutico y se introdujo como antitrombótico, bajo el nombre comercial de Coumadin en 1954. (Quintero, 2010, p. 270; Zehnder, 2016).

### **Warfarina**

La warfarina es el anticoagulante oral de elección, en la prevención primaria y secundaria, a corto y largo plazo de eventos trombóticos en pacientes con tromboembolismo venoso, fibrilación auricular, sustitución de válvulas cardíacas, enfermedad arterial coronaria y en individuos con alto riesgo quirúrgico (por ejemplo, cirugías ortopédicas o ginecológicas), profilaxis en el infarto recurrente del miocardio; en fin, situaciones en las cuales se ha demostrado ampliamente su eficacia y seguridad (Quintero, 2010, p. 276; Weitz, 2012).

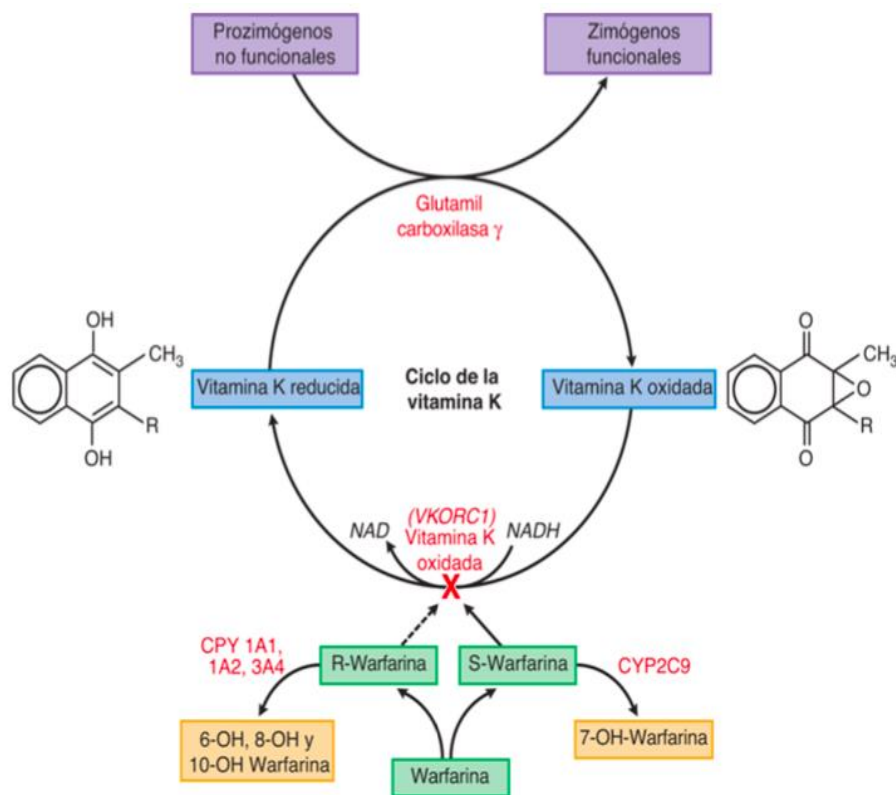
### **Mecanismo de acción.**

Con base en información brindada por Weitz (2012) y Zehnder (2016), es un antagonista de la vitamina K, debido a que actúan sobre los factores de coagulación que dependen de esta vitamina para su activación. Esto quiere decir que su acción se produce por la inhibición de los cofactores dependientes de la vitamina K (los factores de coagulación II, VII, IX y X, así como los factores reguladores de proteína C y proteína S) en la cascada de coagulación. Los

precursores de estos factores requieren carboxilación, para permitir que los factores de coagulación se unan a las superficies fosfolípicas dentro de los vasos sanguíneos, en el endotelio vascular.

Los mismos autores mencionan que la warfarina inhibe la enzima epóxido reductasa, por lo que disminuye la vitamina K y la hidroquinona en los tejidos, lo cual inhibe la carboxilación de los residuos de ácido glutámico de los factores de coagulación (mediada por la enzima glutamil-carboxilasa), tal y como se muestra en la figura 9. Cuando esto ocurre, los factores de coagulación ya no son carboxilados de nuevo, y son incapaces de enlazarse a la superficie endotelial de los vasos sanguíneos y, por lo tanto, son biológicamente inactivos. De esta manera se reduce la capacidad de coagulación de la sangre.

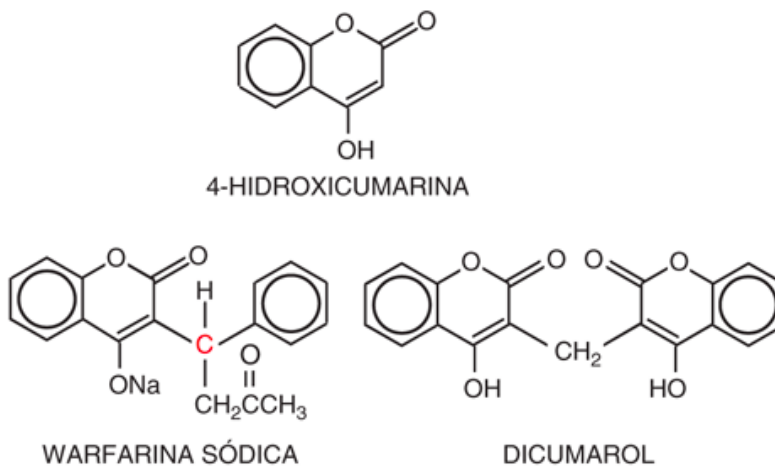
**Figura 9. Mecanismo de Acción de la Warfarina**



Nota: Weitz (2012).

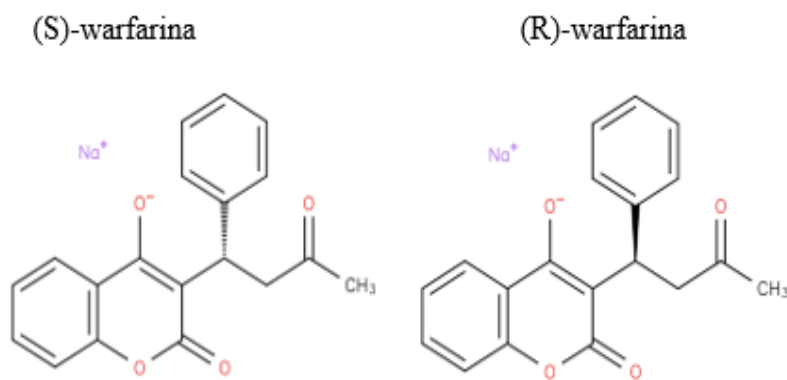
La descripción en cuanto a su estructura química (véase la figura 10), la molécula original de la cual derivan los antagonistas de vitamina K (warfarina y dicumarol) es la 4-hidroxicumarina. Se señala en rojo el átomo de carbono asimétrico en la cumarina. La warfarina sódica, o 3-( $\alpha$ -acetoniiben-cil)-4-hidroxicumarina, es una mezcla racémica de dos isómeros ópticos activos, la S-warfarina y R-warfarina (véase la figura 11), siendo el primer isómero cinco veces más potente en el antagonismo de la vitamina K que el segundo (Quintero, 2010, p. 270; Torres, 2010, p. 26).

**Figura 10. Estructura de los Antagonistas de Vitamina K**



Nota: Weitz (2012).

**Figura 11. Isómeros S y R de la Warfarina Sódica**



Nota: Chemical Entities of Biological Interest (ChEBI).

### **Propiedades farmacocinéticas.**

Entre sus propiedades farmacocinéticas se encuentra una biodisponibilidad casi completa, debido a su rápida absorción; el efecto anticoagulante inicia de 8 a 10 h después de ser administrada, y el efecto máximo se alcanza en un lapso de 72 a 96 h. La duración del efecto de una sola dosis de warfarina es de dos a cinco días. Se une de manera amplia (99%) a las proteínas plasmáticas, particularmente a la albúmina (véase la figura 15). Se metaboliza en el hígado y se excreta, junto con sus metabolitos, principalmente en la bilis. Su vida media de eliminación es de 20 a 89 h para el enantiómero R y de 18 a 43 h para el enantiómero S. Además, atraviesa con facilidad la barrera placentaria (Rodríguez, 2013; Weitz, 2012).

Cabe destacar que un control inadecuado, de este fármaco, no solo hace ineficaz la prevención de la enfermedad tromboembólica, sino que puede generar complicaciones graves o mortales. El riesgo más importante y frecuente es la hemorragia, y puede ocurrir en cualquier sitio. Diversos medicamentos pueden modificar el efecto anticoagulante de la warfarina y generar un peligro potencial (Rodríguez, 2013; López, 2014, p. 748).

### **Interacciones entre medicamentos.**

La warfarina posee múltiples interacciones medicamentosas; por ejemplo, la administración simultánea de fármacos antiinflamatorios no esteroideos aumenta el riesgo de hemorragia como consecuencia de un antagonismo competitivo; es decir, ocurre un bloqueo del efecto de la warfarina al competir por el mismo sitio de fijación en la proteína plasmática. En la tabla 10 se mencionan diferentes medicamentos de uso común que, por distintos mecanismos, interaccionan con la warfarina (López, 2014, p. 748).

**Tabla 10. Interacciones Medicamentosas con la Warfarina**

<b>Ivermectina (VO)</b>	<b>Alopurinol (VO)</b>
<b>Metronidazol (VO, topico)</b>	<b>Tramadol (IM)</b>
<b>Amoxicilina (VO)</b>	<b>Lidocaína (SC)</b>
<b>Bencilpenicilina Sódica (IM)</b>	<b>Dimenhidrinato (VO)</b>
<b>Bencilpenicilina Pótasica (IM)</b>	<b>Carbamazepina (VO)</b>
<b>Ceftriaxone (IM)</b>	<b>Valproato de Sodio (VO)</b>
<b>Claritromicina (VO)</b>	<b>Amilriptilina (VO)</b>
<b>Doxiciclina (VO)</b>	<b>Fluoxetina (VO)</b>
<b>Trimetoprim -Sulfametoxazol (VO)</b>	<b>Cimetidina (VO)</b>
<b>Ketoconazol (VO)</b>	<b>Esteroides (VO y Topico)</b>
<b>Ácido Acetil Salicílico (VO)</b>	<b>Anticonceptivos orales e IM</b>
<b>Colesteramina (VO)</b>	<b>Levotiroxina (VO)</b>
<b>Gemfibrozil (VO)</b>	<b>Fenitoína (VO)</b>
<b>Lovastatina (VO)</b>	
<b>AINES (Sulindaco, Ibuprofeno, Indometacina)</b>	

\*VO - Vía Oral; IM - Intramuscular

Nota: López, 2014, p. 748.

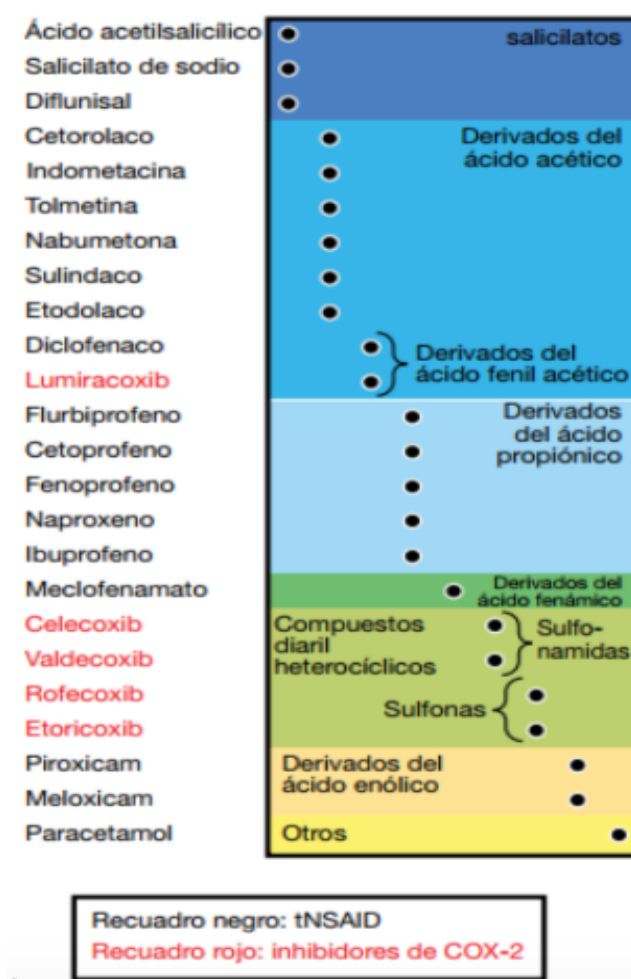
La tabla anterior señala un grupo farmacológico importante en el desarrollo de la presente investigación: los antiinflamatorios no esteroideos, al cual pertenece el ibuprofeno.

### **Antiinflamatorios No Esteroideos**

Los AINEs son un grupo de medicamentos que se obtienen de derivados de múltiples compuestos (véase la figura 12); es decir, son moléculas distintas unas de otras, por lo que tienen la característica de ser químicamente heterogéneos. A pesar de su diferencia estructural,

mantienen relación en cuanto a la actividad clínica y efectos. El amplio grupo de medicamentos incluyen los fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos. En la actualidad, dentro de sus acciones farmacológicas, también se debe considerar el efecto antiagregante plaquetario (Pérez, López y Grau, 2002, p. 120).

**Figura 12. Clasificación de los AINEs por Similitud Química**



Nota: Grosser, Smyth y FitzGerald (2012).

Se observa que existen diferentes familias en los AINEs, y entre ellas se encuentran los derivados del ácido propiónico, lo cuales son inhibidores no selectivos de la ciclooxigenasa (COX) que tienen acciones y efectos secundarios similares a los demás AINEs tradicionales. En este grupo terapéutico se encuentran ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno, fenoprofeno, oxaprozina y flurbiprofeno (Grosser, Smyth y FitzGerald, 2012).

### Mecanismo de acción

El mecanismo por el cual los derivados del ácido propiónico generan acción se basa en la inhibición no selectiva de la ciclooxigenasa, que es una enzima involucrada en la síntesis de prostaglandinas (mediadores del dolor y la fiebre) y tromboxanos (estimuladores de la coagulación de la sangre) a través de la vía del ácido araquidónico. Dicho mecanismo se ejemplifica con la figura 13 (Grosser et al., 2012; Pérez et al., 2002).

**Figura 13. Mecanismo de Acción de los Derivados del Ácido Propiónico**



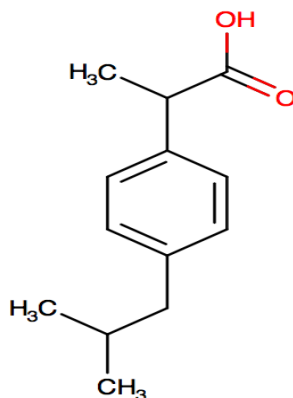
Nota: Elaboración propia (2018).

Esto significa que inhibe la actividad, tanto de la COX-1 como de la COX-2. La inhibición de la actividad de la COX-2 disminuye la síntesis de las prostaglandinas involucradas en la mediación de la inflamación, el dolor y la fiebre, mientras que se cree que la inhibición de la COX-1 causa algunos de los efectos secundarios del ibuprofeno, incluida la ulceración gastrointestinal, y se altera la capacidad que tiene un organismo para detener procesos hemorrágicos (hemostasia) (Grosser, 2012; Pérez et al., 2002).

## **Ibuprofeno**

El ibuprofeno o ácido 2-(4-isobutilfenil)propanoico se patentó en 1961; este medicamento se lanzó por primera vez contra la artritis reumatoide en el Reino Unido en 1969 y en Estados Unidos en 1974. Según Rodríguez (2013), por sus propiedades farmacológicas, es un fármaco indicado en síntomas agudos y crónicos de artritis reumatoide, osteoartritis, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante y gota aguda; de igual manera en tendinitis, bursitis, dolor lumbar, luxaciones, esguinces, cefaleas, odontalgias, dismenorrea y fiebre.

Se administra como una mezcla racémica (véase la figura 14), y posteriormente el enantiómero R inactivo sufre inversión quiral y se convierte en el isómero S activo. Se cree que el enantiómero S es más farmacológicamente activo (DrugBank).

**Figura 14. Estructura del Ibuprofeno**

Nota: DrugBank.

### **Propiedades farmacocinéticas.**

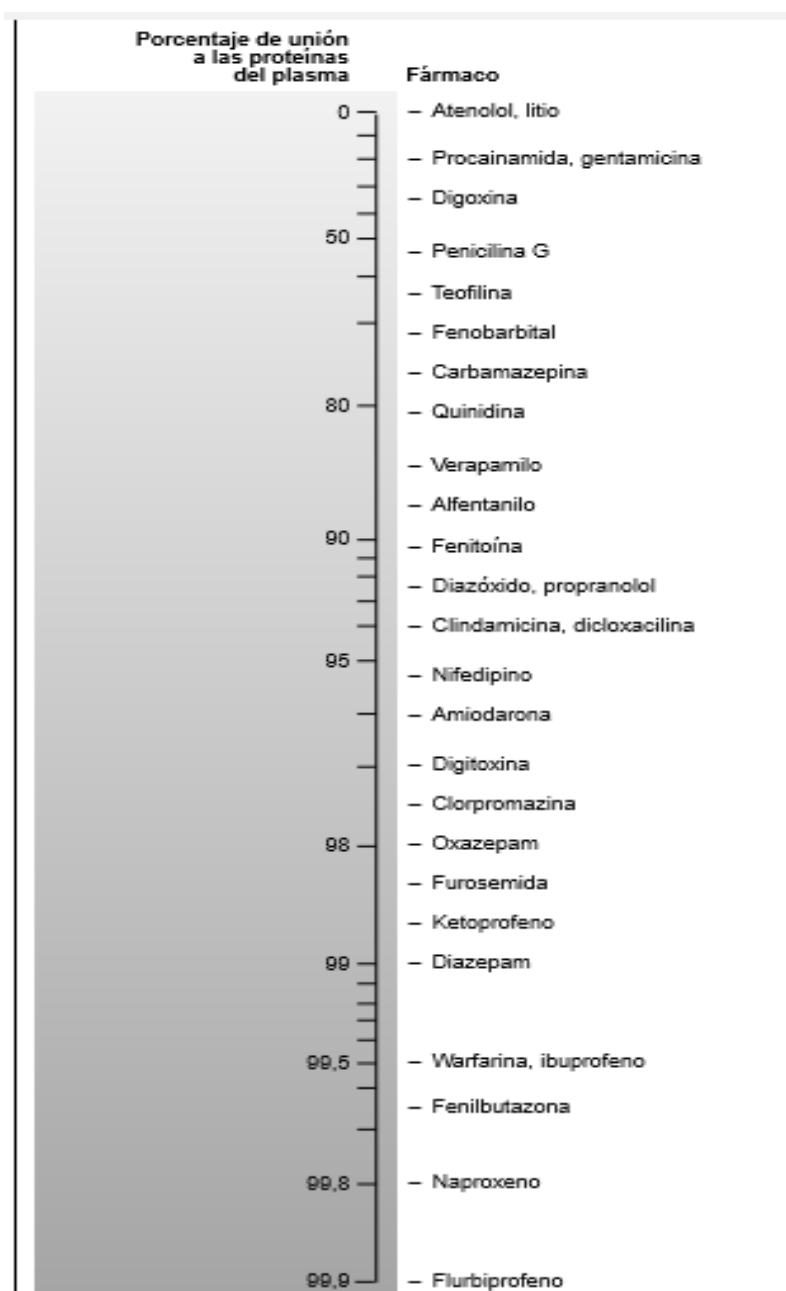
Dentro de sus propiedades, se menciona buena absorción a través de la mucosa gastrointestinal, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas en 1 a 2 h después de administración oral. Vía rectal, estas concentraciones se logran más lentamente. Aproximadamente el 99% se fija a las proteínas plasmáticas (véase la figura 15) y se distribuye en forma amplia en el organismo; además, atraviesa la barrera placentaria. Se metaboliza a nivel hepático y cuenta con una vida media de eliminación de 1.8 a 2 h (Alonso, 2015; Grosser, 2012; Rodríguez, 2013).

### **Afinidad de Fijación de la Warfarina e Ibuprofeno en la HSA**

La unión de los fármacos a las proteínas del plasma es muy variable; sin embargo, en la figura 13 se observa que tanto la warfarina como el ibuprofeno poseen alto grado de unión a las proteínas, representado en porcentaje del 99%. La fijación a la albúmina es la más abundante e

importante; los fármacos mencionados son de naturaleza ácida y presentan un valor de pKa (constante de acidez) de 4.91 y 5.87 respectivamente (Armijo, 2005, p. 57; PubChem, 2018).

**Figura 15. Variabilidad en la Unión de los Fármacos a las Proteínas**

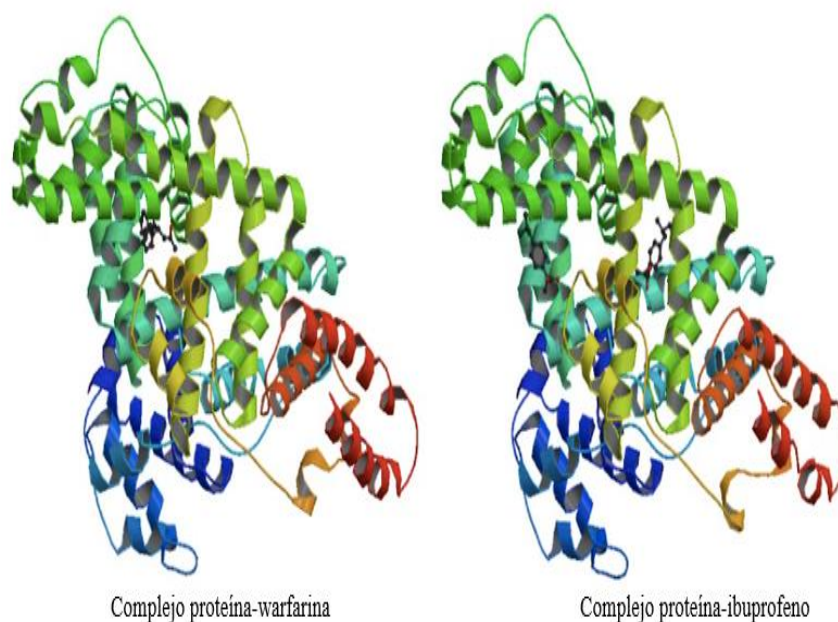


Nota: Armijo, 2005, p. 57.

### Sitios de unión en la HSA de la warfarina e ibuprofeno

La tabla 2, de este capítulo, indica que ciertos medicamentos tienen la capacidad de unirse a varias proteínas plasmáticas. Para el caso de los fármacos de interés, warfarina e ibuprofeno, estos se fijan a la albúmina en el sitio I y II respectivamente (véase la figura 16). Sin embargo, el ibuprofeno es capaz de unirse también al sitio I y, de esta manera, generar un desplazamiento de la warfarina en la proteína (Doménech et al., 2013; Armijo, 2005).

**Figura 16. Fijación de la Warfarina e Ibuprofeno en la HSA**



Nota: Protein Data Bank.

Finalmente, Armijo (2005) menciona otras características de la warfarina y el ibuprofeno, debido a su unión en la albúmina (véase la figura 17). Entre ellas se describe a la warfarina como un fármaco que suele ser desplazado y posee un volumen de distribución de 11 L y, por el

contrario, el ibuprofeno suele ser causa de desplazamiento y cuenta con un volumen de distribución de 10 L. Como consecuencia de la alta fijación a la albúmina, dicho volumen de distribución es menor, siendo entre 0,1 y 0,2 L/kg para ambos fármacos (en un individuo sano de 70kg); esto se refleja en la figura 4 de este capítulo.

**Figura 17. Características de Algunos Fármacos con Alta Unión a las Proteínas del Plasma**

	Unión a proteínas	Tipo de proteína	Fracción de extracción	Volumen de distribución
Acetilsalicílico <sup>a</sup>	#	I, II	•	11
Amitriptilina	> 90	•	P	1.085
Anfotericina B	96	A, $\alpha$	G	280
Clindamicina	94	•	•	56
Clofibrato	#	•	P	8
Clorotiazida	95	I	P	—
Clorpromazina	> 95	•	G	1.470
Diazepam <sup>b</sup>	99	II	P	140
Diazóxido	90	•	•	15
Dicloxacilina <sup>a</sup>	94	II	P	14
Dicumarol <sup>b</sup>	99	I, II	•	11
Diflunisal	98	I, II	•	8
Digitoxina	90	d	P	32
Disopiramida	#	A, $\alpha$	•	182
Doxiciclina	90	•	P	49
Fenilbutazona <sup>a</sup>	#	I	P	12
Fenitoína <sup>b</sup>	90	I	P	56
Flurbiprofeno	100	II, I	•	7
Furosemida	96	I	P	21
Glibenclamida <sup>b</sup>	99	I, II	•	11
Heparina	95	L	•	5
Ibuprofeno	99	II	•	10
Imipramina	> 90	A, $\alpha$	•	1.470
Indometazina <sup>b</sup>	90	I, II	•	14
Ketoprofeno	92	II	•	8
Lorazepam	93	II	P	105
Naproxeno <sup>a</sup>	98	II, I	•	7
Nortriptilina	95	A, $\alpha$	•	1.470
Prazosina	93	•	•	35
Propranolol	93	A, $\alpha$ , L	S	196
Sulfisoxazol <sup>a</sup>	90	I	P	25
Tolbutamida <sup>b</sup>	93	I	P	11
Valproato <sup>a</sup>	#	I	P	11
Warfarina <sup>b</sup>	99	I	P	11

Unión a proteínas: #: saturable. Tipo de proteína: A: albúmina; I: sitio I de la albúmina; II: sitio II de la albúmina; d: sitio digitoxina de la albúmina; L: lipoproteína;  $\alpha$ :  $\alpha$ -glucoproteína.

Fracción de extracción: G próxima a 1,0 y P próxima a 0,1.

<sup>a</sup> Suele ser causa de desplazamiento.

<sup>b</sup> Suele ser objeto de desplazamiento.

### CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

Este capítulo detalla la metodología para elaborar esta investigación. Para ello, se analizarán el enfoque y método que conlleva el estudio, se hará referencia a los instrumentos utilizados en cada paso del proceso y se puntualizarán los procedimientos efectuados para obtener los resultados del proyecto.

#### **Enfoque**

El presente trabajo se desarrolla con un enfoque cuantitativo. Hernández, Fernández y Baptista (2014) lo describen como una serie de procesos de característica secuencial, ya que no se pueden obviar pasos, y además de carácter probatorio; por lo que se diseña un plan que permita probar la hipótesis y, por medio de la estadística, se logran recolectar datos de los resultados y obtener las conclusiones. La investigación realizada bajo este enfoque se inicia con una idea que debe delimitarse, de la cual se derivan los objetivos y, a partir de ella, se construye el marco teórico (p.4).

Por lo anterior, y debido a que se realizará una simulación *in vitro* del desplazamiento de la warfarina por el ibuprofeno en la albúmina, se considera adecuado este enfoque cuantitativo.

#### **Método**

El método se selecciona con base en el problema planteado y los objetivos de la investigación, por lo tanto, la manera de obtener la información necesaria para darle resolución a estos puntos es por medio de un método experimental en un lapso de seis meses. Según Hernández et al. (2014), en un método experimental se requiere manipular intencionalmente una acción para analizar sus posibles resultados. Se inicia con la recopilación de datos fundamentales para el desarrollo del tema y realizando pruebas experimentales para obtener los resultados (p.129).

Debido a esto se considera la investigación en curso con un diseño experimental, el cual se llevará a cabo en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas.

### **Curva de Calibración de Ibuprofeno**

#### **Equipo y reactivos**

- 1 balón de 100 mL
- 9 balones de 25 mL
- Solución buffer de fosfatos  
pH 7.4
- Ibuprofeno estándar
- Balanza analítica
- Papel encerado
- 1 pipeta graduada de 10 mL
- 1 pera
- 1 celda de cuarzo de 1 cm
- 1 espátula
- Espectrofotómetro  
ultravioleta visible

#### **Procedimiento**

##### **Preparación del buffer de fosfatos de pH 7.4.**

Se contó con una solución buffer de fosfatos de pH 7 previamente preparada por el personal del laboratorio. Únicamente se ajustó el pH, con solución amortiguadora de pH 12, hasta llegar a pH 7.4.

### **Preparación estándar madre de ibuprofeno.**

En la balanza analítica se pesaron 40 mg del estándar de ibuprofeno por diferencia en un trozo de papel encerado, y se transfirieron al balón de 100 mL. Se disolvieron en solución buffer de fosfatos pH 7.4 y se llevó a aforo con el mismo solvente para obtener una concentración madre de 0,4 mg/mL.

### **Preparación de la curva de calibración de ibuprofeno.**

Una vez que se preparó la disolución madre se tomaron alícuotas de 0.6 mL, 1.3 mL, 2.5 mL, 3.8 mL, 5 mL, 6.3 mL, 7.5 mL, 8.8 mL y 10 mL con pipeta graduada de 10 mL. Cada una de ellas se llevó a aforo en balones de 25 mL con solución buffer de fosfatos pH 7.4 y se obtuvieron concentraciones de 10 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L, 60 mg/L, 80 mg/L, 100 mg/L, 120 mg/L, 140 mg/L y 160 mg/mL respectivamente.

### **Lecturas de las disoluciones estándar.**

Se obtuvieron las absorbancias de las disoluciones en el espectrofotómetro ultravioleta utilizando una celda de cuarzo de 1 cm a una longitud de onda de 264 nm, utilizando como blanco la solución buffer de fosfatos pH 7.4, ya que fue el medio de disolución empleado. Una vez que se obtuvieron las absorbancias de las disoluciones se procedió a realizar los cálculos respectivos, los cuales se representaron en una gráfica absorbancia versus concentración.

## Curva de Calibración de Warfarina

### Equipo y reactivos

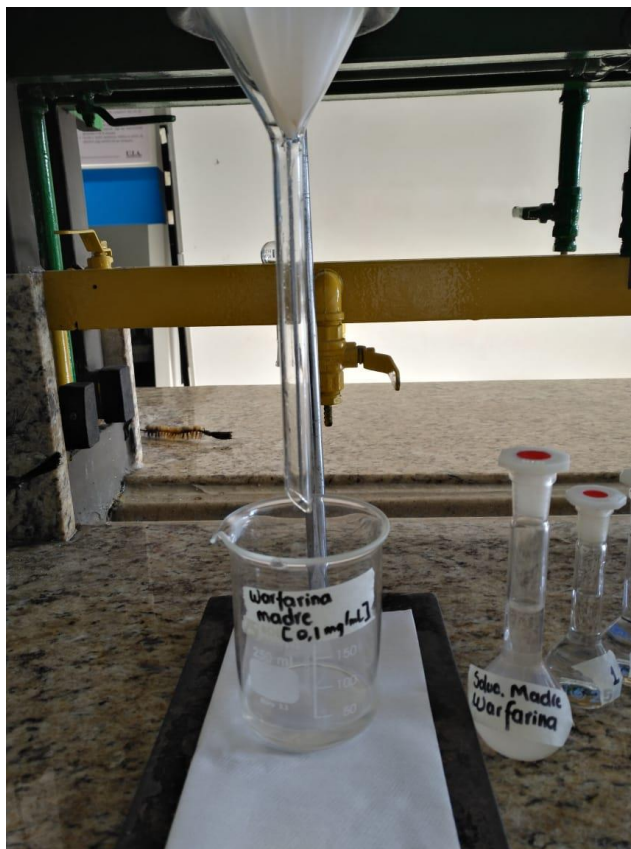
- 1 balón de 50 mL
- 7 balones de 25 mL
- Solución buffer de fosfatos pH 7.4
- Tabletas de warfarina 5mg (Apo<sup>®</sup>-Warfarina)
- Mortero y pistilo
- 1 embudo
- 1 aro para embudo
- Papel filtro
- 1 beaker de 100 mL
- Balanza analítica
- Papel encerado
- 1 pipeta graduada de 10 mL
- 1 pera
- 1 celda de cuarzo de 1 cm
- 1 espátula
- Espectrofotómetro UV-vis

### Procedimiento

#### Preparación de la disolución madre de warfarina.

Se trituro una tableta de 5 mg de warfarina y se colocaron en un balón de 50 mL. Se disolvieron en solución buffer de fosfatos pH 7.4 y se llevó a aforo con el mismo disolvente para obtener una concentración madre de 0,1 mg/mL. Seguidamente, se filtró dicha disolución utilizando un embudo y papel filtro (véase la figura 18).

**Figura 18. Disolución Madre de Warfarina**



Nota: Elaboración propia, 2018.

### **Preparación de la curva de calibración de warfarina.**

De la disolución madre se tomaron alícuotas de 0.3 mL, 1.3 mL, 2.5 mL, 3.8 mL, 5 mL, 6.3 mL y 7.5 mL con pipeta graduada de 10 mL. Cada una de ellas se llevó a aforo en balones de 25 mL con solución buffer de fosfatos pH 7.4 y se obtuvieron concentraciones de 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L y 30 mg/L respectivamente (véase la figura 19).

**Figura 19. Preparación de la Curva de Calibración de Warfarina**



Nota: Elaboración propia, 2018.

### **Lecturas de las disoluciones estándar.**

Se obtuvieron las absorbancias de las disoluciones en el espectrofotómetro ultravioleta utilizando una celda de cuarzo de 1 cm a una longitud de onda de 315 nm, la cual se obtuvo al correr un espectro con la disolución madre de warfarina y utilizando como blanco la solución buffer de fosfatos pH 7.4. Una vez que se obtuvieron las absorbancias de las disoluciones se procedió a realizar los cálculos respectivos, los cuales se representaron en una gráfica absorbancia versus concentración.

## **Curva de Calibración de la Albúmina Sérica Humana (HSA)**

### **Equipo y reactivos**

- 5 balones de 50 mL
- Albúmina sérica humana (Albunorm® 20%)
- Solución buffer de fosfatos pH 7.4
- 1 pipeta graduada de 25 mL
- 1 pipeta graduada de 10 mL
- 1 pera
- 1 celda de cuarzo de 1 cm
- Espectrofotómetro ultravioleta visible

### **Procedimiento**

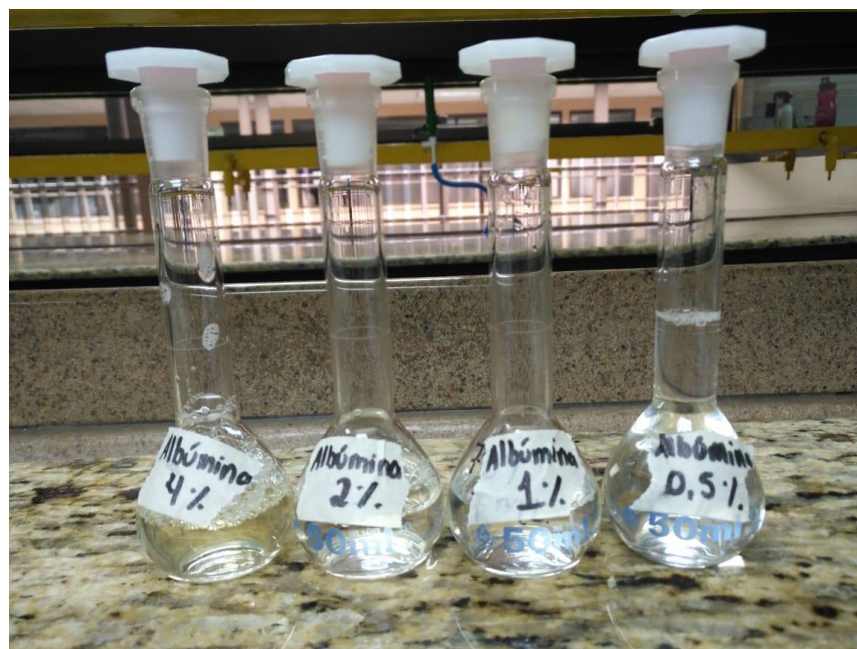
#### **Preparación de la disolución madre de albúmina sérica humana (HSA).**

Con una jeringa se tomaron 10 mL del frasco de 50 mL de albúmina sérica humana al 20% (Albunorm®) y se llevaron a aforo en un balón de 50 mL, obteniendo así una disolución al 4 %.

#### **Preparación de la curva de calibración de la HSA.**

De la disolución al 4% se tomaron alícuotas de 25 mL, 12.5 mL y 6.3 mL con pipeta graduada. Cada una de ellas se llevó a aforo en balones de 50 mL con solución buffer de fosfatos pH 7.4 y se obtuvieron concentraciones de 2 %, 1 % y 0.5 % respectivamente. De la disolución al 0.5 % se tomaron 10 mL y se llevó a aforo en un balón de 50 mL con buffer de fosfatos pH 7.4, para obtener una concentración de 0.1% (véase la figura 20).

**Figura 20. Soluciones de Albúmina a Diferentes Concentraciones**



Nota: Elaboración propia, 2018.

### **Lecturas de las disoluciones estándar.**

Se realizó el espectro de absorción a cada una de las diluciones anteriores para conocer la longitud de onda, a la cual se obtiene la máxima absorción en cada caso. Para ello, se utilizó el espectrofotómetro ultravioleta, una celda de cuarzo de 1 cm y como blanco la solución buffer de fosfatos pH 7.4, ya que fue el medio de disolución empleado.

## Optimización de las Concentraciones de los Fármacos

### Equipo y reactivos

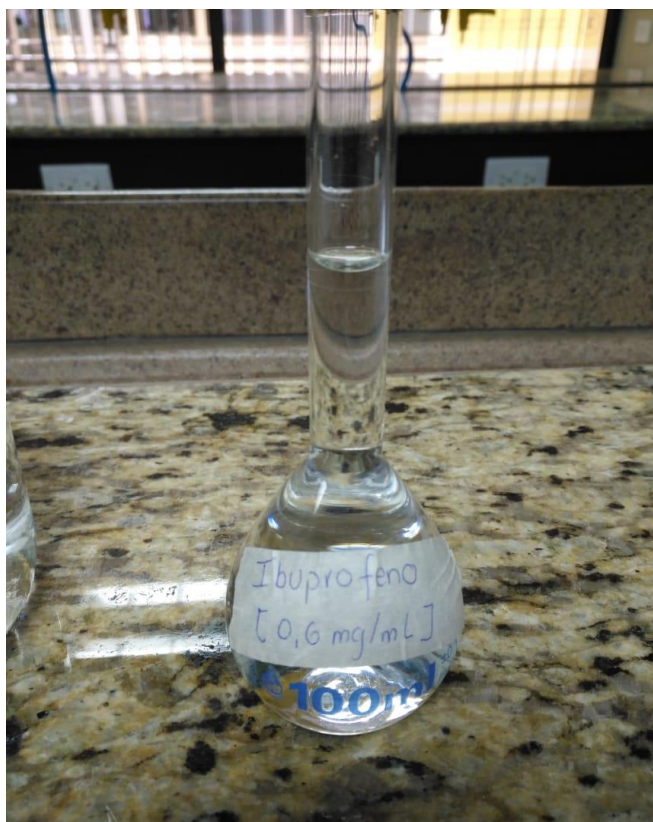
- 1 balón de 100 mL
- 1 balón de 50 mL
- 1 balón de 2000 mL
- Solución buffer de fosfatos pH 7.4
- Ibuprofeno estándar
- Tabletas de warfarina 5mg (Apo<sup>®</sup>-Warfarina)
- Albúmina Humana (Albunorm<sup>®</sup> 20%)
- Mortero y pistilo
- 1 embudo
- 1 aro para embudo
- Papel filtro
- 1 beaker de 100 mL
- Balanza analítica
- Papel encerado
- 1 jeringa de 10cc
- 1 pipeta graduada de 10 mL
- 1 pera
- Agitador magnético
- Pastillas magnéticas de agitación
- 4 beakers de 250 mL
- 1 probeta de 50 mL
- 1 probeta de 25 mL
- 1 celda de cuarzo de 1 cm
- 1 espátula
- Espectrofotómetro ultravioleta visible

### Procedimiento

#### Preparación de la muestra de ibuprofeno.

En la balanza analítica se pesaron 60 mg del estándar de ibuprofeno por diferencia en un trozo de papel encerado, y se transfirieron al balón de 100 mL. Se llevó a aforo con solución buffer pH 7.4 para obtener una concentración madre de 0,6 mg/mL (véase la figura 21).

**Figura 21. Muestra de Ibuprofeno 0.6 mg/mL**



Nota: Elaboración propia, 2018.

### **Preparación de la muestra de warfarina.**

Se trituro una tableta de 5 mg de warfarina y se colocó en un balón de 50 mL. Se llevó a aforo con solución buffer pH 7.4 para obtener una concentración madre de 0,1 mg/mL. Seguidamente, se filtró dicha disolución utilizando un embudo y papel filtro.

### **Preparación de la disolución de albúmina al 0.1%.**

Se tomaron 10 mL de Alburnorm<sup>®</sup> 20% y se llevaron a aforo en un balón de 2000 mL con la solución buffer pH 7.4 y se obtuvo una disolución al 0.1 %.

### **Realización experimental: Sistema sin eliminación.**

El siguiente procedimiento se realizó con la finalidad de verificar la unión de los fármacos a la albúmina sérica humana, pero de manera individualizada. Es decir, la warfarina y el ibuprofeno en sistemas separados:

1. Se colocó sobre un agitador magnético un beaker de 250 mL, al cual se le agregaron 100 mL de solución buffer y 25 mL de ibuprofeno (con concentración de 0,6 mg/mL). Se mantuvo en agitación a 150 rpm y se tomaron muestras cada 10 minutos durante 2 horas. Longitud de onda de 264 nm (véase la figura 22).
2. En otro beaker de 250 mL se agregaron 100 mL de la disolución de la disolución de albúmina 0.1% y 25 mL de ibuprofeno (con concentración de 0,6 mg/mL). Se mantuvo en agitación a 150 rpm y se tomaron muestras cada 10 minutos durante 2 horas. Longitud de onda de 264 nm (véase la figura 22).
3. Se colocó sobre un agitador magnético un beaker de 250 mL, se agregaron 100 mL de solución buffer y 25 mL de warfarina (con concentración de 0,1 mg/mL). Se mantuvo en agitación a 60 rpm y se tomaron muestras cada 10 minutos durante 2 horas. Longitud de onda de 315 nm.

4. Se colocó sobre un agitador magnético un beaker de 250 mL, se agregaron 100 mL de la disolución de albúmina al 0.1% y 25 mL de warfarina (con concentración de 0,1 mg/mL). Se mantuvo en agitación a 60 rpm y se tomaron muestras cada 10 minutos durante 2 horas. Longitud de onda de 315 nm.

**Figura 22. Verificación de la Unión de Fármacos a la Proteína: Sistema sin Eliminación**



Nota: Elaboración propia, 2018.

## Modelo para Simulación de la Unión de Fármacos a Proteína Plasmática: Sistema con Eliminación

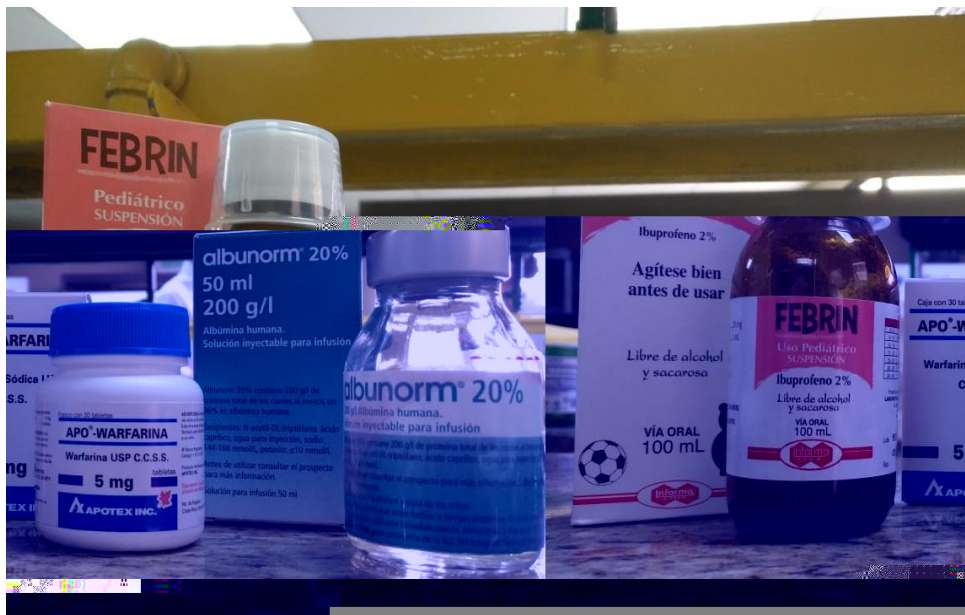
### Equipo

- 1 soporte de base delgada
- 1 kitasato de 250 mL con manguera
- 1 beaker de 1 L
- 1 bomba de inmersión con manguera reguladora de goteo
- Agitador magnético
- Pastilla magnética de agitación
- jeringas de 5cc
- 1 beakers de 250 mL
- 1 probeta de 250 mL
- 1 probeta de 15 mL
- cronómetro
- 1 celda de cuarzo de 1 cm
- Espectrofotómetro ultravioleta visible

### Reactivos

- Solución buffer de fosfatos pH 7.4
- Suspensión de Ibuprofeno (Febrin<sup>®</sup> 2 %)
- Disolución de albúmina al 0.1 %
- Tabletas de warfarina 5mg (Apo<sup>®</sup>-Warfarina): Se utilizó la disolución de concentración 0.1 mg/mL descrita en Optimización de las concentraciones de fármacos.

**Figura 23. Reactivos**



Nota: Elaboración propia, 2018.

### **Preparación de la muestra de ibuprofeno.**

Se tomaron 10 mL de Febrin<sup>®</sup> y se llevaron a aforo en un balón de 100 mL con buffer de fosfatos para obtener una concentración de 2 mg/mL. De esta disolución se tomaron 15 mL (30mg), los cuales fueron administrados al kitasato.

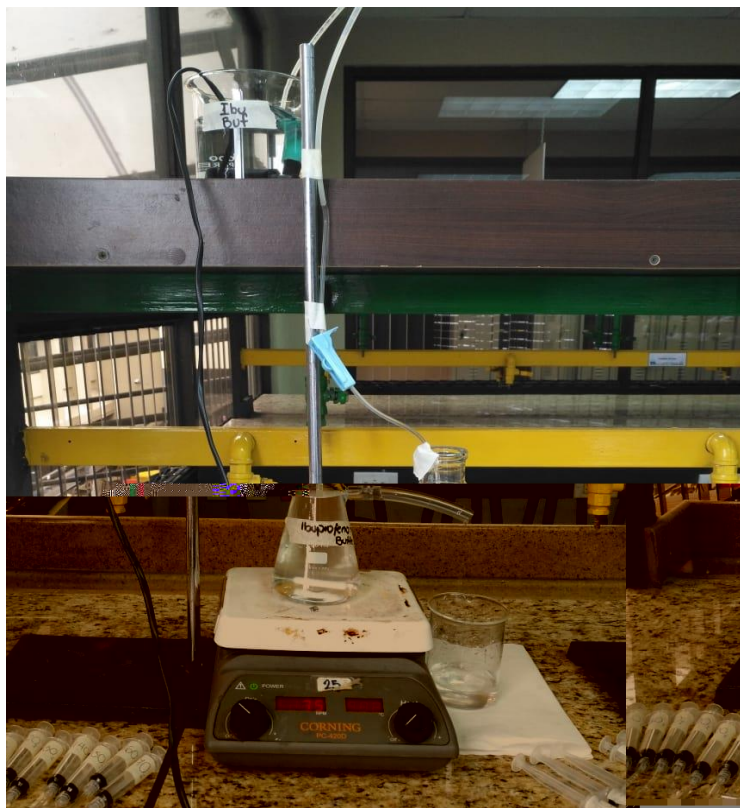
### **Ensamblaje del modelo**

El ensamblaje del modelo se realizó de la misma forma para los 4 sistemas de simulación utilizados (ibuprofeno con buffer, ibuprofeno con albúmina, warfarina con buffer, warfarina con albúmina), con el fin de visualizar el comportamiento de ambos fármacos por separado. Primero se colocó el soporte de base delgada, al lado derecho de este se colocó el agitador magnético.

Seguidamente, sobre el agitador se colocó el kitasato de 250 mL con una pastilla de agitación y con la manguera que permitió simular la eliminación del sistema, la cual se recolectó en un beaker de 250 mL. Posteriormente, en la parte superior de la mesa, se colocó el beaker de 1 L donde se introdujo la bomba de inmersión.

La bomba de inmersión tiene una salida de agua de forma lateral, a la cual se acopla una manguera de una longitud suficiente para alcanzar el kitasato de 250 mL, que se encuentra en la parte inferior de la mesa, dicha manguera cuenta con un regulador de rodillo en el extremo, que permite regular la eliminación (véase la figura 24).

**Figura 24. Modelo Físico para la Simulación *In Vitro* de la Unión a Proteína: Sistema con Eliminación**



Nota: Elaboración propia, 2018.

Una vez ensamblado el equipo, se procedió a llenar el beaker de 1 L colocado en la parte superior de la mesa de trabajo. Posteriormente, se encendió la bomba de inmersión para regular la velocidad de flujo mediante el regulador de rodillo, esto al medir el volumen por medio de una probeta de 25 mL y cronómetro. Se ajustó el flujo a 20 mL/min, al determinar que se movilizaban 10 mL en 30 segundos. Se vigiló que el volumen de este beaker no descendiera por debajo de la porción de la bomba que capta el agua y la impulsa, debido a que producía una alteración en el flujo.

Después de regular la velocidad de eliminación, se agregaron las cantidades correspondientes para cada sistema, de la siguiente manera:

1. Sistema ibuprofeno-buffer: se agregaron al kitasato 200 mL de solución buffer y 15 mL de la muestra de ibuprofeno (concentración 2 mg/mL). Se mantuvo en agitación a 60 rpm.
2. Sistema ibuprofeno-albúmina: se agregaron al kitasato 200 mL de solución de albúmina 0.1 % y 15 mL de la muestra de ibuprofeno (concentración 2 mg/mL). Se mantuvo en agitación a 60 rpm.
3. Sistema warfarina-buffer: se agregaron al kitasato 165 mL de solución buffer y 50 mL de la disolución de warfarina (concentración 0.1 mg/mL). Se mantuvo en agitación a 60 rpm.
4. Sistema warfarina-albúmina: se agregaron al kitasato 165 mL de solución de albúmina y 50 mL de la disolución de warfarina (concentración 0.1 mg/mL). Se mantuvo en agitación a 60 rpm.

Se colocaron en la mesa de trabajo 16 jeringas rotuladas con sus respectivos tiempos de toma de muestra para cada uno de los sistemas: 1 min, 2 min, 4 min, 6 min, 8 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 35 min, 40 min, 45 min, 50 min, 55 min y 60 min. Luego, se encendió la bomba de inmersión para iniciar la cinética. La longitud de onda para realizar la lectura de las muestras fue de 264 nm para el ibuprofeno y 315 nm para la warfarina. El procedimiento para cada sistema se realizó por triplicado.

### **Modelo para Simulación del Desplazamiento de la Warfarina por el Ibuprofeno: Sistema sin Eliminación**

#### **Equipo**

- 1 beaker de 400 mL
- Agitador magnético
- Pastilla magnética de agitación
- jeringas de 5cc
- 1 probeta de 250 mL
- 1 probeta de 50 mL
- 1 probeta de 25 mL
- 1 embudo
- 1 aro para embudo
- algodón
- cronómetro
- 1 celda de cuarzo de 1 cm
- Espectrofotómetro ultravioleta visible

#### **Reactivos**

- Solución buffer de fosfatos pH 7.4
- Solución de albúmina al 0.1 %
- Suspensión de Ibuprofeno (Febrin<sup>®</sup> 2 %)

- Tabletas de warfarina 5mg (Apo<sup>®</sup>-Warfarina): Se utilizó la disolución de concentración 0.1 mg/mL descrita en Optimización de las concentraciones de fármacos.

### **Ensamblaje del modelo**

Se inició colocando sobre un agitador magnético un beaker de 400 mL y su contenido se mantuvo en agitación a 60 rpm al colocar la pastilla de agitación. Sobre la mesa de trabajo se colocaron 16 jeringas rotuladas con sus respectivos tiempos de toma de muestra: 1 min, 2 min, 4 min, 6 min, 8 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 35 min, 40 min, 45 min, 50 min, 55 min y 60 min.

Para continuar, en el beaker de 400 mL se agregaron 185 mL de solución de albúmina al 0.1 % y 50 mL de warfarina (0.1 mg/mL), y se tomaron muestras durante los primeros 10 min. Finalmente, en esta misma disolución se agregaron 15 mL de ibuprofeno (de la disolución de 2 mg/mL previamente filtrada con algodón) y se tomaron muestras cada 5 minutos hasta cumplir la cinética de 1 hora (véase figura 25).

**Figura 25. Modelo Físico para la Simulación *In Vitro* del Desplazamiento de la Warfarina por el Ibuprofeno: Sistema sin Eliminación**



Nota: Elaboración propia, 2018.

El procedimiento anterior también se realizó por triplicado para obtener confiabilidad en los resultados y reproducibilidad.

## **Procedimiento de Recolección y Análisis de los Datos**

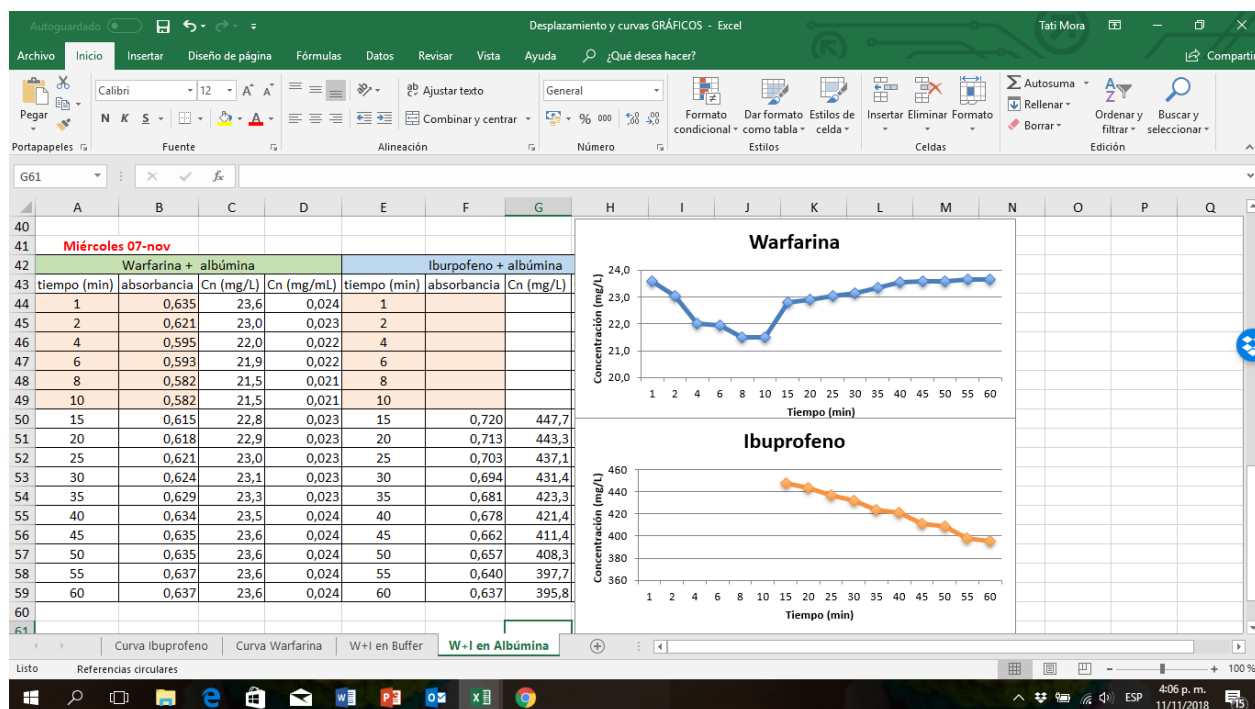
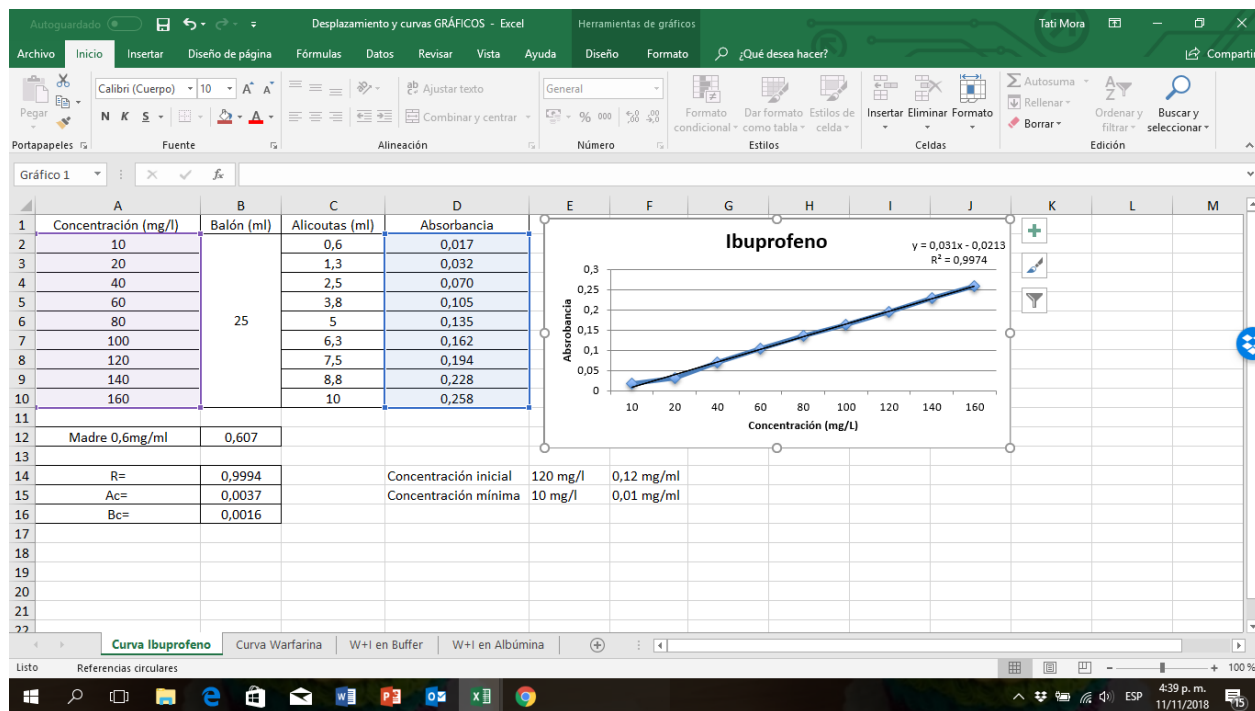
En esta investigación se contó con hojas de cálculo para la recopilación y análisis de la información obtenida en los días de trabajo en el laboratorio.

### **Hojas de cálculo Microsoft Excel 2016**

El uso de esta herramienta simplifica el manejo y obtención de resultados ya que es posible la aplicación de fórmulas previamente definidas. Se organizó la información en la hoja de cálculo de forma que, al llenar las casillas con valores de absorbancias obtenidas en el laboratorio, se lograra obtener las concentraciones correspondientes y el logaritmo natural de dicha concentración considerando los valores de las curvas de calibración efectuadas.

De esta manera, se lograron obtener las gráficas de la concentración en función del tiempo, necesarias para el análisis del modelo en estudio. Esto permitió determinar cambios necesarios para la optimización del sistema (véase la figura 26).

Figura 26. Hoja de Cálculo Microsoft Excel 2016



Nota: Elaboración propia, 2018.

## CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

El análisis de resultados dispone una respuesta al problema planteado inicialmente, con la finalidad de darles seguimiento a los objetivos de la investigación; al simular de manera *in vitro* el proceso de la unión de fármacos a la proteína plasmática y el desplazamiento de un fármaco por otro de su sitio de unión.

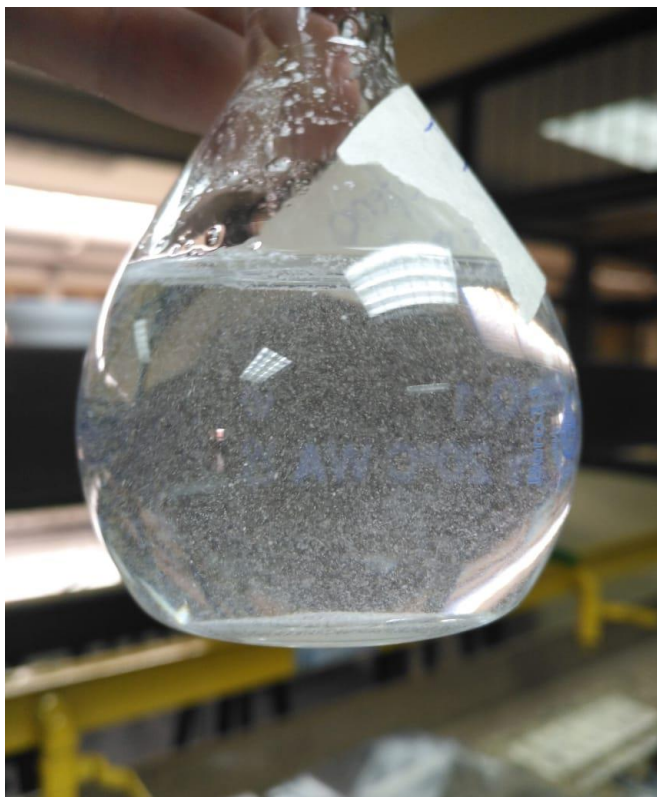
### Optimización del Medio de Disolución a Emplear en el Análisis

Se consideró el agua como un buen disolvente para la albúmina; no obstante, los fármacos no presentan la misma característica en este medio. Al utilizar el agua como medio de disolución limitaría:

1. la cantidad de fármaco en disolución, y
2. observar las variaciones en las concentraciones plasmáticas.

Esto quiere decir, que, al tener poco fármaco disuelto, las variaciones son poco perceptibles; por lo tanto, no se logra ver la modificación en las curvas de niveles plasmáticos. Debido a esto, el agua se consideró un medio de disolución no viable (véase la figura 27).

**Figura 27. Baja Solubilidad del Ibuprofeno en Agua**



Nota: Elaboración propia, 2018.

Pensando en la disolución adecuada de los fármacos, se consideró un medio básico. Este permite que las especies se transformen en sus sales sódicas, lo que aumenta la solubilidad del medicamento. Sin embargo, la limitación se da a nivel de la proteína, ya que esta no es estable. El pH en el cual se encuentra la proteína tiene influencia considerable en el proceso de desnaturalización. Ella se desnaturaliza cuando se somete a valores de pH muy altos o bajos (Durst y Gokel, 2007).

Debido a estas limitaciones, se consideró emplear un buffer de fosfatos de pH 7.4, el cual está reportado en la USP 38-NF 33 como medio de disolución para estos fármacos. Además, la albúmina es evidentemente soluble pues, presenta un pH fisiológico de 7.4. De esta manera, se logra optimizar el medio de disolución adecuado (USP, 2015; Vargas, 2006, p. 15).

La siguiente etapa tuvo como finalidad confirmar la hipótesis anterior, es decir, el empleo de buffer de fosfatos de pH 7.4 como el medio adecuado para la realización del análisis. Dicha etapa se inició con la observación de la disolución de ambos fármacos en buffer de fosfatos mediante la realización de las curvas de calibración.

### **Curvas de Calibración**

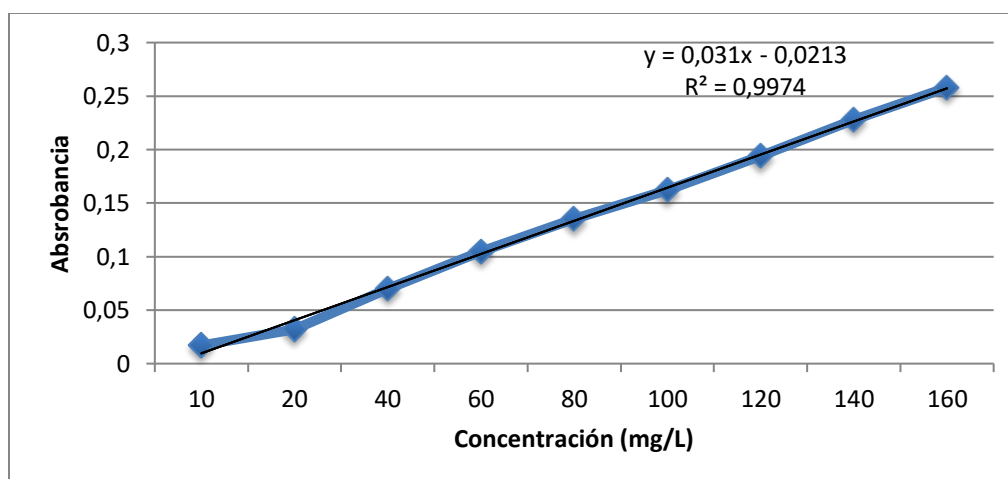
Se consultó en la USP 38 la monografía del ibuprofeno, tomando como referencia la prueba de disolución, en la que se indica el uso de solución amortiguadora de fosfatos como medio de disolución y una longitud de onda de 264 nm para la lectura de las muestras (USP, 2015). Se procedió a elaborar la curva de calibración cuyos resultados se muestran en la tabla 11 y la figura 28 muestra el gráfico de la absorbancia en función de la concentración.

**Tabla 11. Curva de Calibración del Ibuprofeno Obtenida Mediante Análisis de Espectrofotometría UV-VIS**

Patrón	Concentración (mg/L)	Absorbancia
Blanco	0	0,000
1	10	0,017
2	20	0,032
3	40	0,070
4	60	0,105
5	80	0,135
6	100	0,162
7	120	0,194
8	140	0,228
9	160	0,258

Nota: Elaboración propia, 2018.

**Figura 28. Representación de la Absorbancia en Función de la Concentración de Ibuprofeno**



Nota: Elaboración propia, 2018.

Entre los valores estadísticos de la curva se obtuvieron, un coeficiente de correlación (R) de 0.9994, un intercepto (Ac) de 0.0037 y una pendiente (Bc) de 0.0016.

Además, en la USP 38 también se consultó la monografía de la warfarina sódica, tomando como referencia la prueba específica: absorbancia en solución alcalina, la cual indica una longitud de onda de 385 nm para la lectura de las muestras (USP, 2015). Para verificar la longitud de onda de máxima absorción de la warfarina se filtró la disolución madre de 0.1 mg/mL y obtuvo su espectro de absorción.

Sin embargo, se presentaron absorbancias elevadas (1.523 y 1.495) en ciertos tramos del espectro (260 nm a 320 nm); debido a esto, se sacó un promedio de las 7 longitudes de onda correspondientes a ese rango. El promedio obtenido fue de 290 nm, por lo tanto, se realizaron nuevamente las lecturas a partir de 285 nm a 325 nm para localizar la máxima absorción. De esta manera se obtuvo la máxima absorción a una longitud de onda de 315 nm, la cual se identificó como la longitud de onda adecuada para la warfarina.

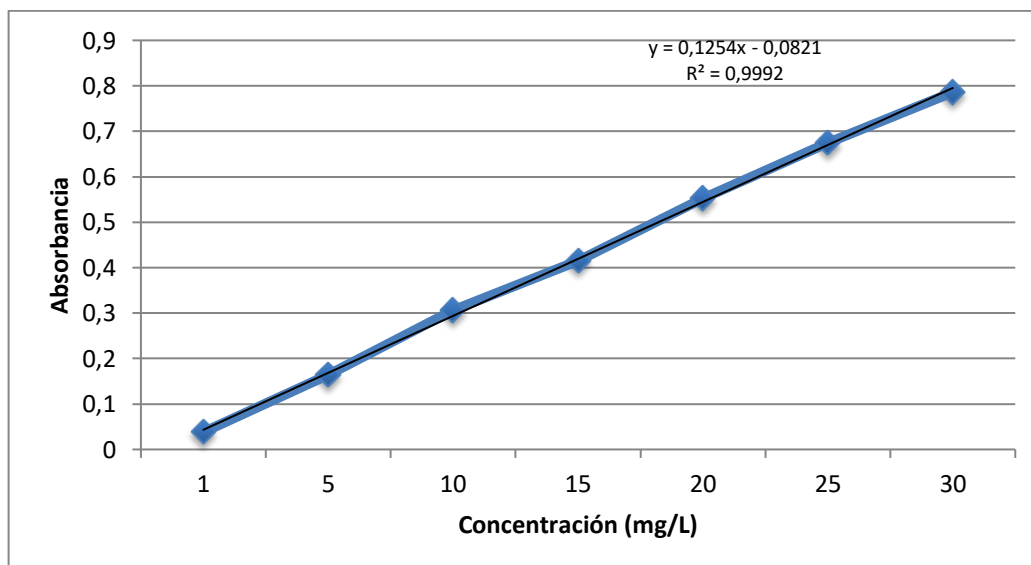
Se procedió a elaborar la curva de calibración cuyos resultados se muestran en la tabla 12 y la figura 29 muestra el gráfico de la absorbancia en función de la concentración.

**Tabla 12. Curva de Calibración de la Warfarina Obtenida Mediante Análisis de Espectrofotometría UV-VIS**

Patrón	Concentración (mg/L)	Absorbancia
Blanco	0	0,000
1	1	0,038
2	5	0,164
3	10	0,306
4	15	0,415
5	20	0,552
6	25	0,674
7	30	0,786

Nota: Elaboración propia, 2018.

**Figura 29. Representación de la Absorbancia en Función de la Concentración de la Warfarina**



Nota: Elaboración propia, 2018.

Entre los valores estadísticos de la curva se obtuvieron, un coeficiente de correlación (R) de 0.9989, un intercepto (Ac) de 0.0317 y una pendiente (Bc) de 0.0256.

Utilizar una tableta de warfarina y no el estándar para preparar la curva de calibración, no afectó el desarrollo de la investigación; ya que, en este análisis no se pretendía determinar ningún parámetro absoluto donde fuera necesario conocer exactamente la dosis administrada (por ejemplo, el cálculo del volumen de distribución). Específicamente, se quería observar los cambios o variaciones en los niveles plasmáticos; por lo tanto, un error en la curva será el mismo error en las muestras o a lo largo de la cinética como tal.

En relación con esta etapa, se logró optimizar la concentración de albúmina para utilizar los sistemas de simulación *in vitro*.

### **Optimización de la Concentración de Albúmina**

A partir de la solución para infusión de albúmina sérica humana (Albunorm® 20 %) se prepararon disoluciones para obtener una concentración adecuada para el análisis. Teóricamente se habla de una concentración aproximada de albúmina en el plasma de 4 g/dl (4 %) (Vargas, 2006, p. 15). No obstante, las absorbancias que se obtuvieron a esa concentración fueron muy elevadas; limitando su uso en ese porcentaje. La siguiente tabla 13 muestra las disoluciones empleadas y sus respectivas las absorbancias.

Se observó, que aún en la disolución al 0.5 % la absorbancia fue alta; por lo que se procedió a diluir dicha concentración a 0.1 %. Se realizó el espectro de la nueva concentración y

se obtuvo la máxima absorción (0.706) a una longitud de onda de 280 nm; conociendo así la concentración óptima de albúmina.

**Tabla 13. Optimización de la Concentración de Albúmina a Emplear**

<b>Porcentaje masa/volumen de albúmina (%)</b>	<b>Absorbancia</b>
<b>4</b>	1.432
<b>2</b>	1.387
<b>1</b>	1.292
<b>0.5</b>	1.244
<b>0.1</b>	0.706

Nota: Elaboración propia, 2018.

Lo anterior permite avanzar a la siguiente etapa, la verificación de la unión a la proteína por parte de la warfarina y del ibuprofeno.

### **Verificación de la Unión de Warfarina a la Albúmina en un Sistema sin Eliminación**

Parte de la optimización consistió en verificar si realmente ocurre unión del fármaco a la proteína. Para ello, se tomó un beaker al cual se le adicionaron 100 mL de la disolución de albúmina al 0.1 %; además, se le administraron 25 mL de warfarina (equivalentes a 2,5 mg). Manteniendo una agitación constante (simulando el plasma) y tomando muestras a los tiempos indicados en la metodología, para posteriormente obtener las concentraciones plasmáticas (véase la tabla 14).

**Tabla 14. Verificación de la Unión de Warfarina a la HSA, Sistema sin Eliminación**

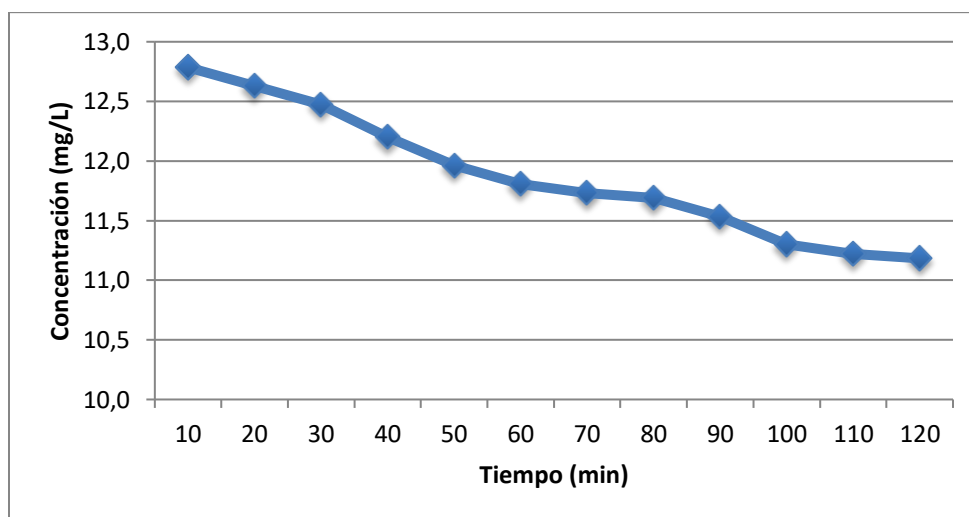
<b>Tiempo (min)</b>	<b>Concentración de warfarina (mg/L)</b>
<b>10</b>	12,8
<b>20</b>	12,6
<b>30</b>	12,5
<b>40</b>	12,2
<b>50</b>	12,0
<b>60</b>	11,8
<b>70</b>	11,7
<b>80</b>	11,7
<b>90</b>	11,5
<b>100</b>	11,3
<b>110</b>	11,2
<b>120</b>	11,2

Nota: Elaboración propia, 2018.

Se observó, cómo las concentraciones de warfarina con el paso de los minutos disminuyen de manera casi lineal, con una variación mínima; lo que indica, que se alcanzó el equilibrio de unión a la proteína. Con esto se logró identificar, que para observar un desplazamiento de la warfarina por otro fármaco (en el caso de esta investigación, el ibuprofeno), el fármaco desplazante podría ser administrado desde el minuto 10, momento en que se alcanza el equilibrio de unión de la warfarina, y de esta manera, observar cambios en los niveles plasmáticos.

Además, se evidenció por una disminución de la concentración plasmática de la warfarina, la unión fármaco-proteína. Esto se representó de manera gráfica en la siguiente figura:

**Figura 30. Verificación de la Unión de la Warfarina a la Albúmina, Sistema sin Eliminación**



Nota: Elaboración propia, 2018.

### **Verificación de la Unión de Ibuprofeno a la Albúmina en un Sistema sin Eliminación**

Se tomó un beaker y se le adicionaron 100 mL de la disolución de albúmina al 0.1 % y 25 mL de ibuprofeno (equivalentes a 15 mg). Manteniendo una agitación constante y tomando muestras a los tiempos indicados en la metodología. Se realizó la lectura de las muestras y se calcularon sus concentraciones (véase la tabla 15).

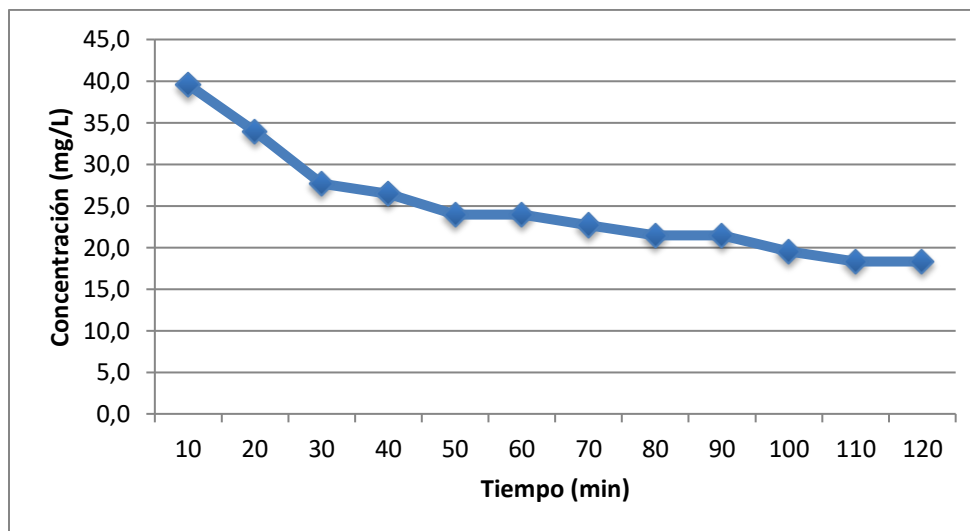
**Tabla 15. Verificación de la Unión de Ibuprofeno a la HSA, Sistema sin Eliminación**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Concentración de ibuprofeno (mg/L)</b>
<b>10</b>	39,6
<b>20</b>	33,9
<b>30</b>	27,7
<b>40</b>	26,4
<b>50</b>	23,9
<b>60</b>	23,9
<b>70</b>	22,7
<b>80</b>	21,4
<b>90</b>	21,4
<b>100</b>	19,6
<b>110</b>	18,3
<b>120</b>	18,3

Nota: Elaboración propia, 2018.

En la tabla 15 se logró observar, que la disminución de las concentraciones plasmáticas es más significativa que en el caso de la warfarina. El tiempo al cual se llega a un equilibrio de unión, representado por la concentración constante de ibuprofeno, se podría decir que es mayor al tiempo de la warfarina. También, se verificó la unión del fármaco a la proteína. Representado en forma gráfica se tiene la figura 31.

**Figura 31. Verificación de la Unión de Ibuprofeno a la Albúmina, Sistema sin Eliminación**

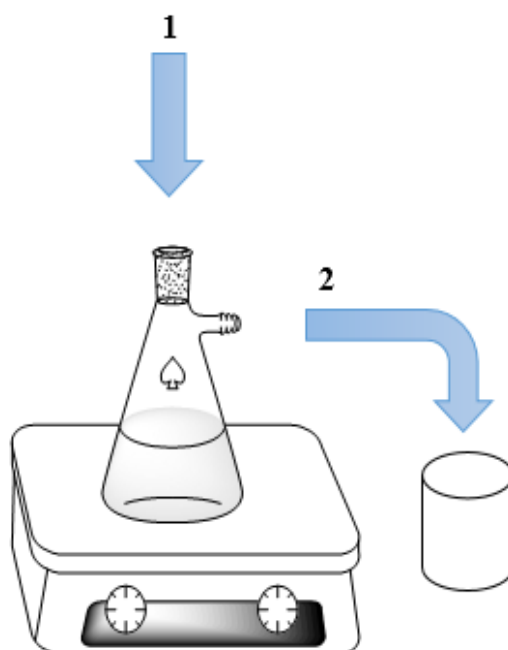


Nota: Elaboración propia, 2018.

### **Simulación de la Unión de Fármacos a la HSA en un Sistema con Eliminación**

La finalidad de los sistemas con eliminación, además de ser la verificación de la unión fármaco-proteína, fue el análisis de la afinidad de ambos fármacos por la albúmina. En la figura 32 se muestra cómo, dichos sistemas fueron alimentados por una bomba de inmersión (flecha 1), la cual permitió ajustar la velocidad de flujo por medio del regulador de rodillo a 20 mL/min; para permitir la eliminación por un lado del kitasato (flecha 2).

**Figura 32. Sistema de Simulación *In Vitro* de la Unión de Fármacos a la Proteína, con Eliminación**



Nota: Elaboración propia, 2018.

### **Simulación de la unión de warfarina a la albúmina, sistema con eliminación**

La distribución de los fármacos en el organismo fue representada por el kitasato de 250 mL. A este matraz, se adicionaron 165 mL de la solución de albúmina al 0.1 % y 50 mL de warfarina. En otro sistema, se agregaron las mismas cantidades (mL) para contener un volumen inicial de 215 mL en ambos casos; pero el medio de disolución utilizado fue la solución de buffer de fosfatos de pH 7.4 y no la solución de albúmina (véase la figura 33). Con las muestras obtenidas durante la cinética de una hora, se calcularon las concentraciones plasmáticas de los dos sistemas (véase la tabla 16 y figura 34).

**Figura 33. Simulación de la Unión de la Warfarina a la Proteína Plasmática: Sistema con Eliminación**



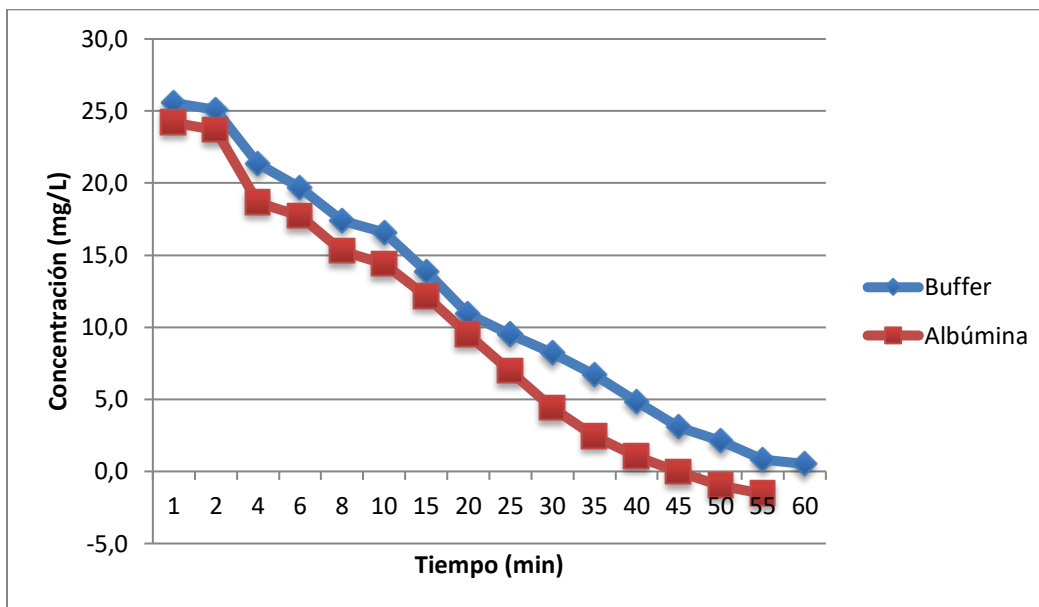
Nota: Elaboración propia, 2018.

**Tabla 16. Concentraciones de Warfarina con y sin Presencia de Albúmina, Sistema con Eliminación**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Concentración de warfarina en buffer (mg/L)</b>	<b>Concentración de warfarina en albúmina (mg/L)</b>
1	25,6	24.2
2	25,1	23.7
4	21,3	18.6
6	19,7	17.7
8	17,4	15.3
10	16,6	14.4
15	13,9	12.1
20	10,9	9.5
25	9,5	7.0
30	8,2	4.4
35	6,7	2.4
40	4,9	1.0
45	3,1	0.0
50	2,1	-1.0
55	0,8	-1.6
60	0,5	-

Nota: Elaboración propia, 2018.

**Figura 34. Verificación de la Unión de Warfarina a la Albúmina, Sistema con Eliminación**

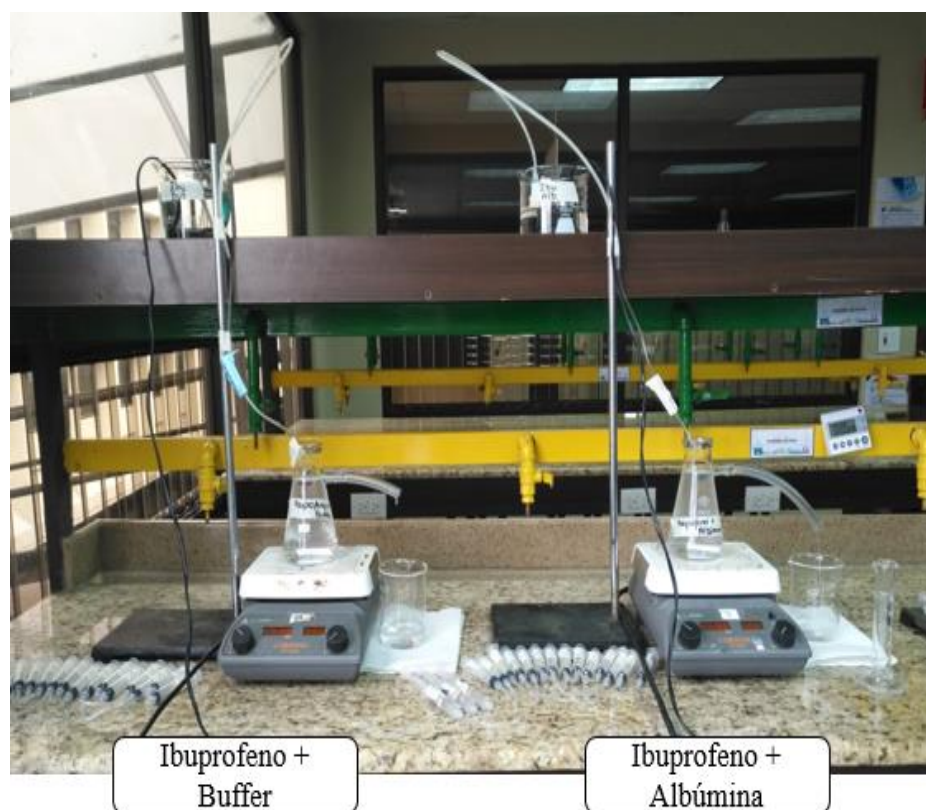


Nota: Elaboración propia, 2018.

### **Simulación de la unión de ibuprofeno a la albúmina, sistema con eliminación**

Para esto, se adicionaron 165 mL de la solución de albúmina al 0.1 % y 15 mL de ibuprofeno en el kitasato de 250 mL, completando un volumen de 215 mL. En otro sistema, se agregaron 165 mL de solución buffer de pH 7.4 y 15 mL de ibuprofeno para contener también un volumen inicial de 215 mL, en el kitasato de 250 mL (véase la figura 35). Con las muestras obtenidas durante la cinética de una hora, se calcularon las concentraciones plasmáticas de los dos sistemas (véase la tabla 17 y figura 36).

**Figura 35. Simulación de la Unión de Ibuprofeno a la Proteína Plasmática: Sistema con Eliminación**



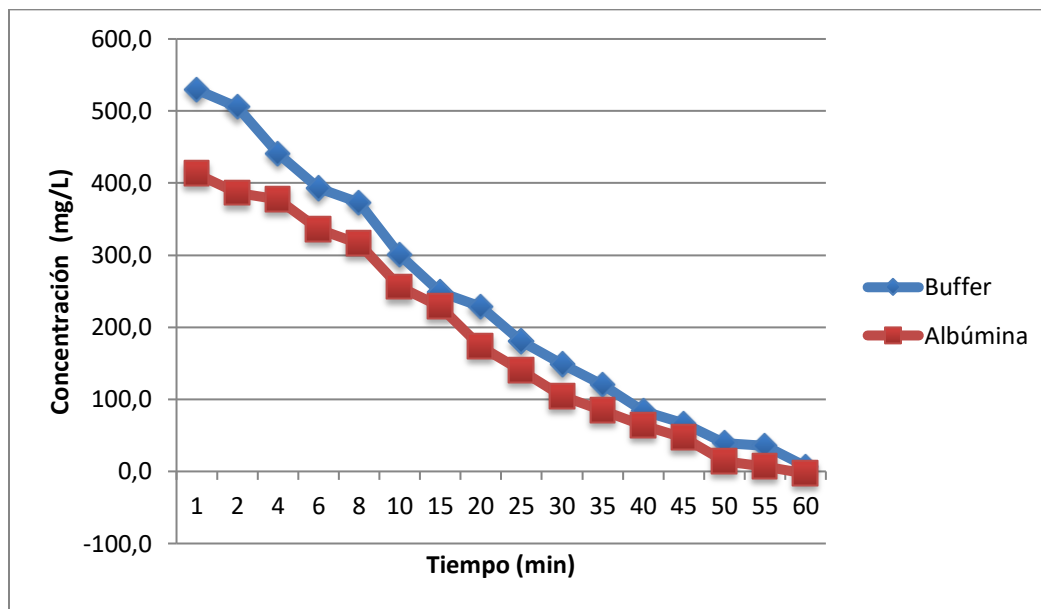
Nota: Elaboración propia, 2018.

**Tabla 17. Concentraciones de Ibuprofeno con y sin Presencia de Albúmina, Sistema con Eliminación**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Concentración de ibuprofeno en buffer (mg/L)</b>	<b>Concentración de ibuprofeno en albúmina (mg/L)</b>
1	529,6	412,7
2	505,2	386,4
4	441,4	377,1
6	393,3	335,8
8	373,3	315,8
10	300,2	256,4
15	248,9	228,9
20	228,9	173,3
25	180,8	140,2
30	148,9	104,6
35	119,6	84,6
40	83,3	63,3
45	66,4	46,4
50	38,9	13,9
55	35,2	7,1
60	7,1	-2,9

Nota: Elaboración propia, 2018.

**Figura 36. Verificación de la Unión de Ibuprofeno a la Albúmina, Sistema con Eliminación**



Nota: Elaboración propia, 2018.

Al analizar las concentraciones de ambos fármacos en sus medios de disolución, se logró observar, que desde el minuto uno existe una disminución en la concentración plasmática cuando ellos se someten a la presencia de albúmina. A pesar de identificar la disminución del fármaco en los dos casos, la diferencia en los sistemas con ibuprofeno es mayor en comparación con los sistemas que contenían warfarina.

El ibuprofeno, al contrario de la warfarina, se une más fuertemente a la proteína; lo que significa a nivel *in vitro*, concentraciones plasmáticas de warfarina con pequeñas variaciones debido a una menor afinidad a la albúmina. La disminución en la concentración plasmática de forma significativa ocurrió con el ibuprofeno; por ende, este presentó mayor afinidad.

Además, la mayor variación en la disminución de la cantidad de ibuprofeno libre se puede atribuir a la capacidad que presenta este fármaco para fijarse tanto al sitio I como al sitio II en la proteína plasmática. En otras palabras, la warfarina cuenta con una posibilidad de unión en la albúmina sérica humana (sitio I), mientras que, el ibuprofeno cuenta con dos posibilidades (sitio I y II); por ende, su disminución en la concentración plasmática es mayor en comparación con la warfarina.

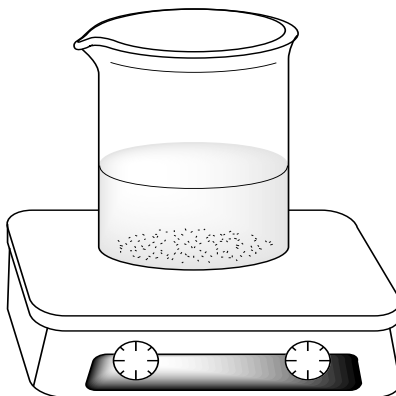
Esta circunstancia se presentó en el procedimiento por triplicado, obteniendo reproducibilidad de los sistemas. Asimismo, se determinó la hipótesis de observar al ibuprofeno como fármaco desplazante de la warfarina en su sitio de unión en la albúmina.

### **Simulación del Desplazamiento de la Warfarina por el Ibuprofeno**

#### **Optimización del modelo**

En un sistema con excreción es muy complicado ver el desplazamiento de un fármaco por otro de su sitio de unión en la albúmina; debido a que siempre se da la disminución en las concentraciones de fármaco libre, consecuencia de la unión a la proteína, pero evidentemente por la eliminación del sistema *in vitro*. Por lo tanto, se decidió realizar la simulación de este concepto en un sistema sin eliminación (véase la figura 37).

**Figura 37. Sistema de Simulación *In Vitro* del Desplazamiento, Sin Eliminación**



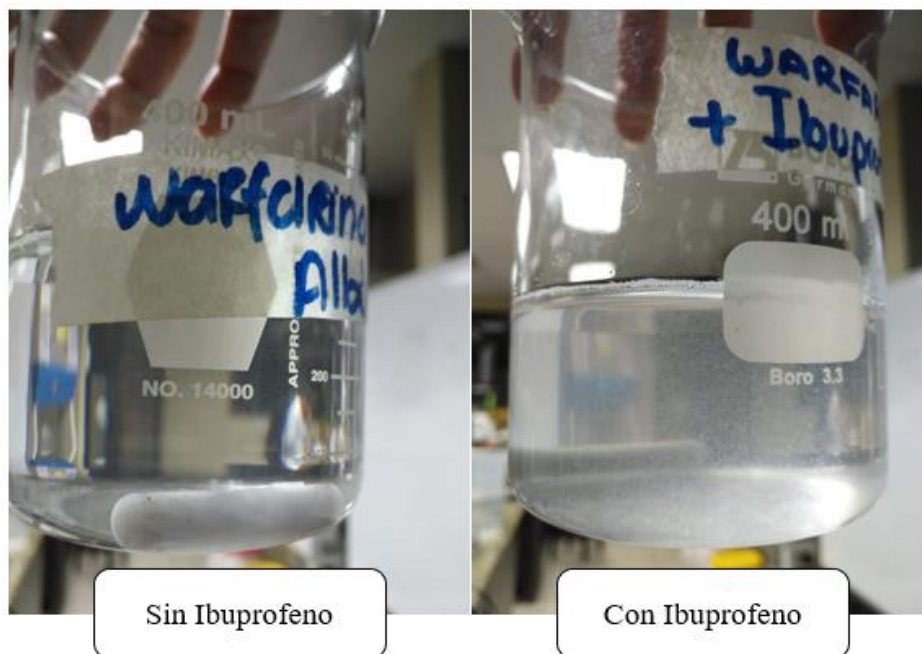
Nota: Elaboración propia, 2018.

Inicialmente, a un beaker de 400 mL se le adicionaron 185 mL de la disolución de albúmina al 0.1 % y 50 mL de warfarina (equivalentes a 5 mg). Se mantuvo la agitación constante a 60 rpm para simular el flujo sanguíneo. Y se tomaron muestras cada 2 minutos durante los primeros 10 minutos. Una vez obtenida la muestra al minuto 10, se agregaron 15 mL de ibuprofeno (equivalentes a 30 mg), para posteriormente, obtener las muestras cada 15 minutos hasta completar la cinética de 1 hora.

En la verificación de la unión de warfarina a la HSA en el sistema sin eliminación, se determinó, que el fármaco desplazante podía ser administrado a partir del minuto 10; ya que, la disminución de las concentraciones de warfarina en presencia de albúmina no presentó grandes variaciones.

Una vez adicionado el ibuprofeno, se observaron partículas en la disolución por lo que, se les colocó filtros a las jeringas y se realizó la lectura en el espectrofotómetro UV a las longitudes de onda establecidas para cada fármaco (véase la figura 38). Sin embargo, las absorbancias obtenidas fueron muy elevadas (1.420 aproximadamente), y con muchas fluctuaciones.

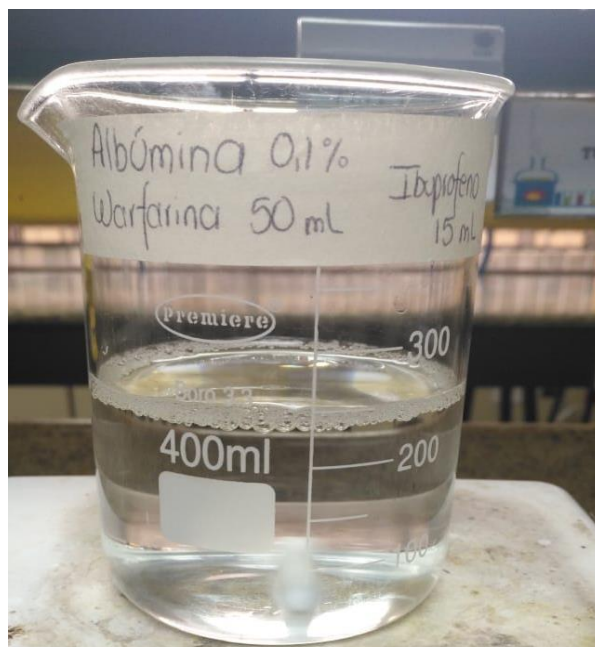
**Figura 38. Presencia de Partículas en la Disolución de Warfarina e Ibuprofeno**



Nota: Elaboración propia, 2018.

Debido a esto, se procedió a filtrar la disolución de ibuprofeno (0.6 mg/mL). Adicionalmente, se realizó un sistema como prueba, utilizando buffer de fosfatos como medio de disolución y ambos fármacos (warfarina e ibuprofeno), para evidenciar la posible aparición de partículas. Como resultado positivo para la investigación, no hubo presencia de partículas (véase la figura 39).

**Figura 39. Disolución de Warfarina e Ibuprofeno en Buffer de Fosfatos, sin Presencia de Partículas**

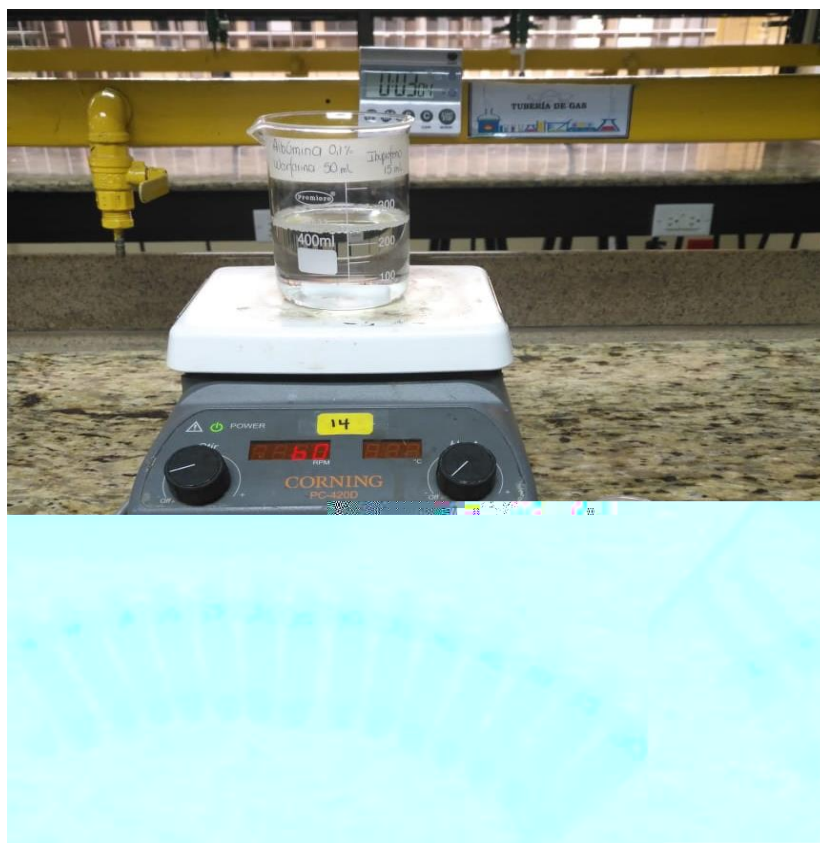


Nota: Elaboración propia, 2018.

### **Verificación del desplazamiento de la warfarina por el ibuprofeno, sistema sin eliminación**

Como puede verse en la figura 40, se tomó un beaker de 400 mL se le adicionaron 185 mL de la disolución de albúmina al 0.1 % y 50 mL de warfarina (equivalentes a 5 mg). Se mantuvo la agitación constante a 60 rpm, y se tomaron muestras a los tiempos determinados. Una vez obtenida la muestra al minuto 10, se agregaron 15 mL de ibuprofeno (equivalentes a 30 mg) y se continuó con la cinética durante 1 hora.

**Figura 40. Modelo Físico para la Simulación *In Vitro* del Desplazamiento de la Warfarina por el Ibuprofeno**



Nota: Elaboración propia, 2018.

La siguiente tabla contiene las concentraciones plasmáticas obtenidas con la lectura de las muestras a la longitud de onda adecuada para cada fármaco (315 nm para la warfarina y 264 nm para el ibuprofeno).

**Tabla 18. Simulación 2: Concentraciones Plasmáticas de Warfarina e Ibuprofeno, por Efecto del Desplazamiento**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración de warfarina (mg/L)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración de ibuprofeno (mg/L)</b>
<b>1</b>	0,645	23,6		
<b>2</b>	0,621	23,0		
<b>4</b>	0,595	22,0		
<b>6</b>	0,593	21,9		
<b>8</b>	0,582	21,5		
<b>10</b>	0,582	21,5		
<b>15</b>	0,615	22,8	0,720	447,7
<b>20</b>	0,618	22,9	0,713	443,3
<b>25</b>	0,621	23,0	0,703	437,1
<b>30</b>	0,624	23,1	0,694	431,4
<b>35</b>	0,629	23,3	0,681	423,3
<b>40</b>	0,634	23,5	0,678	421,4
<b>45</b>	0,635	23,6	0,662	411,4
<b>50</b>	0,635	23,6	0,657	408,3
<b>55</b>	0,637	23,6	0,640	397,7
<b>60</b>	0,637	23,6	0,637	395,8

Nota: Elaboración propia, 2018.

Los primeros minutos (sombreado) indicaron una disminución, poco a poco, de la cantidad de warfarina en plasma, como consecuencia de su unión a la albúmina. Se logrlbúmina.



Existe evidencia sobre la capacidad de unión del ibuprofeno al sitio I en la albúmina; aunque el sitio II sea su principal sitio de fijación (véase la figura 16) (Doménech et al., 2013; Armijo, 2005). En la figura anterior, se observó que después del minuto 45, se estabiliza la cantidad de warfarina liberada, las concentraciones de warfarina en el plasma se mantuvieron constantes. No obstante, en ese momento las concentraciones plasmáticas de ibuprofeno siguieron disminuyendo de manera paulatina. Esta circunstancia evidencia la capacidad del ibuprofeno por unirse a los dos sitios principales de la albúmina (sitio I y II).

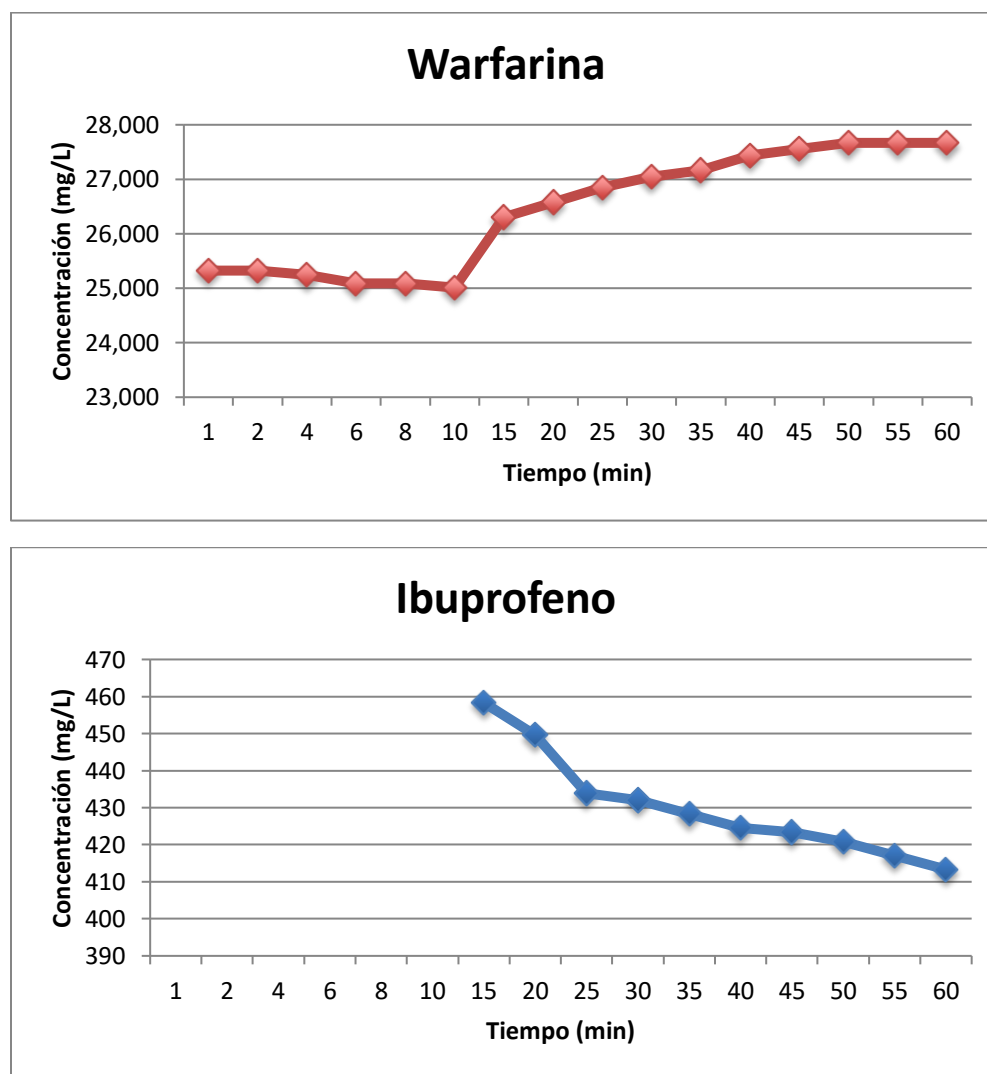
Para mostrar reproducibilidad, se realizó nuevamente la simulación. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 19 y figura 42.

**Tabla 19. Simulación 3: Concentraciones Plasmáticas de Warfarina e Ibuprofeno, por Efecto del Desplazamiento**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración de warfarina (mg/L)</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>Concentración de ibuprofeno (mg/L)</b>
<b>1</b>	0,680	25,3		
<b>2</b>	0,680	25,3		
<b>4</b>	0,678	25,2		
<b>6</b>	0,674	25,1		
<b>8</b>	0,674	25,1		
<b>10</b>	0,672	25,0		
<b>15</b>	0,705	26,3	0,737	458,3
<b>20</b>	0,712	26,6	0,723	449,6
<b>25</b>	0,719	26,8	0,698	433,9
<b>30</b>	0,724	27,0	0,695	432,1
<b>35</b>	0,727	27,2	0,689	428,3
<b>40</b>	0,734	27,4	0,683	424,6
<b>45</b>	0,737	27,6	0,681	423,3
<b>50</b>	0,740	27,7	0,677	420,8
<b>55</b>	0,740	27,7	0,671	417,1
<b>60</b>	0,740	27,7	0,665	413,3

Nota: Elaboración propia, 2018.

**Figura 42. Simulación 3: Verificación del Desplazamiento de la Warfarina por el Ibuprofeno**



Nota: Elaboración propia, 2018.

De esta manera, se comprobó tanto, la interacción de la warfarina con el ibuprofeno, al darse una competencia por el mismo sitio de fijación en la proteína y generar el desplazamiento de la warfarina del sitio I por parte del ibuprofeno, como la capacidad de este para unirse al sitio II.

Tanto en la figura 41 como en la figura 42, se logró observar durante los primeros 10 minutos, la disminución de las concentraciones de warfarina. Con el fin de conocer, cual es el orden que sigue la cinética de unión a la proteína, se realizaron los cálculos correspondientes (véase la tabla 20)

**Tabla 20. Cálculo del Orden de la Cinética de Unión y de la Constante de velocidad de Unión de la Warfarina**

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Orden cero Concentración de warfarina (mg/L)</b>	<b>Orden uno ln [warfarina]</b>
<b>1</b>	25,324	3,232
<b>2</b>	25,324	3,232
<b>4</b>	25,246	3,229
<b>6</b>	25,090	3,222
<b>8</b>	25,090	3,222
<b>10</b>	25,012	3,219
<b>R =</b>	<b>-0,9709</b>	<b>-0,9710</b>
<b>Ac =</b>	25,3742	3,2338
<b>Bc =</b>	-0,03746	<b>-0,00149</b>

Nota: Elaboración propia, 2018.

Rodwell et al. (2016) menciona, que a altas concentraciones de sustrato, la enzima se encuentra saturada por el sustrato, y la velocidad ya no depende de la concentración de este. En este punto, la reacción es de orden cero y la velocidad es máxima ( $V_{max}$ ).

Cuando la concentración de sustrato (en este caso el fármaco) es pequeña; la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y por tanto, la reacción es de primer orden. Esto se logró comprobar con el cálculo de la constante de velocidad de unión de la warfarina, por ende, la cinética se ajusta a una cinética de orden uno de Michaelis-Menten.

Además, para confirmar el orden de la cinética tanto de la warfarina como del ibuprofeno, se realizaron los cálculos según los resultados obtenidos en la verificación de la unión a la proteína plasmática, es decir, según los resultados de los sistemas sin eliminación (véase la tabla 21).

En la siguiente tabla se verifica que ambos fármacos siguen una cinética de primer orden. Y según los resultados obtenidos, la warfarina cuenta con una constante de velocidad de unión a la proteína de  $1.25 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ , mientras que el ibuprofeno de  $6.26 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ . Esto también corrobora la mayor rapidez con que el ibuprofeno se fija a la albúmina y, por ende, hay una mayor disminución en su fracción libre en plasma en comparación con la warfarina.

**Tabla 21. Cálculo del Orden de la Cinética de Unión de la Constante de Velocidad de Unión de los fármacos**

Tiempo (min)	Cn ibuprofeno (mg/L)	Orden uno In [ibuprofeno]	Cn warfarina (mg/L)	Orden uno In [warfarina]
10	39,6	3,678	12,8	2,548
20	33,9	3,525	12,6	2,536
30	27,7	3,321	12,5	2,524
40	26,4	3,275	12,2	2,501
50	23,9	3,175	12,0	2,482
60	23,9	3,175	11,8	2,469
70	22,7	3,122	11,7	2,462
80	21,4	3,065	11,7	2,459
90	21,4	3,065	11,5	2,445
100	19,6	2,974	11,3	2,425
110	18,3	2,908	11,2	2,418
120	18,3	2,908	11,2	2,414
<b>R =</b>	-0,9139	<b>-0,9529</b>	-0,9865	<b>-0,9886</b>
<b>Ac =</b>	35,3390	3,5891	12,8473	2,5550
<b>Bc =</b>	-0,1625874	<b>-0,0062553</b>	-0,0149284	<b>-0,0012522</b>

Nota: Elaboración propia, 2018.

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En el siguiente capítulo se derivan las conclusiones obtenidas tras el análisis de resultados, también mencionan recomendaciones aplicables para futuras investigaciones.

- Los resultados obtenidos ilustran de forma satisfactoria los conceptos estudiados teóricamente, referentes a la unión de fármacos a las proteínas plasmáticas y la capacidad de desplazamiento.
- Se logró optimizar un sistema *in vitro*, que simule la unión de la warfarina y el ibuprofeno a la proteína más abundante del plasma.
- Se evidenció la disminución de la concentración libre tanto de la warfarina como el ibuprofeno al someterlos a la presencia de albúmina.
- Se consiguió establecer un sistema *in vitro* que evidencie el desplazamiento de la warfarina por el ibuprofeno.
- Se demostró, que el ibuprofeno presenta mayor afinidad de fijación a la proteína que la warfarina.
- Se evidenció, la capacidad de unión del ibuprofeno a los dos sitios principales de la albúmina (sitio I y II).

- Con los resultados obtenidos, se logró caracterizar al ibuprofeno como un fármaco desplazante y a la warfarina el desplazado.
- Se identificó, el orden uno al cual ocurre la cinética de unión de ambos fármacos a la albúmina.

### **Recomendaciones**

- Evaluar, los fármacos a una misma concentración, para observar si ocurre una variación en la manera en que disminuyen las concentraciones plasmáticas.
- Se recomienda, alargar la cinética del ibuprofeno en la verificación del desplazamiento de la warfarina, para observar el posible proceso de saturación de la albúmina.
- A los profesores, se les recomienda la utilización de los sistemas de simulación como método de enseñanza, para comprender la importancia del efecto de la unión a las proteínas.

## Referencias

- Añache, J., Devissaguet, A., y Guyot, H. (1983). *Biofarmacia*. México: El Manual Moderno.
- Aleixandre, A. y Puerro, M. (2009). Absorción y distribución de los fármacos. En Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J., Lizasoain, I., Moro, M. y Portolés, A. (18 edición), *Velázquez. Farmacología Básica y Clínica*. (pp. 13-35). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. Recuperado de [http://bibliotecas.unr.edu.ar/muestra/medica\\_panamericana/9788498351682.pdf](http://bibliotecas.unr.edu.ar/muestra/medica_panamericana/9788498351682.pdf).
- Alonso, T. (2015). *Comparación y características farmacéuticas de comprimidos de ibuprofeno genéricos*. (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Armijo, J. (2005). *Farmacología Humana*. Barcelona, España: MASSON. S.A. Recuperado de [https://books.google.co.cr/books/about/Farmacolog%C3%ADa\\_humana.html?id=OvEPIvUwSqQC&printsec=frontcover&source=kp\\_read\\_button&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.co.cr/books/about/Farmacolog%C3%ADa_humana.html?id=OvEPIvUwSqQC&printsec=frontcover&source=kp_read_button&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false).
- Ávila, R. (2010). Propiedades de la sangre. En Fernández, J., Ariznavarreta, C., Cachofeiro, V., Cardinali, D., Escrich, E., Gil-Loyzaga, P., y Tamargo, J. (4 edición), *Fisiología Humana*. New York, NY: McGraw-Hill. Recuperado de <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1858&sectionid=134364443>
- Bi, S., Yan, L., Sun, Y. y Zhang, H. (2011). Investigation of ketoprofen binding to human serum albumin by spectral methods. *Spectrochimica Acta Part A*, (78), 410–414. Recuperado de <https://sci-hub.tw/10.1016/j.saa.2010.11.002>

Buxton, I. y Benet L. (2012). Farmacocinética: dinámica de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de fármacos. En Brunton, L., Chabner, B., Knollmann, B. (12 edición), *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*. New York, NY: McGraw-Hill. Recuperado de <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1882&sectionid=138606735>.

Ceballos, M., Holguín, H., González, C. y Amariles, P. (2013). Interacción warfarina y acetaminofén. Evaluación para establecer su relevancia clínica. *Acta Médica Colombiana*, 38 (1), 22-27. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=163126303004>

De Sousa, D. (2013). *Estudo in silico da interação da albumina de soro humano com o ibuprofeno*. (Tesis de Posgrado). Universidad Federal de Río Grande del Norte, Natal, Brasil.

Doménech, J., Martínez, J. y Peraire, C. (2013). *Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen I: LADME. Análisis farmacocinético. Biodisponibilidad y bioequivalencia*. Madrid, España: Síntesis S.A.

Doménech, J., Martínez, J. y Plá Delfina, J. (2001a). *Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen I: Farmacocinética*. Madrid, España: Síntesis S.A.

Doménech, J., Martínez, J. y Plá Delfina, J. (2001b). *Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen II: Biofarmacia*. Madrid, España: Síntesis S.A.

Durst, H. y Gokel, G. (2007). *Química orgánica experimental*. Barcelona, España: Reverté S.A. Recuperado de [https://books.google.co.cr/books?id=xiiqTfEO1a2gC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=xiiqTfEO1a2gC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false).

- Esmaeilzadeh, S., Valizadeh, H. y Zakeri, P. (2016) The effects of pH, temperature and protein concentration on the *in vitro* binding of flutamide to human serum albumin. *Pharm Dev Technol*, 22 (8), 982-991. DOI: 10.3109/10837450.2016.1163392
- Fehske, K., Müller, W. y Wollert, U. (1981). The location of drug binding sites in human serum albumin. *Biochemical Pharmacology*, 30 (7), 687-692.
- Fox, S. (2016). *Fisiología humana, 14e*. New York, NY: McGraw-Hill. Recuperado de <http://accessmedicina.mhmedical.com/Content.aspx?bookid=2163&sectionid=162707735>
- Ghuman, J., Zunszain, P., Petitpas, I., Bhattacharya, A., Otagiri, M. y Curry, S. (2005). Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol.*, 353 (1), pp.38-52.
- Grosser, T., Smyth, E. y FitzGerald, G. (2012). Antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos; farmacoterapia de la gota. En Brunton, L., Chabner, B. y Knollmann, B. (12 edición), *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*, New York, NY: McGraw-Hill. Recuperado de <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1882&sectionid=138612968>.
- Gutiérrez, M. (2010). *Establecimiento de Ensayos In Vitro, para el Laboratorio de Farmacocinética, que simulen los Modelos Intravenosos: Monocompartimental con y sin Periodo de Latencia y Bicompartimental en la Universidad Internacional de las Américas*. (Tesis de grado Licenciatura en Farmacia). Universidad Internacional de las Américas, Costa Rica.

Hernández, S., Fernández, C., y Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación*. México: McGraw-Hill/Interamericana Editores, S.A. de C.V.

Kennelly, P., Murray, R., Jacob, M., y Varghese, J. (2016). Proteínas plasmáticas e inmunoglobulinas. En Rodwell, V., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., y Weil, P. (30 edición), *Harper. Bioquímica ilustrada*. New York, NY: McGraw-Hill. Recuperado de <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1814&sectionid=127366303>

Linares, A., Milián, P., Jiménez, L., Chala, J., Alemán, H., Betancourt, B., Rodríguez, J. y Martín, L. (2002). Interacciones Medicamentosas. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 21 (2), 139-148. Recuperado de [http://www.latamjpharm.org/trabajos/21/2/LAJOP\\_21\\_2\\_2\\_2\\_3B9FQZINM4.pdf](http://www.latamjpharm.org/trabajos/21/2/LAJOP_21_2_2_2_3B9FQZINM4.pdf).

López, R. (2014). Enfermedad trombótica. Warfarina y sus interacciones con medicamentos de atención primaria. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica LXXI*, (612), 745-752.

Maíz, A. (1993). Albúmina Humana. *Ars Medica Revista de ciencias médicas*. 22 (3), 204-205.

Marín, P. (2010). *Establecimiento de Ensayos In Vitro, para el Laboratorio de Farmacocinética, que simulen los Modelos Extravasales: Monocompartimental con y sin Periodo de Latencia y Bicompartimental en la Universidad Internacional de las Américas*. (Tesis de grado Licenciatura en Farmacia). Universidad Internacional de las Américas, Costa Rica.

Márquez, M., Quintanar, L. y Castañeda, G. (2013). Caracterización espectroscópica de la unión de Docetaxel a la albúmina sérica humana. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 44 (1), 45-51. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v44n1/v44n1a6.pdf>.

Otosu, T., Nishimoto, E. y Yamashita, S. (2010). Multiple conformational state of human serum albumin around single tryptophan residue at various pH revealed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *J Biochem.*, 147 (2), pp.191-200.

Pascuzzo, C. (2008). *Farmacología Básica*. Recuperado de <https://es.slideshare.net/yackwarlikegutierrezttito/farmacologa-basica>.

Pérez, A., López, A., y Grau, I. (2002). Antiinflamatorios no esteroideos (AINES): Consideraciones para su uso estomatológico. *Revista Cubana de Estomatología*, 39 (2), 119-138. Recuperado de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75072002000200004](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072002000200004)

Quintero, J. (2010). Cincuenta años de uso clínico de la warfarina. *Investigación Clínica. Universidad del Zulia*, 51 (2), 269-287. Recuperado de: <http://www.scielo.org.ve/pdf/ic/v51n2/art08.pdf>.

Ramos, M. (2015). *Diseño de una práctica de laboratorio que ilustre los conceptos de biodisponibilidad absoluta y relativa en el curso de farmacocinética, simulando de forma in vitro la administración del dimenhidrinato vía oral, intravenosa e intramuscular, en la Universidad Internacional de las Américas, de abril a noviembre del 2015*. (Tesis de grado Licenciatura en Farmacia). Universidad Internacional de las Américas, Costa Rica.

Ritschel, W., Kearns, G. (2004). *Handbook of Basic Pharmacokinetics-including clinical applications*. Washington, D.C.: APhA.

Rodwell, V., Bender, D., Botham, K., Kennelly, P., y Weil, A. (2016). Harper. Bioquímica ilustrada, 30e. Recuperado de <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1814&sectionid=127362042>

- San Miguel, M.T., Vargas, E. y Martínez, A. (2004). Interacciones entre medicamentos y alimentos: aspectos actuales. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 70 (1), 147-179. Recuperado de <http://analesranf.com/index.php/aranf/article/view/233>.
- Schneidera, E., Huangc, J., Carboned, V., Bakere, M., Azada, M., Cooperc, M., Lia, J. y Velkov, T. (2015). Drug–drug plasma protein binding interactions of ivacaftor. *Journal Molecular Recognition*, 339-348.
- Shao X., Ai N., Xu D. y Fan X. (2016). Exploring the interaction between *Salvia miltiorrhiza* and human serum albumin: Insights from herb–drug interaction reports, computational analysis and experimental studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 161, 1-7.
- Tedesco, D., Pistolozzi, M., Zanasi, R. y Bertucci, C. (2014). Characterization of the species-dependent ketoprofen/albumin binding modes by induced CD spectroscopy and TD-DFT calculations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, pp. 1-5. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.11.029>.
- Torres, J. (2010). Uso de la warfarina en neurología. *Acta Neurológica Colombiana*, 26 (2), pp. 25-34. Recuperado de <https://www.acnweb.org/es/acta-neurologica/volumen-26-2010/66-volumen-26-numero-2-junio-de-2010-suplemento-21/148-uso-de-la-warfarina-en-neurologia.html>.
- Vargas, M. (2006). *Implementación de un método para la purificación de albúmina a partir del plasma equino*. (Trabajo final de graduación, bachiller). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.

Wagner, J. (1983). *Farmacocinética Clínica*. Barcelona, España: Reverte.

Weitz, J. (2012). Coagulación sanguínea y anticoagulantes, fibrinolíticos y antiplaquetarios. En Brunton, L., Chabner, B. y Knollmann, B. (12 edición), *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*. New York, NY: McGraw-Hill. Recuperado de <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1882&sectionid=138612188>.

Winter, M. (1994). *Farmacocinética Clínica Básica*. Madrid, España: Díaz de Santos S.A. Recuperado de [https://books.google.co.cr/books?id=hH1JBOUtmBgC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](https://books.google.co.cr/books?id=hH1JBOUtmBgC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false).

Yamasaki, K., Sato, H., Minagoshi, S., Kyubun, K., Anraku, M., Miyamura, S., ... Otagiri, M. (2017). The Binding of Silibinin, the Main Constituent of Silymarin, to Site I on Human Serum Albumin. *Biol. Pharm. Bull*, 40, 310–317.

Yurgaky, J. y Rodríguez, F. (2009). Warfarina: uso contemporáneo. *Revista Médica*, 17 (1), 107-115. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/med/v17n1/v17n1a15.pdf>.

Zehnder, J.L. (2016). Fármacos utilizados en trastornos de la coagulación. En Katzung, B. y Trevor, A. (13 edición), *Farmacología básica y clínica*. New York, NY: McGraw-Hill. Recuperado de <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1832&sectionid=126879626>.