

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE FARMACIA



**DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS POR CONSIDERAR EN LA
OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES PARA EL DESARROLLO DE
PROCEDIMIENTOS QUE EVIDENCIE LA UNIÓN DE FÁRMACOS A
PROTEÍNA PLASMÁTICA A NIVEL DE ENSAYOS IN VITRO, MEDIANTE LA
DETERMINACIÓN DE LA CONSTANTE DE AFINIDAD DEL IBUPROFENO A
LA ALBÚMINA HUMANA, EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA DE LA
UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS,
DURANTE EL II CUATRIMESTRE 2022**

Modalidad de tesis para optar por el grado de Licenciatura en Farmacia

KRISTCHED ALONDRA AGUILAR DELGADO

TUTOR: ADAM AMEY WILLIAMS

San José, Costa Rica

2022

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 determinar los parámetros por considerar para la optimización de condiciones para el desarrollo de procedimientos de ensayos *in vitro* que evidencien la unión de fármaco a proteína plasmática, mediante la determinación de la constante de afinidad del ibuprofeno a la albúmina humana.

Lo anterior con la intención de contestar la pregunta de investigación. ¿Qué parámetros se deben considerar en la optimización de las condiciones para el desarrollo de procedimientos que evidencien la unión de fármacos a proteína plasmática a nivel de ensayos *in vitro*?

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. Estos resultados experimentales obtenidos ilustran los conceptos estudiados teóricamente, referentes a la unión de fármacos a las proteínas plasmáticas.

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.

AGRADECIMIENTOS

Primero, quiero agradecer a Dios por permitirme estar aquí en este momento y darme la fortaleza en este proceso educativo y de vida.

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todos los profesores que han sido parte de mi formación educativa durante todo este proceso; en especial a mi tutor Adam Amey y la doctora Lexi Chávez, por siempre estar pendientes de proporcionarme toda la ayuda necesaria con tiempo y conocimiento durante el transcurso de este proyecto. También a la doctora Melissa Martínez, quien siempre me apoyó con un abrazo cuando más lo necesitaba.

Deseo reconocer mi más sincero agradecimiento al doctor Ricardo Sancho, director de la carrera de Farmacia; a don José Roberto Vega, director del Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC), por permitirme realizar mi investigación en sus instalaciones y a todo el personal porque siempre están pendientes de ofrecer su ayuda.

Estoy infinitamente agradecida con mis padres, Randall y Gabriela, mi abuela Lidia, y tío Luis ya que sin ellos no podría haber tenido la oportunidad de estar donde estoy hoy; por su lucha constante de querer verme crecer como persona de bien y como profesional día tras día. También a todos aquellos familiares y amigos que me han apoyado siempre y me han visto crecer como persona.

Por último, pero no menos importante, agradezco a todos esos compañeros con los que me he topado desde el inicio de mis estudios. Estoy particularmente agradecida con José Ángel, Edgar, Nico, Andres y Yara, quienes a través de los años se volvieron en grandes amigos para mí.

DEDICATORIA

Al concluir una gran etapa de mi vida, quiero dedicar este trabajo a todos aquellos que caminaron en todo momento junto a mí en este proceso y siempre fueron inspiración, apoyo y fortaleza. Esta mención en especial para Dios, mis padres y mi abuela Lidia, ya que ella fue la primera persona que me inspiró a querer ser farmacéutica desde que era una niña; y, por último, a mis abuelos que en paz descansen, María, Rosalía y Chango.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	II
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA.....	IV
TABLA DE CONTENIDO	V
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE GRÁFICOS.....	XI
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Introducción	2
1.2. Planteamiento del problema.....	2
1.3. Objetivos	5
1.3.1. Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específicos.....	5
1.4. Justificación.....	5
1.5. Antecedentes	8
1.5.1. Antecedentes históricos	8
1.5.2. Antecedentes internacionales	9
1.5.3. Antecedentes nacionales.....	10
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Fármaco.....	13
2.2. Proceso LADME.....	15
2.2.1. Liberación.....	15
2.2.2. Absorción.....	15
2.2.2.1. Difusión pasiva	15

2.2.2.2. Difusión facilitada	16
2.2.3. Distribución	17
2.2.4. Metabolismo	17
2.2.5. Excreción	18
2.2.6. Aclaramiento	19
2.2.6.1. Aclaramiento hepático	20
2.2.6.2. Aclaramiento renal	20
2.3. Plasma sanguíneo	20
2.3.1. pH sanguíneo	21
2.3.1.1. Importancia del mantenimiento de pH	22
2.3.2. Proteínas plasmáticas	23
2.3.2.1. Factores que afectan las concentraciones de proteínas en plasma:	26
2.3.2.2. Albúmina humana	28
2.3.2.2.1. Albúmina humana exógena	29
2.3.3. Unión de fármaco a proteína plasmática	29
2.3.4. Afinidad del complejo fármaco-proteína plasmática	30
2.3.5. Afinidad de fijación	30
2.3.6. Grado de afinidad	31
2.3.7. Cinética de unión	31
2.3.8. Relación de las concentraciones de fármaco y proteína en la formación del complejo fármaco-proteína	33
2.3.9. Desplazamiento de fármacos por competencia en los sitios de unión	33
2.4. Metodologías para determinación de la unión fármaco–proteína	34
2.4.1. Diálisis	34
2.4.2. Ultrafiltración	34

2.4.3. Análisis directo	35
2.4.4. Espectroscopia por radiación ultravioleta	35
2.4.4.1. Mediciones espectroscópicas.....	35
2.4.4.2. Proceso de absorción	35
2.4.5. Calorimetría de titulación isotérmica	36
2.5 AINE	37
2.5.1. Ibuprofeno	40
2.5.1.1. Mecanismo de acción	42
2.5.1.2. Propiedades farmacocinéticas.....	42
2.5.1.3. Sitio de unión del ibuprofeno a la albúmina humana	42
2.5.1.4. Interacciones medicamentosas	43
2.5.1.5. Reacciones adversas	44
2.6. Importancia farmacocinética	44
2.6.1. Tiempo de vida media	46
2.6.2. Área bajo la curva.....	46
2.6.3. Volumen de distribución.....	47
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	49
3.1. Enfoque	50
3.2. Diseño	50
3.3. Fuentes de información	51
3.4. Criterios de inclusión y criterios de exclusión	52
3.5. Variables de la investigación	53
3.6. Instrumentos y técnicas	55
3.7. Materiales	55
3.8. Procedimiento de recolección y análisis de datos	55

3.9. Diseño de experimentos	56
CAPÍTULO IV. RESULTADOS.....	58
4.1. Parámetros que se deben considerar en el desarrollo de ensayos <i>in vitro</i>	59
4.2. Optimización de las condiciones de disolución	61
4.2.1. Determinación de la longitud de onda máxima de absorción y concentración, tanto del ibuprofeno como de la albúmina humana, para el análisis de la unión fármaco a proteína plasmática	64
4.2.2. Curvas de calibración	65
4.2.3. Optimización de la concentración de albúmina	67
4.2.4. Optimización de la concentración de ibuprofeno.....	70
4.2.5. Verificación de la unión de ibuprofeno a la albúmina en un sistema de temperatura controlada y a temperatura ambiente	73
4.2.5.1 Determinación de los tiempos de muestreo.....	73
4.2.5.2 Ensayos sometidos a distintas temperaturas.....	75
4.3 Desarrollo de ensayos fármaco – proteína para determinación de constante de afinidad.....	80
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	94
5.1. Conclusiones	95
5.2. Recomendaciones.....	95
CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
CAPÍTULO VII. ANEXOS	105
Anexo 1. Carta de revisión filológica	106

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de fármacos según su método de obtención.....	13
Tabla 2. Principales funciones que presenta la sangre.....	21
Tabla 3. Algunas funciones que presentan las proteínas.....	25
Tabla 4. Factores fisiológicos y patológicos que afectan las concentraciones de proteínas en plasma	27
Tabla 5. Clasificación de AINES según su selectividad por la ciclooxigenasa	39
Tabla 6. Criterios de búsqueda de la información.....	51
Tabla 7. Criterios de Inclusión y Criterios de Exclusión	52
Tabla 8. Clasificación de la información según nivel de evidencia.	53
Tabla 9. Variables de la Investigación.....	54
Tabla 10. Preparación de las disoluciones de ibuprofeno empleadas para determinar la longitud de onda del máximo de absorción.	64
Tabla 11. Longitud de onda de máximos de absorción obtenidas para distintas concentraciones del ibuprofeno s mediante Espectrofotometría UV-VIS	65
Tabla 12. Longitudes de onda de máximos de absorción obtenidas para distintas concentraciones de la albúmina mediante Espectrofotometría UV-VIS.....	65
Tabla 13. Curva de Calibración del Ibuprofeno Obtenida Mediante Análisis de Espectrofotometría UV-VIS.....	66
Tabla 14. Valores estadísticos de la cuva de calibración	67
Tabla 15. timización de la Concentración de Albúmina humana a emplear	67
Tabla 16. Optimización de la concentración de ubiprofeno a emplear con base en las absorbancias de disoluciones a distintas concetraciones del fármaco analizadas a 264 nm. 71	
Tabla 17. Verificación de la Unión de Ibuprofeno a la albúmina humana en un sistema de temperatura controlada	76
Tabla 18. Verificación de la Unión de Ibuprofeno a la albúmina humana en un sistema de temperatura ambiente.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 19. Miligramos de Ibuprofeno extraído de la solución con albúmina humana..	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 20. Miligramos de Ibuprofeno libre en la solución con albúmina humana.	¡Error! Marcador no definido.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación del proceso de difusión pasiva.....	16
Figura 2. Pasos para el diagnóstico de alteraciones acido-base.....	23
Figura 3. Dimensiones de tamaño y pesos moleculares entre las principales proteínas presentes en plasma	26
Figura 4. Representación de un proceso de calorimetría de titulación isotérmica	37
Figura 5. Representación de los efectos que se desencadenan tras la inhibición de la COX-1	39
Figura 6. Representación de los efectos que se desencadenan tras la inhibición de la COX-2	40
Figura 7. Estructura de la molécula de ibuprofeno protonado y desprotonado	41
Figura 8. Subdominios de unión de la albúmina humana.....	43
Figura 9. Parámetros importantes para estudiar la farmacocinética de un fármaco en un paciente	45
Figura 10. Representación de distribución de una droga en el organismo	47
Figura 11. foto del ibuprofeno en agua.....	62
Figura 12. Foto de buffer de ibuprofeno en buffer de fosfatos a pH.....	63
Figura 13. Albúmina humana en solución inyectable	¡Error! Marcador no definido. 8
Figura 14. Soluciones de albúmina en distintos porcentajes	70
Figura 15. Solución de albúmina a una concentración de 0,1%.....	70
Figura 16. Disolución de albúmina a una concentración 0,1%	72
Figura 17. Apariencia de las disoluciones de ibuprofeno a distintas concentraciones	72
Figura 18. Espectro de absorción de las mediciones de ibuprofeno 0,07 mg/mL en disolución con la albúmina.....	79
Figura 19. Ensayo in vitro de la unión de ibuprofeno 0,6 mg/MI a la albúmina humana bajo condiciones de temperatura 37°C y pH 7,5	78
Figura 19. Ensayo in vitro de la unión de ibuprofeno 0,6 mg/MI a la albúmina humana en condiciones de temperatura ambiente y pH 7,5	79

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Representación de la Absorbancia en Función de la Concentración de Ibuprofeno	66
Gráfico 2. Espectro de absorción de las mediciones de ibuprofeno en disolución con la albúmina.....	¡Error! Marcador no definido.
Gráfico 3. Representación de la afinidad del ibuprofeno en función de la Concentración de Ibuprofeno con respecto al tiempo.....	87

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción

La distribución de los fármacos en el organismo se produce, principalmente, a través del sistema circulatorio, el cual consta de una cadena de vasos sanguíneos que transportan el fármaco en la sangre mediante arterias que llevan sangre a los tejidos y venas que la devuelven al corazón. La distribución del fármaco dependerá tanto de sus propiedades fisicoquímicas como de las características del paciente, las cuales pueden incluir perfusión de órganos, flujo sanguíneo o alguna patología cardíaca¹.

La mayoría de los medicamentos son solubles en el plasma; muchos forman complejos con otros componentes de la sangre como la albúmina, globulinas, lipoproteínas y eritrocitos. De esta manera, los medicamentos tienen acceso a los mismos sitios a los que tiene el componente sanguíneo. Por su parte, la albúmina es la macromolécula cuantificada como más importante de las proteínas plasmáticas, ya que es a la que frecuentemente se le une la mayor parte del medicamento.

La unión de medicamento a la albúmina se ha estudiado *in vitro* por las técnicas de diálisis, ultrafiltración, cromatografía o por métodos espectroscópicos. Estas técnicas han dado resultados similares, pero no siempre idénticos. Dichos estudios deben establecer no solo la extensión de la unión, sino, además, el número de sitios de unión y sus afinidades por él. Un fármaco puede unirse a varios sitios de unión en la molécula de albúmina; es probable que una sustancia pueda desplazar a otra de algunos de sus sitios de unión en la albúmina, pero no de otros⁶.

Debido a lo anterior, el presente trabajo se desarrolla con un enfoque cuantitativo, por lo que se diseña una metodología de carácter probatoria, con el fin de obtener, mediante cálculos matemáticos, el grado de afinidad que presenta el ibuprofeno a la albúmina humana. Lo anterior se desarrolla bajo condiciones controladas, basado en la evidencia que existe sobre ensayos *in vitro*.

1.2. Planteamiento del problema

Pereira et al.⁴, en su estudio de enfoque cuantitativo, señalaron que los medicamentos a escala mundial aumentan cada año y esto se puede relacionar en cierta forma con el aumento de la población y la esperanza de vida. Los medicamentos han llegado a ser el recurso

sanitario más empleado y regulado, lo cual permite garantizar que solamente se comercialicen y se administren aquellos que sean lo suficientemente seguros, efectivos y de buena calidad. Sin embargo, para que un medicamento logre equivalencia terapéutica, debe pasar por estudios *in vitro* o *in vivo* contra un medicamento de referencia.

Los estudios *in vitro* corresponden a curvas de disolución del principio activo en función del tiempo, que se realizan bajo condiciones controladas, fuera de un organismo vivo; generalmente se utilizan tejidos, órganos o células en los que se estudian parámetros farmacocinéticos. Este tipo de estudios funcionan para probar la eficacia de medicamentos y otro tipo de tratamientos nuevos, como de los que ya se encuentran en el mercado. Muchos estudios buscan garantizar eficacia de tratamientos ya en mercado para asegurar que funcionan como dicen que lo hacen.

Nuevas metodologías desarrolladas para determinar y cuantificar el fármaco en la matriz de estudio deben validarse cumpliendo una serie de requisitos para que el resultado informado sea el correcto. La monitorización terapéutica de fármacos requiere conocer y manejar varios aspectos que en forma simultánea le dan sustento. Es más complejo de lo que se cree, ya que involucra la participación de varias especialidades. Por lo que es necesario conocer los conceptos de farmacocinética para una correcta interpretación de los resultados y adaptar los esquemas farmacológicos a los requerimientos de los pacientes¹⁷.

La farmacocinética es un aspecto importante de la terapia con medicamentos y el diagnóstico de la función de los órganos, la respuesta de los pacientes en cuanto a cómo estos absorben, distribuyen, metabolizan y eliminan los fármacos, varía considerablemente, lo que puede conducir a una variabilidad clínica relevante en las características farmacocinéticas². Un estudio farmacocinético es la explicación de un fenómeno biológico complejo, como lo es la interacción entre una molécula y un organismo viviente mediante una expresión matemática⁵.

Para estudiar la farmacocinética en un paciente, se deberían conocer los parámetros farmacocinéticos que explican el sistema ADME (Absorción, distribución, metabolismo y excreción) de ese fármaco; los parámetros más importantes son: El volumen de distribución aparente (V_d), Aclaramiento plasmático (Cl_p), Área bajo la curva de la gráfica concentración

plasmática (ABC en 24 horas), Constante de velocidad de eliminación (ke), Tiempo de vida media de eliminación (más conocido como vida media, $t_{1/2}$) y Constante de absorción (Ka)²².

Uno de los principales objetivos de las ciencias farmacéuticas es asegurar la calidad de los productos farmacéuticos durante todo su ciclo de vida; calidad que se evalúa mediante estudios de laboratorio, tales como identificación, potencia, pureza, disolución, estabilidad de la forma farmacéutica, entre otros. Adicionalmente, en el caso de medicamentos que para lograr su distribución en el organismo requieren una etapa previa de absorción, se deben realizar estudios de biodisponibilidad con el fin de garantizar que el fármaco alcanza la circulación sistémica a una velocidad y cantidad adecuadas para lograr su efecto terapéutico²³.

La mayoría de los medicamentos son solubles en el plasma; muchos forman complejos con otros componentes de la sangre como la albúmina, globulinas, lipoproteínas y eritrocitos. De esta manera, los medicamentos tienen acceso a los mismos sitios a los que tiene el componente sanguíneo. La albúmina es la macromolécula cuantificada como más importante de las proteínas plasmáticas, ya que es a la que frecuentemente se le une la mayor parte del principio activo¹¹.

La unión de los fármacos a proteínas plasmáticas es cuantificable y, generalmente, se representa en un porcentaje que es constante, pero puede ser saturable. Si bien la unión a las proteínas evita que el fármaco ejerza su efecto biológico, permite su transporte por la sangre para llegar a los diversos tejidos y es un medio de almacenamiento para cuando se reduzca su concentración plasmática libre. Esta información es útil para el mantenimiento de la dosis terapéutica en los tratamientos, ya que es posible establecer la fracción libre que puede tener acción farmacológica y calcular una dosis de mantenimiento¹⁹.

Dado lo anterior, se plantea la siguiente pregunta de investigación:

¿Qué parámetros se deben considerar en la optimización de las condiciones para el desarrollo de procedimientos que evidencien la unión de fármacos a proteína plasmática a nivel de ensayos *in vitro*?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Determinar los parámetros por considerar para la optimización de condiciones para el desarrollo de procedimientos de ensayos *in vitro* que evidencien la unión de fármaco a proteína plasmática, mediante la determinación de la constante de afinidad del ibuprofeno a la albúmina humana.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Describir los parámetros por considerar para el desarrollo de ensayos *in vitro* en los que se evidencie la unión de fármaco a proteína plasmática, mediante la revisión de los estudios indicados en la literatura.
2. Optimizar las condiciones de disolución para el ensayo *in vitro* que propicie la formación del complejo fármaco-proteína plasmática.
3. Evidenciar la unión del ibuprofeno a la albúmina humana mediante el análisis de los niveles de fármaco libre en presencia de la proteína y la determinación *in vitro* de la constante de afinidad.

1.4. Justificación

Uno de los principales objetivos de las ciencias farmacéuticas es asegurar la calidad de los productos farmacéuticos durante todo su ciclo de vida; calidad que se evalúa mediante estudios de laboratorio, tales como identificación, potencia, pureza, disolución, estabilidad de la forma farmacéutica, entre otros. Adicionalmente, en el caso de medicamentos que para lograr su distribución en el organismo requieren una etapa previa de absorción, se deben realizar estudios de biodisponibilidad para garantizar que el fármaco alcanza la circulación sistémica a una velocidad y cantidad adecuadas para lograr su efecto terapéutico²³.

En Costa Rica, existe una demanda de estudios de equivalencia terapéutica de medicamentos (estudios *in vitro*) que requiere ser satisfecha con prontitud, con el fin de garantizar la calidad, seguridad y eficacia de aquellos que se producen en el país, no solo para efectos de su registro sanitario en Costa Rica, sino para aquellos que exportan a otros países, dado que también se les exige este tipo de ensayos. Es importante aclarar que, por lo general, los estudios *in vitro* son complementarios⁸.

Predecir la absorción *in vivo* del principio activo, mediante el establecimiento de correlaciones *in vitro/in vivo* que permiten reducir costos y acelerar el desarrollo de productos farmacéuticos, además de evitar la realización de estudios de biodisponibilidad o bioequivalencia en voluntarios humanos²³. Para esto es importante considerar dos factores importantes: solubilidad y permeabilidad. Ambas características son independientes de cada fármaco y de gran importancia, lo que es importante considerar al momento de analizar la distribución de un fármaco¹⁸.

La distribución de los fármacos en el organismo se produce, principalmente, a través del sistema circulatorio, el cual consta de una cadena de vasos sanguíneos que transportan el fármaco en la sangre mediante arterias que llevan sangre a los tejidos y venas que la devuelven al corazón. La distribución del fármaco dependerá tanto de sus propiedades fisicoquímicas como de las características del paciente, las cuales pueden incluir perfusión de órganos, flujo sanguíneo o alguna patología cardíaca. La mayoría de los medicamentos son solubles en el plasma; muchos forman complejos con otros componentes de la sangre como la albúmina, globulinas, lipoproteínas y eritrocitos. De esta manera, los medicamentos tienen acceso a los mismos sitios a los que tiene el componente sanguíneo.

Las proteínas son centrales para todos los seres vivos, a estas biomoléculas se les conoce como las máquinas de la vida porque cumplen diversas funciones cruciales para todos los organismos vivos. Muchas de ellas realizan una función enzimática, actuando como biocatalizadores de las reacciones químicas del metabolismo celular. Algunos grupos de proteínas tienen funciones de defensa, por ejemplo, los anticuerpos reconocen moléculas ajenas, mientras que la trombina y el fibrinógeno contribuyen a la formación de coágulos sanguíneos para evitar hemorragias, actúan como receptores o facilitan la entrada de sustancias a la célula¹⁰.

La albúmina es la macromolécula cuantitativamente más importante de las proteínas plasmáticas y, de manera frecuente, es a la que se le une la mayor parte del medicamento. Como la unión de medicamento a la albúmina es fácilmente reversible obedeciendo la Ley de Acción de Masas, los complejos medicamento-proteína sirven como reservorio circulante de medicamento libre, para así ser biotransformado o excretados; de este modo, la unión de

albúmina decrece la máxima intensidad, pero incrementa la duración de acción de muchos medicamentos¹¹.

La afinidad entre un medicamento y sus sitios de unión en una macromolécula es expresada como una constante de equilibrio que establece la relación de concentración de medicamento en forma unida entre el producto de las concentraciones de medicamento no unido y proteína. El número de moléculas de medicamento ligadas depende de la constante de equilibrio de la unión, del número de sitios de unión, de la concentración de macromolécula y de la concentración del medicamento. Además, la temperatura, pH y fuerza iónica pueden afectar el número de sitios de unión y su constante de afinidad *in vitro*¹¹.

La unión de medicamento a la albúmina se ha estudiado *in vitro* por las técnicas de diálisis, ultrafiltración, cromatografía o por métodos espectroscópicos. Estas técnicas han dado resultados similares, pero no siempre idénticos. Estos estudios deben establecer no solo la extensión de la unión, sino, además, el número de sitios de unión y sus afinidades por él. Un fármaco puede unirse a varios sitios de unión en la molécula de albúmina; es probable que una sustancia pueda desplazar a otra de algunos de sus sitios de unión en la albúmina, pero no de otros¹¹.

Las modificaciones acontecidas en la unión del fármaco a las proteínas plasmáticas pueden ocasionar cambios en la distribución farmacológica. Dichas modificaciones pueden tener relevancia clínica cuando el fármaco se encuentra unido a las proteínas plasmáticas en una proporción superior al 90% de la cantidad total de fármaco presente en el plasma y alcanza un intervalo terapéutico reducido. Además, se precisa que tenga un volumen de distribución pequeño (inferior a 0.15 L/kg), ya que, si se encuentra ampliamente distribuido en los tejidos, incrementos (incluso importantes) en la fracción de fármaco libre pueden carecer de significación clínica.

No contar con un sistema 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 simulaciones *in vitro* que se implementen en el ámbito educativo como una práctica para reforzar la formación profesional. Ya que la construcción de sistemas no biológicos permite 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.

1.5. Antecedentes

1.5.1. Antecedentes históricos

Martínez et al.¹¹, en su investigación de enfoque cuantitativo, señalaron que los medicamentos son transportados por el torrente sanguíneo desde su sitio de absorción a su sitio de acción, por lo que los medicamentos tienen acceso a los mismos sitios a los que tiene el componente sanguíneo. Estudios *in vitro* han revelado que un sitio en el que se une un fármaco puede ser diferente de aquellos al que se unen los otros. Un fármaco puede unirse a varios sitios de unión en la molécula de albúmina; es probable que una sustancia pueda desplazar a otra de algunos de sus sitios de unión en la albúmina, pero no de otros. Mediante ensayos *in vitro* determinaron que no existe competencia por el mismo sitio de unión en la albúmina entre la warfarina, fenitoína e indometacina.

Cordero et al.¹⁵, en su investigación de enfoque cualitativo, presentan una amplia descripción de las características bioquímicas y biológicas de la albúmina humana, así como sus acciones fisiológicas en el organismo. Siendo la albúmina una proteína con peso molecular de aproximadamente 66.000 – 69.000 g/mol, es altamente liposoluble; a pesar de su elevada carga negativa, puede ligarse reversiblemente tanto con cationes como con aniones, lo que hace posible que su situación plasmática sea óptima para poder transportar o inactivar una serie de sustancias como metales pesados, drogas, tinturas, ácidos grasos, hormonas y enzimas. Mediante una amplia revisión bibliográfica, presentaron indicaciones y la dosificación para cada una de las entidades clínicas en las que se utiliza la albúmina humana en la práctica médica general.

1.5.2. Antecedentes internacionales

Menesses et al.²⁵, en su investigación de enfoque cuantitativo, estudiaron que entre los medicamentos más comunes en el mundo se encuentran los antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Cada día, más de 30 millones de estadounidenses los usan para tratar dolores de cabeza, esguinces, síntomas de la artritis y cualquier otro tipo de molestia. La elección del AINE depende, entre otros aspectos, del nivel del dolor y la farmacocinética de cada uno. Mediante un estudio computacional determinaron la afinidad con la que se enlazan con el sitio activo de la enzima y calcular la eficiencia de enlace de estos.

Urresta et al.²⁷, en su investigación de enfoque cuantitativo, estudiaron que la espectrofotometría se ha estado utilizando desde hace algún tiempo para la cuantificación e identificación de sustancias químicas que presenta coloración o que poseen la capacidad de absorber la luz visible y las radiaciones ultravioletas. Es uno de los métodos de análisis más usados, y se basa en la relación que existe entre la absorción de luz por parte de un compuesto y su concentración. Mediante un ensayo, realizaron diferentes controles de calidad establecidos en la Farmacopea Americana oficial USP 39, dentro de los cuales estuvieron análisis fisicoquímicos y microbiológicos.

Por su parte, Subirán et al.¹⁴, en su investigación de enfoque cualitativo, definieron que, cuando un medicamento es administrado, atravesará una serie de procesos en el organismo, estudiados por la farmacocinética y englobados en el término LADME: Liberación, Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción. Realizando una revisión bibliográfica de los conceptos, los procedimientos, la legislación y los últimos avances en el campo de las bioexenciones, demuestran que la relación entre los ensayos de disolución *in vitro* y el comportamiento *in vivo* de los medicamentos es compleja, y depende de las características del medicamento. Mediante una amplia revisión bibliográfica, determinaron que un estudio farmacocinético es la explicación de un fenómeno biológico complejo, como lo es la interacción entre una molécula y un organismo viviente⁹.

Robles et al.¹, en su investigación de enfoque cualitativo, mencionan que la farmacocinética es el estudio de la evolución temporal de las concentraciones de un fármaco o metabolitos en un organismo (fluidos, tejidos, compartimentos extracorporales) y de las relaciones matemáticas que permitan interpretar los datos a través de modelos definidos. Es

el estudio del proceso ADME. Asimismo, constituye un aspecto importante de la terapia con medicamentos y del diagnóstico de la función de los órganos. Mediante una amplia revisión bibliográfica, concluyeron que, si se realizara una estimación de los cambios que influyen en la terapia, con los fármacos que poseen un amplio rango terapéutico, se observaría que es muy probable que estos no causen daño.

Romero et al.¹⁰, en su investigación de enfoque cualitativo, describen que las proteínas llevan a cabo una gran variedad de funciones debido a la estructura que adoptan en el estado nativo. El estado nativo está en equilibrio con un gran número de conformaciones inactivas que colectivamente son llamadas estado desnaturalizado. Mediante una amplia revisión bibliográfica, determinaron que, a partir de experimentos de calorimetría diferencial de barrido CDB, es posible obtener la estabilidad termodinámica de la proteína, esto es el cambio de energía libre de Gibbs (ΔG) entre el estado nativo y el desnaturalizado, así como determinar la curva de estabilidad.

Evoli et al.³², en su investigación de enfoque cuantitativo, estudiaron y proporcionaron múltiples predicciones que cubren la geometría, la afinidad de la unión y el estado de protonación de la forma farmacéuticamente más activa (isómero S) del ibuprofeno a la albúmina, mediante el uso de cálculos de energía libre de unión absoluta en combinación con la dinámica molecular clásica y acoplamiento molecular. Mediante métodos computacionales obtuvieron una descripción detallada de la unión del ibuprofeno, lo que permitió explicar resultados reportados en la literatura en las últimas décadas y demostrando la posibilidad de usar métodos de simulación para predecir la unión del ligando a la albúmina.

1.5.3. Antecedentes nacionales

Pereira et al.⁸, en su investigación de enfoque cuantitativo, estudiaron que los medicamentos a escala mundial aumentan cada año, y esto se puede relacionar en cierta forma con el aumento de la población y la esperanza de vida. Los medicamentos han llegado a ser el recurso sanitario más empleado y regulado, lo cual permite garantizar que solamente se comercialicen y se administren aquellos que sean lo suficientemente seguros, efectivos y de buena calidad. Sin embargo, para que un medicamento genérico logre equivalencia terapéutica, debe pasar por estudios *in vitro* o *in vivo* contra un medicamento de referencia. Mediante una encuesta *online* durante marzo y abril del 2013, en Costa Rica determinaron

que 85 medicamentos en el país requerían de estudios de equivalencia terapéutica no solo para efectos de su registro sanitario en el país, sino para aquellos que exportan a otros países, dado que también se les exige este tipo de ensayos.

Segura et al.¹², en su investigación de enfoque cualitativo, expresan que el concepto de medicamento genérico muchas veces no queda claro, puesto que se confunde con medicamentos que son simples copias o son engaños. Debe quedar claro que, para la mayoría de las agencias regulatorias del mundo, un medicamento genérico es el que ha demostrado intercambiabilidad por uno de referencia o innovador, siempre y cuando se hayan efectuado estudios de bioequivalencia. Mediante una amplia revisión bibliográfica, determinaron que los estudios *in vitro* no solo se aplican a genéricos, sino también a productos originales cuando el sistema de clasificación biofarmacéutica así lo indique.

Pérez et al.²⁶, en su investigación de enfoque cualitativo, estudiaron que el ibuprofeno es un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINE), el cual es presentado en forma de tabletas o suspensión oral, consumido para el tratamiento de fiebre, dolor de cabeza de intensidad leve y moderada (como migraña), artritis, artrosis, inflamación no reumática y dismenorrea primaria. Este AINE se categoriza como un analgésico que no requiere de receta médica para adquirirse, además de que, actualmente, es distribuido en supermercados y farmacias. Incluso se ha contabilizado que se encuentra generalmente entre los dos AINE más consumidos. Mediante ensayos *in vitro* garantizaron el buen funcionamiento realizando la verificación de algunos parámetros de desempeño analítico en el espectrofotómetro UV-Vis.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

En este capítulo, se pretende sustentar teóricamente el estudio. Se desarrolla la base teórica para la investigación mediante la definición de conceptos de importancia, abarcando temas de plasma humano, afinidad a proteínas plasmáticas, el desplazamiento de fármacos de su sitio de unión, parámetros que se deben considerar para desarrollar ensayos *in vitro* y AINE.

2.1. Fármaco

Un fármaco es una sustancia química, la cual puede ser de origen natural, sintético, semisintético o biotecnológico y cuando interacciona con un organismo vivo, da lugar a una respuesta biológica porque produce efectos medibles. Dentro de la definición, se encuentran aquellas sustancias de uso clínico para prevenir, diagnosticar y tratar distintas patologías. Para poder ubicar una sustancia dentro de la clasificación de fármaco, debe administrársele a un organismo vivo de manera exógena y solo con fines médicos¹³. A continuación, en la tabla 1, se puede observar una descripción de la clasificación de fármacos según su método de obtención:

Tabla 1. Clasificación de fármacos según su método de obtención

Fármaco	Descripción
Naturales	El principio activo es una molécula ya existente en la naturaleza, cuya fórmula se conoce y puede sintetizarse.
Semisintéticos	El principio activo se sintetiza en el laboratorio haciendo modificaciones en la molécula natural con el fin de mejorar sus propiedades farmacocinéticas, potenciar o prolongar su efecto, o bien disminuir la aparición de reacciones adversas.
Sintéticos	No derivan de ningún producto natural conocido, es decir, se fabrican íntegramente en el laboratorio farmacéutico tras investigaciones.

Fuente: elaboración propia con base en la referencia¹³.

Cuando se administra un fármaco, los factores que determinan el tiempo en que este alcanza el sitio de acción y la cantidad del principio activo que se requerirá para lograr el efecto deseado van de la mano de la presentación del fármaco, su vía de administración y las

condiciones fisiopatológicas del paciente. Pueden clasificarse las vías de administración dependiendo de la manera en que el fármaco llega al sitio de acción. De esta forma, se encuentran dos grupos: las vías de administración que atraviesan barreras fisiológicas y las vías de administración inmediatas o directas¹³.

Para la mayoría de las vías de administración, es necesario que el fármaco atraviese varias membranas biológicas para así llegar a la circulación general y, posteriormente, a su sitio de acción. Estas membranas tienen una función de barrera, representando cierto grado de selectividad al momento de permitir el paso de los fármacos a través de ellas, facilitando el de ciertos fármacos o impidiendo el de otros. Esto dependerá de las propiedades fisicoquímicas y estructurales tanto de la membrana como del fármaco¹³.

La administración de medicamentos por la vía oral es la más frecuentemente utilizada, ya que se considera la más efectiva, segura y conveniente para la comodidad del paciente¹⁶. La absorción por medio de esta vía se lleva a cabo en la mucosa estomacal e intestinal, determinado por la naturaleza química del fármaco, así como las variables condiciones de pH que se presenten en el medio¹³. Los procesos por los que los fármacos atraviesan las membranas capilares hacia el tejido incluyen la difusión pasiva y la presión hidrostática.

La comprensión de los factores que influyen en los procesos cinéticos que ocurren luego de la administración, conocidos como LADME (Liberación Absorción, Distribución, Metabolización y Eliminación), pueden ser un aspecto importante para dirigir el proceso de desarrollo de fármacos, considerando que, una vez es administrado el medicamento por esta vía, los principios activos tienen que ser absorbidos desde el sitio de administración hasta la circulación sistémica, para luego distribuirse a todos los órganos y tejidos del cuerpo con el fin de producir su efecto farmacológico¹¹.

Los medicamentos son transportados por el torrente sanguíneo desde su sitio de absorción a su sitio de acción. La mayoría de los medicamentos son solubles en el plasma; muchos otros se asocian parcialmente a componentes de la sangre, tales como albúmina, globulinas, lipoproteínas y eritrocitos. De esta manera, los medicamentos tienen acceso a los mismos sitios a los que tiene el componente sanguíneo. Solo la fracción libre de medicamento difunde a través de la pared capilar y la membrana celular, alcanzando así su sitio de acción⁷.

2.2. Proceso LADME

2.2.1. Liberación

La liberación de un fármaco es el primer paso fundamental en la vía de eliminación de este. Después de la dosificación oral, el producto farmacéutico se desintegra, el ingrediente activo se libera y luego se disuelve en el tracto gastrointestinal (GI). Una vez que la sustancia farmacológica se disuelva, estará disponible para ser absorbida a través de las membranas celulares intestinales hacia la circulación sistémica¹².

2.2.2. Absorción

La absorción de un fármaco es un requisito previo para que este ejerza su acción. Dependiendo de la vía de administración, los fármacos tienen que ser absorbidos a través de varias membranas antes de que lleguen a la circulación general. Una vez en el plasma, la mayoría de los fármacos tienen afinidad por las proteínas plasmáticas, como la albúmina y la α -1 glicoproteína ácida. De las proteínas plasmáticas, la albúmina es la de mayor importancia y es la que se une a los fármacos ácidos².

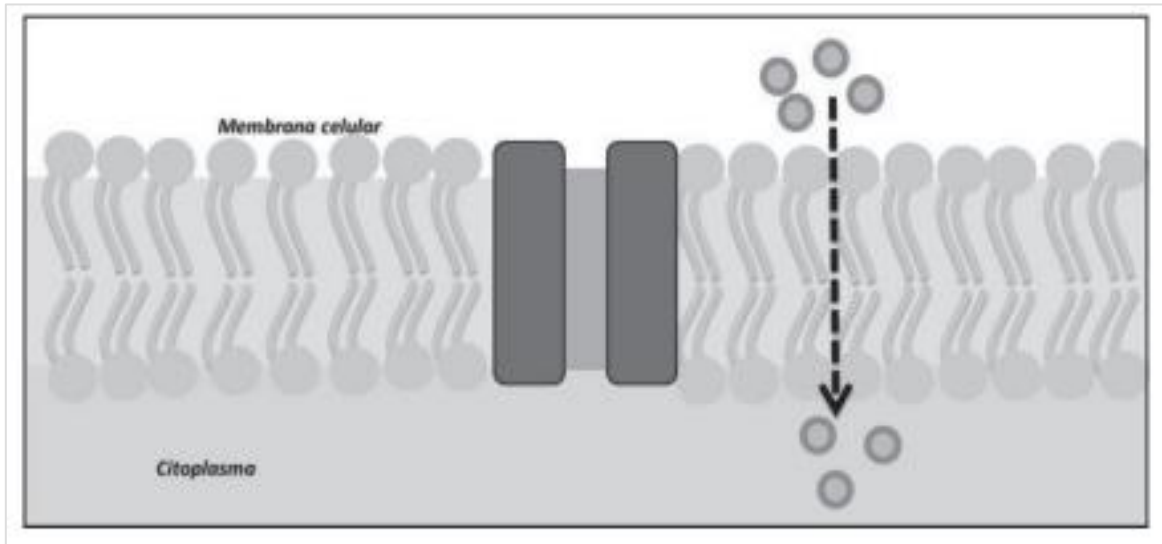
La absorción dependerá de factores tales como las propiedades fisicoquímicas del fármaco. Principalmente, su solubilidad acuosa; su constante de ionización; su capacidad de atravesar, por difusión las barreras biológicas (vinculada a la hidrofobicidad) y el peso molecular y su capacidad para interactuar con sistemas biológicos, enzimas y de transporte que la molécula de principio activo pueda encontrarse durante el proceso de absorción².

Existen varios mecanismos de absorción de fármacos a través de las membranas, dentro de los más utilizados están los siguientes:

2.2.2.1. Difusión pasiva

La difusión pasiva es el principal proceso por el cual la mayoría de los fármacos atraviesan las membranas celulares. Es el proceso por el que las moléculas de un fármaco se mueven desde un área de alta concentración a un área de baja concentración con bajo gasto energético y de manera espontánea. La velocidad con la que la molécula difunda dependerá de características como el gradiente de concentración, la liposolubilidad, el grado de ionización y el tamaño de la molécula^{1,13}.

Figura 1. Representación del proceso de difusión pasiva



Fuente: imagen tomada de la referencia¹³.

La difusión pasiva puede describirse con base en la Ley de difusión de Fick (ver ecuación 1)¹.

Ecuación 1. Ley de difusión de Fick

$$\text{Rate of drug diffusion} = \frac{dQ}{dt} = \frac{-DKA (C_p - C_t)}{h}$$

Fuente: ecuación tomada de la referencia¹.

$C_p - C_t$ es la diferencia entre la concentración del fármaco en el plasma (C_p) y en el tejido (C_t); A es el área superficial de la membrana; h es el espesor de la membrana; K es el coeficiente de reparto lípido-agua; y D es la constante de difusión. El signo negativo denota una transferencia neta de fármaco desde el interior de la luz capilar hacia el tejido y los espacios extracelulares¹.

2.2.2.2. Difusión facilitada

Es un proceso de transporte en el cual las moléculas atraviesan la membrana celular facilitadas por un portador o proteína transportadora, a favor de un gradiente de concentración, sin la necesidad del consumo de energía. Este mecanismo permite el paso de sustancias demasiado grandes y con una polaridad que dificulta su paso por poros, además,

es caracterizado por su rapidez y selectividad, ya que el transportador solo aceptará moléculas con una configuración específica. Estos transportadores son saturables y pueden sufrir fenómenos de competición ante la presencia de otras sustancias que pueden combinarse con estas proteínas¹³.

2.2.3. Distribución

Tras el proceso de absorción o aplicación en el torrente sanguíneo, las moléculas de un fármaco se distribuyen en el plasma y en el líquido intracelular, y su posterior cinética dependerá tanto de las propiedades químicas del fármaco, así como de las características intrínsecas del organismo (pH, procesos enzimáticos, velocidad metabólica, etc.). Generalmente, los fármacos viajan a través del plasma de manera libre, por medio de la fijación a proteínas plasmáticas (como la albúmina) o incorporados en células (principalmente eritrocitos). Después, comenzará a distribuirse a través de la circulación y llegará primero a aquellos órganos que tengan mayor aporte sanguíneo¹⁴.

El tamaño molecular es un factor que afecta la distribución de moléculas extremadamente grandes. Por último, la distribución depende del grado de ionización del fármaco, ya que la fracción no ionizada puede ir a cualquier parte del cuerpo. Al igual que la absorción, se trata de un proceso predominantemente pasivo, con excepción de algunos fármacos que son sustrato de sistemas de transporte especializado; de hecho, los mismos principios y mecanismos generales que rigen la absorción del principio activo intervienen luego en su distribución¹.

2.2.4. Metabolismo

El metabolismo de los fármacos es el término utilizado para describir la biotransformación de sustancias farmacéuticas en el organismo, para que estas puedan eliminarse más fácilmente. La mayoría de los procesos metabólicos que involucran a los fármacos ocurren en el hígado, ya que las enzimas que facilitan las reacciones se concentran allí. El propósito del metabolismo es, generalmente, cambiar la estructura química de la sustancia, para aumentar la facilidad con la que se puede excretar del cuerpo².

La velocidad de metabolismo de los fármacos varía entre pacientes. Algunos metabolizan el fármaco muy rápido, con lo que no se alcanzan concentraciones

terapéuticamente efectivas a nivel sanguíneo o en tejido; en otros, el metabolismo puede ser tan lento que las dosis normales presentan efectos tóxicos. Las velocidades se encuentran influenciadas por factores genéticos, desórdenes coexistentes, particularmente desórdenes crónicos hepáticos o falla cardíaca avanzada, o interacciones entre fármacos, especialmente aquellos que involucran aceleración o inhibición del metabolismo². El metabolismo se divide en procesos de fase I y II:

- En la fase I, el fármaco va a sufrir reacciones de oxidación, oxigenación, reducción, hidrólisis, alquilaciones y desalogenaciones, debido a las modificaciones basadas en la obtención de grupos funcionales. Los metabolitos producidos por las reacciones de fase I rara vez tienen la polaridad suficiente para excretarse, y muchos requieren un metabolismo adicional por parte de las enzimas de fase II. Los citocromos son la principal familia de enzimas responsables de las reacciones de fase I presentes, principalmente, en el hepatocito.¹².
- En la fase II, se facilita la conjugación de los metabolitos generados en las reacciones de fase I, con moléculas endógenas, tales como el ácido glucorónico, glutatión, sulfato o aminoácidos. Para los medicamentos administrados por vía oral, el hígado y el intestino son los sitios principales del metabolismo de los medicamentos donde tienen lugar las reacciones de fase I y fase II y, por lo tanto, también son los sitios potenciales para diferentes interacciones, como las interacciones fármaco-fármaco y alimento-fármaco¹².

2.2.5. Excreción

Una vez que el fármaco o cualquier sustancia ingresada al organismo ha pasado por los diferentes procesos metabólicos correspondientes, ya sea cumpliendo con su función o no, el paso final que le corresponde es la excreción. Se eliminará tanto la sustancia en sí como los metabolitos que haya producido, yendo de la sangre y los tejidos hacia el exterior del organismo. Dentro de las vías de excreción, se destaca la eliminación por medio de los riñones, los pulmones y el sistema hepatobiliar. Otras vías para la excreción del fármaco pueden incluir la excreción del fármaco en el sudor, la saliva, la leche (a través de la lactancia) u otros fluidos corporales^{12, 14}.

2.2.6. Aclaramiento

El aclaramiento o depuración es el concepto más importante por considerar cuando se diseña un régimen racional para la administración de medicamentos a largo plazo. Generalmente, se desea mantener las concentraciones de un fármaco estables dentro de una ventana terapéutica o rango asociado con la eficacia terapéutica y un mínimo de toxicidad para un agente dado.

Asumiendo una biodisponibilidad completa, la concentración del fármaco en el cuerpo en el estado estable se logrará cuando la velocidad de eliminación del fármaco se iguale a la velocidad de su administración (ver ecuación 2).

Ecuación 2. Relación que existe entre tasa de dosificación y el aclaramiento del fármaco

$$\text{Tasa de dosificación} = Cl \times C_{SS}$$

Fuente: ecuación realizada a partir de la referencia⁴³.

El Cl es el aclaramiento (*clearance*) del fármaco de la circulación sistémica, y C_{SS} es la concentración en estado estable o en equilibrio del fármaco. Cuando se conoce la concentración deseada en el estado estable del fármaco en plasma o sangre, la tasa de aclaramiento del fármaco determinará la velocidad a la que debe ser administrado⁴³.

Con la cinética de primer orden, el aclaramiento Cl variará con la concentración del fármaco (C), donde K_m representa la concentración a la que se alcanza la mitad de la velocidad de eliminación máxima (en unidades de masa/volumen), y V_m es igual a la velocidad máxima de eliminación (en unidades de masa/ tiempo). Por tanto, el aclaramiento se obtiene en unidades de volumen que es limpiado (aclarado) de fármaco a través del tiempo. La ecuación 3 es análoga a la ecuación de Michaelis-Menten empleada para la cinética enzimática.

Ecuación 3. Ecuación para determinar el aclaramiento del fármaco según la cinética de primer orden

$$Cl = \frac{V_m}{(K_m + C)}$$

Fuente: ecuación realizada a partir de la referencia⁴⁴.

2.2.6.1. Aclaramiento hepático

Para un fármaco que se elimina eficientemente de la sangre por procesos hepáticos (metabolismo o excreción del fármaco en la bilis), la concentración del fármaco en la sangre que sale del hígado será baja, la razón de extracción se acercará a la unidad, y el aclaramiento del fármaco de la sangre quedará limitado por el flujo sanguíneo hepático⁴⁴.

Los fármacos que el hígado elimina de manera eficiente (p. ej., los fármacos con aclaramientos sistémicos > 6 mL/min/kg, como diltiazem, imipramina, lidocaína, morfina y propranolol) tienen una tasa de eliminación restringida no por procesos intrahepáticos, sino por la velocidad a la que pueden transportarse de la sangre al hígado⁴⁴.

2.2.6.2. Aclaramiento renal

El aclaramiento renal de un fármaco resulta en su aparición en la orina. En el aclaramiento de un fármaco por los riñones debe considerarse la filtración glomerular, la secreción, la reabsorción y el flujo sanguíneo glomerular. La tasa de filtración de un fármaco depende del volumen de líquido que se filtra en el glomérulo y la concentración de fármaco no unido en el plasma (porque el fármaco unido a la proteína no se filtra). La influencia de los cambios en la unión a proteínas, el flujo sanguíneo y el estado funcional de las nefronas afectarán el aclaramiento renal⁴⁴.

2.3. Plasma sanguíneo

La sangre es un líquido complejo que, gracias a la función circulatoria, permanece en constante movimiento²³. Consiste en un líquido rico en proteína conocido como plasma, en el que están suspendidos los elementos celulares: leucocitos, eritrocitos y plaquetas; más de la mitad de su volumen está compuesto, principalmente, por agua, que contiene sales en disolución (electrolitos) y proteínas⁴².

La proteína que más abunda en el plasma es la albúmina, que ayuda a evitar que el líquido se filtre fuera de los vasos sanguíneos y entre los tejidos; además, cumple funciones de transporte al unirse a sustancias como las hormonas y algunos fármacos. El plasma contiene otras proteínas, como anticuerpos (inmunoglobulinas), que defienden activamente al organismo frente a un virus, bacterias, hongos y células cancerosas. También se encuentran los factores de la coagulación, que previenen las hemorragias.

Tabla 2. Principales funciones que presenta la sangre

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

Fuente: elaboración propia con base en la referencia ²³.

2.3.1. pH sanguíneo

La concentración de iones hidrógeno (H⁺) es uno de los parámetros más importantes de equilibrio ácido base, y esta depende de las interacciones entre la presión arterial de dióxido de carbono (PaCO₂), la concentración plasmática del ion bicarbonato (HCO₃⁻), la disociación constante del ácido carbónico y la solubilidad del dióxido de carbono, como lo determinó la ecuación de Henderson y Hasselbalch⁴⁰.

El ion hidrógeno libre (H⁺) en sangre arterial se encuentra a una concentración entre 35 y 45 nmoles/L, lo que equivale a mantener un pH entre 7,45 y 7,55. El pH es definido como el logaritmo negativo (en base 10) de la concentración sanguínea de hidrógeno⁴⁰.

Ecuación 4. Ecuación representativa de la determinación de pH

$$pH = -\text{Log}[H^+]$$

Fuente: ecuación tomada de la referencia⁴⁰.

2.3.1.1. Importancia del mantenimiento de pH

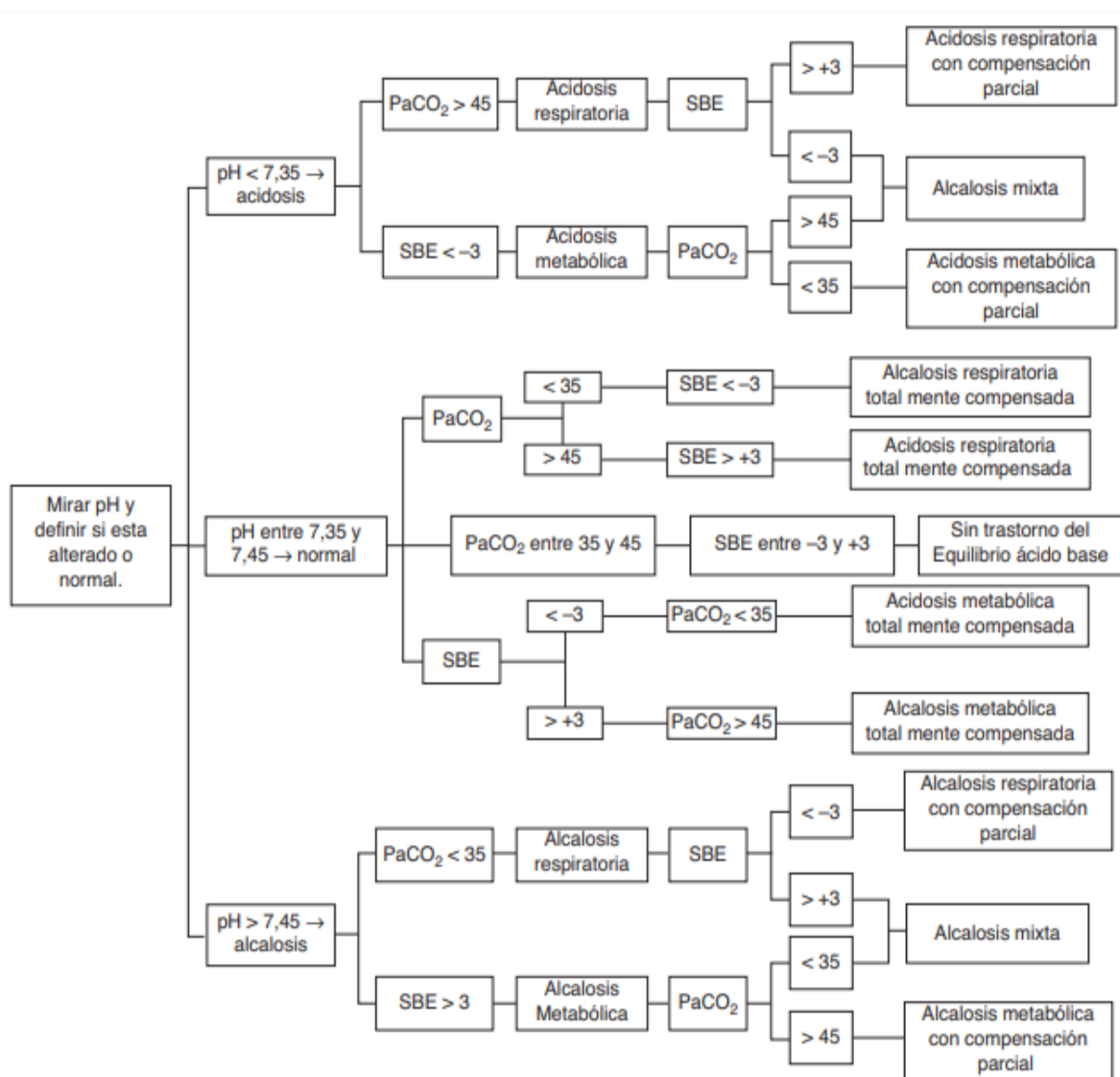
Los cambios agudos en el pH sanguíneo inducen efectos regulatorios en la estructura y función de las proteínas y enzimas, lo que, a su vez, genera cambios en las funciones celulares tales como la glucólisis, la gluconeogénesis, la mitosis, la síntesis de ADN, entre otras⁴⁰.

Debido a lo anterior, es fundamental entender la acción de los elementos que colaboran en el mantenimiento del pH dentro de los límites fisiológicos, como el bicarbonato (HCO_3^-), el hidrógeno, fosfatos, albúmina, sodio, potasio, cloro, lactato, uratos, cetoácidos y otros que permiten que se conserven; en lo que respecta a equilibrio ácido-base, las complejas y eficientes funciones celulares⁴⁰.

Las alteraciones del equilibrio ácido-base pueden ser primarias, pero lo más frecuente es que sean secundarias a enfermedades como la diabetes *mellitus*, falla renal, convulsiones, sepsis, gastroenteritis, fistulas, pancreáticas, obstrucción intestinal o el uso de medicamentos como la isoniazida, furosemida o el linezolid⁴⁰.

Igualmente, durante el curso de una enfermedad con alteraciones del equilibrio ácido-base, se pueden llegar a alterar otros sistemas, como el inmune, con alteraciones en los mediadores de inflamación o el óseo, con alteraciones en la resorción y la formación ósea; sin embargo, los mecanismos fisiopatológicos no están bien dilucidados, por esa razón, para realizar una aproximación diagnóstica de los trastornos del equilibrio ácido-base, se puede tomar en cuenta la figura 2⁴⁰.

Figura 2. Pasos para el diagnóstico de alteraciones ácido-base.



Fuente: figura tomada de la referencia⁴⁰.

2.3.2. Proteínas plasmáticas

Las proteínas son centrales para todos los seres vivos, desde las bacterias hasta las ballenas, pasando por las plantas y los hongos, todos utilizan proteínas. A estas biomoléculas se les conoce como las máquinas de la vida, porque cumplen diversas funciones cruciales para todos los organismos vivos. Muchas de ellas realizan una función enzimática, actuando como biocatalizadores de las reacciones químicas del metabolismo celular; algunos grupos de proteínas tienen funciones de defensa⁶.

Las proteínas son polímeros naturales lineales formados por L-aminoácidos (aa), los cuales contienen un átomo de carbón unido a tres sustituyentes comunes: un grupo carboxilo, un grupo amino y un átomo de hidrógeno. El cuarto sustituyente del carbono es llamado “cadena lateral”. Existen cuatro niveles de estructura que describen a las proteínas: estructura primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria⁶.

La estructura primaria viene determinada por la secuencia de aminoácidos que forman parte de la cadena. La estructura secundaria ocurre cuando la secuencia de aminoácidos adquiere una disposición espacial estable, que viene dada por el plegamiento de la cadena polipeptídica debido a enlaces de hidrógeno. Por su parte, la estructura terciaria de las proteínas da información sobre la disposición espacial de la estructura secundaria de un polipéptido al plegarse sobre sí misma, originando una estructura globular. La estructura cuaternaria viene dada por la disposición espacial de las distintas cadenas polipeptídicas de una proteína multimérica, es decir, compuesta por varios péptidos¹⁶.

Alrededor del 70 a 80% de las proteínas plasmáticas son sintetizadas en el hígado, entre ellas se incluyen albúmina, fibrinógeno, transferrina y casi todos los componentes del complemento y de la cascada de la coagulación de la sangre⁴³. 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 7.4⁴⁰.

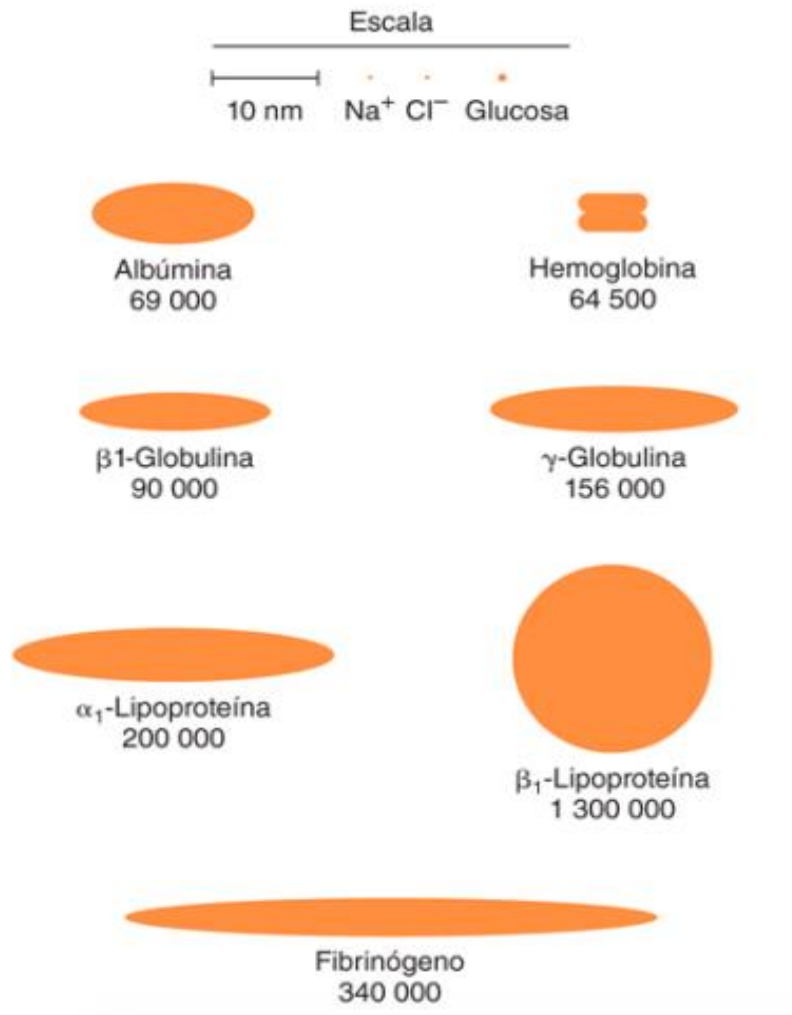
Las proteínas que circulan en el plasma sanguíneo desempeñan funciones importantes en la fisiología humana. Las albúminas facilitan el tránsito de ácidos grasos, hormonas esteroideas y otros ligandos entre tejidos. Por su parte, la transferrina ayuda a la captación y distribución de hierro, un componente de muchas metaloproteínas de importancia crucial. El fibrinógeno circulante sirve como un bloque de construcción de la red de fibrina, que se moviliza fácilmente y que proporciona el fundamento de los coágulos que se utilizan para sellar vasos lesionados⁴³

Tabla 3. Algunas funciones que presentan las proteínas

Función	Proteínas plasmáticas
Antiproteasas	<ul style="list-style-type: none"> • Antiquimotripsina • a1-Antitripsina (a1-antiproteinasa) • a2-Macroglobulina • Antitrombina
Coagulación de la sangre	<ul style="list-style-type: none"> • Diversos factores de la coagulación, fibrinógeno
Enzimas	<ul style="list-style-type: none"> • Función en la sangre, por ejemplo, factores de la coagulación, colinesterasa Escape desde células o tejidos, p. ej., transaminasas
Hormonas	<ul style="list-style-type: none"> • Eritropoyetina^a
Defensa inmunitaria	<ul style="list-style-type: none"> • Inmunoglobulinas, proteínas del complemento y b2-macroglobulina
Participación en respuestas inflamatorias	<ul style="list-style-type: none"> • Proteínas de respuesta de fase aguda (p. ej., proteína C reactiva, a1-glucoproteína ácida [orosomucoide])
Oncofetal	<ul style="list-style-type: none"> • a1-Fetoproteína (AFP)
Transporte o unión de proteínas	<ul style="list-style-type: none"> • Albúmina (diversos ligandos, entre ellos bilirrubina, ácidos grasos libres, iones [Ca²⁺], metales [p.ej., Cu²⁺, Zn²⁺], methem, esteroides, otras hormonas y diversos fármacos) • Globulina de unión a corticosteroide (transcortina) (se une a cortisol) • Haptoglobina (se une a la hemoglobina extracorpúscular) • Lipoproteínas (quilomicrones, VLDL, LDL, HDL) • Hemopexina (se une a hem) • Proteína de unión a retinol (se une a retinol) • Globulina de unión a hormona sexual (se une a testosterona, estradiol) • Globulina de unión a hormona tiroidea (se une a T₄, T₃) • Transferrina (transporta hierro) • Transtiretina (antes prealbúmina; se une a T₄ y forma un complejo con la proteína de unión a retinol)

Fuente: elaboración propia basada en la referencia ⁴³.

Figura 3. Dimensiones de tamaño y pesos moleculares entre las principales proteínas presentes en plasma



Fuente: figura tomada de la referencia⁴³.

2.3.2.1. Factores que afectan las concentraciones de proteínas en plasma:

Varias enfermedades, edad, traumatismos y circunstancias relacionadas pueden afectar la concentración de proteínas plasmáticas, ya sea aumentándolas o disminuyéndolas. Ejemplos de disminución en las proteínas puede ser la enfermedad hepática, debido a la disminución de la síntesis de proteínas; las quemaduras graves, que pueden causar una mayor distribución de albúmina en el líquido extracelular, lo que da como resultado una concentración de albúmina en plasma más pequeña¹.

En ciertas enfermedades genéticas, la calidad de la proteína puede verse alterada por un cambio en la secuencia de aminoácidos. Tanto en la enfermedad hepática crónica como en la enfermedad renal y la uremia, pueden producir una alteración en la calidad de las proteínas plasmáticas sintetizadas, lo cual puede demostrarse por una alteración en la constante de asociación o afinidad del fármaco por la proteína¹.

En el caso de la proteína C reactiva (CRP, así llamada porque reacciona con el polisacárido C de los neumococos), α 1-antiproteinasa, haptoglobina, α 1-glicoproteína ácida, y fibrinógeno, se clasifican como “proteínas de fase aguda”. Las concentraciones de estas proteínas pueden llegar a aumentar desde 50% hasta 1000 veces (en el caso de la CRP) durante estados inflamatorios crónicos, cáncer, artritis, infarto de miocardio y enfermedad de Crohn, lo cual puede llevar a un incremento de la unión de fármacos básicos.^{43,44}

Tabla 4. Factores fisiológicos y patológicos que afectan las concentraciones de proteínas en plasma

Factor	Albúmina	α1-Glicoproteína	Lipoproteína
Decrección	<ul style="list-style-type: none"> • Edad (geriátrico, neonato) • Neumonía bacterial • Quemaduras • Cirrosis Hepática • Fibrosis quística • Enfermedad Gastro-intestinal • Histoplasmosis • Lepra • Absceso hepático • Neoplasmas malignos • Desnutrición (grave) • Mieloma múltiple • Síndrome nefrótico • Pancreatitis (aguda) • Embarazo • Insuficiencia renal • Cirugía • Trauma 	<ul style="list-style-type: none"> • Anticonceptivos orales • Síndrome nefrótico • Concentraciones fetales 	<ul style="list-style-type: none"> • Hipertiroidismo • Enfermedad hepática • Trauma • Lesiones

Factor	Albúmina	α1-Glicoproteína	Lipoproteína
Aumento	<ul style="list-style-type: none"> • Tumores benignos • Ejercicio • Hipotiroidismo • Enfermedad neurológica • Neurosis • Paranoia • Phycosis • Esquizofrenia 	<ul style="list-style-type: none"> • Edad (geriátrica) • Enfermedad celiaca • Enfermedad de Crohn • Infarto de miocardio • Lesiones • Insuficiencia renal • Artritis reumatoide • Estrés • Cirugía • Trauma 	<ul style="list-style-type: none"> • Diabetes • Hipotiroidismo • Enfermedad hepática • Síndrome nefrótico

Fuente: elaboración propia con base en la referencia¹.

2.3.2.2. Albúmina humana

Entre sus funciones biológicas, se encuentran el control del pH sanguíneo actuando como tampón y el transporte de distintas sustancias actúa como transportador de ácidos grasos no esterificados y varios otros compuestos endógenos y exógenos, incluida una gran variedad de productos farmacéuticos y metabolitos activos. Por todo esto, resulta crucial que los valores analíticos de albúmina se encuentren dentro del rango establecido²⁵.

La albúmina humana es una pequeña proteína relativamente simétrica con un peso molecular aproximado de 66 000 a 69 000, y que siendo la principal proteína del plasma es una molécula altamente soluble; la cual, a pesar de su elevada carga negativa, puede ligarse reversiblemente tanto con cationes como con aniones, lo que hace posible que su situación plasmática sea óptima para poder transportar o inactivar una serie de sustancias como metales pesados, drogas, tinturas, ácidos grasos, hormonas y enzimas¹⁰.

Debido a la flexibilidad de la albúmina y a que esta posee un número limitado de sitios de unión de alta afinidad con los sustratos, la unión, por ejemplo, de un fármaco o de un ácido graso a la albumina humana puede generar cambios en su estructura que pueden influir en la unión de nuevos fármacos. Esta alteración es importante porque se puede modificar la distribución y eliminación de un fármaco, pudiendo modular sus efectos terapéuticos¹⁶.

2.3.2.2.1. Albúmina humana exógena

El uso de albúmina humana exógena vía intravenosa está ampliamente extendido y respaldado por la evidencia científica en situaciones clínicas como descompensación hidrópica, descompensación hepática y para el restablecimiento y mantenimiento del volumen circulatorio. Sin embargo, resulta común su uso en muchos otros entornos en los que no está justificado, ya que muchas de las indicaciones por las que se utiliza habitualmente están en debate o no tienen evidencia científica²⁵.

Principalmente, se realiza un uso inapropiado de albúmina en situaciones en las que se intenta corregir un deficiente estado nutricional o un hallazgo analítico de hipoalbuminemia. Esto ocurre con frecuencia en muchas unidades clínicas, a pesar de la falta de evidencia clínica de un beneficio real²⁵.

La selección de indicaciones clínicas para la utilización terapéutica de albúmina debe ser tomada no solo por conceptos arbitrarios o pragmáticos, sino por una adecuada educación de los médicos en el conocimiento de la función fisiológica. Solo unos pocos trastornos específicos requieren regularmente el uso de albúmina^{25,10}.

2.3.3. Unión de fármaco a proteína plasmática

La albúmina tiene una carga neta negativa al pH del suero, sin embargo, puede interactuar tanto con las cargas positivas como negativas de los medicamentos. Teóricamente, todos los sitios cargados en la albúmina pueden funcionar como sitios de unión para medicamentos con la carga apropiada; muchas cargas están escondidas dentro de la estructura tridimensional de la albúmina¹¹. Se han reconocido cuatro sitios de unión diferentes para los fármacos en la albúmina. En su mayoría, los ácidos débiles solo se unen a la albúmina¹⁴.

La unión de los fármacos a proteínas plasmáticas es cuantificable y, generalmente, se representa en un porcentaje que es constante, pero puede ser saturable. Si bien la unión a las proteínas evita que el fármaco ejerza su efecto biológico, permite su transporte por la sangre para llegar a los diversos tejidos y es un medio de almacenamiento para cuando se reduzca su concentración plasmática libre. Esta información es útil para el mantenimiento de la dosis terapéutica en los tratamientos, ya que se puede establecer la fracción libre que puede tener acción farmacológica y calcular una dosis de mantenimiento¹⁴.

La estructura de la proteína abarca tres dominios homólogos (I-III), cada uno dividido en dos subdominios (A-B) conectados a través de espirales aleatorias. Los ácidos grasos de cadena larga, así como muchos otros ligandos diferentes, se unen a la albúmina en siete sitios de unión con los nombres correspondientes FA1 a FA7³². En general, las características de unión de la albúmina se deben a tal multiplicidad de sitios de unión disponibles, combinados con su plasticidad estructural intrínseca para acomodar varios tipos de compuestos³².

2.3.4. Afinidad del complejo fármaco-proteína plasmática

La afinidad entre un medicamento y sus sitios de unión en una macromolécula son expresados como una constante de equilibrio que establece la relación de concentración de medicamento en forma unida entre el producto de las concentraciones de medicamento no unido y proteína. Es frecuentemente expresada en términos de constantes de disociación K_d , la cual es dada por la relación k_2/k_1 , son las constantes de velocidad de reacción de asociación y disociación respectivamente⁷.

Ecuación 5. Ecuación matemática que expresa cómo determinar el comportamiento de fármacos unidos a proteínas según moles

$$r = \frac{\text{Moles of drug bound}}{\text{Total moles of proteín}}$$

Fuente: ecuación tomada de la referencia²

Cuando un medicamento se une con distinta afinidad en los diferentes sitios de la molécula de proteína, se involucran varios equilibrios. Cada uno de estos se caracteriza por una constante de disociación. Para la mayoría de los medicamentos, solo hay uno o dos sitios de unión primarios en la molécula de albúmina; existen sitios secundarios, pero son menos específicos.

2.3.5. 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 celular³⁶.

2.3.6. Grado de afinidad

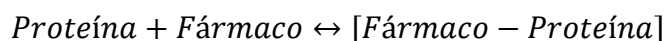
La eficiencia de un medicamento puede verse afectada por el grado de unión a las proteínas, también llamada fracción de fármaco unida (*fu*). Este relaciona la concentración de fármaco unido (*Cu*) y la concentración total de fármaco (*Ct*). Es importante recalcar que, en los fármacos con alto grado de unión, un cambio pequeño en la fracción de fármaco unido produce grandes cambios en la fracción libre (*fl*)³⁶.

Desde el punto de vista farmacoterapéutico, se tiene más interés en la concentración de fármaco libre (*Cl*) que en la concentración unida (*Cu*), ya que el fármaco capaz de atravesar la mayor cantidad de membranas y ejercer efecto farmacológico es el libre³⁶.

2.3.7. Cinética de unión

La cinética que presenta la unión reversible de un complejo fármaco-proteína para una proteína con un sitio de unión simple puede describirse mediante la ley de acción de masas (ver ecuación 6), la cual expresa la relación que existe entre la concentración molar de los productos y la concentración molar de los reactivos, el cual sería la formación del complejo fármaco-proteína.

Ecuación 6. Ecuación reversible de la unión de fármacos a proteínas plasmáticas



Fuente: ecuación tomada de la referencia¹.

La mayoría de los estudios cinéticos *in vitro* utilizan como proteína la albúmina purificada como fuente estándar. El número promedio de moléculas de medicamento ligadas a proteína está dado por la relación de la concentración de medicamento unido [PD], entre la concentración de proteína [P] y fármaco libre [D], de acuerdo con la ecuación 7.

Ecuación 7. Ecuación para determinar la constante de afinidad

$$K_a = \frac{[PD]}{[P][D]}$$

Fuente: ecuación tomada de la referencia⁷.

Cuando un fármaco presenta valores de K_a 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 proteínas³⁶.

Según Sun et al.², la ecuación anterior describe la situación más simple, en la que 1 mol de fármaco se une a 1 mol de proteína en un complejo de 1 a 1. Este caso asume solo un sitio de unión para cada molécula de fármaco. Si hay más de un sitio de unión de fármaco por molécula de proteína, entonces se usa la siguiente ecuación:

Ecuación 8. Ecuación para determinar la constante de afinidad cuando la relación no es 1:1

$$r = \frac{nK_a[D]}{1 + K_a[D]}$$

Fuente: ecuación tomada de la referencia¹.

Debido a que las moléculas de proteína son muy grandes en comparación con las moléculas de fármacos y pueden contener más de un tipo de sitio de unión para el fármaco, y si este se une independientemente a cada sitio de unión con su propia constante de asociación, entonces, la ecuación que se utilizaría sería la siguiente¹:

Ecuación 9. Ecuación para determinar la constante de afinidad en función de los sitios de unión de un fármaco

$$r = \frac{n_1 K_1 [P]}{1 + K_1 [D]} + \frac{n_2 K_2 [P]}{1 + K_2 [D]} + \dots$$

Fuente: ecuación tomada de la referencia¹.

Cada subíndice numérico representa diferentes tipos de sitios de unión, las K representan las constantes de unión y las n representan el número de sitios de unión por molécula de albúmina¹. La cinética de unión proporciona información valiosa sobre el uso terapéutico adecuado del fármaco y las predicciones de posibles interacciones farmacológicas. Cada método para la investigación de la unión *in vitro* de fármacos y proteínas tiene ventajas y desventajas en términos de costo, facilidad de medición, tiempo, instrumentación y otras consideraciones.

2.3.8. Relación de las concentraciones de fármaco y proteína en la formación del complejo fármaco-proteína

La concentración de fármaco, la concentración de la proteína y la constante de afinidad influyen en la fracción de fármaco unido. Con una concentración constante de proteína, solo un cierto número de sitios de unión están disponibles para un fármaco. A bajas concentraciones de fármaco, la mayor parte del fármaco puede unirse a la proteína, mientras que, a altas concentraciones de fármaco, los sitios de unión a proteínas pueden saturarse¹.

2.3.9. Desplazamiento de fármacos por competencia en los sitios de unión

En las interacciones que afectan a la distribución de los fármacos por el organismo, suelen estar implicados procesos de desplazamiento del compuesto unido a las proteínas plasmáticas. El desplazamiento ocurre cuando se toma un segundo fármaco que compite por el mismo sitio de unión en la proteína que el fármaco inicial^{36,41}.

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, aumentaría la respuesta farmacológica; además, probablemente se daría una toxicidad por el agente que es desplazado^{36,41}.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que dichos aumentos tienen carácter transitorio, debido a la acción compensatoria que supone la mayor eliminación del fármaco, por lo que las repercusiones clínicas de este tipo de interacciones en general son de escaso relieve y si se conocen los mecanismos, se pueden prever sus consecuencias⁴¹.

2.4. Metodologías para determinación de la unión fármaco–proteína

La unión de medicamento a la albúmina se ha estudiado *in vitro* por las técnicas de diálisis, ultrafiltración, cromatografía o por métodos espectroscópicos. Estas técnicas han dado resultados similares, pero no siempre idénticos. Dichos estudios deben establecer no solo la extensión de la unión, sino, además, el número de sitios de unión y sus afinidades por él⁷.

Una correlación *in vitro - in vivo* (CIVIV) puede definirse como un modelo matemático predictivo que describe la relación entre una característica de la forma farmacéutica de administración oral (generalmente la velocidad y cantidad de fármaco disuelto) y una respuesta relevante *in vivo* (como la concentración plasmática o la cantidad de fármaco absorbida). El principal objetivo de establecer dicha correlación es utilizar el ensayo de disolución como sustituto de los estudios en humanos¹¹.

2.4.1. Diálisis

Esta técnica consiste en colocar la proteína y el medicamento en una cámara de diálisis con membranas semipermeables que separan el complejo de una cámara en la que no se encuentra la proteína. Tras la unión del fármaco a la proteína, solo el fármaco libre atraviesa la membrana y luego de establecerse el equilibrio, se determina la concentración del medicamento en la cámara libre de proteína. Sin embargo, presenta como desventaja que lleva mucho tiempo alcanzar el equilibrio, por lo que la proteína puede desnaturalizarse porque las condiciones en la que se realiza el estudio son muy diferentes a las del organismo⁷.

2.4.2. Ultrafiltración

La técnica consiste en colocar una mezcla de titulación de proteína con el medicamento en una cámara de ultrafiltración con una membrana adecuada, a la cual se le aplica presión alta y obliga a las moléculas de medicamento libre a difundir a través de la membrana; después de establecerse el equilibrio, se determina la concentración de medicamento libre. Las desventajas de esta técnica son el efecto osmótico y la posible unión a la membrana utilizada⁷.

2.4.3. Análisis directo

Son técnicas analíticas donde no se requiere una separación previa al análisis, sino que las propiedades ópticas del complejo proteína-medicamento difieran del medicamento libre y de la proteína libre⁷.

2.4.4. Espectroscopia por radiación ultravioleta

La espectroscopia de absorción es útil para el análisis cuantitativo, tiene alta sensibilidad, selectividad moderada a alta y buena precisión. Los métodos fluorométricos se aplican para concentraciones más bajas y son más sensibles y específicos que los espectrofotométricos. Cuando se determina la absorción (o fluorescencia) de la proteína, se observa el efecto de agregar varias concentraciones del medicamento y se debe observar una respuesta lineal al graficar el logaritmo de la absorbancia (o fluorescencia) contra el logaritmo de la concentración⁷.

2.4.4.1. Mediciones espectroscópicas

Los analistas utilizan las interacciones de la radiación con la materia para obtener información sobre una muestra. La muestra es estimulada de alguna manera mediante la aplicación de energía en forma de calor, energía eléctrica, luz, partículas o de una reacción química. Antes de aplicar el estímulo, el analito se encuentra en su estado de energía más bajo o estado basal³⁹.

Luego de aplicado el estímulo, algunas de las especies del analito experimentarán una transición hacia un estado de mayor energía o estado excitado. Los resultados obtenidos son expresados gráficamente por un espectro, que pueden proporcionar información tanto cualitativa como cuantitativa acerca de la muestra³⁹.

2.4.4.2. Proceso de absorción

La ley de la absorción también conocida como la ley de Beer-Lambert es un indicativo cuantitativo de la cantidad de atenuación de la concentración de las moléculas absorbentes y de la longitud de la trayectoria donde ocurre la absorción. Conforme la luz atraviesa un medio que contiene un analito absorbente, la intensidad disminuye a medida que el analito es excitado³⁹.

De acuerdo con la ley de Beer, la absorbancia es directamente proporcional a la concentración de las especies absorbentes y a la longitud de la trayectoria del medio absorbente. Esta ley puede ser utilizada de diferentes maneras, ya sea para calcular absorbancias molares de las especies, si se conoce la concentración; si se conoce la absorptividad y la longitud de onda, se puede utilizar para obtener la concentración de la muestra³⁹.

2.4.5. Calorimetría de titulación isotérmica

Un calorímetro es un instrumento que sirve para medir la cantidad de calor que libera o absorbe una muestra en la que ocurre algún evento que refleja las interacciones moleculares presentes entre los componentes de la muestra. Este puede ser la unión de una molécula pequeña (ligando) a una macromolécula (proteína), una reacción química o el cambio estructural que sufre una proteína cuando se calienta³⁸.

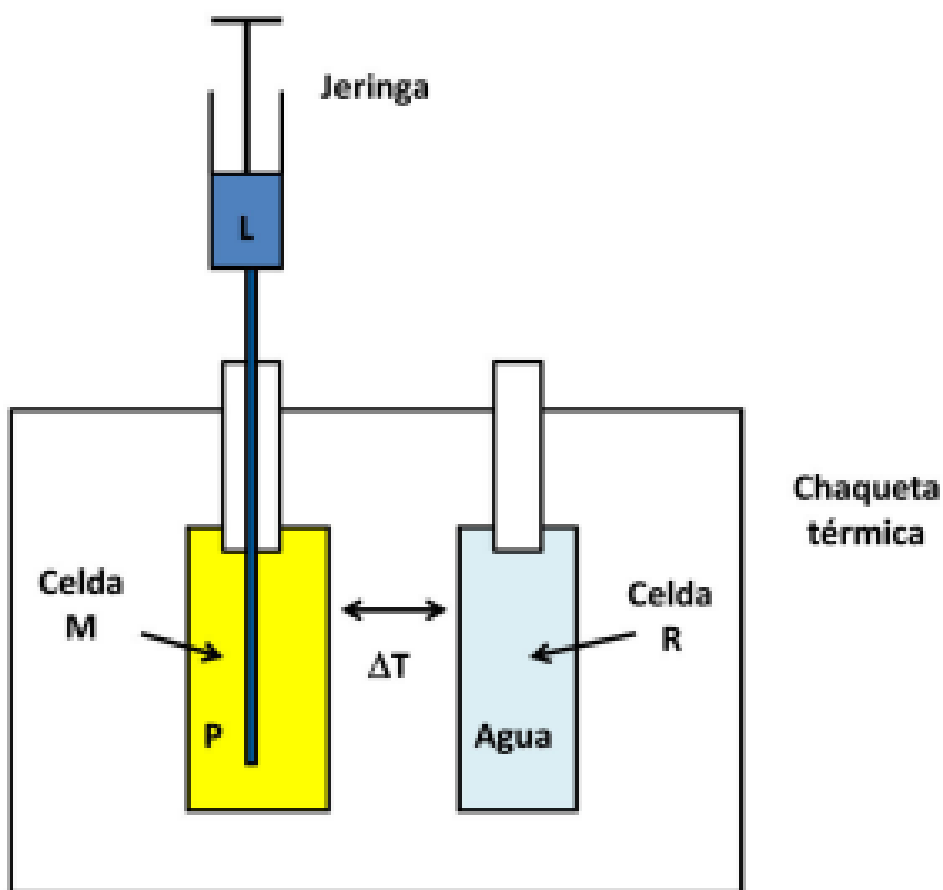
Todos los calorímetros constan de los mismos elementos básicos en su diseño y operan con los mismos principios. Las diferencias entre ellos están en la cantidad de muestra que requieren y en su precisión³⁸. Se utiliza, principalmente, para determinar los parámetros termodinámicos de unión, tales como la afinidad de enlaces y las constantes de disociación, así como la estequiometría, la entalpía, la entropía y la energía libre de Gibbs de enlace bajo condiciones isotérmicas.

El funcionamiento de este se basa en dos celdas idénticas, una de referencia (R) que se llena de agua pura y otra que contiene la muestra (M). Ambas están colocadas dentro de una “chaqueta térmica” que las aísla del exterior, evitando así pérdida o ganancia de energía desde el entorno. El calorímetro establece una diferencia de temperatura (ΔT) muy pequeña, de tal manera que la medición se realiza a una temperatura constante³⁸.

En la celda M se coloca la punta de una jeringa que permite inyectar pequeñas cantidades de su contenido. Típicamente, en la celda M se sitúa una solución de una proteína (P) y en la jeringa una solución de una sustancia (L), cuya interacción con la proteína se desea estudiar. Al realizar una primera inyección o titulación, L y P entran en contacto dentro de la celda M e interaccionan entre sí, liberando o absorbiendo calor³⁸.

La cantidad de energía que hay que proporcionar para recobrar el ΔT original es igual a la cantidad de energía que se liberó o absorbió debido a la interacción o unión entre la proteína y el fármaco en esa primera inyección. Posterior a esa primera toma de muestra, la cantidad de energía debida a la unión va disminuyendo, ya que la cantidad de proteína libre en la celda es cada vez menor³⁸.

Figura 4. Representación de un proceso de calorimetría de titulación isotérmica



Fuente: figura tomada de la referencia³⁸.

2.5 AINE

Los antiinflamatorios no esteroides (AINE) se encuentran entre los medicamentos más prescritos en todo el mundo. Se utilizan, principalmente, en el tratamiento de la inflamación, dolor y edema, así como en las osteoartritis, artritis reumatoides y disturbios musculoesqueléticos²⁶.

Los AINE se pueden clasificar según su estructura química, en ácidos o no ácidos, lo cual determinará su distribución. Los AINE no ácidos como el celecoxib se distribuyen en todos los tejidos corporales; por el contrario, aquellos con grupos ácidos como diclofenaco, ketoprofeno e ibuprofeno tienden a distribuirse y permanecer en los sitios de inflamación, a pesar de que sus concentraciones en plasma decaen con rapidez, lo cual podría implicar un efecto terapéutico a nivel local más sostenido²⁹.

El mecanismo de acción general de los AINE es la inhibición de la síntesis de prostaglandinas al inhibir en grados variables las ciclooxigenasas. Además, en altas concentraciones, pueden llegar a reducir la producción de radicales superóxidos en tejidos inflamados, inducir apoptosis celular, inhibir la expresión de moléculas de adhesión, reducir la producción de óxido nítrico (ON), al reducir la expresión de su sintasa; disminuir la producción de citoquinas inflamatorias, modificar la actividad linfocitaria y alterar las funciones de membrana celular²⁸.

La ciclooxigenasa (COX) es la enzima clave en la síntesis de las prostaglandinas, a través de la oxidación del ácido araquidónico. Las prostaglandinas realizan tanto funciones relacionadas con la homeostasis de diversos órganos como con el dolor, la inflamación y el desarrollo de neoplasias. Esta evidencia llevó al descubrimiento de la existencia de dos isoformas de la COX, denominadas COX-1 y COX-2. Aunque ambas ciclooxigenasas tienen similar afinidad por el ácido araquidónico y son homólogas en un 90%, presentan diferente afinidad por el sustrato y se encuentran en distintos lugares dentro de la célula²⁷.

Los AINE también se clasifican como no selectivos, los cuales son los más antiguos, y designados como tradicionales o convencionales (COX-1), y los selectivos para la COX-2 que se designan como COXIBE (ver tabla 5).

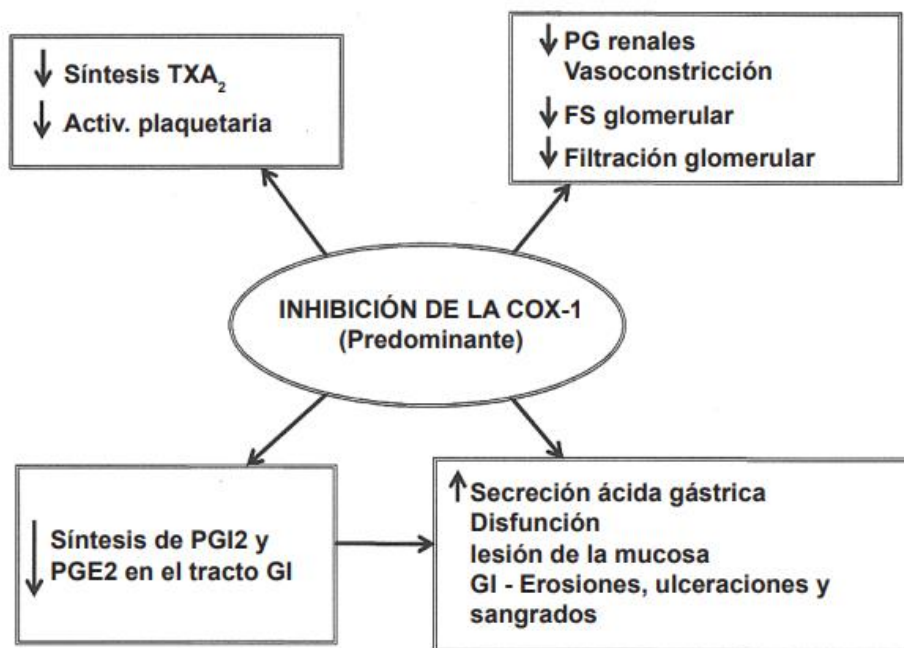
La isoforma COX-1 se encuentra de forma constituida en la mayor parte de los tejidos, es esencial para el mantenimiento del estado fisiológico normal de muchos tejidos, incluidos la protección de la mucosa gastrointestinal, el control del flujo sanguíneo renal, la homeostasia, respuestas autoinmunes, funciones pulmonares y del sistema nervioso central, cardiovasculares y reproductivas²⁶. En la figura 5 se puede observar una representación de los efectos que se desencadenan tras la inhibición de la COX-1²⁷.

Tabla 5. Clasificación de AINE según su selectividad por la ciclooxigenasa

Antiinflamatorios no esteroideos no selectivos (COX-1 Y COX-2) (Tradicionales, convencionales)	Antiinflamatorios no esteroideos selectivos (COX-2) (COXIBE)
Aspirina	Rofecoxib
Acetaminofén	Valdecoxib
Indometacina	Parecoxib
Ibuprofeno	Celecoxib
NaproxenSulindacoo	Etoricoxib
Diclofenaco	Lumiracoxib
Piroxicam	
B-Piroxicam	
Meloxicam	
Cetoprofeno	

Fuente: tabla tomada de la referencia²⁶.

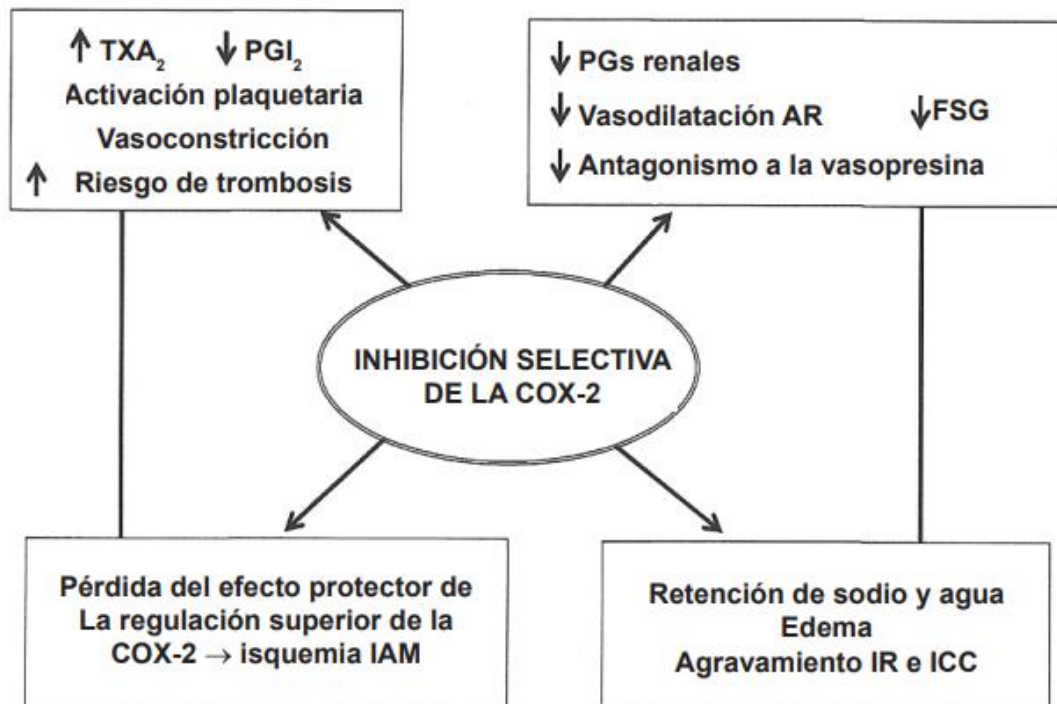
Figura 5. Representación de los efectos que se desencadenan tras la inhibición de la COX-1



Fuente: figura tomada de la referencia²⁶.

La isoforma COX-2 es inducida en las inflamaciones por varios estímulos como citocinas, endotoxinas y factores de crecimiento, además, origina prostaglandinas inductoras, que contribuyen al desarrollo del edema, rubor, fiebre e hiperalgesia. También se expresa en las células vasculares endoteliales normales, que secretan prostaciclina en respuesta al estrés de cizallamiento²⁶.

Figura 6. Representación de los efectos que se desencadenan tras la inhibición de la COX-2



Fuente: figura tomada de la referencia²⁶.

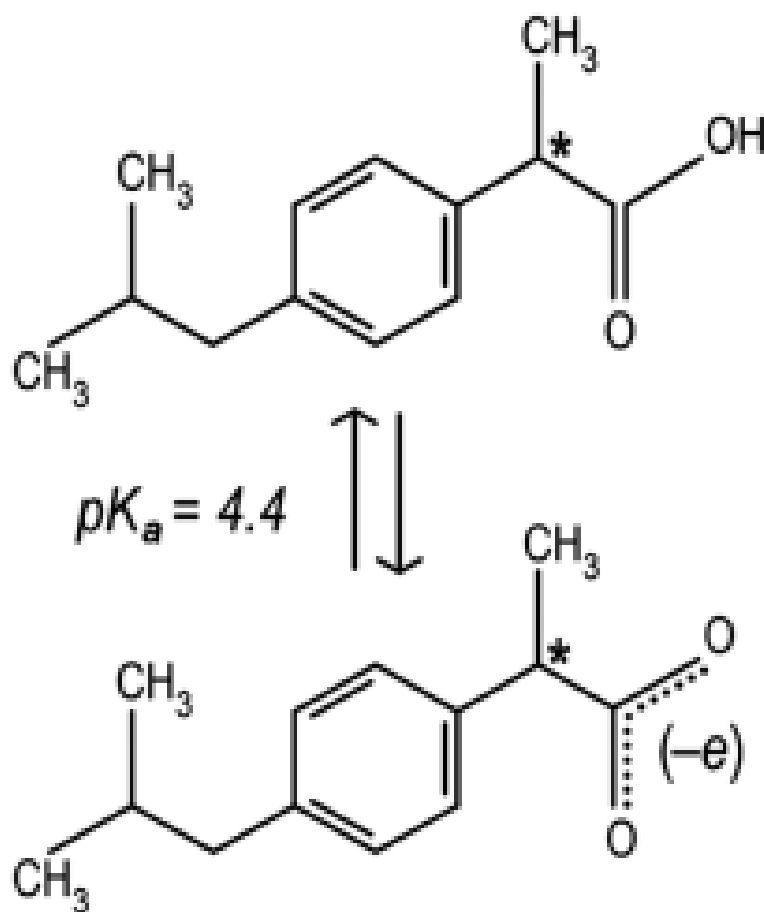
2.5.1. Ibuprofeno

El ibuprofeno es un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINE) derivado del ácido propiónico; es una mezcla racémica de enantiómeros R y S. Su desarrollo se dio en 1960; mientras se buscaba un medicamento alternativo a la aspirina. Se encuentra en forma de tabletas o suspensión oral, presenta propiedades farmacológicas para el tratamiento de fiebre, dolor de cabeza de intensidad leve y moderada (como migraña), artritis, artrosis, inflamación no reumática y dismenorrea primaria³⁰.

En formulaciones comerciales, el fármaco suele estar disponible en una mezcla racémica de ambos isómeros. Sin embargo, solo el S-ibuprofeno es farmacológicamente activo, como se ha demostrado en algunos estudios *in vitro* e *in vivo*. Además, el isómero R se interconvierte en gran medida en S-ibuprofeno como resultado del metabolismo³².

El grupo carboxilo del ibuprofeno tiene un pKa de 4.4, por lo que se espera que sea desprotonado ($-\text{COO}^-$) en condiciones fisiológicas normales, como lo es el pH de la sangre de $7,40 \pm 0,05$. Sin embargo, dentro del núcleo de una matriz proteica, el pH puede diferenciarse fácilmente hasta en tres unidades dependiendo del solvente en el que se encuentre disuelto³².

Figura 7. Estructura de la molécula de ibuprofeno protonado y desprotonado



Fuente: figura tomada de la referencia³².

2.5.1.1. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción del ibuprofeno consiste en bloquear la síntesis de prostaglandinas, a través de la inhibición de las isoformas COX-1 y COX-2; sin embargo, presenta afinidad por la COX-1 y se une de forma reversible. Las prostaglandinas son sustancias de carácter lipídico que tienen una importante participación en el surgimiento de síntomas como el dolor, la fiebre y la inflamación; este procedimiento se da por medio de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa, que es la encargada de catalizar la síntesis de prostaglandinas³⁰.

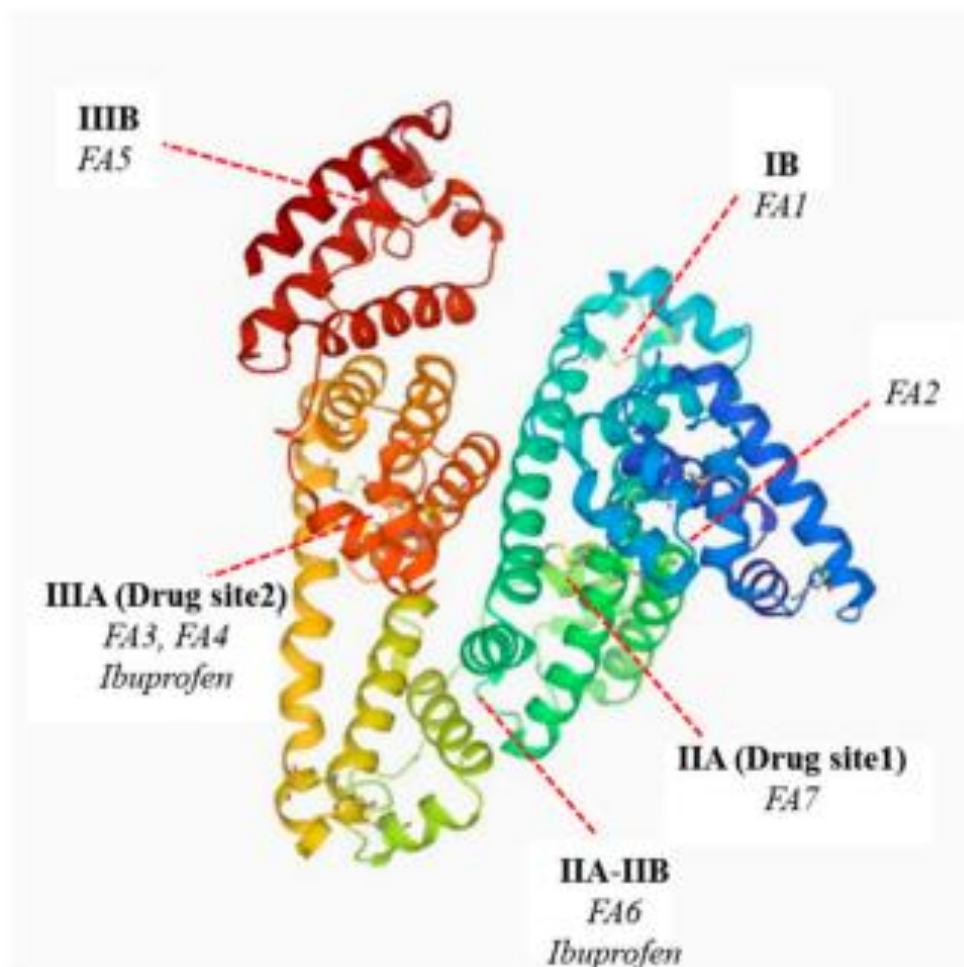
2.5.1.2. Propiedades farmacocinéticas

El ibuprofeno se absorbe bien y rápidamente a través de la mucosa gastrointestinal, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas en 1 a 2 horas después de administración oral; los alimentos reducen la velocidad de absorción, pero no la cantidad absorbida. Alrededor del 99% del fármaco se fija a la albúmina y se distribuye en forma amplia en el organismo, incluso en el espacio sinovial, además de que también atraviesa la barrera placentaria. Se metaboliza a nivel hepático a derivados hidroxilados y carboxilados, los que se eliminan conjugados con el ácido glucurónico a través de la orina. Su vida media de eliminación es de 1.8 a 2 horas³¹.

2.5.1.3. Sitio de unión del ibuprofeno a la albúmina humana

Los principales sitios de unión de los ácidos grasos en la albúmina sérica humana se encuentran en el subdominio IB (FA1), IIA (FA7), IIA-IIB (FA6), IIIA (FA3 y FA4), IIIB y entre los dominios I y II (FA2). El ibuprofeno que exhibe una alta afinidad por las proteínas plasmáticas se une a los subdominios IIA, IIB y IIIA³³.

Figura 8. Subdominios de unión de la albúmina humana.



Fuente: figura tomada de la referencia³³.

2.5.1.4. Interacciones medicamentosas

Se encuentra descrito en la literatura que el ibuprofeno interactúa con diversos grupos de fármacos. Este medicamento es un ácido débil soluble en lípidos, por lo tanto, es factible que pueda ser capaz de atravesar membranas biológicas sin la necesidad de transportadores específicos. Sin embargo, se han observado interacciones clínicamente significativas relacionadas con la competencia por los sitios de unión de estas proteínas transportadoras³⁴.

Una interacción farmacocinética en la que los transportadores pueden desempeñar un papel clave es con el ibuprofeno y el metotrexato. Se ha comprobado que la administración

conjunta reduce el aclaramiento de metotrexato, lo cual puede producir un aumento de las concentraciones plasmáticas del antineoplásico, provocando una mayor toxicidad³⁴.

Otras interacciones relacionadas con transportadores pueden aumentar la eficacia o limitar la toxicidad del fármaco con el que interactúa. Por ejemplo, el ibuprofeno se ha estudiado para modular la actividad de la glicoproteína-P, de manera que, en el tratamiento de sarcomas, la administración del ibuprofeno invierte el flujo de salida del antineoplásico doxorubicina produciendo un aumento de la acumulación del fármaco intracelular y la apoptosis³⁴.

2.5.1.5. Reacciones adversas

El tratamiento con ibuprofeno genera un bienestar para el paciente, no obstante, su inadecuado uso puede producir daños a la salud. El principal sistema afectado es el digestivo, generando irritación del tracto gastrointestinal al inhibir la producción de prostaglandinas, las cuales protegen la mucosa, independientemente de la vía de administración (oral, inyectable, rectal). Según la literatura, existe una incidencia de los analgésicos que afecta en mayor grado a los ancianos³⁰.

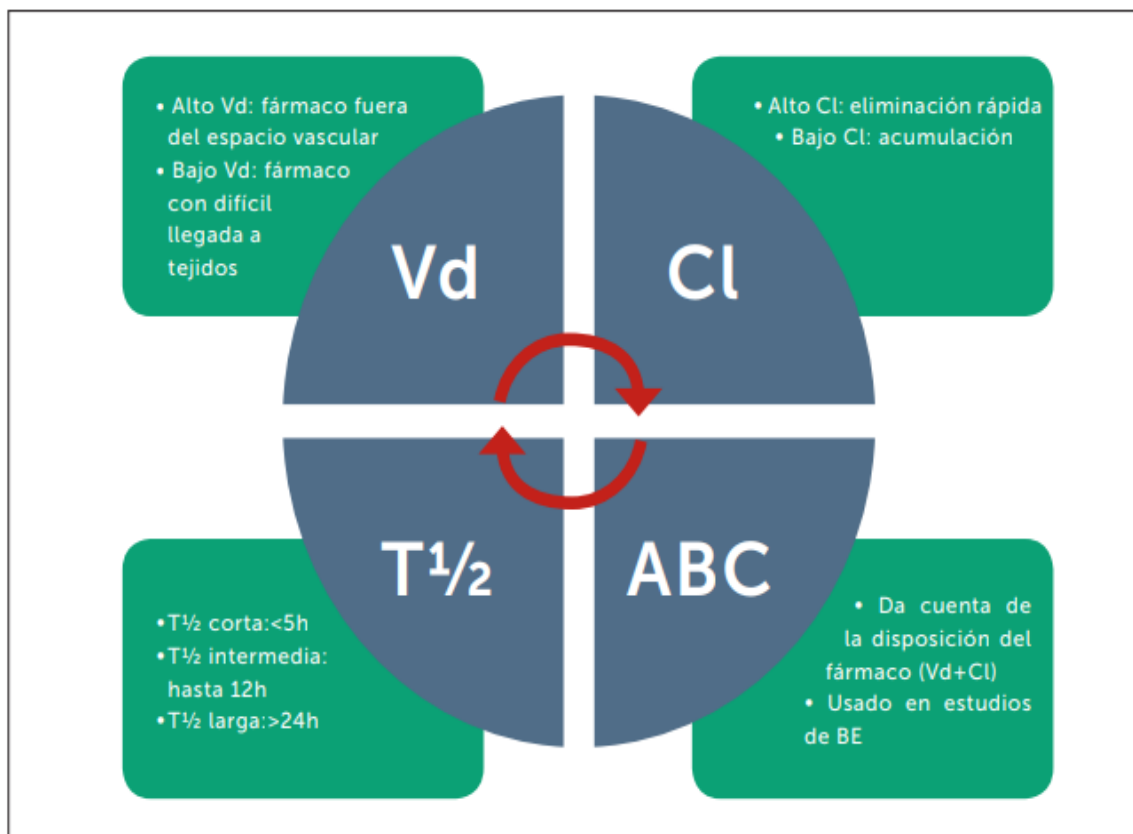
Se han realizado investigaciones que contemplan una gran serie de riesgos, especialmente cardiovasculares y accidentes cerebrovasculares por el consumo de AINE. Este tipo de información debería alertar a la población a preocuparse por la cantidad y calidad del fármaco que ingiere, ya que su exceso, en muchos casos por automedicación e inconsistencias en el medicamento, generaría perjuicios a la salud³⁰.

2.6. Importancia farmacocinética

La farmacocinética es un aspecto importante de la terapia con medicamentos y el diagnóstico de la función de los órganos. Si se realiza una estimación aproximada de los cambios que influyen en la terapia, los medicamentos con un amplio rango terapéutico no causarán ningún daño. Para fármacos con un rango terapéutico estrecho, se recomienda llevar a cabo un control, a través de la medición de concentraciones y, posiblemente, la corrección del régimen de terapia, particularmente si se producen efectos secundarios cuando se excede el límite tóxico¹.

Para estudiar la farmacocinética en un paciente, se deberían conocer los parámetros farmacocinéticos que explican el proceso ADME de ese fármaco. Los parámetros más importantes por considerar para el desarrollo de ensayos *in vitro* se detallan en la figura 9.

Figura 9. Parámetros importantes para estudiar la farmacocinética de un fármaco en un paciente



Vd: volumen aparente de distribución (expresado en L o L/Kg).
Cl: clearance o aclaramiento (expresado en L/h o mL/min).
T^{1/2}: tiempo de vida media de eliminación (expresado en h).
ABC: área bajo la curva de concentración plasmática del fármaco versus tiempo en 24 h.
BE: bioequivalencia.

Fuente: elaboración propia.

En los últimos años, el desarrollo de ensayos *in vitro* ha logrado demostrar su incuestionable importancia en la obtención de metodologías que sirva como sustituto del estudio *in vivo*. Se pueden establecer los medios en los que se realizarán los procedimientos, además de ser un fiel control de calidad que predice el comportamiento *in vivo* de un fármaco.

Para el desarrollo de estudios de fármacos, se deben considerar diferentes factores farmacocinéticos y farmacodinámicos, los cuales se listan a continuación¹:

- Se debe mantener el equilibrio entre el fármaco unido y libre.
- El método debe ser válido en una amplia gama de concentraciones de fármacos y proteínas.
- Debe evitarse o considerarse en el método la unión de fármacos extraños o la adsorción de fármacos en las paredes del aparato, membranas u otros componentes.
- Debe evitarse la desnaturalización de las proteínas o la contaminación de la proteína.
- El método debe considerar el pH y las concentraciones iónicas del medio y los efectos de Donnan debidos a la proteína.
- El método debe ser capaz de detectar la unión de fármacos tanto reversible como irreversiblemente, incluidas las asociaciones y disociaciones en fase rápida y lenta de fármacos y proteínas.
- El método no debe introducir sustancias que interfieran, como disolventes orgánicos.
- Los resultados *in vitro* del método deben permitir la extrapolación a la situación *in vivo*.

2.6.1. Tiempo de vida media

El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) es un parámetro farmacocinético del que muchas veces se habla. Es el tiempo que tarda para que la concentración del fármaco se reduzca a la mitad, permitiendo así saber cuándo se alcanza el estado estacionario del fármaco (aquel momento en que, pese a las sucesivas dosis, la concentración plasmática sigue aumentando y siempre se mueve en un rango), así como predecir cuándo se eliminaría el fármaco del organismo¹⁷.

2.6.2. Área bajo la curva

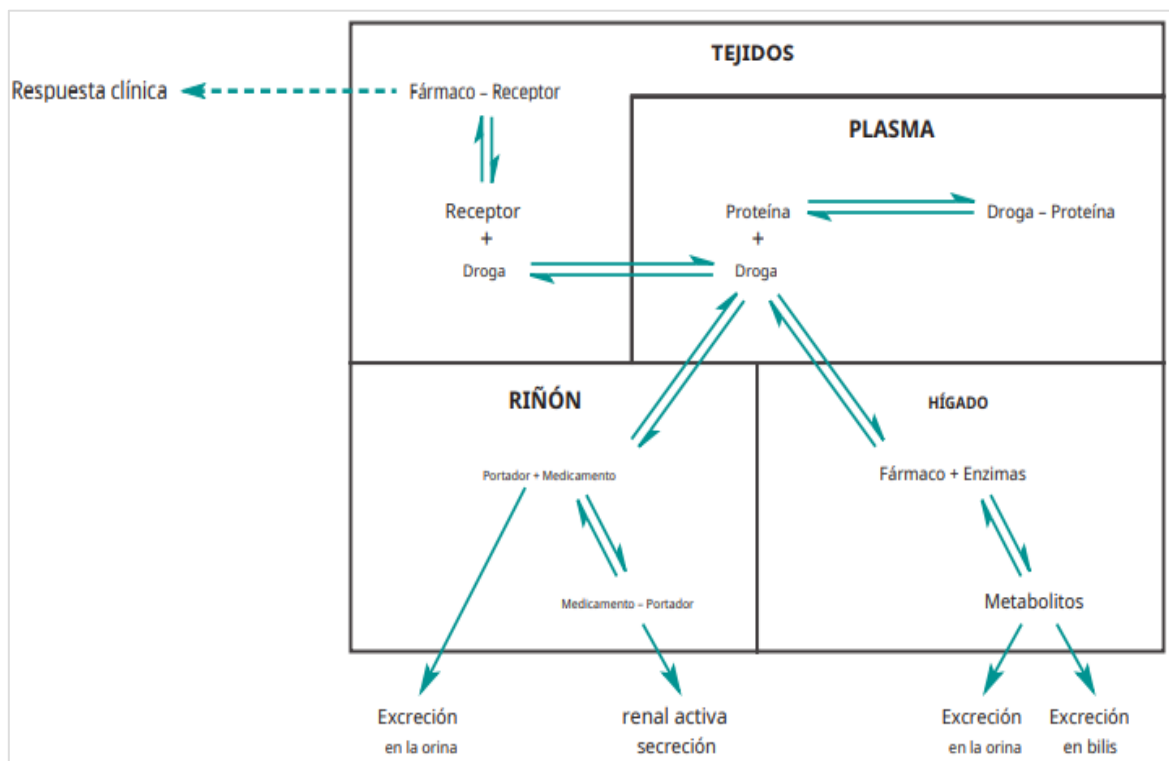
El área bajo la curva de concentración plasmática en función del tiempo o ABC es la medida de la cantidad de fármaco absorbido que se estima con los datos experimentales de concentración plasmática en función del tiempo y a partir de estos se calcula el área bajo la

curva. Este parámetro farmacocinético es un valor numérico calculado por integración de las concentraciones plasmáticas comprendidas desde el tiempo de la administración del fármaco (t_0) hasta el infinito (ABC_0^∞)¹⁷.

2.6.3. Volumen de distribución

La concentración de fármaco en el plasma o los tejidos depende de la cantidad de fármaco absorbido sistémicamente y del volumen en el que se distribuye este. El volumen aparente de distribución en un modelo farmacocinético se utiliza para estimar el grado de distribución del fármaco en el organismo. Aunque el volumen de distribución aparente no representa un verdadero volumen anatómico o físico, representa el resultado de la distribución dinámica del fármaco entre el plasma y los tejidos, y explica el balance de masa del fármaco en el organismo¹.

Figura 10. Representación de distribución de una droga en el organismo



Fuente: imagen tomada de la referencia².

Diversos factores fisiológicos y patológicos tales como la edad, el embarazo, la insuficiencia renal o las interacciones farmacológicas, entre otros, pueden variar la cantidad distribuida en los diferentes tejidos del organismo y, por lo tanto, modificar la respuesta terapéutica². El cálculo del Volumen de distribución en un modelo monocompartimental se da por medio de la ecuación 10.

Ecuación 10. Ecuación para determinar la constante de afinidad

$$Vd = \frac{\text{Cantidad total del fármaco que llega al organismo}}{\text{Concentración plasmática del fármaco}}$$

Fuente: ecuación tomada de la referencia².

Debe entenderse que este no es un valor preciso, solo refleja un análisis del plasma y la concentración del fármaco en este, al momento de la medición. Como ya se había mencionado, existen factores que alteraran la distribución y, por ende, también el volumen de distribución. Su afinidad por los receptores, la concentración y capacidad de unión a proteínas plasmáticas, la cantidad de agua y grasa que tiene el organismo, su acumulación en tejidos con poco riego sanguíneo y las características fisicoquímicas del medicamento por sí, todos serán factores que cambien los valores del volumen de distribución¹⁵.

Los fármacos que se unen en gran medida a las proteínas plasmáticas tienen una fracción baja de fármaco libre (F_{tu} = fracción de fármaco no unida o libre) en el agua del plasma. El fármaco unido a proteínas plasmáticas no se difunde con facilidad y, por tanto, se distribuye menos extensamente a los tejidos. Al contrario, los fármacos con baja unión a proteínas plasmáticas tienen mayor fracción de fármaco libre, por lo general, se difunden más fácilmente en los tejidos y tienen un mayor volumen de distribución¹.

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

Este capítulo detalla la metodología en que se fundamenta esta investigación, la cual se centra en un tipo de estudio experimental, con el fin de obtener la constante de afinidad que presenta el ibuprofeno con la albúmina humana en condiciones de disolución, pH, concentraciones y temperatura controladas. Se hace referencia a los instrumentos utilizados en cada paso del proceso y se puntualizan los procedimientos efectuados para obtener los resultados del proyecto.

3.1. Enfoque

El presente trabajo se desarrolla con un enfoque cuantitativo, por lo que se diseña una metodología de carácter probatoria, con el fin de obtener, mediante cálculos matemáticos, el grado de afinidad que presenta el ibuprofeno a la albúmina humana. Lo anterior se desarrolla bajo condiciones controladas, basado en la evidencia que existe sobre ensayos *in vitro*.

El objetivo de este ensayo es determinar los parámetros por considerar para la optimización de condiciones para el desarrollo de procedimientos de ensayos *in vitro* fármaco-proteína plasmática, mediante la identificación de la constante de afinidad del ibuprofeno a la albúmina humana.

3.2. Diseño

Según Guevara et al.²⁴, en la investigación de enfoque experimental, el investigador manipula una o más variables de estudio, para controlar el aumento o disminución de esas variables y su efecto en las conductas observadas. Además, se produce la observación objetiva de fenómenos que ocurren en situaciones muy controladas, en las que uno o más factores varían; mientras que otros se mantienen constantes, con el fin de establecer las relaciones de concomitancia entre las variables bajo estudio.

En el desarrollo de este ensayo *in vitro*, se evalúan variables como temperatura, concentración, pH y reactivos, con el fin de obtener datos sobre el grado de unión del fármaco a la proteína para posteriormente ser evaluados.

3.3. Fuentes de información

Para sustentar este ensayo, se utilizaron artículos científicos y bases bibliográficas basadas en ensayos *in vitro* y parámetros farmacocinéticos, para la determinación de afinidad entre fármacos con la albúmina humana.

Tabla 6. Criterios de búsqueda de la información

Objetivo	Descriptor	Motores de búsqueda	Periodo de estudio	Idioma
Describir los parámetros por considerar para el desarrollo de ensayos <i>in vitro</i> en los que se evidencie la unión de fármaco a proteína plasmática, mediante la revisión de los estudios indicados en la literatura.	Parámetros farmacocinéticos	Google Académico Scielo Elsevier	2016-2021	Español/inglés /Francés/portugés
	Ensayos <i>in vitro</i>	Google Académico Scielo Elsevier	2016-2021	Español/inglés /Francés/portugés
	Complejos fármaco-proteína plasmática.	Google Académico Scielo Elsevier	2016-2021	Español/inglés /Francés/portugés
Optimizar las condiciones de disolución para el ensayo <i>in vitro</i> que propicie la formación del complejo fármaco-proteína plasmática.	Condiciones de disolución para ensayos <i>in vitro</i>	Google Académico Scielo Elsevier	2016-2021	Español/inglés /Francés/portugés
	Condiciones que propicien la unión fármaco-proteína	Google Académico Scielo Elsevier	2016-2021	Español/inglés /Francés/portugés
Evidenciar la unión del ibuprofeno a la albúmina humana mediante el análisis de los niveles de fármaco libre en presencia de la proteína y la determinación <i>in vitro</i> de la constante de afinidad.	Constante de afinidad	Google Académico Scielo Elsevier	2016-2021	Español/inglés /Francés/portugés
	Unión fármaco-proteína	Google Académico Scielo Elsevier	2016-2021	Español/inglés /Francés/portugés

Fuente: elaboración propia, 2022.

3.4. Criterios de inclusión y criterios de exclusión

En la tabla 7, se presentan los criterios de inclusión y exclusión.

Tabla 7. Criterios de inclusión y criterios de exclusión

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Artículos sobre la determinación de las constantes de afinidad.	Artículos sobre determinación de constantes de eliminación.
Artículos sobre la unión de fármacos a proteínas plasmáticas humanas.	Artículos sobre la unión de fármacos a proteínas plasmáticas diferentes a la humana.
Artículos sobre ensayos <i>in vitro</i> con medicamentos.	Artículos sobre ensayos <i>in vivo</i> con medicamentos.
Artículos sobre parámetros farmacocinéticos en estudios <i>in vitro</i> .	Artículos sobre parámetros no farmacocinéticos.
Artículos sobre la constante afinidad del ibuprofeno.	Artículos sobre constantes de eliminación.

Fuente: elaboración propia, 2022.

3.5. Variables de la investigación

Entre la información recopilada hay 14 artículos, ocho de ellos relacionados a ensayos *in vitro*, seis de ellos relacionados a aspectos farmacocinéticos y su importancia terapéutica. En la tabla 8, se detallan los artículos que fueron revisados para dar sustento al estudio; se especifica el tipo de estudio, cantidad de referencias según el tipo de estudio, cantidad de artículos según el nivel de evidencia y el porcentaje otorgado.

Tabla 8. Clasificación de la información según nivel de evidencia.

Nivel de evidencia	Tipo de estudio	Cantidad según tipo de estudio	Cantidad según nivel de evidencia	Porcentaje
3	Revisión sistemática de estudios observacionales	3	3	21%
4	Estudios de enfoque mixto	1	1	8%
	Estudio analítico	2	2	14%
5	Revisión bibliográfica	8	8	57%
Total		14	14	100%

Tabla 9. Variables de la investigación

Objetivo	VARIABLES	Concepto	Indicador	Técnicas/ Instrumento
Describir parámetros farmacocinéticos por considerar para el desarrollo de ensayos <i>in vitro</i> mediante la formación de un complejo fármaco-proteína plasmática.	Parámetros farmacocinéticos.	Describe la evolución de las concentraciones de un fármaco en diferentes fluidos.	Porcentaje de fármaco libre.	Revisión bibliográfica.
Optimizar las condiciones de disolución para el ensayo <i>in vitro</i> que propicie la formación del complejo fármaco-proteína plasmática.	Condiciones de disolución.	Condiciones de disolución controladas de temperatura, pH, volumen, agitación, disolvente.	Mezcla homogénea.	Espectrofotómetro UV. Curva de calibración.
Evidenciar el comportamiento y la constante de afinidad que presenta el ibuprofeno a la albúmina humana, mediante cálculos matemáticos como evidencia de la unión del fármaco a la proteína plasmática.	Comportamiento y constante de afinidad.	Es la fuerza de unión entre un fármaco y una biomolécula como las proteínas.	Cálculos matemáticos.	Análisis de datos. Hojas de cálculo.

Fuente: elaboración propia, 2022.

3.6. Instrumentos y técnicas

Los materiales empleados para el desarrollo de este ensayo *in vitro* con el fin de determinar el grado de afinidad que presenta el ibuprofeno a la albúmina humana, como la cristalería, reactivos y equipos empleados en esta metodología que permitieron desarrollar este trabajo de investigación, fueron facilitados por el Laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas.

3.7. Materiales

- Equipos:
 - Un soporte
 - Un *beaker* de 1 L
 - Pipetas
 - Jeringas
 - Espectrofotómetro ultravioleta visible
 - Peras
 - Celdas de cuarzo
 - Termómetro
 - Pastillas magnéticas de agitación
 - Plantillas
 - Balones aforados.

- Reactivos:
 - Solución *buffer* de fosfatos pH 7.5
 - Hidrógeno fosfato de sodio
 - Dihidrógeno fosfato de potasio
 - Ibuprofeno
 - Solución de albúmina sérica humana (Albunorm® 20 %)

3.8. Procedimiento de recolección y análisis de datos

Se inicia realizando pruebas experimentales para obtener los resultados y los datos se van almacenando en hojas de cálculo para analizar la información obtenida en los días de

trabajo en el laboratorio. De esta manera, se pueden obtener gráficas en función de la concentración de fármaco unido a la proteína plasmática humana.

3.9. Diseño de experimentos

Preparación del *buffer* de fosfatos y ajuste de pH: se contó con una solución *buffer* de fosfatos de pH 7.2 previamente preparada por el personal del laboratorio. Únicamente se ajustó el pH, con solución de NaOH 0,1 M hasta llegar a pH 7.5, el cual es el valor normal de la sangre.

Preparación de una disolución madre de ibuprofeno: en la balanza analítica se pesaron 100 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 7.5 y se llevó a aforo con el mismo solvente para obtener una concentración madre de 1.0 mg/mL.

Preparación de soluciones de ibuprofeno para el barrido de longitudes de onda: de la disolución al 1,0 mg/mL se tomaron alícuotas de 5 mL, 10 mL y 15 mL con pipeta aforada. Cada una de ellas se llevó a aforo en balones de 25 mL con solución *buffer* de fosfatos pH 7.5 y se obtuvieron concentraciones de 0.20 mg/mL, 0.40 mg/mL y 0.60 mg/mL respectivamente.

Lectura de las soluciones: tras la realización del barrido de longitudes de onda usando un intervalo de 200 nm a 800 nm, se obtuvo máximo de absorción a 264 nm en el espectrofotómetro ultravioleta utilizando una celda de cuarzo de 1 cm. Se utilizó como blanco la solución *buffer* de fosfatos pH 7.5, ya que fue el medio de disolución empleado.

Preparación de soluciones de ibuprofeno de la curva de calibración: una vez realizada la solución madre, se tomaron alícuotas de 5 mL, 7.5 mL, 10 mL, 12.5 mL, 15 mL, 17.5 mL y 20 mL con pipeta graduada de 10 mL y se trasvasaron a balones aforados de 25.0 mL. Cada una de ellas se llevó a aforo en balones de 25 mL con solución *buffer* de fosfatos pH 7.5 y se obtuvieron concentraciones de 0.20 mg/mL, 0.30 mg/mL, 0.40 mg/mL, 0.50 mg/mL, 0.60 mg/mL, 0.70 mg/mL, y 0.80 mg/mL respectivamente, para después obtener las absorbancias a 264 nm.

Preparación de una solución patrón de albúmina: con una jeringa se tomaron 20 mL del frasco de 50 mL de albúmina sérica humana al 20% (Albunorm®) y se llevaron a aforo en un balón de 100 mL, de esta manera, se obtiene una disolución al 4 %.

Lectura de las soluciones: tras la realización del barrido de longitudes de onda usando un intervalo de 200 nm a 800 nm, se obtuvo el máximo de absorción a 278 nm en el espectrofotómetro ultravioleta utilizando una celda de cuarzo de 1 cm. Se utilizó como blanco la solución *buffer* de fosfatos pH 7.5, ya que fue el medio de disolución empleado.

Preparación de soluciones de albúmina para el barrido de longitudes de onda: de la disolución al 4% se tomaron alícuotas de 12.5 mL, 6.25 mL, 3.12 mL y 0.62 mL con pipeta graduada. Cada una de ellas se llevó a aforo en balones de 25 mL con solución *buffer* de fosfatos pH 7.5 y se obtuvieron concentraciones de 2 %, 1 %, 0.5 % y 0.1 % respectivamente para después leer las absorbancias a 278 nm.

Obtención de la constante de afinidad del ibuprofeno con la albúmina mediante cálculos matemáticos: luego de la obtención de los datos del procedimiento *in vitro*, se van almacenando en hojas de cálculo para analizar la información obtenida en los días de trabajo en el laboratorio. De esta manera, se pueden obtener gráficas en función de la concentración de fármaco unido a la proteína plasmática humana y, posteriormente, obtener la constante de afinidad del fármaco a la proteína.

CAPÍTULO IV. 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 del ibuprofeno a la albúmina humana bajo condiciones óptimas que propiciaran la formación del complejo fármaco-proteína plasmática.

4.1. Parámetros que se deben considerar en el desarrollo de ensayos *in vitro*

Para describir los parámetros que se deben tomar en cuenta en el desarrollo de ensayos *in vitro*, se tomó en cuenta que en los últimos años el desarrollo de estos ensayos ha logrado demostrar su incuestionable importancia en la obtención de metodologías que sirven como sustituto de estudios *in vivo*, ya que se pueden establecer los medios en los que se realizaran los procedimientos, además de presentar la ventaja de la comodidad, la reproducibilidad y el uso de razonamiento matemático, lo cual permite aproximarse a los hechos biológicos^{2,17}.

Existen muchos factores que pueden influir negativamente en los resultados de un ensayo *in vitro*, los cuales deben ser estrictamente controlados para obtener resultados verídicos. Entre esos factores se encuentran: Volumen de distribución, aclaramiento, área bajo la curva, vida media, temperatura, concentración, pH.

- El volumen de distribución es un parámetro matemático importante que relaciona la cantidad de fármaco en el cuerpo con la concentración que se tiene en la sangre o en el plasma, en el que va a depender del fluido medido; este volumen no se refiere necesariamente a un volumen fisiológico, sino al volumen del líquido que sería requerido para contener todo el fármaco como un ensayo *in vitro*^{2,17}.
- Otro parámetro que se investigó fue el aclaramiento del fármaco, ya que un ensayo *in vitro* puede realizarse como un modelo sin eliminación del fármaco como el desarrollado en este proyecto, o como un modelo con eliminación. Este concepto a nivel farmacocinético se emplea para determinar la vida media de los fármacos y así poder predecir el estado estacionario de un fármaco en un organismo o un ensayo. Con respecto al área bajo la curva tiene un importante significado, ya que se grafican las concentraciones plasmáticas de un fármaco en

función del tiempo. Este se calcula desde el momento en el que se administra el fármaco hasta el momento en el que la concentración plasmática encuentra un equilibrio^{2,17}.

- Con respecto al tiempo de vida media, este es un parámetro que farmacocinético que se define como el intervalo de tiempo que necesita un fármaco para que su concentración se reduzca a la mitad por lo que se expresa en unidades de tiempo. Este está estrechamente relacionado y depende del volumen de distribución como del aclaramiento total del fármaco. Por lo anterior se llegó a observar que puede considerarse uno de los parámetros más importantes, porque puede definir el perfil farmacocinético de un fármaco^{2,17}.
- Para una adecuada interpretación de la cantidad que se llega a absorber, las mediciones se deben realizar hasta tiempo infinito ABC_0^∞ , ya que el tiempo de eliminación puede llegar a representar un valor importante, al menos en fármacos que poseen vidas medias muy largas. Por lo anterior se puede hacer referencia a que cuando se desarrollan este tipo de ensayos los tiempos se llegan a detener antes de eliminado el fármaco, por lo que el tiempo infinito se toma como el valor remanente cuando se finalizó las mediciones^{2,17}.
- Cuidar la temperatura y pH en un ensayo in vitro es esencial, en especial, si se emplean proteínas como en este trabajo de investigación. Si la proteína se somete a temperaturas muy altas se puede llegar a degradar, por lo que si se quiere realizar un método de simulación lo mejor será mantener las condiciones normales a las que se encuentran en el organismo^{2,17}.
- Sin embargo, haciendo referencia al segundo objetivo de este proyecto, se pudo llegar a observar en las mediciones realizadas que las diferencias de temperatura entre ensayos no se presentaron diferencias significativas, por lo que la temperatura menor a los 37°C no es un factor de afectación para degradar la proteína o afectar la unión del fármaco a la albúmina^{2,17}.
- Se consideró tomar en cuenta las concentraciones de trabajo de un fármaco para no saturar el medio en el que se está trabajando, por lo que los barridos de longitudes de onda para optimizar las condiciones de disolución son esenciales

para determinar las concentraciones de fármaco idóneas en las condiciones experimentales a emplear^{2,17}.

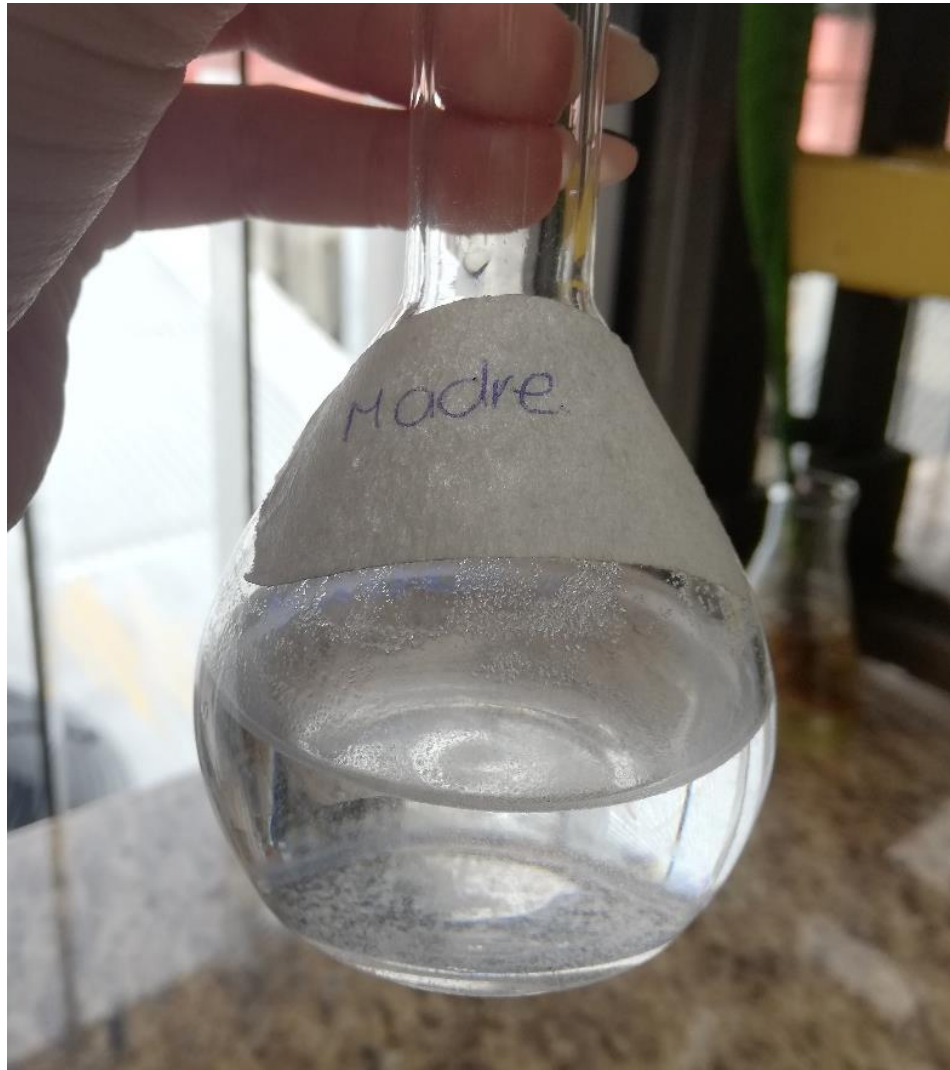
4.2. Optimización de las condiciones de disolución

La primera etapa del proyecto correspondió a la selección del medio de disolución adecuado para el análisis de la unión del ibuprofeno a la albúmina humana. En primera instancia se tuvo como parámetro de elección que tanto la proteína como el fármaco fuesen solubles en este medio o disolvente. Para esto se consideró el agua destilada; sin embargo, los resultados no fueron los esperados ya que el ibuprofeno no presentó una disolución completa en este disolvente³⁷.

Debido a lo infructuoso que resultó el empleo de agua se revisó la literatura disponible sobre los medios en los que este fármaco presenta solubilidad. Se obtuvo que es muy soluble en etanol, acetona y en cloroformo; sin embargo, estos medios distan de las condiciones en las que se encontraría el fármaco junto a la proteína en el plasma.

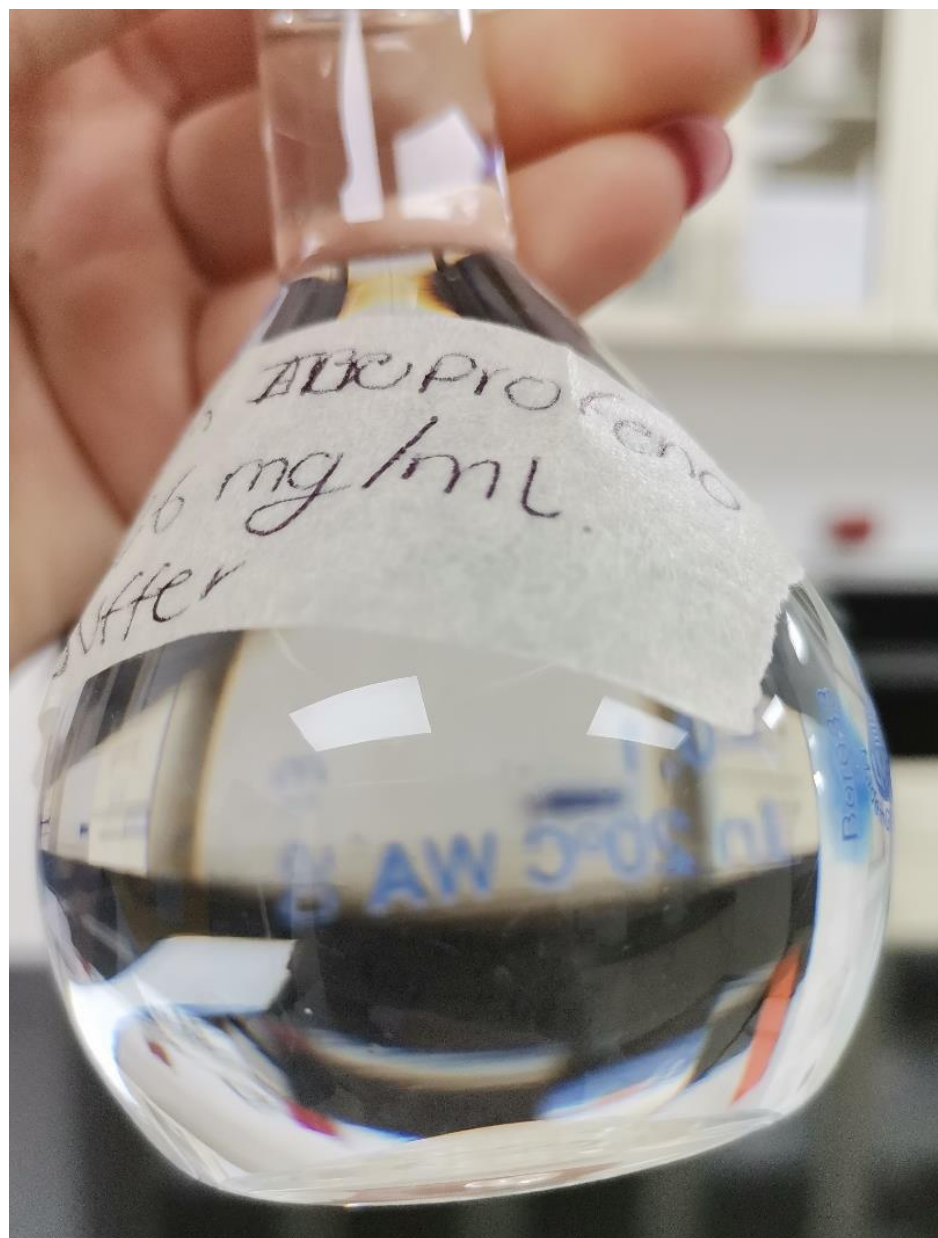
Finalmente, se observó que está reportado en la USP 42 como medio de disolución para el ibuprofeno un buffer de fosfatos. Además, la albúmina es evidentemente soluble pues, presenta un pH fisiológico de 7,4-7,5. De esta manera, se logra optimizar el medio de disolución adecuado.

Figura 11. Disolución acuosa de ibuprofeno a una concentración de 0,60 mg/mL



Nota: elaboración propia, 2022.

Figura 12. Disolución de ibuprofeno a una concentración de 0,60 mg/mL en buffer de fosfatos pH 7,5



Nota: elaboración propia, 2022.

4.2.1. Determinación de la longitud de onda máxima de absorción y concentración, tanto del ibuprofeno como de la albúmina humana, para el análisis de la unión fármaco a proteína plasmática

Para determinar la longitud de onda de análisis de ibuprofeno en disolución, se prepararon tres diluciones a partir de la disolución madre de concentración 1,0 mg/mL. En este proceso se tomaron distintas alícuotas que se transfirieron a balones de 25 mL y se llevaron a aforo con una disolución de *buffer* de fosfatos de pH 7,5. En la tabla 10 se muestran las alícuotas tomadas y las concentraciones resultantes.

Tabla 10. Preparación de las disoluciones de ibuprofeno empleadas para determinar la longitud de onda del máximo de absorción del ibuprofeno

Disolución	Alícuota tomada de la disolución madre de ibuprofeno (mL)	Concentración resultante de la disolución (mg/mL)
1	5,0	0,20
2	10,0	0,40
3	15,0	0,60

Nota: elaboración propia, 2022.

De esta etapa, se obtuvo para las tres disoluciones que el máximo de absorción se encontró a 264 nm.

Una vez obtenida la longitud de onda que se emplearía para cuantificar el ibuprofeno en el sistema de su unión a la proteína plasmática, la siguiente etapa correspondió en determinar la longitud de onda a la que absorbe principalmente la albúmina. Esto tuvo el propósito, en primer lugar, de descartar una posible interferencia que podría darse si el máximo de absorción de la proteína coincidiera con la del fármaco; en segundo lugar, poseer la longitud de onda a la que podría realizarse la cuantificación de la albúmina en disolución, de ser necesario.

Para el barrido espectral de la albúmina, se tomaron alícuotas de una solución madre preparada al 4% en 100 mL, las cuales fueron 12,5 mL, 6,25 mL, 3,1 mL, 0,6 mL, las cuales se llevaron a aforo en balon aforado de 25 mL con búffer de fosfatos pH 7,5, de las que se obtuvieron concentraciones de albúmina al 2%, 1%, 0,5% y 0,1%. Como resultado del

barrido de absorbancias se observó un máximo de absorción a una longitud de onda de 279 nm.

Además de determinar la longitud de onda a la que se deben realizar estas mediciones con la albumina, se logró determinar cuál es la concentración de la proteína en solución adecuada para realizar el análisis de la unión del fármaco a la proteína.

Tabla 11. Longitud de onda de máximos de absorción obtenidas para distintas concentraciones del ibuprofeno s mediante espectrofotometría UV-VIS

Concentración (mg/mL)	Longitud de onda (nm)
0,20	264
0,40	264
0,60	264
1,0	264

Nota: elaboración propia, 2022.

Tabla 12. Longitudes de onda de máximos de absorción obtenidas para distintas concentraciones de la albúmina mediante espectrofotometría UV-VIS

Porcentaje masa/volumen de albúmina (%)	Longitud de onda (nm)
4	285
2	273
1	243
0.5	278 y 232
0.1	279

Nota: elaboración propia, 2022.

4.2.2. Curvas de calibración

Se consultó en la USP 42 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 mediante el barrido de absorbancias realizado, se obtuvo una longitud de onda de 264 nm para la lectura de las muestras. Se procedió a elaborar la curva de

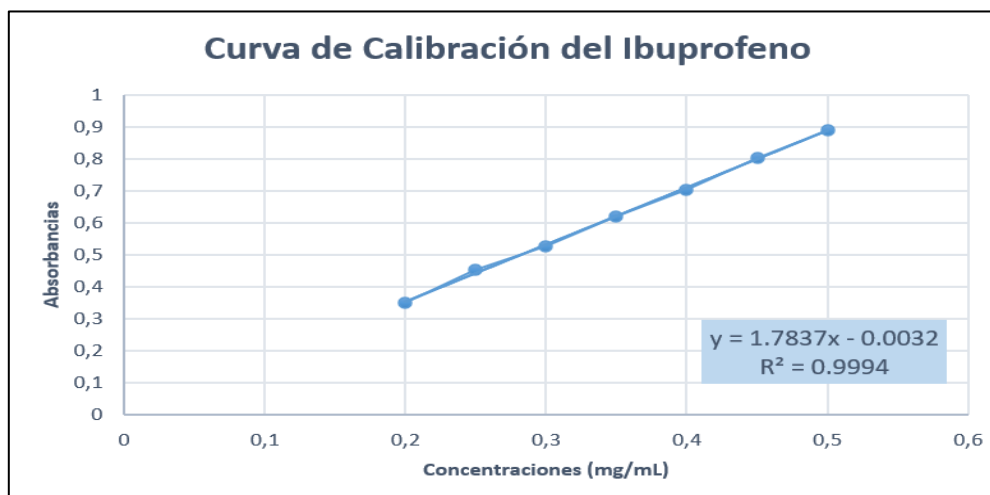
calibración cuyos resultados se muestran en la siguiente tabla y gráfico, esta última muestra el gráfico de la absorbancia en función de la concentración.

Tabla 13. Curva de calibración del ibuprofeno obtenida mediante análisis de espectrofotometría UV-VIS

Concentración (mg/mL)	Absorbancias (nm)
0.20	0.3488
0.25	0.4545
0.30	0.5265
0.35	0.6205
0.40	0.7049
0.45	0.8042
0.50	0.8886

Nota: elaboración propia, 2022.

Gráfico 1. Representación de la absorbancia en función de la concentración de ibuprofeno



Nota: elaboración propia, 2022.

Tabla 14. Valores estadísticos de la curva de calibración

Coefficiente	Intercepto	Pendiente
0.9994	1.7837	0.0032

Nota: elaboración propia, 2022.

4.2.3. Optimización de la concentración de albúmina

A partir de la solución para infusión de albúmina sérica humana (Albunorm® 20 %), se prepararon varias disoluciones a distintas concentraciones para el análisis. Según la teoría las concentraciones séricas estándar, en adultos están establecidas entre 3.4-5.4 g/dL aproximadamente²⁵. No obstante, las absorbancias obtenidas dentro de ese rango fueron muy elevadas, limitando su uso en ese porcentaje. La siguiente tabla muestra las disoluciones empleadas y sus respectivas absorbancias.

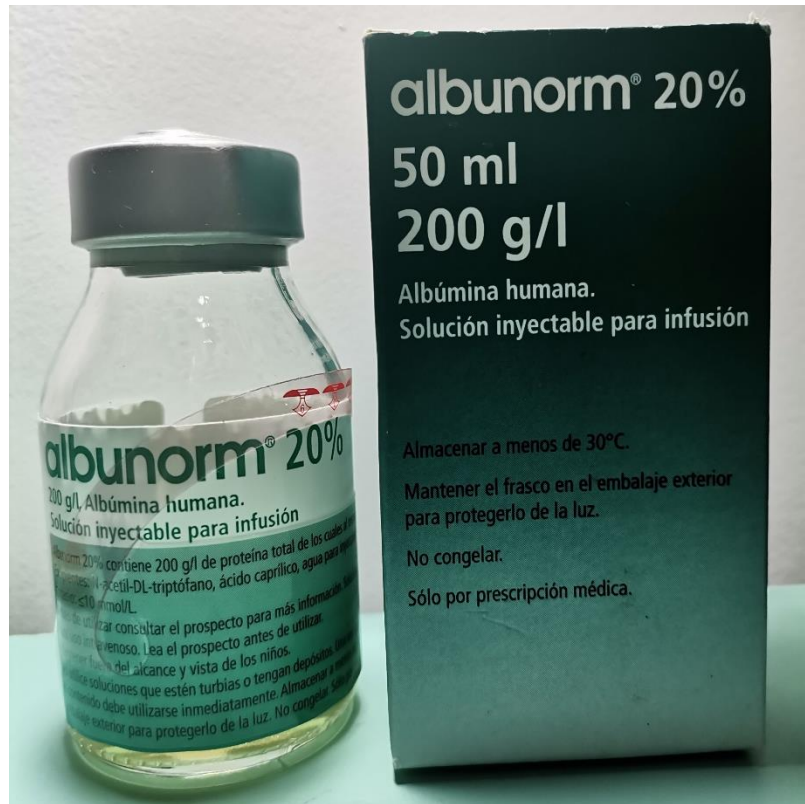
Tabla 15. Optimización de la concentración de albúmina humana por emplear

Porcentaje masa/volumen de albúmina (%)	Absorbancia
4	3.988
2	3.890
1	3.180
0.5	3.036
0.1	1.044

Nota: elaboración propia, 2022.

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 obtuvo el espectro de absorción de la nueva dilución y se observó que la longitud máximo de absorción se situó a una longitud de onda de 279 nm y con una absorbancia de 1,044. A pesar de que esta absorbancia es aún elevada se consideró emplear esta longitud de onda ya que en el sistema de unión esta concentración se diluiría al adicionarle la disolución de ibuprofeno permitiendo que la absorbancia sea aún menor que la obtenida en este punto.

Figura 13. Albúmina humana en solución inyectable



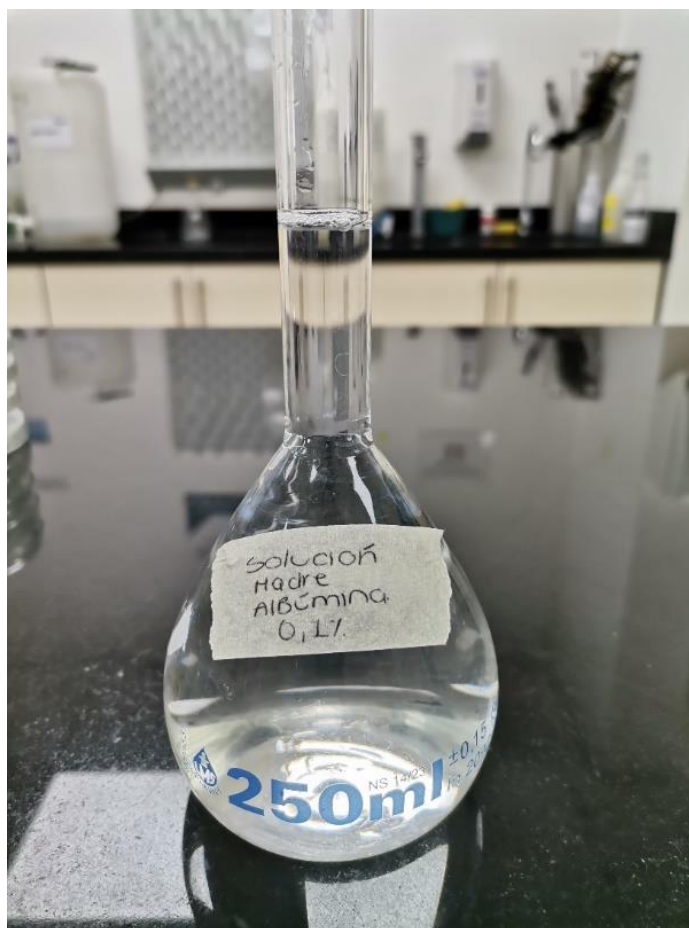
Nota: elaboración propia, 2022.

Figura 14. Soluciones de albúmina en distintos porcentajes



Nota: elaboración propia, 2022.

Figura 15. Solución de albúmina a una concentración de 0.1%



Nota: elaboración propia, 2022.

4.2.4. Optimización de la concentración de ibuprofeno

Para el análisis se prepararon varias disoluciones de ibuprofeno en búffer de fosfatos a distintas concentraciones. En la balanza analítica se pesaron 20 mg, 60 mg y 100 mg del estándar de ibuprofeno por diferencia en un trozo de papel encerado, y se transfirieron a un balón aforado de 100 mL. Se llevó a aforo con solución búffer pH 7,5 para obtener concentraciones de 0,20 mg/mL, 0,60 mg/mL y 1,00 mg/mL para evitar la presencia de partículas en la solución se colocó el balón en el baño ultrasónico durante 20 minutos.

Figura 16. Solución de ibuprofeno a una concentración de 0.60 mg/mL en baño ultrasónico



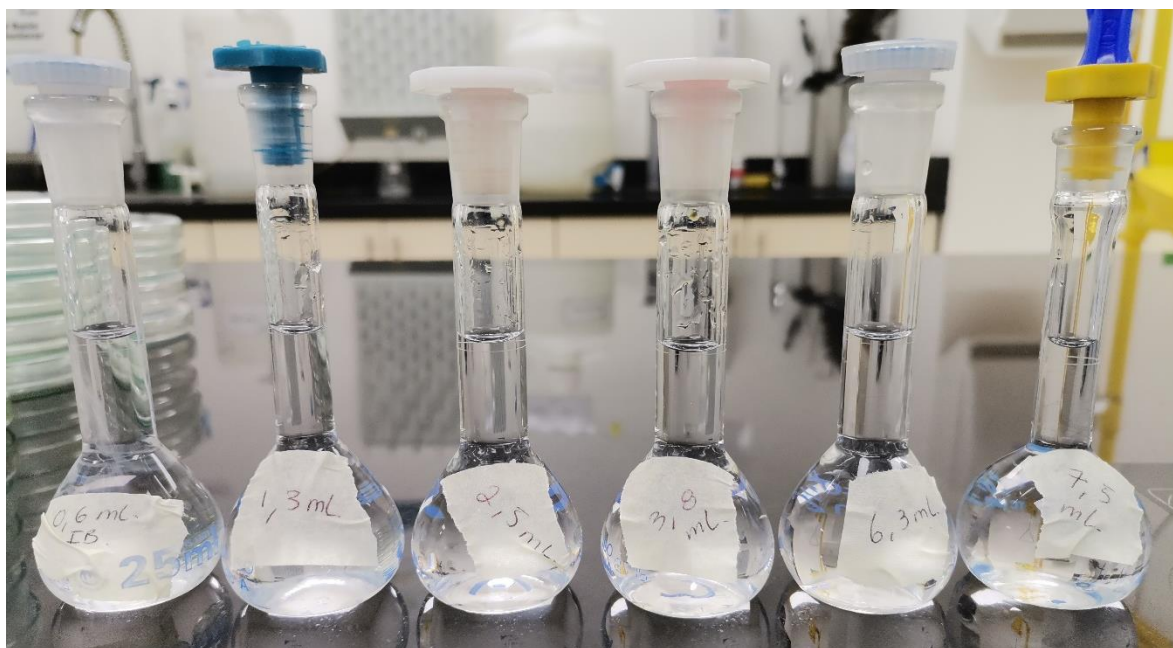
Nota: elaboración propia, 2022.

Tabla 16. Optimización de la concentración de ibuprofeno a emplear con base en las absorbancias de disoluciones a distintas concentraciones del fármaco analizadas a 264 nm.

Concentración de ibuprofeno (mg/mL)	Absorbancia
0.20	0.350
0.60	0.786
1.0	1.766

Nota: elaboración propia, 2022.

Figura 17. Apariencia de las disoluciones de ibuprofeno a distintas concentraciones

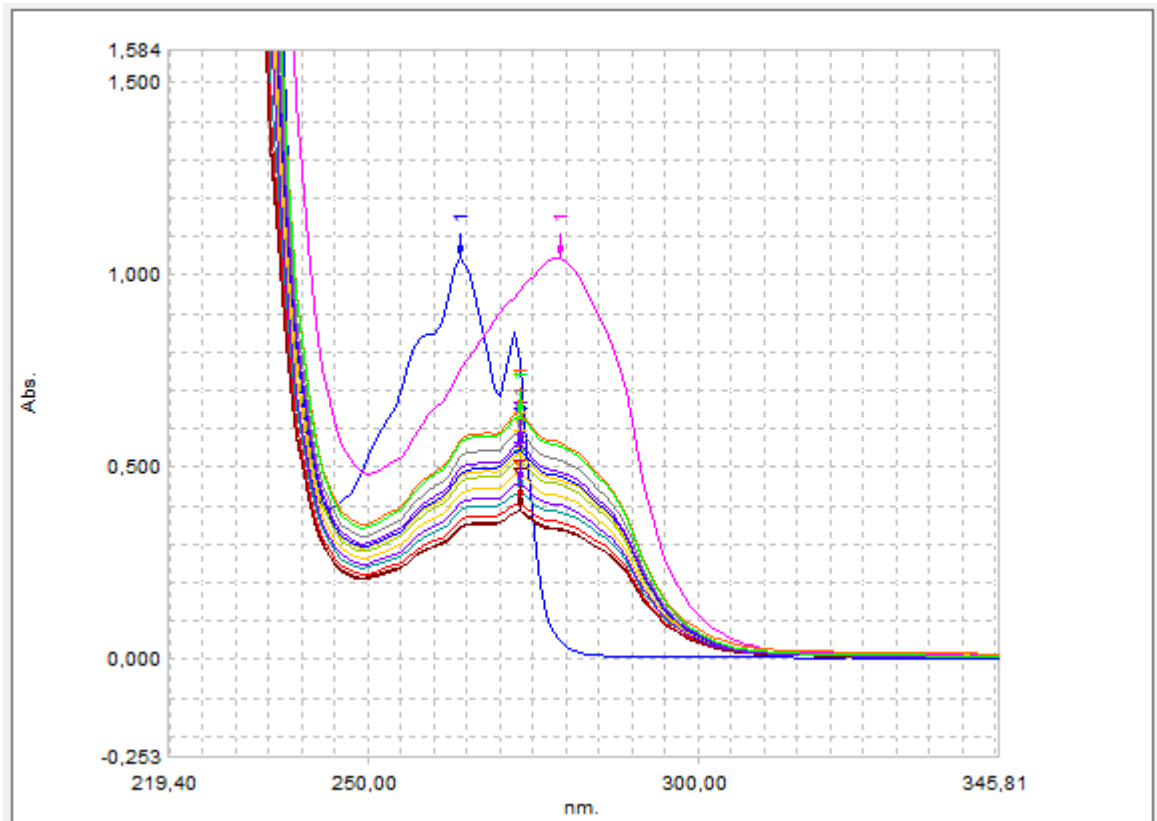


Nota: elaboración propia, 2022.

Una vez optimizadas las condiciones según lo explicado en las pruebas anteriores, se realizó la medición espectrofotométrica de un ensayo de unión del ibuprofeno a la albúmina humana en el que se comparaban los espectros de absorción del complejo fármaco – proteína, contra el ibuprofeno a una concentración de 0,6 mg/mL y la albúmina humana al 0,1%. En la figura, se observa que la línea rosa representa el pico de albúmina y el pico azul el del ibuprofeno, los picos restantes representan el complejo ibuprofeno – albúmina humana.

De esto se determinó que con forme se realizaron las mediciones en los respectivos tiempos de muestreo, la concentración de ibuprofeno en el medio iba disminuyendo y absorbiendo en el mismo punto que el pico de ibuprofeno.

Figura 18. Espectro de absorción de las mediciones de ibuprofeno 0,075 mg/mL en disolución con la albúmina



Nota: elaboración propia, 2022.

4.2.5. Verificación de la unión de ibuprofeno a la albúmina en un sistema de temperatura controlada y a temperatura ambiente

4.2.5.1 Determinación de los tiempos de muestreo

La primera aproximación en el optimizado de las condiciones que se realizó para medir la unión del ibuprofeno a la albúmina humana bajo condiciones de temperatura controlada a 37°C sin reposición de volumen, tomando alícuotas cada 10 minutos por un lapso de 120 minutos, sin embargo, los resultados para este ensayo no fueron los esperados ya que no se mostró una disminución de la concentración del fármaco que sería un indicio de la unión a la proteína.

Esto es porque al formarse el complejo fármaco-proteína la absorción de radiación correspondería a otra longitud de onda distinta a la absorbe el fármaco libre. Por lo que se consideró que la relación fármaco – proteína fue elevada de modo que se saturó la biomolécula sin darse cambio significativo en la cantidad de ibuprofeno. En la siguiente tabla se logra observar que los cambios de concentración no fueron los esperados.

Tabla 17. Variación de la concentración de ibuprofeno libre bajo condiciones de ensayo 1 (Concentración inicial de 0,015 mg/mL) sin reposición de volumen.

Tiempo (minutos)	Concentración (mg/L)
10	43,9
20	43,8
30	43,5
40	40,3
50	45,0
60	45,5
70	45,9
80	46,6
90	47,7
100	49,1
110	49,3
120	50,0

Nota: elaboración propia, 2022.

Tomando en cuenta los valores obtenidos en este ensayo se realizaron cambios para el desarrollo de los próximos ensayos, ya que se observó que llegado a los 40 minutos la concentración del fármaco de empieza a liberar de la proteína por lo que los tiempos se redujeron tomándolos cada 5 minutos durante los primeros 30 minutos y luego de este tiempo cada 30 minutos hasta tratar de llegar a un equilibrio del fármaco en el medio.

Se repitió el análisis mediante las mismas condiciones iniciales, modificando el hecho de que en cada muestreo se realizó la reposición de volumen.

Tabla 18. Variación de la concentración de ibuprofeno libre bajo condiciones de ensayo 1 (Concentración inicial de 0,015 mg/mL) con reposición de volumen.

Tiempo (minutos)	Concentración (mg/mL)
10	37,6
20	23,3
30	23,1
40	20,4
50	20,3
60	19,4
70	18,6
80	17,6
90	17,1
100	16,0
110	15,1
120	13,7

Nota: elaboración propia, 2022.

Los resultados corresponden a lo esperado en este ensayo, sin embargo, en este punto surge la incertidumbre de si la variación es realmente por la unión del fármaco o por el proceso de dilución realizado. Por lo que surgieron las siguientes hipótesis para el desarrollo de tres tipos de ensayos distintos que se miden bajo condiciones diferentes

4.2.5.2 Ensayos sometidos a distintas temperaturas

Para lograr verificar la unión del ibuprofeno a la albúmina, se realizaron ensayos en los que inicialmente se medía el efecto de la temperatura sobre la unión fármaco-proteína e identificar si existe algún tipo de cambio notable entre mediciones, de las cuales se obtuvo

que los datos eran muy similares entre ellos obteniendo así diferencias no significativas, por lo que temperatura no es una condición que modificaba la afinidad del fármaco hacia la proteína plasmática. En la tabla 17 y figura (17) se observan las concentraciones de los ensayos a temperatura ambiente como a una temperatura controlada de 37°C.

Ecuación 11. Ecuación de la recta de la curva de calibración.

$$y = 1.7837x + -0.0032$$

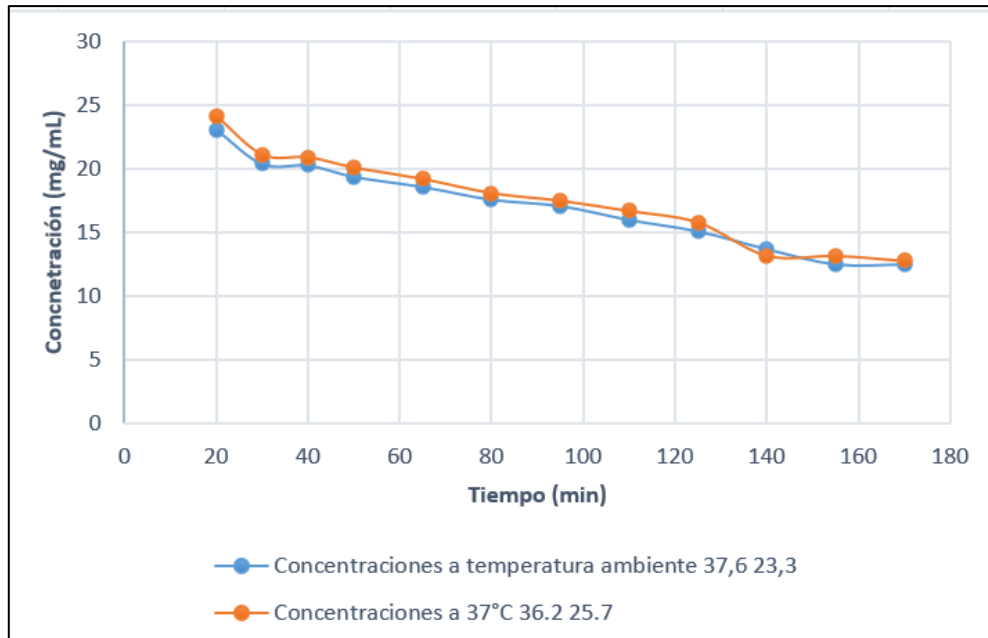
Nota: elaboración propia, 2022.

Tabla 19. Variación de la concentración de ibuprofeno libre bajo condiciones de ensayo 1 (Concentración inicial de ibuprofeno 0,015 mg/mL) a temperatura de 37°C y temperatura ambiente con reposición de volumen

Tiempo (minutos)	Concentraciones a temperatura ambiente ~26°C (mg/L)	Concentraciones a temperatura de 37°C (mg/L)
0	37,6	36,2
10	23,3	25,7
20	23,1	24,1
30	20,4	21,1
40	20,3	20,9
50	19,4	20,1
80	18,6	19,2
95	17,6	18,1
110	17,1	17,5
125	16,0	16,7
140	15,1	15,8
155	13,7	13,2
170	12,5	13,2
130	12,5	12,8

Nota: elaboración propia, 2022.

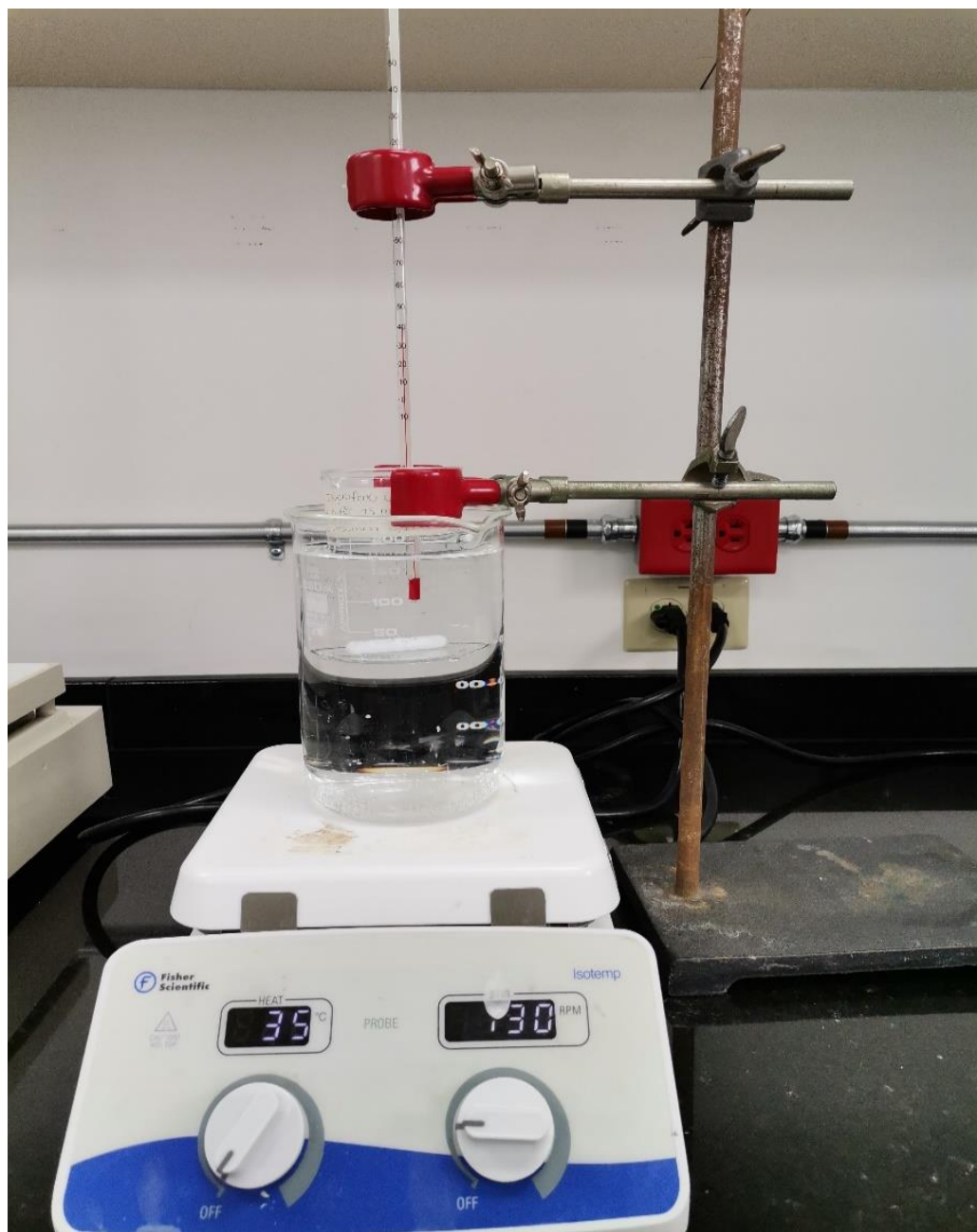
Gráfica 2. Representación de la concentración de ibuprofeno libre bajo condiciones de ensayo 1 (Concentración inicial de ibuprofeno 0,015 mg/mL) a temperatura de 37°C y temperatura ambiente



Nota: elaboración propia, 2022.

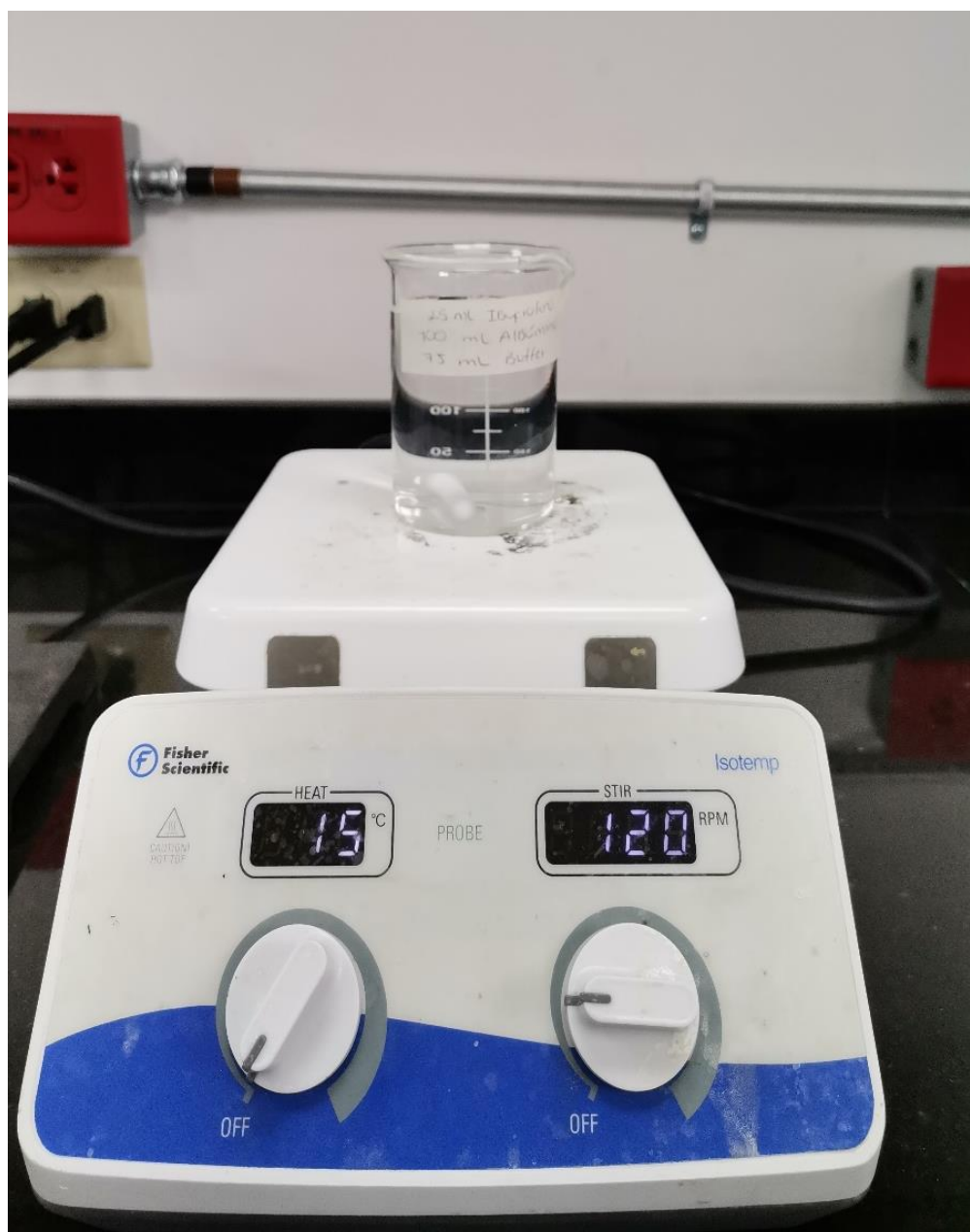
Se observó que las concentraciones obtenidas con respecto al tiempo fueron disminuyendo con forme avanzaban los minutos, lo cual permitió observar que esa disminución de concentraciones se podría deberse a la unión del fármaco a la albúmina humana.

Figura 19. Ensayo *in vitro* de la unión de ibuprofeno 0,6 mg/mL a la albúmina humana bajo condiciones de temperatura de 37°C y pH 7,5



Nota: elaboración propia, 2022.

Figura 20. Ensayo *in vitro* de la unión de ibuprofeno 0,6 mg/mL a la albúmina humana en condiciones de temperatura ambiente y pH 7,5



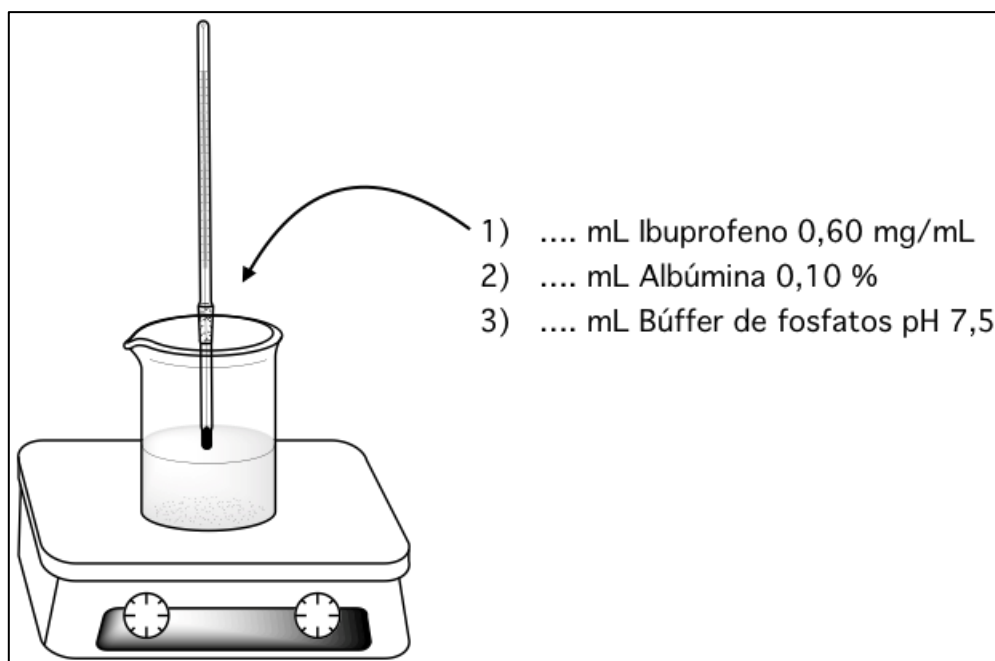
Nota: elaboración propia, 2022.

4.3 Desarrollo de ensayos fármaco – proteína para determinación de constante de afinidad

Con el propósito de evidenciar la unión del ibuprofeno a la albúmina mediante la determinación de la constante de afinidad respectiva, se establecieron distintos sistemas en donde se modificaron las concentraciones iniciales de ibuprofeno manteniendo una concentración constante de la albúmina. La concentración de albúmina correspondió a la dilución de un volumen de 100 mL de la concentración inicial al 0,1 % a un volumen final de 200 mL.

De acuerdo con SHARGEL y YU¹, la determinación de las constantes de afinidad en sistemas in vitro se realiza a través del método del doble recíproco en donde a una concentración constante de proteína se varía la concentración del fármaco. Debido a esto se consideró emplear tres concentraciones de fármaco y una fija de la proteína. En la figura 21 se muestra el esquema seguido para la preparación del sistema de unión, mientras que en las siguientes tablas se resumen las condiciones para cada uno de los ensayos.

Figura 21. Preparación de los sistemas de análisis de unión del ibuprofeno a la albúmina humana bajo distintas condiciones



Nota: elaboración propia, 2022.

Tabla 20. Condiciones iniciales para el análisis de unión del ibuprofeno a la albúmina humana para distintas concentraciones iniciales del fármaco tanto para el proceso sin reposo como con reposición de volumen.

Ensayo No	Ibuprofeno 0,60 mg/mL adicionando (mL)	Albúmina 0,10% adicionando (mL)	Buffer fosfatos pH 7,5 adicionando (mL)	Concentración inicial de ibuprofeno (mg/mL)
1	5	100	95	0,015
2	10	100	90	0,030
3	20	100	80	0,060
4	25	100	75	0,075

Nota: elaboración propia, 2022.

Luego se procedió a realizar la toma de muestras de 10 mL, hasta completar un intervalo de tiempo de 180 minutos. Estos ensayos se realizaron tanto con reposición como sin reposición del líquido extraído de la mezcla.

Tomando en cuenta lo discutido en el apartado de los tiempos de muestreo por la incertidumbre causada por la variación entre ensayos con y sin reposición de volumen, surgieron las siguientes hipótesis para el desarrollo de tres tipos de ensayos distintos que se miden bajo condiciones diferentes e identificar sin el fármaco realmente se une a la proteína o se diluye.

Inicialmente se realizan los 4 ensayos mencionados en la tabla anterior y se miden a tiempo cero y a tiempo infinito sin intervención de otras mediciones, con el fin de identificar si hay algún tipo de variación en la concentración. Con lo que se obtiene como resultado los siguientes datos.

Tabla 21. Análisis de unión del ibuprofeno a la albúmina humana para distintas concentraciones iniciales del fármaco para el proceso a tiempo infinito

Ensayo No	Concentración inicial (mg/L)	Concentración final (mg/L)
1	20,1	18,6
2	21,4	21,3
3	25,8	24,7
4	59,4	28,8

Nota: elaboración propia, 2022.

La segunda y tercera hipótesis figuran con respecto a la unión o dilución del fármaco, por lo que se realizan los ensayos bajo las mismas condiciones mencionadas en la tabla 20, con y sin reposición de volumen. Otro aspecto que se tomó en cuenta fueron los tiempos de mediciones, que se realizaron dentro de los primeros 30 minutos ya que en los análisis anteriores para la optimización de las condiciones se logró identificar que a los 30 minutos el fármaco llega a un equilibrio de unión con la albúmina, pero rápidamente empiezan a incrementar las concentraciones de ibuprofeno porque la albúmina se satura rápidamente y se da una reacción reversible de la unión.

Tabla 22. Variación de la concentración de ibuprofeno libre bajo condiciones de ensayo 1 (Concentración inicial de 0,015 mg/mL) con reposición y sin reposición de volumen

Tiempo (minutos)	Concentración sin reposición de volumen (mg/L)	Concentración con reposición de volumen (mg/L)
0	20,1	20,1
5	19,2	19,6
10	19,1	18,3
15	19,0	15,7
20	19,0	14,4
25	18,2	12,7
30	17,7	12,1
60	18,4	11,2
90	19,4	0,09
120	19,6	0,08
150	19,6	0,07
180	20,1	0,07

Nota: elaboración propia, 2022.

Tabla 23. Variación de la concentración de ibuprofeno libre bajo condiciones de ensayo 2 (Concentración inicial de 0,03 mg/mL) con reposición y sin reposición de volumen

Tiempo (minutos)	Concentración sin reposición de volumen (mg/mL)	Concentración con reposición de volumen (mg/mL)
0	21,4	21,4
5	20,6	20,1
10	20,5	19,0
15	19,7	17,8
20	19,6	16,2
25	18,8	15,0
30	18,3	13,6
60	19,8	11,7
90	20,8	10,7
120	21,3	10,4
150	21,3	0,09
180	21,3	0,08

Nota: elaboración propia, 2022.

Tabla 24. Variación de la concentración de ibuprofeno libre bajo condiciones de ensayo 3 (Concentración inicial de 0,06 mg/mL) con reposición y sin reposición de volumen

Tiempo (minutos)	Concentración sin reposición de volumen (mg/mL)	Concentración con reposición de volumen (mg/mL)
0	25,8	25,8
5	22,9	24,6
10	22,7	23,2
15	22,0	21,9
20	21,0	20,1
25	20,9	19,3
30	20,1	17,6
60	22,1	16,8
90	23,1	15,9
120	23,6	14,5
150	23,6	12,7
180	24,1	12,1

Nota: elaboración propia, 2022.

Tabla 25. Variación de la concentración de ibuprofeno libre bajo condiciones de ensayo 4 (Concentración inicial de 0,075 mg/mL) con reposición y sin reposición de volumen

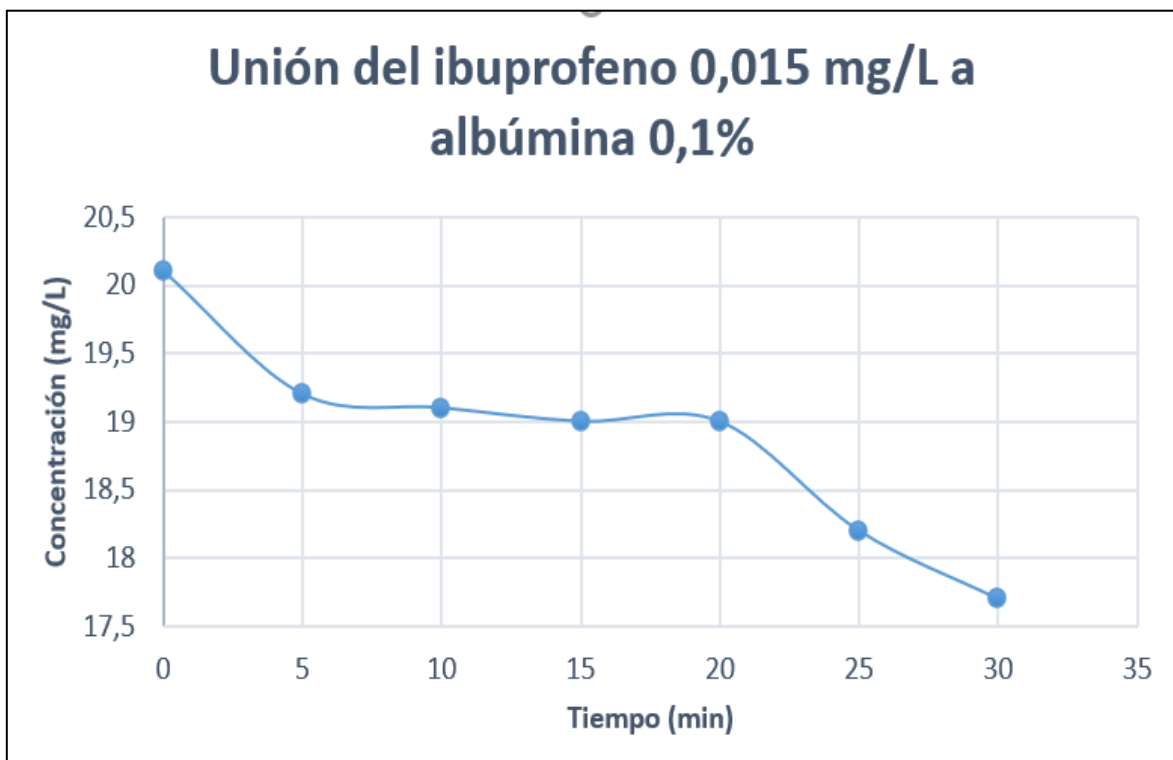
Tiempo (minutos)	Concentración sin reposición de volumen (mg/mL)	Concentración con reposición de volumen (mg/mL)
0	59,4	43,7
5	35,7	43,6
10	30,1	36,2
15	28,8	31,7
20	27,5	25,7
25	24,5	24,7
30	23,2	24,1
60	25,7	23,2
90	28,7	21,9
120	29,5	21,1
150	29,5	16,2
180	29,9	14,9

Nota: elaboración propia, 2022.

De los cuadros anteriores se observó la tendencia del ibuprofeno a llegar a un supuesto punto de equilibrio a los 30 minutos, lo cual es importante porque sin importar la concentración de ibuprofeno en las que se realizaron los ensayos esa tendencia se mantuvo. Por lo que para la determinación de la constante de afinidad se tomaron las concentraciones al minuto 30 para los ensayos sin reposición de volumen, ya que es evidente que en el ensayo con reposición de volumen no existe unión del fármaco, sino dilución.

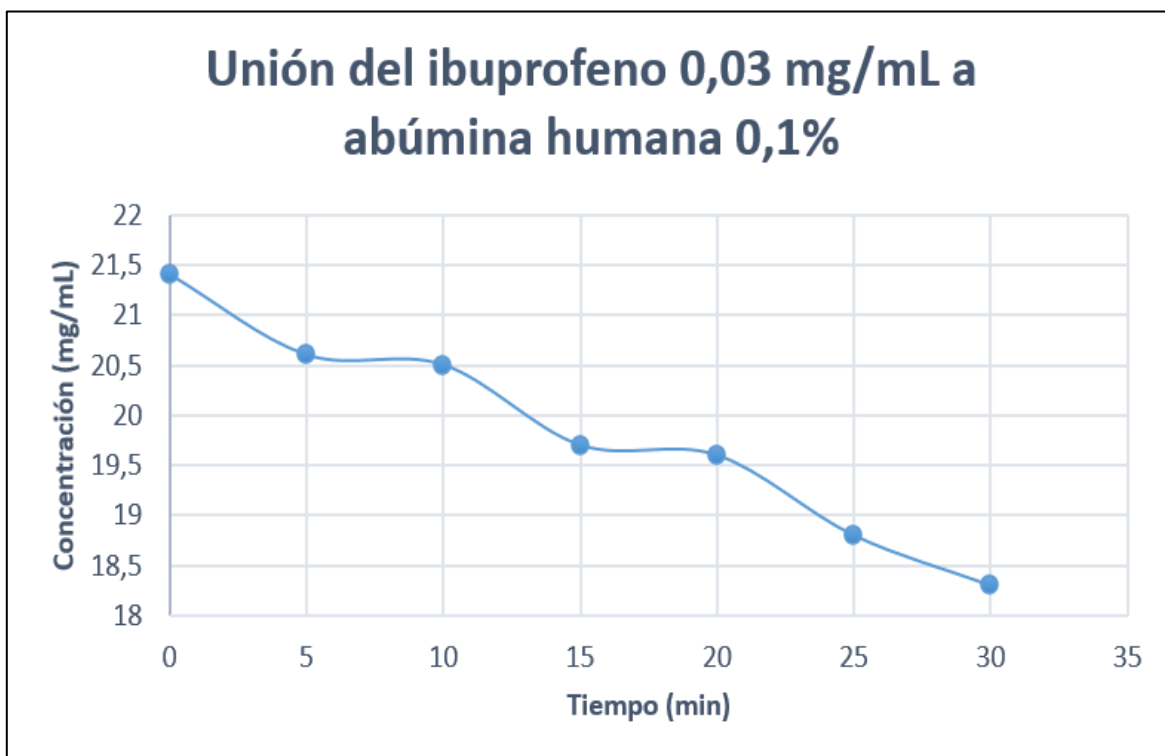
Las gráficas 3, 4, 5 y 6 muestran una disminución de la concentración de ibuprofeno en la disolución empleada como sistema de unión fármaco a proteína plasmática. Esta disminución podría evidenciar la unión del ibuprofeno a la albúmina humana.

Gráfico 2. Representación de la afinidad del ibuprofeno en función de la concentración de ibuprofeno con respecto al tiempo



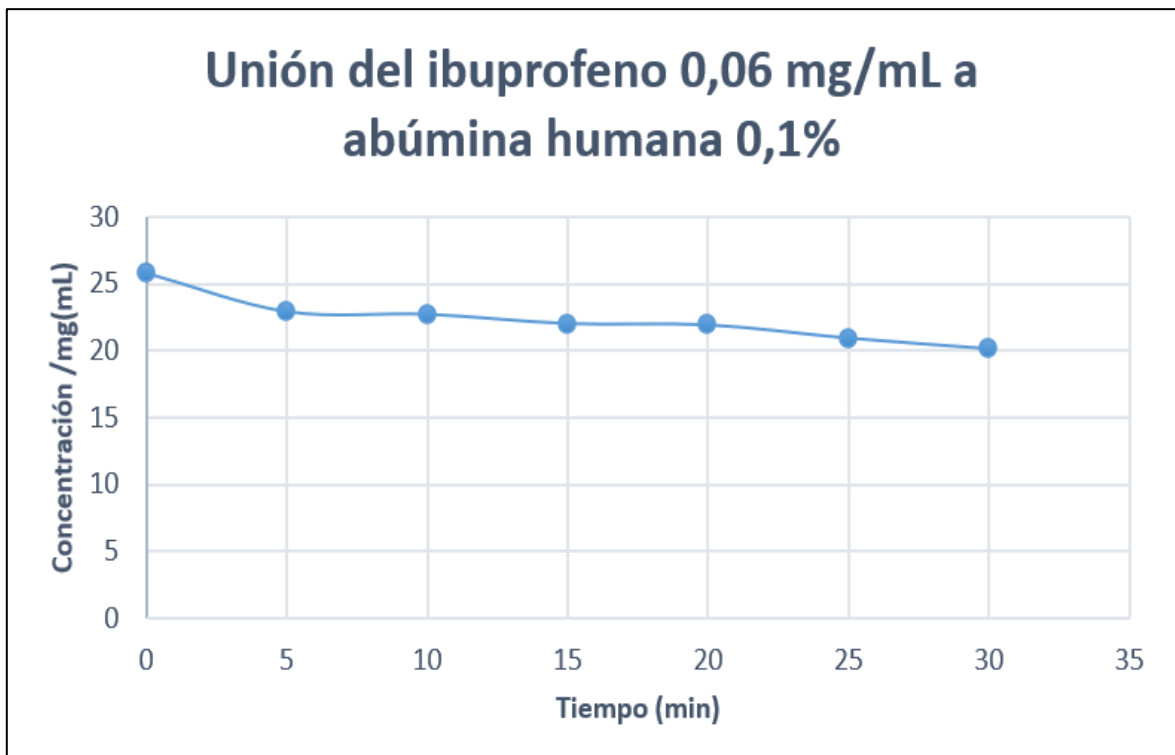
Nota: elaboración propia, 2022.

Gráfico 4. Representación de la afinidad del ibuprofeno en función de la concentración de ibuprofeno con respecto al tiempo



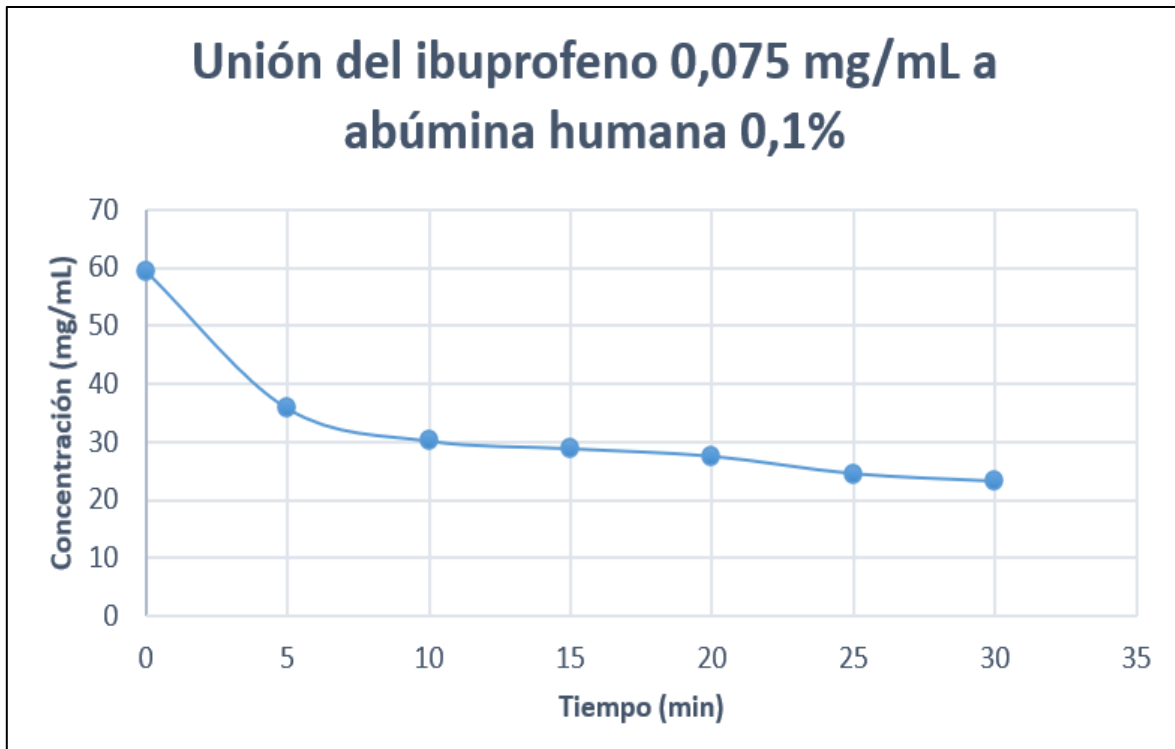
Nota: elaboración propia, 2022.

Gráfico 5. Representación de la afinidad del ibuprofeno en función de la concentración de ibuprofeno con respecto al tiempo



Nota: elaboración propia, 2022.

Gráfico 6. Representación de la afinidad del ibuprofeno en función de la concentración de ibuprofeno con respecto al tiempo



Nota: elaboración propia, 2022.

Conforme se forma el complejo ibuprofeno-albúmina la cantidad de fármaco libre disminuye y de igual modo su concentración. Esto que se visualiza es parte del último objetivo específico de esta investigación. Ya con este resultado, la siguiente etapa es evidenciar su afinidad también, a través de la determinación experimental de su constante de afinidad. Para esto se consideró la metodología reportada por Shargel¹.

Para determinar la constante de afinidad, primero se procedió a determinar los miligramos de fármaco extraído de la solución durante cada muestreo, según indica la metodología con respecto al tiempo y cantidades.

Todos esos miligramos extraídos permitieron determinar la cantidad de fármaco que iba quedando en el medio luego de cada extracción, lo cual permitió determinar la cantidad de ibuprofeno unido a la proteína; lo que, posteriormente, se transformó a moles para poder determinar la fracción de fármaco unido según lo indica la ecuación 12.

Ecuación 12. Ecuación matemática que expresa cómo determinar el comportamiento de fármacos unidos a proteínas según moles.

$$r = \frac{\text{Moles of drug bound}}{\text{Total moles of protein}}$$

Fuente: ecuación tomada de la referencia².

Al analizar las concentraciones del fármaco en su medio de disolución, y luego durante el tratamiento matemático, tratar de determinar la constante de afinidad.

Según el tratamiento matemático de los datos que se obtuvieron en los ensayos, la constante no se logró determinar, ya que se presentaron una gran serie de factores que interfirieron en la determinación. Entre estos factores están la concentración de albúmina, que por más que se diluyó, según los cálculos, sigue siendo una concentración muy grande y se necesitaría de una mayor concentración de ibuprofeno para que se una a la proteína.

Esto no quiere decir que no hay unión del fármaco a la proteína, ya que cuando se determina la fracción de fármaco unido a la proteína simplemente no se puede determinar porque la relación molar entre el ibuprofeno y la albúmina humana presenta muchas diferencias, un ejemplo es que si se hubiese disminuido la concentración de albúmina 100 veces, el intercepto que me permite despejar la constante de afinidad me hubiesen dado positivo, por lo que se necesita llegar a optimizar más los medios de disolución. En la siguiente tabla se observan los valores que se tomaron en cuenta para calcular la constante de afinidad.

Tabla 26. Variación de la concentración de ibuprofeno libre bajo condiciones de ensayos a diferentes concentraciones del fármaco

Ensayo No	Concentración inicial (mg/L)	Concentración final (mg/L)
1	20,1	20,1
2	21,4	21,3
3	25,8	24,1
4	59,4	29,9

Nota: elaboración propia, 2022.

Tabla 27. Conversión de la concentración de ibuprofeno libre inicial y final a moles

Ensayo No	Concentración inicial (mg/L)	Concentración final (mg/L)	Moles iniciales	Moles Finales	Moles unidos de Ibuprofeno
	Interpolación (mol/L)	Interpolación (mol/L)			
1	0,00009744	0,00009744	0,00001949	0,00001364	0,000005846
2	0,00010374	0,00010325	0,00002075	0,00001446	0,000006292
3	0,00012507	0,00011683	0,00002501	0,00001636	0,000008658
4	0,00028794	0,00014494	0,00005759	0,00002029	0,000037297

Nota: elaboración propia, 2022.

Tabla 28. Determinación de la fracción de albumina libre bajo y fracción de ibuprofeno unido para determinar la constante de afinidad

r	1/[D]	1/r
0,0196	10263,18	51,145
0,0210	9684,98	47,520
0,0290	8559,75	34,536
0,1247	6899,33	8,017

Nota: elaboración propia, 2022.

Tabla 29. Valores estadísticos de la fracción de albumina libre bajo y fracción de ibuprofeno unido para determinar la constante de afinidad

Coefficiente	Intercepto	Pendiente
0.9908	-80,3748	0,01306

Nota: elaboración propia, 2022.

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.

5.1. Conclusiones

- Con respecto a la unión del fármaco a la proteína se evidenció la disminución de la concentración libre de ibuprofeno al ser sometido a disolución en presencia de albúmina lo cual se evidenció mediante gráficos.
- Se visualizó que es importante la concentración tanto del fármaco, como de la proteína ya que la relación de concentraciones puede afectar tanto la cuantificación, como la determinación de la constante de afinidad
- En cuanto a la temperatura, se observó que no tuvo una influencia significativa en las concentraciones de fármaco libre en el rango de 26°C a 37°C, ya que tuvieron un comportamiento similar.
- Hay evidencia de unión del fármaco a la proteína la cual se da de manera muy rápida, sin embargo, hay evidencia de que después de los 30 minutos el fármaco se empieza a liberar del complejo fármaco-proteína.
- En los ensayos con reposición de volumen los 30 minutos el fármaco sigue disminuyendo sus concentraciones de fármaco libre en el medio, sin embargo no es tan amplia debido a que parte del fármaco sigue incrementando en el medio y a pesar de tomar alícuotas, se está reponiendo el volumen lo que diluye el fármaco en una baja proporción.

- Debe tomarse en cuenta como otro parámetro importante la relación molar, para el desarrollo de ensayos in vitro para que se permita establecer tanto sitios de unión, como la constante de afinidad.

5.2. Recomendaciones

- Realizar simulaciones *in vitro* con otro tipo de medicamentos a una misma concentración, para observar si ocurre una variación en la manera en que disminuyen las concentraciones plasmáticas.
- Se recomienda realizar las mediciones a diferentes concentraciones de fármaco, pero manteniendo las de albúmina para evitar procesos de saturación de la proteína y obtener nuevas optimizaciones de disolución.
- 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.
- Se recomienda la investigación bajo otro tipo de metodología distinta de esta, para evaluar la unión del fármaco.
- Debido a que en este trabajo de investigación no se mostraron cambios significativos en cuanto a la temperatura, se recomienda realizar mediciones en otros intervalos para identificar si hay cambios distintos a los realizados en este ensayo.
- Se insta a solicitar el aprovechamiento del desarrollo de investigaciones en otras instituciones, las cuales presentan actualmente convenios con la carrera de Farmacia, como el que se brindó en el LANOTEC.

CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sun H, Zhao H. Physiologic Distribution and Protein Binding. Shargel L, Yu A. Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics. 7a ed. Estados Unidos: Mc Graw Hill; 2016. 259-308
2. Robles Piedras A. Importancia de la farmacocinética en la práctica clínica. Educación y Salud. 2019; 8(15): 123-126
3. Márquez M, Quintanar L, Castañeda G. Caracterización espectroscópica de la unión de Docetaxel a la albúmina sérica humana. Rev. mex. cienc. Farm [Internet]. 2013 [Citado el 11 de febrero del 2022]; 44(1): 45-51. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000100006
4. Pereira Vega Z. Oferta y demanda de estudios de equivalencia terapéutica (in vitro e in vivo) de medicamentos en Costa Rica. Tecnol Marcha. 2015; 29(1): 18-27
5. Reutemann H, Formentini e. Análisis farmacocinético y administración extravascular; Errores comunes en el cálculo y la interpretación de los parámetros farmacocinéticos. Revista FAVE. 2003; 2(2): 147-160
6. Romero S, Fernández A, Costas M. Estabilidad termodinámica de proteínas. Educ Química. 2018; 20(3): 3-17
7. Martínez Martínez M. Estudio De La Unión In Vitro De La Peroxisomicina A1-Albumina. Competencia Con Otros Fármacos Acídicos [Tesis de Maestría En Ciencias con Especialidad en Química Analítica Biomédica]. Nuevo León, México: Universidad Autónoma De Nuevo León
8. Segura Campos L. Medicamentos genéricos: su importancia económica en los sistemas públicos de salud y la necesidad de estudios in vitro para establecer su bioequivalencia. Revista Pensamiento Actual. 2017; 17(28): 108-120

9. Subirán Adrados R. Bioexenciones [Licenciatura En Farmacia]. Madrid, España: Universidad Complutense De Madrid; 2018
10. Cordero M, Montero U, Murillo N. Conceptos generales sobre la albúmina humana y su utilización clínica. *Acta Med Costarric*. 1999; 28(1): 32-38
11. Cárdenas Cuadros P. Estudio de la correlación in vitro/ in vivo de la liberación de 6 - metilcumarina a partir de un sistema microparticulado [Licenciatura en Farmacia]. Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2015
12. Ozdin D. Approches et considérations innovatrices reliées à l'équivalence pharmacocinétique (PK) et pharmacodynamique (PD) des médicaments New and alternative approaches to the assessment of pharmacokinetic and pharmacodynamic equivalence [Tesis de Licenciatura en Farmacia]. Quebec, Canadá: Universidad de Montreal; 2020
13. Viruete S. Manual de conocimientos básicos de farmacología [Internet]. 1a ed. México: Universidad de Guadalajara; 2015 [Consultado el 27 de febrero del 2022].
14. Guerrero O, García P, Barrios K. Distribución. En: Viruete S. Manual de conocimientos básicos de farmacología. 1a ed. México: Universidad de Guadalajara; 2015. 75-82
15. Guerrero O, Barrios K, Cárdenas A. Biotransformación y excreción. En: Viruete S. Manual de conocimientos básicos de farmacología. 1a ed. México: Universidad de Guadalajara; 2015. 75-82
16. Bueno Alejo C. Interacciones fármaco-proteína en estados excitados [Doctorado en Tecnología Química]. Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia; 2009
17. Escobar L. Monitorización terapéutica de fármacos y aspectos prácticos de farmacocinética. *Rev Med Clin Condes*. 2016; 27(5): 605-614

18. Talevi A, Quiroga P, Ruiz M. Procesos biofarmacéuticos Su relación con el diseño de formas farmacéuticas y el éxito de la farmacoterapia [Internet]. 1a ed. Argentina: Editorial de la Universidad de la Plata; 2016 [Consultado el 13 de marzo de 2022]. Disponible en: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/109861/CONICET_Digital_Nro.992b02a9-5429-4827-a0e7-c3950be6c788_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
19. Guevara G, Verdesoto A, Castro N. Educational research methodologies (descriptive, experimental, participatory, and action research). Recimundo [Internet]. 2020 [citado el 16 de marzo del 2022]; 4(3): 163-173. Disponible en: <https://www.recimundo.com/index.php/es/article/view/860/1363>
20. Menesses L, Cuesta S. Determinación Computacional de la Afinidad y Eficiencia de Enlace de Antiinflamatorios No Esteroides Inhibidores de la Ciclooxygenasa-2. REMCB. 2015; 36(2): 17-25
21. Pérez E, Cordero J, Bastos H. Evaluación de parámetros de calidad en tabletas de ibuprofeno que se consumen en Costa Rica. Revista Pensamiento Actual [Internet]. 2020 [consultado el 18 de marzo del 2020]; 20(34): 99-144. Disponible en: <https://doi.org/10.15517/pa.v20i34.41787>
22. Urresta Núñez J. Caracterización Y Establecimiento De Bioequivalencia In Vitro En Cápsulas Blandas De Ibuprofeno De Diferentes Laboratorios Farmacéuticos En Relación Al Medicamento Innovador Buprex Flash De Laboratorios Life, En Base Del Factor F1 Y F2. [Tesis de Licenciatura en Farmacia]. Ecuador: Universidad Central Del Ecuador; 2018
23. Fernández J, Cachofeiro V, Cardinali D, Delpón E, Díaz E, Escribiche E, Juliá V, Teruel F, Pardo M. Fisiología Humana [Internet]. 5a ed. New York, McGraw Hill; 2010.

[Consultado el 26 de mayo del 2022]. Disponible en:
<https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=2987>

24. 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.
25. Hernández A, Perelló E, Campillo J, Zayas M, Aznar M, Camacho M. Estudio de utilización de albúmina en pacientes no críticos en un hospital de tercer nivel. *Rev Ofil Ilaphar*. 2021; 31(2): 155-159
26. Batluouni M. Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares, Cerebrovasculares y Renales. *Arq Bras Cardiol* [Internet]. 2010 [Citado el 13 de mayo del 2022]; 94(4): 538-546. Disponible en: <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2010000400019>
27. García J, Gómez J. Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. Elsevier [Internet]. 2000 [Citado el 2 de junio del 2022]; 27(1): 33-35. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-reumatologia-29-articulo-fisiopatologia-ciclooxigenasa-1-ciclooxigenasa-2-8546>
28. Barahona J, Monge M. Fisiopatología y seguridad del uso de aines selectivos y no selectivos: balance de riesgos. *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica* [Internet]. 2011 [Citado el 30 de mayo del 2022]; 5(1): 39-57. Disponible en: <https://doi.org/10.15517/rmu.v5i1.7862>
29. García I, Díaz S, Zorrilla J, Cortés R. Aspectos de seguridad en el tratamiento del dolor con analgésicos antiinflamatorios no esteroideos. *Rev Sanid Milit Mex* [Internet]. 2018 [Citado el 30 de mayo del 2022]; 72(5-6): 324-331. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rsm/v72n5-6/0301-696X-rsm-72-5-6-324.pdf>

30. Pérez E, Cordero J, Bastos H. Evaluación de parámetros de calidad en tabletas de ibuprofeno que se consumen en Costa Rica. *Salud y Medio Ambiente*. 2020; 20(34): 99-114
31. Rodríguez R. *Vademécum Académico de medicamentos* [Internet]. 6a ed. México, McGraw Hill; 2013. [Consultado el 12 de junio del 2022]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552§ionid=9037129>
32. Evoli S, Mobleyb D, Guzziac R, Rizzuti B. Multiple binding modes of ibuprofen in human serum albumin identified by absolute binding free energy calculations. *Phys Chem Phys*. 2016; 18(1): 32358—32368.
33. Ploch A, Pentak D, Nycz J. A Comprehensive Spectroscopic Analysis of the Ibuprofen Binding with Human Serum Albumin, Part II. *Sci Pharm*. 2021; 89(30): 1-18
34. Poveda A, García A, Pérez P. Farmacología del ibuprofeno intravenoso. *Rev Soc Esp Dolor*. 2016; 23(1): 3-12
35. Reutemann S, Formentini E. Análisis farmacocinético y administración extravascular; Errores comunes en el cálculo y la interpretación de los parámetros farmacocinéticos. *Rev Fac Cien Vet*. 2003; 2(2): 147-160
36. Mora Agüero K. Fármaco libre en plasma debido a su afinidad a proteína plasmática; una simulación in vitro del desplazamiento [Tesis de licenciatura en Farmacia]. San José, Costa Rica: Universidad Internacional de las Américas; 2018
37. Bendezu M, Laos D, Palomino J, Panay J. Perfil de Dissolução dos comprimidos de ibuprofeno com problemas de bioequivalência em meio biorelevante formado por Lauril sulfato de sódio. *Braz J Med Biol* [Internet]. 2021 [Consultado el 01 de junio del 2022];

- 4(3): 10662-10675. Disponible en:
<https://www.brazilianjournals.com/index.php/BJHR/article/viewFile/29870/23549>
38. Costas Basín M. CALOR Y PROTEÍNAS. RDU UNAM [Internet]. 2015 [consultado el 2 de junio del 2022]; 16(1): 2-11. Disponible en:
<http://www.revista.unam.mx/vol.16/num1/art02/art02.pdf>
39. Skoog D, West D, Holler F, Crouch S. Fundamentos de química analítica. 9a ed. Boston: Brooks/Cole; 2014.
40. Aristizábal R, Calvo F, Valencia L, Montoya M, Barbosa O, Hincapié V. Equilibrio ácido-base: el mejor enfoque clínico. Rev Colomb Anestesiol [Internet]. 2015 [Consultado el 12 de julio de 2022]; 43(3): 219-224. Disponible en:
<https://doi.org/10.1016/j.rca.2015.04.001>
41. Barcia E, Negro S. Fundamentos de las interacciones farmacocinéticas. An R Acad Farm [Internet]. 2002 [Consultado el 15 de julio del 2022]; 68(2): 265-305. Disponible en:
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/ibc-23758?lang=es>
42. Barrett K, Barman S, Boitano S, Brooks H. Ganong de Fisiología Médica. 24a ed. España. McGraw Hill; 2012
43. Rodwell V, Bender D, Botham K, Kennlly P, Weil P. Harper Bioquímica Ilustrada. 30a ed. México: McGraw Hill; 2015
44. Brunton L, Hilal R, Knollmam P. Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 13a ed. México; 2018