

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

ESCUELA DE FARMACIA

**“SIMULACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO QUE TIENE LA
UNIÓN A PROTEÍNA EN PLASMA SOBRE EL
VOLUMEN DE DISTRIBUCIÓN APARENTE, DE LA
WARFARINA Y EL KETOPROFENO”**

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

PAULA MARÍA GÓMEZ ROMERO

TUTOR: ADAM AMEY WILLIAMS

SAN JOSÉ, NOVIEMBRE, 2018

Dedicatoria

Este trabajo de graduación va dedicado primeramente a Dios por la fuerza brindada para culminar este proceso, por guiar mis pasos y protegerme a cada momento.

A mi madre Flor, por ser el pilar de mi vida, ya que sin ella no hubiera logrado culminar este proceso que ha sido gracias a Dios y su fuerza. Te dedico este trabajo por el esfuerzo que hiciste para darme la mejor de las herencias que es mi educación.

Agradecimiento

En primer lugar le agradezco a Dios por permitirme creer en mí misma y darme la oportunidad de finalizar una meta de muchas; gracias por el amor y la misericordia que ha mostrado durante mi vida.

A mi madre Flor, que ha sido una mujer valiente, que ha luchado por sacar adelante sola a sus hijos, por eso este triunfo es de ambas; gracias por ser mi pilar, gracias por ser mi apoyo incondicional, por su confianza en mí y sobre todo por su amor constante. No tengo como agradecerle por todo lo que me ha dado y por ayudarme a cumplir una meta más.

A mi hermano Luis Alejandro que aunque discutimos por nuestras diferencias ha sido un gran apoyo en mi vida, gracias por las muestras de amor, eres una gran bendición en mi vida.

Quiero agradecer a mi Tita Esther y a mi Tito Luis que me han acompañado en cada minuto de mi vida. Gracias por darme el amor más grande y puro que he vivido, por guiarme, cuidarme, consentirme y sobre todo por su amor sin límites. A mis tíos por su amor, su apoyo incondicional, por cuidarme todos los días y estar conmigo siempre que los necesito.

También a mi tutor Lic. Adam Amey Williams por todo su apoyo durante este proyecto, por su paciencia y por estar dispuesto a brindar su tiempo en este proyecto de investigación.

Quiero agradecer a todos los que me brindaron un apoyo para sacar mi proyecto adelante, ayudándome a conseguir los fármacos que me hacían faltan para terminar mi trabajo de graduación.

A mis amigos, que Dios puso en mi camino para apoyarme en este proceso y por ser una gran compañía en este largo camino. Las vivencias tanto dentro y fuera de las aulas que me hicieron crecer como persona.

Por último, agradezco a todos los que me acompañaron en el laboratorio, en especial a Raxel, a Davis y a Yendri, gracias por su apoyo, compañía y paciencia; gracias por los desayunos y almuerzos que compartimos, así como ser buenos escuchando en los momentos de frustración.

Contenidos

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	13
Planteamiento del problema	13
Hipótesis.....	14
Objetivo General.....	14
Objetivos Específicos	14
Justificación	15
Antecedentes	16
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	21
Biofarmacia	21
Farmacocinética	21
Liberación	23
Absorción	24
Biodisponibilidad.	27
Distribución	29
Metabolismo	33
Metabolismo hepático.....	33
Metabolismo extrahepático.....	34
Excreción	34
Excreción renal.....	35
Excreción biliar.	36
Excreción salival.....	37
Excreción pulmonar.....	37
Excreción láctea o mamaria.....	38
Volumen de Distribución.....	39
Curva de niveles plasmáticos	42
Modelos Farmacocinéticos	44

Modelo monocompartimental.....	44
Modelo monocompartimental intravenoso.....	45
Proteínas plasmáticas	46
Tipos de proteínas plasmáticas	47
Albúmina.	47
Alfa 1- glicoproteína ácida.	49
Lipoproteínas.....	49
Afinidad a proteínas plasmáticas	49
Unión a proteínas	50
Sitio de unión	53
Unión fármaco-proteína	55
Fármaco libre	58
Desplazamiento de fármacos.....	59
Warfarina	60
Mecanismo de acción	61
Farmacocinética del fármaco.....	61
Indicaciones	62
Interacciones.....	63
Contraindicaciones	64
Advertencias para el paciente	64
Antiinflamatorios no esteroideos	65
Derivados del ácido propiónico.....	65
Ketoprofeno.	66
Mecanismo de acción	67
Farmacocinética del fármaco.....	67
Indicaciones	67
Interacciones.....	68
Contraindicaciones	68
Advertencias al paciente.....	68

Simulación <i>In vitro</i>	68
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	70
Enfoque	70
Método	70
Instrumentos.....	70
Preparación de la solución de buffer de fosfatos a pH 7,4	71
Equipo	71
Reactivos	71
Procedimiento.....	71
Preparación de Curva de Calibración para la Albúmina Sérica Humana.....	72
Equipo	72
Reactivos	72
Procedimiento.....	72
Preparación de la disolución madre de albúmina sérica humana (HSA).....	72
Preparación de la curva de calibración de la albúmina sérica humana.	73
Curva de Calibración	74
Equipo	74
Reactivos	74
Procedimiento.....	75
Preparación estándar madre de Ketoprofeno.....	75
Preparación de la curva de calibración de ketoprofeno.....	75
Curva de Calibración de la Warfarina	76
Preparación de la curva de calibración de warfarina.	77
Optimización de las Concentraciones de los Fármacos.....	78
Procedimiento.....	78
Preparación de la disolución de albúmina al 0.1%.....	78
Realización experimental, sistema sin eliminación.	79
Modelo para Simulación de la Unión de Fármacos a Proteína Plasmática.....	79

Equipo	79
Reactivos	80
Procedimiento.....	80
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS	87
Optimización del medio de disolución a emplear.....	87
Curva de calibración.....	88
Optimización de la concentración de albúmina	92
Verificación de la unión de la albúmina al fármaco	93
Modelo para Simulación de la Unión de Fármacos a Proteína Plasmática	99
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES.....	111
Recomendaciones	112
CAPÍTULO VI. PROPUESTA.....	113
Fundamento teórico	113
Volumen de distribución	115
Modelo monocompartimental intravenoso.....	115
Proteínas plasmáticas	116
Albúmina	116
Unión a proteínas	117
Sitio de unión	117
Unión fármaco-proteína	117
Fármaco libre	118
Desplazamiento de fármacos.....	118
Warfarina	118
Ketoprofeno	119
Simulación <i>in vitro</i>	119
Parte experimental.....	120
Preparación de la solución de buffer de fosfatos a pH 7,4	120
Equipo	120

Reactivos	120
Procedimiento.....	120
Curva de Calibración	121
Equipo	121
Reactivos	121
Procedimiento.....	121
Preparación estándar madre de Ketoprofeno.....	121
Preparación de la curva de calibración de ketoprofeno.....	122
Curva de Calibración de la Warfarina	123
Preparación de la curva de calibración de warfarina.	123
Preparación de la disolución de albúmina al 0.1%.....	124
Modelo para Simulación de la Unión de Fármacos a Proteína Plasmática.....	124
Equipo	124
Reactivos	125
Procedimiento.....	125
Referencias.....	128

Figuras

Figura 1. Representación de la Liberación al Administrar una Forma Farmacéutica Sólida	24
Figura 2. Representación de los Diferentes Mecanismos de Transporte del Proceso de Absorción	27
Figura 3. Curvas Farmacocinéticas tras la Administración de un Mismo Fármaco a Igual Dosis por Vía Oral, Intramuscular y Subcutánea.....	29
Figura 4. Distribución del Agua Corporal en un Adulto de 70 kg de Peso	32
Figura 5. Esquema del Proceso del Ciclo Enterohepático.....	37
Figura 6. Esquema de los Procesos Farmacocinéticos.....	39
Figura 7. Curva de Niveles Plasmáticos Después de la Administración Oral de un Fármaco	44
Figura 8. Representación Básica del Modelo Monocompartimental Intravenoso.....	46
Figura 9. Molécula de la Albúmina Humana	48
Figura 10. Distribución de un Fármaco en el Torrente Circulatorio.....	52
Figura 11. Estructura de la Albúmina Sérica Humana.....	53
Figura 12. Transporte de Medicamentos.....	58
Figura 13. Estructura de la Warfarina	61
Figura 14. Estructuras Químicas de los Derivados del Ácido Propiónico.....	66
Figura 15. Estructura del Ketoprofeno.....	67
Figura 16. Alunorm® 20%	74
Figura 17. Balones utilizados en la curva de calibración del Ketoprofeno.....	76
Figura 18. Balones utilizados en la curva de calibración de la Warfarina.....	78
Figura 19. Ejemplo del Ensamblaje del Equipo.....	81
Figura 20. Sistema <i>in vitro</i> del Ketoprofeno en Solución Buffer de Fosfatos a pH 7,4.....	82
Figura 21. Sistema <i>in vitro</i> del Ketoprofeno en Solución de Albúmina al 0,1%	83
Figura 22. Sistema <i>in vitro</i> de la Warfarina en Solución Buffer de Fosfatos a pH 7,4	84
Figura 23. Sistema <i>in vitro</i> de la Warfarina en Solución de Albúmina al 0,1%.....	85

Figura 24. Sistema <i>in vitro</i> de la Warfarina con Ketoprofeno en Solución de Albúmina al 0,1%.....	86
Figura 25. Estándares de Referencia utilizados de Ketoprofeno (Profenid®) y Warfarina	88
Figura 26. Representación de la Absorbancia en Función de la Concentración de Ketoprofeno Obtenida en la Curva de Calibración.....	90
Figura 27. Representación de la Absorbancia en Función de la Concentración de Warfarina Obtenida en la Curva de Calibración	92
Figura 28. Comportamiento de la Concentración del Ketoprofeno en Función del Tiempo en la Solución Buffer de Fosfatos a pH 7,4 en Sistema sin Eliminación	94
Figura 29. Comportamiento de la Concentración del Ketoprofeno Libre en Función del Tiempo en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema sin Eliminación.....	95
Figura 30. Comportamiento de la Concentración de Warfarina en Función del Tiempo en la Solución Buffer de Fosfatos a pH 7,4 en Sistema sin Eliminación	97
Figura 31. Comportamiento de la Concentración de Warfarina Libre en Función del Tiempo en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema sin Eliminación.....	98
Figura 32. Medicamentos utilización de la simulación.....	99
Figura 33. Comportamiento de la Concentración del Ketoprofeno en Función del Tiempo en la Solución Buffer de Fosfatos a pH 7,4 en Sistema con Eliminación	101
Figura 34. Comportamiento de la Concentración del Ketoprofeno Libre en Función del Tiempo en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema con Eliminación	103
Figura 35. Comportamiento de la Concentración de Warfarina en Función del Tiempo en la Solución Buffer de Fosfatos a pH 7,4 en Sistema con Eliminación	105
Figura 36. Comportamiento de la Concentración de Warfarina Libre en Función del Tiempo en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema con Eliminación	107
Figura 37. Comportamiento la Concentración Libre de la Warfarina y el Ketoprofeno en Función del Tiempo en la Solución de Albúmina al 0,1%, sistema con eliminación.....	109
Figura 38. Esquema de los Procesos Farmacocinéticos.....	114
Figura 39. Representación Básica del Modelo Monocompartimental Intravenoso.....	115
Figura 40. Ejemplo del Ensamblaje del Equipo.....	125

Tablas

Tabla 1. Vías de Administración de los Fármacos y Lugares de Absorción Correspondientes	25
Tabla 2. Principales Proteínas Plasmáticas que Intervienen en la Fijación de Fármacos	47
Tabla 3. Sitio de Unión de Fármacos Ácidos a la Albúmina.....	54
Tabla 4. Grados de Unión a las Proteínas del Plasma de Algunos Fármacos	56
Tabla 5. Resultados Obtenidos para la Curva de Calibración del Ketoprofeno	89
Tabla 6. Resultados Estadísticos de la Curva de Calibración del Ketoprofeno.....	89
Tabla 7. Resultados Obtenidos para la Curva de Calibración Obtenida para la Warfarina	91
Tabla 8. Resultados Estadísticos de la Curva de Calibración de la Warfarina	91
Tabla 9. Optimización de la Concentración de Albúmina	92
Tabla 10. Determinación de las Concentraciones del Ketoprofeno con la Solución Buffer de Fosfatos de pH 7,4 en Sistema sin Eliminación	93
Tabla 11. Determinación de las Concentraciones del Ketoprofeno Libre en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema sin Eliminación	95
Tabla 12. Determinación de las Concentraciones de la Warfarina con Solución Buffer de Fosfatos a pH 7,4 en Sistema sin Eliminación	96
Tabla 13. Determinación de las Concentraciones de Warfarina Libre en Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema sin Eliminación	98
Tabla 14. Sistema <i>in vitro</i> para Determinar la Concentración del Ketoprofeno con la Solución Buffer de Fosfatos de pH 7,4 en Sistema con Eliminación	100
Tabla 15. Sistema <i>in vitro</i> para Determinar la Concentración del Ketoprofeno Libre en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema con Eliminación.....	102
Tabla 16. Sistema <i>in vitro</i> para Determinar la Concentración de Warfarina con la Solución Buffer de Fosfatos de pH 7,4 en Sistema con Eliminación	104
Tabla 17. Sistema <i>in vitro</i> para Determinar la Concentración de Warfarina Libre en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema con Eliminación.....	106

Tabla 18. Sistema <i>in vitro</i> para Determinar la Concentración Libre del Uso Conjunto de Warfarina y Ketoprofeno en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema con Eliminación	108
Tabla 19. Volumen de Distribución en los Dos Disolventes Utilizados	110

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

Durante varios años se ha dado a conocer el comportamiento tanto farmacocinético como farmacodinámico en los seres vivos, los cuales ayudan a un mejor efecto terapéutico, por lo que, es de suma importancia la creación de prácticas de laboratorio que faciliten la observación de los distintos procesos del fármaco, ya que, en cada individuo se comporta de manera diferente.

Todo fármaco que entra al torrente sanguíneo se une a alguna proteína plasmática, siendo la albúmina sérica humana la más abundante en plasma, lo que representa alrededor de un 60% del total de las proteínas plasmáticas, por lo que, la mayoría de fármacos se une a esta proteína, pero esta unión es reversible, ya que, el fármaco unido pierde su actividad farmacológica (Bi, Yan, Sun y Zhang, 2011, p. 410).

En la práctica es importante conocer cómo se comporta el fármaco, por la capacidad que tiene de interactuar con otros fármacos, donde las interacciones farmacológicas se deben a la unión a proteínas, debido a que solo la fracción libre es biológicamente activa, lo que produce que se afecte tanto la distribución como el metabolismo del fármaco (Yurgaky y Rodríguez, 2009, p. 107).

Entender cómo se ve afectada la respuesta de los fármacos administrados de manera conjunta, es importante. Como por ejemplo, la posibilidad de mantener un adecuado control del efecto anticoagulante es baja, por la unión a proteínas y la variación en el volumen de distribución aparente, y, por ende, es primordial vigilar la salud de las personas en estos casos (Quintero, 2010, p. 271).

Mencionado lo anterior, la interacción entre fármacos puede ocasionar problemas en cuanto a la farmacoterapia, por lo que, conocer el mecanismo de acción de los fármacos que son

usados de forma concomitante es de suma importancia, para así disminuir estas interacciones y poder definir una estrategia más efectiva y segura para el paciente.

La investigación pretende diseñar una práctica de laboratorio que permita una mejor comprensión y visualización de los conceptos analizados a lo largo de la carrera de Farmacia, mediante el análisis *in vitro* de la administración de warfarina y ketoprofeno de forma concomitante, ya que, el comportamiento de los fármacos en el cuerpo humano varía en relación con cada organismo.

Para lograr solucionar la problemática de no contar con una manera fácil de ver, a nivel experimental, lo que se aprende en diversos cursos a lo largo de la carrera, surge la iniciativa de poder crear un sistema de simulación *in vitro* que fortalezca los conocimientos adquiridos durante la formación profesional, para lo cual se plantea la siguiente interrogante:

¿Es posible demostrar mediante un sistema *in vitro* el efecto que tiene la unión de fármaco a proteínas sobre el parámetro farmacocinético de volumen de distribución aparente?

Hipótesis

Es posible simular, a nivel *in vitro*, el efecto que tiene la unión de fármaco a proteína sobre el volumen de distribución.

Objetivo General

Facilitar la visualización del efecto que presenta la unión de fármacos a la proteína del plasma sobre el volumen de distribución aparente, a través de una simulación *in vitro*, empleando warfarina y ketoprofeno.

Objetivos Específicos

Diseñar un sistema *in vitro* para la simulación de la unión del fármaco a proteína plasmática.

Demostrar, a través de la medición de la concentración de fármaco libre, el efecto que tiene la unión a proteína plasmática sobre sus niveles en sangre.

Mostrar a nivel *in vitro* el efecto que tiene la unión a proteína del plasma sobre el volumen de distribución del fármaco.

Justificación

Esta investigación puede facilitar la visualización, sobre la unión a proteínas y la variación en el volumen de distribución, que presentan los fármacos empleados de forma concomitante. Con esto, comprender mejor los conceptos vistos en farmacocinética, con el fin de explicar la interacción entre el fármaco y la albúmina sérica humana, debido que esta última es la mejor elección para estudios cinéticos y termodinámicos *in vitro* sobre unión a proteínas (Esmaeilzadeh, Valizadeh y Zakeri, 2016, p. 982).

Con los resultados se pretende que tanto el profesional en salud como el estudiante de la carrera de Farmacia logre visualizar con mayor facilidad y de forma experimental lo estudiado en cursos de farmacocinética. Esto permite tomarlos en cuenta al realizar recomendaciones terapéuticas porque la unión a proteínas es un determinante importante, ya que, solo la fracción libre es biológicamente activa (Yurgaky y Rodríguez, 2009, p. 107).

Estudiar la unión a proteínas y cómo afecta el volumen de distribución al administrar algún medicamento permite determinar la dosis exacta que se debe emplear. Para obtener esta información es necesario realizar un análisis de las variantes al usar dos fármacos de forma conjunta, como la warfarina y el ketoprofeno, ya que, si el fármaco es capaz de unirse a la albúmina y desplazar a la warfarina de la misma, lo cual potencia el efecto anticoagulante (Yurgaky y Rodríguez, 2009, p. 108).

En distintos cursos de la carrera, se desarrollan temas a nivel teórico que no se pueden apreciar a nivel práctico, por lo que, se pretenden desarrollar prácticas de laboratorio como apoyo a la parte teórica, con la finalidad de poder ejemplificar, de una forma experimental, los conceptos vistos en los cursos teóricos, para así tener profesionales con mayor conocimiento.

Este proyecto pretende desarrollar un modelo que permita ilustrar el comportamiento de los fármacos en el cuerpo humano, simulando, de manera *in vitro*, la administración de dos fármacos de forma conjunta. Con esto se intenta mejorar la comprensión de los conceptos de los diferentes parámetros farmacocinéticos, y permitir un mejor aprovechamiento de los cursos impartidos por la universidad.

El presente proyecto tiene como finalidad generar información que propicie proyectos relacionados con el tema, principalmente a nivel nacional, así como implementar una práctica que demuestre los efectos sobre los distintos parámetros farmacocinéticos.

Antecedentes

Para la recopilación de la información necesaria para antecedentes se revisaron distintas bases de datos como Google Scholar, Redalyc, Scielo, entre otras, con el fin de fundamentar esta investigación; a continuación se analizan los artículos encontrados a nivel internacional.

Durante varias décadas la warfarina fue el único anticoagulante oral. El nombre viene del acrónimo WARF, que significa Wisconsin Alumni Research Foundation. En 1941, Link, Campbell y un grupo de químicos de la Universidad de Wisconsin investigaron acerca del trébol dulce que generaba hemorragias en el ganado; este contenía un principio llamado *dicumarol*. Por lo cual, comenzaron a desarrollar anticoagulantes sintéticos más potentes basados en la estructura molecular del dicumarol, con el fin de utilizarlos como un veneno contra los roedores, hasta que en 1948 obtuvieron la warfarina (Quintero, 2010, p. 270).

En 1967, en los Laboratorios RhBne-PoulencResearch se sintetizó por primera vez el ketoprofeno, tres años posteriores a la creación del prototipo del ibuprofeno. En 1973 se aprobó, en Francia y en Reino Unido, su uso clínico, como un fármaco antiinflamatorio no esteroideo perteneciente al grupo derivado del ácido propiónico, siendo uno de los más potentes. En 1986, en Estados Unidos se demostró la seguridad y efectividad de las cápsulas de ketoprofeno en el tratamiento de la osteoartritis y la artritis reumatoide (Thomas y Kantor, 1986, p. 93).

Fehske, Müller y Wollert (1981) publicaron el artículo “The location of drug binding sites in human serum albumin” (“La ubicación de los sitios de unión del fármaco en la albúmina sérica humana”); ellos mencionan que se investigó por primera vez la albúmina sérica en 1947, por Goldstein. En 1954, Scatchard creó cinco preguntas fundamentales, con el fin de mencionar la importancia de la unión a proteínas plasmáticas para la distribución y actividad farmacológica. Sin embargo, no fue hasta 1975 que se conoció la estructura primaria completa de la albúmina sérica humana, que consiste de una sola cadena peptídica.

Según Wagner (1983), la *farmacocinética* se define como el estudio de las velocidades de cambio de la concentración de fármaco en los fluidos biológicos, tejidos y excretas, así como también el de la respuesta farmacológica y la construcción de modelos adecuados para la interpretación de tales datos (p. 2).

En el 2009, Deeb, Rosales, Gómez, Garduño y Correa publicaron en Biopolímeros un artículo titulado “Exploration of Human Serum Albumin Binding Sites by Docking and Molecular Dynamics Flexible Ligand-Protein Interactions” (“Exploración de los sitios de unión a la albúmina sérica humana por acoplamiento y dinámica molecular de interacciones ligando-proteína flexibles”). El objetivo fue la realización de simulaciones de dinámica molecular en albúmina sérica humana, para el estudio de características conformacionales de sus sitios de unión a ligando primario. Se utilizó un acoplamiento ciego, para explorar la afinidad de unión albúmina sérica humana. Los resultados muestran que en las simulaciones de dinámica molecular existe una flexibilidad considerable para la proteína, y proporciona evidencia de que los sitios de unión a la albúmina sérica humana I y II interactúan con la warfarina y el ketoprofeno. En las

conclusiones se resalta que los movimientos de la albúmina sérica humana juegan un papel importante en el reconocimiento de drogas.

Bi, Yang, Sun y Zhang, en el 2011, publicaron, en *Spectrochimica Acta Part A*, un artículo llamado “Investigation of ketoprofen binding to human serum albumin by spectral methods” (“Investigación de la unión del ketoprofeno a la albúmina sérica humana por métodos espectroscópicos”). El objetivo principal fue investigar la interacción del ketoprofeno con la albúmina sérica humana *in vitro*, utilizando los métodos de extinción de fluorescencia y UV. Los resultados indican que la intensidad de fluorescencia disminuye conforme va aumentando la concentración de Ketoprofeno. La principal conclusión es que la albúmina sérica humana actúa como un portador que ayuda a que el fármaco tenga un fácil acceso a la región afectada.

Otro artículo, en el que se menciona la unión del fármaco a la proteína del plasma, se publicó en el *Journal Of Biochemical And Molecular Toxicology* en 2014; el trabajo fue llamado “Insights into *in vitro* binding of Parecoxib to human serum albumin by spectroscopic methods” (“Información sobre la unión *in vitro* de Parecoxib a la albúmina sérica humana a través de métodos espectroscópicos”), el cual fue desarrollado por Shang, Liu, Gao, Zhu y Liu y otros colaboradores. En su trabajo mencionaron, como objetivo, investigar las interacciones del Parecoxib con albúmina sérica humana bajo condiciones fisiológicas simuladas; mediante el uso de fluorescencia, dicroísmo circular, infrarrojo con transformada de Fourier, tridimensional, espectroscopía de fluorescencia y acoplamiento molecular de técnicas, obteniendo, como resultado, que la unión del Parecoxib a la albúmina sérica humana llevó a cambios conformacionales en la proteína, por lo que el sitio de unión del Parecoxib en la albúmina sérica humana es la cavidad hidrofóbica de esta última. En conclusión, el Parecoxib se une espontáneamente con albúmina sérica humana a través de las fuerzas de Waals.

Al año siguiente se publicó, en *J. Pharm.Biomed. Anal.* (2015), el artículo “Characterization of the species dependent ketoprofen/albumin binding modes by induced CD spectroscopy and TD-DFT calculations” (“Caracterización de los tipos de unión de las especies dependientes ketoprofeno/albúmina mediante dicroísmo circular inducido y cálculos TD-DFT”),

realizado por Tedesco, Pistolozzi, Zanasi y Bertucci, donde se investigó acerca de los tipos de enlace dependientes del ketoprofeno a las albúminas séricas; se efectuó mediante espectroscopia de dicroísmo circular inducido y cálculos mecánicos basados en su formulación dependiente del tiempo. El resultado más relevante fue que, con el medicamento, unido a la albúmina sérica humana o a la albúmina sérica de rata, se observan distintas conformaciones, lo cual indica que la unión es dependiente de la especie. Como conclusión, la elucidación estructural favorece una mejor comprensión de los cambios en la farmacocinética y farmacodinámica.

En el 2016, los autores Esmaeilzadeh, Valizadeh y Zakeri publicaron, en *Pharm Dev Technol*, un artículo llamado “The effects of pH, temperature and protein concentration on the *in vitro* binding of flutamide to human serum albumin” (“Los efectos del pH, la temperatura y la concentración de proteínas en la unión *in vitro* de la flutamida a la albúmina sérica humana”). Se plantearon, como objetivo, investigar la cinética, termodinámica y cambios de pH de la unión de flutamida y albúmina sérica humana. Se realizó, mediante un método de ultrafiltración modificada, para la determinación precisa de los parámetros de flutamida y albúmina sérica, obteniendo, como resultado, que los parámetros cinéticos se ven afectados por la temperatura, pH y concentración de albúmina; también que la unión entre la flutamida y la albúmina sérica humana se da de forma espontánea. La conclusión principal fue que la unión de flutamida y albúmina sérica humana se vio afectada por el pH, temperatura y el porcentaje de albúmina utilizado.

Yamasaki, Sato, Minagoshi, Kyubun, Anraku, entre otros, en el 2017 publicaron, en *Biol. Pharm. Bull*, un artículo llamado “The Binding of Silibinin, the Main Constituent of Silymarin, to Site I on Human Serum Albumin” (“La unión de Silibinina, el constituyente principal de silimarina, al sitio I en la albúmina sérica humana”). Este trabajo tuvo como objetivo informar sobre la unión de silibinina a las proteínas plasmáticas; el método fue realizado mediante análisis termodinámicos y experimentos de desplazamiento mutuo, utilizando ligandos que se unen principalmente a los sitios I y II, y el principal resultado es que la silibinina se une estrecha y selectivamente al sitio I. Como conclusión, la evidencia obtenida indica que la silibinina se une al sitio I de la HSA con ayuda de múltiples fuerzas, y puede desplazar a los fármacos del sitio I; por ejemplo, warfarina o ibuprofeno.

Para el establecimiento de lo realizado en torno al tema de investigación en Costa Rica, se visitaron las universidades nacionales, tanto públicas como privadas, que imparten la carrera de Farmacia (Universidad Internacional de las Américas, Universidad de Iberoamérica, Universidad de Ciencias Médicas, Universidad Latina y Universidad de Costa Rica) para recolectar información, pero no se logró encontrar documentados relacionados con el tema. Sin embargo, en la Universidad Internacional de las Américas se obtuvieron tesis sobre simulación *in vitro* en farmacocinética.

Marín, en su tesis presentada en el 2010, en Costa Rica. en la Universidad Internacional de las Américas, llamada “Establecimiento de Ensayos *In Vitro*, para el Laboratorio de Farmacocinética, que simulen los Modelos Extravasales: Monocompartimental con y sin Periodo de Latencia y Bicompartimental en la Universidad Internacional de las Américas”, mencionó, como objetivo principal, diseñar ensayos *in vitro* que permitieran representar la administración extravasal mono y bicompartimental, con y sin periodo de latencia, utilizando un método de modelo extravasal monocompartimental, administrando solución de azul de bromotimol e inyectable de Cianocobalamina, obteniendo, como resultado, que independientemente del fármaco empleado, se conseguía la curva esperada. Como conclusión, al emplear cianocobalamina o azul de bromotimol en los modelos extravasales, se obtiene el mismo resultado.

En el 2014, Calderón presentó la tesis nombrada “Implementación de una práctica de laboratorio para el curso del laboratorio de farmacocinética que simule de forma *in vitro* una administración extravasal por vía oral de un fármaco disuelto con comportamiento monocompartimental.” El crear un modelo que contribuye a la demostración farmacocinética de una administración extravasal por vía oral, fue el principal objetivo planteado, utilizando un modelo monocompartimental, obteniendo, como resultado, la morfología de la curva esperada, siendo ajustable para los requerimientos de cualquier laboratorio o fármaco. En conclusión, se obtuvo que la curva de niveles plasmáticos con el nuevo modelo monocompartimental son similares a los de la literatura.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

En el presente capítulo se desarrollará la base teórica para la elaboración de este trabajo, donde se describirán conceptos básicos y procedimientos para comprender los pilares importantes dentro de la investigación a realizar.

Biofarmacia

Se define como “una disciplina que aborda la relación existente entre las propiedades fisicoquímicas del fármaco, la forma farmacéutica y la vía de administración en la velocidad y cantidad de fármaco absorbido”. Esta ciencia también garantiza una correcta biodisponibilidad o cantidad de fármaco inalterado, que llega a la sangre o sitio de acción después de un tiempo establecido (Jung, 2013, pp. 5-6).

Wagner (como se cita en Doménech, Martínez y Peraire, 2013) define a la *Biofarmacia* como una disciplina que describe la variabilidad de las respuestas terapéuticas en función del medicamento, de forma cuantitativa. Se podría decir que la Biofarmacia es la encargada del estudio de los procesos de incorporación y de los factores que lo condicionan (p. 38).

Rabasco (2002) menciona que la biofarmacia estudia la influencia de la formulación y la técnica de elaboración de un medicamento sobre su actividad terapéutica. Donde se consideran los efectos de la forma de dosificación sobre la respuesta biológica y los factores que pueden afectar al principio activo y a la forma farmacéutica que lo incluye (p.29).

Farmacocinética

Wagner (como se cita en Doménech, Martínez y Peraire, 2013) define la *Farmacocinética* como “el estudio caracterización de la evolución temporal de los fármacos y sus metabolitos en los diferentes fluidos, tejidos y emuntorios del organismo, así como de la evolución de la

respuesta farmacológica y la construcción de modelos adecuados para interpretar los datos obtenidos” (p. 35).

La farmacocinética clínica se define como “la aplicación de principios de la farmacocinética en el uso racional y seguro del medicamento en el paciente”. Con base en esto se pretende resolver problemas terapéuticos como la individualización de la posología, la detección y control de interacciones, los problemas de medicamento, especialmente el incumplimiento en pacientes crónicos, las alteraciones en la biodisponibilidad por los cambios en la forma farmacéutica o en la vía de administración, la resistencia al tratamiento, problemas de toxicidad, entre otras (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 37).

La farmacocinética estudia el paso de los fármacos en el organismo, y permite conocer su concentración en la biofase. Esta última es el medio en el cual un fármaco se encuentra disponible para interactuar con los receptores y, así, ejercer su efecto biológico. Un fármaco libre desde su formulación farmacéutica condiciona la concentración que se pueda alcanzar en la biofase, y así varía el tiempo (Velázquez, 2008, p. 13).

Hernández (2014) menciona que la farmacocinética es una ciencia de carácter multidisciplinario cuyo principal objetivo es la individualización, posológica u optimización de los tratamientos farmacológicos, con el fin de alcanzar la máxima eficacia terapéutica con una baja incidencia de efectos secundarios (p. 81).

Además, habla de que la farmacocinética analiza qué le ocurre al principio activo desde el momento en que ingresa al organismo hasta que es eliminado, siguiendo los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo y excreción (LADME).

Actualmente, la farmacocinética es entendida como el campo de la ciencia que se enfoca en el estudio de la trayectoria de cualquier sustancia, después de su administración, en organismos vivos. Involucra el estudio de la cinética de absorción, distribución, metabolismo y excreción de la droga (Hedaya, 2012).

En el 2014 se describió *LADME* de la siguiente manera: la liberación es a partir de la forma farmacéutica; la absorción es el acceso que tiene el fármaco inalterado a la circulación sistémica; la distribución corresponde a los distintos lugares a los que llega el fármaco; el metabolismo es la biotransformación de la molécula original y, por último, la eliminación es la excreción del fármaco por cualquier vía, ya sea renal, biliar, salivar, entre otras (Goodman, Gilman, Hardman y Limbird, pp. 3-6).

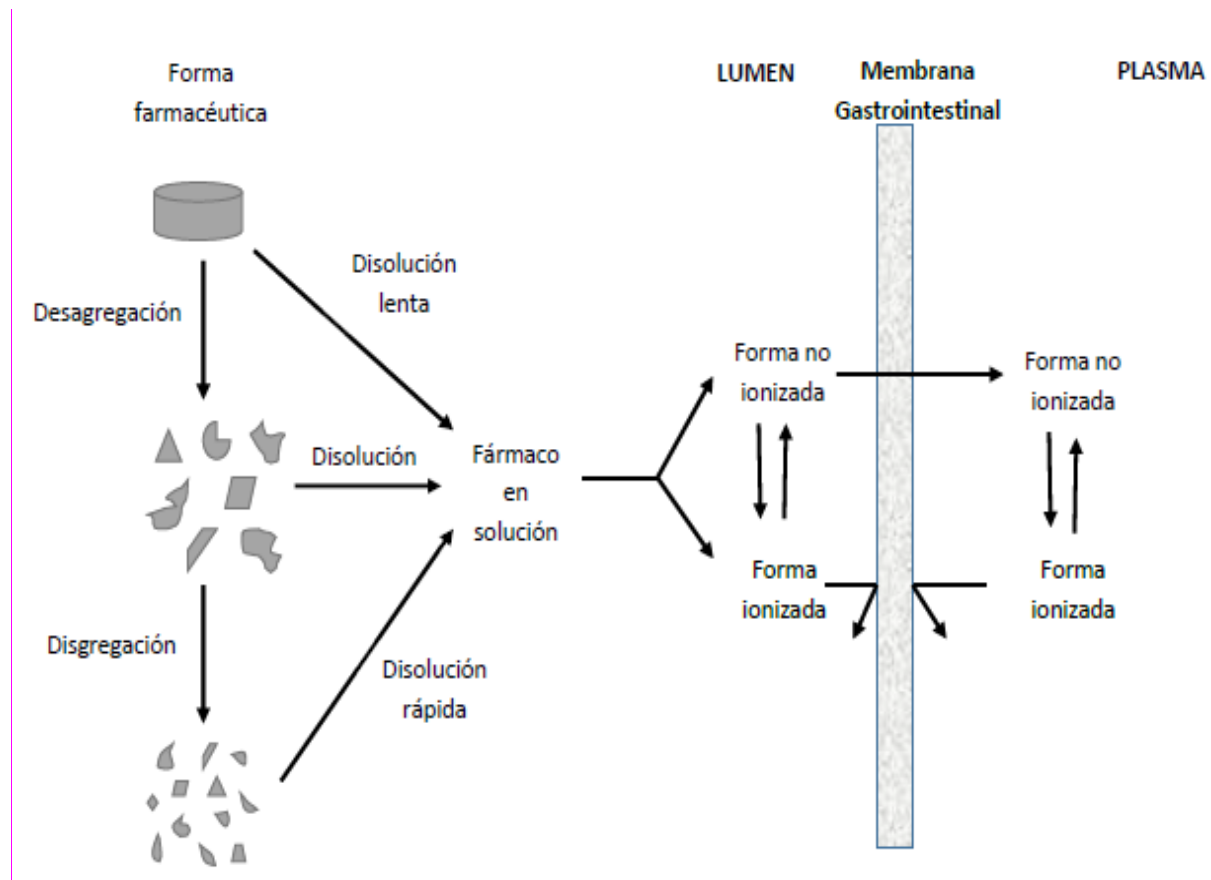
En las etapas de *LADME*, la liberación y absorción son secuenciales; una vez incorporado el fármaco a la circulación sistémica se inician las etapas posteriores como la distribución, el metabolismo y la excreción. El metabolismo y la excreción constituyen las potenciales rutas de eliminación de los fármacos. Por último, los procesos de distribución y eliminación de los fármacos se producen de forma simultánea (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 41).

Liberación

El medicamento es una reserva donde se encuentra contenido el principio activo para poder ser administrado. La liberación depende de la forma farmacéutica del medicamento y de la vía de administración; de acuerdo con esto varía, para saber cuán complejo, rápido y completo ocurre este proceso. Para que la liberación suceda, debe encontrarse bajo condiciones biológicas y condiciones mecánicas del sitio de administración determinadas (Aïache, Devissaguet y Guyot, 1983).

El objetivo de este paso, del sistema *LADME*, es la disgregación y dispersión en el medio acuoso del sitio de administración de los fármacos que se encuentran en formas dosificadoras sólidas. (Aïache, Devissaguet, y Guyot, 1983). En la figura 1 se pueden observar tres etapas de liberación al administrar una forma farmacéutica sólida (Doménech, Martínez y Plá, 2001).

Figura 1. Representación de la Liberación al Administrar una Forma Farmacéutica Sólida



Nota: Doménech, Martínez y Plá (2001).

Absorción

Velázquez (2008) menciona que la absorción es la entrada del fármaco al organismo desde el lugar de administración hasta la circulación sistémica. El fármaco debe ser capaz de atravesar membranas biológicas (p. 14). Así mismo, los factores que condicionan la absorción del fármaco están medidos por la administración, la cantidad de principio activo y la velocidad con la que este llega al organismo (p. 26).

La absorción incluye los procesos que pasan los medicamentos desde el sitio de administración hasta la circulación sanguínea, a través de una barrera biológica, para así poder alcanzar su lugar de acción. Para las demás vías de administración, el fármaco debe atravesar una

o más membranas biológicas, para absorberse y efectuar su acción farmacológica en el organismo. En la tabla 1 se mencionan las posibles vías de administración y dónde se puede absorber el fármaco (Aïache, Devissaguet y Guyot, 1983).

Tabla 1. Vías de Administración de los Fármacos y Lugares de Absorción Correspondientes

Vía de administración	Lugar de absorción
Intravenosa	Ninguno
Extravascular	Endotelios capilares
Oral	Epitelio gástrico, intestinal y cólico
Sublingual y bucal	Epitelios bucales
Nasal	Epitelio nasal
Ocular	Epitelio de la conjuntiva y de la córnea
Transpulmonar	Epitelio de tracto respiratorio y de alveolos
Rectal	Epitelio rectal
Percutánea	Epidermis

Nota: Doménech, Martínez, y Plá (2001).

Cuando se administra un fármaco, el proceso global que sufre, desde que se incorpora al organismo hasta que es eliminado por este, resulta muy complejo. Sin embargo, de una forma elemental, dicho tránsito podría identificarse con las siguientes fases principales: absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME). En realidad, cada uno de los procesos citados representa el conjunto de varios subprocesos interconectados (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 51).

Después de la liberación, el fármaco es cedido por la forma farmacéutica y pasa a solución. Una vez disuelto el fármaco, las moléculas del soluto se difunden hacia la vecindad de las membranas biológicas absorbentes, iniciándose propiamente el proceso de absorción. La complejidad del mismo depende básicamente del lugar y vía de administración elegidos. La

incorporación del fármaco al organismo es condición indispensable para que tengan lugar el resto de los procesos, incluida la acción farmacológica (p. 51).

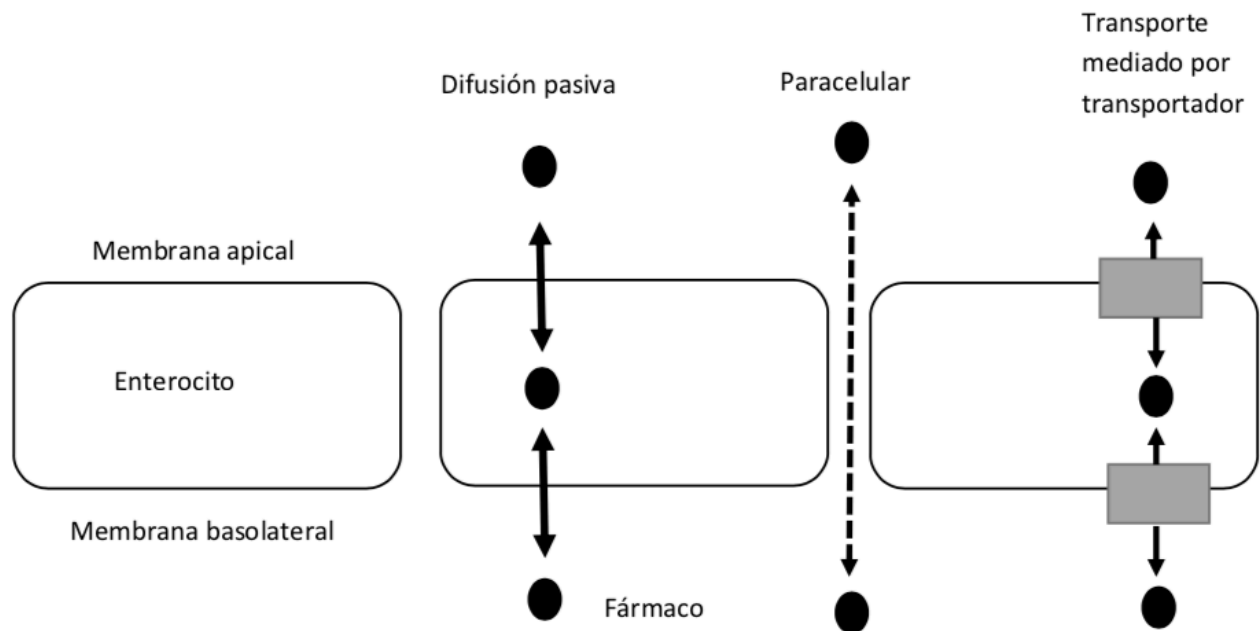
El proceso de absorción esta condicionado por la administración del fármaco, a excepción de la administración por vía intravenosa. Esta garantiza el acceso directo del fármaco inalterado a la circulación sistémica, por lo que es una vía rápida y se utiliza para determinar la biodisponibilidad en magnitud de los medicamentos administrados por vías distintas (p. 55).

En vías de administración como la extravasal, que implican un proceso de absorción, existe la posibilidad de que cierta cantidad del fármaco administrado no logre ingresar a la circulación sanguínea y la fracción de dosis, que en este caso llegue al órgano diana sin sufrir cambios, se considera la dosis biodisponible (Autlon, 2004, p. 249).

Los mecanismos de absorción a través de las membranas biológicas se pueden dividir en cuatro categorías:

- * *Difusión pasiva*: ocurre a través de la membrana lipídica o por poros acuosos. La difusión pasiva puede ser paracelular, logrando atravesar en los espacios entre membrana-membrana; o transcelular, atravesando las células.
- * *Transporte activo*: mediado por transportadores en contra de gradiente.
- * *Difusión facilitada*: mediada por transportadores.
- * *Endocitosis*: permite el paso de moléculas grandes (véase la figura 2) (Tsaïoun, 2011).

Figura 2. Representación de los Diferentes Mecanismos de Transporte del Proceso de Absorción



Nota: Hedaya (2012).

Biodisponibilidad.

Este parámetro permite indicar la cantidad y la forma en la que un fármaco llega a la circulación sistémica, y se ven reflejadas mayormente en la absorción, ya que expresa la cantidad y la velocidad con la que se absorbe el principio activo (Velázquez, 2008, p. 26).

La FDA (como se cita en Doménech, Martínez y Peraire, 2013) define la *biodisponibilidad* como “la velocidad y cantidad a la cual un fármaco o componente activo, absorbido a partir de la forma de dosificación que lo contiene, se hace disponible en su lugar de acción”. En esta definición se relaciona la velocidad y magnitud de la absorción con el acceso y permanencia del fármaco en la biofase o lugar de acción (p. 607).

Otra definición es la propuesta por la APhA (como se cita en Doménech, Martínez y Peraire, 2013), que se refiere a: “velocidad y magnitud la cual un principio activo es absorbido a partir de la forma de dosificación que lo contiene y alcanza la circulación sistémica” (p. 607).

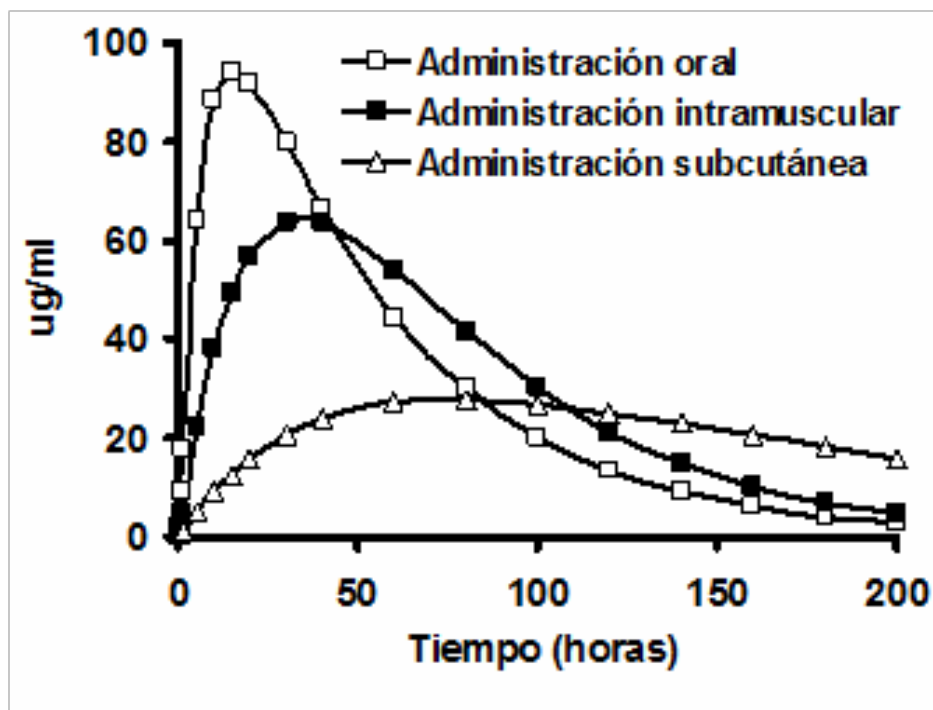
La biodisponibilidad es un parámetro propio del principio activo que cuantifica la disponibilidad fisiológica del mismo; es decir, considera hasta qué punto es capaz de acceder de forma inalterada a la circulación sistémica y la velocidad en la que se produce el proceso, acorde con la vía de administración utilizada (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 608).

El acceso del fármaco a circulación depende de varios factores, acerca de la forma de dosificación, como la capacidad de ser liberado desde la forma de dosificación y la velocidad de liberación. Los factores que influyen en la biodisponibilidad pueden ser relacionados con el principio activo, la forma de dosificación o con el paciente (Doménech, Martínez y Plá, 2001).

Este parámetro es importante en el desarrollo de una forma farmacéutica, y no solo debería apoyarse en ensayos “*in vivo*”, al menos en su estado inicial. Es necesario estudiar la disponibilidad del principio activo simulando condiciones de forma “*in vitro*” (Aïache, Devissaguet y Guyot, 1983).

En la figura 3 se puede observar cómo la administración de un mismo fármaco a una misma dosis, en diferentes formas farmacéuticas, tiene un proceso similar de absorción, pero diferente área bajo la curva, y esto produce diferentes biodisponibilidades. Por lo tanto, se deben graficar los niveles plasmáticos contra el tiempo para analizar el valor resultante del área bajo la curva (Hedaya, 2012).

Figura 3. Curvas Farmacocinéticas tras la Administración de un Mismo Fármaco a Igual Dosis por Vía Oral, Intramuscular y Subcutánea



Nota: Hedaya (2012).

La biodisponibilidad puede variar entre distintas formulaciones y vías de administración. Cuando el fármaco es administrado por la vía intravenosa, la administración del medicamento se realiza directamente al torrente sanguíneo; por lo tanto, todo el fármaco llega a la circulación sistémica, obteniéndose una biodisponibilidad del 100% (Winter, 1994, pp. 7-8).

Distribución

La distribución de los fármacos permite el transporte por el plasma sanguíneo y el posterior paso por los órganos diana; la distribución condiciona las concentraciones que van a alcanzar los tejidos y la manera en que se van a eliminar (Velázquez, 2008, p. 28).

La distribución se entiende como el proceso, o conjunto de procesos, mediante los cuales el fármaco se incorpora desde la circulación sistémica a los diferentes órganos y tejidos

corporales. La capacidad de distribución de los fármacos es muy variable, estando controlada por actores de tipo fisiológico como flujo sanguíneo, capacidad de fijación a proteínas plasmáticas y titulares, además de permeabilidad de las membranas (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 41).

La distribución del fármaco se realiza desde el plasma a las proteínas plasmáticas, y también a todos los elementos figurados de la sangre. El proceso de distribución es el único estrictamente reversible, y se concreta en la obtención de un equilibrio de concentración en todo el volumen accesible, al cabo de un tiempo dado, y es característico de cada fármaco (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 56).

Desde el punto de vista farmacocinético, la distribución se establece como un equilibrio reversible entre el fármaco libre y el unido a tejidos o proteínas, que condiciona el comportamiento cinético del fármaco en el organismo. Desde un punto de vista terapéutico, los procesos de distribución presentan importancia cuando el efecto farmacológico o tóxico del fármaco tiene una localización tisular (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 41).

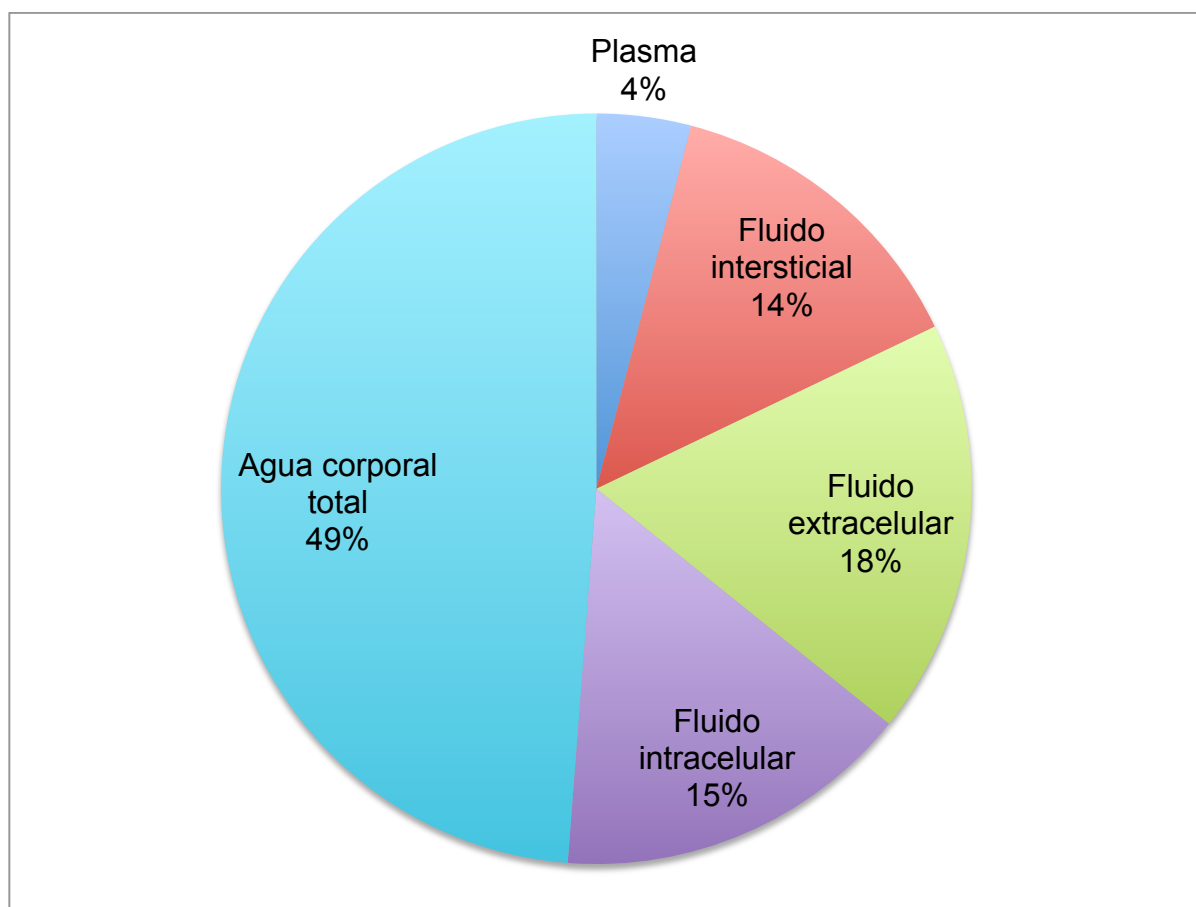
Al acceder el fármaco a la circulación sistémica puede fijarse a proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina, o penetrar en los eritrocitos. A su vez, el fármaco en forma libre puede abandonar los capilares y acceder al flujo extracelular tisular, habitualmente fluido intersticial. Dependiendo de su mayor o menor permeabilidad, la fracción libre localizada extracelularmente en el tejido puede atravesar la membrana celular y fijarse a estructuras intracelulares diversas, como las proteínas intracelulares (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 41).

Puede definirse como el proceso de transferencia reversible del fármaco desde la sangre a distintas estructuras extravasculares del organismo; este proceso está condicionado por las características fisicoquímicas del principio activo, y por factores fisiológicos y patológicos del individuo (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 77).

En el caso de fármacos para los que existe una relación directa entre concentraciones plasmáticas y respuesta, resulta suficiente con caracterizar el proceso de distribución de forma global en el organismo mediante parámetros de distribución aparente que, junto con otros parámetros de absorción y eliminación, permiten predecir la curva de niveles plasmáticos condicionante, en estos casos, de la respuesta farmacológica y toxicológica (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 78).

El agua constituye aproximadamente $2/3$ del total del peso corporal de un adulto; además, depende de otros factores como son edad, sexo y grado de obesidad. En recién nacidos, los valores de agua pueden llegar al 75% del peso corporal total, y este disminuye progresivamente con la edad. El sexo condiciona el contenido acuoso corporal, siendo menor en la mujer adulta que en el hombre, debido a que la mujer posee mayor proporción de grasa corporal. El tejido adiposo presenta un porcentaje acuoso bajo, y la proporción de agua depende de la cantidad de grasa presente. El agua corporal total se reparte en varios espacios corporales, como se esquematiza en la figura 4, que muestra los valores establecidos para un adulto de 70kg de peso (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 78).

Figura 4. Distribución del Agua Corporal en un Adulto de 70 kg de Peso



Nota: Doménech, Martínez y Peraire (2013).

El fluido extracelular incluye toda el agua corporal que se localiza fuera de las células, y está constituido por el fluido intersticial, el agua plasmática y el denominado *fluido transcelular*. De acuerdo con estos datos, el volumen de distribución real de los fármacos en un individuo adulto sano podría tomar los siguientes valores:

- * 3,5 litros: quedan confinados en el espacio acuoso vascular, debido a que son fármacos que no presentan capacidad de paso a través de las membranas vasculares ni celulares.
- * 15,5 litros: fármacos capaces de salir del espacio vascular, pero sin capacidad de paso a través de las membranas celulares.

- * 42 litros: fármacos con capacidad de atravesar todo tipo de membranas biológicas del organismo (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 78).

Metabolismo

Los fármacos son convertidos o transformados bioquímicamente en otras moléculas de forma parcial o total por diferentes sistemas enzimáticos, originando la formación de metabolitos. Estas biotransformaciones tienen como objetivo originar moléculas más polares para facilitar la excreción del organismo. Este proceso de metabolismo condiciona, de forma importante, la actividad farmacológica de los fármacos (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 112).

Los fármacos se transforman de forma total o parcial en el organismo por medio de distintos sistemas enzimáticos, con el fin de facilitar su eliminación. El organismo posee esta función para hacer posible la eliminación de moléculas lipófilas, para que no exista una acumulación en diferentes tejidos causando efectos tóxicos (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 112).

La capacidad del metabolismo en cada persona está condicionada por diversos factores intrínsecos como genéticos o fisiopatológicos y factores extrínsecos como hábitos, dieta o medicamentos. Las diferencias en las concentraciones de fármacos, y en la respuesta del mismo se ve justificada por la variabilidad interindividual (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p.112).

Metabolismo hepático.

El hígado es cuantitativamente el órgano más importante en la biotransformación, desempeñando un papel fundamental en la inactivación y subsiguiente eliminación de los fármacos. Su influencia sobre la biodisponibilidad y el aclaramiento supone, además, un control sobre su exposición sistémica (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 116).

Este metabolismo juega un papel relevante en la inactivación y eliminación de los fármacos. Existen dos tipos principales de reacciones metabólicas: las reacciones de fase I son, principalmente, reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis; suelen ser las que ocurren de primero, y consisten en la introducción de un grupo que aumente la polaridad de las moléculas. Las reacciones de fase II son reacciones de conjugación, las cuales ensamblan sustratos endógenos para aumentar tamaños de las moléculas y, así inactivarlos y facilitar la eliminación (Doménech, Martínez, y Plá, 2001).

Metabolismo extrahepático.

Además del hígado, existen otros metabolismos que afectan a los fármacos. El principal es originado por el tracto gastrointestinal. Este está mediado especialmente por la flora bacteriana o por los sistemas enzimáticos que se encuentran en las células epiteliales de la pared intestinal (Aïache, Devissaguet, y Guyot, 1983).

Excreción

Constituye la ruta de eliminación de los fármacos del organismo. Se puede definir como el proceso o conjunto de procesos por medio de los cuales un fármaco, o sus metabolitos, son expulsados al exterior del organismo. Es la transferencia de las moléculas de la circulación sanguínea al medio exterior de forma inalterada o biotransformada; por lo tanto, constituye la ruta final de eliminación de un fármaco o de sus metabolitos. Este proceso de excreción se puede llevar a cabo por: los riñones, la bilis, de forma glandular o fecal (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 159).

La excreción se define como el proceso por medio del cual un fármaco o sus metabolitos son expulsados al exterior del organismo, y esta es la ruta final de eliminación de un fármaco o sus metabolitos. Hay fármacos que se eliminan del organismo mediante procesos de biotransformación, y tienden a generar metabolitos más polares que finalmente utilizan la excreción para abandonar el organismo (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 159).

A nivel farmacocinético, la estimación de los parámetros se permite mediante los datos de excreción renal de un fármaco. A nivel farmacológico, la excreción renal de un fármaco puede utilizarse para evitar una acumulación renal de algunos fármacos que tienen implicación toxicológica debido a patologías renales (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 159).

Excreción renal.

El riñón, junto con el hígado, constituyen dos de los principales órganos responsables de la eliminación de metabolitos endógenos, fármacos, metabolitos y otras sustancias. La excreción renal de un fármaco constituye un proceso que implica la existencia de los procesos conocidos como *filtración glomerular*, *reabsorción tubular* y *excreción tubular activa* (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 160).

La filtración glomerular es un fenómeno pasivo, que sigue una cinética de orden uno, dependiente del flujo de filtración y de la concentración del fármaco libre en plasma; se ve facilitado por la alta permeabilidad de los capilares del glomérulo, el cual permite el paso de la mayoría de moléculas, incluyendo los fármacos en forma libre. Sustancias de elevado peso molecular, como la proteína plasmática del tipo de la albúmina y las células sanguíneas, no presentan este proceso (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 161).

Mediante la reabsorción tubular, alrededor de 180 litros de ultrafiltrado atraviesan el glomérulo, donde se recupera más del 99% del agua que ha pasado por el proceso de filtración. La reabsorción ocurre principalmente de forma pasiva, por difusión a favor de gradiente, y favoreciendo más a sustancias lipófilas o apolares. Por otro lado, los iones o sustancias polares son eliminados por la orina (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 161).

La secreción tubular es mediada por un mecanismo activo, contra gradiente y con utilización de energía, y constituye una manera en la cual ciertas sustancias y fármacos pueden

ser transportados, de manera directa, desde el plasma hacia la luz tubular, a través de las paredes de los túbulos (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 163).

Excreción biliar.

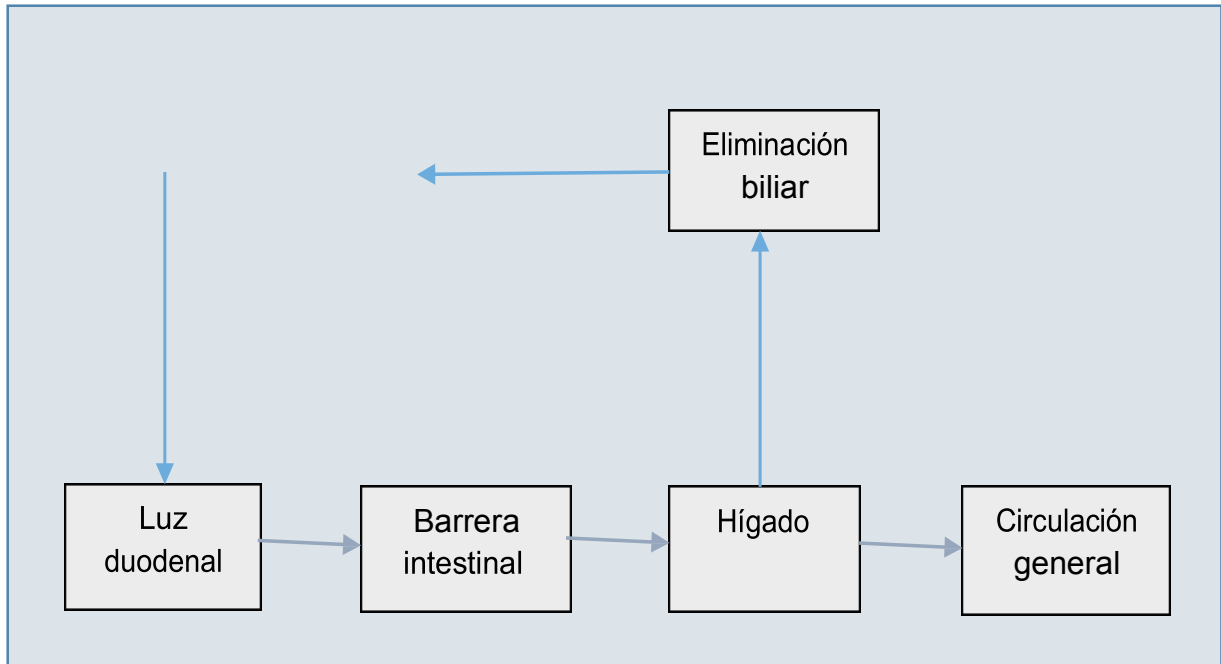
Shargel (como se cita en Doménech et al., 2013), menciona que la excreción biliar desempeña un papel importante en la secreción de fármacos de masa molecular superior a 300, especialmente de aniones y cationes orgánicos y sustancias no ionizadas que contengan grupos lipófilos e hidrófilos (p. 176).

La bilis está compuesta por agua, bilirrubina, ácidos grasos, colesterol y sales biliares, que favorecen la digestión de las grasas cuando la bilis alcanza el intestino delgado, pero también puede contener fármacos y otras sustancias que se excretan por la bilis (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 176).

Se produce por un mecanismo de transporte activo, que es el responsable del paso del fármaco desde la sangre hasta la bilis. Se han descrito tres sistemas de transporte activo que intervienen en el proceso de la excreción biliar, de los cuales uno de ellos interviene en el transporte de ácidos orgánicos, principalmente de ácidos carboxílicos o sulfónicos; el otro es responsable del transporte de bases orgánicas, como compuestos de amonio cuaternario y, por último, existe un sistema de transporte específico para sustancias orgánicas neutras, como pueden ser los glucósidos (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p.176).

En la figura 5 se observa que el fármaco que logra ser reabsorbido en el intestino y alcanza de nuevo la circulación sanguínea es lo que se conoce como *ciclo enterohepático*. Este ciclo produce una mayor permanencia de los fármacos en plasma; en otras palabras, incrementa su vida media en el organismo. Estos fármacos que sufren el ciclo enterohepático se excretan de forma definitiva del cuerpo por excreción renal (Doménech, Martínez y Plá, 2001).

Figura 5. Esquema del Proceso del Ciclo Enterohepático



Nota: Doménech, Martínez y Plá (2001).

Excreción salival.

Los fármacos pueden pasar desde el sistema circulatorio al tracto gastrointestinal por diferentes vías. Una de estas vías es la excreción salival, la cual se efectúa por difusión pasiva, y depende del pKa, de la solubilidad y de la fracción libre del fármaco en plasma. Algunos fármacos se excretan a través de la saliva por un mecanismo de transporte activo (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 180).

La excreción salival puede tener un gran interés en monitorización de fármacos, por la facilidad de toma de muestra para el análisis, cuando hay buena correlación entre los niveles en saliva y los niveles plasmáticos (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 160).

Excreción pulmonar.

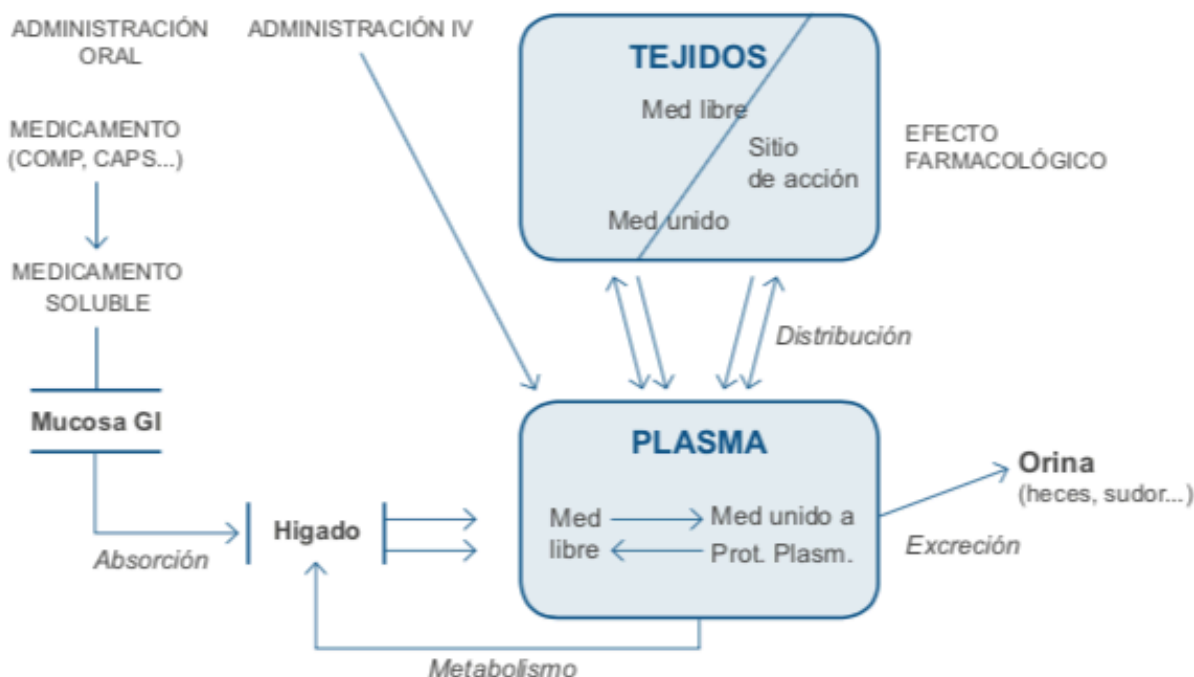
Algunos fármacos se excretan a través de los pulmones con el aire espirado. Utilizan este mecanismo de excreción sustancias volátiles como alcohol etílico, cloruro de amonio, anestésicos gaseosos, cumarina y paraldehído (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 181).

Excreción láctea o mamaria.

El mecanismo de transporte suele ser difusión pasiva, aunque también puede existir el transporte activo; algunos fármacos se excretan a través de la leche materna; este paso depende del pKa del fármaco, de la diferencia de pH entre la leche y el plasma, de la cantidad de fármaco en sangre materna y del coeficiente de reparto del fármaco no ionizado (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 181).

La importancia de la excreción mamaria radica en que, al excretarse el fármaco por la leche materna, puede pasar al recién nacido lactante, con potencial peligro de toxicidad (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p.160).

Figura 6. Esquema de los Procesos Farmacocinéticos



Nota: Girona (2013).

En la figura 6 se describe el esquema farmacocinético tras la administración oral y endovenosa. Una vez que el medicamento llega al torrente circulatorio, se distribuye por todo el organismo hasta llegar a los receptores para realizar su efecto terapéutico, pero también los efectos adversos; incluye alteraciones de la absorción, distribución, metabolismo y excreción (Girona, 2013, p. 22).

Volumen de Distribución

El volumen de distribución aparente es un parámetro que representa una distribución de los fármacos; también se conoce como *volumen hipotético*, en el que se disuelve la cantidad de fármaco total que llega al organismo, para así conseguir una concentración de fármaco igual a la del plasma (Velázquez, 2008, p. 33).

El grado de distribución de un fármaco se estima por medio del volumen de distribución aparente (Vd). El Vd se define como:

$$Vd = \frac{\text{Dosis}}{\text{Concentración plasmática}}$$

Este parámetro farmacocinético da una idea sobre el grado de distribución o compartimentalización a través del organismo; la magnitud más adecuada para expresarlo es el litro. Los valores de Vd son informativos; sin embargo, se deben tomar en cuenta, debido a la diferencia de distribución de cada fármaco en el organismo (Mendoza, 2018, p. 44).

Mendoza (2018) menciona, también, que existen algunos factores que tienden a mantener el fármaco en plasma o aumentar concentraciones plasmáticas (Cp) con baja solubilidad en lípidos, aumento de unión a proteína plasmática, o disminución de la fijación tisular, y estos reducen el volumen aparente de distribución. Por otro lado, los factores que disminuyen Cp aumentan el volumen de distribución aparente (p. 45).

Existe una distribución uniforme del fármaco en los compartimentos acuosos, que son sangre, espacio intersticial y espacio intracelular; el fármaco se disuelve en el líquido total de estos compartimentos, y el volumen de agua corporal en el que se disuelve el fármaco sería el volumen de distribución aparente (Velázquez, 2008, p. 33).

Así mismo, el autor menciona que el volumen de distribución aparente se expresa en litros; relaciona la cantidad de fármaco en el organismo en el momento dado con la concentración plasmática, y depende de las características fisicoquímicas y del paso a través de las membranas (p. 34).

Los fármacos que se unen a las proteínas del plasma tendrán volúmenes de distribución menores que un fármaco que no los posee. Un fármaco con un gran volumen de distribución

aparente se distribuye en los tejidos, donde se unen a constituyentes en los tejidos o disuelven en lípidos (Gennaro, 2003, p. 1347).

Además, el autor sugiere que, si el volumen de distribución es grande, el aumento en la concentración plasmática puede ser mínimo; en cambio, si el volumen de distribución es pequeño, la concentración de fármaco en el sitio de unión puede aumentar y provocar un aumento en la acción de este (p. 1349).

El parámetro de volumen de distribución es utilizado para conocer la cantidad de fármaco en el organismo a partir de las concentraciones plasmáticas. Teóricamente representa el volumen acuoso del organismo, en el cual es capaz de diluirse una cantidad determinada de fármaco. Desde un punto de vista farmacocinético, el volumen de distribución es un parámetro importante, ya que relaciona la concentración plasmática del fármaco y la cantidad correspondiente del mismo en el organismo al mismo tiempo (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 269).

El volumen de distribución se expresa en unidades de volumen (mL, L) o volumen/peso (mL/kg o L/kg) en función de cómo se exprese la dosis administrada (peso o peso/peso organismo; por ejemplo, mg o mg/kg) (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 271).

Rodgers (como se cita en Doménech et al., 2013) sugiere que aproximadamente el 60% del peso corporal es agua, y el 40% restante está constituido por estructuras sanguíneas y tisulares de muy diversa naturaleza, capaces de unirse de forma reversible a los fármacos (p. 79).

Además, menciona que el grado de distribución se determina mediante distintos métodos matemáticos basados en el análisis compartimental o estocástico de las curvas de concentraciones plasmáticas, a los que se denomina “volumen de distribución en el equilibrio” ($V_{d_{ss}}$), “volumen extrapolado” (V_{ex}) o “volumen área” ($V_{d_{área}}$) en función del método aplicado para su estimación, que es un método para calcular el $V_{d_{ss}}$ mediante la utilización del peso corporal del paciente y el coeficiente de reparto en tejido muscular (p. 80).

Doménech, Martínez y Peraire, (2013) mencionan que se trata de constantes que relacionan la cantidad y concentración de fármaco en el sistema a un tiempo dado; esto proporciona información sobre el grado de distribución en el organismo, sin aportar conocimientos sobre el proceso en órganos o tejidos concretos ni sobre la velocidad de distribución, que es determinante del grado real de acumulación tisular (p. 80).

Los fármacos que presenten un alto grado de afinidad por los tejidos tendrán elevados valores de volumen de distribución, indicativo de una amplia difusión tisular del fármaco. Por el contrario, los que se unen en alta proporción a proteínas plasmáticas pueden mostrar valores altos o bajos en este parámetro (Rabasco, 2002, p.42).

Curva de niveles plasmáticos

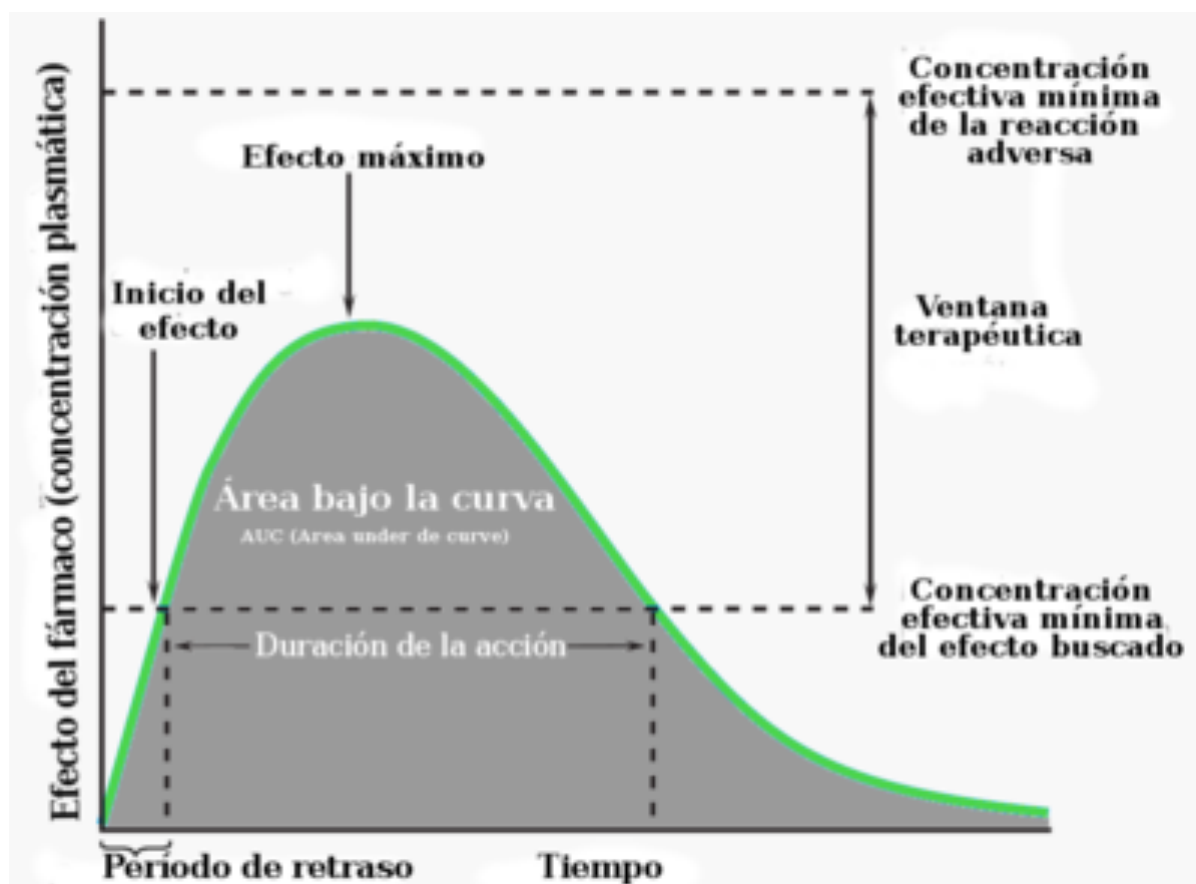
Velázquez (2008) indica que los niveles plasmáticos son más fáciles de medir utilizando el curso temporal de las concentraciones plasmáticas del fármaco para predecir sus efectos, al graficar las concentraciones plasmáticas como una función del tiempo desde la administración del fármaco hasta una etapa determinada de su eliminación. En estas curvas pueden identificarse los parámetros siguientes:

- *Concentración mínima eficaz (CME)*: es la concentración en la cual se observa el efecto terapéutico.
- *Concentración mínima tóxica (CMT)*: es la concentración a partir de la cual suelen aparecer efectos tóxicos.
- *Índice terapéutico o margen de seguridad*: es la relación entre CMT y CME. Se puede observar mayor seguridad cuanto mayor sea la relación.
- *Periodo de latencia (PL)*: tiempo que transcurre desde el momento de la administración hasta que se inicia el efecto farmacológico; es decir, hasta que se alcanza la CME.

- *Intensidad del efecto (IE)*: suele guardar relación con la concentración alcanzada por el fármaco en el plasma; puede variar la concentración en los tejidos por la unión a proteínas plasmáticas, el flujo sanguíneo regional o la afinidad del fármaco por un tejido determinado.
- *Duración de la acción*: es el tiempo que transcurre entre el momento en que se alcanza la CME y el momento en que el nivel del fármaco desciende por debajo de esta concentración (p. 14).

En la figura siguiente se puede observar que la concentración del fármaco en el plasma aumenta paulatinamente hasta alcanzar el máximo ($C_{\text{máx}}$), en un tiempo ($T_{\text{máx}}$), y después comienza a descender. Los diversos procesos farmacocinéticos actúan en diferente intensidad; en un principio predomina la absorción, por lo que se ve que la curva sube dependiendo de la velocidad de absorción. Al alcanzar el máximo, la absorción se iguala con la eliminación y, por último, se puede ver que la curva comienza a descender, porque la eliminación supera al proceso de absorción (Velázquez, 2008, p. 14).

Figura 7. Curva de Niveles Plasmáticos Después de la Administración Oral de un Fármaco



Nota: Velázquez, Lorenzo, Moreno, Lizasoain, Leza, Moro y Portolés (2008).

Modelos Farmacocinéticos

Los seres vivos tienen sistemas complejos en los que resulta casi imposible establecer una relación de la dosis de fármaco que se administra, la vía de administración y la concentración que logra llegar a cada una de las partes del cuerpo. Ante esta complejidad, se ha buscado la forma de efectuar representaciones o presentar modelos farmacocinéticos que ofrezcan una aproximación de lo que realmente sucede en el organismo (Doménech, Martínez y Plá, 2001).

Modelo monocompartimental

Los modelos farmacocinéticos que se han diseñado son representaciones matemáticas de una fracción o del total de la representación del organismo, que se utilizan para describir el sistema LADME. Con ello se logra una estimación de las expresiones matemáticas que describen el curso temporal de las concentraciones de un fármaco y de los parámetros farmacocinéticos correspondientes (Doménech, Martínez y Plá, 2001).

Los modelos farmacocinéticos se pueden emplear para:

- Predecir los niveles que se alcanzarían en plasma, tejidos u orina.
- Calcular regímenes de dosificación.
- Estimar la acumulación de fármacos y metabolitos.
- Establecer una relación entre la concentración del fármaco y la acción farmacológica o toxicológica.
- Comparar la biodisponibilidad o bioequivalencia entre las formulaciones.
- Demostrar los posibles factores fisiológicos o patológicos que afectan el sistema LADME.
- Predecir las interacciones entre fármacos o con alimentos. (Doménech, Martínez y Plá, 2001).

Los modelos compartimentales son los más utilizados en la farmacocinética. Estos compartimentos están definidos por sectores acuosos que abarcan un volumen determinado y que contienen una cantidad establecida de fármaco. (Doménech, Martínez y Plá, 2001).

Modelo monocompartimental intravenoso.

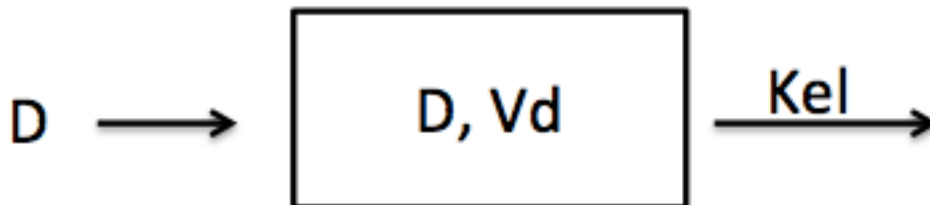
El modelo monocompartimental es el más simple. Este modelo representa al organismo y, para efectos de distribución, está diseñado por un solo compartimento, el cual abarca a los órganos que son más perfundidos, como el corazón, el hígado, los riñones, el cerebro y los pulmones (Doménech, Martínez y Plá, 2001).

Una de las suposiciones en este tipo de modelos es que una vez que se administra una dosis de fármaco vía intravenosa rápida, se da una distribución instantánea del fármaco en todo el

volumen del compartimento y, una vez que se ha distribuido, se da el proceso de excreción (Doménech, Martínez y Plá, 2001).

Es el más utilizado en la práctica clínica; se considera al organismo como una sola unidad homogénea, donde todos los tejidos y fluidos del cuerpo están incluidos en un solo compartimento. En este modelo, se dice que la distribución es instantánea, rápida y homogénea luego de la administración del fármaco, y asume que el fármaco se equilibra de forma instantánea (Doménech, Martínez y Plá, 2001).

Figura 8. Representación Básica del Modelo Monocompartimental Intravenoso



Nota: Doménech, Martínez y Peraire (2013).

En la figura 8 se puede observar un modelo monocompartimental, el cual es simple y se considera abierto, debido a que el fármaco entra al organismo y luego es eliminado. El volumen de distribución (V_d) representa el volumen donde se distribuye el fármaco en el cuerpo humano, y la cantidad de fármaco (D) cambia conforme pasa el tiempo, y la constante de eliminación (K_{el}) es el proceso que sufre el fármaco durante el tránsito en el organismo (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 264).

Proteínas plasmáticas

Las moléculas de los fármacos en la sangre pueden ir disueltas en el plasma, incorporadas a las células o fijadas a las proteínas plasmáticas; estas condicionan los efectos farmacológicos. Por esto, la albúmina es una de las más importantes, ya que es muy abundante y tiene mayor

superficie y capacidad de fijación; sin embargo, es capaz de interaccionar con muchos fármacos de naturaleza ácida (Velázquez, 2008, p. 28).

Las proteínas del plasma participan en mecanismos de transporte, coagulación, inmunidad y acción enzimática, así como en la nutrición, equilibrio ácido-base y electrolítico. Se puede determinar por métodos como espectrometrías UV o técnicas refractométricas, aunque suele observarse errores en presencia de alguna patología (Gennaro, 2003, p. 660).

En el plasma humano se han identificado numerosas proteínas, de las cuales las más relevantes, desde el punto de vista de la fijación de fármacos, son las incluidas en la tabla 2 (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 86).

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

Proteína	Peso molecular (Da)	Niveles plasmáticos normales (g/L)
Albúmina	65000-69000	35-50
Alfa 1-glicoproteína ácida	41000-44000	0,4-1,0
Lipoproteínas	200000-3400000	Variable

Nota: Doménech, Martínez y Peraire (2013).

Tipos de proteínas plasmáticas

El plasma humano contiene más de 60 proteínas, de las cuales las más importantes, desde el punto de vista de la fijación de los fármacos, son:

Albúmina.

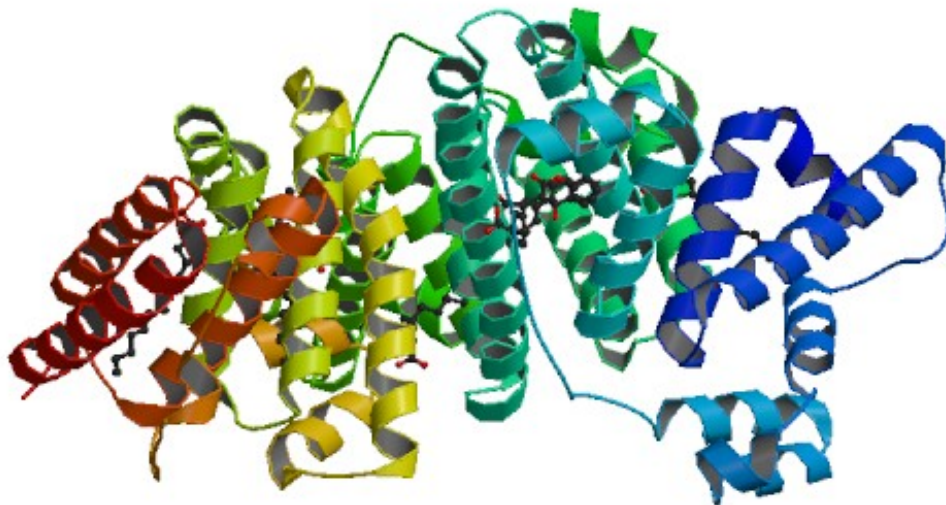
Santos (2004) menciona que la semivida de eliminación de la albúmina es de 17 a 19 días; esta se distribuye en plasma, fluidos extracelulares, piel, músculo y otros tejidos. La

concentración se mantiene de 35 a 45g/L. También es responsable de mantener la presión osmótica de la sangre y el transporte de sustancias en plasma.

La albúmina es ligeramente básica debido a que posee grandes cantidades de aminoácidos como arginina, histidina y lisina, y se unirán principalmente a ella fármacos ácidos o neutros. Esta es una proteína saturable; al ocurrir esto, los fármacos se unirán a otra proteína plasmática, como la lipoproteína (Le, 2018).

Es la más abundante y la máxima responsable de la fijación de fármacos. Su peso molecular oscila entre 65000 y 69000 Da. En condiciones normales, los niveles plasmáticos de albúmina son de 35-50g/L. La albúmina fija determinadas sustancias endógenas, tales como ácidos grasos, bilirrubina y una gran variedad de fármacos, desempeñando un papel fundamental en la fijación de fármacos neutros y ácidos débiles (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 86).

Figura 9. Molécula de la Albúmina Humana



Nota: Wishart (2017).

La albúmina sérica humana, como la proteína más prominente en el plasma, podría servir como un depósito circulante para muchos fármacos. Es el principal portador de distintos metabolitos endógenos y exógenos en la sangre (Baraka, Guerin, Bourdon y Rondeau, 2012).

Alfa 1- glicoproteína ácida.

Es la más pequeña de las proteínas plasmáticas. Esta proteína tiene un único sitio de unión con una elevada afinidad, y fija principios activos básicos altamente liposolubles. Su concentración plasmática oscila entre 0,4-1,0 g/L, aumentando cuando existe un proceso inflamatorio, un proceso maligno o estrés, y disminuyendo en casos de trastornos hepáticos o renales (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 87).

Lipoproteínas.

Son macromoléculas constituidas por una parte lipídica y otra proteica, y se clasifican según su densidad, que varía en función de la cantidad y tipo de lípidos y proteínas que contengan, en: lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de alta densidad (HDL). Su concentración plasmática es muy variable, dependiendo del sexo, edad, dieta y procesos patológicos, entre otros factores. Estas proteínas fijan, principalmente, fármacos muy liposolubles como ciclosporina A, diclofenaco, imipramina, diltiazem, entre otros (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 88).

Afinidad a proteínas plasmáticas

Los fármacos se unen a proteínas del plasma, principalmente a la albúmina. Un fármaco unido puede actuar como un depósito para el fármaco libre, liberándose de forma paulatina hasta que se encuentre en equilibrio. Los fármacos se unen de forma selectiva a los receptores (Gennaro, 2003, p. 1299).

La albúmina tiene dos sitios para la unión de fármacos, uno es para fármacos de carácter ácido y el otro para los de carácter básico. La unión depende de la afinidad de los fármacos y es una cifra estable para cada uno de ellos. Solamente el fármaco libre es activo, puesto que es el único capaz de atravesar barreras y difundir a tejidos (Girona, 2013, p.33).

Unión a proteínas

Los medicamentos, una vez que han alcanzado el torrente circulatorio, se desplazan de forma libre o unida a las proteínas plasmáticas. De todas las proteínas, la albúmina es la principal proteína vehiculizadora de fármacos en el organismo. Constituye más de la mitad de las proteínas en sangre (Girona, 2013, p.33).

La unión a proteínas es un proceso reversible y favorecido por la liposolubilidad del fármaco; se suele cuantificar en forma de porcentaje, y este suele estar constante dentro de un intervalo de niveles plasmáticos amplio, por lo que la proteína del plasma es saturable; al suceder esto, el porcentaje de fármaco libre será mayor (Velázquez, 2008, p. 28).

La concentración en los tejidos y sitios de acción se ve limitada por la unión del fármaco a la proteína plasmática, ya que solo el fármaco libre logra una distribución equilibrada. La concentración de fármaco libre en líquido intracelular será igual a la del plasma, excepto cuando se realiza por medio de transportadores. Igualmente, se ve restringido el transporte y el metabolismo por la unión a la proteína del plasma (Goodman, 2015).

Existen ciertos factores que afectan la unión del fármaco a la proteína del plasma, como el tipo de proteína disponible, la afinidad y la capacidad de fijación a la misma, así como la presencia de sustancias competidora, como lo son otros fármacos principalmente. La albúmina es la proteína del plasma más abundante, por lo que es la más estudiada (Gennaro, 2003, p. 1349).

La unión de fármacos a proteínas puede tener una gran influencia en su comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ya que solamente la fracción libre se encuentra en disposición de acceder a los receptores y, por lo tanto, ser eficaz (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 85).

La unión de los fármacos con las proteínas plasmáticas se efectúa a través de enlaces reversibles, encontrándose en equilibrio la fracción libre y la unida a proteínas plasmáticas (Rabasco, 2002, p.42).

El porcentaje de unión es variable, pudiendo oscilar desde 0 hasta más del 99%. Este porcentaje se puede considerar como una constante para cada fármaco, siendo independiente de su concentración plasmática (Rabasco, 2002, p.42).

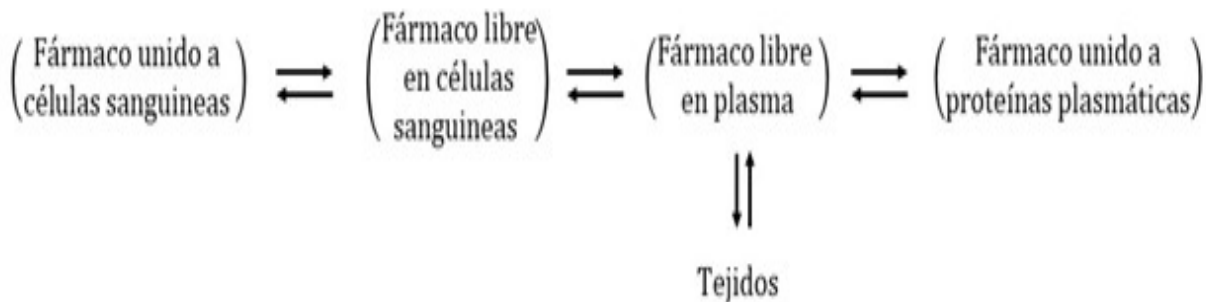
Los fármacos que son ácidos débiles se unen prioritariamente a la albúmina, mientras que las bases débiles lo hacen indistintamente a todas las proteínas. A este respecto, el comportamiento de la albúmina es totalmente diferente según se trate de fármacos ácidos o básicos (Rabasco, 2002, p.42).

Doménech, Martínez y Peraire, (2013) mencionan que la unión a proteínas plasmáticas puede condicionar su distribución y eliminación; el volumen de distribución de los fármacos con un elevado grado de fijación a proteínas plasmáticas, como la warfarina (99%) o el ácido valproico (98%), suele ser relativamente pequeño al quedar confinado en el compartimento vascular el complejo fármaco-proteína. Por el contrario, los fármacos que se unen en menor medida a proteínas plasmáticas presentan, generalmente, valores de volumen de distribución elevados. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, la distribución es un proceso complejo, y existen numerosos factores que lo condicionan, ya que existen fármacos que presentan un elevado grado de unión a proteínas plasmáticas, pero también una gran afinidad por las proteínas tisulares, lo cual se traduce en valores elevados del volumen de distribución, como, por ejemplo, la digoxina, los antidepresivos tricíclicos y el itraconazol (p. 85).

En circulación sistémica solamente la fracción libre de fármaco se encontrará en disposición de abandonar el espacio vascular y alcanzar los distintos órganos y tejidos, donde se fijará con mayor o menor intensidad a las proteínas u otros componentes tisulares (véase la figura 7) (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 86).

Ritschel (como se citó en Doménech, Martínez y Peraire, 2013) menciona que la interacción más importante se produce a nivel de torrente sanguíneo con las proteínas plasmáticas, a las cuales se les pueden fijar diversas moléculas de fármacos mediante uniones físicas reversibles como puentes de hidrógeno o fuerzas der Van de Waals (p. 86).

Figura 10. Distribución de un Fármaco en el Torrente Circulatorio



Nota: Doménech, Martínez y Peraire (2013).

La unión a la albúmina humana aumenta la vida útil de un fármaco antes de que se metabolice, también permite que algunos fármacos hidrófobos se vuelvan más solubles en la sangre, los fármacos unidos difícilmente pueden alcanzar el sitio de acción a través de la sangre sin perder sus actividades farmacológicas y su toxicidad. Entre los fármacos, algunos tienen un índice terapéutico estrecho, como la warfarina, y son fácilmente tóxicos en el estado no unido (Baraka, Guerin, Bourdon y Rondeau, 2012, p. 1961).

La fijación a proteínas sigue la acción de masas, es decir, un equilibrio reversible entre la forma libre y la forma ligada que constituye una forma de almacenamiento plasmático. La cantidad de forma depende de los siguientes factores:

- Difusión del principio activo fuera del medio circulante.
- Afinidad y duración de la forma libre. (Hernández, 2014, p.57).

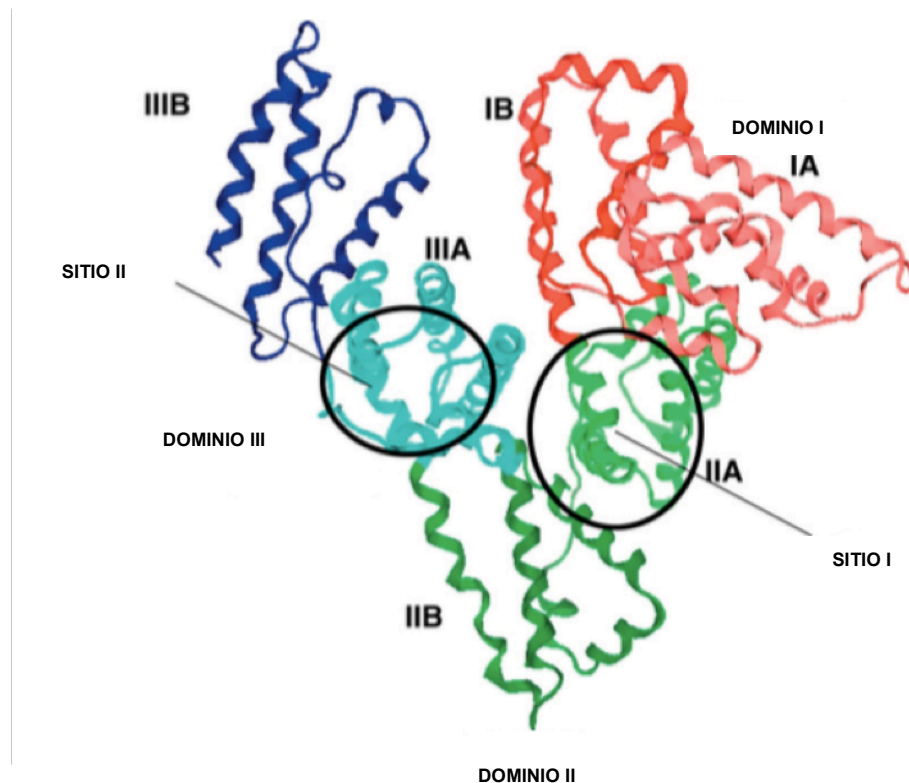
La mayoría de los fármacos se unen a las proteínas plasmáticas en un grado variable, estos enlaces son reversibles. La unión puede favorecer un enantiomero u otro y en un grado que varía con la molécula del fármaco y con el estado de la proteína; los estereoisómeros también pueden

tener efectos opuestos, una forma es un agonista en el mismo receptor donde su imagen de espejo es un antagonista. La estereoselectividad en la unión puede afectar significativamente la cantidad de fármaco presente en el plasma (Chuang y Otagiri, 2006, p.159).

Sitio de unión

En la albúmina, actualmente se conocen hasta cuatro sitios para la unión de los fármacos. Los fármacos unidos a las proteínas del plasma no producen efectos biológicos, pero esta unión permite el transporte y almacenamiento. En la tabla 3 se pueden observar los principales sitios de unión de los fármacos, donde los fármacos ácidos se unen principalmente a la albúmina. En la figura 11 se puede observar la estructura de la albúmina con sus sitios de unión principales (Velázquez, 2008, p. 29).

Figura 11. Estructura de la Albúmina Sérica Humana



Nota: Chuang et al. (2006).

Tabla 3. Sitio de Unión de Fármacos Ácidos a la Albúmina

Sitio 1	Sitio 2
Acenocumarol	Ácido clofibrico
Ácido nalidíxico	Ácido etacrínico
Ácido salicílico	Ácido flufenámico
Bilirrubina	Ácido salicílico
Bumetamida	Benzodiacepinas (Diacepam)
Clorotiacida	Cloxacilina
Clorpropamida	Dicloxacilina
Dicumarol	Dicumarol
Diflunisal	Diflunisal
Fenilbutazona	Flucloxacilina
Fenitoína	Flurbiprofeno
Flucloxacilina	Glibenclamida
Flurbiprofeno	Ibuprofeno
Furosemida	Indometacina
Glibenclamida	Ketoprofeno
Indometacina	Naproxeno
Ketoprofeno	Probenecida
Naproxeno	Sulfobromoftaleína
Sulfamidas	Tamoxifeno
Sulfinpirazona	Tolazamida
Tolbutamida	Tolbutamida
Valproato	
Warfarina	

Nota: Velázquez et al. (2008).

De los cuatros sitios de unión en la molécula de albúmina plasmática posee dos, que son los principales en cuanto a la fijación de fármacos se refiere:

- Sitio I: a él se unen fármacos de estructura diversa tales como la warfarina, fenilbutazona, ácido valproico, fenitoína y otros. La capacidad para desplazar a la warfarina se ha utilizado como criterio de unión a este sitio.
- Sitio II: a él se unen los benzodiazepinas y los ácidos carboxílicos tales como el ibuprofeno, ketoprofeno y otros. El diacepam se ha utilizado como marcador de este sitio de unión (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 87).

Debido a su gran tamaño y capacidad de adaptación, al sitio I tiende a unirse a compuestos heterocíclicos voluminosos que incluyen sulfonamidas, salicilatos y compuestos de cumarina, como la warfarina (Baraka, Guerin, Bourdon y Rondeau, 2012, p.1961).

En contraste, el sitio II es más pequeño y menos flexible, induce la unión más estereoespecífica de ácidos carboxílicos aromáticos y profenos tales como ibuprofeno o ketoprofeno. La interacción de los fármacos con la albúmina puede verse afectada por modificaciones de la proteína, como la glicación u oxidación (Baraka, Guerin, Bourdon y Rondeau, 2012, p.1961).

Unión fármaco-proteína

La unión de los fármacos a la proteína es poco específica, competitiva y variable. Diversos factores pueden alterar dicha unión. Esta puede disminuir si se reduce la concentración de proteínas. Suelen haber fármacos que se unen en mayor medida, por lo que pueden provocar problemas de sobredosificación (véase la tabla 4) (Velázquez, 2008, p. 29).

Además, existen interacciones farmacológicas que pueden producir una elevación de las concentraciones plasmáticas del fármaco desplazado, que puede conllevar toxicidad como si existiese sobredosificación; esto resulta de administrar un fármaco desplazante en dosis altas por vía intravenosa (p. 29).

Tabla 4. Grados de Unión a las Proteínas del Plasma de Algunos Fármacos

Escaso (0-50%)	Intermedio (50-90%)	Alto (90-98%)	Muy alto (98-100%)
Atenolol	Alfentanilo	Amiodarona	Diacepam
Digoxina	Carbamacepina	Anfotericina B	Dicumarol
Litio	Clorpromacina	Clindamicina	Diffunisal
Procainamida	Diazóxido	Clorotiacida	Doxicilina
Quinidina	Dicloxacilina	Fenilbutazona	
Teofilina	Digoxina	Flurbiprofeno	
Verapamilo	Fenitoína	Furosemida	
	Fenobarbital	Glibenclamida	
	Heparina	Ibuprofeno	
	Imipramina	Ketoprofeno	
	Indometacina	Naproxeno	
	Loracepam	Warfarina	
	Nifedipinio		
	Nortriptilina		
	Oxacepam		
	Penicilina G		
	Prazosina		
	Propanolol		
	Sulfisoxazol		
	Tolbutamida		

Nota: Velázquez et al. (2008).

Las interacciones son capaces de provocar consecuencias fatales que se derivan de la unión plasmática de los fármacos, es probable que se manifieste una competición entre varias

moléculas por un lugar de fijación. La unión que tiene la molécula más estable desplaza a las otras de los lugares de fijación y aumenta su forma libre (Hernández, 2014, p.57).

La unión a proteínas constituye una forma de almacenamiento reversible para numerosas moléculas. Ciertos tejidos poseen una capacidad de fijación muy elevada para diversas sustancias y la concentración tisular puede alcanzar niveles muy superiores a su concentración plasmática (Hernández, 2014, p.57).

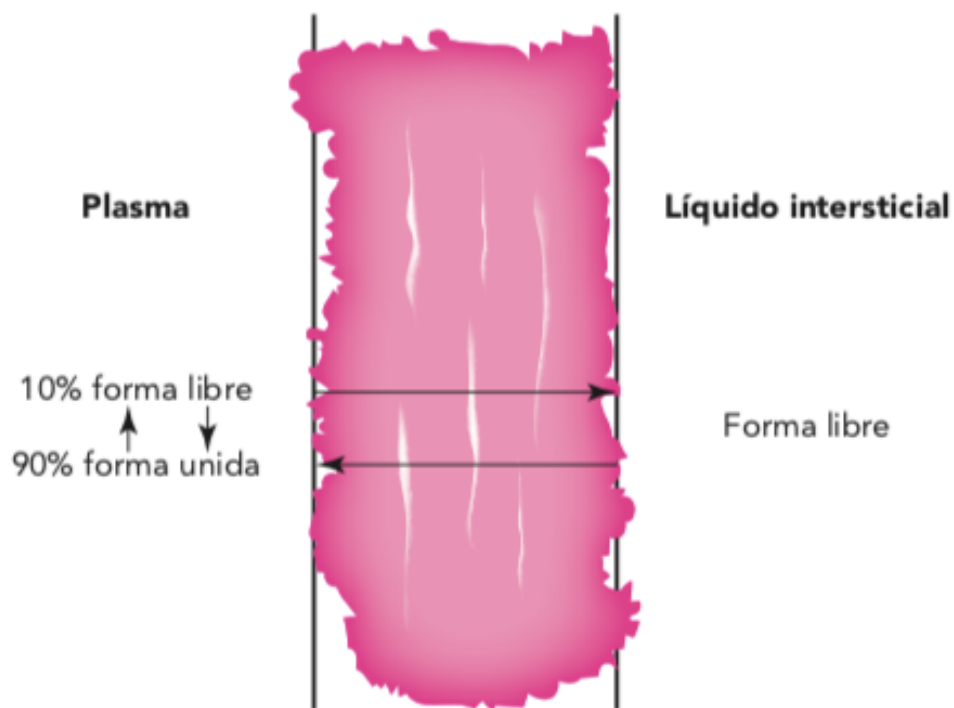
La unión plasmática modula el efecto farmacológico mediante disminución de la intensidad del efecto inicial; por tanto, el efecto farmacológico sólo depende de la forma libre (Hernández, 2014, p.57).

También menciona que si se desea evitar la unión a proteínas para lograr un efecto terapéutico, es factible aplicar otro que tenga más afinidad por las proteínas, con lo que es posible saturar los sitios de unión y dejar libre el fármaco (p.57).

El 90% de los medicamentos se encuentran ligados a proteínas plasmáticas, sólo 10% está en forma libre y difundida. El gradiente de concentración depende sólo de la forma libre en el plasma y la difusión se realiza hasta que el equilibrio se alcance en todos los líquidos celulares o extracelulares (véase la figura 12) (Hernández, 2014, p.57).

La forma libre es la única capaz de fijarse a los receptores farmacológicos y ejercer un efecto del que depende la eficacia clínica de la molécula. La forma ligada es inactiva de forma temporal, a medida que la forma libre se metaboliza o elimina (Hernández, 2014, p.57).

Figura 12. Transporte de Medicamentos



Nota: Hernández (2014).

La fracción que se encuentra unida es farmacológicamente inactiva. Actúa como si fuera un reservorio o una forma de transporte, permanece en la sangre, no siendo metabolizada ni excretada y constituye una reserva móvil del fármaco. Solamente la fracción libre se halla disponible para su distribución a tejidos, la biotransformación o la excreción y es la que ejerce la acción farmacológica (Rabasco, 2002, p.42).

Al unirse a las proteínas puede aumentar la solubilidad del fármaco. Este es el caso del dicumarol, poco soluble en agua, que se disuelve bien en el plasma, ya que su unión a proteínas plasmáticas es del 99%. Igual ocurre con otros fármacos muy lipófilos, insolubles en agua, que pueden ser transportados por las lipoproteínas plasmáticas (Rabasco, 2002, p.42).

Fármaco libre

El fármaco libre es el que logra atravesar los tejidos diana y los respectivos órganos de metabolismo y excreción. En ciertas circunstancias el fármaco, unido a la proteína del plasma, favorece la solubilidad del fármaco en el mismo, y este se va liberando poco a poco para alcanzar un equilibrio con la fracción libre (Velázquez, 2008, p. 29).

Desplazamiento de fármacos

Se pueden aumentar los niveles de fármaco libre por la competición entre fármacos por la unión a la proteína plasmática, y esto provocaría interacciones; estas interacciones pueden llegar a ser tóxicas para el organismo (Gennaro, 2003, p. 1299).

El efecto que ocurre, al ser un fármaco desplazado, es un aumento de la respuesta farmacológica transitoria, y el impacto de esto depende de la cantidad de fármaco fijada, el grado de desplazamiento, el volumen de distribución aparente y la depuración del fármaco (Gennaro, 2003, p. 1349).

Por ejemplo, el mismo autor menciona que si un fármaco tiene una depuración alta, el grado de unión a la proteína es muy bajo; en cambio, si es de baja depuración, la eliminación será menor, pero existirá una mayor sensibilización de unión a las proteínas. Así como la warfarina, es un fármaco con una baja depuración, por lo que se ha demostrado que el desplazamiento del fármaco es mayor, mostrando, de este modo, un aumento de las concentraciones de fármaco libre (p. 1349).

El desplazamiento del fármaco de su unión a las proteínas plasmáticas por otros fármacos que compite en este nivel, puede contribuir a la producción de reacciones adversas aumentando la forma libre, es decir, la farmacológicamente activa. Sin embargo, lo que ocurre también es que esa forma libre esta disponible para su distribución a través del plasma, hacia los tejidos. La interacción sería el desplazamiento en la unión a los tejidos. La concentración plasmática del fármaco desplazado puede duplicarse debido a la competición en los tejidos. (Velázquez, 2008, p. 1089)

La administración de dos fármacos con un alto grado de unión a proteínas puede causar toxicidad por aumento de exposición al fármaco con menor afinidad, al aumentar la proporción de fármaco libre (Girona, 2013, p.33).

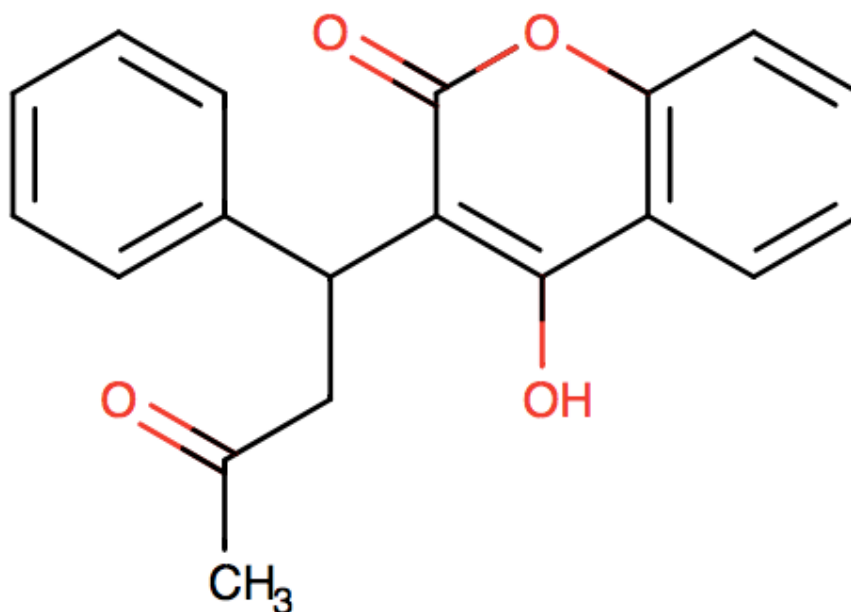
Las interacciones que afectan a la distribución tienen cierta importancia cuando los fármacos desplazados tienen un intervalo terapéutico estrecho, como los anticoagulantes antagonistas de la vitamina K (AVK), antiepilépticos, antidiabéticos orales y otros. (Girona, 2013, p.33).

Algunos fármacos pueden desplazar a los AVK de su unión a proteínas plasmáticas, con potenciación de la actividad anticoagulante como ácido etacrínico, ácido nalidíxico, antiinflamatorios no esteroideos (diclofenaco, fenilbutazona, feprazona, ibuprofeno, ketoprofeno, mefenámico, nimesulida, sulindaco), bicalutamida, carnitina, gemfibrozilo, hidrato cloral, ifosfamida, miconazol, valproico (Girona, 2013, p.33).

Warfarina

La warfarina es usada para el tratamiento de fenómenos trombóticos desde 1960; es un derivado sintético de la cumarina que, al antagonizar en forma competitiva la vitamina K e inhibir la síntesis de la enzima epóxido reductasa, lo hace también con los factores de coagulación dependientes de la vitamina K, entre ellos los factores II, VII, IX, y X (Yurgaky y Rodríguez, 2009, p. 107).

Figura 13. Estructura de la Warfarina



Nota: Wishart (2017).

Mecanismo de acción

Se produce el efecto anticoagulante por la inhibición de la epóxido-reductasa de la vitamina K, la enzima que cataliza el paso de la vitamina K oxidada a su forma reducida. La vitamina K reducida induce la carboxilación de los residuos de glutamato de los factores II (protrombina), VII (proconvertina), IX (Christmas) y X (Stuart) de la cascada de la coagulación. El bloqueo de esta carboxilación da por resultado moléculas incompletas que son biológicamente inactivas en la coagulación (Rodríguez, 2013).

Farmacocinética del fármaco

Este fármaco se absorbe de forma rápida y completamente después de su administración oral, y tiene una biodisponibilidad excelente. Se une de manera amplia a las proteínas plasmáticas. Se metaboliza en el hígado y se excreta, junto con sus metabolitos, principalmente

en la bilis. Su vida media de eliminación es de 20 a 89 horas. Cruza con facilidad la barrera placentaria (Rodríguez, 2013).

Absorción

La biodisponibilidad de la warfarina es casi completa por vía oral, intravenosa o rectal. Los preparados comerciales en comprimidos varían en la rapidez de disolución, y ello origina algunos cambios en la rapidez y la magnitud de absorción. El alimento presente en el aparato gastrointestinal también puede disminuir la rapidez de absorción. En término de una hora de haber sido ingerida, por lo común se detecta la warfarina en el plasma, y las concentraciones alcanzan su máximo en un lapso de 2 a 8 horas (Brunton et al., 2006, p. 862).

Distribución

La warfarina se liga de manera casi completa (99%) a las proteínas plasmáticas, en particular a la albúmina, y se distribuye con rapidez en un volumen que equivale al espacio de la albúmina (0.14 L/Kg) (Brunton et al., 2006, p. 862).

Biotransformación y eliminación

La warfarina es administrada en la forma de mezcla racémica del fármaco S-y R-. La primera (S-) es tres a cinco veces más potente que la segunda (R-), y es metabolizada principalmente por el CYP2C9. Los metabolitos inactivos de la warfarina se excretan en orina y heces. La semivida del fármaco varía de 25 a 60 horas, con una media aproximada de 40 horas, y la duración de acción es de dos a cinco días (Brunton et al., 2006, p. 862).

Indicaciones

Profilaxis y tratamiento de la trombosis venosa profunda, embolia pulmonar, complicaciones tromboembólicas asociadas a fibrilación auricular y sustitución de válvulas cardíacas. Además, hay profilaxis en el infarto recurrente del miocardio (Rodríguez, 2013).

Reducción del riesgo de muerte en infarto de miocardio recurrente y eventos tromboembólicos, como accidente cerebrovascular o embolia sistémica post infarto de miocardio (Sosa y González, 2014).

Interacciones

Se produce una modificación en los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolización y excreción del fármaco. El desplazamiento de la unión de la warfarina a las proteínas plasmáticas, por parte de otros fármacos, hace que haya más warfarina libre y, por lo tanto, aumenta su acción anticoagulante (Sosa y González, 2014, p. 11).

La administración simultánea de fármacos antiinflamatorios no esteroideos y fibrinolíticos aumenta el riesgo de hemorragia, así como el uso de diversos medicamentos que pueden modificar el efecto anticoagulante como antibióticos, salicilatos, sulfonamidas, hipoglucemiantes orales, alcohol y cimetidina, que lo aumentan; mientras que los barbitúricos, anticonceptivos orales, griseofulvina y fenitoína lo disminuyen (Rodríguez, 2013).

La unión a proteínas (99%) constituye un determinante importante en las interacciones farmacológicas debido a que sólo la fracción libre es biológicamente activa. Si un fármaco es capaz de ocupar la albúmina y desplazar el medicamento de la misma, potenciaría en forma considerable sus propiedades anticoagulantes, de igual manera que todos aquellos medicamentos con metabolismo dependiente del citocromo p450 tendrían efectos en la concentración plasmática de warfarina, por el incremento o disminución del metabolismo de la misma (Yurgaky y Rodríguez, 2009, p. 107).

Las interacciones farmacológicas se han correlacionado con incremento de las tasas de sangrado, así como con dificultad para obtener valores terapéuticos de anticoagulación según sea el caso, a través de mecanismos que incluyen: disfunción plaquetaria (asa, clopidogrel), irritación gástrica directa (antiinflamatorios no esteroides, AINES), interferencia en el metabolismo (amiodarona, rifampicina), disminución síntesis de vitamina K (antibióticos), interferencia con metabolismo de vitamina K (acetaminofén). Dentro de los grupos de medicamentos usados frecuentemente debe resaltarse que los inhibidores de la ciclooxigenasa 2 (COX 2) selectivos, así como el pantoprazol se han relacionado con menores efectos adversos dentro del grupo de los AINES, e inhibidores de bomba de protones respectivamente (Yurgaky y Rodríguez, 2009, p. 108).

Contraindicaciones

En casos de hipersensibilidad a la warfarina, tendencia hemorrágica, deficiencia de vitamina K, intervenciones quirúrgicas o traumatismos recientes, úlcera péptica, hemofilia, anemia, amenaza de aborto, hipertensión, pericarditis, endocarditis bacteriana, insuficiencia hepática o renal grave, anestesia regional o lumbar y durante el embarazo (Rodríguez, 2013).

Advertencias para el paciente

1. Seguir estrictamente el esquema de dosificación indicado.
2. Tomar con los alimentos y a la misma hora cada día.
3. Evitar la ingestión de verduras verdes (col, espinacas, brócoli) por su alto contenido en vitamina K.
4. En caso de la omisión accidental de una dosis, se deberá consultar al médico para un reajuste de dosis, y nunca se debe tomar doble dosis para compensar la omitida.
5. Portar una identificación que indique que se está tomando warfarina.
6. Evitar el consumo de alcohol y actividades que puedan causar una lesión traumática.
7. Acudir, de manera periódica, al médico, para vigilar el tiempo de protrombina y, de ser necesario, ajustar la dosis.

8. Informar de inmediato al médico si se presentan signos o síntomas de hemorragias, como moretones sin golpes previos, sangrado de encías, vómito con sangre, orina con sangre o heces oscuras (Rodríguez, 2013).

Reacciones adversas

El riesgo más importante y frecuente es la hemorragia, que puede ocurrir virtualmente en cualquier sitio. Los signos, síntomas y gravedad de la hemorragia varían con la localización y el grado de la hemorragia. No se ha establecido la frecuencia de efectos adversos; se ha informado de algunos casos de reacciones adversas de naturaleza idiosincrásica (Rodríguez, 2013).

Antiinflamatorios no esteroideos

Pérez et al. (2002) mencionan que los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) son un conjunto de medicamentos que tienen la particularidad de ser moléculas distintas entre ellas, debido a que se obtienen de derivados de múltiples compuestos, poseen diferentes estructuras químicas, y guardan relación en cuanto a la actividad clínica y sus efectos (p. 3).

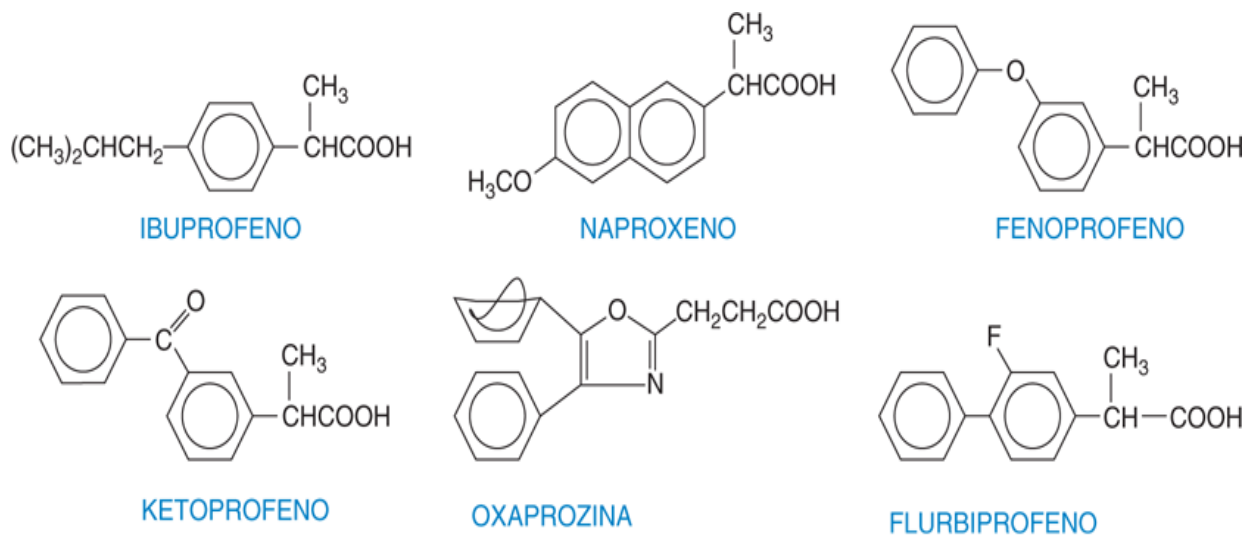
También mencionan que los antiinflamatorios no esteroideos inhiben la ciclooxigenasa 1 (COX-1) y que, al inhibir esta vía, se produce una disminución de prostaglandinas y tromboxanos; así mismo, se da la inhibición de la ciclooxigenasa 2 (cox-2), ejerciendo su actividad antiinflamatoria. Por lo general se absorben bien por vía oral, por lo que presentan porcentajes altos de unión a proteínas plasmáticas, y se excretan por filtración glomerular o secreción tubular (Pérez, López y Grau, 2002, p. 3).

Derivados del ácido propiónico

Existen diferentes familias en los AINEs; entre ellas se encuentran los derivados del ácido propiónico, inhibidores no selectivos de la ciclooxigenasa, por lo que producen una inhibición a nivel de COX-1, lo que ocasiona que se desencadenen ciertos efectos secundarios. En la figura 9

se pueden observar los distintos fármacos que pertenecen a este grupo terapéutico, entre los cuales se encuentran ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno, oxaprozina y flurbiprofeno (Goodman y Gilman, 2015, p. 637).

Figura 14. Estructuras Químicas de los Derivados del Ácido Propiónico

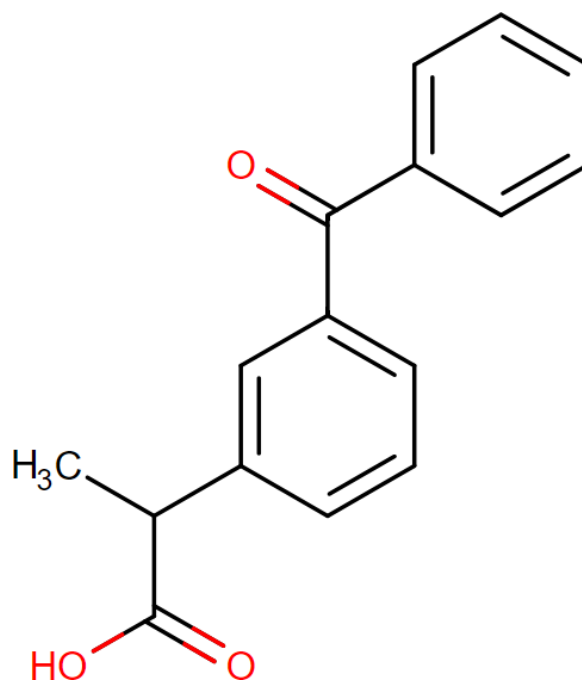


Nota: Goodman, Gilman, Hilal-Dandan y Brunton (2015).

Ketoprofeno.

El ketoprofeno fue sintetizado en Francia por los químicos de Rhône-Poulenc, en 1967, e introducido, en 1973, en Francia y Reino Unido, como un fármaco antiinflamatorio, perteneciente al grupo de los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), altamente potente y seguro del grupo derivado de ácido propiónico (Thomas y Kantor, 1986, p. 93).

Figura 15. Estructura del Ketoprofeno



Nota: Wishart (2017).

Mecanismo de acción

Sus efectos se atribuyen a su capacidad para inhibir la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos por inhibición de las ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2). También reduce la formación de tromboxano A₂, inhibe la agregación plaquetaria y prolonga el tiempo de protrombina (Rodríguez, 2013).

Farmacocinética del fármaco

Se administra por vía oral y su biodisponibilidad es del 90%. Cerca del 99% se une a proteínas plasmáticas. Se conjuga con el ácido glucurónico en el hígado y se excreta principalmente por la orina. La vida media es de aproximadamente dos horas (Rodríguez, 2013).

Indicaciones

Dolor agudo, dismenorrea, fiebre, artritis reumatoide, osteoartritis (Rodríguez, 2013).

Interacciones

La administración simultánea de otros AINE, corticosteroides o alcohol aumenta el riesgo de efectos gastrointestinales. Los antiácidos disminuyen su absorción. Incrementa el efecto de los anticoagulantes y antiplaquetarios. Puede incrementar el efecto hipoglucemiante de la insulina y sulfonilureas. Incrementa la toxicidad de ciclosporina. Reduce el efecto antihipertensivo de los inhibidores de la ECA y diuréticos. El probenecid incrementa sus concentraciones plasmáticas, incrementando el riesgo de efectos adversos (Rodríguez, 2013).

Contraindicaciones

Contraindicado en casos de hipersensibilidad al ketoprofeno o a cualquier AINE, en pacientes con asma, urticaria, insuficiencia hepática o renal, con eventos trombóticos, con úlceras gastrointestinales, en el tratamiento del dolor perioperatorio, durante el embarazo y la lactancia. Debe utilizarse con precaución en pacientes ancianos (Rodríguez, 2013).

Advertencias al paciente

1. Ingerir con los alimentos para reducir las molestias gastrointestinales.
2. No ingerir bebidas alcohólicas durante el tratamiento.
3. Informar de inmediato al médico si las molestias gastrointestinales son muy intensas, o si se presenta sangrado, oscurecimiento de las heces, edema de extremidades, reacciones cutáneas y trastornos oculares (Rodríguez, 2013).

Simulación *In vitro*

Los estudios *in vitro* intentan simular las condiciones naturales en que se realizó la observación, o al menos aproximarse a las condiciones aplicadas en los experimentos *in vivo*.

Estos experimentos son herramientas adecuadas para el estudio de mecanismos involucrados en los fenómenos observados (Fina, Lombarte y Rigalli, 2013, p. 284).

Un estudio *in vitro* muestra parcialmente el mecanismo en estudio. Las extrapolaciones que se hacen de un trabajo *in vitro* deben ser bien aclaradas en la discusión y en las conclusiones, a fin de evitar malas interpretaciones (Fina, Lombarte y Rigalli, 2013, p. 28).

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

En el presente capítulo se puntualizará la metodología realizada para la elaboración de esta investigación, así como el enfoque y el diseño que se manejará. Para esto, se analizarán el objeto del estudio y los aspectos que se investigarán de cada uno de ellos. Por último, se detallarán, paso a paso, los procedimientos utilizados para obtener los resultados de este proyecto.

Enfoque

La presente investigación tendrá un enfoque cuantitativo, al cual Hernández, Fernández y Baptista (2014) lo definen como el que: “Representa un conjunto de procesos, es secuencial y probatorio. Cada etapa precede a la siguiente y no podemos “brincar” o eludir pasos. El orden es riguroso, aunque podemos redefinir alguna fase” (p. 4), ya que se realizará un experimento en el laboratorio por medio de la manipulación de variables, donde se pretende facilitar la visualización sobre la unión a proteínas y la variación en el volumen de distribución, que presentan los fármacos empleados de forma concomitante, tratando de dar una respuesta a la pregunta y la hipótesis planteada.

Método

El diseño de esta investigación es de tipo experimental. Según Hernández et al. (2014), un diseño es experimental cuando: “el investigador pretende establecer el posible efecto de una causa que se manipula” (p.129). La variación en el volumen de distribución por el desplazamiento de dos fármacos usados de forma conjunta se comprobará por métodos realizados en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas.

Instrumentos

Los instrumentos y procedimientos utilizados en la Universidad Internacional de las Américas son los siguientes:

Preparación de la solución de buffer de fosfatos a pH 7,4

Equipo

Espátula

Balanza granataria digital

pHmetro

2 beaker 1000mL

2 pastillas de agitación

2 agitadores magnéticos

Envase previamente lavado y rotulado

Reactivos

Agua destilada

Fosfato de potasio (KH_2PO_4)

Fosfato disódico (Na_2HPO_4)

Buffer de fosfatos pH 12

Procedimiento

Se prepararon alrededor de 10 litros de solución buffer de fosfatos a un pH 7.4, medidos con el pHmetro, el cual debió ser previamente calibrado con las sustancias buffer correspondientes, y se envasó y rotuló para su uso. Las siguientes instrucciones corresponden a dos litros de solución:

Se pesaron 9,08g de KH_2PO_4 , en una balanza granataria digital, se colocaron en un beaker de 1000mL con 500mL de agua destilada y agitación constante; luego se pesaron 11,48g de Na_2HPO_4 y se agregaron a un beaker de 1000mL con 500mL de agua destilada hasta lograr disolver por completo las dos soluciones; luego se les agregó a ambos beakers 500mL de agua destilada; posteriormente se mezclaron las dos soluciones, y con el pHmetro se midió el pH; por último, con el buffer de fosfatos pH 12 se ajustó el pH, hasta llegar a 7,4.

Preparación de Curva de Calibración para la Albúmina Sérica Humana

Equipo

5 Balones aforados 50mL

Jeringa de 10mL

1 pipeta graduada de 25mL

1 pipeta graduada de 10mL

1 pera

1 celda de cuarzo de 1cm

Espectrofotómetro UV-VIS

Reactivos

Albúmina sérica humana (Albunorm® 20%)

Solución buffer de fosfatos pH 7,4

Procedimiento

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

Con una jeringa se extrajeron 10mL del frasco de Alburnorm® al 20%, y se depositaron en balón aforado de 50mL; se aforó con solución buffer de fosfatos pH 7,4, obteniéndose una concentración al 4%.

Preparación de la curva de calibración de la albúmina sérica humana.

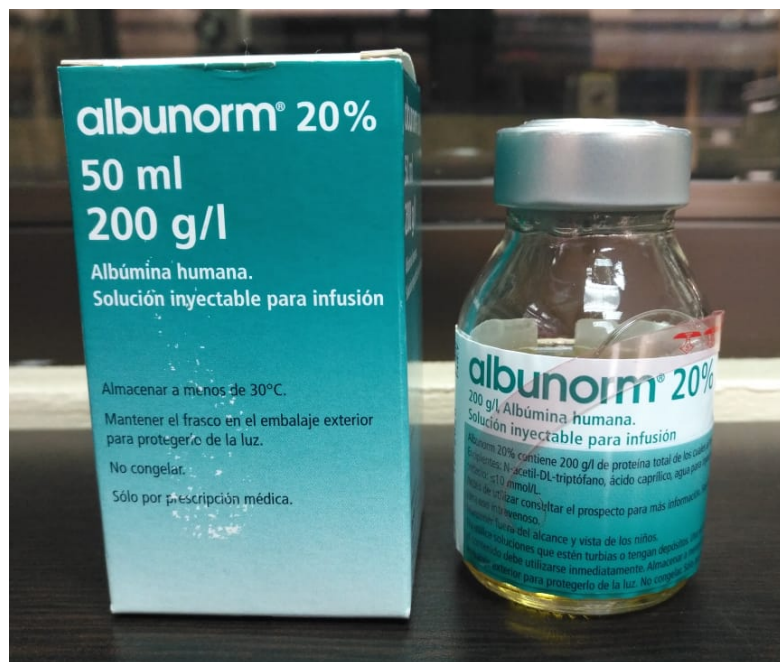
De la disolución al 4% se tomaron las siguientes alícuotas:

- Se tomaron 25mL con pipeta graduada de 25mL y se llevó a aforo en balón aforado de 50mL, para obtener una concentración de 2%.
- Se tomaron 12,5mL con pipeta graduada de 25mL y se llevó a aforo en balón aforado de 50mL, para obtener una concentración de 1%.
- Se tomaron 6,3mL con pipeta graduada de 10mL y se llevó a aforo en balón aforado de 50mL, para obtener una concentración de 0,5%.

De la disolución al 0.5 % se tomaron 10 mL y se llevó a aforo en un balón de 50 mL con buffer de fosfatos pH 7.4, para obtener una concentración de 0.1% .

Se efectuó el espectro de absorción a cada una de las disoluciones para obtener la longitud de onda, para esto se utilizó un espectrofotómetro UV-VIS, una celda de cuarzo de 1cm, como blanco la solución buffer de fosfatos pH 7,4.

Figura 16. Albunorm® 20%



Nota: Elaboración propia (2018).

Curva de Calibración

Equipo

Balanza analítica

Espectrofotómetro UV-VIS

14 balones aforados 25mL

1 balón aforado 50mL

1 balón aforado 100mL

1 embudo de espiga

Papel filtro

1 espátula

1 pipeta graduada 10mL

1 pipeta graduada 5mL

1 pera

1 celda de cuarzo de 1 cm

Reactivos

Estándar de Ketoprofeno

Solución buffer de fosfatos pH 7,4

Warfarina (Apo®-Warfarina)

Procedimiento

Preparación estándar madre de Ketoprofeno.

Se tomó un balón aforado de 100mL y se colocaron 10mg del estándar pesados en balanza analítica, se llevó a aforo con solución buffer de fosfatos de pH 7.4, obteniendo la muestra madre a una concentración de 0,1mg/mL;

Preparación de la curva de calibración de ketoprofeno.

Una vez preparada la disolución madre se tomaron las siguiente alícuotas:

- Se tomaron 0,3mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 1mg/L.
- Se tomaron 1,3mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 5mg/L.
- Se tomaron 2,5mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 10mg/L.
- Se tomaron 3,8mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 15mg/L.
- Se tomaron 5mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 20mg/L.

- Se tomaron 6,3mL con pipeta graduada de 10mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 25mg/L.
- Se tomaron 7,5mL con pipeta graduada de 10mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 30mg/L.

Se leyeron las absorbancias en un espectrofotómetro UV-VIS, utilizando una celda de cuarzo de 1cm a una longitud de onda de 258 nm, se empleo la solución buffer de fosfatos pH 7,4 como blanco y se realizó una gráfica de absorbancia versus concentración.

Figura 17. Balones utilizados en la curva de calibración del Ketoprofeno



Nota: Elaboración propia (2018).

Curva de Calibración de la Warfarina

Se tomó un balón aforado de 50mL y se colocaron 5mg de la warfarina previamente triturados, se llevó a aforo con solución buffer de fosfatos de pH 7.4, obteniendo una

concentración madre de 0,1mg/mL; posteriormente se filtró la solución empleando un embudo y papel filtro.

Preparación de la curva de calibración de warfarina.

Se tomaron las siguientes alícuotas de esa solución madre:

- Se tomaron 0,3mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 1mg/L.
- Se tomaron 1,3mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 5mg/L.
- Se tomaron 2,5mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 10mg/L.
- Se tomaron 3,8mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 15mg/L.
- Se tomaron 5mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 20mg/L.
- Se tomaron 6,3mL con pipeta graduada de 10mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 25mg/L.
- Se tomaron 7,5mL con pipeta graduada de 10mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 30mg/L.

Se leyeron las absorbancias por medio de un espectrofotómetro UV-VIS, utilizando una celda de cuarzo de 1cm a una longitud de onda de 315 nm, se empleo la solución buffer

de fosfatos pH 7,4 como blanco y se realizó una gráfica de absorbancia versus concentración.

Figura 18. Balones utilizados en la curva de calibración de la Warfarina



Nota: Elaboración propia (2018).

Optimización de las Concentraciones de los Fármacos

Procedimiento

Preparación de la disolución de albúmina al 0.1%.

Se tomaron 10 mL de Alburnorm® 20% y se llevaron a aforo en un balón de 2000 mL con la solución buffer pH 7,4.

Realización experimental, sistema sin eliminación.

1. Se colocó un beaker de 250 mL sobre un agitador magnético, se le agregaron 100 mL de solución buffer de fosfatos de pH 7,4 y 25 mL de ketoprofeno. Se mantuvo en agitación a 60 rpm y se tomaron muestras de 5mL cada 10 minutos durante 2 horas.
2. En otro beaker de 250 mL se agregaron 100 mL de la solución de albúmina al 0,1% y 25 mL de ketoprofeno. Con una agitación de 60 rpm y se tomaron muestras de 5mL cada 10 minutos durante 2 horas.
3. Se puso un beaker de 250 mL sobre un agitador magnético, se añadieron 100 mL de solución buffer y 25 mL de warfarina. A una agitación de 60 rpm y se tomaron muestras de 5mL cada 10 minutos durante 2 horas.
4. En un agitador magnético se colocó un beaker de 250 mL, se adicionaron 100 mL de la solución de albúmina al 0,1% y 25 mL de warfarina. Se mantuvo en agitación a 60 rpm y se tomaron muestras de 5mL cada 10 minutos durante 2 horas.

La longitud de onda para realizar la lectura de las muestras fue de 258 nm para el ketoprofeno y 315 nm para la warfarina.

Modelo para Simulación de la Unión de Fármacos a Proteína Plasmática

Equipo

5 beakers 250mL	80 jeringas 5mL
5 beakers 1000mL	Cronómetro
5 kitsato 250mL	5 bombas de inmersión de 600 Lh ⁻¹ de capacidad
5 agitador magnético	

5 pastillas de agitación

Probeta 50mL

Espectrofotómetro UV-VIS

Reactivos

Ketoprofeno (Profenid[®])

Warfarina (Apo[®]-Warfarina)

Solución buffer de fosfatos pH 7,4

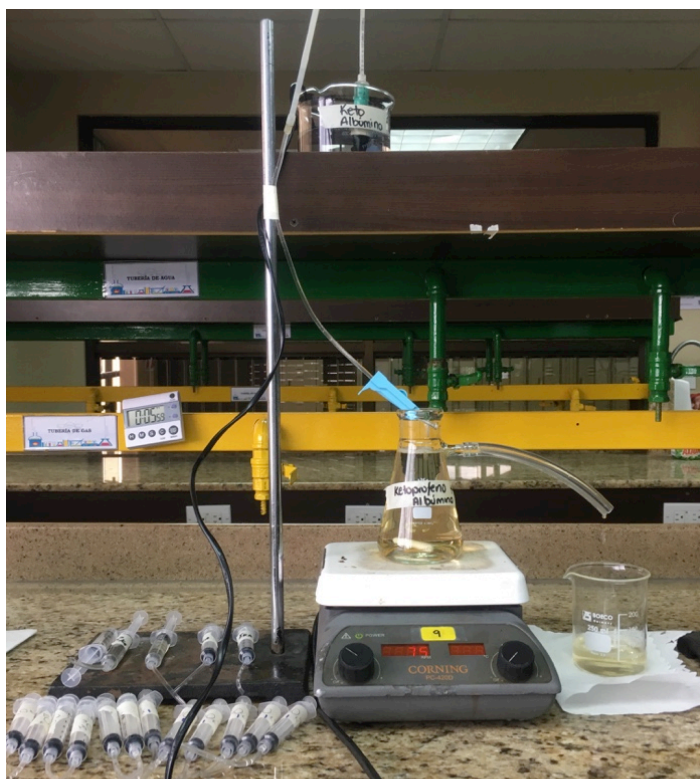
Solución de albúmina al 0,1%

Procedimiento

Se ensambló el equipo de la misma manera para cinco sistemas, con el fin de visualizar el comportamiento de cada fármaco, de la siguiente manera:

Sobre un agitador magnético se colocó un kitasato de 250mL con un pastilla de agitación, el cual representó el compartimento central. En la parte superior de la mesa se ubicó un beaker de 1000mL con la bomba de inmersión. Se puso un beaker de 250mL en la salida del kitasato, para simular la excreción. (veáse la figura 19).

Figura 19. Ejemplo del Ensamblaje del Equipo

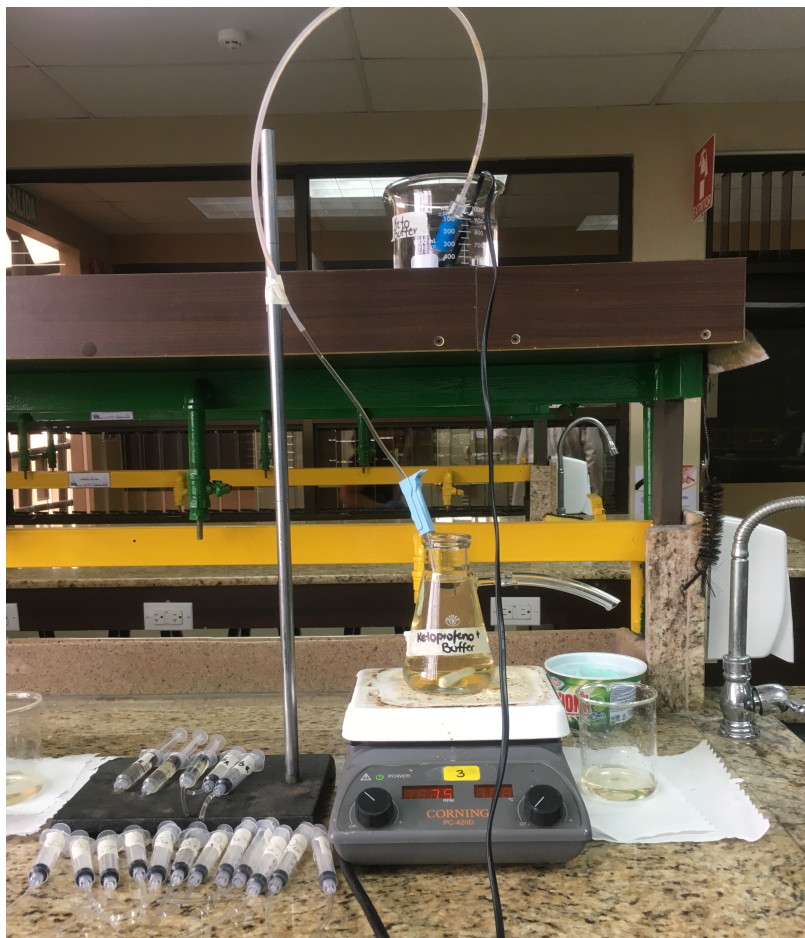


Nota: Elaboración propia (2018).

Luego del ensamble del equipo, se procedió a llenar el beaker de 1L colocado en la parte superior de la mesa de trabajo. Seguidamente, se encendió la bomba de inmersión para regular la velocidad de flujo mediante el regulador de rodillo ajustando el flujo a 20mL/min. Después de regular la velocidad de eliminación, se procedió a adicionar las dosis a cada sistema a utilizar:

1. Sistema ketoprofeno- solución buffer de fosfatos a pH 7,4: se agregaron al kitasato 200mL de solución buffer de fosfatos a pH 7,4 y 5mL de ketoprofeno (Profenid®), con agitación a 60 rpm. (véase la figura 20).

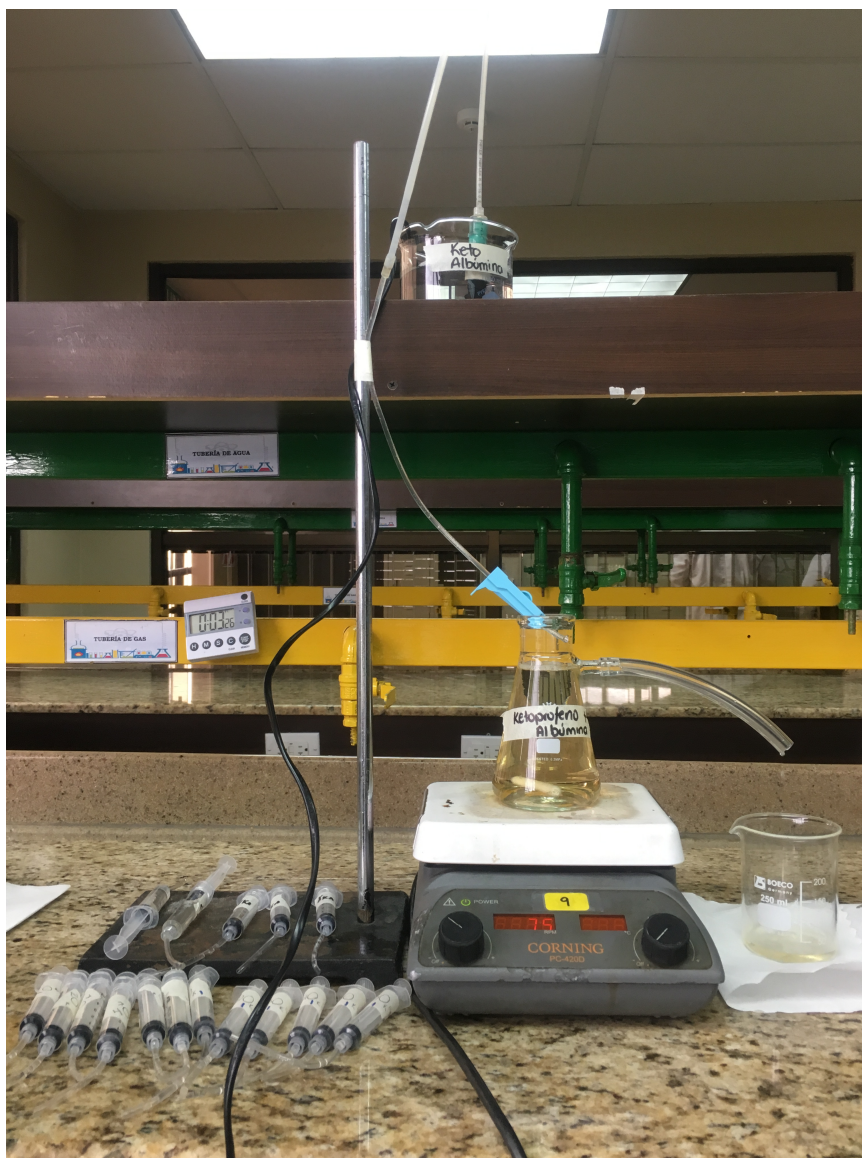
Figura 20. Sistema *in vitro* del Ketoprofeno en Solución Buffer de Fosfatos a pH 7,4



Nota: Elaboración propia (2018).

2. Sistema ketoprofeno- solución de albúmina al 0,1%: se adicionaron al kitasato 200mL de solución de albúmina 0,1 % y 5mL de ketoprofeno (Profenid®), con agitación a 60 rpm. (véase la figura 21).

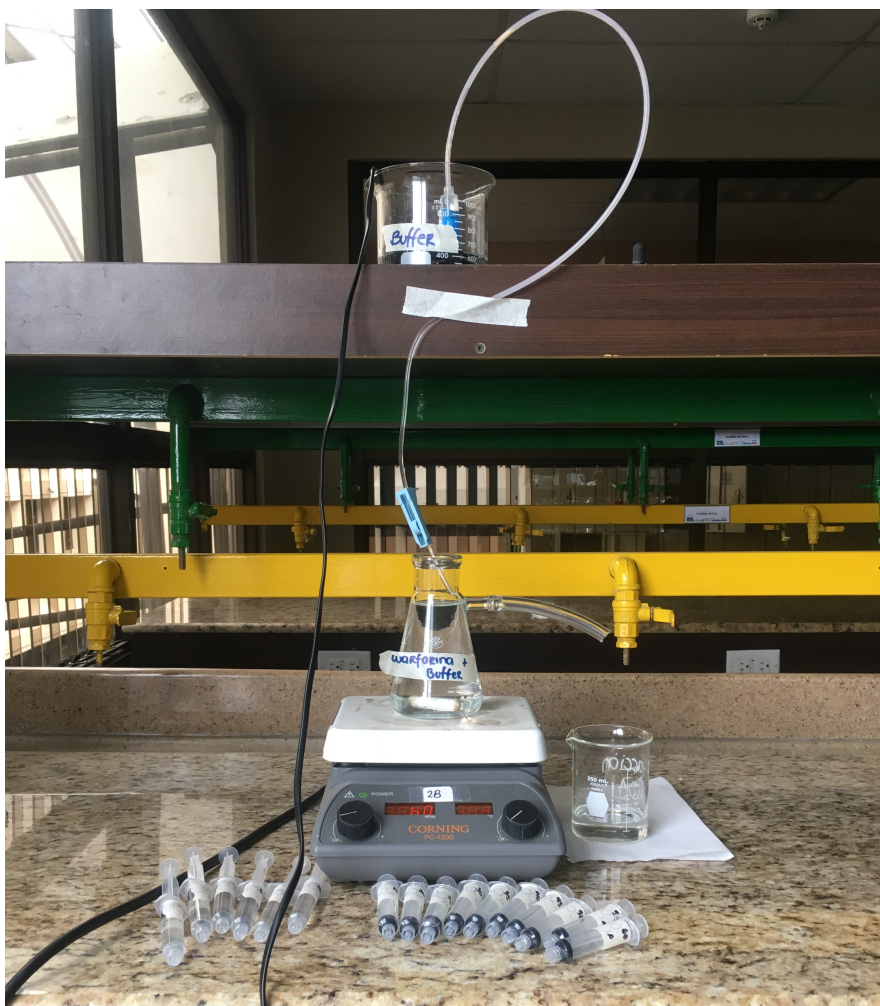
Figura 21. Sistema *in vitro* del Ketoprofeno en Solución de Albúmina al 0,1%



Nota: Elaboración propia (2018).

3. Sistema warfarina- solución buffer de fosfatos a pH 7,4: se agregaron al kitasato 150mL de solución buffer y 50mL de la disolución de warfarina con concentración 0,1mg/mL y con agitación a 60 rpm. (véase la figura 22).

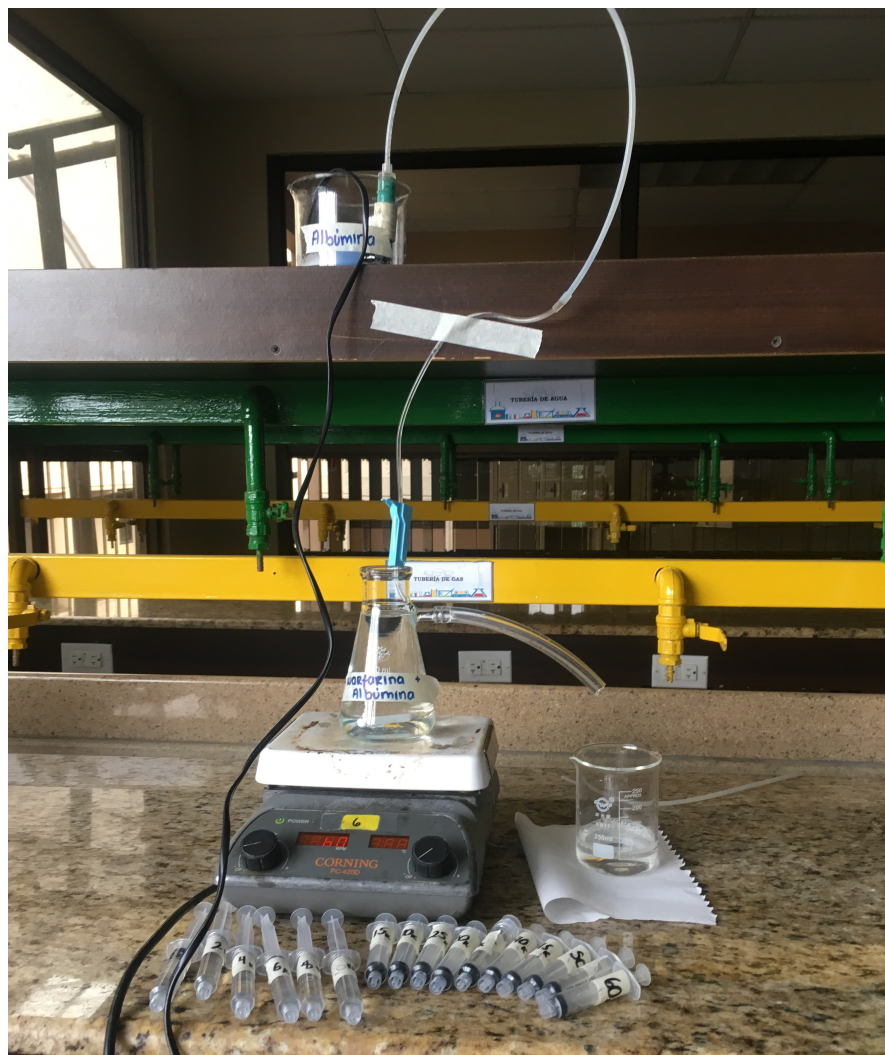
Figura 22. Sistema *in vitro* de la Warfarina en Solución Buffer de Fosfatos a pH 7,4



Nota: Elaboración propia (2018).

4. Sistema warfarina- solución de albúmina al 0,1%: se agregaron al kitasato 150mL de solución de albúmina al 0,1% y 50mL de la disolución de warfarina con concentración 0,1mg/mL y con agitación a 60 rpm. (véase la figura 23).

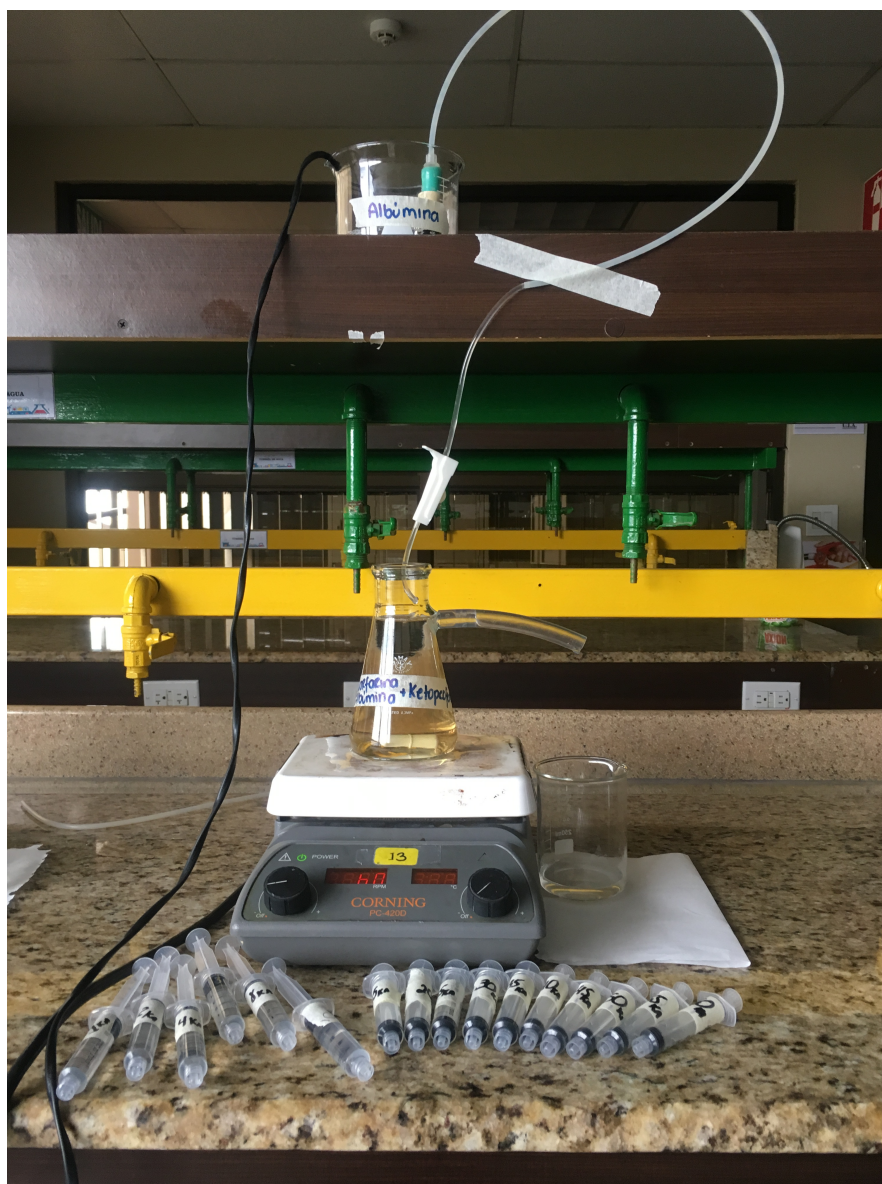
Figura 23. Sistema *in vitro* de la Warfarina en Solución de Albúmina al 0,1%



Nota: Elaboración propia (2018).

5. Sistema warfarina- solución de albúmina al 0,1%- ketoprofeno: se agregaron al kitasato 150mL de solución de albúmina al 0,1% y 50mL de la disolución de warfarina con concentración 0,1mg/mL y con agitación a 60 rpm., luego de 10 minutos se adicionaron 5mL de ketoprofeno (Profenid®). (véase la figura 24).

Figura 24. Sistema *in vitro* de la Warfarina con Ketoprofeno en Solución de Albúmina al 0,1%



Nota: Elaboración propia (2018).

Se tomaron muestras de 5mL a los siguientes tiempos: 1min, 2min, 4min, 6min, 8min, 10min, 15min, 20min, 25min, 30min, 35min, 40min, 45min, 50min, 55min, 60min. La longitud de onda para realizar la lectura de las muestras fue de 258nm para el ketoprofeno y 315nm para la warfarina. El procedimiento para cada sistema se realizó por triplicado.

CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Este capítulo pretende aportar datos que den seguimiento a los objetivos planteados en la presente investigación, con la finalidad de tener una respuesta del problema planteado inicialmente, con el objeto de simular *in vitro* el cambio de volumen de distribución y el desplazamiento de la warfarina y el ketoprofeno, al utilizar una solución de albúmina al 0,1% y una solución buffer de fosfatos a pH 7,4.

Optimización del medio de disolución a emplear

A la hora de seleccionar el disolvente adecuado se pensó en tres opciones, las cuales fueron: agua destilada, NaOH 0,1M y solución buffer de fosfatos a pH 7,4.

Se consideró el agua destilada, ya que, es uno de los reactivos más comunes y es considerado como disolvente universal, a pesar de ser un buen disolvente, limita la cantidad de fármaco que puede usarse, esto conlleva a que no se disuelva por completo y produzca absorbancias muy altas, haciendo que se deba diluir las concentraciones del fármaco.

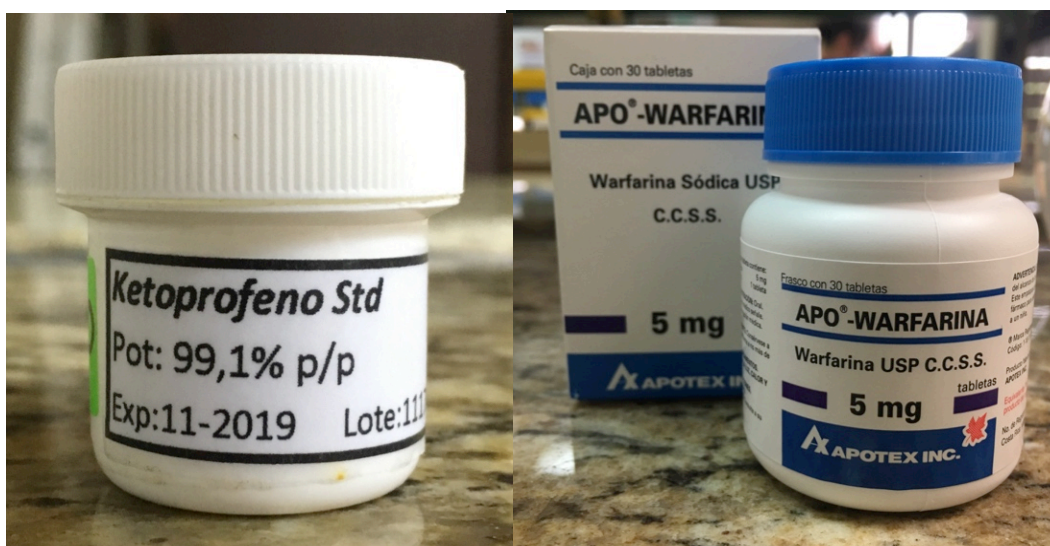
El fármaco, al disolverlo con el NaOH 0,1M, produce la sal sódica lo que favorece la solubilidad del fármaco; sin embargo, al mezclar el NaOH 0,1M con la albúmina produce una desnaturalización de la proteína, por lo que, se genera la ruptura de los enlaces disulfuro formados por los aminoácidos de cisteína y puentes de hidrógeno, haciendo que se pierdan las funciones como la viscosidad y la facilidad con que se cristaliza la albúmina, por esta razón se descarta (Barrios, Gomes y Trillo, 2017).

Por último, se probó con la solución buffer de fosfatos a pH 7,4; esta fue la solución que se escogió, debido a que simula mejor las condiciones del plasma. Según la USP 38, se disuelven los fármacos y la albúmina siendo el medio adecuado para emplearse como medio de disolución (USP 38, 2015).

Curva de calibración

Para la realización de las curvas de calibración de cada fármaco se utilizaron estándares de referencias, aunque solo se pudo utilizar el estándar de ketoprofeno, debido a que el estándar de warfarina, por su alto costo, fue imposible conseguirlo, por lo que, se optó por emplear el fármaco de warfarina (véase la figura 25).

Figura 25. Estándares de Referencia utilizados de Ketoprofeno (Profenid®) y Warfarina



Nota: Elaboración propia (2018).

La curva de calibración de ketoprofeno se realizó utilizando un estándar de ketoprofeno, y para elaborar la solución madre se agregó una solución buffer de fosfatos a un pH 7,4, debido a que esta solución simula de una mejor manera las condiciones fisiológicas.

La USP 38 (2015) indica que la longitud de onda a utilizar en el espectrofotómetro UV-VIS es de 258nm, utilizando como blanco una solución buffer de fosfatos de pH 7,4. Posteriormente, se analizó la curva de calibración a esta misma longitud de onda (p. 4392).

La curva de calibración con el ketoprofeno demostró un ajuste lineal; se determinó la ecuación de la curva mediante una regresión lineal. La ecuación conseguida fue empleada para el

cálculo de las concentraciones obtenidas en los sistemas utilizados a partir de las absorbancias medidas. Los valores estadísticos y los resultados obtenidos de las curvas se muestran en las tablas 5 y 6, y en la figura 26 se muestra el gráfico de la absorbancia en función de la concentración.

Tabla 5. Resultados Obtenidos para la Curva de Calibración del Ketoprofeno

Concentración (mg/L)	Balón (mL)	Alícuotas (mL)	Absorbancia
1	25	0,3	0,081
5		1,3	0,230
10		2,5	0,434
15		3,8	0,609
20		5,0	0,788
25		6,3	0,991
30		7,5	1,155

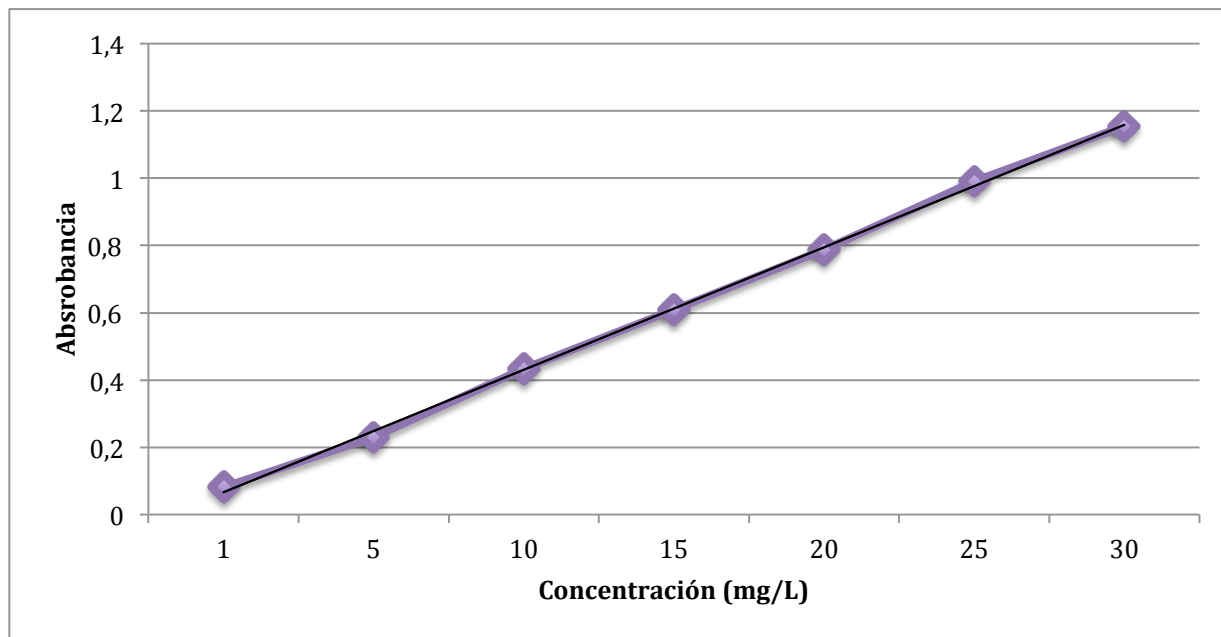
Nota: Elaboración propia (2018).

Tabla 6. Resultados Estadísticos de la Curva de Calibración del Ketoprofeno

R²	0,9991
Intercepto	0,0492
Pendiente	0,0372

Nota: Elaboración propia (2018).

Figura 26. Representación de la Absorbancia en Función de la Concentración de Ketoprofeno Obtenida en la Curva de Calibración



Nota: Elaboración propia (2018).

La curva de calibración, tanto del ketoprofeno como de la warfarina, se realizó con base en la cantidad de fármaco total que se va a utilizar en la simulación del sistema *in vitro*. Para las dos curvas se utilizó el mismo medio de disolución, ya que, de no ser así, no sería cuantificable. Es necesario utilizar el mismo disolvente cuando se comparan espectros de absorción con fines de identificación (Skoog, *et al.*, 2001).

La curva de calibración de la warfarina se realizó utilizando el medicamento, y debido a la carencia del patrón por su alto costo, se utilizó una solución buffer de fosfatos a un pH 7,4; se filtró la solución madre obtenida, ya que, los excipientes no son solubles y podrían producir interferencias a la hora de la lectura.

La USP 38 (2015) indica que la longitud de onda a utilizar en el espectrofotómetro UV-VIS es de 380nm en una solución alcalina de NaOH. Debido que se utilizaría un buffer de fosfatos a un pH de 7,4, se prefirió realizar un espectro de absorción para conocer la longitud de onda exacta, dando como resultado una longitud de 315nm. La solución buffer de fosfatos de pH

7,4 se empleó como blanco, y por último se analizó la curva de calibración a esta misma longitud de onda (p. 6233).

Por medio de una regresión lineal, se obtuvo la ecuación correspondiente de la curva de calibración, demostrando un ajuste lineal. Los resultados obtenidos de las curvas se muestran en las tablas 7 y 8, y en la figura 27 se puede observar el gráfico de la absorbancia en función de la concentración.

Tabla 7. Resultados Obtenidos para la Curva de Calibración Obtenida para la Warfarina

Concentración (mg/L)	Balón (mL)	Alícuotas (mL)	Absorbancia
1	25	0,3	0,038
5		1,3	0,164
10		2,5	0,306
15		3,8	0,415
20		5	0,552
25		6,3	0,674
30		7,5	0,786

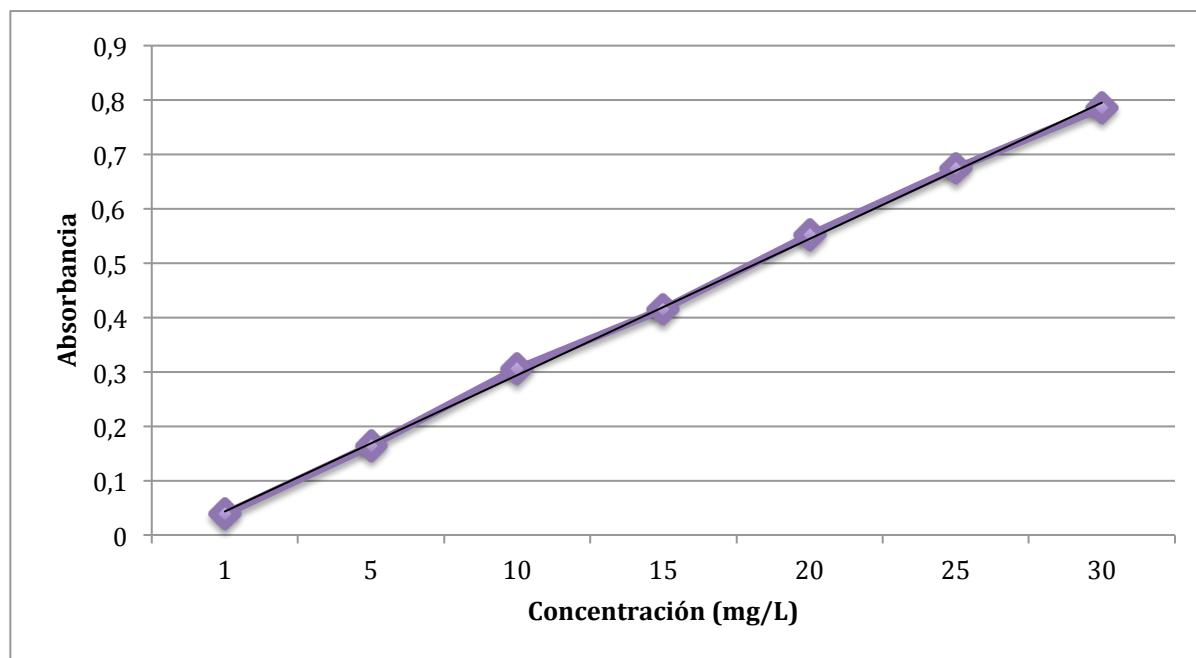
Nota: Elaboración propia (2018).

Tabla 8. Resultados Estadísticos de la Curva de Calibración de la Warfarina

R²	0,9992
Intercepto	0,0317
Pendiente	0,0256

Nota: Elaboración propia (2018).

Figura 27. Representación de la Absorbancia en Función de la Concentración de Warfarina Obtenida en la Curva de Calibración



Nota: Elaboración propia (2018).

Optimización de la concentración de albúmina

A partir de la solución de albúmina sérica humana (Albunorm® 20 %) se prepararon disoluciones para obtener una concentración adecuada para el análisis. Se realizó un barrido para conocer la longitud de onda apropiada, y esta fue de 280nm (véase la tabla 9).

Tabla 9. Optimización de la Concentración de Albúmina

Porcentaje masa/volumen de albúmina (%)	Absorbancia
4,0	1,432
2,0	1,387
1,0	1,292
0,5	1,244
0,1	0,706

Nota: Elaboración propia (2018).

Al analizar las absorbancias se puede observar, que la disolución de albúmina al 0,5% tiene una absorbancia alta; por lo que, se procedió a diluirla hasta obtener una concentración de 0,1%. Con la nueva concentración se obtuvo una absorción máxima de 0,706 a una longitud de onda de 280nm; conociendo así la concentración óptima de albúmina.

Verificación de la unión de la albúmina al fármaco

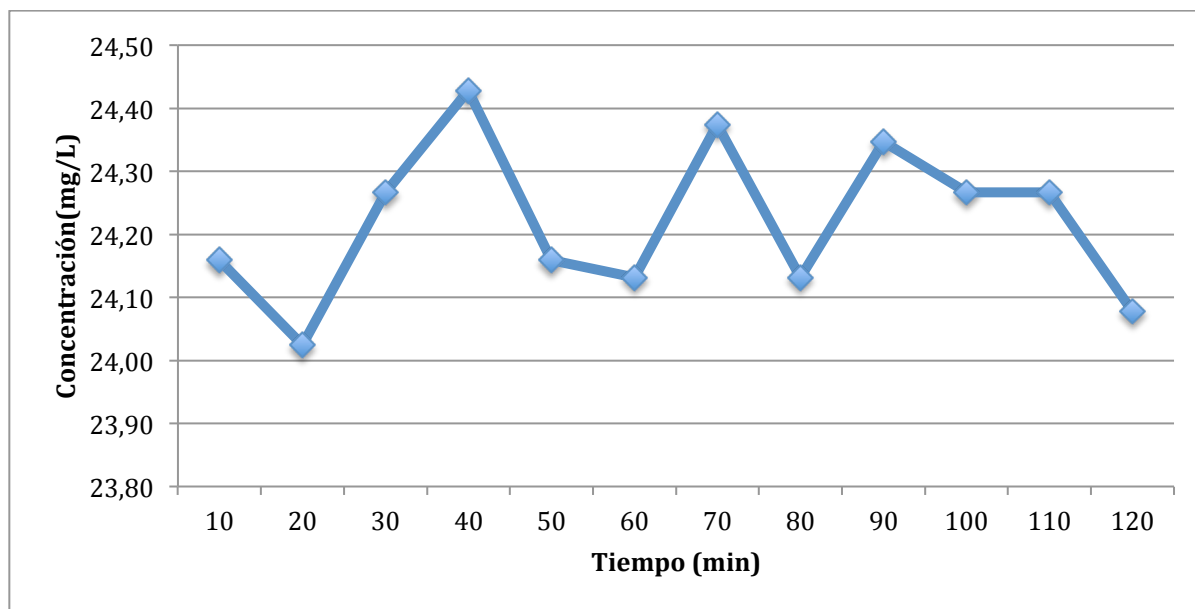
Para verificar la unión de la proteína al fármaco se realizó para el ketoprofeno, una simulación sin eliminación en un beaker de 250mL, donde se le añadieron 100mL de solución buffer de fosfatos a pH 7,4, con 2,5mg del fármaco, como se mencionó en la metodología (véase la tabla 10). En la figura 28, se observó que las concentraciones de ketoprofeno en solución buffer de fosfatos se mantuvieron aproximadamente constantes este sistema se realizó sin eliminación, debido que se efectuó con el fin de observar una diferencia entre el sistema con la solución buffer simulando el plasma sin albúmina y el sistema con la solución de albúmina.

Tabla 10. Determinación de las Concentraciones del Ketoprofeno con la Solución Buffer de Fosfatos de pH 7,4 en Sistema sin Eliminación

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mg/L)
10	0,948	24,16
20	0,943	24,02
30	0,952	24,27
40	0,958	24,49
50	0,948	24,16
60	0,947	24,13
70	0,956	24,37
80	0,947	24,13
90	0,955	24,35
100	0,952	24,27
110	0,952	24,27
120	0,945	24,09

Nota: Elaboración propia (2018).

Figura 28. Comportamiento de la Concentración del Ketoprofeno en Función del Tiempo en la Solución Buffer de Fosfatos a pH 7,4 en Sistema sin Eliminación



Nota: Elaboración propia (2018).

Para el segundo, se realizó en un beaker de 250mL, donde se le adicionaron 100mL de la solución de albúmina al 0,1%, con 2,5mg del fármaco, con una velocidad de agitación de 60rpm, y se sacaron muestras cada 10 minutos, para verificar la unión del fármaco a la albúmina, por medio de la disminución de la concentración plasmática hasta llegar a ser constantes, indicando que se llegó a un equilibrio (véase la tabla 11).

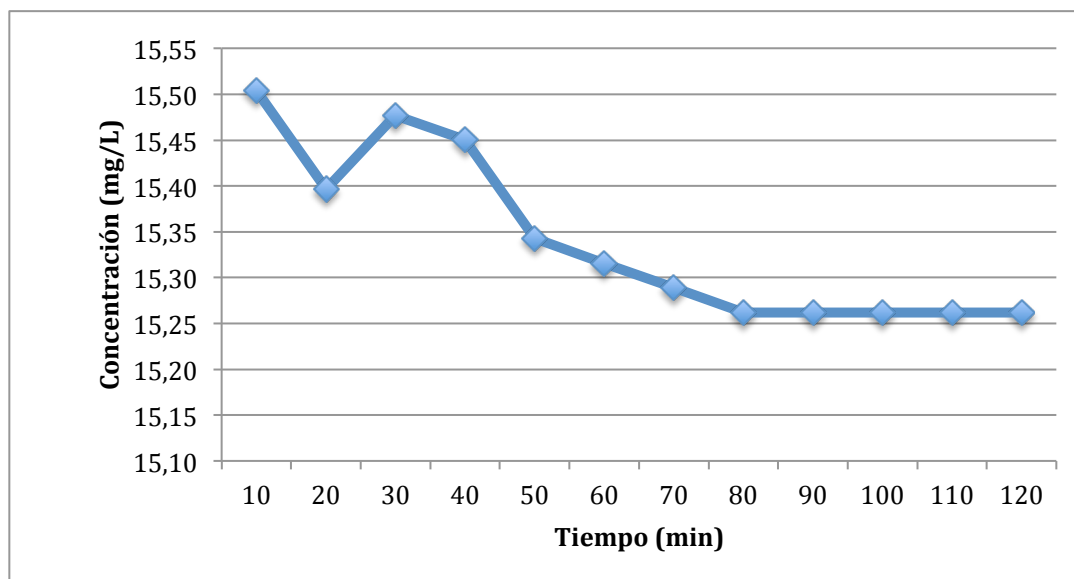
La unión a proteínas es un proceso reversible y favorecido por la liposolubilidad del fármaco, por lo que la proteína del plasma es saturable; esto se puede observar en la figura 29, donde se observa que la concentración se vuelve constante al minuto 80, y el sistema empleado no posee ningún tipo de eliminación (Velázquez, 2008, p. 28).

Tabla 11. Determinación de las Concentraciones del Ketoprofeno Libre en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema sin Eliminación

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mg/L)
10	0,626	15,50
20	0,622	15,40
30	0,625	15,48
40	0,624	15,45
50	0,620	15,34
60	0,619	15,32
70	0,618	15,29
80	0,617	15,26
90	0,617	15,26
100	0,617	15,26
110	0,617	15,26
120	0,617	15,26

Nota: Elaboración propia (2018).

Figura 29. Comportamiento de la Concentración del Ketoprofeno Libre en Función del Tiempo en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema sin Eliminación



Nota: Elaboración propia (2018).

Asimismo, para verificar la unión de la albúmina al fármaco en este caso, para la warfarina; en el primer sistema se utilizó un beaker de 250mL, se le agregaron 100mL de solución buffer de fosfatos a pH 7,4, con 2,5mg de warfarina, a una velocidad de agitación de 60rpm y tomándose muestras cada 10 minutos, para observar cómo se comporta el fármaco sin la presencia de albúmina (véase la tabla 12).

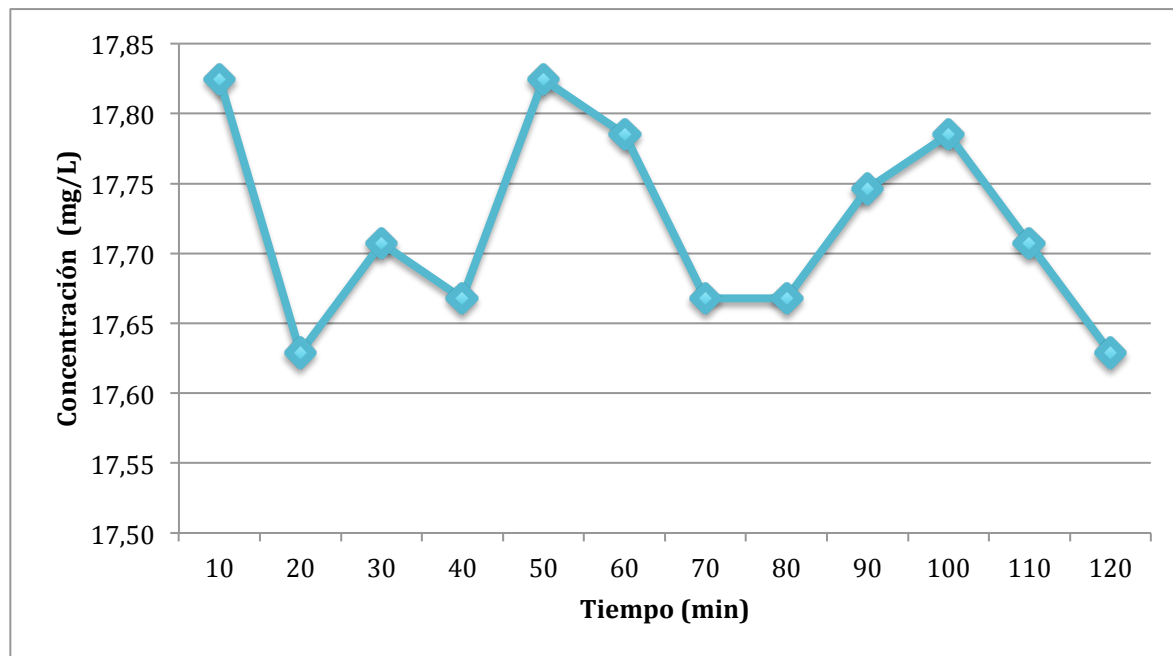
En la figura 30, se observó que las concentraciones de warfarina en solución buffer de fosfatos pH 7,4 se mantuvieron aproximadamente constantes, debido a que la simulación no posee eliminación con el fin de notar una diferencia entre el sistema con la solución buffer simulando el plasma sin albúmina y el sistema con la solución de albúmina.

Tabla 12. Determinación de las Concentraciones de la Warfarina con Solución Buffer de Fosfatos a pH 7,4 en Sistema sin Eliminación

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mg/L)
10	0,488	17,82
20	0,483	17,63
30	0,485	17,71
40	0,484	17,67
50	0,488	17,82
60	0,487	17,79
70	0,484	17,67
80	0,484	17,67
90	0,486	17,75
100	0,487	17,79
110	0,485	17,71
120	0,483	17,63

Nota: Elaboración propia (2018).

Figura 30. Comportamiento de la Concentración de Warfarina en Función del Tiempo en la Solución Buffer de Fosfatos a pH 7,4 en Sistema sin Eliminación



Nota: Elaboración propia (2018).

En el otro sistema, al beaker de 250mL se le adicionaron 100mL de la solución de albúmina al 0,1%, con 2,5mg de warfarina, a una velocidad de agitación de 60rpm, y se tomaron muestras cada 10 minutos, para verificar la unión del fármaco a la albúmina, por medio de la disminución de la concentración plasmática hasta llegar a ser constantes (véase la tabla 13).

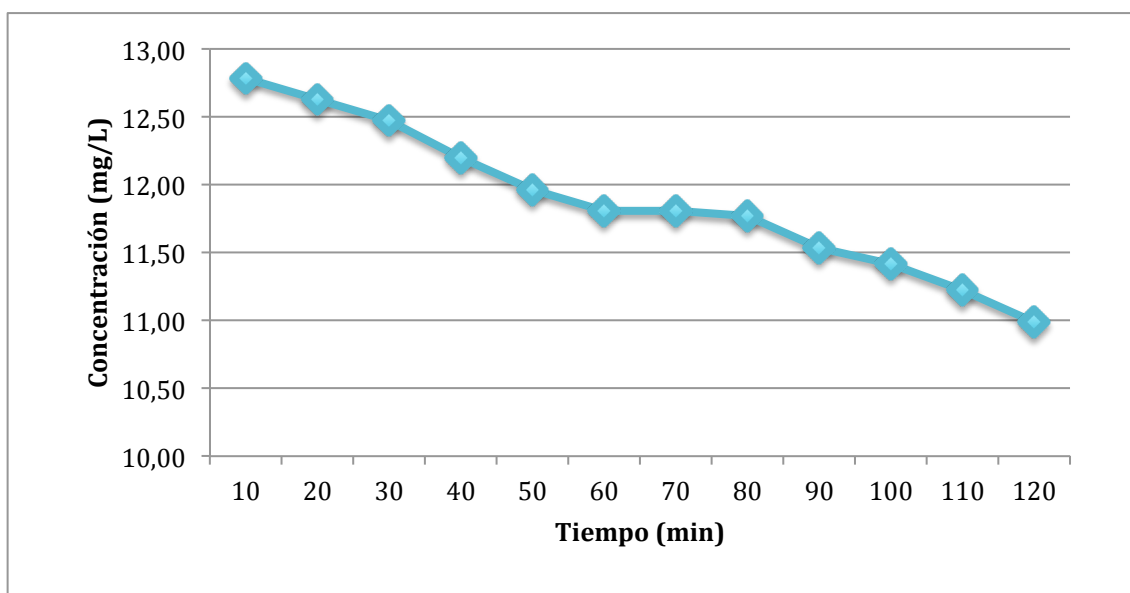
Esto se realizó para observar cuán rápida es la unión a la proteína plasmática utilizada, y así saber en qué momento se podría administrar el otro fármaco. En la figura 31, se logra visualizar una disminución de la concentración plasmática de la warfarina por la unión fármaco-proteína.

Tabla 13. Determinación de las Concentraciones de Warfarina Libre en Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema sin Eliminación

Tiempo (min)	Absorbancia	Concentración (mg/L)
10	0,359	12,79
20	0,355	12,63
30	0,351	12,47
40	0,344	12,20
50	0,338	11,96
60	0,334	11,81
70	0,334	11,81
80	0,333	11,77
90	0,327	11,54
100	0,324	11,42
110	0,319	11,22
120	0,313	10,99

Nota: Elaboración propia (2018).

Figura 31. Comportamiento de la Concentración de Warfarina Libre en Función del Tiempo en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema sin Eliminación

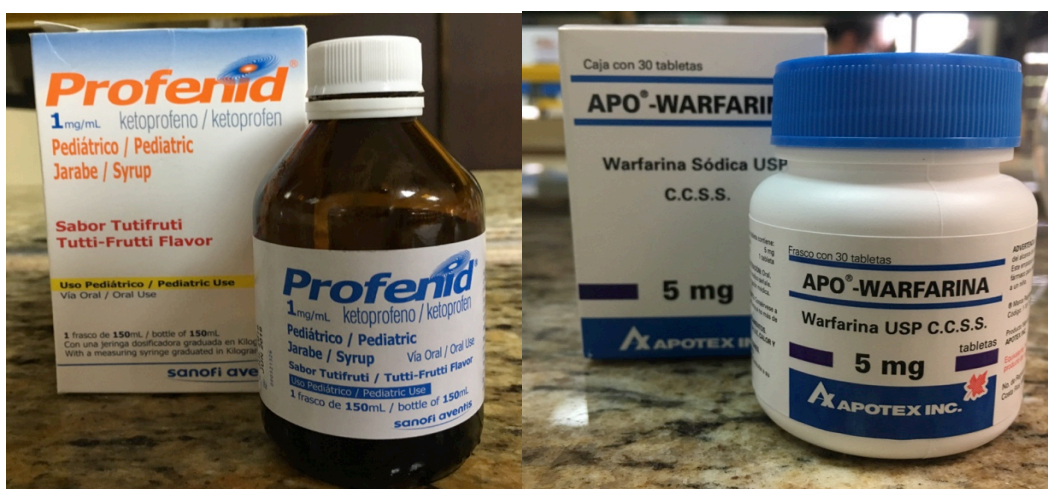


Nota: Elaboración propia (2018).

Modelo para Simulación de la Unión de Fármacos a Proteína Plasmática

En la figura 32, se muestran los medicamentos por utilizar para la simulación *in vitro*, siendo estos el ketoprofeno (como jarabe marca Profenid®) y la warfarina (como tabletas marca Apo® - Warfarina).

Figura 32. Medicamentos utilización de la simulación



Nota: Elaboración propia (2018).

El ketoprofeno es un antiinflamatorio no esteroideo que cuenta con presentación oral (Rodríguez, 2013). Se puede observar cómo la concentración plasmática del ketoprofeno con la solución buffer de fosfatos a pH 7,4 disminuye conforme pasa el tiempo de forma considerable (véase la tabla 14).

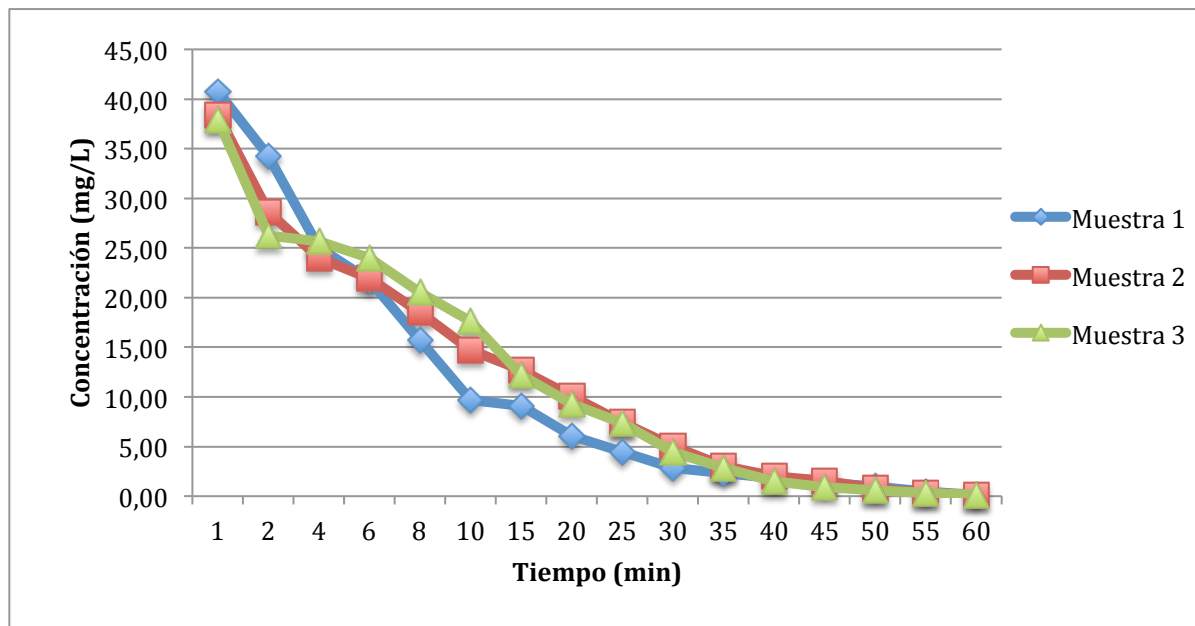
Como se observa en la figura 33, tras la administración de una dosis única de fármaco, este se distribuye en el organismo de forma instantánea y homogénea, y se elimina siguiendo una cinética de primer orden, se realizó por triplicado para observar la reproducibilidad del sistema.

Tabla 14. Sistema *in vitro* para Determinar la Concentración del Ketoprofeno con la Solución Buffer de Fosfatos de pH 7,4 en Sistema con Eliminación

Muestra	1	2	3
Tiempo (min)	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/L)
1	40,74	38,35	37,92
2	34,27	28,62	26,23
4	25,05	24,02	25,69
6	21,71	21,93	23,97
8	15,69	18,54	20,50
10	9,67	14,70	17,63
15	9,08	12,74	12,20
20	6,07	10,07	9,27
25	4,46	7,41	7,33
30	2,87	5,05	4,43
35	2,36	3,06	2,82
40	1,79	2,01	1,47
45	1,39	1,53	0,91
50	0,99	0,77	0,59
55	0,45	0,32	0,32
60	0,13	0,123	0,13

Nota: Elaboración propia (2018).

Figura 33. Comportamiento de la Concentración del Ketoprofeno en Función del Tiempo en la Solución Buffer de Fosfatos a pH 7,4 en Sistema con Eliminación



Nota: Elaboración propia (2018).

La unión de fármacos que se unen a proteínas plasmáticas juega un papel muy importante en la obtención de parámetros, como la concentración plasmática y volumen de distribución. En la tabla 15, se puede observar que la concentración del fármaco libre es cada vez menor, debido a la unión del fármaco a la albúmina y la eliminación presente en el sistema.

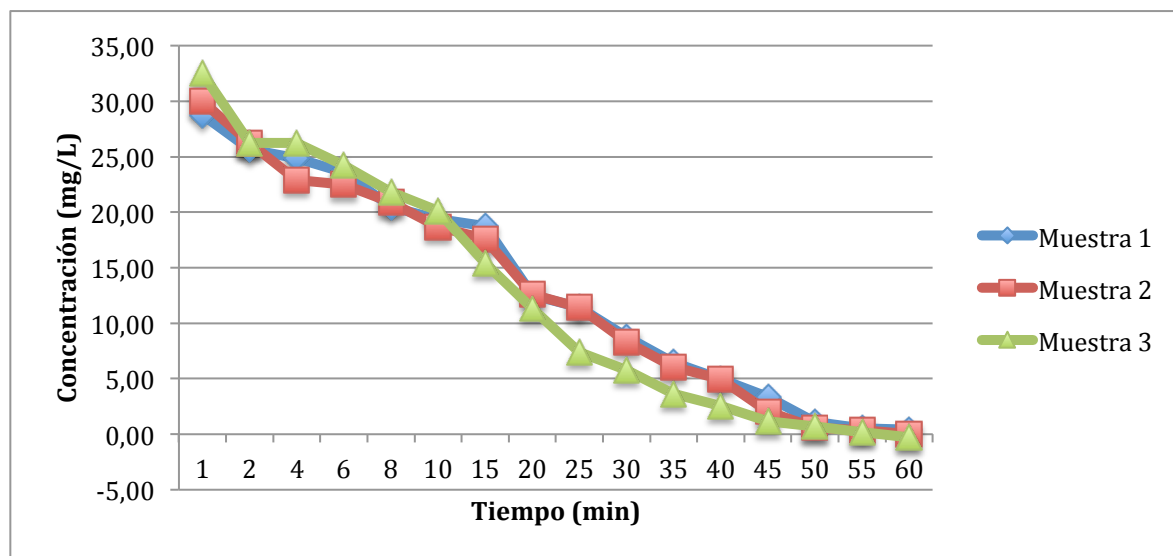
La unión del fármaco a la albúmina es reversible; se sabe que el fármaco unido pierde la actividad farmacológica, y el fármaco unido se convierte en la forma de su almacenamiento temporal, que controla la liberación de este al receptor para prevenir el metabolismo rápido (Bi, 2011).

Tabla 15. Sistema *in vitro* para Determinar la Concentración del Ketoprofeno Libre en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema con Eliminación

Muestra	1	2	3
Tiempo (min)	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/L)
1	28,76	30,02	32,55
2	25,66	26,26	26,23
4	24,88	22,90	26,23
6	23,62	22,49	24,24
8	20,50	20,91	21,79
10	19,37	18,70	20,15
15	18,76	17,60	15,42
20	12,52	12,57	11,28
25	11,45	11,45	7,39
30	8,78	8,33	5,77
35	6,47	6,07	3,62
40	4,99	4,99	2,52
45	3,33	2,04	1,18
50	1,12	0,59	0,69
55	0,56	0,37	0,18
60	0,40	0,02	-0,30

Nota: Elaboración propia (2018).

Figura 34. Comportamiento de la Concentración del Ketoprofeno Libre en Función del Tiempo en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema con Eliminación



Nota: Elaboración propia (2018).

La warfarina es un derivado sintético de la cumarina con propiedades anticoagulantes; se absorbe de forma rápida y completamente después de su administración oral, y tiene una biodisponibilidad excelente (Rodríguez, 2013).

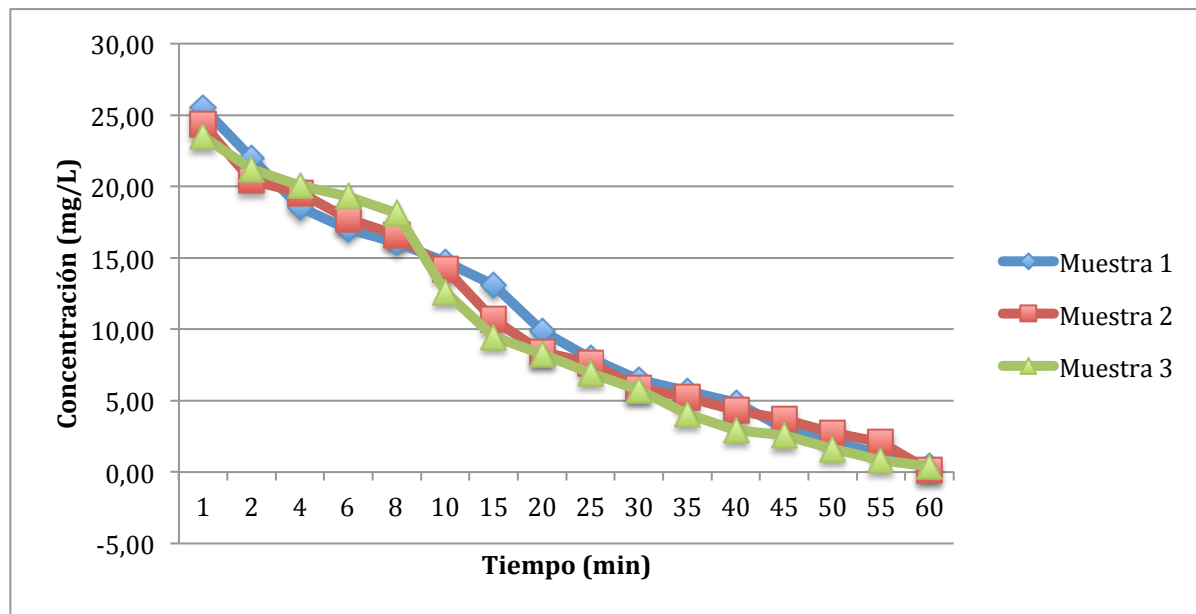
Se asume que la distribución es instantánea y uniforme; en la tabla 16, se puede observar el fármaco en una solución sin albúmina que posee concentraciones más altas. Como se observa en la figura 35, las concentraciones plasmáticas con el transcurso del tiempo disminuyen de forma exponencial, debido a que decrece la cantidad de fármaco presente en el sistema a una velocidad proporcional.

Tabla 16. Sistema *in vitro* para Determinar la Concentración de Warfarina con la Solución Buffer de Fosfatos de pH 7,4 en Sistema con Eliminación

Muestra	1	2	3
Tiempo (min)	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/L)
1	25,53	24,35	23,49
2	21,97	20,41	21,23
4	18,53	19,55	20,06
6	17,01	17,71	19,31
8	16,07	16,62	18,14
10	14,74	14,23	12,63
15	13,10	10,68	9,47
20	9,90	8,41	8,25
25	7,94	7,63	6,93
30	6,50	5,91	5,75
35	5,68	5,21	4,07
40	4,86	4,31	2,94
45	3,06	3,68	2,59
50	2,12	2,75	1,65
55	1,26	2,08	0,83
60	0,44	0,13	0,40

Nota: Elaboración propia (2018).

Figura 35. Comportamiento de la Concentración de Warfarina en Función del Tiempo en la Solución Buffer de Fosfatos a pH 7,4 en Sistema con Eliminación



Nota: Elaboración propia (2018).

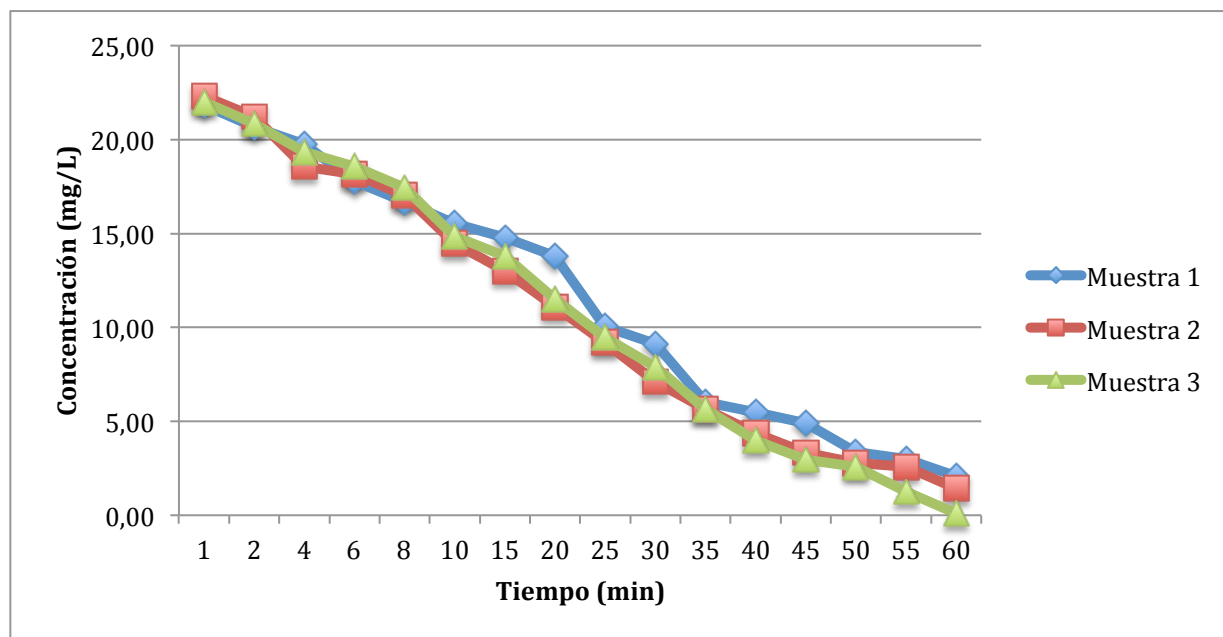
En la tabla 17, se puede observar que desde el minuto uno la concentración del fármaco libre es cada vez menor, debido a la unión del fármaco a la albúmina. El fármaco unido pierde la actividad farmacológica; sin embargo, la unión de este con la albúmina es reversible, lo que implica que puede liberarse el fármaco nuevamente (Bi, 2011).

Tabla 17. Sistema *in vitro* para Determinar la Concentración de Warfarina Libre en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema con Eliminación

Muestra	1	2	2
Tiempo (min)	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/L)	Concentración (mg/L)
1	21,85	22,32	22,01
2	20,68	21,23	20,84
4	19,74	18,57	19,35
6	17,79	18,14	18,57
8	16,69	17,05	17,44
10	15,52	14,47	14,86
15	14,78	13,02	13,80
20	13,80	11,11	11,50
25	10,05	9,19	9,47
30	9,11	7,12	7,90
35	6,03	5,64	5,64
40	5,48	4,35	3,99
45	4,89	3,33	2,94
50	3,37	2,78	2,59
55	2,98	2,59	1,26
60	2,08	1,42	0,09

Nota: Elaboración propia (2018).

Figura 36. Comportamiento de la Concentración de Warfarina Libre en Función del Tiempo en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema con Eliminación



Nota: Elaboración propia (2018).

Al agregar un fármaco con más afinidad por las proteínas, se logra observar el desplazamiento del fármaco unido, lo que produce que aumenten las concentraciones del fármaco desplazado, esto puede causar toxicidad por aumento de exposición al fármaco con menor afinidad, al aumentar la proporción de fármaco libre (Girona, 2013, p.33).

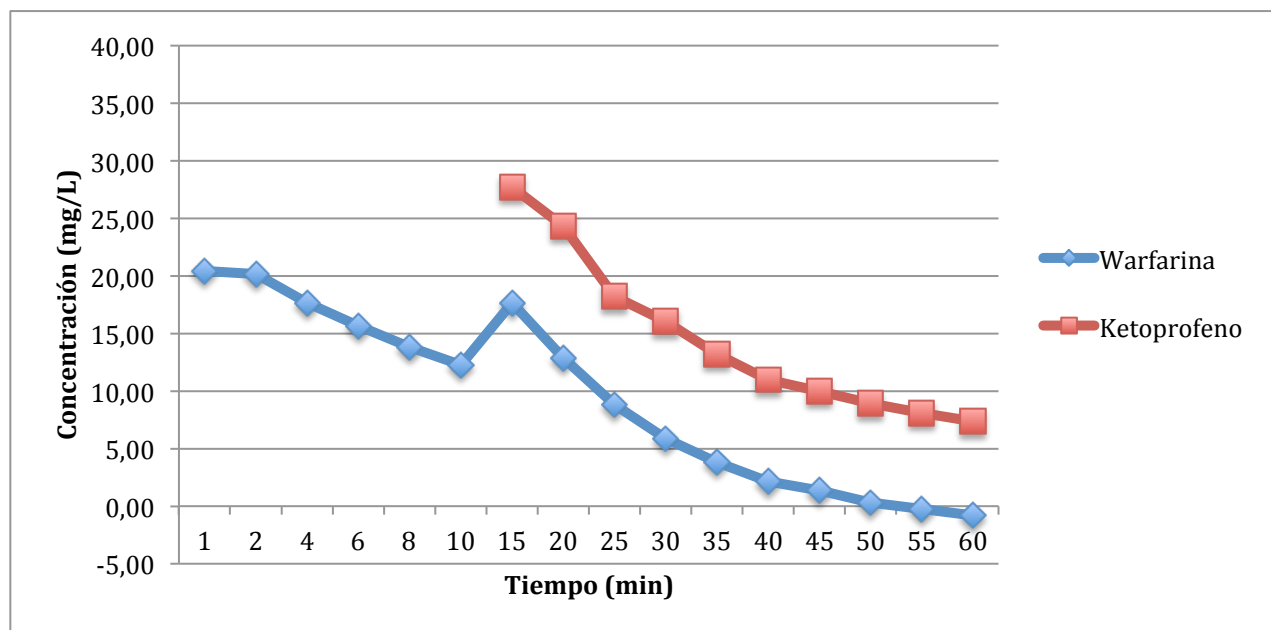
La warfarina, a pesar de tener un alto grado de unión a la albúmina, es fácilmente desplazada por el ketoprofeno, ya que, poseen un mismo sitio de unión; por esta razón, al agregarle el ketoprofeno al sistema que previamente tenía warfarina, aumentó la concentración en plasma de warfarina (véase la figura 37).

Tabla 18. Sistema *in vitro* para Determinar la Concentración Libre del Uso Conjunto de Warfarina y Ketoprofeno en la Solución de Albúmina al 0,1% en Sistema con Eliminación

Tiempo (min)	Warfarina		Ketoprofeno	
	Absorbancia	Concentración (mg/L)	Absorbancia	Concentración (mg/L)
1	0,555	20,45		
2	0,547	20,13		
4	0,484	17,67		
6	0,432	15,64		
8	0,385	13,80		
10	0,345	12,24		
15	0,483	17,63	1,081	27,73
20	0,362	12,90	0,954	24,32
25	0,258	8,84	0,726	18,19
30	0,182	5,87	0,646	16,04
35	0,130	3,84	0,541	13,22
40	0,086	2,12	0,457	10,96
45	0,067	1,38	0,421	9,99
50	0,040	0,32	0,381	8,92
55	0,025	-0,26	0,351	8,11
60	0,011	-0,81	0,323	7,36

Nota: Elaboración propia, (2018).

Figura 37. Comportamiento la Concentración Libre de la Warfarina y el Ketoprofeno en Función del Tiempo en la Solución de Albúmina al 0,1%, sistema con eliminación



Nota: Elaboración propia (2018).

Aquellos que presenten un alto grado de afinidad por los tejidos tenderán a poseer elevados valores de volumen de distribución, indicativo de una amplia difusión tisular del fármaco. Por el contrario, los que se unen en alta proporción a proteínas plasmáticas pueden mostrar valores altos o bajos en este parámetro (Rabasco, 2002, p.42).

El volumen de distribución del organismo sin albúmina es mayor, en comparación con el organismo con albúmina (véase la tabla 19), como se indica en la literatura: si un fármaco presenta una alta unión a proteína, el volumen de distribución es pequeño y la concentración plasmática será mayor. Estas pruebas se realizaron por triplicado (Goodman, 2015).

Tabla 19. Volumen de Distribución en los Dos Disolventes Utilizados

Fármaco/ Disolvente	Solución Buffer de Fosfatos pH 7,4	Solución de albúmina al 0,1%
<i>Ketoprofeno</i>	0,2003 L	0,1960 L
<i>Warfarina</i>	0,2557 L	0,2512 L

Nota: Elaboración propia (2018).

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

Este capítulo presenta las conclusiones obtenidas, de una forma concisa, tras el análisis de resultados obtenidos en el trabajo de investigación desarrollado; también se sugieren ciertas recomendaciones aplicables para futuras investigaciones.

Se logró el diseño y desarrollo de un sistema que ejemplifique, a nivel *in vitro*, los conceptos de unión a proteína plasmática y el volumen de distribución, utilizando como fármacos el ketoprofeno y la warfarina.

Se determinó que la concentración de albúmina al 0,1% es la ideal para la realización del análisis.

Se efectuó una curva de calibración para el ketoprofeno donde el R^2 fue de 0,9991 y para la warfarina fue de 0,9992, lo que determina que se puede cuantificar la variación entre las variables.

Se realizó la verificación sobre la unión a la proteína del plasma, utilizada con los fármacos ketoprofeno y warfarina.

Se observó una buena reproducibilidad en los sistemas, que consiguieron mostrar los conceptos fundamentales relacionados con la unión de fármaco a la albúmina y el volumen de distribución.

Se simularon, de manera satisfactoria, las condiciones fisiológicas para mostrar, de forma *in vitro*, lo ocurrido tras la administración del ketoprofeno y la warfarina de forma concomitante.

Por medio de la simulación *in vitro*, se comparó el cambio en el volumen de distribución al estar unidos a la albúmina, dando como resultado que el fármaco unido posea un volumen de distribución menor que al estar libre.

En la simulación *in vitro* se demostró que la warfarina fue desplazada por el ketoprofeno, al estar unida a la proteína plasmática.

Recomendaciones

Disponer de los patrones necesarios para realizar la práctica de laboratorio.

Verificar que los equipos necesarios para el desarrollo de la práctica, como el espectrofotómetro UV-VIS, se encuentren calibrados y en buen estado.

Lavar adecuadamente la cristalería donde se realizaran los sistemas y realizar enjuagues con el disolvente a utilizar para evitar alteraciones.

Vigilar el goteo del sistema para evitar que se vea alterado por alguna razón.

Evaluar los mismos fármacos con diferentes condiciones como la temperatura o la concentración de albúmina, para obtener valores de la variación que pueden presentar los sistemas.

Analizar la unión del fármacos a proteínas del plasma distintas proteínas plasmáticas como la alfa 1- glicoproteína ácida o la lipoproteína.

Optimizar las concentraciones de fármacos y de proteína plasmática a utilizar para tener resultados confiables.

CAPÍTULO VI. PROPUESTA

Fundamento teórico

Wagner (como se cita en Doménech, Martínez y Peraire, 2013) define a la *Biofarmacia* como una disciplina que describe la variabilidad de las respuestas terapéuticas en función del medicamento, de forma cuantitativa. Se podría decir que la Biofarmacia es la encargada del estudio de los procesos de incorporación y de los factores que lo condicionan (p. 38).

Wagner (como se cita en Doménech, Martínez y Peraire, 2013) define la *Farmacocinética* como “el estudio caracterización de la evolución temporal de los fármacos y sus metabolitos en los diferentes fluidos, tejidos y emuntorios del organismo, así como de la evolución de la respuesta farmacológica y la construcción de modelos adecuados para interpretar los datos obtenidos” (p. 35).

En el 2014 se describió *LADME* de la siguiente manera: la liberación es a partir de la forma farmacéutica; la absorción es el acceso que tiene el fármaco inalterado a la circulación sistémica; la distribución corresponde a los distintos lugares a los que llega el fármaco; el metabolismo es la biotransformación de la molécula original y, por último, la eliminación es la excreción del fármaco por cualquier vía, ya sea renal, biliar, salivar, entre otras (Goodman, Gilman, Hardman y Limbird, pp. 3-6).

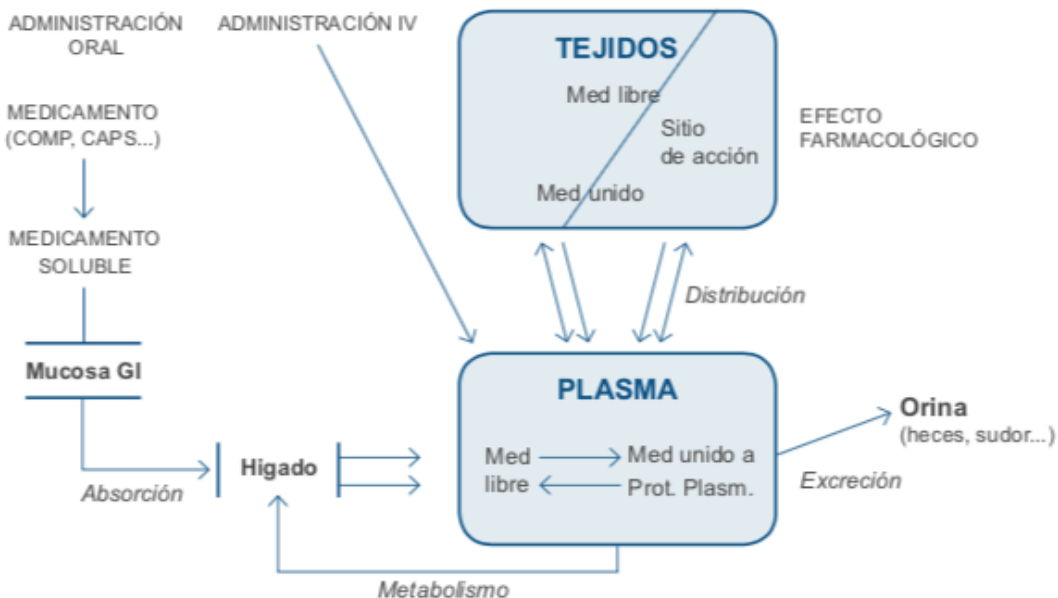
La FDA (como se cita en Doménech, Martínez y Peraire, 2013) define la *biodisponibilidad* como “la velocidad y cantidad a la cual un fármaco o componente activo, absorbido a partir de la forma de dosificación que lo contiene, se hace disponible en su lugar de acción”. En esta definición se relaciona la velocidad y magnitud de la absorción con el acceso y permanencia del fármaco en la biofase o lugar de acción (p. 607).

La biodisponibilidad puede variar entre distintas formulaciones y vías de administración. Cuando el fármaco es administrado por la vía intravenosa, la administración del medicamento se

realiza directamente al torrente sanguíneo; por lo tanto, todo el fármaco llega a la circulación sistémica, obteniéndose una biodisponibilidad obtenida del 100% (Winter, 1994, pp. 7-8).

La distribución del fármaco se realiza desde el plasma a las proteínas plasmáticas, y también a todos los elementos figurados de la sangre. El proceso de distribución es el único estrictamente reversible, y se concreta en la obtención de un equilibrio de concentración en todo el volumen accesible, al cabo de un tiempo dado, y es característico de cada fármaco (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 56).

Figura 38. Esquema de los Procesos Farmacocinéticos



Nota: Girona (2013).

En la figura 38 se describe el esquema farmacocinético tras la administración oral y endovenosa. Una vez que el medicamento llega al torrente circulatorio, se distribuye por todo el organismo hasta llegar a los receptores para realizar su efecto terapéutico, pero también los efectos adversos; incluye alteraciones de la absorción, distribución, metabolismo y excreción (Girona, 2013, p. 22).

Volumen de distribución

El volumen de distribución aparente es un parámetro que representa una distribución de los fármacos; también se conoce como *volumen hipotético*, en el que se disuelve la cantidad de fármaco total que llega al organismo, para así conseguir una concentración de fármaco igual a la del plasma (Velázquez, 2008, p. 33).

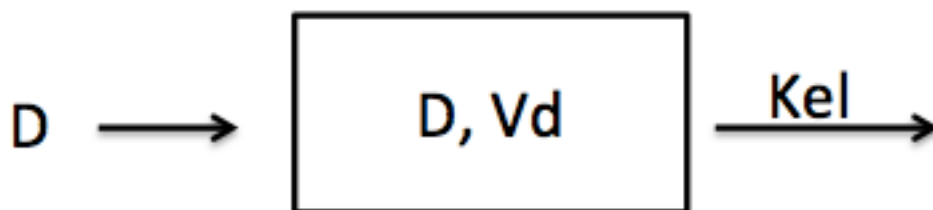
Los fármacos que se unen a las proteínas del plasma tendrán volúmenes de distribución menores que un fármaco que no los posee. Un fármaco con un gran volumen de distribución aparente se distribuye en los tejidos, donde se unen a constituyentes en los tejidos o disuelven en lípidos (Gennaro, 2003, p. 1347).

El volumen de distribución se expresa en unidades de volumen (mL, L) o volumen/peso (mL/kg o L/kg) en función de cómo se exprese la dosis administrada (peso o peso/peso organismo; por ejemplo, mg o mg/kg) (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 271).

Modelo monocompartimental intravenoso

El modelo monocompartimental es el más simple. Este modelo representa al organismo y, para efectos de distribución, está diseñado por un solo compartimento, el cual abarca a los órganos que son más perfundidos, como el corazón, el hígado, los riñones, el cerebro y los pulmones (Doménech, Martínez y Plá, 2001).

Figura 39. Representación Básica del Modelo Monocompartimental Intravenoso



Nota: Doménech, Martínez y Peraire (2013).

En la figura 39 se puede observar un modelo monocompartimental, el cual es simple y se considera abierto, debido a que el fármaco entra al organismo y luego es eliminado. El volumen de distribución (V_d) representa el volumen donde se distribuye el fármaco en el cuerpo humano, y la cantidad de fármaco (D) cambia conforme pasa el tiempo, y la constante de eliminación (K_{el}) es el proceso que sufre el fármaco durante el tránsito en el organismo (Doménech, Martínez y Peraire, 2013, p. 264).

Proteínas plasmáticas

Las proteínas del plasma participan en mecanismos de transporte, coagulación, inmunidad y acción enzimática, así como en la nutrición, equilibrio ácido-base y electrolítico. Se puede determinar por métodos como espectrometrías UV o técnicas refractométricas, aunque suele observarse errores en presencia de alguna patología (Gennaro, 2003, p. 660).

El plasma humano contiene más de 60 proteínas, de las cuales las más importantes, desde el punto de vista de la fijación de los fármacos, son:

Albúmina

Santos (2004) menciona que la semivida de eliminación de la albúmina es de 17 a 19 días; esta se distribuye en plasma, fluidos extracelulares, piel, músculo y otros tejidos. La concentración se mantiene de 35 a 45g/L. También es responsable de mantener la presión osmótica de la sangre y el transporte de sustancias en plasma.

La albúmina es ligeramente básica, y se unirá principalmente a ella fármacos ácidos o neutros. Esta es una proteína saturable; al ocurrir esto, los fármacos se unirán a otra proteína plasmática, como la lipoproteína (Le, 2018).

La albúmina sérica humana, como la proteína más prominente en el plasma, podría servir como un depósito circulante para muchos fármacos. Es el principal portador de distintos metabolitos endógenos y exógenos en la sangre (Baraka, Guerin, Bourdon y Rondeau, 2012).

Unión a proteínas

La unión a proteínas es un proceso reversible y favorecido por la liposolubilidad del fármaco; se suele cuantificar en forma de porcentaje, y este suele estar constante dentro de un intervalo de niveles plasmáticos amplio, por lo que la proteína del plasma es saturable; al suceder esto, el porcentaje de fármaco libre será mayor (Velázquez, 2008, p. 28).

La unión a la albúmina humana aumenta la vida útil de un fármaco antes de que se metabolice, y también permite que algunos fármacos hidrófobos se vuelvan más solubles en la sangre los fármacos unidos difícilmente pueden alcanzar el sitio de acción a través de la sangre sin perder sus actividades farmacológicas y su toxicidad. Entre los fármacos terapéuticos, algunos tienen un índice terapéutico estrecho, como la warfarina, y son fácilmente tóxicos en el estado no unido. (Baraka, Guerin, Bourdon y Rondeau, 2012).

Sitio de unión

En la albúmina, actualmente se conocen hasta cuatro sitios para la unión de los fármacos. Los fármacos unidos a las proteínas del plasma no producen efectos biológicos, pero esta unión permite el transporte y almacenamiento. (Velázquez, 2008, p. 29).

Unión fármaco-proteína

La unión de los fármacos a la proteína es poco específica, competitiva y variable. Diversos factores pueden alterar dicha unión. Esta puede disminuir si se reduce la concentración de proteínas. Suelen haber fármacos que se unen en mayor medida, por lo que pueden provocar problemas de sobredosificación (Velázquez, 2008, p. 29).

La fracción que se encuentra unida es farmacológicamente inactiva. Actúa como si fuera un reservorio o una forma de transporte; permanece en la sangre, no siendo metabolizada ni excretada y constituye una reserva móvil del fármaco. Solamente la fracción libre se halla disponible para su distribución a tejidos, la biotransformación o la excreción y es la que ejerce la acción farmacológica (Rabasco, 2002, p.42).

Fármaco libre

El fármaco libre es el que logra atravesar los tejidos diana y los respectivos órganos de metabolismo y excreción. En ciertas circunstancias el fármaco, unido a la proteína del plasma, favorece la solubilidad del fármaco en el mismo, y este se va liberando poco a poco para alcanzar un equilibrio con la fracción libre (Velázquez, 2008, p. 29).

Desplazamiento de fármacos

El desplazamiento del fármaco de su unión a las proteínas plasmáticas por otro fármacos que compite en este nivel, puede contribuir a la producción de reacciones adversas aumentando la forma libre, es decir, la farmacológicamente activa. Sin embargo, lo que ocurre también es que esa forma libre esta disponible para su distribución a través del plasma, hacia los tejidos. La una interacción sería el desplazamiento en la unión a los tejidos. La concentración plasmática del fármaco desplazado puede duplicarse debido a la competición en los tejidos. (Velázquez, 2008, p. 1089)

La administración de dos fármacos con un alto grado de unión a proteínas puede causar toxicidad por aumento de exposición al fármaco con menor afinidad, al aumentar la proporción de fármaco libre, el farmacológicamente activo (Girona, 2013, p.33).

Warfarina

La warfarina es un derivado sintético de la cumarina con propiedades anticoagulantes, y es un antagonista de la vitamina K. Este fármaco posee un estrecho margen de acción (Sosa y González, 2014, p. 7).

Se produce una modificación en los procesos de liberación, absorción, distribución, metabolización y excreción del fármaco. El desplazamiento de la unión de la warfarina a las proteínas plasmáticas, por parte de otros fármacos, hace que haya más warfarina libre y, por lo tanto, aumenta su acción anticoagulante (Sosa y González, 2014, p. 11).

Ketoprofeno

Es un derivado del ácido propiónico; pertenece al grupo de los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). También tiene propiedades antipiréticas. (Rodríguez, 2013)

La administración simultánea de otros AINE, corticosteroides o alcohol aumenta el riesgo de efectos gastrointestinales. Los antiácidos disminuyen su absorción. Incrementa el efecto de los anticoagulantes y antiplaquetarios. Puede incrementar el efecto hipoglucemiante de la insulina y sulfonilureas. Incrementa la toxicidad de ciclosporina. Reduce el efecto antihipertensivo de los inhibidores de la ECA y diuréticos. El probenecid incrementa sus concentraciones plasmáticas, incrementando el riesgo de efectos adversos (Rodríguez, 2013).

Simulación *in vitro*

Los estudios *in vitro* intentan simular las condiciones naturales en que se realizó la observación, o al menos aproximarse a las condiciones aplicadas en los experimentos *in vivo*. Estos experimentos son herramientas adecuadas para el estudio de mecanismos involucrados en los fenómenos observados (Fina, Lombarte y Rigalli, 2013, p. 284).

Parte experimental

Preparación de la solución de buffer de fosfatos a pH 7,4

Equipo

Espátula

Balanza granataria digital

pHmetro

2 beaker 1000mL

2 pastillas de agitación

2 agitadores magnéticos

Envase previamente lavado y rotulado

Reactivos

Agua destilada

Fosfato de potasio (KH_2PO_4)

Fosfato disódico (Na_2HPO_4)

Buffer de fosfatos pH 12

Procedimiento

Se prepararon alrededor de 10 litros de solución buffer de fosfatos a un pH 7.4, medidos con el pHmetro, el cual debió ser previamente calibrado con las sustancias buffer correspondientes, y se envasó y rotuló para su uso. Las siguientes instrucciones corresponden a dos litros de solución:

Se pesaron 9,08g de KH_2PO_4 , en una balanza granataria digital, se colocaron en un beaker de 1000mL con 500mL de agua destilada y agitación constante; luego se pesaron 11,48g de Na_2HPO_4 y se agregaron a un beaker de 1000mL con 500mL de agua destilada hasta lograr disolver por completo las dos soluciones; luego se les agregó a ambos beakers 500mL de agua destilada; posteriormente se mezclaron las dos soluciones, y con el pHmetro se tomó el pH; por último, con el buffer de fosfatos pH 12 se ajustó el pH, hasta llegar a 7,4.

Curva de Calibración

Equipo

Balanza analítica	Papel filtro
Espectrofotómetro UV-VIS	1 espátula
14 balones aforados 25mL	1 pipeta graduada 10mL
1 balón aforado 50mL	1 pipeta graduada 5mL
1 balón aforado 100mL	1 pera
1 embudo de espiga	1 celda de cuarzo de 1 cm

Reactivos

Estándar de Ketoprofeno
Solución buffer de fosfatos pH 7,4
Warfarina (Apo®-Warfarina)

Procedimiento

Preparación estándar madre de Ketoprofeno.

Se tomó un balón aforado de 100mL y se colocaron 10mg del estándar pesados en balanza analítica, se llevó a aforo con solución buffer de fosfatos de pH 7.4, obteniendo la muestra madre a una concentración de 0,1mg/mL;

Preparación de la curva de calibración de ketoprofeno.

Una vez preparada la disolución madre se tomaron las siguiente alícuotas:

- Se tomaron 0,3mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 1mg/L.
- Se tomaron 1,3mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 5mg/L.
- Se tomaron 2,5mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 10mg/L.
- Se tomaron 3,8mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 15mg/L.
- Se tomaron 5mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 20mg/L.
- Se tomaron 6,3mL con pipeta graduada de 10mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 25mg/L.
- Se tomaron 7,5mL con pipeta graduada de 10mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 30mg/L.

Se leyeron las absorbancias por medio de un espectrofotómetro UV-VIS, utilizando una celda de cuarzo de 1cm a una longitud de onda de 258nm, se empleo la solución buffer de fosfatos pH 7,4 como blanco y se realizó una grafica de absorbancia versus concentración.

Curva de Calibración de la Warfarina

Se tomó un balón aforado de 50mL y se colocaron 5mg de la warfarina previamente triturados, se llevó a aforo con solución buffer de fosfatos de pH 7.4, obteniendo una concentración madre de 0,1mg/mL; posteriormente se filtró la solución empleando un embudo y papel filtro.

Preparación de la curva de calibración de warfarina.

Se tomaron las siguientes alícuotas de esa solución madre:

- Se tomaron 0,3mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 1mg/L.
- Se tomaron 1,3mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 5mg/L.
- Se tomaron 2,5mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 10mg/L.
- Se tomaron 3,8mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 15mg/L.
- Se tomaron 5mL con pipeta graduada de 5mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 20mg/L.

- Se tomaron 6,3mL con pipeta graduada de 10mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 25mg/L.
- Se tomaron 7,5mL con pipeta graduada de 10mL y se llevó a aforo en balón aforado de 25mL, para obtener una concentración de 30mg/L.

Se leyeron las absorbancias por medio de un espectrofotómetro UV-VIS, utilizando una celda de cuarzo de 1cm a una longitud de onda de 315nm, se empleo la solución buffer de fosfatos pH 7,4 como blanco y se realizó una grafica de absorbancia versus concentración.

Preparación de la disolución de albúmina al 0.1%

Se tomaron 10 mL de Alburnorm® 20% y se llevaron a aforo en un balón de 2000 mL con la solución buffer pH 7,4.

Modelo para Simulación de la Unión de Fármacos a Proteína Plasmática

Equipo

5 beakers 250mL	5 bombas de inmersión de 600 Lh ⁻¹ de capacidad
5 beakers 1000mL	
5 kitasato 250mL	5 pastillas de agitación
5 agitador magnético	Espectrofotómetro UV-VIS
80 jeringas 5mL	Probeta 50mL
Cronómetro	

Reactivos

Ketoprofeno (Profenid[®])

Warfarina (Apo[®]-Warfarina)

Solución buffer de fosfatos pH 7,4

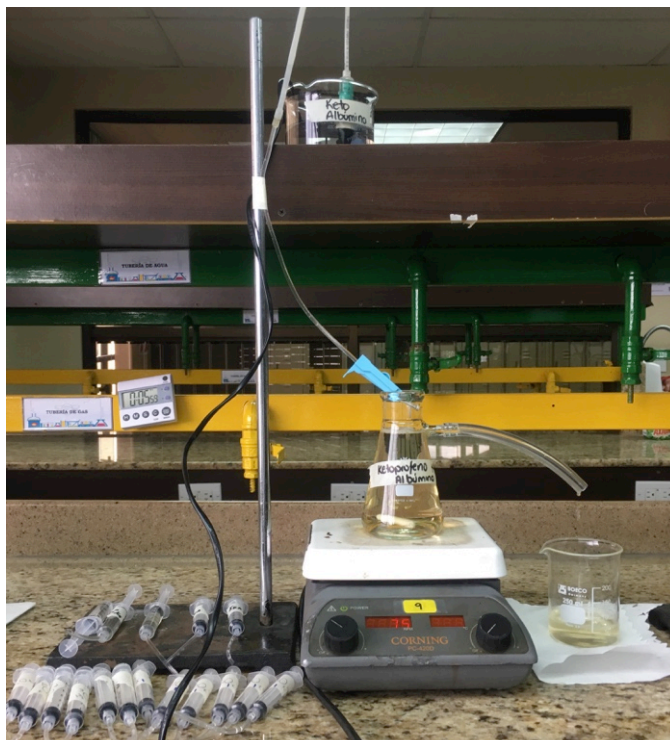
Solución de albúmina al 0,1%

Procedimiento

Se ensambló el equipo de la misma manera para cinco sistemas, con el fin de visualizar el comportamiento de cada fármaco, de la siguiente manera:

Sobre un agitador magnético se colocó un kitasato de 250mL con un pastilla de agitación, el cual representó el compartimento central. En la parte superior de la mesa se ubicó un beaker de 1000mL con la bomba de inmersión. Se puso un beaker de 250mL en la salida del kitasato, para simular la excreción. (véase la figura 40).

Figura 40. Ejemplo del Ensamblaje del Equipo



Nota: Elaboración propia (2018).

Luego del ensamblaje del equipo, se procedió a llenar el beaker de 1 L colocado en la parte superior de la mesa de trabajo. Seguidamente, se encendió la bomba de inmersión para regular la velocidad de flujo mediante el regulador de rodillo ajustando el flujo a 20 mL/min. Después de regular la velocidad de eliminación, se procedió a adicionar las dosis a cada sistema ha utilizar:

1. Sistema ketoprofeno- solución buffer de fosfatos a pH 7,4: se agregaron al kitasato 200 mL de solución buffer de fosfatos a pH 7,4 y 5mL de ketoprofeno (Profenid®), con agitación a 60 rpm.
2. Sistema ketoprofeno- solución de albúmina al 0,1%: se adicionaron al kitasato 200 mL de solución de albúmina 0,1 % y 5mL de ketoprofeno (Profenid®), con agitación a 60 rpm.
3. Sistema warfarina- solución buffer de fosfatos a pH 7,4: se agregaron al kitasato 150mL de solución buffer y 50 mL de la disolución de warfarina con concentración 0,1 mg/mL y con agitación a 60 rpm.
4. Sistema warfarina- solución de albúmina al 0,1%: se agregaron al kitasato 150 mL de solución de albúmina al 0,1% y 50 mL de la disolución de warfarina con concentración 0,1 mg/mL y con agitación a 60 rpm.
5. Sistema warfarina- solución de albúmina al 0,1%- ketoprofeno: se agregaron al kitasato 150 mL de solución de albúmina al 0,1% y 50 mL de la disolución de

warfarina con concentración 0,1 mg/mL y con agitación a 60 rpm., luego de 10 minutos se adicionaron 5mL de ketoprofeno (Profenid®).

Se tomaron muestras a los siguientes tiempos: 1min, 2min, 4min, 6min, 8min, 10min, 15min, 20min, 25min, 30min, 35min, 40min, 45min, 50min, 55min, 60min. La longitud de onda para realizar la lectura de las muestras fue de 258nm para el ketoprofeno y 315nm para la warfarina. El procedimiento para cada sistema se realizó por triplicado.

Referencias

- Aïache, J., Devissaguet, A., y Guyot, H. (1983). Biofarmacia. México: El Manual Moderno.
- Autlon, M. (2004). Farmacia: La Ciencia del Diseño de las Formas Farmacéuticas. Elsevier. Madrid, España. Segunda edición.
- Baraka, J., Guerin, A., Boudon, E. y Rondeau, P. (2012). Impaired drug-binding capacities of in vitro and in vivo glycated albumin. *Biochimie* 94, 1960-1967. doi:10.1016/j.biochi.2012.05.017
- Barrios, A., Gomes, H. y Trillo, J. (2017) Desnaturalización de proteínas. Universidad del Magdalena. Colombia, 22(8).
- Bi, S., Yan, L., Sun, Y., y Zhang, H. (2011). Investigation of ketoprofen binding to human serum albumin by spectral methods. *Spectrochimica Acta Part A*, 78 (1), 410-414. DOI: 10.1016/j.saa.2010.11.002.
- Calderón, B. (2014). *Implementación de una práctica de laboratorio para el curso del laboratorio de farmacocinética que simule de forma in vitro una administración extravasal por vía oral de un fármaco disuelto con comportamiento monocompartimental*. (Tesis de grado para Licenciatura en Farmacia). Universidad Internacional de las Américas, Costa Rica.
- Chuang, V., y Otagiri, M. (2006). Stereoselective Binding of Human Serum Albumin. *Chirality* 18,159–166. DOI: 10.1002/chir.
- Deeb, O., Rosales, M., Gómez, C., Garduño, R., y Correa, J. (2009). Exploration of Human Serum Albumin Binding Sites by Docking and Molecular Dynamics Flexible Ligand-Protein Interactions. *Biopolimeros*, 93 (2), 161-170. DOI: 10.1002 / bip.21314.

- Doménech, J., Martínez, J. y Peraire, C. (2013). Tratado general de Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen I: LADME. Análisis farmacocinético. Biodisponibilidad y bioequivalencia. Madrid: *Síntesis S.A.*
- Doménech, J., Martínez, J. y Plá, Delfina, J. (2001). Biofarmacia y Farmacocinética. Volumen I: Farmacocinética. Madrid: *Síntesis S.A.*
- Esmailzadeh, S., Valizadeh, H., y Zakeri, P. (2016) The effects of pH, temperature and protein concentration on the *in vitro* binding of flutamide to human serum albumin. *Pharm Dev Technol*, 22 (8), 982-991. DOI: 10.3109/10837450.2016.1163392.
- Fedder, D. (1974). Bioavailability: A Practitioner's Point of View. Journal of the American Pharmaceutical Association (APhA), 404.
- Fehske, K., Müller, W., y Wollert, U. (1981). The location of drug binding sites in human serum albumin. *Biochemical Pharmacology*, 30 (7), 687-692. DOI: 10.1016/0006-2952(81)90151-9.
- Fina, B., Lombarte, M. y Rigalli, A. (2013). Investigación de un fenómeno natural: ¿estudios in vivo, *in vitro* o in silico? *Actualizaciones en Osteología*, 9 (3), 239-240
- Gennaro, A. (2003). Remington Farmacia. *Médica Panamericana*. Buenos Aires. (20a. ed.) 1, 660-1349
- Girona, L. (2013). Introducción a las interacciones farmacológicas. Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. Madrid, España (1a. ed.).
- Goodman, L., Gilman, A., Hardman, J. y Limbird, L. (2001). Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. *McGraw-Hill*. New York. (10a. ed.).

- Goodman, L., Gilman, A., Hilal-Dandan, R. y Brunton, L. (2015) Manual de farmacología y terapéutica. *McGraw-Hill*. México. (2ª. ed.).
- Hedaya, M. (2012). *Introduction of Pharmacokinetics*. En M. Hedaya, Basic Pharmacokinetics. Kuwait: CRC Press. 1-2.
- Hernández, A. (2014). Farmacología general. Una guía estudio. *McGraw-Hill*. México. 57-81.
- Hernández, S., Fernández, C., y Baptista, P. (2014). Metodología de la investigación. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V. México. (6ª ed.).
- Jung, H. (2013). La Biofarmacia en México. Un breve análisis del pasado y el presente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44, 5-6.
- Le, J. (2018) Distribución del fármaco en los tejidos. [Mensaje en un blog]. Recuperado de: <https://www.msdmanuals.com/es-cr/professional/farmacolog%C3%ADa-cl%C3%ADnica/farmacocin%C3%A9tica/distribuci%C3%B3n-del-f%C3%A1rmaco-en-los-tejidos>
- Marín, P. (2010). *Establecimiento de Ensayos In Vitro, para el Laboratorio de Farmacocinética, que simulen los Modelos Extravasales: Monocompartimental con y sin Periodo de Latencia y Bicompartimental*. (Tesis de grado para Licenciatura en Farmacia). Universidad Internacional de las Américas, Costa Rica.
- Mendoza, N. (2008). Farmacología Médica. *Editorial Médica Panamericana*. México. 44-45.
- Pérez, A., López, A., y Grau, I. (2002). Antiinflamatorios no esteroideos (AINES): Consideraciones para su uso estomatológico. *Revista Cubana de Estomatología*, 39(2), 119-138. ISSN 0034-7507.

- Quintero, J. (2010). Cincuenta años de uso clínico de la warfarina. *Investigación Clínica. Universidad del Zulia, Venezuela*, 51 (2), 269-287. Recuperado de: <http://www.scielo.org.ve/pdf/ic/v51n2/art08.pdf>
- Rabasco, A. (2002). Biofarmacia y Farmacocinética Básica. En: Avances en Farmacología y Farmacoterapia: Conceptos Básicos en Farmacología. *Acción Médica*.
- Rodríguez, R. (2013) Vademécum Académico de Medicamentos. *McGraw-Hill* Interamericana Editores, S.A. de C.V. México. (6^a ed.).
- Santos, N; Draibe, S. (2004) Albúmina sérica como marcador nutricional de pacientes. *Revista de Nutrición*. Campinas, 17(3), 339-349.
- Shang, S., Liu, Q., Gao, J., Zhu, Y., Liu, J., Wang, K., ... Zhang, S. (2014). Insights into in vitro binding of parecoxib to human serum albumin by spectroscopic methods. *Journal Of Biochemical And Molecular Toxicology*, 28(10), 433-441. DOI:10.1002/jbt.21582
- Skoog, D., Holler, J. y Nieman, T. (2001). Principios de análisis instrumental. *McGraw-Hill*. España. (5. ed.).
- Sosa, M. y González, T. (2014) Warfarina: co-medicación y posibles interacciones. *Biomedicina*, 9 (3), 6-35.
- Tedesco, D., Pistolozzi, M., Zanasi, R., y Bertucci, C. (2015). Characterization of the species dependent ketoprofen/albumin binding modes by induced CD spectroscopy and TD-DFT calculations. *J Pharm Biomed Anal*, 112, 176-80. DOI: 10.1016 / j.jpba.2014.11.029.
- Thomas, G., y Kantor, M. (1987). Ketoprofen: A Review of Its Pharmacologic and Clinical Properties. *Pharmacotherapy*, 6 (3), 93-103. DOI: 10.1002/j.1875-9114.1986.tb03459.x

Tsaioun, K. (2011). *ADMET for medicinal chemists. A practical guide*. Singapore: Wiley.

USP 38 (2015). *United States Pharmacopeia*.

Velázquez B., Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M y Portolés, A. (2008). Farmacología básica y clínica. *Médica panamericana*. España. (18a. ed.). 13-34.

Wargner, J. (1983). Farmacocinética Clínica. Barcelona: Reverte.

Winter, M. (1994). Farmacocinética Clínica Básica. Díaz de Santos S.A. Madrid, España. Segunda edición.

Wishart D., Feunang Y., Guo A., Lo E., Marcu A., Grant J., Sajed T., Johnson D., Li C., Sayeeda Z., Assempour N., Iynkkaran I., Liu Y., Maciejewski A., Gale N., Wilson A., Chin L., Cummings R., Le D., Pon A., Knox C., y Wilson M. (2017) DrugBank 5.0: una actualización importante de la base de datos de DrugBank para 2018. *Nucleic Acids Res*. Doi: 10.1093 / nar / gkx1037.

Yamasaki, K., Sato, H., Minagoshi, S., Kyubun, K., Anraku, M., Miyamura, S., ... Otagiri, M. (2017). The Binding of Silibinin, the Main Constituent of Silymarin, to Site I on Human Serum Albumin. *Biol. Pharm. Bull*, 40, 310–317. DOI: 10.1248 / bpb.b16-00790.

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