

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

CARRERA DE FARMACIA

**SIMULACION *IN VITRO* DE PRUEBA DE
PERMEABILIDAD DE UNA FAMILIA DE AINES A
TRAVÉS DE UNA MEMBRANA**

**MODALIDAD DE TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO
DE LICENCIATURA EN FARMACIA**

GABRIELA FALLAS MORALES

LIC. ARMANDO CALVO CANOSSA

SEDE ARANJUEZ

JULIO, 2018

Agradecimientos

Agradecida con Dios, primeramente, por el don de la vida, por permitirme creer en mí misma tras las adversidades y darme la oportunidad de finalizar una meta de muchas.

A mis padres y familia, por el gran apoyo y amor durante la trayectoria de tan anhelado sueño, a todas las personas especiales que han formado parte de mi vida y de quien soy ahora como persona.

Agradezco infinitamente la dedicación de mis profesores, por ampliar mi conocimiento y ser los mentores de mis ganas de querer aprender, entender e investigar con pasión.

Dedicatoria

Principalmente, a Dios, guía de mis días, a quienes están y a los que estuvieron; finalmente, a todas las personas que quieren y se animan a hacer la diferencia, ya que de pequeñas ideas surgen grandes proyectos.

Pensamiento

“Pretending to know everything, closes the door to finding out what's really there”.

Neil deGrasse Tyson

Resumen

El presente trabajo de investigación consiste en una simulación *in vitro* de prueba de permeabilidad de una familia de AINES a través de una membrana. Su objetivo principal es implementar una membrana que simule de manera *in vitro* una prueba de permeabilidad de una familia de antiinflamatorios no esteroideos.

Lo anterior con la intención de contestar la pregunta central. ¿Se puede simular la permeabilidad *in vitro* de una familia de antiinflamatorios no esteroideos a través de una membrana cuyos resultados se comparen con los datos reportados en literatura?

Se desarrolla con un enfoque cuantitativo, ya que la investigación se realizará a nivel de laboratorio, la estrategia para obtener la información requerida para la resolución del planteamiento del problema siguiendo los objetivos es por medio de un método experimental, iniciando con la recopilación de datos, fundamental para el desarrollo del tema y realizando pruebas experimentales para obtener los resultados.

Se propone la extracción de membranas del huevo de gallina la cual por medio de simulaciones *in vitro*, permite la difusión efectiva de fármacos siendo cuantificable la permeabilidad aparente del naproxeno, ketoprofeno y dexketoprofeno. Se recomienda analizar la membrana utilizando microscopía electrónica, para obtener datos del tamaño del poro nominal de la membrana antes y después de usada, también a estudiantes y profesores, se recomienda la utilización de la membrana como método de enseñanza en áreas farmacéuticas, para comprender la importancia de las propiedades fisicoquímicas en el estudio de la permeabilidad de fármacos.

Contenido

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	15
Planteamiento del problema	15
Hipótesis	17
Objetivos.....	18
Objetivo general.....	18
Objetivos específicos	18
Justificación	18
Antecedentes.....	21
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	26
Antiinflamatorios no esteroideos.....	26
Derivados del ácido propiónico	29
Ketoprofeno.	31
Naproxeno.	32
Dexketoprofeno.....	34
Propiedades fisicoquímicas	36
Constante de disociación de un ácido (pKa).....	36
Coeficiente de partición (logP)	37
Solubilidad.....	38
Área Polar Superficial.....	38
Permeabilidad de moléculas a través de membranas.....	39
Membranas biológicas	40
Membrana intestinal	41
Pruebas de permeabilidad.....	45
Membranas	46

	11
Caco2	47
Ensayo de permeabilidad con membrana artificial en paralelo	49
Tejidos extraídos de fuentes naturales	50
Enterocitos aislados	51
Huevo de gallina	51
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	57
Enfoque de la investigación	57
Método de la investigación	57
Fuentes de información	58
Instrumentos	58
Procedimiento de recolección y análisis de los datos	60
Preparación del medio simulación líquido intestinal:	60
Preparación de la membrana biológica:	61
Preparación de modelo para simulación <i>in vitro</i>	62
Preparación de las curva de calibración:	62
Preparación de la muestra	66
Realización experimental	67
CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS	68
Obtención de la membrana	68
Modelo físico para la simulación <i>in vitro</i> de prueba de permeabilidad	73
Análisis de permeabilidad del Ketoprofeno	81
Análisis de permeabilidad del Dexketoprofeno	87
Análisis de permeabilidad del Naproxeno	93
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	106
REFERENCIAS	109

Índice de tablas

Tabla 1. Propiedades Fisicoquímicas de los Derivados del Arílicos del Acido Propiónico	35
Tabla 3. Absorbancia Versus Concentración para la Curva de Calibración del Ketoprofeno.....	81
Tabla 4. Absorbancia a Diferentes Tiempos en las Muestras de Profenid® (ketoprofeno)	83
Tabla 5. Concentración (mg/mL) Respecto al Tiempo de Profenid® (ketoprofeno).....	84
Tabla 6. Cantidad Respecto al Tiempo de Profenid® (ketoprofeno).....	85
Tabla 7. Papp del Profenid® (ketoprofeno)	86
Tabla 8. Absorbancia Versus Concentración para la Curva de Calibración del Dexketoprofeno	87
Tabla 9. Absorbancia a Diferentes Tiempos en las Muestras de Enantyum® (dexketoprofeno)	89
Tabla 10. Concentración (mg/mL) Respecto al Tiempo de Enantyum® (Dexketoprofeno)	90
Tabla 11. Cantidad Respecto al Tiempo de Enantyum® (Dexketoprofeno).....	92
Tabla 12. Papp del Enantyum® (Dexketoprofeno)	93
Tabla 13. Absorbancia Versus Concentración para la Curva de Calibración del Naproxeno	94
Tabla 14. Absorbancia a Diferentes Tiempos en las Muestras de Aleve® (Naproxeno) 96	96
Tabla 15. Concentración (mg/mL) respecto al tiempo de Aleve® (Naproxeno).	97
Tabla 16. Cantidad Respecto al Tiempo de Aleve® (Naproxeno).....	99
Tabla 17. Papp del Aleve® (Naproxeno)	100
Tabla 18. Comparación de Papp calculadas versus las obtenidas y propiedades fisicoquímicas.....	101

Índice de figuras

Figura 1. Influencia de los AINEs en la Cascada del Acido Araquidónico	27
Figura 2. Clasificación de los AINEs por Similitud Química	29
Figura 3. Clasificación de los AINEs Según su Selectividad a las Isoformas de COX ..	30
Figura 4. Estructura del Ketoprofeno	32
Figura 5. Estructura del Naproxeno.....	33
Figura 6. Estructura del Dexketoprofeno, [(S)-(+)-Ketoprofen]	35
Figura 7. Estructura de una Membrana Biológica.....	40
Figura 8. Variedad de Transportes de Fármacos a Través de las Barreras Celulares.....	45
Figura 9. Monocapa de Células en Sistema de Permeación	48
Figura 10. Sección Longitudinal, el Contenido Interior de un Huevo de Gallina.....	52
Figura 11. Vista Transversal de la Cáscara de Huevo de Gallina Representando las Principales Características Morfológicas	56
Figura 12. Membrana de Huevo Expuesta Tras el Tratamiento con HCl	69
Figura 13. Reacción Química del Carbonato de Calcio y HCl.....	70
Figura 14. Membrana del Huevo Tras la Descalcificación con HCl.....	71
Figura 15. Vista Microscópica de la Membrana Tras la Exposición al HCl, Aumento (10X/0.25/0.17)	72
Figura 16. Membrana Antes y Después de Prueba <i>In Vitro</i> , Aumento (10X/0.25/0.17)	73
Figura 17. Cortes en los Extremos del Tubo Plástico.....	74
Figura 18. Diámetro del Tubo Plástico, Medidos con un Calibrador Vernier.....	74
Figura 19. Representación Esquemática de la Celda Franz.....	75
Figura 20. Modelo Físico para la Simulación <i>In Vitro</i> de Prueba de Permeabilidad con sus Respectivas Partes	76
Figura 21. Calibración de pH Metro.....	77
Figura 22. Modelo de Simulación <i>In Vitro</i> en Diferentes Ángulos.....	78
Figura 23. Presentación Farmacéutica de AINEs	79
Figura 24. Estándares de Referencia	80
Figura 25. Gráfico de Curva de Calibración del Ketoprofeno.	82
Figura 26. Gráfico de Tendencia de la Concentración Versus Tiempo del Profenid® (ketoprofeno)	85
Figura 27. Gráfico de la Curva de Calibración del Estándar de Dexketoprofeno	88

Figura 28. Gráfico de la Tendencia de la Concentración Respecto al Tiempo del Enantyum® (Dexketoprofeno)	91
Figura 29. Gráfico de la Curva de Calibración del Estándar de Naproxeno.	95
Figura 30. Gráfico de la Tendencia de la Concentración Respecto al Tiempo del Aleve® (Naproxeno).....	98

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

Durante el proceso de descubrimiento de fármacos, se lleva a cabo un procedimiento de análisis exhaustivo que permite seleccionarlos o descartarlos según propiedades, dentro de estas un pilar importante son las propiedades fisicoquímicas. En esta línea, una de las pruebas que destaca es la de permeabilidad, con la cual se conoce la capacidad para atravesar membranas biológicas. Influyen propiedades como el coeficiente de reparto, entre otras que se mencionarán posteriormente (Meng y Xu, 2013, p.997).

Las membranas utilizadas en los ensayos de permeabilidad pueden ser artificiales o naturales, las naturales son una excelente opción para realizar estudios *in vitro* al provenir de un sistema biológico, pero presentan varios inconvenientes que dificultan ser usadas. Entre estas desventajas se encuentra la gran cantidad de material que es necesario, complejidad de métodos analíticos y consumo de tiempo (Herrera et al., 2012, p.27).

Se han desarrollado métodos *in vitro* como el de células Caco-2, las cuales son cultivadas de un adenocarcinoma humano, estas asemejan la estructura del epitelio del intestino delgado, pero ameritan estrictas condiciones experimentales y controles de cuidado en el proceso del cultivo, cabe destacar que los resultados no son reproducibles y la inversión es costosa (Debandi, François y Daraio, 2010, p.98; Smetanová, Štětinová, Svoboda y Květina, 2011, p.3).

Por otro lado, la aparición de los ensayos de permeabilidad de membrana artificial en paralelo, según sus siglas en inglés (PAMPA), evita el transporte activo, lo que permite que los compuestos de prueba se clasifiquen según una propiedad de permeabilidad simple por difusión pasiva, siendo óptimo, ya que un alto porcentaje de los fármacos utilizan la difusión pasiva para atravesar el epitelio intestinal (Álvarez, Contreras y Soto, 2014; Herrera et al., 2012, p. 24).

Las metodologías mencionadas poseen gran importancia en el estudio de permeabilidad de fármacos, ya que proporcionan información del comportamiento de las moléculas en las membranas biológicas, de esta forma, se obtienen aproximaciones sobre la viabilidad de nuevos fármacos; sin embargo, cada una posee ciertas desventajas, las cuales difieren unas de otras y no son comparables. En el caso de la células Caco-2, está la dificultad de obtención y mantenimiento de la membrana de dichas células cultivadas, el alto costo que poseen, así como la incapacidad de predecir por separado la permeabilidad según el tipo de transporte que utiliza este método y su resultados no reproducibles; en cuanto al método PAMPA, no es una membrana biológica y solamente utiliza la difusión pasiva como transporte, lo cual, a pesar de ser el más utilizado para el transporte de fármacos a nivel intestinal, no comprende el 100 % biológicamente.

Estos métodos representan el campo de la química médica, la cual tiene como finalidad el estudio para el desarrollo de nuevos compuestos y su utilización en el campo farmacéutico, fundamentado desde los principios químicos y propiedades físico químicas, así como la actividad biológica para una relación cuantitativa en la estructura y actividad.

Analizar la permeabilidad de compuestos permite que estos sean tomados en cuenta en futuras investigaciones como posibles fármacos, por lo cual es importante que profesionales de la salud que cuentan con bases químicas, mencionando al campo farmacéutico como la principal área de dicho campo, sepan utilizar dicha información, ya que, a partir de la permeabilidad, es posible establecer modificaciones químicas en la fase del descubrimiento o desarrollo de fármacos, así como, posteriormente, la predicción de cantidad y lugar de absorción, los tiempos de dosificación, entre otras características, las cuales tienen estrecha relación con la permeabilidad.

Es claro que no siempre se va a contar con los métodos de análisis anteriormente mencionados, debido a la falta de metodologías, presupuesto elevado en equipos y altas tecnologías; sin embargo, la ciencia es amplia para establecer nuevos métodos y generar nuevas formas eficientes con los que se pueda desempeñar una buena enseñanza en el área de la química medicinal, misma que está estrechamente relacionada con áreas como físico química, físico farmacia, biofarmacia, bioquímica, química orgánica,

farmacocinética, entre otras áreas; por ende, la obtención de datos experimentales como por predicción tiene gran importancia.

Tener conocimiento de las diferentes propiedades fisicoquímicas de los compuestos toma gran importancia en lo que conlleva la permeabilidad de fármacos a través de membranas, estas pueden ser obtenidas bajo diferentes métodos experimentales; sin embargo, con el auge de la era del silicio, es posible establecer dichas propiedades *in silico*, lo que permite evaluar con gran seguridad el uso de herramientas computacionales para aspectos o pasos críticos en dichas investigaciones. Así mismo, esta nueva modalidad de análisis es de gran ayuda para acortar en tiempo y presupuesto estos procesos de análisis, al tratarse de moléculas nuevas de las que aún no hay ensayos experimentales.

El conocimiento sobre la estructura de una membrana lipídica permite realizar pruebas de permeación de fármacos a través de una membrana que haya sido seleccionada previamente con pruebas y parámetros ya conocidos, para obtener datos lo más cercanos posible a la realidad de los estudios *in vitro* a gran escala de la permeación de fármacos, cumpliendo con la reproducibilidad y siendo considerados como un método de enseñanza en la química medicinal. Esto lleva a la interrogante: ¿Se puede simular la permeabilidad *in vitro* de una familia de antiinflamatorios no esteroideos a través de una membrana cuyos resultados se comparen con los datos reportados en literatura?

Hipótesis

Es posible simular *in vitro* la prueba de permeabilidad de una familia de antiinflamatorios no esteroideos a través de una membrana cuyos resultados sean comparables con los datos de permeabilidad reportados en la literatura.

Objetivos

Objetivo general

Implementar una membrana que simule de manera *in vitro* una prueba de permeabilidad de una familia de antiinflamatorios no esteroideos.

Objetivos específicos

Proponer una membrana que permita la permeabilidad *in vitro* de una familia de fármacos antiinflamatorios no esteroideos.

Determinar la permeabilidad de una familia de fármacos antiinflamatorios no esteroideos por simulación *in vitro*.

Comparar los reportes de permeabilidad de una familia de fármacos antiinflamatorios no esteroideos con los resultados obtenidos en la simulación *in vitro*.

Justificación

El propósito de esta investigación es lograr de forma efectiva una simulación *in vitro* de prueba de permeabilidad de una familia de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, a través de una membrana, para comprender de una forma experimental la importancia de las propiedades fisicoquímicas de las moléculas en el campo de la química medicinal.

En la investigación para el descubrimiento de fármacos y la evaluación del potencial de absorción oral de las posibles drogas, los cuales son numerosos candidatos al éxito, diferentes propiedades fisicoquímicas son medibles de forma *in vitro* o computacionalmente calculadas, según es mencionado por Zhu, Jiang, Chen y Hwang, (2002), en estas propiedades se incluyen lipofilicidad, liposolubilidad, potencial de enlace

de puentes de hidrógeno o área de superficie polar molecular (PSA) y permeabilidad de membrana a través de células Caco-2.

A pesar de que el tema del desarrollo de fármacos es muy amplio y conocido, la dinámica molecular ha tomado gran importancia, permitiendo facilidades que son complejas de reproducir a nivel *in vitro*, por lo que demostrar experimentalmente un paso significativo que se lleva a cabo en la elección de nuevas moléculas, permite el entendimiento más allá de las teorías. Dicha investigación pretende formar parte de la enseñanza del área mencionada, logrando apreciar desde una perspectiva experimental la importancia de una de las etapas en el desarrollo de nuevos fármacos a pequeña escala.

La literatura de la permeabilidad de fármacos es extensa y meticulosa, por lo que realizar simulaciones de pruebas *in vitro* de determinados fármacos permite apoyar las teorías ya establecidas con anterioridad. Dando reproducibilidad es capaz de desarrollar un método para determinar la permeabilidad de fármaco para futuras investigaciones a pequeña escala con fines educativos (Álvarez et al., 2015, p.1520).

El comportamiento de los fármacos a nivel de absorción varía según las características de la molécula que los conforma, donde las diferentes propiedades fisicoquímicas hacen posible la predicción de la permeación de un fármaco a través de una membrana lipofílica, por lo que evaluar cualitativamente las moléculas destinadas a ser fármacos tiene relación en su paso por el cuerpo, iniciando por la absorción; cabe destacar que por mucho tiempo se ha determinado que la mayoría de estas moléculas siguen un patrón importante en cuanto a sus propiedades, siendo de pesos moleculares pequeños y de carácter lipofílico, finalmente, eso conlleva a las cinco reglas de Lipinski.

El análisis de drogas comerciales ilustró que había una relación entre las propiedades moleculares de un compuesto y su absorción oral. Por ejemplo, el peso molecular, el enlace de hidrógeno y la lipofilicidad ($\log P$) han sido todos asociados con un compuesto que tiene una alta absorción oral (las 5 reglas de Lipinski). (Ruell, 2003, p.28)

Tras identificar una membrana que permita la permeabilidad *in vitro* de una familia de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, se espera favorecer positivamente la

correlación de datos obtenidos experimentalmente con los de la literatura, proporcionándole viabilidad a la investigación para futuras pruebas con otros fármacos, ya que la amplitud del tema permite crear modificaciones y aplicación de teorías complementarias para obtener datos de importancia en el estudio de desarrollo de nuevos medicamentos. Sin embargo, la composición de la membrana es pilar esencial para la obtención de datos favorables *in vitro*, lo que implica un estudio de la naturaleza de la membrana, ya que lo ideal sería utilizar membranas que simulen el lugar de absorción en el organismo para cumplir con el fin destinado en el campo farmacéutico.

Existe una expansión en la comercialización industrial de membranas, lo que significa un progreso significativo en el desarrollo de membranas más detalladas y mejores características. Estos avances dan progreso y mejoras a diferentes áreas de la investigación como son aplicaciones médicas, herramientas de investigación, procesos de formación de membranas, estructura química, estructuras físicas y empaques, lo anterior mencionado por Ng, Rouse, Sanderson, y Eccleston (2012, p.580).

Tras la experimentación y el análisis de datos, el procedimiento se puede establecer como opción para seguir investigando en diferentes áreas de la química medicinal y áreas en común, ya que se prevé que el método sea reproducible. La selección de ensayar permeabilidad se fundamenta en que es una práctica indispensable en el desarrollo de fármacos. “La permeabilidad del fármaco es el principal factor para decidir si un candidato a fármaco puede hacer que el desarrollo continúe. Por lo tanto, es importante predecir la permeabilidad del fármaco antes de la inversión” (Meng y Xu, 2013, p.991).

Antecedentes

Según William Stillwell (2013), las teorías más antiguas del transporte a través de una membrana datan de Charles Ernest Overton en el año 1899, quien encontró que moléculas diferentes al agua cruzaban las membranas, específicamente las de carga neutra cruzaban más rápido que las cargadas. Concluyó que las membranas debían poseer una barrera lipídica, que podían contener colesterol y lecitina, sus análisis más probados fueron mediante difusión pasiva, por medio del gradiente de concentración del soluto al disolverse en la membrana y atravesarla. Así mismo, reconoció la necesidad del transporte "ascendente" (ahora llamado activo) contra un gradiente para algunos solutos que no siguieron su regla de solubilidad lipídica.

En 1974, se generó información sobre el estudio de permeación, donde el autor Cohen (1974) en el estudio titulado *The Permeability of Liposomes to Nonelectrolytes II. The Effect of Nystatin and Gramicidin A*, realizado en Inglaterra, encontró que la selectividad para la difusión dentro de las membranas está relacionada con el estado físico de las cadenas de hidrocarburos, demostró que la permeabilidad a través de liposomas sigue un orden de coeficiente de partición de los solutos en un disolvente lipídico, así mismo, observó la disminución de velocidades de penetración independientemente de la composición lipídica o la cantidad de colesterol presente tras el aumento del tamaño del soluto.

Durante el pasar de los años, se registran diferentes estudios sobre la ampliación del tema de la perfusión de solutos a través de membranas, tal es el caso de Bassolino, Alper y Stouch (1993) en el estudio titulado *Solute Diffusion in Lipid Bilayer Membranes: An Atomic Level Study by Molecular Dynamics Simulation*, realizado en Estados Unidos, quienes aseguran que se sabía poco sobre el mecanismo o el paso de determinación de velocidad de este a nivel atómico. Mencionan la importancia de la estructura y dinámica de las membranas lipídicas para el transporte de solutos, sin embargo, se sabe poco de estos procesos, porque su fluidez dificulta la caracterización experimental.

La permeabilidad del fármaco es la capacidad de una molécula para cruzar la bicapa lipídica, se puede estimar con el cambio de energía libre que la droga debe superar a través de la membrana, según lo indican Meng y Xu (2012) en su investigación titulada *Drug permeability prediction using PMF method* realizada en China, mencionan que las células Caco-2 son usadas *in vitro* para predecir el transporte intestinal de fármacos, siendo buenas, pero más lentas y caras en comparación con los métodos computacionales. Tras simular la permeabilidad de doxorubicina e ibuprofeno, concluyen que, cuanto más alta permeabilidad, más baja energía libre posee el fármaco y que los fármacos con grupos hidrofóbicos tienden a pasar rápidamente la membrana.

En el año 2006, en Islandia, los autores Loftsson, Konráðsdóttir y Másson, en el estudio titulado *Development and evaluation of an artificial membrane for determination of drug availability*, mencionan que las membranas artificiales PAMPA (ensayo de permeabilidad de membrana artificial en paralelo, según sus siglas en inglés) y las membranas basadas en células como Caco-2 son utilizadas en las etapas iniciales del descubrimiento de fármacos, pero, al penetrar los fármacos a las membranas, se cuenta con dos resistencias al paso, las cuales son indicadas como resistencia a la membrana lipofílica y resistencia a la difusión en las capas de agua no agitada adyacentes a ambas superficies de la membrana lipófila. Por lo que es necesario implementar membranas que simulen las propiedades fisicoquímicas de las membranas biológicas de forma sencilla y de bajo costo para el estudio del campo farmacéutico.

Las membranas artificiales PAMPA, mencionadas anteriormente, son un método de bajo costo, reproducible, de alta precisión y fácil de usar en comparación con el cultivo celular que permite predecir la absorción, considerando que entre 80 % y 95 % de las drogas son absorbidas principalmente por difusión pasiva. Según Álvarez, Contreras y Soto (2014), en su investigación titulada *Use of DMPC and DSPC lipids for verapamil and naproxen permeability studies by PAMPA*, en Chile, realizaron un ensayo de permeabilidad con membrana artificial en paralelo (PAMPA) con verapamilo y naproxeno, donde utilizaron los lípidos 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DSPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC) y una mezcla equimolar de DMPC / DSPC, ambos en ausencia y en presencia de 33,3 % en moles de colesterol. Esto indica la importancia de simular las membranas biológicas donde deben poseer medios lipídicos para que tengan un grado de comparabilidad.

Delgado en el 2014 en México realizó el estudio titulado *Cálculo de la permeabilidad de un modelo de membrana celular hacia dos agentes antifúngicos* y da reconocimiento de propiedades moleculares en relación con el proceso de difusión pasiva del fármaco, destacando el peso molecular, el estado de ionización, la capacidad de formar puentes de hidrógeno, el coeficiente de distribución (log D) y el coeficiente de partición (log P). Así mismo, destaca que, en la actualidad, los estudios de permeabilidad realizados en membranas por vía computacional han ido tomando mayor importancia mejorando las técnicas de simulación para los muestreos dentro de las membranas.

Es de suma importancia tomar en cuenta los factores para predecir la absorción de fármacos tras el paso de las membranas, permeabilidad, solubilidad y disolución del fármaco, principalmente en la etapa de descubrimiento de fármacos, tal como fue demostrado por Takano, Kataoka y Yamashita en el año 2012, en su estudio titulado *Integrating drug permeability with dissolution profile to develop IVIVC*, realizado en Japón, quienes trataron la correlación *in vivo-in vitro* (IVIVC) por dos enfoques: el sistema de disolución / permeación *in vitro* (sistema D / P) y el modelo de simulación *in silico*. Estudios IVIC puede agilizar el proceso de desarrollo de fármacos y aumentar su probabilidad de éxito.

Las propiedades fisicoquímicas de los tejidos y de las moléculas son de importancia para el entendimiento de la distribución por la membrana, tal como fue mencionado en Estados Unidos por los autores Ghosh, Maurer, Litchfield, Varma, Rotter, Scialis, Feng, Tu, Guimaraes y Scott para el año 2014 en su estudio *Toward a Unified Model of Passive Drug Permeation II: The Physicochemical Determinants of Unbound Tissue Distribution with Applications to the Design of Hepatoselective Glucokinase Activators*, donde emplearon el enfoque utilizando datos experimentales *in vitro* para estimar la permeabilidad de especies tanto ionizadas como neutras, con el fin de comprender la exposición subcelular de ácidos o bases utilizando propiedades fisicoquímicas específicas.

La permeabilidad de la membrana lipídica es una propiedad importante del fármaco que contribuye a los aspectos de farmacocinética. Ghosh, Scott y Maurer para el año 2013 en Estados Unidos, en su estudio *Towards a unified model of passive drug*

permeation I: Origins of the unstirred water layer with applications to ionic permeation desarrollaron un complemento que describe cómo las moléculas pueden penetrar las membranas en formas neutras e ionizadas, de acuerdo con la relación Nernst-Planck, proporcionando una ayuda donde propiedades moleculares y los comportamientos relacionados con la permeabilidad de la membrana lipídica pueden considerarse a favor del diseño futuro de fármacos.

La autora Krämer en el año 2015, con su aporte en *Quantitative aspects of drug permeation across in vitro and in vivo barriers*, en Suiza, destaca que la cinética de permeación a través de las paredes de células endoteliales y epiteliales es determinante para la farmacocinética de un fármaco y concluye que hay condiciones por considerar en la permeación de fármacos, como lo son diferentes condiciones de gradiente en los compartimentos, transporte dirigido mediante transportadores, insolubilidad del permeante o adsorción al material del dispositivo, alta acumulación del permeante en la barrera, por ejemplo, fase lipídica, material de barrera intracelular o compuestos altamente permeables.

Cabe destacar que existen nuevas formas para analizar las membranas para beneficio de la industria farmacéutica, tal es el caso de una investigación realizada en China por Zeng, Yao, Liu, en el 2012, titulada *Numerical simulation of the effect of permeability on the hydrodynamics in a parallel-plate coculture flow chamber*, donde estudiaron la permeabilidad de membranas porosas y mostraron que la permeabilidad era directamente proporcional al espesor, la porosidad y el tamaño de poro de la membrana e inversamente proporcional al factor de forma de la superficie, lo que muestra que es importante conocer la composición de la membrana por ensayar.

Otra técnica estudiada es la del intestino invertido, la cual se utiliza para estudiar el transporte de fármacos a través del intestino y hacia las células epiteliales. Este es útil para cuantificar el transporte paracelular de moléculas hidrofílicas y la estimación del efecto de los potenciadores de la absorción. En India, se realizó un ensayo por Dixit, Jain y Dumbwani en el año 2011, titulado *Standardization of an ex vivo method for determination of intestinal permeability of drugs using everted rat intestine apparatus*, donde los resultados de absorción obtenidos tras el método experimental del intestino

invertido con atenolol, propranolol y metoprolol comparado con datos reportados con Caco-2 fueron similares.

La presente investigación va a permitir obtener una visión experimental del trasfondo que se lleva a nivel farmacéutico en el desarrollo de nuevos medicamentos, considerando a pequeña escala una simulación de las pruebas que se deben realizar para el descarte o aplicación de nuevas moléculas en el área de la salud, por medio de la comparación de datos de una familia de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) obtenidos computacionalmente y los realizados bajo un método *in vitro* en laboratorio, lo que a su vez ayudará al entendimiento del área dentro de la química medicinal.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

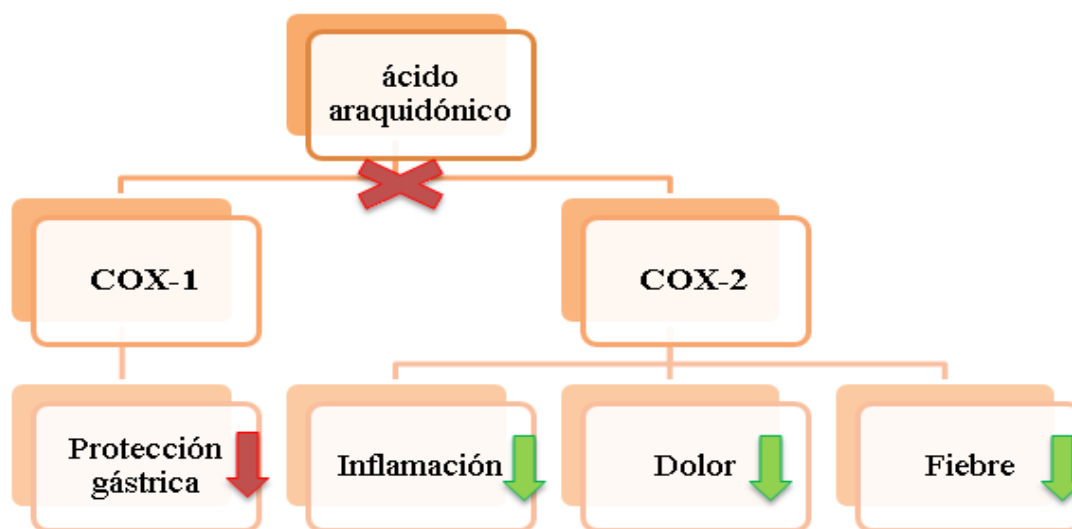
En el siguiente capítulo, se exponen los conceptos de importancia para la siguiente investigación, abarcando temas de los antiinflamatorios no esteroideos, permeabilidad y membranas, principalmente, siendo racionales con el estudio por desarrollar.

Antiinflamatorios no esteroideos

Los medicamentos conocidos como antiinflamatorios no esteroideos (AINEs por sus siglas) son utilizados en gran medida para el tratamiento de inflamación, el dolor y la fiebre; así mismo, algunos de estos fármacos se emplean para la hiperuricemia y la gota. En términos generales, estos medicamentos actúan al inhibir un grupo de prostaglandinas conocidas como ciclooxigenasas, las cuales tienen un papel fundamental en el desarrollo de la inflamación, dolor, fiebre y también participan en mecanismos de protección gástrica.

Basado en información brindada por Goodman y Gilman (2015), en la inhibición de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) es la principal mediadora de los resultados antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorios de los AINEs, mientras que, al inhibir de forma simultánea la ciclooxigenasa-1 (COX-1), existe una contribución a los efectos secundarios indeseables en el tubo digestivo. Al ver la figura 1, se observa cómo se da la interrupción de ambas COX, sin embargo, más adelante se brinda información sobre la tendencia de inhibición de unos AINEs en relación con otros.

Figura 1. Influencia de los AINEs en la Cascada del Acido Araquidónico



Nota: elaboración propia (2018).

Los antiinflamatorios no esteroideos inhiben la ciclooxigenasa 1 (cox-1), la cual se encuentra en diferentes tejidos, por esta vía se produce una disminución de prostaglandinas y tromboxanos, en los tejidos gastrointestinales y renales, genera efectos indeseables y puede limitar su utilidad terapéutica, expresando en otros términos la relación beneficio riesgo de los AINEs, sin embargo, posee un papel importante en diferentes reacciones fisiológicas, así mismo, se da la inhibición de la ciclooxigenasa 2 (cox-2) ejerciendo su actividad antiinflamatoria (Pérez, López y Grau, 2002, p.3).

Los AINEs son un conjunto de medicamentos que tienen la particularidad de ser químicamente heterogéneos, esto implica que sean moléculas distintas entre ellas, debido a que se obtienen de derivados de múltiples compuestos, los cuales, a pesar de sus diferentes estructuras químicas, guardan relación en cuanto a la actividad clínica y sus efectos. Para Pérez et al. (2002), el amplio grupo de medicamentos incluyen los fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos, también afirman que, en la actualidad, dentro de sus acciones farmacológicas se debe considerar el efecto antiagregante plaquetario.

Entre las características químicas, Goodman y Gilman (2015) destacan que de los AINEs la mayoría son ácidos orgánicos con cifras de pKa relativamente bajas y, por lo general, son fármacos hidrófobos, una característica que les permite lograr el acceso a los

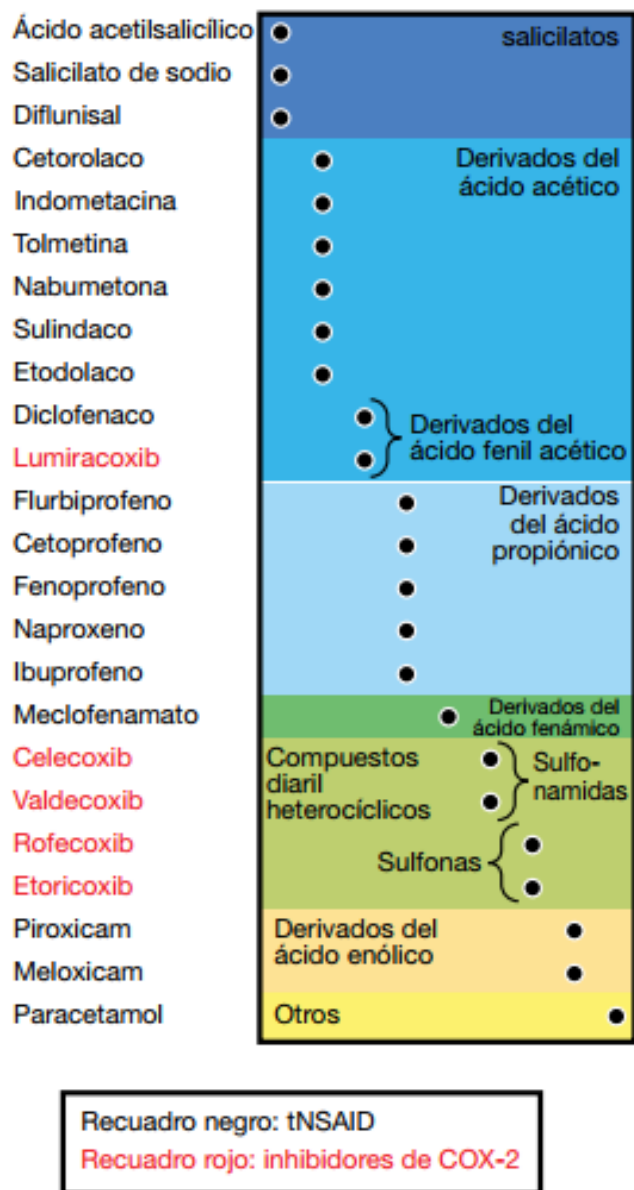
conductos hidrófobos del araquidonato, lo que ocasiona características farmacocinéticas compartidas.

Los mismos autores indican que los compuestos, por lo general, se absorben bien por vía oral, presentan altas cifras de unión a proteínas plasmáticas y se excretan por filtración glomerular o por secreción tubular. Se acumulan en sitios de inflamación, donde el pH es bajo, lo que podría confundir la relación entre las concentraciones plasmáticas y la duración del efecto farmacológico

Cabe mencionar que los AINEs están clasificados según su derivación química, por lo que existen diferentes familias con ciertas similitudes, tal como se observa en la figura 2, donde son representados los compuestos o, mejor dicho, el principio activo de los diferentes AINEs y sus familias

En el libro *Las bases farmacológicas de la terapéutica* de Goodman y Gilman (2015), se describen diferentes clases, las cuales comprenden derivados del ácido salicílico (donde se incluye el ácido acetilsalicílico, diflusinal), ácido propiónico (amplio grupo que comprende naproxeno, ibuprofeno, flurbiprofeno, ketoprofeno), el ácido acético (el cual posee los compuestos indometacina, etodolaco, diclofenaco, ketorolaco), el ácido enólico (con dos compuestos llamados piroxicam y fenilbutazona), el ácido fenámico (el cual incluye al ácido mefenámico y al ácido meclofenámico), las alcalonas (como nabumetona) y los compuestos diarilheterocíclicos conocidos por su terminación en coxib (incluye el celecoxib, el valdecoxib, el rofecoxib, y el etoricoxib).

Figura 2. Clasificación de los AINEs por Similitud Química



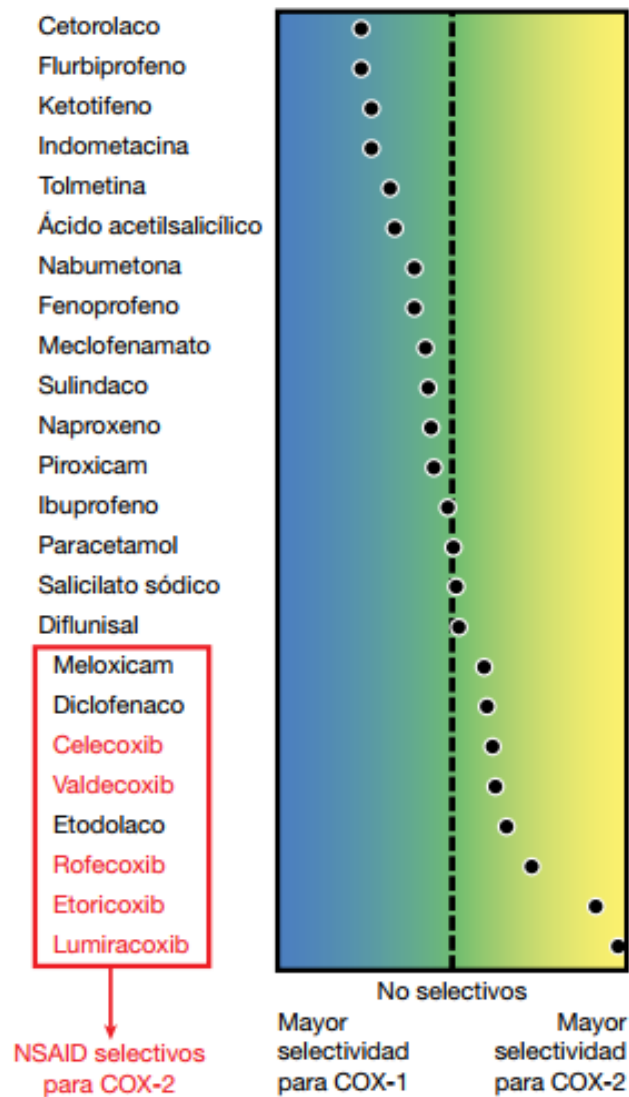
Nota: Goodman y Gilman (2015, p.962).

Derivados del ácido propiónico

Como se mencionó anteriormente, existen diferentes familias en los AINEs, entre ellas se encuentran los derivados del ácido propiónico, estos son inhibidores no selectivos de la ciclooxigenasa (ver figura 3). Esto quiere decir que poseen inhibición de la COX1

por lo que se desencadenan ciertos efectos secundarios comunes a otros AINES. En este grupo terapéutico, se encuentran ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno y oxaprozina (Goodman y Gilman, 2015, p.637).

Figura 3. Clasificación de los AINEs Según su Selectividad a las Isoformas de COX



Nota: Goodman y Gilman (2015, p.962).

Ketoprofeno.

Fue sintetizado en Francia por los químicos de Rhône-Poulenc en 1967 e introducido en 1973 en Francia y el Reino Unido para uso antiinflamatorio. Según se indica en *National Center for Advancing Translational Sciences* (NCATS, por sus siglas en inglés), este medicamento es utilizado para tratar la artritis reumatoide, la osteoartritis, la dismenorrea y aliviar el dolor moderado. Según Wishart (2018), ha sido relacionado con una baja tasa de elevaciones de las enzimas séricas durante la terapia y con raros casos de daño hepático agudo, tiene como ventaja que la absorción del compuesto es buena y rápida de forma oral, donde a su vez la concentración máxima tiene un tiempo entre 0.5 a 2 horas.

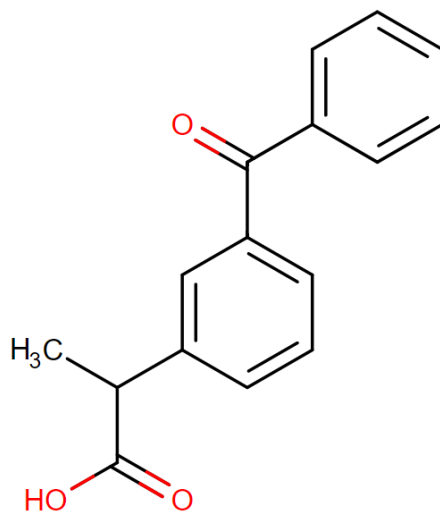
Descrito en cuanto a su estructura química, el ketoprofeno es un ácido oxo monocarboxílico que consiste en ácido propiónico sustituido por un grupo 3-benzoilfenilo en la posición dos, tal como se muestra en la figura 4. Es clasificado como una benzofenona, a lo que se indica como cualquier cetona aromática donde el grupo carbonilo está unido a dos grupos fenilo, a su vez, también posee la particularidad de ser un ácido oxo monocarboxílico, lo que tiene como definición cualquier ácido monocarboxílico que tenga al menos un grupo funcional oxo adicional, según lo indican en *Chemical Entities of Biological Interest* (ChEBI)(a).

Entre sus propiedades farmacocinéticas se encuentra, según la literatura en *Drug Information Handbook*, que el inicio de acción es de menos de 30 minutos con una duración del efecto antiinflamatorio de aproximadamente 6 horas; posee una absorción de aproximadamente el 100 %, cuenta con unión a proteína plasmática mayor al 99 %, así mismo, se registra tiempo de vida media de 2 a 4 horas y la excreción aproximada de 80 % en orina.

Dentro de sus propiedades, se dice que posee un punto de fusión de 95°C, punto de inflamabilidad 228,8 °C, densidad obtenida por predicción de 1,3 g/cm³ y punto de ebullición por predicción de 431,2°C, basado en datos de Royal Society of Chemistry;

en la tabla 1, se recopilan más propiedades fisicoquímicas, las cuales son de importancia para el desarrollo de la permeabilidad.

Figura 4. Estructura del Ketoprofeno



Nota: Wishart (2018). *DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018*.

Naproxeno.

El naproxeno es un agente antiinflamatorio con propiedades analgésicas y antipiréticas; tanto el ácido como su sal de sodio se usan en el tratamiento de la artritis reumatoide, la osteoartritis, la espondilitis anquilosante, la tendinitis, la bursitis, otros trastornos reumáticos o músculo esqueléticos, la gota aguda, así como para el alivio del dolor leve a moderado y el tratamiento de la dismenorrea primaria. Se habla de la particularidad del naproxeno, el cual posee efectos inhibidores prominentes sobre la función leucocítica y algunos datos sugieren que el naproxeno también parece tener una eficacia levemente mejor en cuanto a la analgesia y alivio de la rigidez matutina (Goodman y Gilman, 2015, p.637).

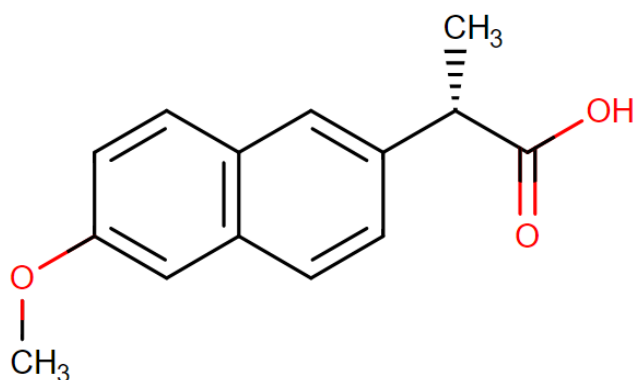
Una cualidad del naproxeno es que se absorbe rápida y completamente en el tracto gastrointestinal, el mismo posee una biodisponibilidad *in vivo* del 95 %. Sin embargo, el compuesto es bien absorbido, pero la forma de su sal de sodio se absorbe más

rápida, lo que conlleva a niveles plasmáticos máximos más altos para una dosis dada en comparación con la base. En cuanto a su absorción junto con comidas, estas causan una ligera disminución en la velocidad de absorción, según lo indica Wishart (2018).

Según su clasificación química, es 2-metoxinaftaleno sustituido por un grupo carboxi etilo en la posición seis, esto es explicado como un alquiloxinaftaleno que tiene un sustituyente metoxi; también es descrito como un ácido monocarboxílico, en otras palabras es un oxoácido que contiene un único grupo carboxi (ver figura 5), según lo indican en ChEBI(b). Entre sus propiedades farmacocinéticas, posee una duración del efecto antiinflamatorio igual o menor a 12 horas, posee una absorción de aproximadamente el 100 %, cuenta con unión a proteína plasmática de 99 %, así mismo, se registra tiempo de vida media de 12 a 17 horas y la excreción es 95 % en orina, dichos datos son basados en *Drug Information Handbook*.

Dentro de sus propiedades, se habla de que se encuentra en estado polvo (sólido) blanco, con un punto de ebullición de 402-404 °C, posee un punto de fusión de 155°C, punto de inflamabilidad 154.5 °C basado en datos de Royal Society of Chemistry; en la tabla 1, se recopilan más propiedades fisicoquímicas, las cuales son de importancia para el desarrollo de la permeabilidad.

Figura 5. Estructura del Naproxeno



Nota: Wishart (2018). *DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018*.

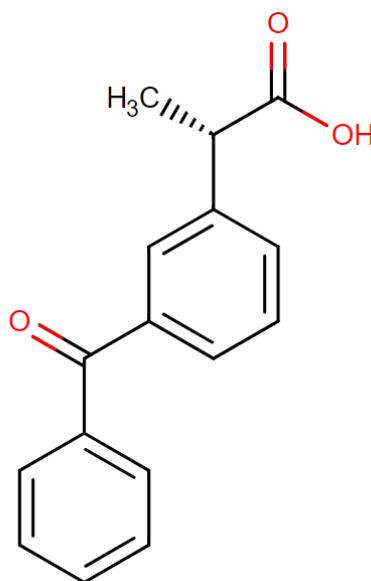
Dexketoprofeno.

Al bloquear la ciclooxigenasa, el dexketoprofeno evita la producción de prostaglandinas y, por lo tanto, reduce la inflamación y el dolor. Junto con la acción analgésica periférica, posee acción analgésica central. Mencionando el estado de absorción, se conoce que, después de la ingestión oral, el inicio de acción de dexketoprofeno es dentro de los 30 minutos. La vida media plasmática de dexketoprofeno es de aproximadamente 4-6 horas. La concentración máxima es de aproximadamente 30 minutos.

El dexketoprofeno es el estereoisómero dextrorrotatorio del ketoprofeno, según el principio de la estereoquímica, el autor L.C. Wade describe que los estereoisómeros tienen la misma secuencia de enlaces, sin embargo, difieren en la orientación espacial de algunos de sus átomos. Esta diferencia espacial provoca diferencias considerables en sus propiedades físicas, químicas y biológicas; al mencionar la actividad óptica del compuesto, se debe recordar que, según la rotación del plano de polarización de la luz, a los compuestos que giran el plano de polarización hacia la derecha se les denomina dextrógiros, [(S)-(+)-Ketoprofen].

Según lo indican en ChEBI(c), es descrito en cuanto a su estructura química, es un ácido monocarboxílico, específicamente el ácido (S) -hidratrópico sustituido en la posición 3 del anillo fenilo por un grupo de benzoilo (ver figura 6). Es clasificado como una benzofenona, a lo que se indica como cualquier cetona aromática donde el grupo carbonilo está unido a dos grupos fenilo, a su vez, también posee la particularidad de ser un ácido oxo monocarboxílico, lo que tiene como definición cualquier ácido monocarboxílico que tenga al menos un grupo funcional oxo adicional.

Dentro de sus propiedades, se dice que posee un punto de fusión de 75°C, punto de inflamabilidad 228,79 °C, punto de ebullición de 431,3°C, densidad obtenida por predicción de 1,2 g/cm³ basado en datos de Royal Society of Chemistry; en la tabla 1, se recopilan más propiedades fisicoquímicas, las cuales son de importancia para el desarrollo de la permeabilidad.

Figura 6. Estructura del Dexketoprofeno, [(S)-(+)-Ketoprofen]

Nota: Wishart (2018). *DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018*.

A continuación, en la tabla 1, se mencionan diferentes propiedades fisicoquímicas de algunos de los derivados del ácido propiónico anteriormente mencionados, donde se pueden apreciar sus diferencias, ya que estructuralmente son moléculas diferentes, sin embargo, se observa cómo el dexketoprofeno posee las mismas propiedades que el ketoprofeno dadas las circunstancias químicas vistas.

Tabla 1. Propiedades Fisicoquímicas de los Derivados del Arílicos del Acido Propiónico

Fármaco	Propiedad fisicoquímica. ^a					
	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	logP	APS (Å ²)	Solubilidad en agua	pKa
Ibuprofeno	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206.29	3.97	37.30	21 mg/L (25 °C)	4.91
Naproxeno	C ₁₄ H ₁₄ O ₃	230.25	3.18	46.53	15.9 mg/L (a 25 °C)	4.15
Dexketoprofeno	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	254.28	3.29	54.37	51 mg/L (a 22 °C)	3.88
Ketoprofeno	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	254.28	3.29	54.37	51 mg/L (a 22 °C)	3.88

^a Información tomada de Wishart (2018). *DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018*.

Cada elemento, compuestos y sustancias poseen un conjunto de propiedades que les da la identidad individualizada, estas aportan gran utilidad para el entendimiento o explicación de diferentes áreas de la ciencia.

Propiedades fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas comprenden las características inherentes de una sustancia que pueden ser determinadas sin alterar la composición, pueden estar relacionadas con la apariencia del compuesto, así mismo, están asociadas con la capacidad para formar nuevas sustancias, dándole caracterización para ser identificadas y diferenciarlas de otras, lo anterior descrito por Arena y Hein (2007). A continuación, se describen propiedades como logP, pKa, APS, solubilidad, peso molecular y fórmula molecular, las cuales están asociadas con la permeabilidad de las moléculas.

Constante de disociación de un ácido (pKa)

La pKa es una medida logarítmica de la constante de disociación de un ácido, esto quiere decir que $-\log_{10} K_a$. Esta constante de disociación es una medida cuantitativa de la fuerza de un ácido en solución, según lo define Szisz (2016).

En otras palabras, es explicado más detalladamente por los autores Di y Kerns (2003) como la constante de ionización de un compuesto, dándole una importancia farmacológica, ya que más de 60 % de las drogas que son comercializadas son ionizables; por lo que la importancia de dicho factor está en que afecta la solubilidad, la permeabilidad y la absorción oral por medio de la variación de la distribución de especies neutras y cargadas.

Los mismos autores contribuyen con la idea de que los compuestos de carácter ácidos a pH altos (medios básicos) tienden a ser más solubles y menos permeables,

mientras que los compuestos básicos tienden a ser más solubles y menos permeables a pH bajos (medios ácidos).

Coefficiente de partición (logP)

El coeficiente de partición es una relación de concentraciones de un compuesto no ionizado en las dos fases de disolventes inmiscibles (agua y n-octanol) en equilibrio. Esta es la medida logarítmica base 10 del coeficiente, dado por la ecuación 1.

$$\log P_{oct/agua} = \log \left(\frac{[soluta]_{octanol}}{[soluta]_{agua}^{no\ ionizado}} \right) \quad (1)$$

El flujo de masa de una molécula en el medio de dos disolventes inmiscibles se rige por su lipofilidad. Según Szisz (2015), cuanto más afín sea una molécula al medio lipofílico, más soluble es en la fase orgánica. Cuando una molécula es ionizable a un pH determinado, se forma un anión o catión hidrófilo, lo que conlleva a que este no tenga afinidad en el medio orgánico, por ende, tiende a acumularse en el medio acuoso.

Solubilidad

La descripción más sencilla de solubilidad está en que es una propiedad química que hace referencia a la habilidad de una sustancia soluto para disolverse en un solvente, esto definido por Szisz (2018). La solubilidad tiene efecto directo y de gran importancia en los resultados de ensayos tanto *in vitro* en cuanto a actividad y propiedad como en la biodisponibilidad oral *in vivo*, por lo que los compuestos con características insolubles tienden a dar resultados erróneos de ensayo, según lo mencionan Di et al. (2003).

A su vez, mencionan la importancia de la medición de la solubilidad a múltiples niveles de pH (por ejemplo, pH 1-8), debido a que muchos candidatos a fármacos contienen grupos ionizables. Esta relación de solubilidad y pH proporciona el entendimiento de la absorción a lo largo del gradiente de pH del tracto gastrointestinal, cabe destacar que existen múltiples ensayos de cribado de solubilidad temprana, los cuales son de alto rendimiento y son empleados en el descubrimiento de fármacos.

Existe una relación entre la solubilidad y la permeabilidad, esta última se explica más adelante, los autores indican que la solubilidad mínima necesaria para la administración oral va a depender de la potencia y la permeabilidad del compuesto. Ya que un compuesto de alta potencia y permeabilidad puede tener baja solubilidad para tener la actividad oral, sin embargo, un compuesto de baja potencia y permeabilidad va a depender de una buena solubilidad para que el compuesto sea oralmente activo.

Área Polar Superficial

El área polar superficial (PSA, por sus siglas) de una molécula se define como la suma de polaridad de las moléculas de un compuesto como oxígeno, nitrógeno o hidrógeno, en otras palabras, la capacidad de un compuesto para formar puentes de hidrógeno. Los autores Shityakov et al. (2013) mencionan que, en la parte de investigación de medicamentos, si una molécula no es lo suficientemente polar, no podrá abandonar la membrana para volver al entorno acuoso.

De esta forma, estas propiedades toman gran influencia en la permeabilidad, ya que los fármacos suelen ser moléculas ionizables, lo que implica que se tome en cuenta qué tanto se disocia un compuesto, la afinidad que tiene este a medios acuosos o lipofílicos, su capacidad de disolverse en medios y la polaridad para analizar su afinidad a atravesar membranas.

Permeabilidad de moléculas a través de membranas

La permeabilidad involucra la capacidad de una barrera para permitir el paso de un soluto a través de ella siendo cuantificable y modificable por la composición de membranas o por las propiedades fisicoquímicas del soluto que va atravesarla, descrito por Di et al. como un factor importante para el paso a través de las membranas celulares en ensayos basados en células, como sucede en la absorción a través del tracto gastrointestinal (GI). Se debe tener claro que la permeabilidad y la solubilidad son interdependientes, donde muchos compuestos muy permeables poseen baja solubilidad y viceversa.

Los autores Di y Kerns (2003) indican que existen propiedades de gran importancia que tienen estrecha relación con la permeabilidad y la solubilidad de compuestos, ya que, si se modifica estructuralmente el tamaño molecular, afectará la capacidad de la molécula para crear puentes de hidrógeno o viceversa; de la misma forma, si se modifica el peso molecular, se verá afectada la lipofilicidad. Estos cambios pueden aumentar la permeabilidad de la molécula, sin embargo, habrá una disminución en la solubilidad.

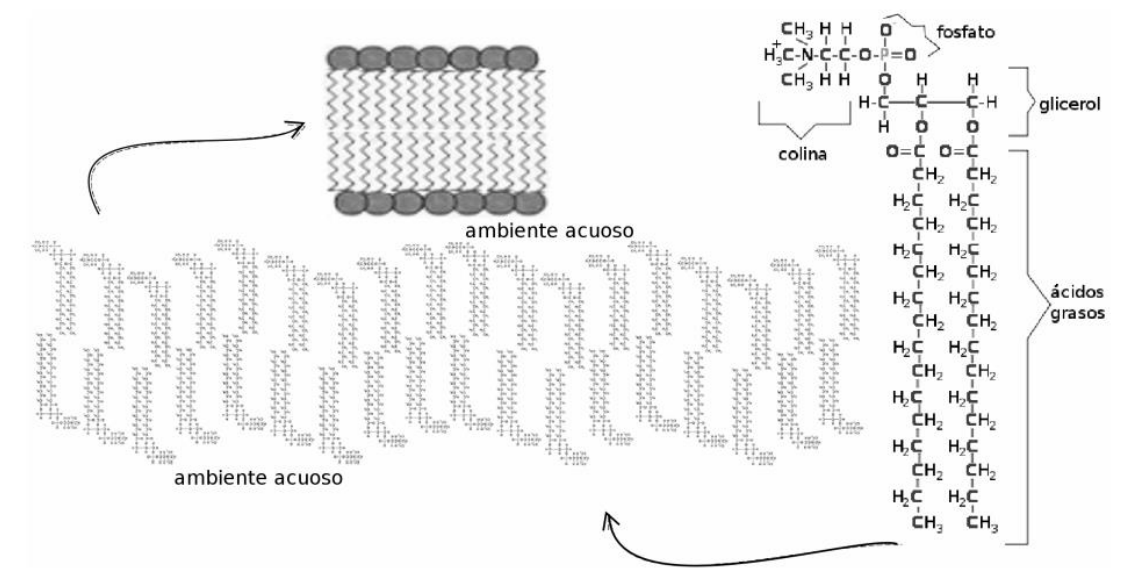
Por este motivo, para obtener una buena absorción, los autores recomiendan que debe existir un equilibrio entre las propiedades fisicoquímicas, además, que en relación de permeabilidad y solubilidad la primera es de elección, ya que la solubilidad se puede mejorar mediante modificaciones estructurales en la molécula o de fármacos.

Membranas biológicas

Las membranas biológicas son el principal componente de todos los organismos, estas poseen cualidades especiales, entre ellas la composición. Están compuestas por bicapas de fosfolípidos con incorporaciones proteicas, glicolípidos y colesterol.

Esta conformación se puede encontrar desde las membranas hasta en las organelas, los autores Martínez, Maldonado y Hernández (2010) indican la funcionalidad de las membranas de forma generalizada como el aislamiento de la célula, actúa como barrera de los espacios intra y extracelular. Tienen la particularidad de ser anfifílicas, ya que poseen una afinidad acuosa, pero, así mismo, otra parte de las moléculas tienen afinidad lipofílica como se observa en la figura 7. Donde los ácidos grasos comprenden la parte lipofílica, mientras que la cabeza polar comprende los fosfatos y la colina.

Figura 7. Estructura de una Membrana Biológica



Nota: Martínez et al. (2010, p109).

Membrana intestinal

La administración oral es la vía de elección principal para los fármacos, pues es el modo más natural o fisiológico y, por tanto, con mayor aceptabilidad por parte del paciente. La absorción oral del fármaco está influenciada por múltiples factores, entre ellos se destacan la permeabilidad del fármaco, así como la solubilidad, su disolución, el transporte activo y también en algunos casos el metabolismo presistémico.

Para ser absorbido, un fármaco debe difundir a través de diferentes barreras, incluidas la mucosa, la capa del moco intestinal, las células epiteliales intestinales, la lámina propia y el endotelio de los capilares. Entre estas barreras mencionadas la capa de células epiteliales es la barrera más importante para la absorción del fármaco, por ende, es posible utilizar una monocapa de las células epiteliales intestinales para estudiar la absorción del fármaco, mencionado por Smetanová et al (2011).

Las membranas son estructuras muy ordenadas y divididas en compartimientos. Estas son relativamente permeables al agua, ya sea por difusión o por el flujo impulsado por diferencias hidrostáticas u osmóticas a ambos lados de la membrana. El paso paracelular por los espacios intercelulares es lo bastante grande como para que la transferencia a través del endotelio capilar esté limitada por el flujo sanguíneo. Por consiguiente, la mayoría de los fármacos lipófilos debe pasar por la membrana celular misma mediante procesos pasivos y activos. (Goodman y Gilman, 2015, p.14)

La absorción del fármaco a través de la membrana intestinal es un proceso complejo y puede ocurrir por una o más rutas diferentes, de las cuales se describen el transporte pasivo transcelular, pasivo paracelular, rutas mediadas por los transportadores y por la transcitosis (ver figura 8). En cuanto al transporte pasivo transcelular y paracelular, se describe que la difusión pasiva es promovida según el gradiente de concentración que es producido en las vías transcelulares, estas atraviesan la membrana

celular del enterocito o si son paracelulares, son descritas como la vía estrecha que hay en la unión de un enterocito con otro.

Los compuestos lipofílicos pueden atravesar de forma más rápida la barrera celular partiendo de la sección luminal, su transporte principalmente será transcelular; en cuanto al proceso paracelular, las uniones son estrechas, por lo que el paso de compuestos a través del espacio intercelular es restringido, donde solamente compuestos hidrofílicos de bajo peso molecular y ciertos péptidos cruzan el epitelio intestinal a través del mecanismo paracelular. En cuanto a la difusión pasiva de compuestos en solución acuosa, el proceso transcelular es más efectivo que el paracelular, debido a que la superficie para difusión disponible para los compuestos es mayor en el mecanismo transcelular que para los compuestos que atraviesan el espacio intercelular (Smetanová et al., 2011).

En el transporte pasivo, la molécula del fármaco suele penetrar por difusión por medio de un gradiente de concentración tomando en cuenta la solubilidad de la molécula en la bicapa lipídica. Los autores Goodman y Gilman (2015) indican que hay una correlación directamente proporcional en la magnitud del gradiente de concentración a través de la membrana, al coeficiente de reparto entre lípidos-agua del fármaco y, finalmente, también se incluye a la de superficie de la membrana expuesta al fármaco.

Donde una vez alcanzado el equilibrio, se dice que la concentración de fármaco libre es la misma en ambos lados de la membrana, sin embargo, destacan que se cumple cuando el fármaco no sea un electrolito. En cuanto a los compuestos iónicos, las concentraciones estables dependen del gradiente electroquímico del ion y las diferencias en el pH a través de la membrana, ya que se modifica el estado de ionización de la molécula de manera desigual en ambos lados de la membrana.

Existe una relación entre los electrólitos débiles y la influencia del pH, la mayoría de los fármacos son ácidos o bases débiles, los cuales están en solución en su forma no ionizada liposoluble y difusible o en su forma ionizada lipoin soluble no difusible.

La distribución a través de la membrana de un electrólito débil depende de su pKa y el gradiente de pH a través de la membrana. La pKa es el pH en el que la mitad del fármaco (sea este ácido débil o electrólito base) se encuentra en su forma ionizada. La

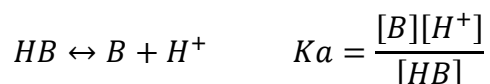
proporción entre el fármaco no ionizado y el ionizado en cualquier pH determinado puede calcularse con la ecuación (2) de Henderson-Hasselbalch:

$$\log \frac{[\text{forma protonada}]}{[\text{forma NO protonada}]} = pKa - pH$$

$$\text{forma ptotonada} = HA \text{ o } HB$$

$$\text{forma NO ptotonada} = A^- \text{ o } B \quad (2)$$

Esta ecuación correlaciona el pH del medio que se encuentra rodeando al fármaco y la constante de disociación ácida (pKa), donde en esta última se toma en cuenta la relación entre las formas protonada y no protonada de la molécula, ver ecuación (3). Siguiendo la disociación de un ácido y base protonado se cuenta con:



(3)

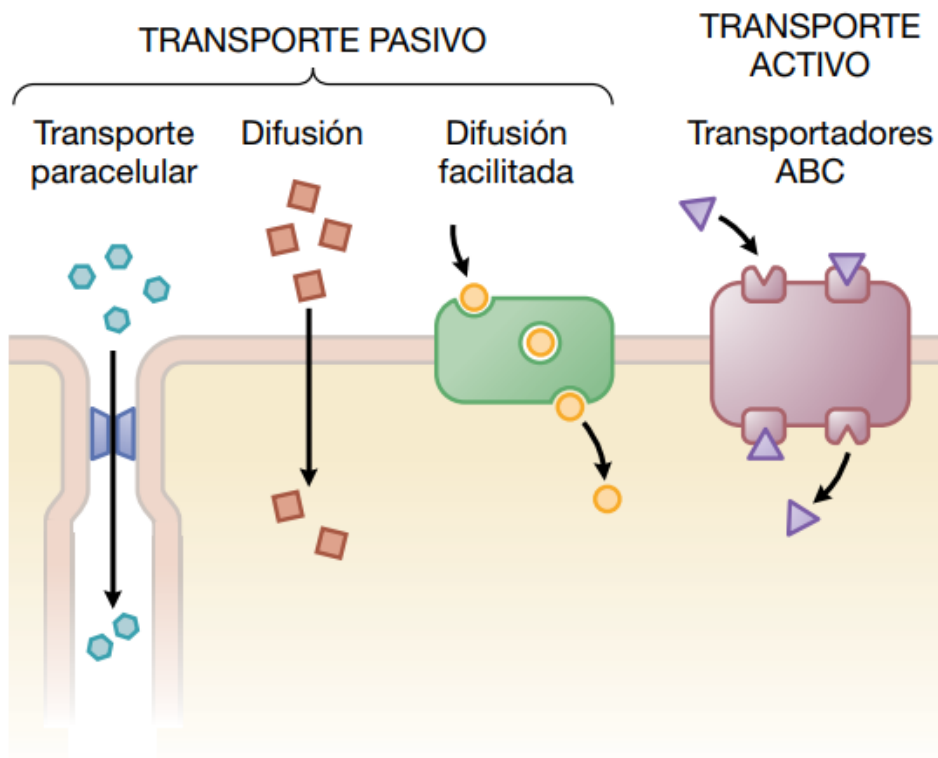
Así mismo, se destaca que, en un estado de equilibrio, un fármaco ácido se acumula en el lado más básico de la membrana y un fármaco básico en el lado más ácido, donde este fenómeno es conocido como atrapamiento iónico y es un proceso importante en la distribución de fármacos.

En el transporte mediado por transportadores, estos últimos son proteínas de membrana, las cuales controlan la entrada de nutrientes e iones esenciales, así como la salida de desechos celulares, toxinas ambientales, fármacos y otros xenobióticos, donde Goodman y Gilman (2015) describen que las funciones de los transportadores de membrana pueden ser activas (necesitan energía) o facilitadas (de equilibrio, no necesitan

energía). Cuando analizan el transporte de los estudios, son centrados en los transportadores de dos superfamilias principales: los transportadores ABC (sus siglas en inglés de *ATP binding cassette*) y SLC (siglas en inglés de *solute carrier*). Donde la mayor parte de las proteínas ABC son transportadores activos primarios que dependen de la hidrólisis de ATP para el bombeo activo de sus sustratos a través de las membranas.

Por otro lado, la superfamilia SLC codifica proteínas de transporte facilitado y transportadores activos secundarios acoplados con iones, muchos de los transportadores SLC sirven de blanco farmacológico o participan en la absorción y disposición de los fármacos. El epitelio intestinal presenta una barrera importante para los medicamentos administrados por vía oral (Smetanová et al., 2011)

Figura 8. Variedad de Transportes de Fármacos a Través de las Barreras Celulares



Nota: Goodman y Gilman (2015, p.18).

Pruebas de permeabilidad

Los modelos de permeabilidad *in vitro* deben predecir el potencial de absorción intestinal de un fármaco y también proporcionar información para comprender los mecanismos de absorción involucrados, ya que la absorción de compuestos tras la administración oral está limitada tanto por características físicas como bioquímicas; esto puede ser logrado según el grado de correlación con la absorción intestinal, ya que dependerá fuertemente de la complejidad, costo y duración del ensayo.

Los modelos de permeación pueden clasificarse en métodos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, los cuales presentan diferente grado de correlación con la absorción intestinal. Cada modelo requiere diferentes herramientas y/o materiales para hacer

su estimación de la absorción de fármacos, donde además del diferente grado de inversión, cada uno de estos tiene un grado de complejidad variable. (Herrera et al., 2012, p.22)

En cuanto a la absorción intestinal de un fármaco, esta es controlada por la velocidad de disolución y solubilidad del mismo, ya que de esta manera se determina la velocidad a la que el fármaco alcanza unas concentraciones máximas (C) en el fluido luminal a nivel intestinal, a su vez, también implica el coeficiente de permeabilidad; este es relacionado con la velocidad a la cual el fármaco disuelto va a atravesar la pared intestinal (P) para llegar a la circulación sanguínea.

Herrera et al. (2012) indican que dichos factores están incluidos en la primera ley de Fick (ecuación 4) aplicada a la absorción de fármacos, donde:

$$\frac{dm}{Adt} = Pm ([Ce] - [Ci]) \quad (4)$$

Respetivamente dm/Adt corresponde al flujo por unidad de área, Pm está relacionada con la constante de permeabilidad, finalmente, las concentraciones exterior e interior de los compartimentos Ce y Ci .

Membranas

La absorción de un compuesto a través de la mucosa intestinal está limitada por diversos factores que comprenden la barrera epitelial desde aspectos físicos y bioquímicos, por lo que los modelos *in vitro* deben predecir la absorción intestinal de un fármaco y los mecanismos que debe atravesar dicho fármaco para lograr atravesar la barrera epitelial. Dichos objetivos se logran cuando se toman en cuenta, en la mejor medida de lo posible, las características de la barrera intestinal, cabe mencionar que depende de la complejidad, costo y duración del modelo experimental.

Los modelos de permeación pueden clasificarse en métodos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, los cuales presentan diferente grado de correlación con la absorción

intestinal. Cada modelo requiere diferentes herramientas y/o materiales para hacer su estimación de la absorción de fármacos, donde además del diferente grado de inversión, cada uno de estos tiene un grado de complejidad variable. (Herrera et al., 2012, p.22)

Caco2

El modelo celular de Caco-2 posee alto grado de diferenciación, ya que este modelo se obtiene por medio del cultivo celular mencionado por Smetanová et al. (2011). Caco-2 se ha convertido en una de las líneas celulares más populares en cuanto a los estudios de transporte epitelial *in vitro*, siendo de gran utilidad para predecir la absorción de fármacos en humanos, también aporta utilidad para explorar el mecanismo de absorción del fármaco e identificar sustratos o inhibidores de transportadores. Así mismo, se ha demostrado la buena correlación entre la permeabilidad a través de la membrana monocapa de células Caco-2, la solubilidad y la biodisponibilidad oral en humanos.

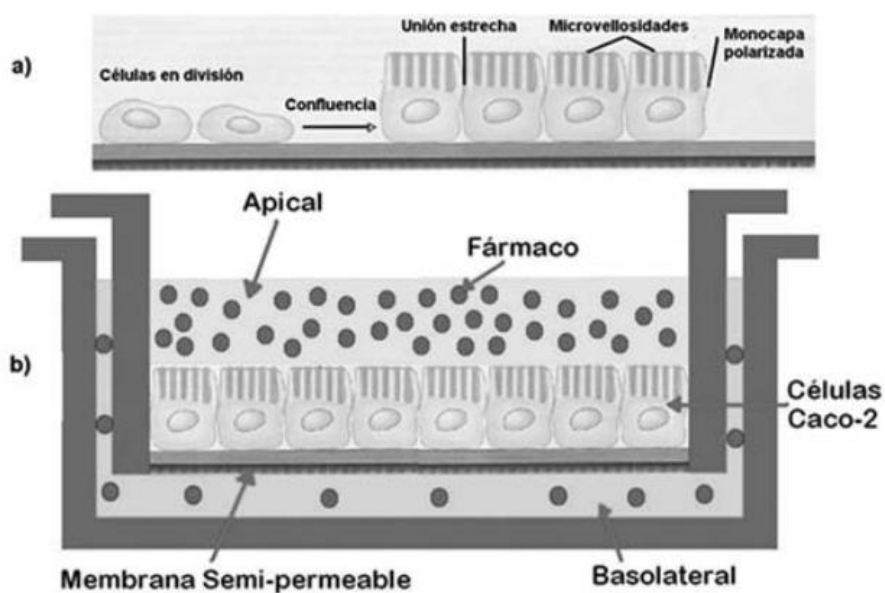
En el ensayo de Caco2, se utiliza una capa de células inmortales, la cual es obtenida de un adenocarcinoma del epitelio colorrectal, este modelo presenta como punto a favor el ser un modelo muy representativo fisiológicamente, ya que posee transportadores, también puede utilizarse para detectar cuando el transporte activo ejerce un efecto significativo, esto presentado por Pastor y Zamora (2011). A pesar de su origen, estas células, tras varios días de cultivo, muestran una polaridad morfológica y de hidrolasas de borde de cepillo, las cuales son comparables con las células de absorción intestinal en su estado maduro.

Los autores Smetanová et al. (2011) indican que, después de 30 días, la superficie celular alcanza un tamaño mínimo, el cual es adecuado y morfológicamente hablando toman el aspecto de un enterocito. Al cabo de los 30 días, se completa la polarización estructural donde se aprecia que la mayoría de las células tienen un borde de cepillo completamente desarrollado con microvellosidades altas y regulares distribuidas de manera uniforme en forma de alfombra organizada. Los mismos autores destacan que las

monocapas de Caco-2 se han utilizado para estudiar el transporte de drogas en las cuatro rutas existentes de transporte celular a nivel intestinal.

Una de las principales ventajas de los cultivos celulares está en el comportamiento polarizado que permite la simulación de las condiciones del intestino, donde a nivel intestinal es simulando de manera muy completa los dos tipos de barreras para la absorción de fármacos: la bioquímica y la fisicoquímica, tal como lo explican Herrera et al. (2012) en la figura 9, donde se aprecia la posición de las células.

Figura 9. Monocapa de Células en Sistema de Permeación



Nota: Herrera, et al. (2012, p26).

- a) Desarrollo de una monocapa de células que alcanza confluencia y forma uniones estrechas y microvellosidades; b) sistema para permeación a través de células montadas sobre una membrana semipermeable, lo cual simula las condiciones normales de absorción de compuestos (Herrera et al., 2012).

Entre los parámetros estimados según Smetanová et al., se debe calcular la permeabilidad aparente (P_{app}) donde se refiere a la ecuación (3):

$$P_{app} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \times \frac{1}{A \times C_0}$$

(5)

Donde $\frac{dQ}{dt}$ es la tasa o relación de permeabilidad, cantidad de droga que aparece en el compartimento receptor en función del tiempo (nmol / s).

A=corresponde al área de superficie de la membrana (cm²).

C₀= representa a la concentración inicial en el compartimento donante (nmol/mL)

Ensayo de permeabilidad con membrana artificial en paralelo

El ensayo de permeación con membrana artificial en paralelo (PAMPA) se ha propuesto como un sistema de cribado de alto rendimiento que puede ser adecuado para estudiar la permeación de la piel, según la investigación de los autores Lou et al. (2016). Los mismos autores mencionan los antecedentes de PAMPA como modelo para predecir la absorción gastrointestinal, este modelo utiliza una mezcla de ceramidas sintéticas, colesterol y ácidos grasos libres montados en placas para recrear la bicapa lipídica, finalmente, indican que el resultado de las membranas PAMPA es comparable con membranas artificiales de silicona, así como con piel porcina y humana.

Según Herrera et al. (2012), utilizar ensayos de permeabilidad ya sea con membranas artificiales o líneas celulares durante toda la etapa de desarrollo de medicamentos, es de gran utilidad e importancia, ya que ambos métodos proporcionan información valiosa, dando lugar a que sea posible una estimación anticipada de los principales mecanismos de absorción que van a estar presentes en la molécula candidata a fármaco nuevo.

Así mismo, ambos modelos poseen características diferentes como lo son la rapidez, bajo costo y transporte más sencillo para predecir la permeabilidad (difusión pasiva), mientras que las células Caco-2 toman en cuenta mayores mecanismos de transporte para la permeación, destaca por su funcionalidad en estudios más complejos; por lo que los mismos autores recalcan que ambos métodos se deben diferenciar y no ser tomados como modelos competitivos.

Tejidos extraídos de fuentes naturales

Los tejidos intestinales se han utilizado frecuentemente para estudiar la absorción, aplicando una solución con el fármaco, dicho parámetro se cuantifica por medio de la relación de cantidad de fármaco inicial y final ya sea en alguno de los dos lados del tejido, dando como conclusión que este fue absorbido. Entre sus ventajas está la integridad del tejido y la habilidad para determinar la absorción a través de diferentes segmentos intestinales. Una desventaja en común es la viabilidad limitada de este tipo de preparaciones. Herrera et al. (2012) describen ampliamente los modelos experimentales para la absorción de fármacos.

En cuanto a la técnica de perfusión en segmentos de intestino, se deben perfundir regiones específicas a lo largo del tracto intestinal; para calcular la permeabilidad, se debe cuantificar la desaparición del compuesto del lumen intestinal asumiendo que el fármaco desaparecido es igual al fármaco absorbido. Los autores destacan que esta consideración es válida cuando la captación apical del fármaco es el paso limitante en la absorción del mismo, pero, si se tiene en consideración que la absorción del fármaco no es el único factor responsable de su desaparición, esta consideración podría ser engañosa.

Al comparar la utilización de animales completos, la técnica de perfusión posee ciertas ventajas, tales como la utilización de diferentes segmentos para evaluar la absorción y metabolismo sin la interferencia de factores fisiológicos como el vaciamiento gástrico, el área superficial del segmento o el tiempo de tránsito intestinal. Sin embargo, esta técnica de perfusión no posee ventajas sobre los sistemas *in vitro*, ya que requiere grandes cantidades del compuesto por evaluar. Se debe tomar en cuenta, como se mencionó anteriormente, que la determinación de la absorción basada en la desaparición del lumen está condicionada al compuesto por utilizar.

Otra desventaja radica en el número de segmentos intestinales que pueden obtenerse de un animal, siendo este limitado. Sin embargo, son de gran valor, ya que se pueden tomar en cuenta los mecanismos de transporte y evaluación de la absorción

cuando los fármacos poseen baja solubilidad y se requiere el uso de vehículos complejos que no pueden ser representados en sistemas *in vitro*.

Entre las primeras técnicas utilizadas para el estudio de la absorción de fármacos, se utilizó el método del intestino invertido:

Este modelo incluye a la mucosa y a las capas musculares subyacentes donde la presencia de la capa muscular puede inducir la acumulación de fármaco y, en dado caso, dar lugar a una recuperación pobre del mismo. Esta técnica fue muy popular hace algunas décadas, sin embargo, su uso en años recientes se ha reducido en gran medida debido a las complicaciones que presenta en cuanto a la viabilidad de los tejidos por tiempos prolongados y a la poca reproducibilidad que se puede presentar, aun así, todavía se puede observar su implementación en estudios para determinar la absorción de fármacos. (Herrera et al., 2012, p. 27)

Enterocitos aislados

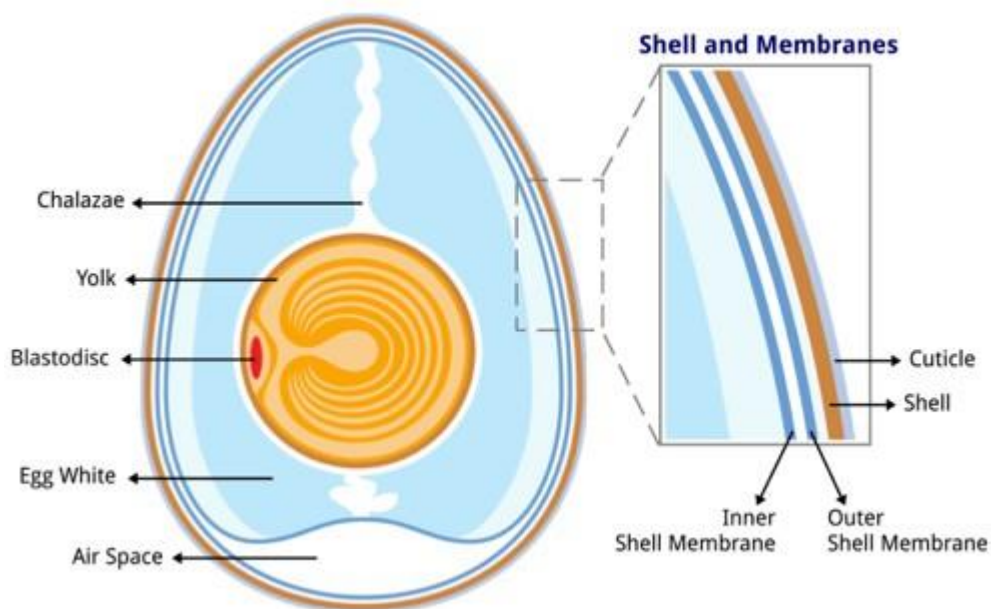
Si se obtiene un segmento de intestino y se trata la superficie mucosa con diferentes agentes quelantes o mecánicos para obtener las células enterocíticas, se pueden utilizar para estudiar la captación de fármacos, pero, por la alta destrucción de las mismas en el proceso de obtención y la viabilidad del método, no es utilizada con gran frecuencia para el estudio del transporte, además de que, al utilizarse en suspensión, los enterocitos pierden su polaridad siendo una desventaja para dichos estudios.

Huevo de gallina

Los autores Hincke et al. (2012) mencionan que el huevo aviar es el huevo amniótico más avanzado en cuanto a los vertebrados ovíparos, ya que el caparazón es una biocerámica de complejidad, la cual tiene como función el intercambio de gases metabólicos y agua, también proporciona protección contra el daño físico, la invasión microbiana y la depredación por animales pequeños; la permeabilidad de la cáscara está

determinada genéticamente por diferentes características de los poros que esta contiene, tal como la cantidad de poros, su densidad, ramificación y calibre.

Figura 10. Sección Longitudinal, el Contenido Interior de un Huevo de Gallina



Nota: Pollock (2013). *Comprendiendo el Huevo Aviar: desde Afuera hacia Adentro*.

Así mismo, la autora Pollock (2013) detalla a fondo la composición del huevo de gallina (ver figura 10), entre las partes que componen un huevo se encuentran:

La cutícula, el cual es el componente más externo, compuesto de proteínas, polisacáridos y lípidos. La cutícula cerosa delgada protege al huevo de la evaporación del agua, así como de la invasión microbiana, la cutícula cubre la siguiente capa que comprende la cáscara.

La cáscara es la porción más grande compuesta principalmente de calcita, la forma cristalina del carbonato de calcio. Está dividida en dos partes: esponjosas y mamilares. La capa externa o capa cristalina densa mide de 3-8 μm de grosor y sirve como una zona de transición a la superficie exterior del huevo, por otra parte, la capa esponjosa constituye aproximadamente dos tercios de la cáscara. Tiene un aproximado de 200 μm de espesor

y contiene cristales calcificados entremezclados con una matriz orgánica, que consiste en una serie de capas de proteínas y mucopolisacáridos.

En cuanto a la capa mamilar interna delgada, consta de núcleos orgánicos, con estructuras en forma de cono, las cuales están incrustadas dentro de la membrana externa de la cáscara que se encuentra debajo. Los núcleos orgánicos están compuestos principalmente por proteínas, pero también contienen carbohidratos y mucopolisacáridos. La deposición de cristales de carbonato de calcio comienza a partir de estos núcleos orgánicos.

Existen áreas donde la cristalización es incompleta, con el fin de crear poros en forma de embudo dentro de la cáscara del huevo. El número de poros aumenta a medida que disminuye el peso del huevo. El diámetro de los poros oscila entre 0.3-0.9 μm . Los poros sirven como un sitio importante de intercambio de gases (agua y dióxido de carbono) y para el transporte de vapor de agua a través de la cáscara del huevo.

Estos intercambios se producen, principalmente, por difusión pasiva. Cabe destacar que la cáscara de huevo se forma por precipitación controlada de carbonato de calcio en las fibras de la membrana externa y se produce en el espacio extracelular entre la dilatada membrana de la cáscara que envuelve la albúmina hidratada y la mucosa de la pared uterina.

Seguidas de las capas más internas de la cáscara, se encuentran las membranas de la cáscara. Estas membranas semipermeables son una barrera contra la invasión microbiana y también desempeñan un papel menor en la respiración del huevo. La membrana externa está en contacto con la capa mamilar de la cáscara, mientras que la membrana interna está en contacto directo con el albumen, ambas están firmemente unidas excepto en una pequeña región, por lo general, en el extremo romo del huevo conocida como cámara de aire, la cual se forma a medida que el huevo se enfría después de la oviposición.

Así mismo, se encuentra el amnios, el cual es un saco lleno de líquido con proteína, agua y minerales durante todo el desarrollo embriológico, el albumen drena en el amnios, permitiendo que esta estructura sirva como una fuente de proteína. La capa

interna gruesa de albumen consiste en una capa viscosa y densa, contiene la yema en el centro del huevo, conocida como chalaza. La chalaza consiste en una cadena doble en el extremo agudo del huevo y una cadena sencilla en el extremo redondeado.

Finalmente, la membrana vitelina consta de cuatro membranas que separan al saco vitelino del albumen, esta membrana envuelve la yema de huevo. La yema es otro nutriente importante, el cual proporciona proteínas y lípidos en el desarrollo tardío y durante los primeros días de vida.

En cuanto a las membranas de la cáscara, se ha descubierto su composición (ver figura 11), los autores Hincke et al. (2012) ahondan en el tema explicando que los precursores de las membranas de la cáscara de huevo se secretan y se ensamblan durante aproximadamente una hora. La malla resultante de fibras entrelazadas se organiza en láminas internas y externas morfológicamente distintas que encierran la albúmina de huevo.

Las fibras de membrana están compuestas de aproximadamente 10 % de colágeno (tipos I, V y X) y 70-75 % de otras proteínas y glicoproteínas que contienen enlaces cruzados derivados de lisina. Las membranas internas permanecen sin calcificar, mientras que las fibras de la membrana de la cubierta externa se mineralizan en sitios discretos y se incorporan a la base de la cáscara de huevo.

No es bien conocido el mecanismo o razón por el cual la membrana carece de calcificación, pero se cree que es el colágeno tipo X el responsable de prevenir una calcificación generalizada de la membrana del caparazón. Es bien sabido que cualquier modificación de las membranas de la cáscara de huevo, debido a la inhibición de la formación de fibras o la reticulación, altera la formación de cáscara de huevo y sus propiedades mecánicas.

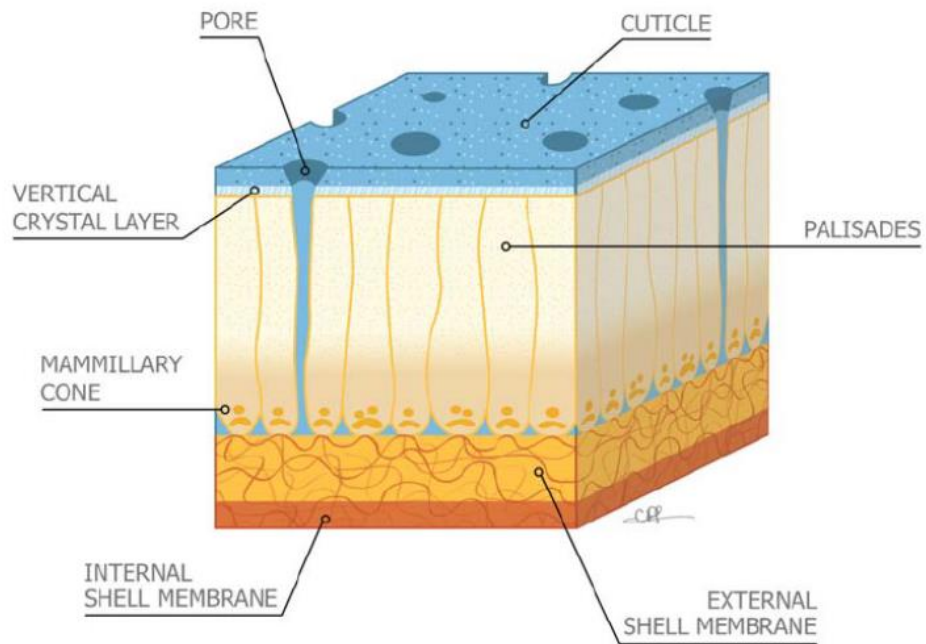
La inhibición de la reticulación derivada de lisina de la membrana de cáscara de huevo por aminopropionitrilo o por deficiencia de cobre afecta el patrón de estructura de la cáscara de huevo y degrada sus propiedades mecánicas.

Se identificaron proteínas específicas de cáscara de huevo durante la investigación de constituyentes abundantes de la cáscara de huevo y el fluido uterino. Estas nuevas proteínas se denominaron Ovocleidinas (*ovo*, latín - huevo, *kleidoun*, griego - para abarcar lo relacionado al papel funcional) o Ovocalixinas (*ovo*, latín-huevo, *cáliz*, latín - cáscara, en referencia a su ubicación). Se han propuesto dos posibles roles para las Ovocleidinas y Ovocalixinas en la reproducción aviar: regulación de la mineralización de la cáscara de huevo y defensa antimicrobiana. Las proteínas de huevo blanco ovoalbúmina, lisozima y ovotransferrina también están presentes en el fluido uterino, y se localizan principalmente en las regiones más internas (membranas de la cáscara y capa de cono mamilar) de la cáscara de huevo. (Hincke et al., 2012, p.1272)

Así mismo, destacan la identificación de Ovocalyxin-36, la cual es una proteína prominente de 36 kDa presente en el fluido uterino recogido durante la fase de calcificación activa de la mineralización de la cáscara. La proteína solo se detecta en las regiones del oviducto donde tiene lugar la formación de la cáscara de huevo.

OCX-36 se localiza en la cáscara de huevo calcificada (mayoritariamente en la parte interna de la cáscara) y también es abundante en las membranas de la cáscara. La secuencia de proteína OCX-36 muestra una identidad significativa con proteínas de mamífero, tales como proteínas ligadoras de lipopolisacáridos, proteínas que aumentan la permeabilidad bactericida y proteínas de la familia del clon del epitelio nasal y del paladar que son componentes claves de la innata sistema inmune y actúa como la primera línea de defensa del huésped.

Figura 11. Vista Transversal de la Cáscara de Huevo de Gallina Representando las Principales Características Morfológicas



Nota: Hincke, et al. (2012). *The eggshell: structure, composition and mineralization*.

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO

En el presente capítulo, se muestra el enfoque y el método por realizar para la presente investigación, las fuentes de información que se deben tomar en cuenta, lugar donde se llevará a cabo la investigación, las variables, los instrumentos, técnicas, así como el procedimiento de recolección y análisis de los datos.

Enfoque de la investigación

El presente trabajo se desarrolla con un enfoque cuantitativo, descrito por Hernández, Fernández y Baptista (2014) como un enfoque que posee forma de procesos, es secuencial y probatorio, tiene un orden secuencial donde no se pueden evadir ni obviar pasos; inicia de una idea a la cual se le va dando forma y delimitando, se aclaran los objetivos y pregunta de la investigación, así mismo, se revisa la literatura y se procede con la elaboración del marco teórico. Con las preguntas establecidas, se plantea una hipótesis y se determinan las variables de la investigación. En este enfoque, se diseña un plan que permita probar la hipótesis y, por medio de la estadística, se logran recolectar datos de los resultados y se obtienen las conclusiones.

Dado lo anterior, se considera adecuado este enfoque, ya que se realizará a nivel de laboratorio la simulación *in vitro* de prueba de permeabilidad de una familia de AINEs a través de una membrana.

Método de la investigación

La estrategia para obtener la información requerida para la resolución del planteamiento del problema siguiendo los objetivos es por medio de un método experimental en un lapso de siete meses, iniciando con la recopilación de datos fundamental para el desarrollo del tema y realizando pruebas experimentales para obtener los resultados, siendo aplicable este método, ya que es descrito como:

Refiere a un estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes (supuestas causas antecedentes), para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre una o más variables dependientes (supuestos efectos consecuentes), dentro de una situación de control para el investigador. (Hernández, Fernández y Baptista, 2014, p. 129)

Fuentes de información

En el presente apartado, se describen las fuentes de información que deben ser consideradas para la elaboración del estudio, así como el lugar de desarrollo. La investigación por realizar se llevará a cabo en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas, San José, Costa Rica. En el periodo de enero a julio de 2018.

Las fuentes de información por abarcar en la investigación son las siguientes: AINEs, propiedades fisicoquímicas de los fármacos, pruebas de permeabilidad, membranas y permeabilidad de AINEs.

Instrumentos

En el siguiente apartado, se mencionan los instrumentos por utilizar en el laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas para la siguiente investigación:

Beakers de 250, 500 y 2000 mL

Balanza analítica

Termómetros de vidrio (de columna de mercurio)

Probetas de 500 mL

Calentador

Agitador magnético

Soporte universal

Pastillas magnéticas de agitación

Piseta

Erlenmeyer 250 mL

Papel toalla

Jeringas de 10cc.

Pinzas

Goteros

Cubetas de cristal de cuarzo

Portable pH/ TDS/ Temperature Meter marca HANNA instruments, código HI9811-5, procedencia: Romania.

Equipo espectrofotómetro UV-vis, marca SPECTRO UV-2505

Microscopio LABOMED por Labo América, Inc. U.S.A

Reactivos:

Soluciones amortiguadoras para el pHmetro

NaOH con pH 7.4

Ácido clorhídrico 1M

Solución buffer de fosfatos pH 7.4

Solución buffer de fosfatos pH 5

Agua destilada

Jarabe Profenid[®] (Ketoprofeno)

Capsulas Aleve[®] (Naproxeno)

Enantyum[®] (Dexketoprofeno)

Estándar de ketoprofeno

Estándar de naproxeno

Estándar de dexketoprofeno

Huevos de gallina

Procedimiento de recolección y análisis de los datos

Se procede a exponer el procedimiento por seguir para la preparación de los medios de disolución y metodología para la realización de la simulación *in vitro* de permeación de la familia de AINEs, así como la recolección de los datos que se debe llevar a cabo para la siguiente investigación.

Preparación del medio simulación líquido intestinal:

Preparar cinco litros de solución buffer de fosfatos pH 7.4, medir el pH con el pHmetro, el cual debe ser previamente calibrado con las sustancias buffer correspondientes, envasar y rotular para su uso y almacenamiento correcto en refrigeración. Las siguientes instrucciones corresponden a un litro de solución, por lo que se debe realizar por separado, ya que la solución de pH 7.4 se utiliza para hacer lavados de las membranas como se indica más adelante.

En un beaker de 250 mL provisto de una pastilla de agitación, se adicionaron 91 mL de agua destilada medidos en una probeta de 100 mL y 8,62 mL de HCl concentrado medidos en una probeta de 10 mL la mezcla se agitó durante 5 minutos con un agitador magnético a 60 rpm. La disolución resultante se trasvasó a un balón aforado de 100 mL, se aforó con agua destilada se rotuló y almacenó.

En un beaker de 250 mL provisto de una pastilla de agitación, se adicionaron 40 mg de NaOH pesados en balanza y 40 mL de agua destilada medidos en una probeta de 100 mL la mezcla se agitó durante 15 minutos con un agitador magnético a 60 rpm, la disolución resultante se trasvasó a un balón aforado de 100 mL, se aforó con agua destilada, se rotuló y almacenó.

En un beaker de 1500 mL provisto de una pastilla de agitación, se adicionaron 8.06 g NaCl, 0.22 g KCl, 1,15 g Na₂HPO₄, y 0.20 g KH₂PO₄ pesados en balanza, se adicionó el 80 % del agua destinada para un litro de solución buffer, se mezcló agitador magnético hasta la dilución completa de las sales, se ajustó el pH a 7.4 con HCl 1M o

NaOH 10M según fue lo necesario, haciendo adiciones gota a gota siendo monitoreado con el pHmetro (calibrado), se aforó con agua destilada, la disolución resultante se filtró con embudo de espiga larga y papel filtro de calibre medio, finalmente se trasvasó a un recipiente de 1000 mL se rotuló y almacenó en refrigeración.

Preparación de la membrana biológica:

Se tomó un huevo de gallina, se limpió y secó, seguidamente se le realizó un agujero en el lado apical del huevo con una micro espátula, sin introducir por completo para no dañar la membrana y se extrajo el contenido del huevo. Se realizaron lavados con abundante agua destilada al interior de la membrana y, finalmente, los lavados con solución buffer pH 7.4.

En *beaker* de 300 mL se adicionaron 100 mL de HCl 1M y se introdujo la membrana que posee cáscara, se mantuvo en constante agitación para la descalcificación de forma pareja. Se adicionaron gotas de HCl concentrado; se realizaron lavados a la membrana con abundante agua destilada, con el cuidado respectivo de la manipulación de la membrana para evitar el rompimiento de la misma, se realizó un lavado con solución buffer pH 7.4. Se realizó dicho procedimiento con cuatro huevos.

Preparación de modelo para simulación *in vitro*

Se colocaron las membranas en un vidrio reloj con solución buffer pH 7.4 por 20min para la hidratación respectiva de las mismas.

Se utilizó un tubo de ensayo plástico y se realizó un corte transversal en la parte cónica, (esta tiene la función de entrada al compartimiento donador); de la misma forma se realizó un corte a la tapa, y se dejó únicamente la rosca para el tubo y el orificio de la misma circunferencia del tubo plástico.

Se colocó un *beaker* de 200 mL con una pastilla de agitación sobre una plantilla magnética, se le adicionaron 150 mL de solución buffer pH 7.4, y se mantuvo en agitación constante a 100 rpm; (este funcionó como compartimiento receptor), se mantuvo la temperatura controlada 37°C.

Se colocó la membrana hidratada cuidadosamente en el orificio del tubo plástico y se ajustó sin ejercer presión, ya que puede provocar el rompimiento de la misma, de igual forma se colocó el empaque para ajustar. Se procedió a cortar el exceso de membrana que sale por el borde de la rosca con cuidado y, finalmente, se cubrió la parte superior de la rosca con silicón caliente, se dejó enfriar para asegurar el sellado.

Se fijó el tubo de plástico con dos prensas para tubo de ensayo en direcciones contrarias, para que tenga función de apoyo sobre el *beaker*, el tubo del lado del compartimiento donador no se sumergió, solo la membrana se mantuvo en contacto con el medio.

Preparación de las curva de calibración:

Para el ketoprofeno, se tomó un balón de 100 mL y se colocó 10 mg del estándar de ketoprofeno pesados en una balanza analítica, se llevó a aforo con solución buffer de fosfatos de pH7.4, obteniendo así la muestra madre, seguidamente se tomaron alícuotas de esta solución:

- Se tomaron 4,98 mL con pipeta graduada de 10mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.01992 mg/mL (120 %).
- Se tomaron 4,56 mL con pipeta graduada de 10mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.01826 mg/mL (110 %).
- Se tomaron 4,15 mL con una pipeta graduada de 10 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.0166 mg/mL (100 %).
- Se tomaron 3,32 mL con una pipeta graduada de 5 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.01328 mg/mL (80 %).
- Se tomaron 2,49 mL con una pipeta graduada de 5 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.00996 mg/mL (60 %).
- Se tomaron 2,07 mL con una pipeta graduada de 5 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.0083 mg/mL (50 %).
- Se tomaron 1,6 mL con una pipeta graduada de 5 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.0064 mg/mL (40 %).
- Se tomaron 0,8 mL con una pipeta graduada de 1 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.0032 mg/mL (20 %).

Se leyeron las absorbancias por medio de un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 258 nm y se realizó una gráfica absorbancia versus concentración.

Para el dexketoprofeno, se tomó un balón de 100 mL y se colocaron 10mg del estándar de dexketoprofeno, se llevó a aforo con solución buffer de fosfatos de pH7.4, obteniendo así la muestra madre. Seguidamente, se tomaron alícuotas de esta solución:

- Se tomaron 4,98 mL con una pipeta graduada de 10 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.01992 mg/mL (120 %).
- Se tomaron 4,56 mL con una pipeta graduada de 10 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.01826 mg/mL (110 %).
- Se tomaron 4,15 mL con una pipeta graduada de 10 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.0166 mg/mL (100 %).
- Se tomaron 3,32 mL con una pipeta graduada de 5 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.01328 mg/mL (80 %).
- Se tomaron 2,49 mL con una pipeta graduada de 5 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.00996 mg/mL (60 %).
- Se tomaron 2,07 mL con una pipeta graduada de 5 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.0083 mg/mL (50 %).

- Se tomaron 1,6 mL con una pipeta graduada de 5 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.0064 mg/mL (40 %).
- Se tomaron 0,8 mL con una pipeta graduada de 1 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.0032 mg/mL (20 %).

Se leyeron las absorbancias por medio de un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 258 nm y se realizó una gráfica absorbancia versus concentración.

Para el naproxeno, se tomó un balón de 100 mL y se colocaron 10 mg del estándar de naproxeno, se llevó a aforo con solución buffer de fosfatos de pH 7.4, obteniendo así la muestra madre, seguidamente se tomaron alícuotas de esta solución:

- Se tomaron 4,98 mL con una pipeta graduada de 10 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.01992 mg/mL (120 %).
- Se tomaron 4,56 mL con una pipeta graduada de 10 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.01826 mg/mL (110 %).
- Se tomaron 4,15 mL con una pipeta graduada de 10 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.0166 mg/mL (100 %).
- Se tomaron 3,32 mL con una pipeta graduada de 5 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.01328 mg/mL (80 %).

- Se tomaron 2,49 mL con una pipeta graduada de 5 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.00996 mg/mL (60 %).
- Se tomaron 2,07 mL con una pipeta graduada de 5 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.0083 mg/mL (50 %).
- Se tomaron 1,6 mL con una pipeta graduada de 5 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.0064 mg/mL (40 %).
- Se tomaron 0,8 mL con una pipeta graduada de 1 mL y se llevó a aforo en balón de 25 mL para obtener una concentración final de 0.0032 mg/mL (20 %).

Se leyeron las absorbancias por medio de un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 274 nm y se realizó una gráfica absorbancia versus concentración.

Preparación de la muestra

Se procedió a la realizar la preparación de la muestra, de forma que los tres compuestos por evaluar tuvieran una concentración de 0.5 mg/mL, para utilizar en cada muestra 2,5 mg de principio activo en cada muestra que se realizó por triplicado para cada medicamento.

1. Ketoprofeno: Se tomaron 5 mL del jarabe Profenid con se tomó una pipeta de 5 mL, se llevaron a un balón aforado de 10 mL, se procedió a aforar con solución buffer pH 5.

2. Dexketoprofeno: Se tomaron 12, 5 mg (aproximadamente 3.125 mL) de Enantyum bebible con una pipeta de 5 mL, se llevaron a aforo en un balón aforado de 25 mL con solución buffer pH 5.
3. Naproxeno: se tomó una cápsula de Aleve de 200mg y se extrajo con una jeringa el total de su contenido, se colocó en un balón aforado de 100 mL y se aforó con solución pH 7.4; con una pipeta graduada de 10 mL, se tomaron 6,25 mL de la solución y se trasvasó a un balón aforado de 25 mL finalmente se aforó con solución buffer pH 7.4.

Realización experimental

1. Se tomaron 5 mL de la muestra con pipeta y se colocó cuidadosamente en el compartimento donador del modelo, utilizando un cronómetro se llevó el control del tiempo para la toma de muestras donde se tomaron a los 10, 20, 30, 40, 50 min del compartimiento receptor con una jeringa de 10 mL.
2. En el espectrofotómetro UV-vis, primeramente, se leyó la sustancia blanco, la cual corresponde al medio de disolución (solución buffer pH 7.4), y se realizaron las lecturas de las muestras rotuladas en orden según la longitud de onda especificada. Se obtuvieron los datos de la absorbancia y se devolvió la muestra al compartimiento receptor, para no alterar el volumen del medio ni la concentración.

Estos pasos se repitieron con cada fármaco (naproxeno, ketoprofeno y dexketoprofeno) tres veces, para darle reproducibilidad a la investigación, con las membranas, las cuales deben ser lavadas cuidadosamente con solución buffer pH 7.4 tras cada uso.

Longitud de onda naproxeno: máxima 274nm.

Longitud de onda ketoprofeno: máxima 258nm.

Longitud de onda dexetoprofeno: máxima 258nm

CAPÍTULO IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Este capítulo aporta datos que dan seguimiento de los objetivos específicos para finalizar con el objetivo general de la presente investigación. El análisis de resultados prevé tener una respuesta del problema planteado inicialmente, con la finalidad de simular *in vitro* la prueba de permeabilidad de una familia de antiinflamatorios no esteroideos, a través de una membrana cuyos resultados sean comparables con los datos de permeabilidad reportados en la literatura.

Obtención de la membrana

Dentro de los objetivos específicos de la investigación, está proponer una membrana que permita la permeabilidad *in vitro* de una familia de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por lo que inicialmente se procede con la obtención de dicha membrana.

Tomando en cuenta el origen, composición, medios económicos y complejidad de procedimientos, se propone la utilización de la membrana de huevos. Dicha membrana es posible extraerla tras los fundamentos de reacciones químicas con ácido clorhídrico (HCl), tal como se aprecia en la figura 12. La cual muestra que, a pesar de permanecer bajo concentraciones ácidas, no existe rompimiento de la membrana, ya que se percibe el contenido del huevo.

Sin embargo, para fines experimentales, se recomienda la extracción del contenido del huevo previo al tratamiento con el ácido, con el fin de facilitar el manejo que se debe emplear para la simulación prevista, ya que es necesario utilizar partes limpias y sin daños mecánicos para asegurar la integridad de la membrana.

Figura 12. Membrana de Huevo Expuesta Tras el Tratamiento con HCl



Nota: elaboración propia (2018).

Tal como fue mencionado por la autora Pollock (2013), la cáscara del huevo está compuesta principalmente por calcita, la forma cristalina del carbonato de calcio, por lo que se aprovecha dicho compuesto para realizar una reacción con ácido clorhídrico.

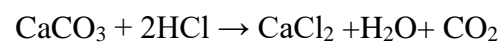
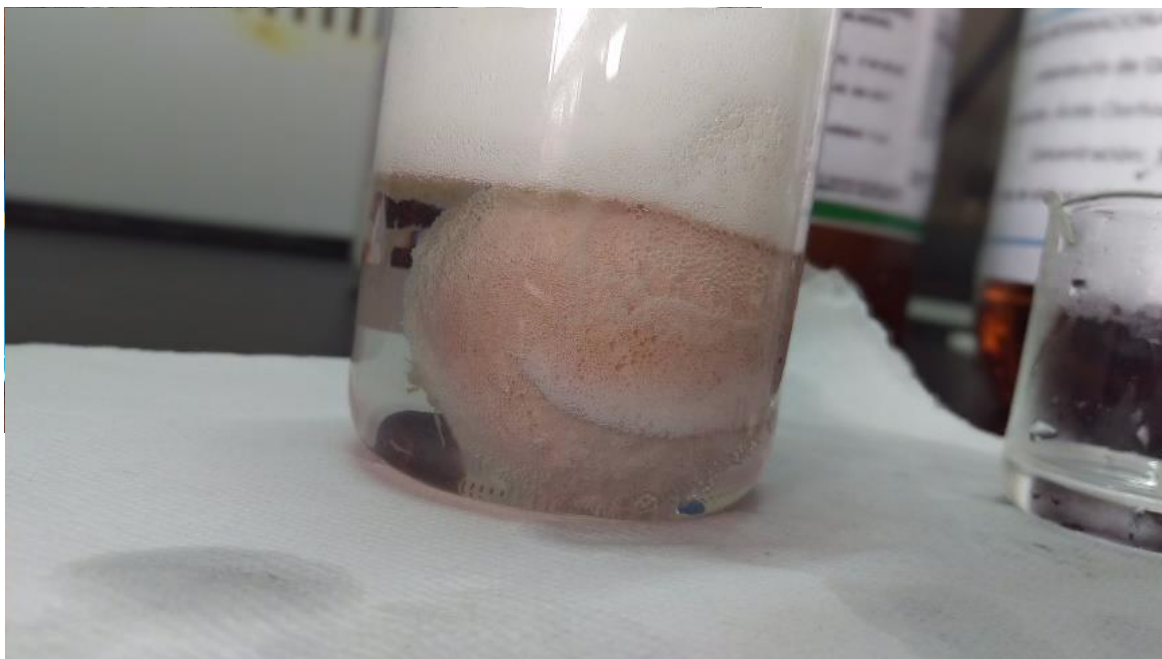


Figura 13. Reacción Química del Carbonato de Calcio y HCl



Nota: elaboración propia (2018).

Como se observa en la figura 13, existe el desprendimiento de CO_2 y en el medio se obtiene una disolución de cloruro de calcio, por lo que, tras unos minutos, se va a obtener la membrana del huevo completamente descalcificada, lista para los lavados y su utilización posterior. Tal como se muestra en la figura 13, la cual permite observar la delgada membrana, los autores Hincke, et al. (2012) mencionan que la composición de la misma es de colágeno, proteínas y glicoproteínas.

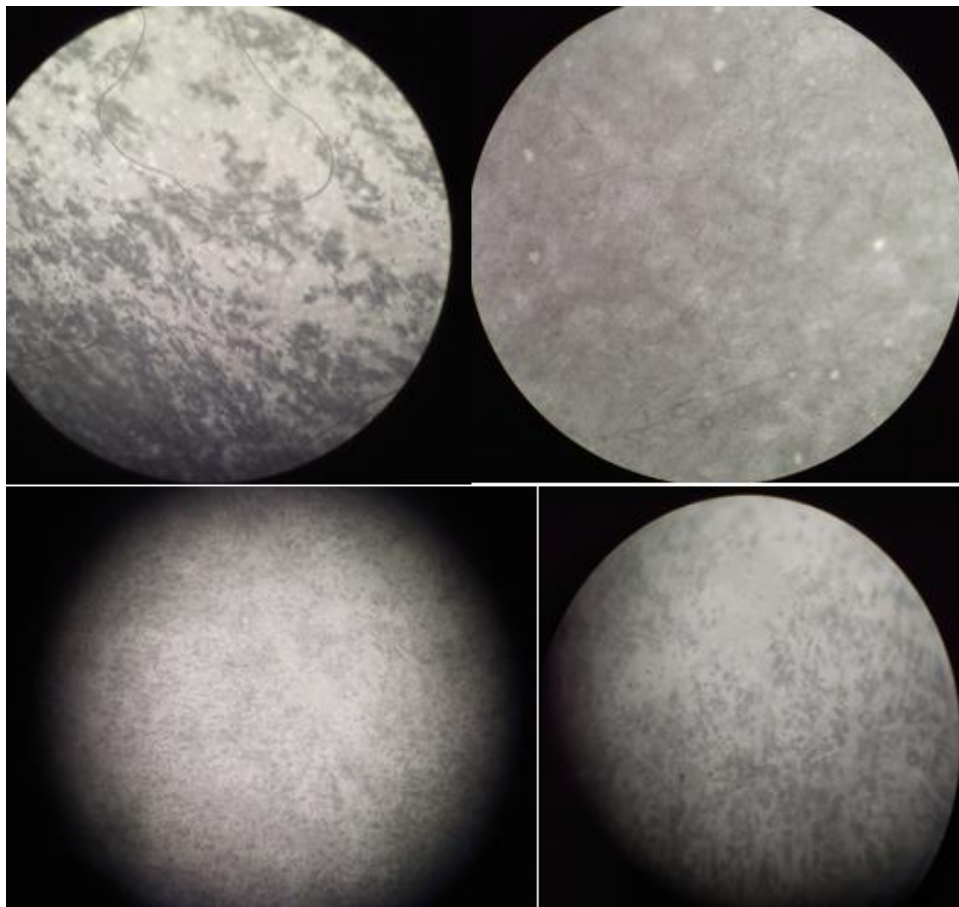
Figura 14. Membrana del Huevo Tras la Descalcificación con HCl



Nota: elaboración propia (2018).

Tras dicha extracción, se aprecia cómo la estructura de la membrana se mantiene íntegra (ver figura 15), aún con vista microscópica se asegura la estabilidad de la membrana tras la exposición a un agente tan corrosivo como el HCl.

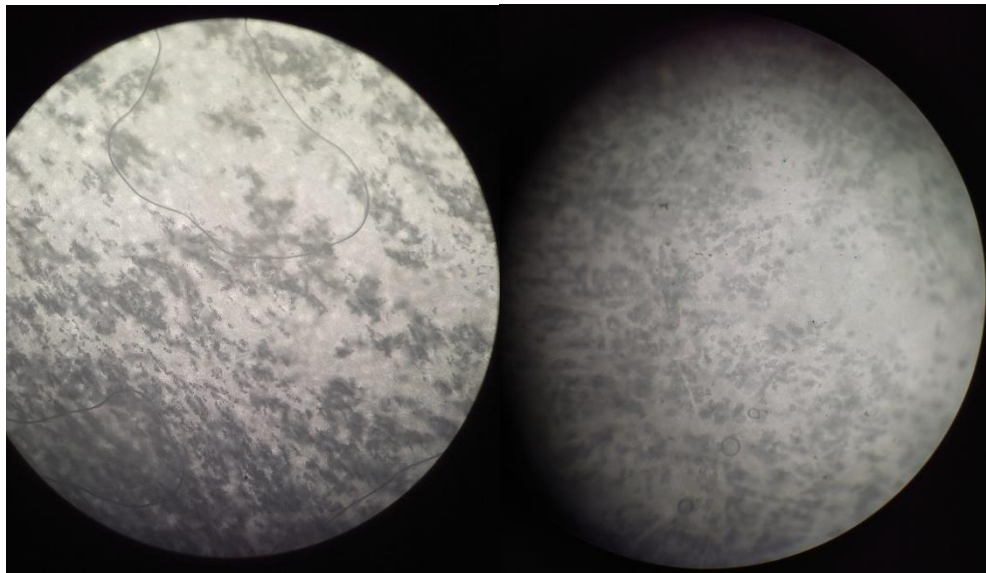
Figura 15. Vista Microscópica de la Membrana Tras la Exposición al HCl, Aumento (10X/0.25/0.17)



Nota: elaboración propia (2018).

La membrana fue utilizada por triplicado para cada compuesto, por lo que era de importancia observar si la misma presentaba algún desgaste visual que comprometiera la integridad de la membrana biológica. Sin embargo, tal como se observa en la figura 16, del lado derecho hay una visión microscópica de la membrana recién extraída y del lado izquierdo, tras el uso por triplicado de una de las pruebas, a pesar de que no se aprecia gran diferencia visualmente, lo ideal sería una revisión por microscopio electrónico.

Figura 16. Membrana Antes y Después de Prueba *In Vitro*, Aumento (10X/0.25/0.17)



Nota: elaboración propia (2018).

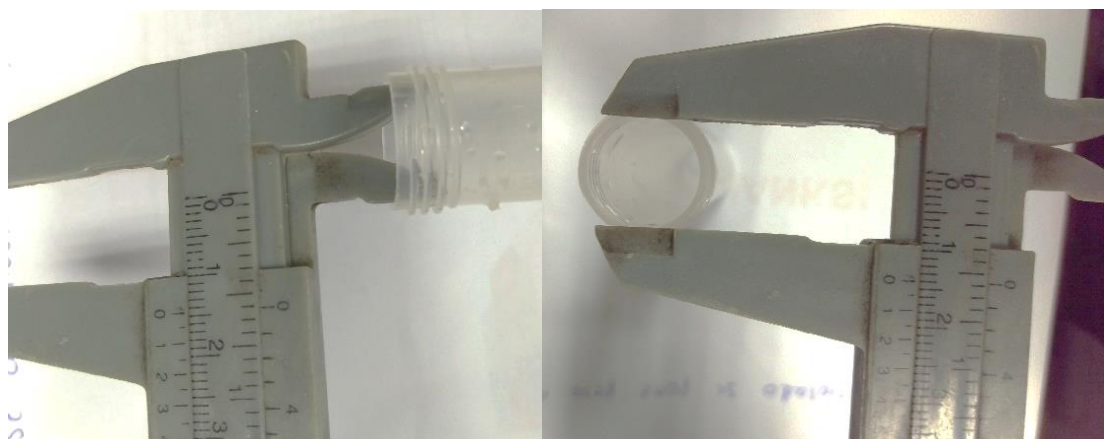
Modelo físico para la simulación *in vitro* de prueba de permeabilidad.

Se debe contar con un modelo simplificado que permita controlar los factores externos como temperatura, agitación y la permanencia de la membrana en contacto con el medio de disolución en los compartimentos tanto donador como receptor, además de contar con la facilidad de obtención de las muestras para las lecturas a diferentes tiempos, donde no existan variables en el modelo.

Figura 17. Cortes en los Extremos del Tubo Plástico

Nota: elaboración propia (2018).

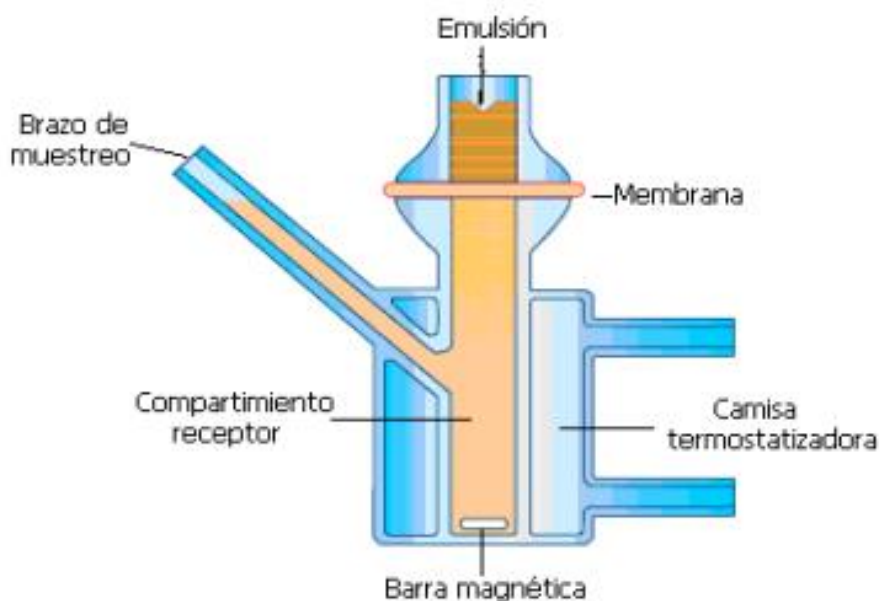
Establecer el modelo con el tubo plástico permite tener un área de permeación constante, ya que al realizar el corte (figura 17) en el extremo de tubo plástico permite la abertura para introducir las muestras, seguido del corte en la tapa permite obtener el extremo del tubo aun con la rosca, la cual tiene como función sujetar la membrana. Dichos pasos se explican más adelante, mantener el diámetro del tubo es un dato de suma importancia para cuantificar la permeabilidad del fármaco, estos tubos poseen un diámetro de un centímetro (ver figura 18), dato importante para la obtención de Papp de cada compuesto.

Figura 18. Diámetro del Tubo Plástico, Medidos con un Calibrador Vernier

Nota: elaboración propia (2018).

El modelo es desarrollado en una forma sencilla a pequeña escala (ver figura 20), tomando como referencia el modelo de permeación de las celdas de Franz, mencionadas por los autores Debandi et al. (2011), Loftsson (2006), Luo (2016) y Ng, et al. (2012).

Figura 19. Representación Esquemática de la Celda Franz



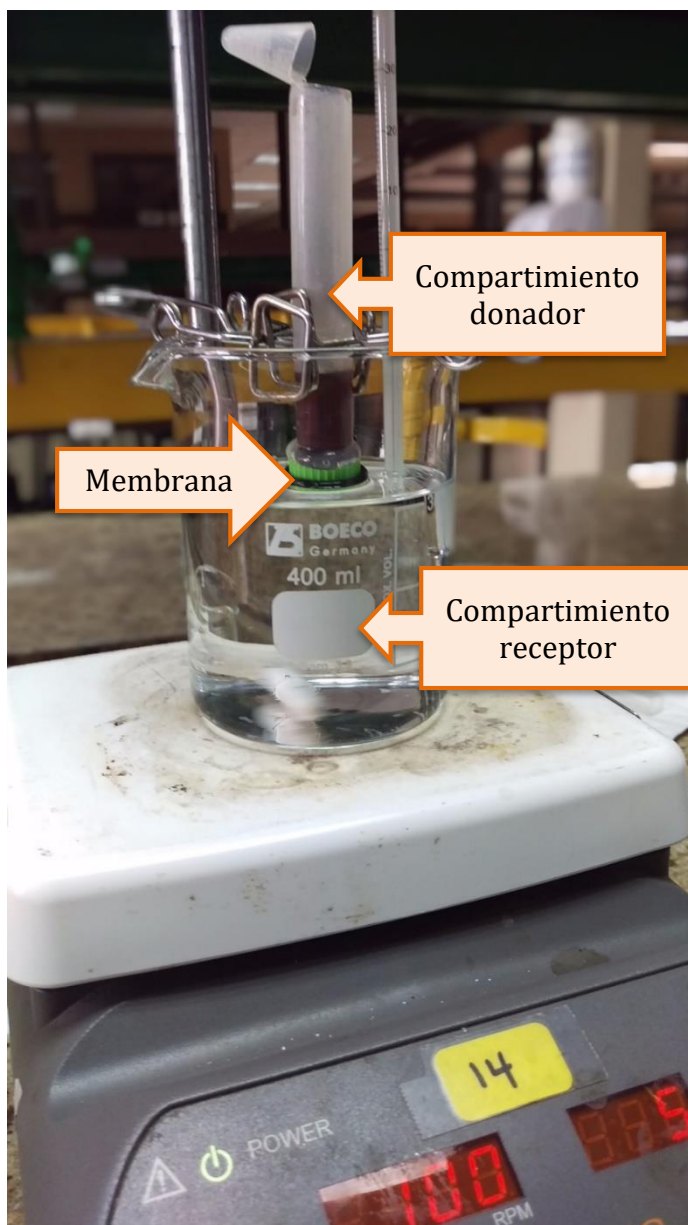
Nota: Debandi et al. (2011, p.100).

Las celdas de Franz son descritas por Baena, Dallos, Manzo y Ponce D'León (2011) con historia de utilización desde 1975 para estudios de penetración transepitelial y liberación de fármacos. Posee un sistema compuesto por un compartimento donador y uno receptor, las cuales son separadas por una membrana que puede ser de origen animal, humana o sintética, la cual va a permitir la evaluación de la difusión de compuestos biológicamente activos (ver figura 19). Tras la toma de muestras del compartimento receptor, se cuantifican mediante técnicas analíticas UV y/o HPLC.

Los mismos autores indican la existencia de parámetros que influyen en la difusión de los compuestos por evaluar, como la temperatura, la velocidad de agitación, el tipo y naturaleza de la membrana y el medio del compartimento receptor. Por consiguiente, el modelo establecido posee un compartimento donador representado por

la parte superior del tubo plástico; un compartimento receptor, el cual es representado por *beaker* y la división dada por la membrana de origen biológico extraída del huevo.

Figura 20. Modelo Físico para la Simulación *In Vitro* de Prueba de Permeabilidad con sus Respectivas Partes



Nota: elaboración propia (2018).

Como fue mencionado, existen parámetros que influyen en la difusión, por lo que se mantuvo una temperatura de 37°C con un termómetro, el cual fue ajustado con prensas universales. La agitación se mantuvo constante con 100 rpm para todas las muestras de los tres compuestos por evaluar, la membrana siempre del mismo origen; sin embargo, se debe tomar en cuenta que, al ser de origen biológico, pueden haber ciertas variaciones en

el tamaño de poro de la membrana de diferentes huevos, por lo que se utilizó la misma membrana para cada muestra del mismo compuesto. En cuanto al medio de disolución, se utilizó de manera constante el buffer de fosfatos pH 7,4.

Figura 21. Calibración de pH Metro



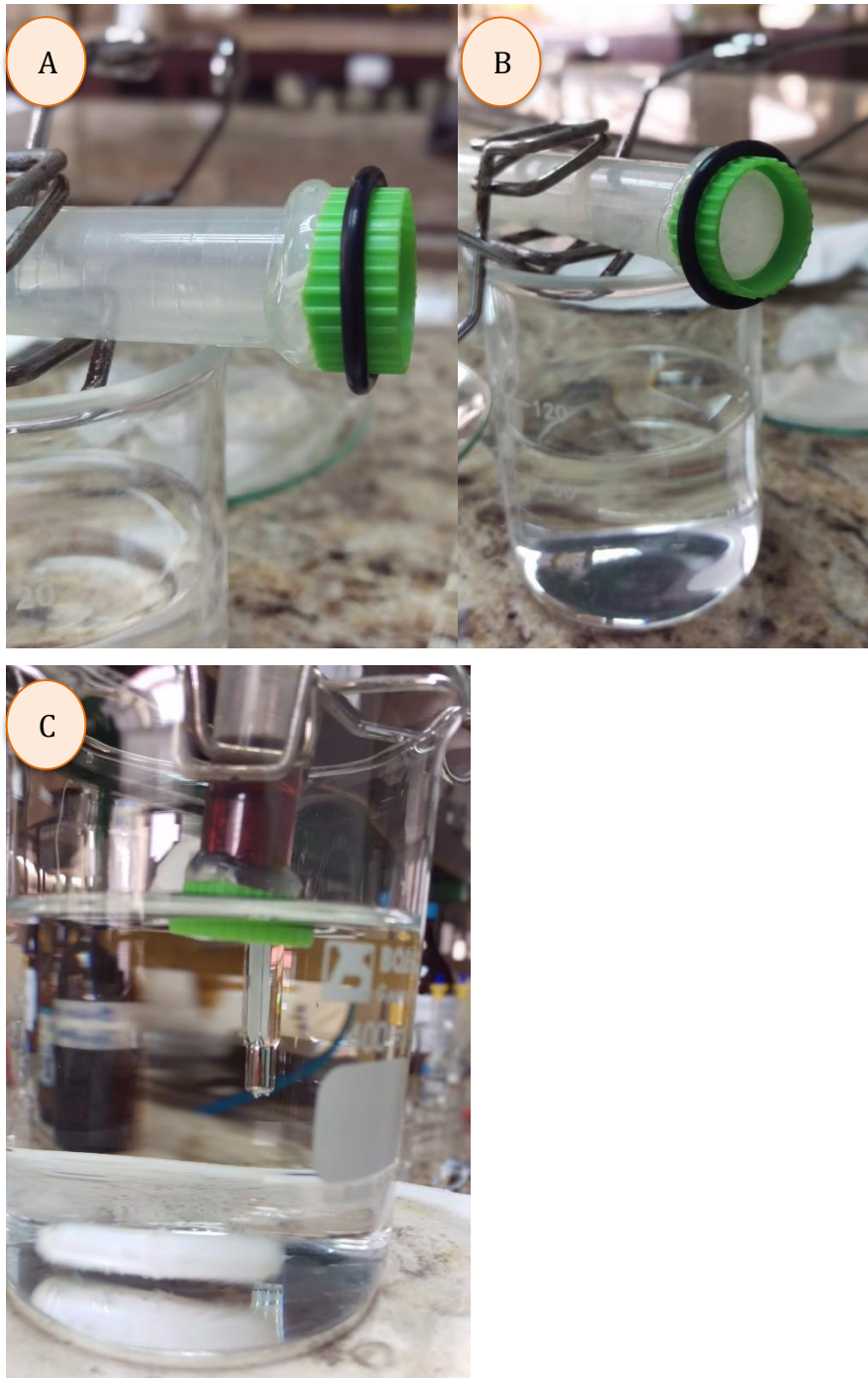
Nota: elaboración propia (2018).

Mencionada la importancia del pH para la difusión de fármacos, se debe tener previa calibración de los equipos por utilizar para dicha medición, ya que se debe mantener controlado este parámetro para evitar datos falsos a la hora de la lectura de las muestras. En la figura 21, se observa del lado izquierdo la calibración del equipo con una solución estandarizada de pH 7,0 y del lado derecho se asegura un pH real de 7,4 de la solución buffer de fosfatos.

El modelo prevé las filtraciones por los bordes del tubo (ver figura 22(a), (b)), al contar con la tapa, el empaque y el silicón, dan como resultado que la muestra por tomar pase únicamente por la membrana, además, el no sumergir por completo el tubo contribuye a un mejor manejo y datos no alterados en caso de filtraciones no deseadas, por ese motivo, las pinzas se deben colocar en una posición que ejerza un adecuado

soporte sobre el *beaker*, para mantener elevado el compartimento donador, tal como se muestra en la figura 22(c).

Figura 22. Modelo de Simulación *In Vitro* en Diferentes Ángulos



Nota: elaboración propia (2018).

Figura 23. Presentación Farmacéutica de AINEs



Nota: elaboración propia (2018).

En la figura 23, se presentan los medicamentos por utilizar para la simulación *in vitro*, siendo representado el naproxeno como cápsulas de gelatina de marca Aleve[®], ketoprofeno como jarabe marca Profenid[®] y dexketoprofeno como solución oral marca Enantyum[®].

Para el estudio de la absorción de diversos compuestos, incluidos los que exhiben actividad farmacológica, se ha utilizado el modelo de células Caco-2. En el desarrollo de nuevos fármacos, los estudios de absorción realizados en este sistema pueden ser utilizados para solicitar excepción de los estudios de bioequivalencia.

La complejidad de utilización de monocapas de células epiteliales o el desarrollo de membranas artificiales para la medición de la permeabilidad de un fármaco, con el fin de predecir su absorción, lleva a proponer una membrana para dar con la simulación *in vitro* de permeabilidad de fármacos; es importante destacar que el origen de la membrana y su composición permiten la funcionalidad de permeación.

Para la cuantificación de fármaco que atraviesa la membrana propuesta, se debe plantear un método confiable para dicho propósito, por lo que se implementa la realización de curvas de calibración con cada compuesto del fármaco (principio activo), utilizando estándares de referencia, los cuales son brindados en la Universidad Internacional de las Américas (figura 24).

Figura 24. Estándares de Referencia



Nota: elaboración propia (2018).

Análisis de permeabilidad del Ketoprofeno

La curva de calibración tanto del naproxeno, ketoprofeno como dexketoprofeno se realiza con base en el 120 a 20 % de la cantidad de fármaco total que se va poner a prueba en la membrana. Se debe utilizar el mismo medio de disolución que se va utilizar en la simulación, ya que no sería cuantificable si son distintos. Esto debido a que, en la espectrofotometría, se tienen variables que influyen en la absorbancia, entre las que los autores Skoog, Holler y Nieman (2001) mencionan: la naturaleza del disolvente, el pH de la disolución, la temperatura, entre otras; así mismo, destacan con gran importancia que es ineludible utilizar el mismo disolvente cuando se comparan espectros de absorción con fines de identificación.

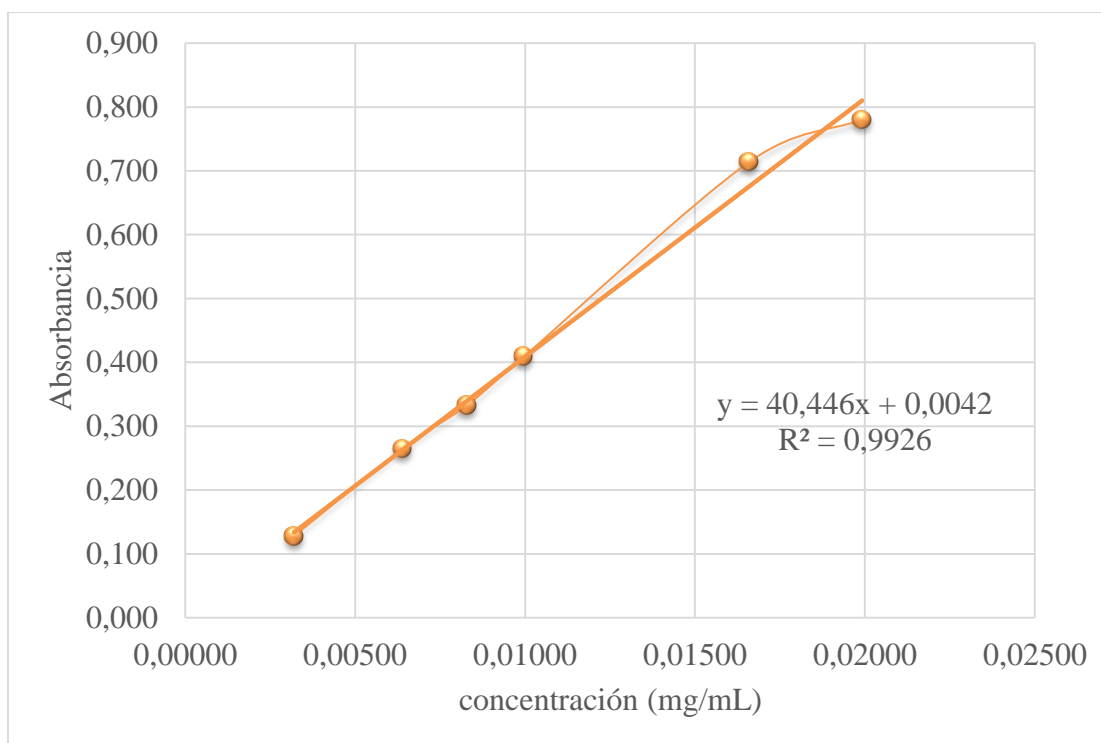
Tabla 2. Absorbancia Versus Concentración para la Curva de Calibración del Ketoprofeno.

%	Absorbancia	Concentración mg/mL ($\times 10^{-3}$)
20	0,128	3,20
40	0,265	6,40
50	0,333	8,30
60	0,409	9,96
80	0,636	13,28
100	0,714	16,60
120	0,780	19,92

Nota: elaboración propia (2018).

Tras la realización de las curvas, se observa una relación entre absorbancia y concentración, mencionada por Skoog et al. (2001), quienes afirman que normalmente la concentración de un analito absorbente está linealmente relacionada con la absorbancia. Esta tendencia se obtiene tanto para el ketoprofeno como el dexketoprofeno y naproxeno en las tablas 3, 8 y 13 respectivamente, donde se aprecia un aumento de la absorbancia respecto a la concentración calculada, fundamentados en la Ley de Lamber Beer.

Figura 25. Gráfico de Curva de Calibración del Ketoprofeno.



Nota: elaboración propia (2018).

Por medio de una regresión lineal, se obtiene la ecuación correspondiente de las curvas de calibración utilizando la absorbancia en el eje "Y" y la concentración en mg/mL en el eje "X" en el caso del Ketoprofeno el valor de la pendiente es de 40,446 y el intercepto es 0,0042, dando de esta forma un r^2 de 0,9926 siendo un valor de correlación aceptable, ya que es cercano a uno. Dicha información se observa en la figura 25.

Tabla 3. Absorbancia a Diferentes Tiempos en las Muestras de Profenid® (ketoprofeno)

tiempo (min)	Absorbancia		
	muestra 1	muestra 2	muestra 3
10	0,138	0,170	0,192
20	0,289	0,348	0,231
30	0,373	0,479	0,307
40	0,459	0,567	0,389
50	0,546	0,666	0,465
60	0,591	0,759	0,561

Nota: elaboración propia (2018).

Teniendo la ecuación lineal y tras el muestreo de los medicamentos en la simulación *in vitro*, se obtuvieron los valores de absorbancia de las muestras del ketoprofeno (representadas en la tabla 4) a diferentes tiempos, durante una hora se analizan para obtener las concentraciones correspondientes a cada tiempo.

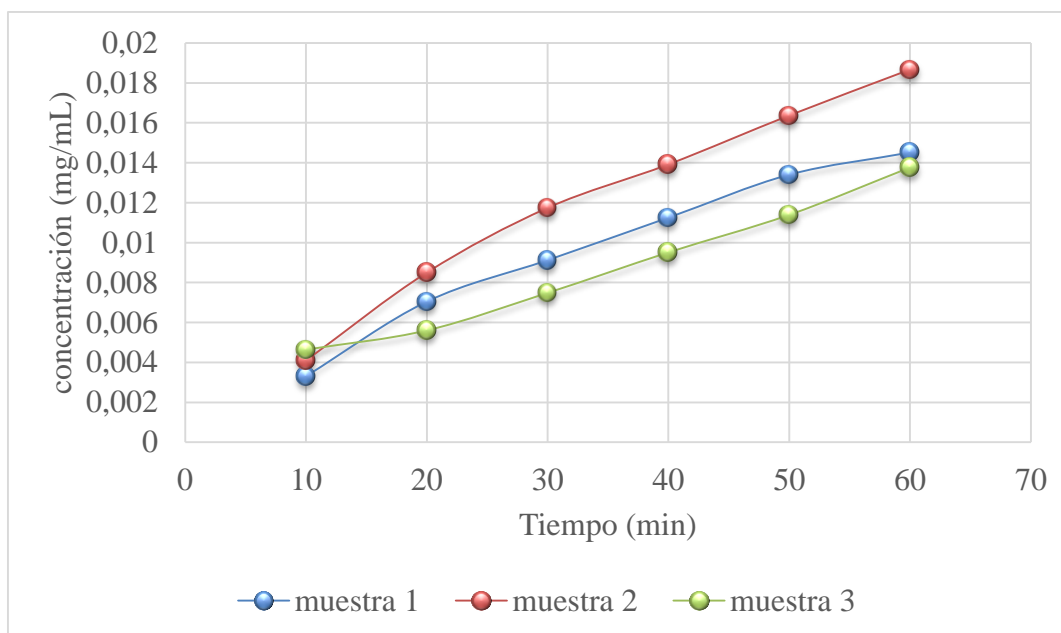
Tabla 4. Concentración (mg/mL) Respecto al Tiempo de Profenid® (ketoprofeno)

tiempo(min)	Concentración (mg/mL) x10 ⁻³		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
10	3,30811	4,09929	4,64323
20	7,04149	8,50022	5,60748
30	9,11833	11,73911	7,48653
40	11,24462	13,91485	9,51392
50	13,39564	16,36256	11,39297
60	14,50823	18,66192	13,7665

Nota: elaboración propia (2018).

Según la tabla 5 y figura 26, se puede observar una tendencia de aumento de la permeación tras cada muestra; sin embargo, las diferencias no son tan significantes en el ketoprofeno, esto es más visible en la tabla 6, la cual muestra los datos de miligramos obtenidos en cada muestra a los mismos tiempos.

Figura 26. Gráfico de Tendencia de la Concentración Versus Tiempo del Profenid® (ketoprofeno)



Nota: elaboración propia (2018).

Tabla 5. Cantidad Respecto al Tiempo de Profenid® (ketoprofeno)

tiempo(min)	Cantidad(mg)		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
10	0,49621718	0,61489393	0,6964842
20	1,05622311	1,27503338	0,8411215
30	1,36774959	1,76086634	1,12297879
40	1,68669337	2,08722741	1,42708797
50	2,00934579	2,45438362	1,70894526
60	2,17623498	2,79928794	2,06497552

Nota: elaboración propia (2018).

La cantidad de se determinó tras el despeje miligramos utilizando la concentración obtenida, el volumen total del compartimento receptor de 150 mL, este volumen se mantiene constante ya que tras cada toma de muestra se devuelve al compartimento para evitar errores en los datos. Por medio de la cuantificación de medicamento (tabla 6) que atravesó la membrana, se puede medir la permeabilidad aparente del fármaco (tabla 7) donde la concentración es el mismo valor inicial para cada corrida de muestra, los valores obtenidos muestran una leve diferencia donde la tendencia es $2 > 1 > 3$ en cuanto a cantidad respecto al tiempo; en otras palabras, la muestra 2 presenta mayor cantidad de fármaco en el compartimento receptor que la muestra 1 y esta presenta más que la muestra 3, siendo posible este comportamiento por una acumulación de residuos en la membrana, así mismo se debe considerar la matriz de excipientes puesto lo que se utilizó es el fármaco y no la droga como tal.

Tabla 6. Papp del Profenid® (ketoprofeno)

profenid	Concentración (nmol/mL)	Área (cm ²)	Papp (cm/s E-04)	Papp media E-04	SD E-04	CV%
Muestra 1	1966,33632	0,785	14,0473	14,6	3,09	21,18%
Muestra 2			17,9389			
Muestra 3			11,829			

Nota: elaboración propia (2018)

Análisis de permeabilidad del Dexketoprofeno

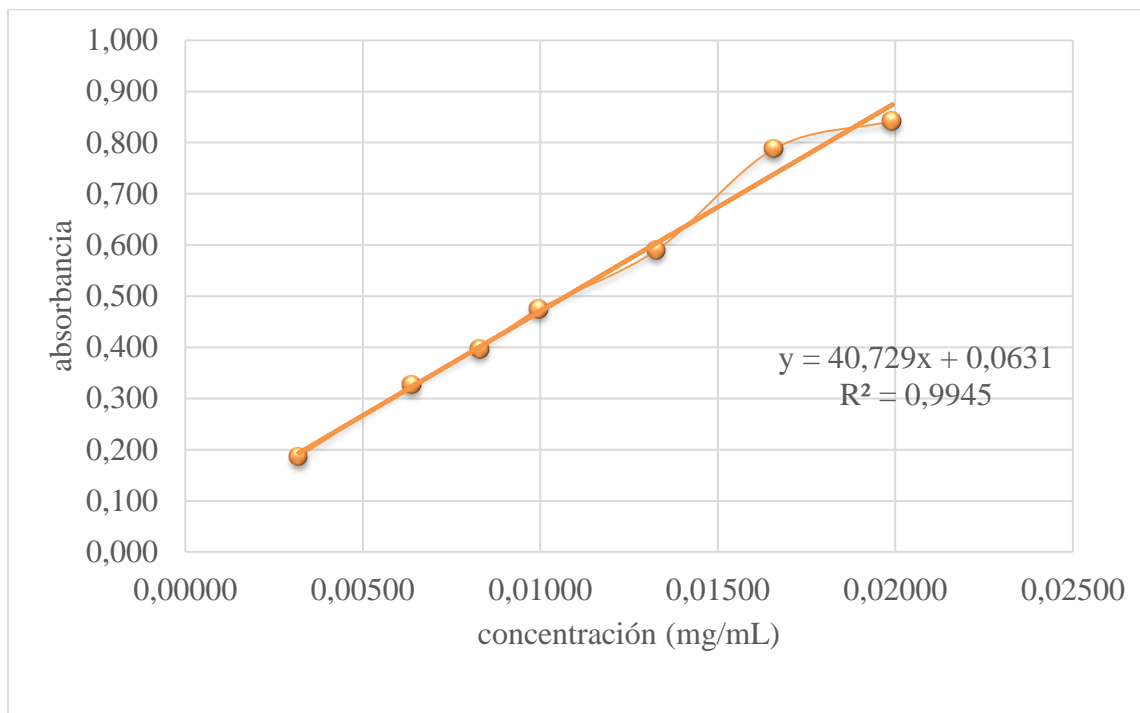
El dexketoprofeno muestra una tendencia diferente de valores a su mezcla racémica, ketoprofeno, estos valores se analizan a continuación.

Siguiendo la misma metodología que el ketoprofeno, por medio de una regresión lineal, se obtiene la ecuación correspondiente de las curvas de calibración, la cual se alcanza por medio de los valores de absorbancias y concentraciones (tabla 8), utilizando la absorbancia en el eje Y y la concentración en mg/mL en el eje X. En el caso del dexketoprofeno, el valor de la pendiente es de 40,729, el intercepto es 0,0631, dando de esta forma un r^2 de 0,9945, siendo un valor de correlación aceptable, ya que es cercano a uno. Dicha información se observa en la figura 27.

Tabla 7. Absorbancia Versus Concentración para la Curva de Calibración del Dexketoprofeno

Porcentaje (%)	Absorbancia	Concentración (mg/ml) x10⁻³
20	0,186	3,20
40	0,327	6,40
50	0,397	8,30
60	0,475	9,96
80	0,590	13,28
100	0,788	16,60
120	0,842	19,92

Nota: elaboración propia (2018).

Figura 27. Gráfico de la Curva de Calibración del Estándar de Dexketoprofeno

Nota: elaboración propia (2018).

Tras la realización de las curvas, se asegura la relación entre absorbancia y concentración, las cuales son linealmente relacionadas. Esta tendencia se obtiene también para el dexketoprofeno como medicamento (tabla 9) donde las absorbancias van en aumento, mismo que sucede con las concentraciones de las muestras a los mismos tiempos (tabla 10).

Tabla 8. Absorbancia a Diferentes Tiempos en las Muestras de Enantyum® (dexketoprofeno)

Tiempo (min)	Absorbancia		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
10	0,077	0,123	0,114
20	0,153	0,167	0,153
30	0,209	0,201	0,203
40	0,297	0,261	0,259
50	0,354	0,317	0,307
60	0,389	0,373	0,382

Nota: elaboración propia (2018).

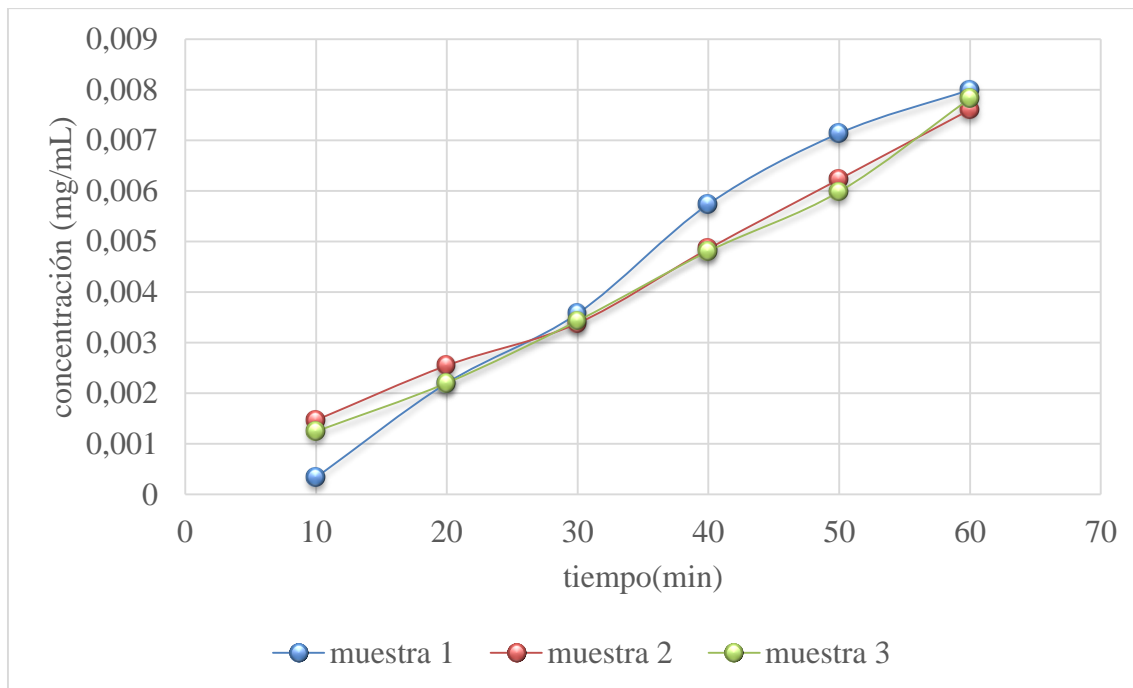
Según la tabla 10 y figura 28, la tendencia de aumento concentración versus tiempo de la permeación tras cada muestra se mantiene; sin embargo, las diferencias son muy leves en las muestras 2 y 3, lo que conlleva a valores sumamente similares muestra tras muestra. Esto es más visible en la tabla 11, la cual muestra los datos de miligramos que se obtuvieron en cada muestra a los mismos tiempos; sin embargo, la muestra 1 es en la que se obtienen valores más altos de las tres tomas.

Tabla 9. Concentración (mg/mL) Respecto al Tiempo de Enantyum® (Dexketoprofeno)

Tiempo (min)	Concentración(mg/ml) x10 ⁻³		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
10	0,34128	1,4707	1,24972
20	2,20727	2,55101	2,20727
30	3,58221	3,38579	3,4349
40	5,74284	4,85895	4,80984
50	7,14233	6,23389	5,98836
60	8,00167	7,60883	7,8298

Nota: elaboración propia (2018).

Figura 28. Gráfico de la Tendencia de la Concentración Respecto al Tiempo del Enantyum® (Dexketoprofeno)



Nota: elaboración propia (2018).

Por medio de la cuantificación de medicamento Enantyum® (tabla 11) que atravesó la membrana, se puede medir la permeabilidad aparente del fármaco. Los valores obtenidos muestran una leve diferencia, donde la tendencia es $1 > 3 > 2$ en cuanto a cantidad respecto al tiempo; en otras palabras, la muestra 1 presenta mayor cantidad de fármaco en el compartimiento receptor que la muestra 3 y esta última muestra presenta más que la muestra 2; lo cual no sigue un orden cronológico de la realización experimental; sin embargo, pudo verse afectado por factores externos, a pesar de que se mantuvieron las condiciones constantes para todas las muestras.

Tabla 10. Cantidad Respecto al Tiempo de Enantyum® (Dexketoprofeno)

tiempo (min)	Cantidad(mg)		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
10	0,05119203	0,22060448	0,18745857
20	0,33109087	0,38265118	0,33109087
30	0,53733212	0,50786909	0,51523484
40	0,86142552	0,72884186	0,7214761
50	1,07134965	0,93508311	0,89825432
60	1,20025044	1,14132436	1,17447028

Nota: elaboración propia (2018).

La permeabilidad aparente del Enantyum® (tabla 12) posee un coeficiente de variación relativamente bajo (13 %), lo que indica que se obtuvieron valores de Papp para cada muestra similares, dando una Papp promedio de 8,74 cm/s.

Tabla 11. Papp del Enantyum® (Dexketoprofeno)

Enantyum	Papp (cm/s E-04)	Papp media (cm/s E-04)	SD E-04	CV%
muestra 1	10,05	8,74	1,16	13%
muestra 2	7,86			
muestra 3	8,30			

Nota: elaboración propia (2018).

Análisis de permeabilidad del Naproxeno

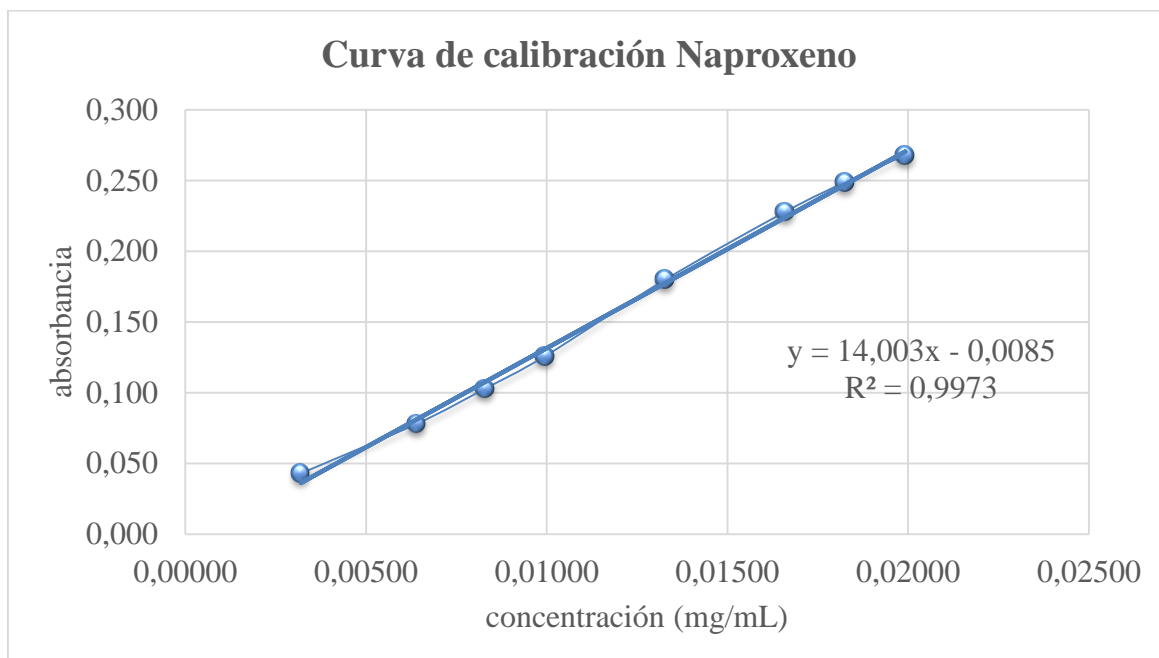
A continuación, se procede con los datos obtenidos experimentalmente del naproxeno, utilizando su forma ácida para el estándar para la elaboración de la curva de calibración, el cual fue aportado por la Universidad Internacional de las Américas.

Tabla 12. Absorbancia Versus Concentración para la Curva de Calibración del Naproxeno

Curva de calibración Naproxeno		
Porcentaje (%)	Absorbancia	Concentración(mg/ml) x10⁻³
20	0,043	3,20
40	0,078	6,40
50	0,103	8,30
60	0,126	9,96
80	0,180	13,28
100	0,228	16,60
110	0,249	18,26
120	0,268	19,92

Nota: elaboración propia (2018).

En la tabla 13, se encuentran las absorbancias a diferentes concentraciones con base en el 120 a 20 % de la cantidad de fármaco total que se va poner a prueba en la membrana (este corresponde a 2,5mg por cada prueba) utilizando el mismo medio de disolución (Buffer de fosfatos), para asegurar la identificación del compuesto, tal como fue dicho por Skoog, Holler y Nieman (2001).

Figura 29. Gráfico de la Curva de Calibración del Estándar de Naproxeno.

Nota: elaboración propia (2018).

Por medio de una regresión lineal, se obtiene la ecuación correspondiente de las curvas de calibración utilizando la absorbancia en el eje Y y la concentración en mg/mL en el eje X. En el caso del naproxeno, el valor de la pendiente es de 14,003, el intercepto es -0,0085, dando de esta forma un r^2 de 0,9973, siendo un valor de correlación aceptable, ya que es cercano a uno. Dicha información se observa en la figura 29.

Tabla 13. Absorbancia a Diferentes Tiempos en las Muestras de Aleve® (Naproxeno)

	Absorbancia Aleve® (Naproxeno).		
Tiempo (min)	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
10	0,023	0,034	0,033
20	0,052	0,051	0,077
30	0,063	0,073	0,092
40	0,081	0,096	0,129
50	0,09	0,097	0,138
60	0,096	0,1	0,149

Nota: elaboración propia (2018).

Teniendo la ecuación lineal y tras el muestreo de los medicamentos en la simulación *in vitro*, se obtienen los valores de absorbancia de las muestras del naproxeno (representadas en la tabla 14) a diferentes tiempos durante una hora. Estas se analizan para obtener las concentraciones correspondientes a cada minuto (ver tabla 15).

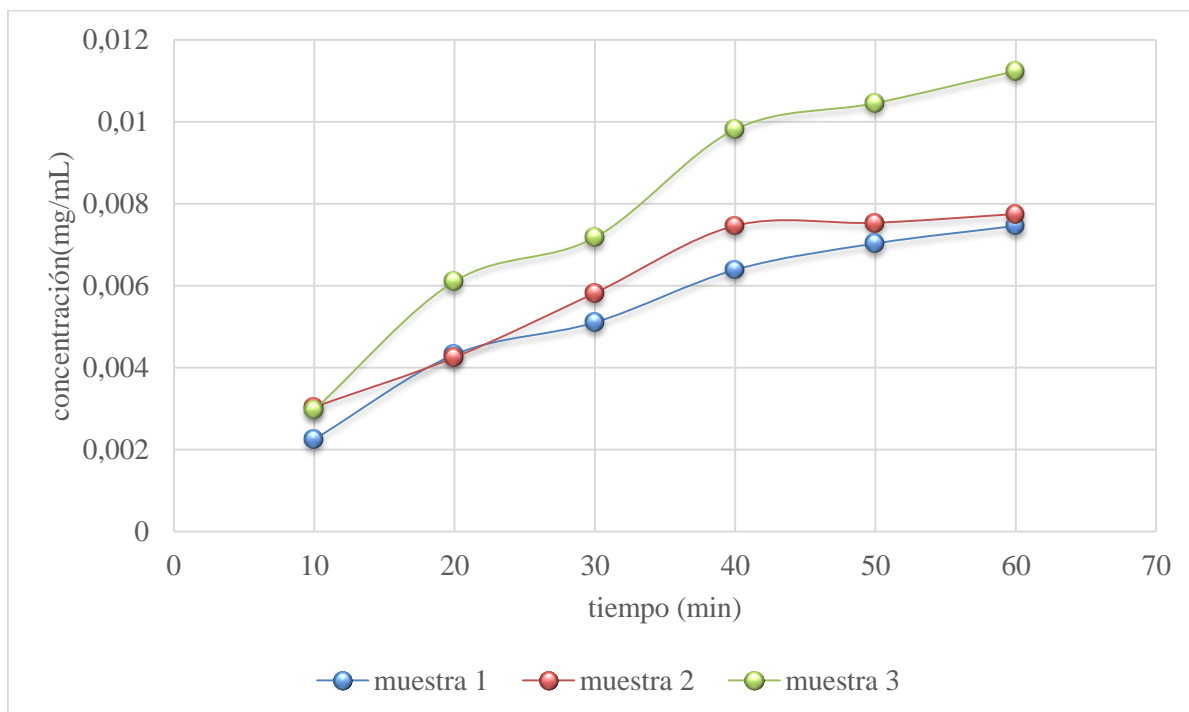
Tabla 14. Concentración (mg/mL) respecto al tiempo de Aleve® (Naproxeno).

Tiempo(min)	Concentración Naproxeno (mg/mL) x10 ⁻³		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
10	2,2495	3,0350	2,9636
20	4,3205	4,2490	6,1058
30	5,1060	5,8201	7,1770
40	6,3914	7,4626	9,8193
50	7,0342	7,5341	10,4620
60	7,4626	7,7483	11,2475

Nota: elaboración propia (2018).

Según la tabla 15 y figura 30, se puede observar una tendencia de aumento de la permeación tras cada muestra, sin embargo, las diferencias para este producto son las más marcadas en cuanto a los tres compuestos analizados. Esto es más visible en la tabla 16, la cual muestra los datos de miligramos obtenidos en cada muestra a los mismos tiempos.

Figura 30. Gráfico de la Tendencia de la Concentración Respecto al Tiempo del Aleve® (Naproxeno)



Nota: elaboración propia (2018).

Se observa una tendencia similar en cuanto a cantidades de compuesto medido en relación con el tiempo en las muestras 1 y 2, sin embargo, en la muestra 3 se obtienen datos con mayor paso de Naproxeno desde el compartimento donador al compartimento receptor (ver tabla 16). Analizando los datos obtenidos a los 60 minutos, las dos primeras muestras se aproximan a un 40 % de la cantidad total disponible, mientras que la tercera muestra obtiene más del 50 % de la cantidad total.

Tabla 15. Cantidad Respecto al Tiempo de Aleve® (Naproxeno)

Tiempo(min)	Cantidad (mg)		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
10	0,33742769	0,45525959	0,4445476
20	0,64807541	0,63736342	0,91587517
30	0,76590731	0,87302721	1,07655502
40	0,95872313	1,11940299	1,47289866
50	1,05513104	1,13011498	1,56930658
60	1,11940299	1,16225095	1,68713847

Nota: elaboración propia (2018).

Por medio de la cuantificación de medicamento (tabla 16) que atravesó la membrana, se mide la permeabilidad aparente del fármaco, los valores obtenidos muestran una leve diferencia donde la tendencia es $3 > 1 > 2$ en cuanto a cantidad respecto al tiempo; en otras palabras, la muestra 3 presenta mayor cantidad de fármaco en el compartimiento receptor que la muestra 1, así mismo, esta muestra presenta más que la muestra 2.

La diferencia más significativa está entre la muestra 3 con respecto a las dos primeras, ya que la muestra 1 y 2 poseen valores muy similares (6,46 cm/s y 6,38 cm/s) respectivamente; el coeficiente de variación es un poco alto, sin embargo, se encuentra menor al 50 %, dicho resultado se da por la diferencia anteriormente menciona de Papp de las muestras, finalmente, el Papp promedio del Naproxeno es de 7,75 cm/s

Tabla 16.Papp del Aleve® (Naproxeno)

Aleve	Concentración (nmol/mL)	Área (cm ²)	Papp (cm/s) E-04	Papp media (cm/s) E-04	SD E-04	CV%
muestra 1	2171,55266	0,785	6,46	7,75	2,30	30%
muestra 2			6,38			
muestra 3			10,4			

Nota: elaboración propia (2018).

Al evaluar la permeabilidad con ketoprofeno y naproxeno, compuestos que tienen establecida la categoría en la que se encuentran dentro del sistema de clasificación biofarmacéutica, además, son considerados moléculas pequeñas, por lo que tienen facilidad de absorción por difusión pasiva y cuyas permeabilidades aparentes (Papp) han sido reportadas por Zhu et al. (2002) y Feixiong et al. (2012) tanto experimental como *in silico*, permite determinar la Papp utilizando la membrana extraída del huevo siendo de carácter biológico y comparar los resultados con los de la literatura, sin embargo, los datos del dexketoprofeno no han sido reportados, se utilizan como referencia los valores del ketoprofeno, ya que poseen las mismas características físicas y químicas.

Por medio del espectro fotómetro UV visibles, es posible la cuantificación de principio activo de cada fármaco, ya que se establece una relación entre las absorbancias obtenidas (ver tabla 4, 9 y 14) y la concentración de fármaco a diferentes tiempos (tablas 5, 10 y 15), esto dado por la ecuación obtenida con anterioridad con un estándar de cada compuesto (figura 25, 27 y 29).

La precisión de la metodología fue tomada en cuenta, ya que, al realizar las pruebas por triplicado con una misma membrana para cada compuesto, se obtiene reproducibilidad del método dándole validez a los datos. Esto se logra observar en las figuras 26, 28 y 30, las cuales muestran la concentración a diferentes tiempos. En los tres compuestos se aprecia cómo hay un aumento de la concentración con el paso del tiempo, sin embargo, para cada compuesto, las tres muestras realizadas siguen un mismo patrón

de la línea trazada, lo que indica que la membrana posee buenas características como tal, ya que permea en función al tiempo y es resistente, debido a que permite hasta tres pruebas bajo las mismas condiciones.

Tabla 17. Comparación de Papp calculadas versus las obtenidas y propiedades fisicoquímicas.

	Papp pred. ^a (cm/s)	Papp exp ^b (cm/sE-06)	Papp exp (cm/s E-04)	Peso molecular (g/mol)	logP	APS (Å ²)	Solubilidad en agua (mg/L)	pKa
Naproxeno	21.11	10.6	7,7747	230,25	3,18	46,53	15,9	4,15
Ketoprofeno	19.63	16.7	14,605	254,28	3,29	54,37	51	3,88
Dexketoprofeno	----	---	8,74 ^c	254,28	3,29	54,37	51	3,88

^a Literatura de Papp fue tomada de la referencia Feixiong (2012)

^b valores de Papp (cm s^{-1} , $\times 10^{-6}$) a 7.4, determinados en HPLC por Zhu *et al.* (2002).

^c valores de Dexketoprofeno son predicciones Tetko. *et al.* (2005)

Nota: elaboración propia (2018).

Retomando la ecuación (5) de permeabilidad aparente dada por Smetanová et al., esta debe ser calculada de la siguiente manera:

$$P_{app} = \left(\frac{dQ}{dt} \right) \times \frac{1}{A \times C_0} \quad (5)$$

Donde $\frac{dQ}{dt}$ es la tasa o relación de permeabilidad, cantidad de droga que aparece en el compartimento receptor en función del tiempo (nmol / s).

A=corresponde al área de superficie de la membrana (cm²).

C₀= representa a la concentración inicial en el compartimento donante (nmol/mL)

Tomando en cuenta que son tres fármacos por evaluar, se realiza una ecuación de cantidad de fármaco obtenido (nmol) en función del tiempo (s) para cada uno de los fármacos, donde la pendiente obtenida será dQ/dt. Este valor debe ser dividido entre el área de la membrana utilizada (cm²) y la concentración inicial en el compartimento donador (nmol/mL); dicho lo anterior, se obtienen los valores de P_{app} para cada muestra de cada principio activo (ver tabla 7, 12, 17).

Tras el análisis estadístico (ver tabla 7, 12, 17) de los resultados, se observa que los valores CV% del dexketoprofeno son los más bajos con un 13 %, lo que indica que la dispersión de las muestras fue baja, en otras palabras, la P_{app} de cada muestra fueron similares; mientras que, para el ketoprofeno y el naproxeno, hubo diferencias más grandes en los resultados de P_{app} por cada muestra. Donde para el ketoprofeno se observa en la gráfica de concentración versus tiempo (figura 26) que los datos de mayor valor fueron alcanzados por la muestra 2 y respecto al naproxeno, la muestra 3 obtuvo los valores más altos dando, por consiguiente, un P_{app} mayor, dando un CV de 30 %, el más alto de los tres medicamentos, siendo este el comportamiento de la membrana con los fármacos.

Al realizar una comparación de P_{app} promedio de las tres muestras de cada fármaco obtenida experimentalmente con la membrana extraída del huevo a pH 7,4 y las P_{app} de la literatura, en las cuales Cheng (2012) utilizó medios *in silico* y Zhu et al.

(2002) bajo un análisis *in vitro* utilizaron una membrana artificial a pH 7,4, se obtienen los resultados (tabla 18) que muestran una relación estrecha entre naproxeno en PAMPA y la membrana de huevo; sin embargo, en cuanto a la predicción QSAR, en ambas Papp no muestran mucha similitud, pero, al analizar el ketoprofeno, es de gran comparación tanto la predicción *in silico* con las *in vitro* tanto PAMPA como la membrana biológica de huevo.

En cuanto al dexketoprofeno, no se cuenta con datos de Papp; sin embargo, hay que recordar que este compuesto es el estereoisómero dextrorrotatorio del ketoprofeno, [(S)-(+)-Ketoprofen], por lo que comparten las propiedades fisicoquímicas, como peso molecular, logP, área polar superficial, pKa, entre otras. Por esta razón, se realiza la comparación de la permeabilidad y se observa una gran diferencia entre el isómero y la mezcla racémica, sin embargo, las preparaciones comerciales poseen diferentes compuestos de excipientes, por lo que este factor externo puede estar ejerciendo una influencia en el muestreo.

Estos fármacos son denominados de alta permeabilidad por la *Food and Drug Administration* (FDA, por sus siglas en inglés), lo que significa que poseen un factor de absorción $\geq 85\%$ donde el compuesto estándar de valores de Papp es el metoprolol (20×10^{-6} cm/s) usado para el sistema de clasificación biofarmacéutica (BCS), por otro lado, Pham, et al. (2011) mencionan que, para que un compuesto sea considerado de alta permeabilidad, el valor definido para Papp debe ser $\geq 8 \times 10^{-6}$ cm/s, mientras que, para ser clasificado como moderadamente o poco permeable, la Papp debe ser $< 8 \times 10^{-3}$ cm/s.

A pesar de las diferencias en las Papp obtenidas basándose en los límites mencionados, se obtiene que los tres fármacos (naproxeno, ketoprofeno y dexketoprofeno) poseen una muy buena permeabilidad, ya que las Papp de todos (ver tabla 18) están por encima de 8×10^{-6} cm/s, lo que demuestra que, bajo el estudio a través de la membrana biológica extraída del huevo, la clasificación de los compuestos es de alta permeabilidad.

Analizando las propiedades fisicoquímicas, hay que recordar que, como lo mencionan Arena y Hein (2007), son características propias de cada compuesto, las cuales son determinadas sin alteración de la composición. La importancia de estas propiedades

en cuanto a los fármacos son múltiples, una de ellas es que, tras el descubrimiento de nuevos compuestos, estos deben pasar por ciertos análisis, los cuales proveen una evaluación temprana de seguridad del compuesto.

Se deben evaluar las propiedades de absorción, distribución, metabolismo, excreción (ADME, por sus siglas) y toxicología, mejor dicho, la farmacocinética (Innovation org, 2007), donde debe ser satisfactoria la absorción en sangre, distribución en el sitio de acción del cuerpo, una metabolización eficiente y efectiva, la excreción del compuesto del cuerpo y, finalmente, la seguridad de que este no sea tóxico; estos análisis pueden ser realizados *in vivo*, *in vitro* o *in silico*.

Sin embargo, según los resultados obtenidos, existe la posibilidad de alterar la estructura del compuesto para mejorar las propiedades de este. Este paso es llamado optimización, donde, al sufrir cambios estructurales, se puede mejorar la efectividad o la seguridad. Estos cambios pueden implicar un aumento del peso molecular, de la solubilidad, el cambio de la pKa, entre otras, por lo que es de suma importancia el análisis fisicoquímico de las moléculas.

Retomando los valores de cada compuesto, se observa cómo el peso molecular de los tres medicamentos está entre 200 y 300g/ mol, por lo que son considerados moléculas pequeñas, las cuales tienden a atravesar con mayor facilidad las membranas celulares, además de recordar que vienen de un mismo derivado, los aril propanóicos también conocidos como derivados del ácido propanóico, por lo que la tendencia es a tener pesos similares. El logP de los compuestos permite calcular la hidrofobicidad de las moléculas por medio de la relación octanol/ agua, donde valores bajos de logP indican que el compuesto tiende a distribuirse de mejor forma en medios hidrofílicos, de lado contrario, logP altos indican una tendencia a la hidrofobicidad de la molécula.

La determinación de un logP bajo está relacionada con un valor de <5 como hidrofílica y los valores >5 son considerados hidrófobos, por lo tanto, el naproxeno, dexketoprofeno y ketoprofeno son de carácter hidrófobas, permitiendo que sean más afines a medios acuosos. En este caso, el medio de disolución es un buffer de fosfatos en medio acuoso, por lo que dichos compuestos tienen buena afinidad con el medio, permitiendo de esta forma la solubilidad.

El área polar superficial (APS) es una propiedad que se basa en la polaridad estructural de las moléculas, donde hace referencia a la sumatoria de los átomos polares que forman parte de la estructura, esta es dada en ångström (\AA^2). La relación de esta propiedad para la permeabilidad es estrecha, ya que, si el APS es aproximadamente mayor a 140\AA^2 , se considera que la permeación a través de membranas va a ser deficiente, ya que es considerada muy polar; sin embargo, en los fármacos analizados, la APS posee un valor aceptable, lo cual favorece la permeación a través de membranas, esto posee buenos resultados en la parte experimental.

La solubilidad en agua es de las primeras propiedades que entran en función tras los análisis *in vitro*, ya que es necesario tener el compuesto disuelto en un medio para realizar la simulación. En cuanto a ketoprofeno y dexketoprofeno, se reportan solubilidades altas, por lo que el medicamento es fácilmente disuelto en el medio buffer, por otro lado, el naproxeno presenta una solubilidad menor en relación con los otros dos compuestos, esto significa mayor dificultad para obtener la disolución inicial, lo que explica la utilización de equipo ultrasónico para aumentar la velocidad de disolución, ya que, inicialmente, se observa la formación de un precipitado, pero, tras 15 min en el ultrasónico, no se ven partículas en el medio. Así mismo, la temperatura (37°C) promueve la solubilidad del compuesto.

La constante de disociación de los ácidos (pKa) afecta directamente la solubilidad, permeabilidad y la absorción oral por medio de la variación de la distribución de especies neutras y cargadas, según lo mencionan Di y Kerns (2003), esta familia de AINEs son de carácter ácido, tal como se observa en las figuras 4, 5 y 6. Posee un ácido propiónico en su estructura, lo que facilita la ionización del compuesto. Los tres fármacos poseen valores de pKa aproximada a 4, lo que implica una buena disociación en el buffer, el cual es de carácter básico con un pH 7.4., ya que, cuanto menor sea la pKa, mayor es la constante de disociación del ácido.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El presente capítulo atañe a las conclusiones obtenidas de una forma concisa tras el análisis de resultados obtenidos en el trabajo de investigación desarrollado, también se dan a conocer recomendaciones aplicables para futuras investigaciones y como método de enseñanza en el campo de la química medicinal.

- Se implementó la membrana del huevo de gallina en un modelo de simulación *in vitro* en una prueba de permeabilidad de una familia de antiinflamatorios no esteroideos.
- Se propuso la extracción de membranas del huevo de gallina, la cual demostró gran capacidad para simular pruebas *in vitro* de permeabilidad de fármacos con reproducibilidad.
- Por medio de simulaciones *in vitro*, se determinó que la membrana extraída del huevo permite la difusión efectiva de fármacos.
- Por medio de la simulación *in vitro*, se determinó una permeabilidad aparente del compuesto Naproxeno de 7,77cm/s a través de una membrana de origen biológico extraída del huevo de gallina.
- Por medio de la simulación *in vitro*, se determina una permeabilidad aparente del compuesto Ketoprofeno de 14,60cm/s a través de una membrana de origen biológico extraída del huevo de gallina.
- Por medio de la simulación *in vitro*, se determina una permeabilidad aparente del compuesto Dexketoprofeno de 8,74cm/s a través de una membrana de origen biológico extraída del huevo de gallina.

- La comparación de Papp reportada en Naproxeno con PAMPA (10,6cm/s) muestra estrecha relación con la obtenida con la membrana biológica (7,77cm/s), mas no sucede lo mismo con la reportada por predicción (21,11cm/s).
- La comparación de Papp reportada en Ketoprofeno con PAMPA (16,7cm/s) muestra una excelente aproximación tanto con la obtenida con la membrana biológica (14,6cm/s) como la reportada por predicción (19,6cm/s).
- No se cuentan con reportes de Papp para Dexketoprofeno; sin embargo, al comparar el dato obtenido 8,74 cm/s con el reportado de su mezcla racémica (ketoprofeno) 16.7cm/s, se obtienen valores por debajo del 50%.
- El ketoprofeno, Naproxeno y Dexketoprofeno mostraron ser compuestos de alta permeabilidad, ya que los valores de Papp obtenidos son mayores a 8×10^{-6} cm/s, que siguen la categoría establecida por la FDA para dichas clasificaciones de los fármacos.

Recomendaciones

- Se recomienda que, para futuros trabajos de investigación, se logre obtener un análisis de la membrana por medio de la utilización microscopía electrónica, para obtener datos del tamaño del poro nominal de la membrana antes y después del uso de la misma.
- Así mismo, la evaluación de la permeabilidad aparente utilizando diferente pH para contemplar la simulación de diferentes porciones del intestino delgado.
- Evaluar los mismos fármacos con diferentes membranas obtenidas de un mismo lote de huevos, para obtener valores de la variación biológica que pueden presentar las membranas al ser de diferentes huevos.
- A los estudiantes y profesores, se les recomienda la utilización de la membrana como método de enseñanza en el campo de la química medicinal, biofarmacia y otras áreas farmacéuticas, para comprender la importancia de las propiedades fisicoquímicas en el estudio de la permeabilidad de fármacos.

REFERENCIAS

- Álvarez, M., Contreras, B., y Soto, M. (2014). Use of DMPC and DSPC lipids for verapamil and naproxen permeability studies by PAMPA. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41(4), 658-62. doi: 10.3109/03639045.2014.892954
- American Pharmacists Association. (2017). *Drug Information Handbook*. 17 ed. Hudson, Ohio: Lexi-Comp, Inc.
- Arena, S., y Hein, M. (2007). *Fundamentos de Química*. México: Cengage Learning.
- Baena, Y., Dallos, L., Manzo, R., y Ponce D'León, L. (2011). Estandarización de celdas de Franz para la realización de ensayos de liberación de fármacos a partir de complejos con polielectrolitos. *Rev.Colomb. Cienc. Quím. Farm* 40 (2), 174-188. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v40n2/v40n2a03.pdf>.
- Bassolino, D., Alper, H., y Stouch, T. (1993). Solute Diffusion in Lipid Bilayer Membranes: An Atomic Level Study by Molecular Dynamics Simulation. *Biochemistry*, 32 (47), 12624–12637. doi: 10.1021/bi00210a010
- Berendsen, H., y Marrink, S. (1993). Molecular-dynamics of water transport through membranes - water from solvent to solute. *Pure and Applied Chemistry*, 65(12), 2513-2520. doi: 10.1351/pac199365122513
- Cohen, B. (1974). The Permeability of Liposomes to Nonelectrolytes II. The Effect of Nystatin and Gramicidin A. *The Journal of Membrane Biology*, 20, 235- 268. Recuperado de <https://doi.org/10.1007/BF01870638>
- Debandi, E., François, N., y Daraio, M. (2010). Evaluación de distintas membranas para liberación *in vitro* de principios activos anticelulíticos. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 2(2), 97-105. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=323627682009>

- Delgado, O. (2014). *Cálculo de la permeabilidad de un modelo de membrana celular hacia dos agentes antifímicos*. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas, México.
- Dixit, P., Jain, D., y Dumbwani, J. (2011). Standardization of an ex vivo method for determination of intestinal permeability of drugs using everted rat intestine apparatus. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 65, 13–17. doi: 10.1016/j.vascn.2011.11.001.
- Di, L., y Kerns, E. (2003). Profiling drug-like properties in discovery research. *Current Opinion in Chemical Biology*, 7 (3), 402-408. doi: 10.1016/S1367-5931(03)00055-3
- Feixiong, C., Weihua, L., Yadi, Z., Jie, S., Zengrui, W., Guixia, L., Philip, W., y Yun, T. (2012). admetSAR: a comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties. *J. Chem. Inf. Model.*52(11): 3099-3105.
- Ghosh, A., Scott, D., y Maurer, T. (2013). Towards a unified model of passive drug permeation I: Origins of the unstirred water layer with applications to ionic permeation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 52, 109–124. doi: doi.org/10.1016/j.ejps.2013.10.004
- Ghosh, A., Maurer, T., Litchfield, J., Varma, M., Rotter, C., Scialis, R., Feng, B., Tu, M., Guimaraes, C., y Scott, D. (2014). Toward a Unified Model of Passive Drug Permeation II: The Physiochemical Determinants of Unbound Tissue Distribution with Applications to the Design of Hepatoselective Glucokinase Activators. *Drug Metabolism and Disposition*, 42, 1599–1610. doi: https://doi.org/10.1124/dmd.114.058032
- Goodman y Gilman. (2015) *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 12. ed. País: México. McGraw-Hill.
- Hastings, J., Owen, G., Dekker, A., Ennis, M., Kale, N., Muthukrishnan, V., Turner, S., Swainston, N., Mendes, P., y Steinbeck, C. (2016). (a) ChEBI in 2016: Improved

services and an expanding collection of metabolites. *Nucleic Acids Res.*
Recuperado de <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:6128>

Hastings, J., Owen, G., Dekker, A., Ennis, M., Kale, N., Muthukrishnan, V., Turner, S., Swainston, N., Mendes, P., y Steinbeck, C. (2016). (b) ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites. *Nucleic Acids Res.* Recuperado de <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=7476>

Hastings, J., Owen, G., Dekker, A., Ennis, M., Kale, N., Muthukrishnan, V., Turner, S., Swainston, N., Mendes, P., y Steinbeck, C. (2016). (b) ChEBI in 2016: Improved services and an expanding collection of metabolites. *Nucleic Acids Res.* Recuperado de <http://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI:76128>

Herrera, D., Hernández, E., Espinosa, J., Martínez, I., Beltrán, A., y Martínez, J. (2012). Técnicas de complejidad variable para evaluar la absorción de fármacos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 43(1), 18-32. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000100003&lng=es&tlng=es

Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, M. (2014). *Metodología de la investigación*. México: McGRAW-HILL / Interamericana editores, S.A.

Hincke, M., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodríguez, A., y McKee, M. (2012). The eggshell: structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience* 17, 1266-1280.

Innovation. Org. (2007). *Drug Discovery and Development, the Pharmaceutical Research and Manufacturers of America*.

Krämer, S. (2015). Quantitative aspects of drug permeation across *in vitro* and *in vivo* barriers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25, 30-45. doi: 10.1016/j.ejps.2015.10.013

L.C. Wade, Jr. (2004). *Química orgánica*. España: Pearson educación, S. A.

- Loftsson, T., Konrádsdóttir, F., y Másson, M. (2006). Development and evaluation of an artificial membrane for determination of drug availability. *ELSEVIER*, 60-68. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.07.009
- Luo, L., Patel, A., Sinko, B., Bell, M., Wibawa, J., Hadgraft, J. y Lane, M. (2016). A comparative study of the *in vitro* permeation of ibuprofen in mammalian skin, the PAMPA model and silicone membrane. *International Journal of Pharmaceutics* 505,(1-2) 14-19. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.03.043>
- Martínez, L., Maldonado., A., y Hernández, E. (2010). Elasticidad de las membranas biológicas. *Revista Mexicana de Física* 56(1) 107-122. PACS: 87.16.dm; 87.16dj; 02.40.Hw
- Meng, F., y Xu, W. (2013). Drug permeability prediction using PMF method. *Journal of Molecular Modeling*, 19, 3, 991–997, DOI: 10.1007/s00894-012-1655-1.
- National Center for Advancing Traslational Sciences. (s.f.). *KETOPROFEN*. Recuperado de <https://drugs.ncats.io/substance/90Y4QC304K>
- Pérez, A., López, A., y Grau, I. (2002). Antiinflamatorios no esteroideos (AINES): Consideraciones para su uso estomatológico. *Revista Cubana de Estomatología*, 39(2), 119-138. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072002000200004&lng=es&tlng=es
- Pollock, C. (2013). *Comprendiendo el Huevo Aviar: desde Afuera hacia Adentro*. Recuperado de <https://lafeber.com/vet/es/comprendiendo-el-huevo-aviar-desde-afuera-hacia-adentro/#Referencias>
- Pham, H., González, I., Bermejo, M., Mangas, V., Centelles, I., Garrigues, T., y Cabrera, M. (2011). In Silico Prediction of Caco-2 Cell Permeability by a Classification QSAR Approach. *Molecular Informatics. John Wiley and Sons*, 30, 376 – 385. doi: 10.1002/minf.201000118

- Royal Society of Chemistry. (2015). *ChemSpider: Naproxen*. Recuperado de <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.137720.html>
- Shityakov, S., Neuhaus, W., Dandekar, T., y Förster, C. (2013). Analysing molecular polar surface descriptors to predict blood-brain barrier permeation. *Int. J. Computational Biology and Drug Design*, 6, 146-156.
- Skoog, D., Holler, J. y Nieman, T. (2001). Principios de análisis instrumental, 5. ed. País: España. McGraw-Hill.
- Smetanová, L., Štětinová, V., Svoboda, Z., y Květina, J. (2011). Caco-2 cells, biopharmaceutics classification system (bcs) and biowaiver. *Acta Médica (Hradec Kralove)*, 54, (1), 3-8. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21542416>
- Stillwell, W. (2013). Membrane History. In W. Stillwell (Ed.), *An Introduction to Biological Membranes* (pp. 13–28). San Diego: Elsevier. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52153-8.00002-7>
- Szisz, D. (2016). *pKa calculation*. Recuperado de <https://docs.chemaxon.com/display/docs/pKa+calculation>
- Szisz, D. (2018). *Solubility Predictor*. Recuperado de <https://docs.chemaxon.com/display/docs/Solubility+Predictor>
- Szisz, D. (2015). *LogP and logD calculations*. Recuperado de <https://docs.chemaxon.com/display/docs/LogP+and+logD+calculations>
- Takano, R., Kataoka, M., y Yamashita, S. (2012). Integrating drug permeability with dissolution profile to develop IVIVC. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 33(7), 354–365. doi: 10.1002/bdd.1792

Tetko, I., Gasteiger, J., Todeschini, R., Mauri, A., Livingstone, D., Ertl, P., Palyulin, V., Radchenko, E., Zefirov, N., Makarenko, A., Tanchuk, V., y Prokopenko, V. (2005). Virtual computational chemistry laboratory - design and description. *J. Comput. Aid. Mol. Des.*,19, 453-63.

U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. (2017). *Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System*. Estados Unidos.

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. (2018). DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(Database issue), D1074–D1082. Recuperado de doi: org/10.1093/nar/gkx1037.

Zeng, Y., Yao, X., y Liu, X. (2012). Numerical simulation of the effect of permeability on the hydrodynamics in a parallel-plate coculture flow chamber. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 17, (8), 875–887. doi: 10.1080/10255842.2012.723699

Zhu, C., Jiang, L., Chen, T., y Hwang, K. (2002). A comparative study of artificial membrane permeability assay for high throughput profiling of drug absorption potential. *ELSEVIER*, 37, 399–407. doi: 10.1016/S0223-5234(02)01360-0