



Tesis de Doctorado en Química

Recirculación Plasma - Tracto Gastrointestinal de fármacos estereoisómeros

Q.F. Marianela Lorier

Directores:

Prof. Pietro Fagiolino

Prof. Marta Vázquez

Área Biofarmacia y Terapéutica

Departamento de Ciencias Farmacéuticas

Facultad de Química

Universidad de la República

Uruguay

La Defensa Oral Intermedia de la tesis fue realizada el 28 de noviembre de 2016, frente a un tribunal examinador conformado por las Profesoras: Dra. Verónica Cesio, Dra. Laura Domínguez y la Dra. Sonia Rodríguez de Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

Índice de contenidos

Resumen.....	4
Listado de publicaciones.....	6
Capítulo 1: Introducción, objetivos y metodología general.....	7
Capítulo 2: Farmacocinética estereoselectiva de Ketoprofeno tras la administración oral de formulaciones de liberación modificada bajo diferentes condiciones de administración.	20
Capítulo 3: Predicción de la absorción oral <i>in vivo</i> de Ketoprofeno mediante ensayos de disolución <i>in vitro</i> y cálculos de partición hacia fase orgánica.	31
Capítulo 4: Impacto de la modificación de la distribución del gasto cardíaco tras la ingesta de comidas y de la estimulación de la secreción pancreática sobre la tasa de inversión quiral R-en-S del Ibuprofeno.	39
Capítulo 5: Alteración del patrón de estereoselectividad en la metabolización de Metadona causada por procesos de recirculación plasma- tracto gastrointestinal- plasma.	52
Capítulo 6: Conclusiones generales.....	65
Bibliografía	69
Agradecimientos.....	76
Anexo I: Procedimiento para la dosificación de enantiómeros de Ketoprofeno en plasma.....	77
<i>Anexo II: Procedimiento para la dosificación de enantiómeros de Ibuprofeno en plasma.....</i>	<i>81</i>
Anexo III: Procedimiento para la dosificación de enantiómeros de Metadona y su metabolito EDDP en diferentes fluidos biológicos.	85

Resumen

La respuesta farmacocinética de un fármaco es variable y depende de múltiples procesos. Esta respuesta puede complejizarse, por ejemplo, debido a procesos de recirculación plasma – tracto gastrointestinal – plasma del fármaco. Las moléculas secretadas pueden volverse a absorber, y en dicho caso no se hablaría de excreción sino de circulación entre la sangre y el fluido hacia el cual se pretendió eliminar.

El proceso más ampliamente reconocido en farmacología es la recirculación entero-hepática. Sin embargo, en la presente tesis se profundiza en otros posibles circuitos de recirculación. Un trayecto del fármaco podría ser a través del jugo gástrico, en donde partiendo desde la sangre, alcanzaría dicho fluido para luego ingresar al medio interno desde la luz intestinal cuando el mismo se vacíe desde el estómago tras la apertura del píloro. Otro podría ser mediante el jugo pancreático, el cual es secretado a través del ducto pancreático que se conecta con el hepático inmediatamente antes de vaciar su contenido hacia el duodeno. Varios mililitros de ambos jugos son vertidos en pocos minutos hacia el tracto gastrointestinal, activados esencialmente por la llegada de alimentos al estómago y al intestino, respectivamente.

Estos trayectos adquieren relevancia en moléculas ionizables dado el pH que posee cada uno de estos fluidos. Existe un gradiente importante de pH entre ambos y el plasma (pH 7,4). De este modo, las drogas básicas preferirán la transferencia desde el plasma hacia el jugo gástrico de pH entre 1,2 y 2,3, para luego verse impedido su retorno a plasma por ionización a este pH ácido. En tanto las drogas ácidas, desde el plasma hacia el jugo pancreático de pH 8 aproximadamente.

El objetivo de la tesis fue estudiar la circulación plasma-tracto gastrointestinal-plasma de moléculas ácidas y básicas, que a su vez presenten estereoisomería. Los fármacos estereoisómeros, si bien poseen las mismas propiedades físico- químicas, pueden diferir en su farmacocinética y farmacodinamia. Los procesos de recirculación pueden afectar directamente la exposición a los diferentes isómeros ya que una posible ruta de metabolización para este grupo de fármacos es justamente la inversión quiral y al atravesar el enterocito puede ocurrir la conversión de un isómero en el otro.

La investigación realizada demostró la recirculación a la que son sometidos algunos fármacos. Además, repetidamente se observó que luego de la ingesta de comidas, el cociente de concentraciones de isómeros modificaba la tendencia que seguía.

Muchas veces los procesos de recirculación aumentan el tiempo de residencia de las moléculas en el organismo, prolongado su acción, sin embargo, en algunos fármacos, como para Metadona, el isómero S podría no favorecerse de este proceso ya que cada vez que atraviesa el enterocito aumenta su eliminación. Para los AINES, la ingesta de comidas podría en algunos casos promover la relación entre isómeros que resulta más beneficiosa para la terapia, al favorecer la conversión R-en-S, pero en otros casos, como para Ibuprofeno, podría no impactar sobre la exposición al isómero activo ya que la mayor tasa de conversión no logra compensar el gran aumento de clearance intestinal que se ve para ambos isómeros cuando se administran comidas frecuentes. Debe considerarse cada caso en particular para poder hacer una recomendación respecto, por ejemplo, al modo de administración. Por esto es interesante destacar, que este tipo de

investigaciones, si bien aportan valiosa información respecto a la farmacocinética de determinados fármacos, principalmente constituyen herramientas poderosas para el entendimiento de la fisiología, lo que permite la aplicación del conocimiento a diferentes casos.

Otro factor que demostró condicionar de manera importante la farmacocinética de los fármacos estudiados, fueron las diferencias fisiológicas entre hombre y mujeres. Se observó el más lento vaciado gástrico de las mujeres respecto los hombres, su mayor pH intestinal y el impacto del tamaño corporal sobre procesos de metabolización saturables.

Resumiendo, se demostró la disímil exposición a los isómeros que puede obtenerse tras la administración de una mezcla racémica y cómo diferentes variables impactan sobre la relación entre los isómeros. Por más que la terapia estereoselectiva resulte beneficiosa, por ejemplo, porque solo uno de los isómeros sea farmacológicamente activo, la mayoría de los fármacos estereoisómeros que se encuentran en el mercado, se administran como racematos debido al coste económico y a la complejidad de la separación de los isómeros. Esto introduce la necesidad de considerar el seguimiento de la terapia con estos medicamentos a través de la determinación de los isómeros por separado, ya que, como se mencionó, el perfil farmacocinético y farmacodinámico de los isómeros puede ser diferente y, por lo tanto, carece de lógica el análisis de la mezcla racémica. En el presente trabajo, se pone de manifiesto la ventaja de la determinación quiral. De otra manera, no hubiese sido posible la detección de los procesos estudiados y el correcto análisis de los resultados. Por otro lado, la información recabada podría ser de utilidad para el desarrollo de formas farmacéuticas innovadoras que permitan un más eficiente uso de la dosis racémica contenida.

Es de destacar la importancia de la investigación, en este caso en farmacocinética y en los factores que impactan sobre la misma, además del entendimiento de diferentes aspectos de la fisiología humana, para lograr un mejor aprovechamiento de los fármacos disponibles en el mercado, promoviendo el uso racional de los mismos, y para guiar e incentivar el desarrollo de nuevos fármacos a nivel nacional, siempre con el fin último de mejorar los perfiles de seguridad y eficacia de los tratamientos farmacológicos en beneficio de los usuarios.

Listado de publicaciones

- * Biorelevant in vitro dissolution coupled with n-octanol partition assay to predict in vivo absorption of ketoprofen after oral administration.

Lorier M, Fotaki N, Vázquez M, Fagiolino P.
Acta Farmaceutica Bonaerense (hasta 2006) - Latin American Journal of Pharmacy (desde 2007). 2018, 37.

- * Stereoselective metabolic change of methadone caused by its blood-gastrointestinal cycling.

Lorier M., Guevara N., Fagiolino P., Vázquez M., Ibarra M.
Current Topics in Pharmacology. 2018, 22: 27-34.

- * Revisiting pharmacokinetics and pharmacogenetics of methadone in healthy volunteers.

Guevara N, Lorier M, Vázquez M, Fagiolino P, Feria-Romero I, Orozco-Suarez S.
Capítulo ONLINE FIRST en Libro Farmacocinética y Farmacodinamia.
IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.82426

- * Stereoselective Pharmacokinetics of Ketoprofen After Oral Administration of Modified-Release Formulations in Caucasian Healthy Subjects.

Lorier M, Magallanes L, Ibarra M, Guevara N, Vázquez M, Fagiolino P.
Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2015; 41: 787.

- * Sex and food influence on intestinal absorption of ketoprofen gastroresistant formulation.

Magallanes L, Lorier M, Ibarra M, Guevara N, Vázquez M, Fagiolino P.
Clinical Pharm in Drug Dev. 2015; 5(3): 196-200.

Capítulo 1: Introducción, objetivos y metodología general

La interacción medicamento-organismo conduce al desarrollo de dos tipos de respuestas: la respuesta farmacocinética (PK) y la respuesta farmacodinámica (PD).

La respuesta PK constituye lo que el organismo le hace al fármaco. Esta respuesta está caracterizada por las concentraciones de fármaco o sustancias derivadas en distintos fluidos del cuerpo. Describe el destino del fármaco desde su administración hasta su completa eliminación.

La respuesta farmacodinámica constituye lo que el fármaco le hace al organismo y refiere a la intensidad de los efectos provocados en el organismo. Estos efectos dependerán de la interacción fármaco-receptor a nivel de sitio de acción o biofase.

Entonces, la respuesta PK y la respuesta PD están íntimamente ligadas. Las concentraciones de fármaco y de sus derivados activos a nivel de sitio de acción van a determinar la intensidad de los efectos provocados y, por lo tanto, la respuesta clínica de un paciente. El análisis de estas respuestas por separado, provee limitada información respecto a la aplicabilidad clínica de un fármaco. La elección de la posología y de las condiciones de administración dependerá de la respuesta PK/PD del fármaco. Estas decisiones se tomarán en base al objetivo que se persigue con una terapia: provocar un conjunto de efectos deseados con cierta intensidad y duración (eficacia) minimizando el perfil de efectos tóxicos (seguridad).

En la práctica clínica, resulta engorroso medir las intensidades de los varios efectos que puede provocar un principio activo en un paciente, además de que el efecto puede ser subjetivo. Por este motivo el análisis farmacocinético ha tenido históricamente mayor desarrollo. Sin embargo, el estudio de la respuesta farmacocinética debe conducir a un resultado farmacodinámico para no carecer de utilidad clínica ^{1,2,3}.

Monitorización en plasma, saliva y orina

Si bien lo importante son las concentraciones alcanzadas a nivel de sitio de acción, es difícil la determinación de fármaco a este nivel, principalmente por dificultad de acceso o por desconocimiento del mismo. El fluido más comúnmente monitoreado es el plasma por su fácil acceso y por su estrecho relacionamiento con los tejidos, entre ellos el tejido a nivel de sitio de acción. Sin embargo, existen otros fluidos en los que también es posible el monitoreo como la saliva y la orina.

La extracción de saliva es un proceso sencillo, que no requiere de personal especializado, no invasivo, indoloro, seguro y económico. Es importante estandarizar el método de recolección de manera de obtener resultados significativos. Esto se debe a que la concentración de fármaco al inicio del conducto es semejante a la concentración de fármaco libre en arteria. Sin embargo, en su recorrido, se establecen intercambios con el líquido intracelular de las células ductales, y éste con el líquido intersticial presente al otro lado de la membrana basal, por lo que las concentraciones de fármaco empezarán a asemejarse a las presentes a nivel venoso. La difusión de fármaco desde la sangre a la saliva es muy rápida si la lipofilia de las moléculas le permiten un fácil reparto por las

membranas celulares, de lo contrario la difusión se enlentece pudiendo llegar a ser insignificante, por ejemplo, si el soluto estuviese cargado de manera permanente. La transferencia también estará condicionada por la existencia de transportadores de flujo a este nivel. Entonces, la saliva puede no ser un fluido de monitorización adecuado para determinados fármacos, pero sí para muchos otros en los que podría complementar o incluso sustituir el monitoreo en plasma ^{4,5,6}. Sin embargo, existen otras desventajas respecto a su uso como la alta variabilidad en los resultados, la dependencia de las concentraciones con el pH salival, entre otras cosas.

Otro potencial fluido de monitorización es la orina, presentando ventajas similares a la saliva respecto a su extracción. La tasa de excreción de un fármaco y su concentración en orina, son el efecto neto resultante de procesos de filtración glomerular y, reabsorción y secreción a nivel tubular ⁷.

Tanto para saliva como para orina, su aplicación se ve limitada a la tasa de transferencia del fármaco a estos fluidos y a la sensibilidad del método analítico de determinación utilizado.

De la monitorización se desprenden numerosos parámetros de exposición que serán útiles para caracterizar la respuesta farmacocinética. Entre ellos, se destacan los siguientes:

- * Concentración máxima: es la máxima concentración de fármaco alcanzada tras la administración. Caracteriza la cantidad de fármaco absorbido.
- * Tiempo máximo: es el tiempo al que se alcanza la máxima concentración. Caracteriza la velocidad de absorción.
- * Área bajo la curva: es la integral de la función de concentraciones de fármaco en el tiempo. Caracteriza la cantidad de fármaco absorbido.
- * Semivida de eliminación: es el tiempo requerido para que la concentración de fármaco disminuya a la mitad en pseudoequilibrio. Caracteriza la velocidad de eliminación del fármaco.

Variabilidad en la respuesta clínica

La respuesta clínica de un paciente depende de la acción combinada de fármacos, metabolitos, intermediarios metabólicos, otras sustancias endógenas y exógenas, entre otras cosas. La respuesta será muy variable entre individuos y también en un mismo individuo en ocasiones diferentes. La variabilidad interindividual en los parámetros farmacocinéticos puede responder a diversos factores: peso corporal, edad, sexo, funcionalidad renal, expresión y actividad enzimática, hábitos, momento del día de la administración, condiciones de la administración ¹. Es por esto que profundizar en el conocimiento farmacocinético y comprender realmente los procesos que ocurren cuando se administra un fármaco, repercute fuertemente en la optimización de la terapia de un paciente.

Variabilidad en la respuesta farmacocinética: procesos de recirculación plasma-tracto gastrointestinal-plasma

La respuesta farmacocinética dependerá de una serie de procesos que se resumen a continuación:

- Liberación: comprende la salida del fármaco desde el medicamento que lo contiene y su llegada al sitio de absorción.
- Absorción: el proceso por el cual el fármaco llega a la circulación sanguínea desde el sitio de administración.
- Distribución: la difusión de moléculas de fármaco a través de la sangre desde un determinado punto a todo el cuerpo.
- Eliminación: comprende procesos de excreción y metabolización. La excreción es la eliminación incambiada de la molécula. La metabolización es la transformación de la molécula con la finalidad de aumentar su hidrofilia para excretarse más fácilmente. A esta nueva molécula se la llama metabolito y puede permanecer en el cuerpo.

Estos procesos pueden complejizarse y por ejemplo aparecer múltiples picos en los perfiles de concentración a lo largo del tiempo. Estos segundos picos pueden ser multifactoriales y percibirse debido a:

- a) Absorción bifásica: una parte del fármaco se absorbe y luego ocurre un segundo proceso de absorción de un remanente de fármaco que no había sido liberado desde la formulación (como puede ser el caso de comprimidos bicapa) o que no había sido vaciado desde el estómago hacia el intestino.
- b) Disolución fraccionada: dado el aumento gradual de pH a lo largo del tracto gastrointestinal, aquellos fármacos que presenten solubilidad pH dependiente pueden presentar una disolución fraccionada.
- c) Absorción discontinua: algunos fármacos presentan sitios específicos de absorción y se absorben en distintas porciones del intestino.
- d) Acumulación en tejidos: fármacos que se acumulan en tejidos pueden luego liberarse desde los mismos hacia plasma originando segundos picos que no ocurren debido a una nueva entrada.
- e) Recirculación de fármacos.

Profundizando en este último punto, a veces, lo secretado puede volverse a absorber, y en dicho caso no se hablaría de excreción sino de circulación entre la sangre y el fluido hacia el cual se pretendió eliminar. El proceso más ampliamente reconocido en farmacología es la recirculación entero-hepática, donde el intestino y el hígado son los órganos entre los cuales la droga estaría circulando. La bilis, conteniendo ácidos y sales biliares, es formada y secretada por el hígado, pudiendo incluso almacenarse en vesícula biliar, para luego alcanzar el intestino al verse al conducto biliar. Si un fármaco presenta excreción biliar, podría reabsorberse al secretarse hacia intestino⁸. Existen casos en los que la baja tasa de excreción biliar que presenta el fármaco, no logra explicar la aparición de segundos picos en los perfiles de concentración plasmática. Habiéndose descartado otras posibles explicaciones, por ejemplo, al administrar el

fármaco por vía intravenosa, desacreditando aquellos factores relacionados a la disolución o absorción del fármaco, se postulan otros trayectos de recirculación.

Un trayecto de recirculación de fármaco podría ser a través del jugo gástrico, en donde partiendo desde la sangre, alcanzaría dicho fluido para luego ingresar al medio interno desde la luz intestinal cuando el mismo se vacíe desde el estómago tras la apertura del píloro. Otro podría ser utilizando el jugo pancreático. El jugo pancreático es secretado a través del ducto pancreático que se conecta con el hepático inmediatamente antes de vaciar su contenido hacia el duodeno. Una vez en el duodeno, el fármaco acumulado en el jugo pancreático se encontraría disponible para reabsorberse y volver a la circulación sanguínea. Varios mililitros de ambos jugos son vertidos en pocos minutos hacia el tracto gastrointestinal, activados esencialmente por la llegada de alimentos al estómago y al intestino, respectivamente ^{8, 9, 10, 11}.

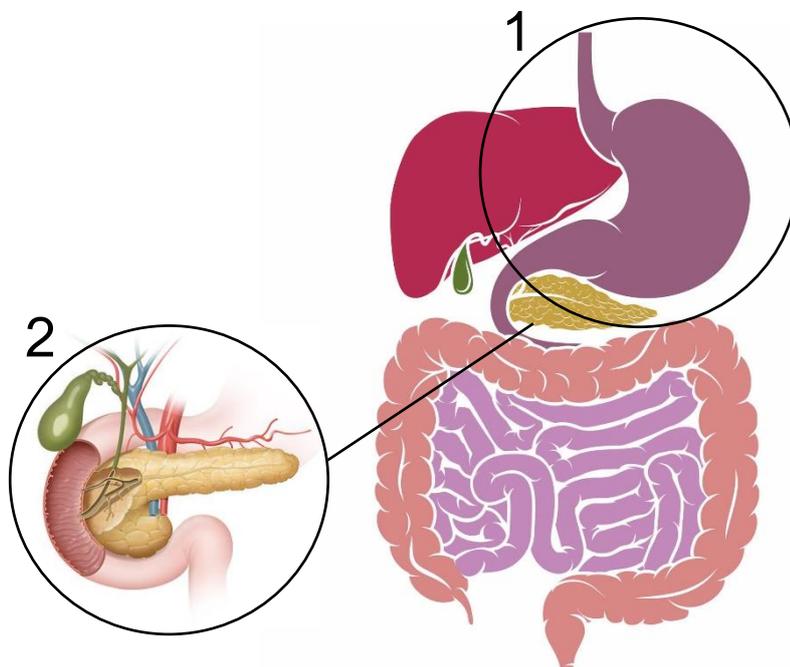


Figura 1.1. Recirculación plasma-tracto gastrointestinal- plasma a través de jugo gástrico (1) y jugo pancreático (2). Ambos jugos son secretados hacia duodeno, en respuesta a la llegada de alimentos al estómago y al intestino, respectivamente, desde donde el fármaco acumulado en dichos fluidos puede volver a ingresar a circulación sanguínea.

Más circuitos podrían describirse, en base a los fluidos salivales e intestinales, pero los que tendrían una especial relevancia serían los anteriormente descritos, por la distancia del recorrido, por la abundancia del jugo secretado, por las circunstancias que acompañan sus secreciones, y por las características fisicoquímicas de tales fluidos. En lo que sigue, llamaremos circulación plasma – tracto gastrointestinal – plasma (P-TGI-P), concerniendo tanto el estómago como el páncreas en sus funciones de secreción externa.

Estos trayectos adquieren relevancia en moléculas ionizables dado el pH que posee cada uno de estos fluidos. Existe un gradiente importante de pH entre ambos y el plasma (pH 7,4). De este modo, las drogas básicas preferirán la transferencia desde el plasma hacia

el jugo gástrico de pH entre 1,2 y 2,3, para luego verse impedido su retorno a plasma por ionización a este pH ácido. En tanto las drogas ácidas, desde el plasma hacia el jugo pancreático de pH 8 aproximadamente ^{9,12}.

Detección de procesos de circulación plasma- tracto gastrointestinal- plasma

El ingreso de sustancias se conduce normalmente por una vena, la cual desemboca finalmente en la vena cava inferior si dicha absorción tuviera lugar desde el tracto gastrointestinal, y tras fluir por la pequeña circulación (corazón-pulmón), asomarán luego por todas las arterias de la gran circulación. Al arribar a los capilares que alimentan los tejidos de los diferentes órganos se produce una importante extravasación, haciendo que su llegada al otro extremo del capilar provoque una tenue carga de moléculas sobre las ya existentes en la sangre venosa. De esta forma se explica por qué los perfiles de concentraciones plasmáticas arteriales en función del tiempo detectan con mucha mayor sensibilidad cualquier ingreso de fármaco que lo que hacen las correspondientes concentraciones venosas. Entonces, aunque un fármaco circule a través de los fluidos mencionados, no se originarán necesariamente modificaciones perceptibles en el perfil de concentraciones plasmáticas. Así es que la saliva adquiere importancia en la detección de proceso de recirculación dada, como ya se mencionó anteriormente, la posibilidad de relacionar las concentraciones a este nivel con las concentraciones que se encuentran a nivel arterial ^{13,14, 15}.

Fármacos estereoisómeros

Algunos fármacos son en realidad una mezcla de isómeros ópticos. Los isómeros son moléculas idénticas que difieren en su configuración espacial. Entre tales, algunos poseen propiedades básicas, y otros, ácidas. Los estereoisómeros, si bien poseen las mismas características ácido-base, así como otras propiedades físico-químicas, pueden diferir en su farmacocinética y farmacodinamia.

Las diferencias farmacocinéticas entre los isómeros pueden encontrarse en su absorción, por ejemplo, presentando diferentes biodisponibilidades por diferenciada afinidad por transportadores de eflujo, o en su distribución, como puede ser el caso de isómeros que presenten tasas de unión a proteínas plasmáticas desiguales, o en su eliminación, metabolizándose a través de diferentes enzimas ^{16,17}. Es interesante consignar que, en algunos casos, un posible producto de la biotransformación sería precisamente el enantiómero opuesto, o sea, su inverso quiral. Esta inversión puede ser uni o bidireccional. La inversión ocurre presistémicamente en intestino y sistémicamente en intestino e hígado. Se ha demostrado que cuanto más tiempo resida en el cuerpo un isómero, más oportunidades tendría de invertirse quiralmente, dado que más tiempo tendría para ser biotransformado ¹⁸.

En cuanto a su farmacodinamia, existen casos en los que la actividad farmacológica de los isómeros no es la misma, pudiendo ser ambos isómeros activos o uno activo y otro inactivo o incluso tóxico. También ocurre que uno de los isómeros podría interferir en la actividad de su inverso quiral o ser su administración simplemente innecesaria ^{16, 17}.

Dados los variados perfiles de eficacia y seguridad que pueden presentar los isómeros, la administración y el análisis farmacocinético de los isómeros por separado es relevante.

Sin embargo, aunque pudiera existir un beneficio en la terapia estereoselectiva, la mayoría de los fármacos estereoisómeros comercializados actualmente se suministran como mezclas racémicas dada la complejidad y el costo de la separación de los mismos.

Objetivos de la tesis

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la circulación P-TGI-P de moléculas ácidas y básicas, que a su vez presenten estereoisomería. No sólo profundizar y cuantificar el proceso de recirculación, sino también investigar si dicho proceso incide de modo significativo en la inversión entre los isómeros.

Establecer el grado de inversión tras cada reabsorción, podría abrir interesantes perspectivas terapéuticas con variado perfil de eficacia y seguridad de los tratamientos con fármacos estereoisómeros ionizables. Quizás la terapéutica con estos fármacos podría mejorarse con sólo adecuar de modo estratégico las comidas, durante el intervalo de administración. La industria farmacéutica podría beneficiarse de esta investigación para la elección de la tecnología a utilizar en la producción de formas farmacéuticas, con el fin de lograr el patrón de liberación que mejor se ajuste a las propiedades del fármaco, de manera de favorecer la relación apropiada entre los isómeros.

Con este objetivo se eligieron fármacos utilizados en terapia del dolor, algunos pertenecientes a la familia química de ácidos aril-propiónicos (antiinflamatorios no esteroideos) y un opioide.

Fármacos Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos son un grupo de medicamentos ampliamente utilizados como analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos al inhibir la síntesis de prostaglandinas por bloqueo de la enzima ciclooxigenasa 2. Esta enzima convierte el ácido araquidónico en endoperóxidos cíclicos que luego se transforman en prostaglandinas y tromboxanos que actúan como mediadores inflamatorios activando los nociceptores terminales.

Las prostaglandinas actúan protegiendo la mucosa gástrica al inhibir la secreción gástrica y estimulan la formación de mucus. De aquí deriva su efecto adverso más frecuente: irritación del tracto gastrointestinal. Los efectos secundarios gastrointestinales más frecuentes son esofagitis, úlceras, gastroduodenitis, lesiones tóxicas, indigestión y diarrea. También puede afectar los niveles plaquetarios ocasionando problemas de coagulación. Son considerados nefrotóxicos, al provocar lesiones características en el riñón que pueden desembocar en síndrome nefrótico o insuficiencia renal aguda con el uso crónico.

Para el tratamiento del dolor agudo pueden administrarse por vía intravenosa o vía oral. Se comercializan tanto presentaciones orales de rápido inicio de acción (cápsulas de gelatina blanda) como presentaciones de liberación modificada. Los AINES presentan buena biodisponibilidad por vía oral. Dado el aumento gradual de pH que ocurre a nivel intestinal, las moléculas de características ácidas, al ionizarse a pH básico y perder su capacidad de transferencia a través de las membranas celulares, pueden presentar una

ventana de absorción estrecha. En el caso de los AINES, como los valores de pKa no son extremos, se consigue una absorción prácticamente completa luego de su administración oral de una formulación de liberación inmediata.

Presentan una elevada unión a proteínas plasmáticas y una buena distribución por difusión pasiva pH dependiente, así como gran liposolubilidad. La semivida de eliminación de los AINES es muy variable según el fármaco. Se metabolizan a nivel hepático, por las enzimas CYP3A4, CYP2C19 y CYP2C9, o bien directamente ocurre la glucuronidación ^{19, 20}.

Algunos de estos fármacos presentan un carbono quiral (derivados del ácido arilpropiónico). En este grupo de fármacos se incluyen: Ibuprofeno, Ketoprofeno, entre otros.

El isómero activo es el isómero S, aunque en la clínica se administra como racemato. Es interesante mencionar que una de las rutas de metabolización es la inversión quiral, la conversión de un isómero en su isómero opuesto.

El proceso de inversión procede vía un tioéster intermediario de acil-CoA, que puede sufrir tanto inversión quiral alrededor del carbono alfa como hidrólisis. Se detectó actividad de tioéster sintetasa en mitocondrias y microsomas, mientras que la actividad isomerasa e hidrolasa fue hallada en citoplasma y mitocondria. Parece existir una enzima acil-CoA racemasa, pero la naturaleza del intermediario de racemización sigue siendo objeto de discusión. No debe excluirse, la posibilidad de que la inversión quiral sea de naturaleza química y no enzimática ya que los protones del carbono ubicado en posición alfa respecto del grupo carbonilo de un éster acil-CoA son altamente ácidos.

In vitro se ha determinado que tanto el isómero R(-)-CoA como el S(+)-CoA sufren racemización e hidrólisis al ser incubados con homogenatos de hígado de rata. Sin embargo, sólo el isómero R(-) fue convertido enzimáticamente a tioéster. Esto indica que la inversión quiral es unidireccional ^{21, 22}.

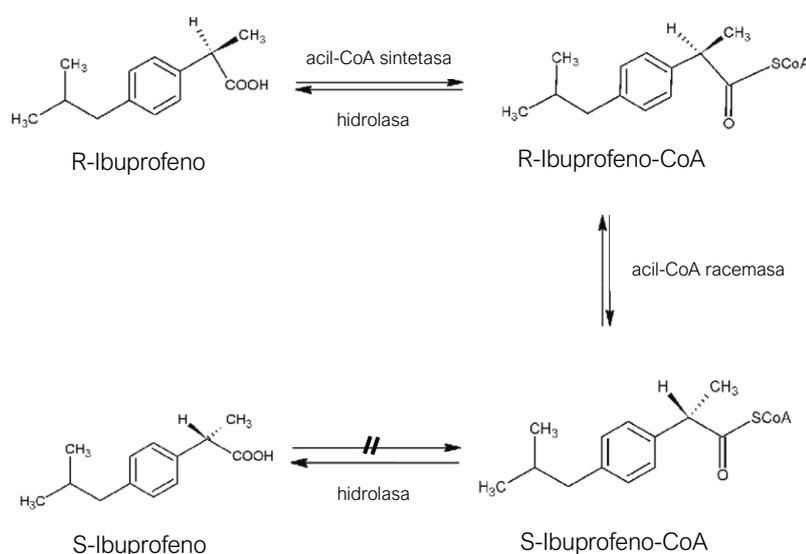


Figura 1.2. Mecanismo de inversión quiral de los antiinflamatorios no esteroides ejemplificado para Ibuprofeno.

También se ha demostrado la unidireccionalidad de la inversión *in vivo*. En un estudio se administró vía oral una dosis única de 300 mg de S-Ibuprofeno, detectándose en plasma únicamente este isómero. Sin embargo, al administrarse una dosis oral única de 300 mg de R-Ibuprofeno, se detectan ambos isómeros en plasma. Por último, al administrarse una dosis única de 600 mg de la mezcla racémica vía oral, se detectan ambos isómeros, siendo el área bajo la curva para el isómero S mayor que la obtenida tras la administración de la misma dosis del isómero S puro ²¹.

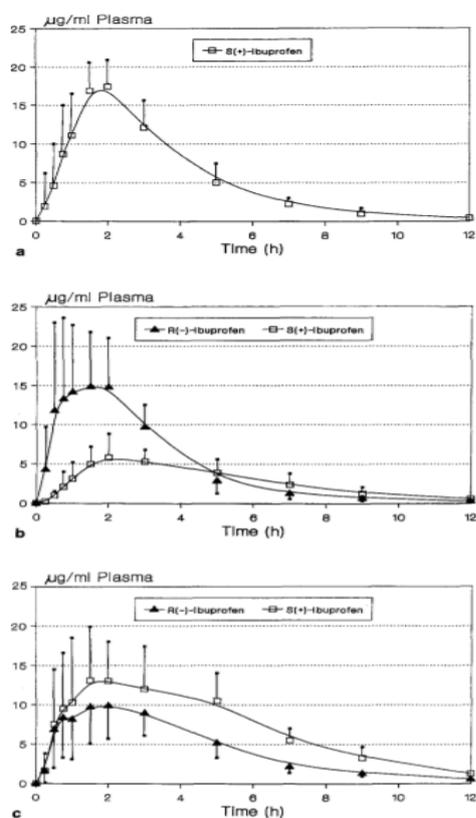


Figura 1.3. Inversión quiral *in vivo* de Ibuprofeno. Perfil medio (n=11) obtenido tras la administración de: a) una dosis oral única de 300 mg de S-Ibuprofeno, b) una dosis oral única de 300 mg de R-Ibuprofeno, c) una dosis oral única de 600 mg de la mezcla racémica.

La enzima responsable de la inversión se encuentra mayormente en hígado. Sin embargo, el mecanismo bioquímico involucrado en la conversión de isómeros ópticos de ácidos carboxílicos comparte algunos pasos de la biosíntesis de triglicéridos al interior de los enterocitos ¹⁸. Esta biosíntesis de triglicéridos ocurre en la primera porción del intestino delgado ²³ durante el normal proceso de la digestión de grasas, por lo que podría inferirse que la bioconversión estuviera también allí localizada ¹⁸. También puede encontrarse la enzima en otros tejidos como riñones, glándulas salivales, y páncreas. ²⁴

El tiempo de residencia en el tracto gastrointestinal influye sobre este proceso, reforzando el concepto de que la bioconversión ocurriría en alguna porción específica del intestino. Se ha referenciado que la conversión de R en S tendría directa relación con la velocidad a la cual se absorbe el fármaco, cuánto más lento se absorba mayor sería la conversión ^{25, 26, 27}. Sin embargo, sistemáticamente se observa que el fenómeno coincide también con la ingesta de comida, tanto en los medicamentos de liberación inmediata como en los de liberación prolongada.

Ketoprofeno

El Ketoprofeno (pK_a 4,5²⁸) es un potente antiinflamatorio no esteroideo rápidamente absorbido. Su eliminación ocurre principalmente mediante metabolización y posterior excreción urinaria como conjugado de ácido glucurónico²⁹.

El Ketoprofeno presenta un centro quiral. Los isómeros presentan diferente afinidad por la albumina lo que puede explicar el mayor clearance que presenta el isómero S^{29,30}.

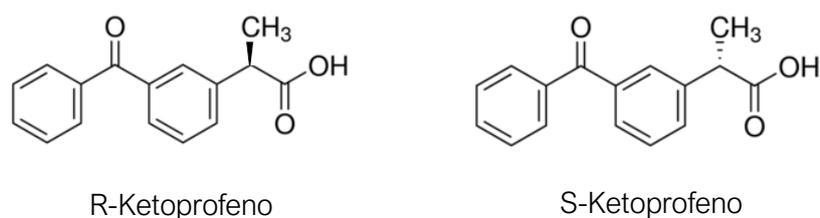


Figura 1.4. Estructura química de los isómeros de Ketoprofeno.

Una de las posibles rutas de metabolización del Ketoprofeno es la conversión del isómero R en S³¹. Para Ketoprofeno se reportó sólo un 10 % de conversión entre isómeros luego de una administración oral^{30,32}. Este porcentaje aumenta con la disminución de la función renal debido a la regeneración de la aglicona a partir del conjugado glucurónico del fármaco, que se acumula, aumentando la inversión del isómero R. Debido al incremento en la producción del isómero S, producto de la enfermedad renal, su semivida es mayor que la del isómero R. Otra posible explicación, es que al verse impedida la eliminación del conjugado glucurónico por vía renal, se vean favorecidas otras vías de excreción, como la biliar o la pancreática y que ocurra la inversión tras la secreción de estos fluidos al duodeno³³.

No se encontró mención de la recirculación de Ketoprofeno a través de jugo pancreático/intestinal cuando sí se ha referenciado el fenómeno para otros fármacos ácidos débiles.

Ibuprofeno

Es prácticamente insoluble en agua y presenta alta liposolubilidad. Es un ácido débil de pK_a comprendido entre 4,9 y 5,3³⁴. La absorción oral de Ibuprofeno es rápida y completa, obteniéndose la concentración plasmática máxima a la hora o a las dos horas aproximadamente. Se une extensamente a proteínas plasmática (99%). Se elimina de manera rápida mayormente mediante metabolización y posterior excreción del conjugado de glucurónico. En menor medida se excreta incambiado en orina³⁵.

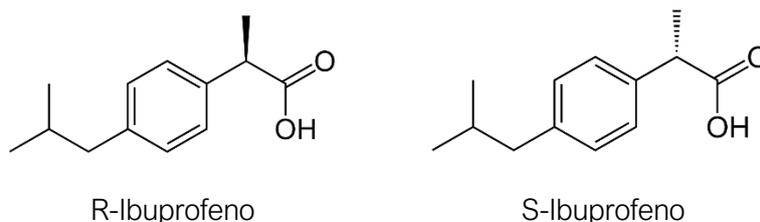


Figura 1.5. Estructura química de los isómeros de Ibuprofeno.

Aproximadamente un 63% de la dosis sufre inversión unidireccional del isómero R en S. Los parámetros farmacocinéticos difieren entre los isómeros. La semivida de eliminación aparenta ser similar en ambos (1.8 - 2.0 horas), sin embargo, debido a que el isómero S se forma en gran extensión desde el isómero R, su verdadera eliminación queda enmascarada por la eliminación de su precursor ^{36, 37}.

Fármacos opioides

Un opioide es un fármaco que se une a receptores opioides situados principalmente en el sistema nervioso central y, en otros tejidos como los del tracto gastrointestinal. Se utilizan por su gran potencia analgésica.

En nuestro país, se desalienta el uso de opioides debido al riesgo de generar tolerancia y dependencia con el uso crónico de estos fármacos cuando son un grupo de fármacos de gran utilidad. El desconocimiento constituye una barrera para lograr el ajuste adecuado del tratamiento y para la obtención de resultados satisfactorios.

Dentro de los analgésicos opioides, la metadona se destaca por sus múltiples mecanismos de acción, que no sólo permiten ampliar su indicación a pacientes con dolor neuropático, si no que atenúan el desarrollo de tolerancia y dependencia. Además, al presentar una larga semivida de eliminación, el síndrome de abstinencia es mucho menos intenso del que se observa durante el tratamiento con otros opioides.

Metadona

La Metadona, un agonista opioide sintético, se ha utilizado a nivel mundial para la estabilización y mantenimiento de pacientes con desórdenes adictivos, ampliando su espectro en los últimos años para el tratamiento del dolor crónico ³⁸.

Es un agonista de los receptores opioides μ de acción prolongada y de los receptores δ ³⁹. Además, es un antagonista no competitivo de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) y es un potente inhibidor de la receptación de serotonina y noradrenalina ^{40, 41}. La activación del receptor NMDA contribuye a la generación de hiperalgesia en las neuropatías y durante la inflamación. Además, este receptor se encuentra involucrado en el desarrollo de tolerancia al efecto analgésico de los opioides y en la dependencia opioide. Por lo tanto, el antagonismo sobre los receptores de NMDA no solo contribuye al efecto antinociceptivo de la metadona, sino que puede prevenir o atenuar el desarrollo de tolerancia y los síndromes de abstinencia ^{42, 43}.

La Metadona posee un carbono asimétrico y se comercializa como la mezcla racémica de los dos enantiómeros. La estereoselectividad de los receptores opioides μ es conocida y el enantiómero (R)- presenta una afinidad 10 veces mayor que el enantiómero S, siendo el primero 50 veces más potente y el responsable de la mayoría, si no todo, el efecto opioide de la Metadona ^{39, 44}. Sin embargo, ambos isómeros poseen similar afinidad por el sitio no competitivo del receptor NMDA. Entonces, aunque el isómero S posee poca o nula actividad opioide, puede potenciar el efecto analgésico opioide del isómero R ^{45, 46}.

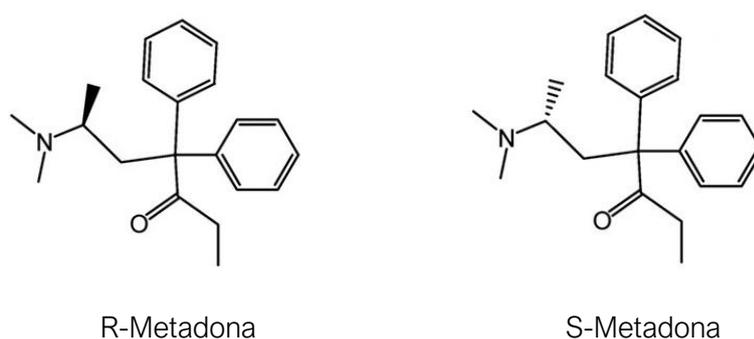


Figura 1.6. Estructura química de los isómeros de Metadona.

Los efectos adversos que se observan más frecuentemente son náuseas, vómitos, constipación, sudoración, mareos, aturdimiento y sedación. En la práctica clínica, el tratamiento con metadona se acompaña con la indicación de antieméticos en las primeras dosis. Ocasionalmente puede ocurrir depresión respiratoria, euforia, disforia, sequedad de boca, espasmos del tracto gastrointestinal, hipotensión postural, síncope, taquicardia o bradicardia, retención urinaria, prurito y aturdimiento ⁴⁷.

Se absorbe rápidamente tras la administración oral y está sujeta a un importante metabolismo de primer paso tras dosis múltiple (se referencia también como sustrato de la glicoproteína-P). La biodisponibilidad oral se encuentra entre 70 y 80%, siendo similar para ambos enantiómeros. Debido a su naturaleza lipofílica, la metadona presenta una importante distribución hacia los tejidos, lo que se ve reflejado en su gran volumen de distribución. Se encuentra extensamente unida a las proteínas plasmáticas, entre un 60 y 90 %. Debido a sus propiedades básicas (pKa de 8,3), se une principalmente a la alfa-1-glicoproteína ácida (AGA) pero también se une en una menor extensión a la albúmina y la globulina ^{48, 49}.

La semivida de eliminación es de 20-35 horas. La principal ruta de eliminación es la biotransformación oxidativa a nivel hepático e intestinal. Las isoenzimas involucradas son CYP3A4, CYP2B6, CYP2C19 y en menor extensión CYP2D6. El principal metabolito es el 2-etilindien-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP), el cual es inactivo. Este metabolito se forma por N-desmetilación, con posterior ciclación que ocurre de forma espontánea. Las isoenzimas involucradas en la N-desmetilación y por ende en la formación de este metabolito son CYP3A4 (no estereoselectiva) y CYP2B6 (estereoselectiva hacia el enantiómero S), aunque también podrían estar involucradas

las isoenzimas CYP2C19 y CYP2D6 (ambas estereoselectivas hacia el enantiómero R). Teniendo en cuenta la falta de especificidad de los inductores e inhibidores enzimáticos hacia la CYP3A4, se ha sugerido que posiblemente esta isoenzima desempeñe un rol minoritario en el metabolismo *in vivo* de la Metadona, siendo la CYP2B6 quien desempeñe un rol predominante ^{50, 51, 52}.

La Metadona presenta efecto auto inductivo sobre su metabolismo. Se ha referenciado que el clearance de metadona puede aumentar en 3,5 veces desde la primera dosis hasta la situación de estado estacionario en individuos adictos a opioides. También la literatura cita diferencias en la semivida de eliminación tras la administración de una dosis única (54,8 horas) y el tratamiento crónico (22,5 horas). Este aumento en el clearance tiempo dependiente es consistente con una inducción de la CYP3A4 y/o del transportador de eflujo ^{48, 53, 54}.

También puede ser eliminada por excreción renal y fecal, al igual que sus metabolitos. La Metadona que es filtrada a nivel del glomérulo, puede ser reabsorbida a nivel de los túbulos renales y como consecuencia de su naturaleza básica (pKa de 8,3) este proceso es pH dependiente. Cuando el pH de la orina es mayor a 6, la excreción renal no constituye una importante ruta de eliminación (4% del clearance total). Sin embargo, cuando el pH de la orina es menor a 6, la excreción renal puede representar el 30% del clearance total ^{39, 49}.

Se han recuperado cantidades significativas de Metadona en jugo gástrico. En un estudio en voluntarios sanos se recuperó aproximadamente el 2% de la dosis administrada en las 8 horas post dosis, mientras que en adictos en recuperación el porcentaje ascendió hasta un 7%. Se ha observado la aparición de segundos picos en los gráficos de concentraciones plasmáticas y salivales tras la administración de este fármaco, lo que parecería evidenciar procesos de recirculación plasma- tracto gastrointestinal- plasma a través de fluido gástrico. La baja recuperación de Metadona en bilis no sería suficiente para explicar el fenómeno ^{55, 56, 57}.

La Metadona presenta farmacocinética estereoselectiva resultando en semividas de eliminación diferentes para (R)- y (S)-metadona, siendo la del isómero (R)- más prolongada que la del isómero (S)-. Además, los dos enantiómeros presentan diferencias en la distribución y eliminación. En un estudio con pacientes con dolor crónico se evidenciaron al encontrarse diferencias en parámetros como el volumen de distribución (496,6 L y 289,1 L para (R)- y (S)-metadona, respectivamente) y los clearance totales (0,158 y 0,129 L/min para (R)- y (S)-metadona respectivamente). Existen también diferencias en la fracción libre, siendo 0,13 y 0,10 para (R)- y (S)-metadona, respectivamente ⁵⁴.

Metodología general

Se realizaron ensayos en voluntarios sanos en el Centro de Evaluación de Biodisponibilidad y Bioequivalencia de Medicamentos de la Universidad de la República (CEBIOBE), sito en el Hospital Español "Dr. Juan José Crottogini", administrándose formulaciones autorizadas por el Ministerio de Salud Pública.

Los voluntarios fueron sometidos a protocolos en los que se establecieron objetivos y diseño experimental de los estudios, criterios de reclutamiento, entre otras cosas. Se estandarizó la ingesta de comida al momento de la administración y durante el período de seguimiento de los perfiles de concentración de fármaco. El protocolo fue diseñado de acuerdo a guías sobre investigación clínica y fue aprobado por la Comisión de ética en la investigación con seres humanos de la Facultad de Química, UdelaR. Se obtuvo un consentimiento informado para cada voluntario previo a su ingreso al estudio. Los ensayos fueron de libre deserción.

Se monitorearon las concentraciones plasmáticas, salivales y/o urinarias a lo largo del tiempo. Se realizó la determinación de los fármacos mediante Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC-Dionex® Ultimate 3000 Series) con detector UV, utilizando columnas quirales que permitieron la cuantificación separada de los isómeros. El desarrollo, validación y aplicación de técnicas analíticas constituyó gran parte del trabajo experimental de la presente tesis.

Los ensayos *in vitro* mediante aparato de disolución marca Distek (Dissolution System 2100C), tipos I y II de la farmacopea norteamericana, fueron también realizados en el CEBIOBE. Durante una pasantía en la Universidad de Bath se completaron los ensayos *in vitro* en aparato de flujo continuo (Sotax CE 7 smart), tipo IV de la farmacopea norteamericana.

Capítulo 2: Farmacocinética estereoselectiva de Ketoprofeno tras la administración oral de formulaciones de liberación modificada bajo diferentes condiciones de administración

Objetivos del estudio

El objetivo del estudio fue identificar el proceso de recirculación de Ketoprofeno y estudiar su impacto en la inversión quiral del isómero R.

Metodología

Fase clínica

Dieciséis voluntarios sanos (8 mujeres y 8 hombres) de entre 19 y 41 años de edad con un peso medio (\pm DE) de 64 (\pm 14) y 75 (\pm 13) kg, respectivamente, participaron de un estudio de bioequivalencia entre una formulación gastro resistente (liberación retardada, LR) (Referencia) y una formulación bicapa (liberación inmediata + liberación prolongada, LI+LP) (Test) conteniendo Ketoprofeno, con fines de registro sanitario.

Se administró un comprimido del producto Referencia (100 mg, Ketofen®, Laboratorio Roemmers, Montevideo, Uruguay) y un comprimido del producto Test (150 mg (75 mg LI + 75 mg LP), Bi-Ketofen®, Laboratorio Roemmers, Montevideo, Uruguay) junto con 100 mL de agua, bajo condiciones de ayuno y con comida, en un estudio cruzado y compensado de cuatro períodos. El período de lavado (*washout*) fue de una semana. El protocolo mediante el cual fue llevado a cabo el estudio fue diseñado de acuerdo a guías sobre investigación clínica y fue aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Química. Se obtuvo un consentimiento informado para cada voluntario previo a su ingreso al estudio. El estudio se realizó en el CEBIOBE.

Fase analítica

Se tomaron muestras de sangre de la vena anticubital mediante cánula hacia un tubo heparinizado. Las muestras fueron tomadas a las 0 (previo a la administración de la dosis) y a las 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 y 28 horas post dosis. Se separó el plasma por centrifugación y fue almacenado a -25°C hasta su análisis. La preparación de muestra consistió en extracción del Ketoprofeno con una mezcla de Hexano y Acetato de Etilo desde 1,0 mL de plasma acidificado, evaporación de la fase orgánica en baño seco bajo corriente de nitrógeno y reconstitución del residuo seco con fase móvil. Se utilizaron 50 μL de una solución de Fenobarbital (400,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como estándar interno. La cuantificación del fármaco se realizó mediante un método quiral validado de HPLC UV que fue una adaptación de un método previamente publicado ^{58, 59}. La fase móvil consistió en un buffer acetato con 1% trietilamonio a pH 5,0 y Metanol en una proporción de 95:5. El flujo de fase móvil fue de 1 mL/min. Se usó una columna de fase estacionaria quiral (CHIROBIOTICS® T, 5 μ , 15 cm x 4,6 mm) con guarda columna de sílica. El detector midió a 220 nm por 7,0 min con un posterior cambio de longitud de onda a 260

nm. El análisis fue llevado a cabo a 40°C y el volumen de inyección fue de 40 µL. El límite inferior de cuantificación fue de 0,050 mg/L y se probó linealidad hasta 7,20 mg/L. Para concentraciones localizadas en las porciones bajas, medias y altas de la curva de calibración, se obtuvieron coeficientes de variación intra- e inter-día (precisión) y errores relativos (exactitud) por debajo de 14%.

Fase estadística

Se construyeron perfiles medios de concentración plasmática de Ketoprofeno en función del tiempo luego de la administración oral de ambas formulaciones tanto en ayuno como con comidas. El tiempo de latencia (T_0) corresponde al tiempo de muestreo experimental que antecede a la primera concentración cuantificable.

Se determinó la media de la máxima concentración experimental de Ketoprofeno en plasma ($C_{MÁX} \pm DE$) y la mediana del tiempo en que se alcanzó la misma ($T_{MÁX}$ y rango) para cada enantiómero en ambos sexos. También se calculó la media del área bajo la curva de concentración vs tiempo, desde 0 (o T_0) hasta el tiempo de la última concentración cuantificable (T) ($AUC_T \pm DE$). Se calculó el AUC_T para cada voluntario utilizando la regla de los trapecios. Se compararon mediante test t-student, no pareado y pareado, las medias de AUC_T y $C_{MÁX}$ entre hombres y mujeres, y entre la administración en ayuno y con comida para cada formulación, respectivamente. Un test T-Wilcoxon fue utilizado para evaluar la influencia del modo de administración y de la formulación sobre T_0 y $T_{MÁX}$ para ambos sexos, dado que se asumió distribución no normal de los mencionados parámetros.

Además, se calculó el cociente de concentraciones S/R medio a cada tiempo de muestreo como un indicador de la tasa de conversión del isómero R en S. El cociente S/R es igual a uno cuando la concentración de los isómeros es la misma. Se evaluó la diferencia entre ese cociente y el valor 1 mediante test t-student. Se comparó también, el cociente S/R medio previo y posterior a la ingesta de comidas mediante test t-student.

En todos los casos, el nivel de significación considerado fue de 0,05 (informando diferencias cuando el error tipo 1 está debajo de 0,05).

Resultados y discusión

En la Figura 2.1. se muestra, a modo de ejemplo, un cromatograma obtenido tras la determinación de Ketoprofeno mediante el método de HPLC-UV quiral desarrollado y validado.

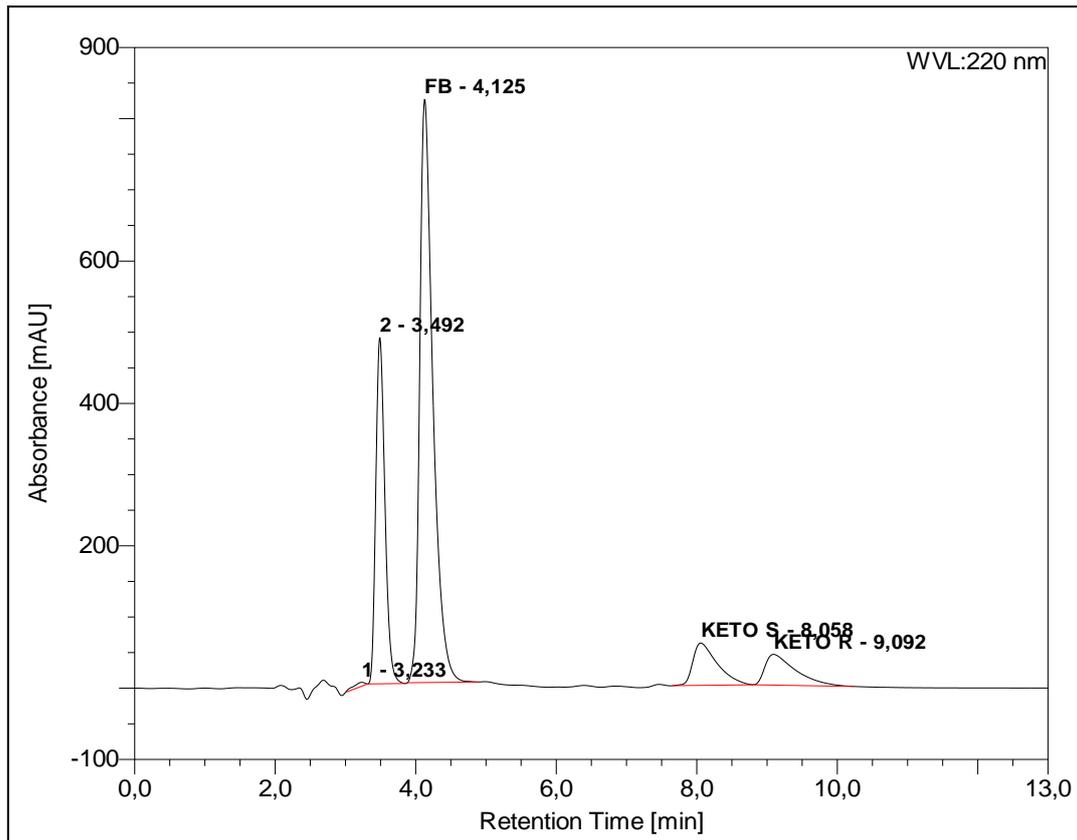


Figura 2.1. Cromatograma correspondiente a la determinación de Ketoprofeno en plasma para la muestra del voluntario 4 tras la administración del producto Test en ayuno, obtenida a las 8 horas post dosis.

En la Tabla 2.1 se resumen los parámetros farmacocinéticos obtenidos luego de la administración oral de la formulación Test y la formulación Referencia bajo ambos modos de administración en hombre y mujer.

	T _{MAX} (h) (rango)		C _{MAX} (mg/L) ± DE		AUC _T (mg.h/L) ± DE		Cociente S/R AUC _T ± DE
	S	R	S	R	S	R	
Test							
Mujeres							
Comida	1.5 (0.5-6.0)	1.5 (0.5-6.0)	2.70 ± 1.03	2.85 ± 1.01	13.5 ± 3.29	14.6 ± 2.92	0.92 ± 0.09
Ayuno	1.0 (0.5-3.0)	1.0 (0.5-3.0)	4.26 ± 1.16	4.69 ± 1.22	13.9 ± 2.37	15.6 ± 2.40	0.89 ± 0.03
Hombres							
Comida	2.2 (1.0-4.0)	2.5 (1.0-4.0)	2.41 ± 0.33	2.67 ± 0.41	12.3 ± 2.19	13.9 ± 1.92	0.89 ± 0.14
Ayuno	0.75 (0.5-1.5)	1.0 (0.5-1.5)	4.17 ± 0.80	4.53 ± 1.03	13.4 ± 2.08	14.8 ± 2.70	0.91 ± 0.07
Referencia							
Mujeres							
Comida	2.0 (2.0-2.0)	2.0 (2.0-2.0)	4.09 ± 1.99	4.26 ± 1.96	10.7 ± 4.73	10.9 ± 4.42	0.98 ± 0.09
Ayuno	2.0 (1.0-2.0)	2.0 (1.0-2.0)	3.56 ± 0.54	3.65 ± 0.63	10.9 ± 1.31	10.8 ± 0.80	1.01 ± 0.15
Hombres							
Comida	1.0 (1.0-4.0)	1.0 (1.0-4.0)	3.50 ± 1.21	3.77 ± 1.50	8.58 ± 1.23	8.73 ± 1.50	0.98 ± 0.10
Ayuno	1.0 (1.0-2.0)	1.0 (1.0-2.0)	4.33 ± 1.19	4.53 ± 1.15	8.42 ± 1.60	8.53 ± 1.65	0.99 ± 0.04

Tabla 2.1. Parámetros farmacocinéticos medios (± desviación estándar) obtenidos luego de la administración (con y sin comidas) de la formulación de liberación retardada gastro resistente (Referencia) y de la formulación bicapa de liberación inmediata + liberación prolongada (Test) en hombres y mujeres.

Las Figuras 2.2 y 2.3 muestran los perfiles medios de concentración plasmática en función del tiempo de la formulación Test de ambos isómeros en ambos sexos bajo ambos modos de administración.

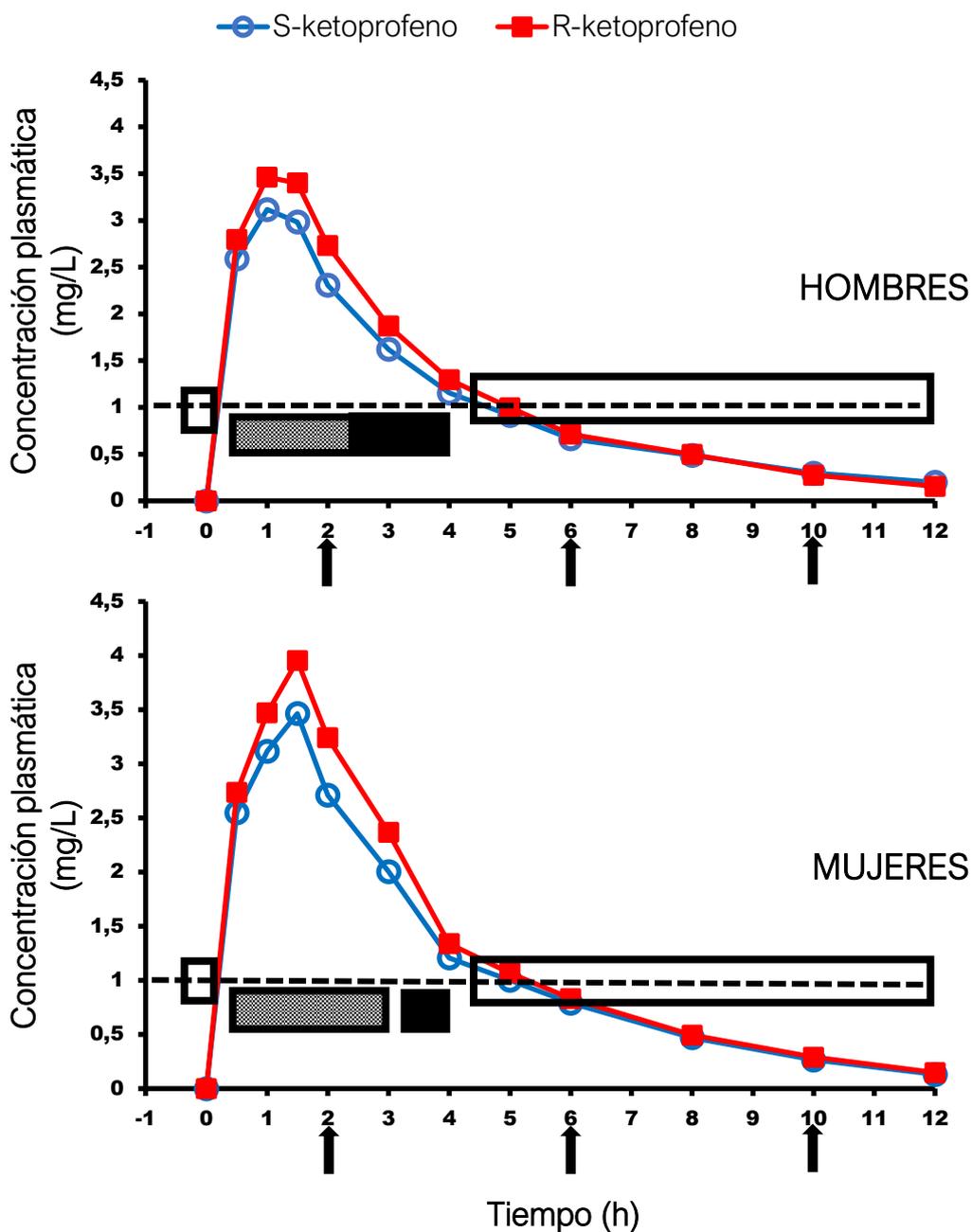


Figura 2.2. Concentración plasmática media de los isómeros R y S de Ketoprofeno obtenidas en 8 hombres y 8 mujeres, luego de la administración en condiciones de ayuno, de una formulación bicapa conteniendo 150 mg de racemato (75 mg LI + 75 mg LP). Las flechas indican la ingesta de comidas. La línea guionada indica el cociente S/R para iguales concentraciones de ambos isómeros. Los rectángulos mostrados denotan cocientes de concentración S/R no significativamente distintos de 1 (vacíos) y significativamente ($p < 0.05$ o $p < 0.01$, test t-student no pareado) por debajo de 1 (rellenos). Los rectángulos negros representan cocientes S/R significativamente mayores que los grises ($p < 0.01$, test t-student pareado).

LI: Liberación inmediata.

LP: Liberación prolongada.

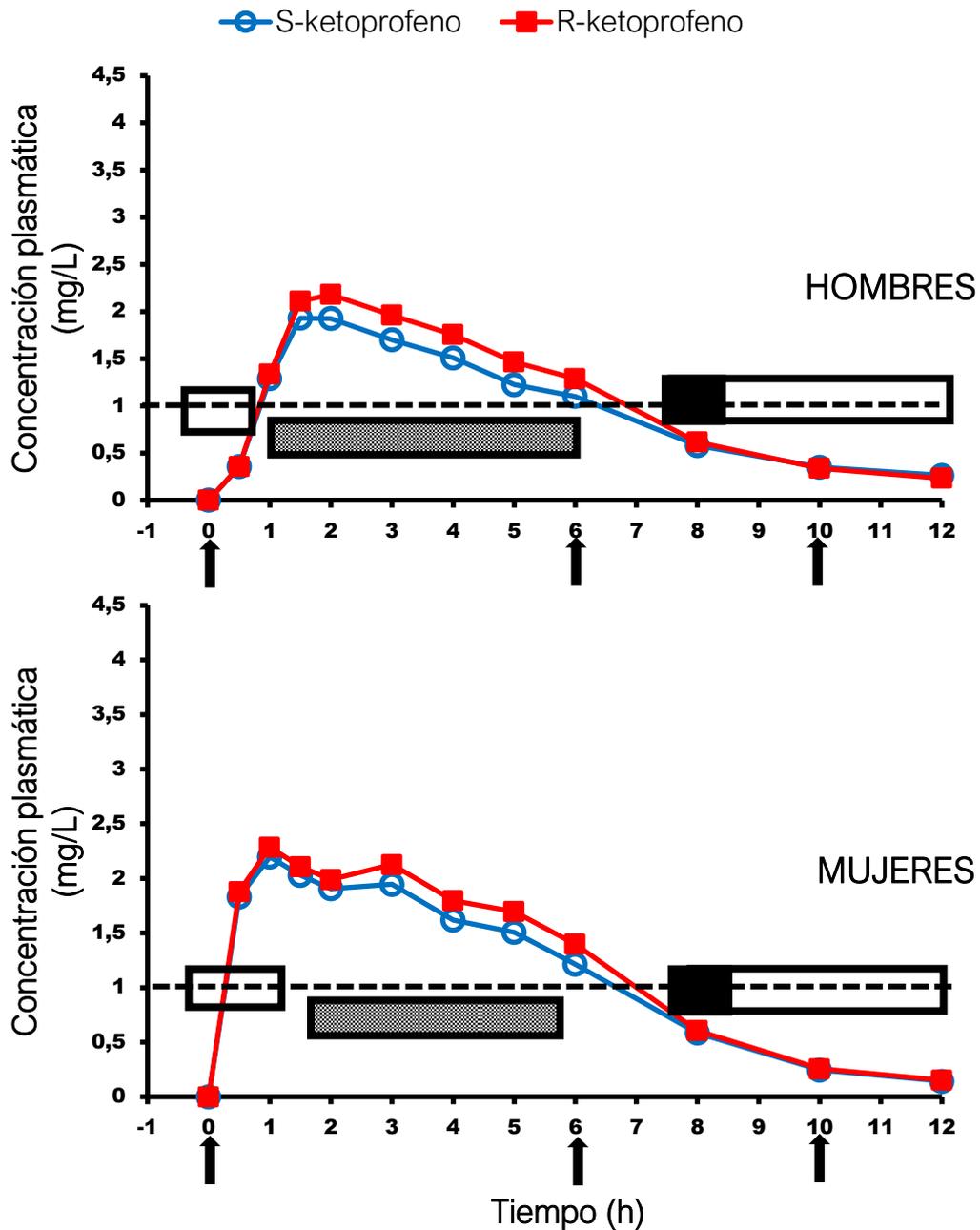


Figura 2.3. Concentración plasmática media de los isómeros R y S de Ketoprofeno obtenidas en 8 hombres y 8 mujeres, luego de la administración con comidas, de una formulación bicapa conteniendo 150 mg de racemato (75 mg LI + 75 mg LP). Las flechas indican la ingesta de comidas. La línea guionada indica el cociente S/R para iguales concentraciones de ambos isómeros. Los rectángulos mostrados denotan cocientes de concentración S/R no significativamente distintos de 1 (vacíos o rellenos de negro) y significativamente ($p < 0.05$ o $p < 0.01$, test t-student no pareado) por debajo de 1 (rellenos de gris). Los rectángulos negros representan cocientes S/R significativamente mayores que los grises ($p < 0.01$, test t-student pareado).

LI: Liberación inmediata.

LP: Liberación prolongada

Para la formulación Test, no se encontraron diferencias significativas entre el AUC_T obtenido para la administración en ayuno y con comidas, en ambos sexos. Sin embargo, el C_{MAX} en ayuno fue mayor ($p < 0,001$) respecto al obtenido para la administración con comidas (4,26 vs 2,70 mg/L y 4,17 vs 2,41 mg/L para el isómero S, y 4,69 vs 2,85 mg/L y 4,53 mg/L vs 2,67 mg/L para el isómero R, en mujeres y hombres respectivamente). El T_{MAX} fue menor ($p < 0,05$) luego de la administración en ayuno (1,00 h vs 1,50 h y 0,75 h y 2,25 h para el isómero S, y 1,00 h vs 1,50 h y 1,00 h vs 2,50 h para el isómero R, en mujeres y hombres respectivamente). Esto indicaría que la administración con comida no impactó sobre la cantidad de fármaco absorbido, pero sí sobre la velocidad de absorción, dando lugar a un retraso en el comienzo y un enlentecimiento de la absorción debido al efecto de la comida sobre el vaciamiento gástrico. Más adelante se profundizará sobre este aspecto cuando se comenten los resultados para el estudio de Ibuprofeno, en el que se mantuvo un ayuno total en una de las fases del estudio. Este hecho permitió una comparación más pura entre un sistema en ayuno y un sistema en el que se administran comidas sucesivas.

La formulación Test, tanto para la administración en ayuno como la con comidas, exhibió una disminución progresiva del cociente de concentraciones S/R luego de la administración de la dosis, revelando un mayor *clearance* aparente y una mayor velocidad de eliminación para el isómero S respecto al R. Luego de la administración con comidas de la formulación Test, se obtuvo un intervalo de tiempo significativamente más largo ($p < 0,05$) en el que el cociente S/R no se diferenciaba de 1 (1h en hombres y 1,5 h en mujeres) respecto a cuando la administración se realizó en condiciones de ayuno (0,5 h), evidenciando una vez más el retraso del pasaje de la formulación hacia el intestino debido a la administración conjunta del medicamento con una comida. Además, se evidencia el enlentecido vaciado gástrico que presentan las mujeres respecto a los hombres.

En las Figuras 2.2. y 2.3. se evidencia un aumento del cociente S/R ($p < 0,05$, test t-student pareado) luego de la ingesta de comidas a las 2 o 6 horas post dosis, respectivamente. Este aumento fue más rápido (1 h luego de la ingesta de la comida administrada a las 2 h post dosis en la administración en ayuno) y más pronunciado en hombres, alcanzando un valor de 1 o incluso un valor mayor desde las 5 a las 12 h post dosis para la administración en ayuno y desde las 8 a las 12 h post dosis para la administración con comidas. La ingesta de comidas a las 10 h post dosis mantuvo el cociente S/R por encima de 1 en hombres y cercano a 1 en mujeres, siendo este cociente mayor en hombres respecto a las mujeres ($p < 0,05$) a las 10 y 12 h post dosis.

Entonces, los perfiles de concentración-tiempo de Ketoprofeno en plasma luego de la administración de la formulación Test, no resultaron similares entre isómeros en ambos sexos y bajo ambos modos de administración. En algunas porciones de la curva, las concentraciones medias del isómero R fueron significativamente mayores que las del isómero S. Durante la fase inicial, cuando predomina la absorción, la concentración de ambos isómeros resultó similar en concordancia con la naturaleza racémica de la dosis administrada. Desde el tiempo de máxima concentración, cuando la absorción iguala a la disposición, el cociente S/R medio fue menor a 1, evidenciando una mayor tasa de

disposición del isómero S, lo que pone de manifiesto una baja conversión del isómero R en S para Ketoprofeno. Ya que no se referencia estereoselectividad en el metabolismo y excreción renal de Ketoprofeno, la menor tasa de unión a proteínas plasmáticas que presenta el isómero S podría explicar su más rápida distribución y eliminación desde el organismo ⁶⁰. Sin embargo, y luego de $T_{MÁX}$, cuando la disposición es el proceso predominante, los niveles de R y S parecen igualarse tras la ingesta de comidas (desde las 5 h luego de la administración en ayuno (Fig. 2.2) y desde las 8 h luego de la administración con comidas (Fig. 2.3)), tanto en hombres como en mujeres. Si no hubiese ningún evento de reabsorción durante la fase de disposición, el cociente de concentraciones S/R debería continuamente disminuir de acuerdo a las diferentes velocidades de eliminación entre isómeros.

Como se mencionó en la Introducción, el Ketoprofeno puede secretarse hacia el tracto gastrointestinal (vía jugos vertidos al duodeno) y entonces serían posibles las reabsorciones. Una posible explicación podría ser que S volviera al medio interno en mayor cantidad que R, dada la mayor tasa de secreción que le proporciona su menor unión a la albúmina. Sin embargo, cálculos realizados estimando las cantidades secretadas de ambos isómeros a partir de sus respectivas concentraciones libres y el probable volumen de plasma que circularía en las adyacencias del páncreas e intestino durante la digestión de las comidas, y asumiendo sus completas absorciones desde el intestino, dieron resultados ínfimos como para afectar el cociente S/R de las concentraciones plasmáticas totales en los tiempos donde el fenómeno ocurre. Por lo tanto, la inversión quiral unidireccional de R a S durante el proceso de secreción y posterior reabsorción sería la explicación más probable.

Por otro lado, luego de la administración de la Referencia, se obtuvo una diferencia significativa ($p < 0,01$) entre la mediana del tiempo de latencia para la administración con comida (5,5 h) y para la administración en ayuno (2,5 h) en ambos isómeros. Se corrigió el $T_{MÁX}$ mediante la sustracción de los tiempos de latencia obtenidos. Este parámetro no mostró diferencias significativas en ambos sexos para ambos isómeros. No se encontraron diferencias significativas entre la administración en ayuno y con comidas para AUC_T y $C_{MÁX}$. No se encontraron diferencias significativas entre los diferentes modos de administración para los distintos sexos y por lo tanto se presentan los resultados en conjunto. La Figura 2.4 muestra el perfil medio de concentraciones plasmáticas en función del tiempo de la formulación Referencia para ambos modos de administración ($n=16$).

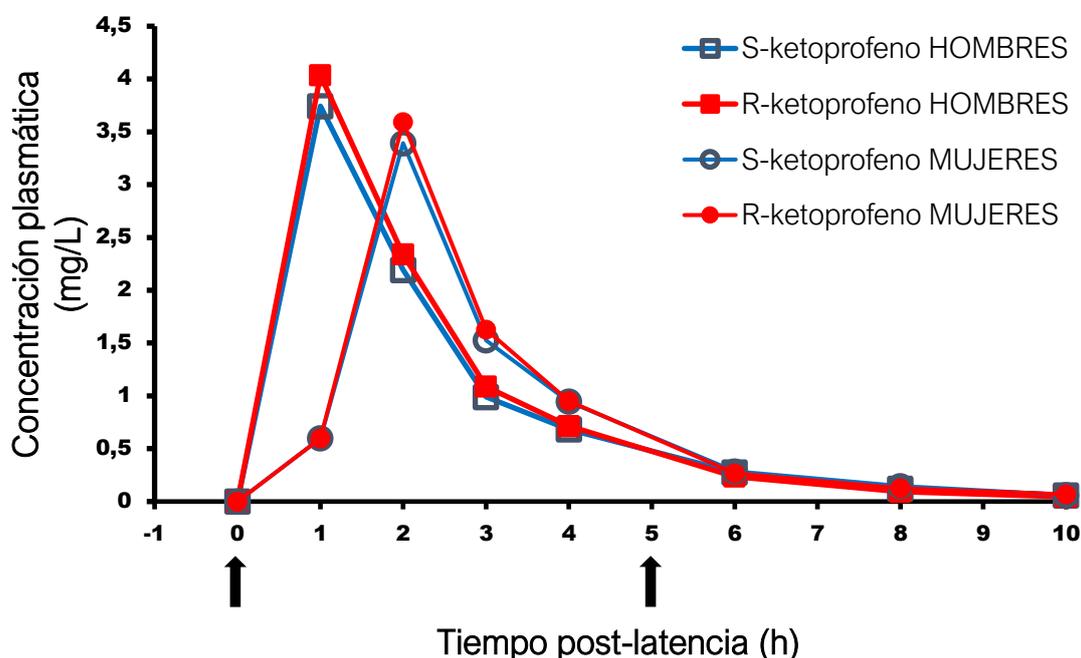


Figura 2.4. Concentración plasmática media de los isómeros R y S de Ketoprofeno obtenidas en hombres (n=16) y mujeres (n=16), luego de la administración en condiciones de ayuno y con comidas, de una formulación gastro resistente conteniendo 100 mg de racemato. Las flechas indican la ingesta de comidas. Los cocientes de concentración S/R no fueron significativamente distintos de 1. (test t de student no apareado).

Para el producto Referencia, la administración con comidas retrasó el pasaje de la formulación desde el estómago hacia el duodeno, pero luego de alcanzar el intestino, el patrón de absorción se mantuvo incambiado, como fue mencionado en bibliografía ⁶¹ y como fue referenciado previamente por nuestro grupo ⁶². Al corregir los valores de AUC_T calculados, por el peso de los individuos, no se observan diferencias significativas entre sexos. Sí se detectaron diferencias para los C_{MAX}/AUC_T de ambos isómeros entre hombres y mujeres, como ya fue observado para la suma de los enantiómeros ⁶². Dado que el cociente C_{MAX}/AUC_T está referenciado como indicador de velocidad de absorción ⁶³, nuestros resultados pondrían en evidencia una mayor velocidad de absorción de Ketoprofeno en hombres respecto a mujeres.

No se obtuvieron diferencias significativas entre el cociente S/R y 1 durante todo el estudio. Es importante notar que la formulación Referencia fue transferida desde el estómago al duodeno a tiempos cercanos a los de ingesta de comidas. Dada la coincidencia entre los tiempos de latencia (2,5 h en ayuno y 5,5 h con comidas) y los tiempos de ingesta de comidas luego de la administración de la formulación Referencia (2h en ayuno y 6 h con comidas), el comienzo de la absorción se superpuso con la digestión de las comidas. Esto fue reforzado por una nueva ingesta de comida 4 horas más tarde (6 h post dosis en ayuno y 10 h post dosis con comidas). Consecuentemente,

secreciones frecuentes de Ketoprofeno hacia el lumen intestinal permitieron la continua reabsorción del fármaco y conversión de R a S. Por ende, los *clearance* aparentes originales de los isómeros si no hubiese habido ingesta de comidas pudieron verse enmascarados por la aumentada biodisponibilidad de isómero S y el aumentado *clearance* del isómero R, provocando un cociente S/R cercano a 1.

Entonces, se puede concluir que los isómeros S y R presentan disímil exposición plasmática media cuando se administra una dosis racémica de Ketoprofeno en humanos bajo condiciones de ayuno, pero cuando el comienzo de la absorción del fármaco coincide con la administración de una comida, se puede obtener una exposición más cercana entre isómeros, como la obtenida para la formulación gastro resistente (Referencia). En el caso que la absorción de la dosis racémica no sea precedida por la ingesta de comida, o si la absorción de fármaco es mantenida por un período largo en el que no haya ingesta de comidas, se podrá observar un período en el que la exposición a ambos isómeros sea diferente, en concordancia con sus diferentes *clearance*, como se obtuvo para la formulación Test tanto en la administración en ayuno como con comidas.

En cuanto a la biodisponibilidad relativa estimada para la formulación Test ($AUC_{Test} * dosis_{Referencia} / AUC_{Referencia} * dosis_{Test}$), fue de 1,07 (con comidas) y 1,13 (ayuno) para el isómero R, y de 0,96 (con comidas) y 1,07 (ayuno) para el isómero S, en hombres. Y en mujeres fue de 0,87 (con comidas) y 0,93 (ayuno) para el isómero R; 0,87 (con comidas) y 0,87 (ayuno) para el isómero S. El cálculo realizado según la ecuación vista previamente tiene la virtud de estar referida a una referencia cuya biodisponibilidad se supone constante, ya que su absorción desde el intestino se considera rápida y prácticamente completa, y donde la eventual diferencia de *clearance* entre hombres y mujeres queda anulada por la realización del cociente Test/Referencia. Por lo tanto, se comparan biodisponibilidades relativas.

Puede observarse entonces una mayor biodisponibilidad relativa de Ketoprofeno en hombres, aún mayor cuando se recibió la formulación Test en condiciones de ayuno. Interesantemente, las mujeres parecieron perder biodisponibilidad cuando recibieron Ketoprofeno como producto Test, el cual posee una capa que libera el ingrediente activo de manera prolongada.

Tras la administración oral de una formulación de liberación inmediata, si bien la biodisponibilidad de Ketoprofeno es alta, se puede perder entre un 15% y un 20% de la dosis presistémicamente ⁶⁴. Probablemente se explique por ionización de la molécula a pH intestinal, lo que desfavorece su absorción, sin importar el sexo de la persona que recibe la medicación. Este fenómeno resulta más significativo en formulaciones de liberación prolongada que alcanzan zonas más distantes del intestino, cuyo pH aumenta gradualmente, sin haber liberado la totalidad de la dosis contenida en la formulación.

El pH intestinal de la mujer es significativamente mayor que el del hombre debido a la regulación de la secreción duodenal de bicarbonato mediada por estrógeno ⁶⁵. Este hecho, por otra parte, explica la menor incidencia de úlceras duodenales en mujeres durante el embarazo o en tratamiento con anticonceptivos ⁶⁶. Entonces, el más alto pH intestinal que presentan las mujeres explicaría la menor biodisponibilidad observada.

Quizás, la diferencia de pH entre sexos en las primeras porciones del intestino no sea suficiente para impactar sobre la biodisponibilidad de formulaciones de liberación inmediata que liberan completamente su contenido en esta zona. Sin embargo, el impacto sí podría ser significativo en formulaciones de liberación prolongada cuya liberación se prolonga a lo largo del intestino, como es el caso. Esta diferencia de biodisponibilidad entre sexos, se hace más intensa cuando la administración ocurre en condiciones de ayuno ya que la presencia de comida a nivel intestinal tiende a disminuir el pH y de esta manera iguala en cierta medida el pH de hombres y mujeres.

En cuanto a la mayor tasa de conversión que parecerían presentar los hombres respecto a las mujeres, podría inferirse que, siendo este proceso saturable, el mayor volumen corporal que presentan los hombres podría favorecerlo, al presentar menores concentraciones plasmáticas.

Conclusiones

Los isómeros R y S exhibieron diferentes características de disposición. El isómero S presentó un mayor *clearance* que el isómero R.

Los perfiles de concentración plasmática de Ketoprofeno obtenidos tras la administración de la formulación Referencia (de liberación retardada gastro resistente) y de la formulación Test (bicapa de liberación inmediata + liberación prolongada) evidenciaron la conversión del isómero R al S durante la recirculación promovida por la ingesta de comidas.

Dadas las características acídicas del Ketoprofeno, este puede secretarse a través de jugos pancreáticos e intestinales debido a la diferencia de pH entre estos jugos y el plasma sanguíneo.

Los hombres mostraron una mayor tasa de conversión respecto a las mujeres.

Capítulo 3: Predicción de la absorción oral *in vivo* de Ketoprofeno mediante ensayos de disolución *in vitro* y cálculos de partición hacia fase orgánica

Introducción

La liberación de un fármaco desde la forma farmacéutica que lo contiene y su posterior disolución dependen de numerosos factores entre los que se encuentran: las características fisicoquímicas del fármaco, los excipientes empleados, la tecnología utilizada y diversos factores fisiológicos. Estos procesos pueden caracterizarse mediante ensayos de disolución *in vitro*.

Los ensayos *in vitro* resultan de interés ya que los procesos de liberación y disolución, preceden y condicionan la permeación, metabolización presistémica del fármaco, y subsecuente absorción para alcanzar circulación sanguínea. Entonces, los perfiles de disolución *in vitro* son útiles como guía para el desarrollo de nuevas formulaciones, como control del proceso de fabricación y aseguramiento de la calidad biofarmacéutica, y también como indicador de la biodisponibilidad que rendirá la formulación *in vivo*.

Los ensayos de disolución miden la velocidad y la cantidad de fármaco que se libera desde el medicamento. Estos parámetros dependerán de las condiciones elegidas para el ensayo. Por lo tanto, si se quisieran relacionar los resultados obtenidos *in vitro* con parámetros de exposición *in vivo*, se deberá determinar la metodología que mejor refleje las condiciones fisiológicas tras una administración oral.

La fisiología gastrointestinal de hombre y mujer difiere debido al perfil de hormonas sexuales que presentan ambos sexos. Estas hormonas impactan sobre variadas funciones en el organismo, afectando la respuesta farmacocinética y farmacodinámica a los fármacos^{67, 68, 69}. Debido al efecto de la progesterona, las mujeres presentan un vaciado gástrico y un peristaltismo intestinal enlentecido respecto al hombre^{70, 71}, pudiendo retrasar la absorción de fármacos. Además, dada la mayor secreción de ácido clorhídrico que exhiben los hombres, su pH gástrico es menor (1-2) que el de las mujeres (2-3)^{72, 73}. Por último, las mujeres presentan un pH intestinal mayor debido a la regulación de la secreción duodenal de bicarbonato mediada por estrógeno⁶⁵. Estas diferencias en pH gastrointestinal entre sexos, puede influir sobre la cantidad absorbida de fármacos ionizables como el Ketoprofeno ($pK_a=4,6$).

Objetivos

Se realizaron estudios *in vitro* con el fin de explicar las diferencias de biodisponibilidades obtenidas entre hombre y mujer en el ensayo *in vivo* que se detalla en el capítulo anterior.

El objetivo fue predecir la absorción oral de Ketoprofeno luego de la administración de la formulación bicapa (Test) (150 mg (75 mg LI + 75 mg LP), Bi-Ketofen®, Laboratorio Roemmers, Montevideo, Uruguay) a través de ensayos de disolución, y posterior

aplicación de coeficientes de distribución n-octanol / agua, simulando la fisiología del tracto digestivo de hombres y mujeres.

Metodología

Fase analítica

Se llevaron a cabo ensayos de disolución *in vitro* del producto Test mediante un aparato de celda de flujo continuo USP IV (Sotax CE 7 smart) conectado a una bomba peristáltica Sotax CP-7 35, de modo de simular la liberación del fármaco en tracto gastrointestinal tras la administración de la formulación en condiciones de ayuno, en hombres y mujeres. Las condiciones de los ensayos se detallan en la Tabla 3.1. y fueron determinadas considerando las diferencias conocidas en la fisiología gastrointestinal entre hombre y mujer. La temperatura de los ensayos fue de $37,0 \pm 0,5$ °C.

		Gástrico			Intestinal (superior)			Intestinal (inferior)		
		Flujo (mL/min)	Tiempo (min)	pH	Flujo (mL/min)	Tiempo (min)	pH	Flujo (mL/min)	Tiempo (min)	pH
Ensayo 1	Mujeres	8 ó 16	30	2,2	8 ó 16	120	5,0	8 ó 16	240	7,4
	Hombres	8 ó 16	30	1,2	8 ó 16	120	4,5	8 ó 16	240	6,8
Ensayo 2	Mujeres	6	90	2,2	4	120	7,4	4	210	7,4
	Hombres	8	60	1,2	4	120	6,8	4	280	6,8
Ensayo 3	Mujeres	6	90	2,2	4	120	5,0	4	180	7,4
	Hombres	8	60	1,2	4	120	4,5	4	210	6,8

Tabla 3.1. Condiciones experimentales de los ensayos de disolución *in vitro* realizados en un aparato de celda de flujo continuo (USP IV) simulando tracto gastrointestinal de hombres y mujeres en ayuno.

Para la preparación de fluido gástrico simulado (pH 1,2 y 2,2) se utiliza Ácido Clorhídrico y Cloruro de Potasio. El buffer acetato pH 4,5 y 6,0 se prepara con Ácido Acético Glacial y Acetato de Sodio, y el buffer fosfato pH 6,4 y 7,8, con Hidróxido de Sodio y Fosfato Monobásico de Potasio.

Para el armado del equipo se coloca una perla de rubí de 5 mm en la punta de la celda de 22.6 mm. Se llena el cono con perlas de vidrio de 1mm y se utilizan filtros de fibra de vidrio (Whatman®, GF/F: tamaño de poro 0.7 µm).

Las muestras recogidas fueron cuantificadas mediante espectrofotometría UV (espectrofotómetro Thermo Spectronic, modelo HeliosGamma, ThermoScientific, UK).

Fase estadística

El porcentaje de dosis de Ketoprofeno disuelto en n- octanol fue calculado mediante coeficientes de distribución (D) a diferentes pHs, referenciados en bibliografía ⁷⁴ (Tabla 3.2.), y mediante los porcentajes de dosis de fármaco disuelto en los medios acuosos ensayados.

pH	5,0	4,5	7,4	6,8
log D	2,6	2,9	0,31	0,91

Tabla 3.2. Coeficiente de distribución para cada uno de los pHs ensayados.

Resultados y discusión

Bajo las condiciones de los ensayos 1 y 2 para simular el tracto gastrointestinal de la mujer, la formulación alcanza una mayor disolución debido al mayor pH gástrico y duodenal que estas presentan. Hasta ese momento, es la capa de liberación inmediata del comprimido la que determina la diferencia entre sexos. Una vez que esa capa libera la totalidad de su contenido, las velocidades de disolución de hombre y mujer se igualan y se mantienen prácticamente constantes a lo largo del tiempo. Esta ventaja muy notoria a favor de las mujeres, no se condice con los resultados de absorción *in vivo* obtenidos (Figuras 3.1-3.3).

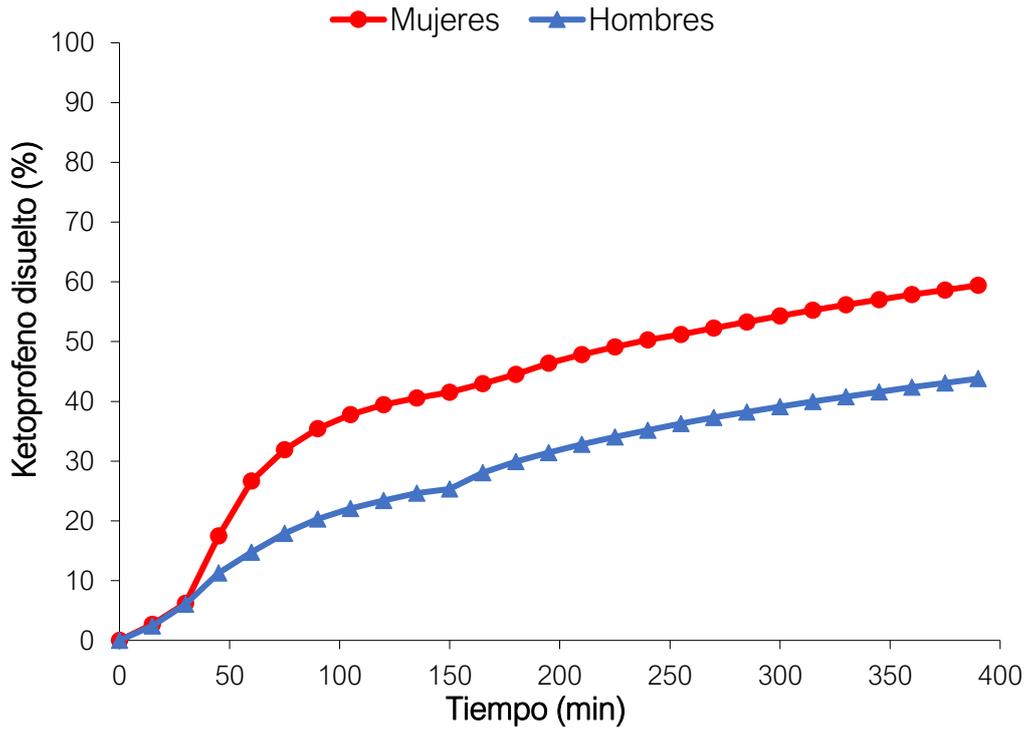


Figura 3.1. Perfil de disolución de hombre y mujer bajo las condiciones del ensayo 1 a flujo 8 mL/min.

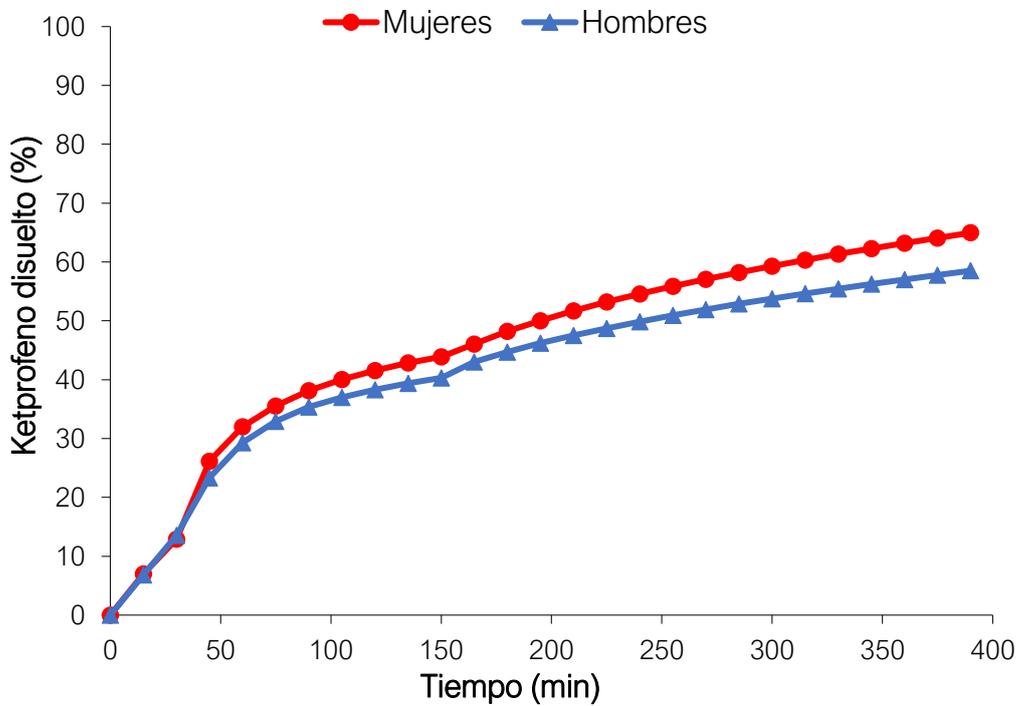


Figura 3.2. Perfil de disolución de hombre y mujer bajo las condiciones del ensayo 1 a flujo 16 mL/min.

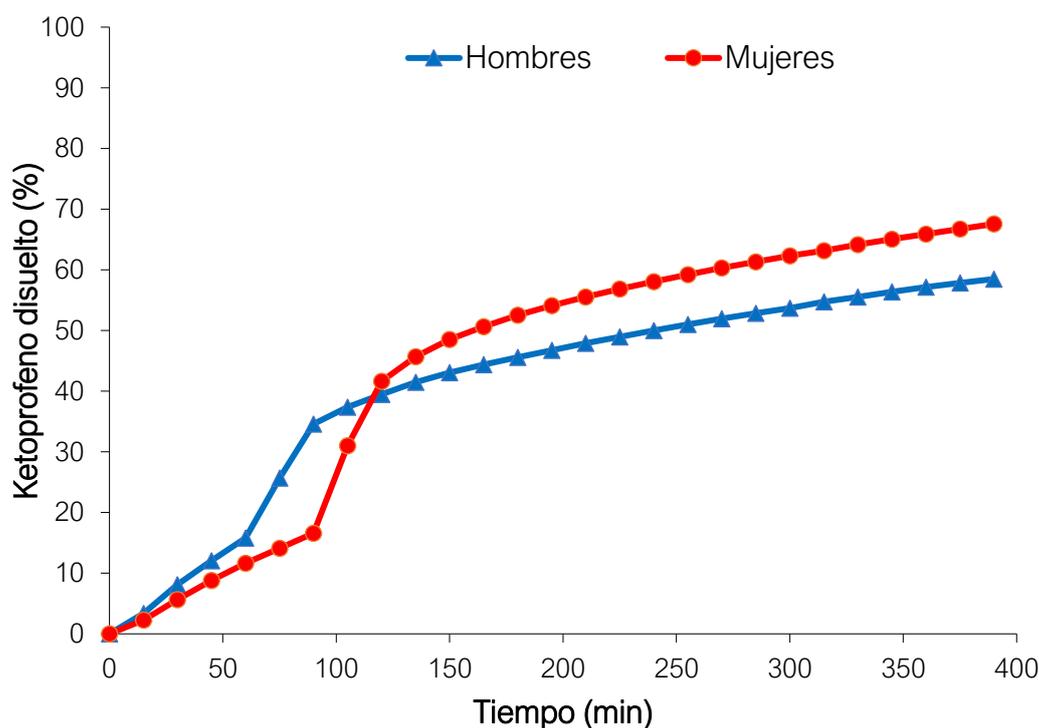


Figura 3.3. Perfil de disolución de hombre y mujer bajo las condiciones del ensayo 2.

Bajo las condiciones del ensayo 3 (Figura 3.4.), la disolución del fármaco es mayor para el hombre durante las primeras etapas del estudio, debido a que se mantiene por menos tiempo a pH gástrico. No obstante, esta ventaja no logra mantenerse dado el mayor pH que presentan las mujeres a nivel intestinal, lo que favorece la disolución del Ketoprofeno, empatando al hombre hacia el final del ensayo. Estos resultados auguraban un mayor distanciamiento a favor de los hombres una vez aplicados los correspondientes coeficientes de reparto entre los medios acuosos, donde ocurre la disolución, y las membranas celulares de la mucosa intestinal, que estarían siendo emuladas por el n-octanol.

Por tanto, las condiciones ensayadas en este tercer estudio parecen ser más favorables para lograr una apropiada correlación *in vivo- in vitro*. En este ensayo se considera el más lento vaciamiento gástrico y el más alto pH intestinal de las mujeres respecto al hombre. Además, los flujos elegidos para el estudio reflejan las diferencias de peristaltismo gástrico que se reportan para hombre y mujer.

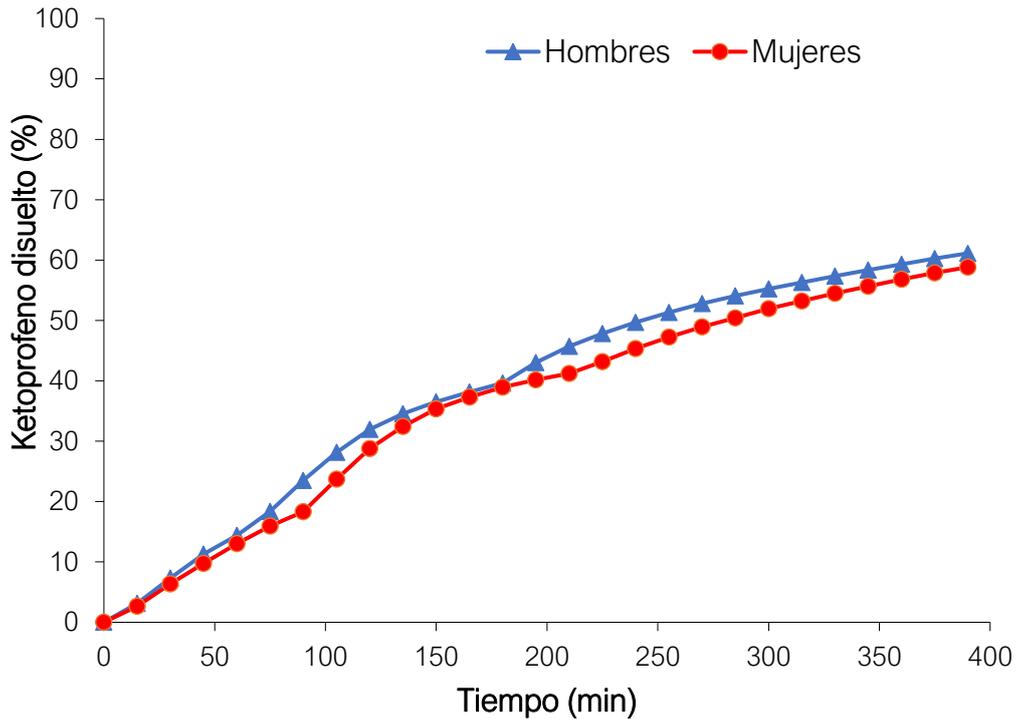


Figura 3.4. Perfil de disolución de hombre y mujer bajo las condiciones del ensayo 3.

La Figura 3.5 muestra la partición hacia n-octanol calculada a partir de los resultados de la disolución bajo las condiciones del ensayo 3. Se observan diferencias en la distribución de Ketoprofeno hacia n-octanol para los distintos sexos, volviéndose notorias una vez que la formulación alcanzó el medio intestinal 2 (pH 7,4 para mujeres y 6,8 para hombres).

Los hombres, que tendrían un trecho intestinal con pH propicio para la absorción más largo, podrían absorber mayor cantidad del fármaco que las mujeres. Esto siempre y cuando el comprimido no se traslade de manera más rápida a lo largo del tracto gastrointestinal del hombre respecto al de la mujer. Se observó durante la disolución que los comprimidos presentaban una densidad suficiente como para evitar un rápido tránsito intestinal, lo que apoyaría esta teoría.

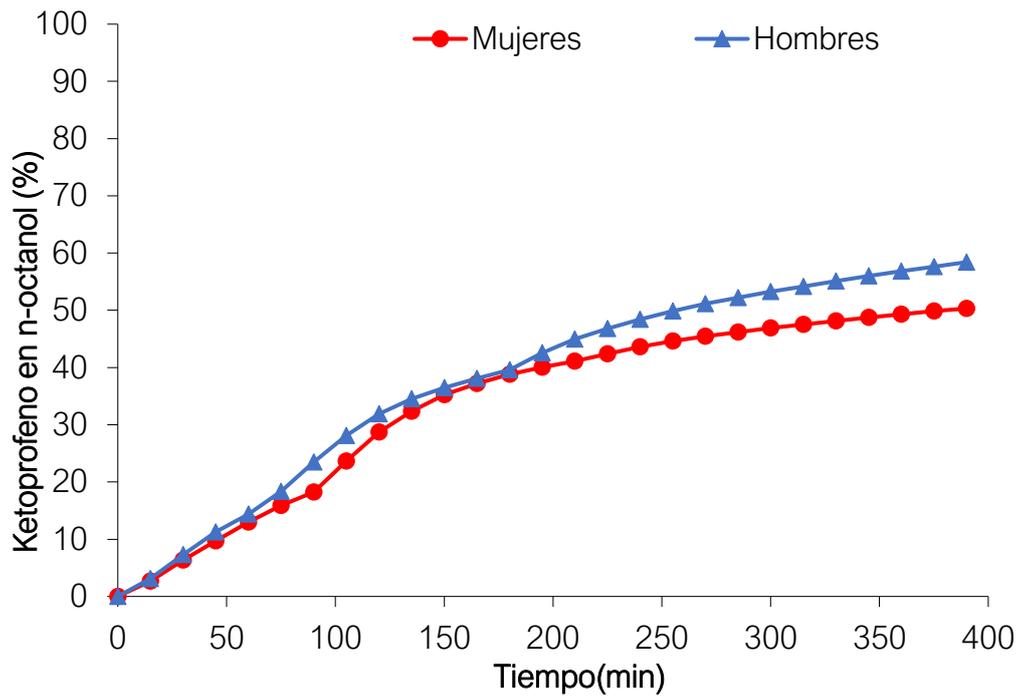


Figura 3.5. Partición hacia n-octanol para hombre y mujer, estimada a partir de los resultados de la disolución bajo las condiciones del ensayo 3.

In vivo, se pudo observar un perfil más agudo en mujeres evidenciando una posible interrupción de la absorción. El cociente AUC_{TEST}/AUC_{REF} confirmaría un 18% menos de biodisponibilidad en mujeres respecto a hombres.

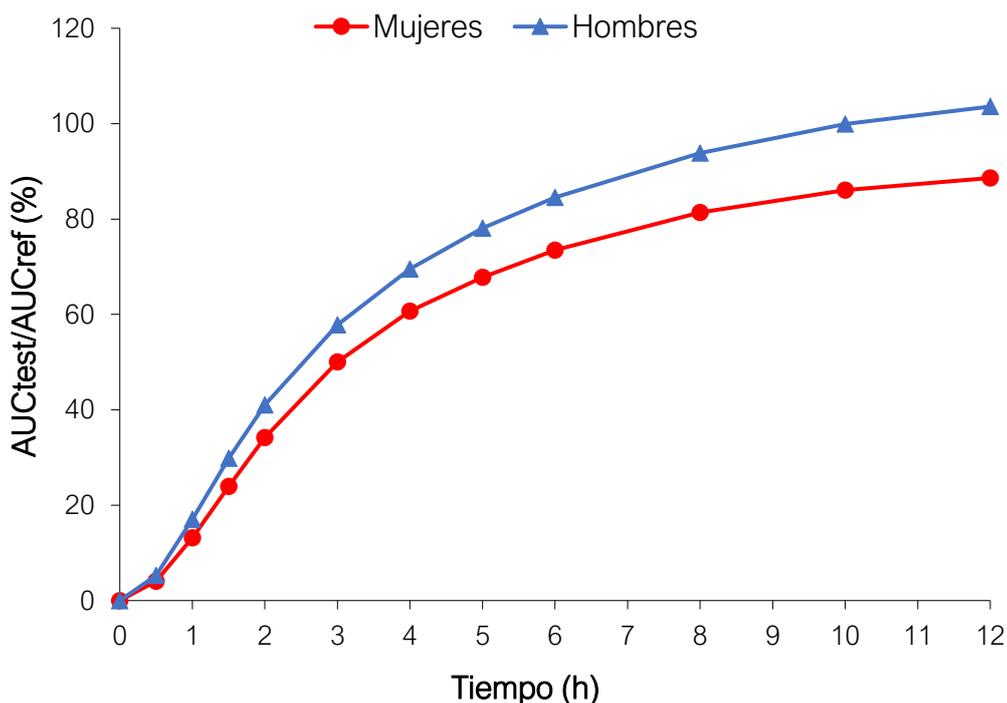


Figura 3.6. Cocientes medios $AUC_{Test} \cdot dosis_{Referencia} / AUC_{Referencia} \cdot dosis_{Test}$ para hombre y mujer luego de la administración oral de la formulación Test en ayuno.

Resulta interesante observar el similar comportamiento que muestran los porcentajes permeados hacia n-octanol (Figura 3.5) con los porcentajes de absorción *in vivo* que muestra el cociente de AUC del producto ensayado respecto al AUC del producto Referencia (Figura 3.6). Igualmente, los resultados de los estudios *in vitro* subestiman la cantidad de Ketoprofeno absorbido *in vivo* a cada uno de los tiempos ensayados. Esto puede deberse al error intrínseco que trae aparejado un ensayo *in vitro*, pero también es necesario recordar que la biodisponibilidad del producto Test se estimó por comparación con la biodisponibilidad del producto Referencia, que se asumió completa. Si la formulación Referencia presentara absorción incompleta, entonces la pérdida de biodisponibilidad de la formulación Test sería aún mayor y por lo tanto más cercana a lo determinado *in vitro*.

Estos resultados ponen de manifiesto la muy buena correlación *in vitro* - *in vivo* que se obtiene cuando se ensaya la disolución con el Aparato IV de la USP y se acoplan los porcentajes disueltos con la correspondiente distribución hacia n-octanol.

Conclusiones

Los ensayos de disolución *in vitro* utilizando el aparato USP IV junto con los coeficientes de distribución en n-octanol son una herramienta útil para predecir la absorción oral de fármacos ionizables como el Ketoprofeno, y por lo tanto su biodisponibilidad. La diferencia en el pH intestinal entre sexos demostró ser la principal causa de la pérdida de biodisponibilidad de Ketoprofeno observada en mujeres luego de la administración de la formulación.

Capítulo 4: Impacto de la modificación de la distribución del gasto cardíaco tras la ingesta de comidas y de la estimulación de la secreción pancreática sobre la tasa de inversión quiral R-en-S del Ibuprofeno

Introducción

Como se vio en el capítulo 2, aunque la inversión de los isómeros para el Ketoprofeno es mínima (10%), pudo apreciarse este fenómeno y asociarse a los repetidos pasajes de fármaco a través de la mucosa intestinal consecuencia de procesos de recirculación. Un fármaco como el Ibuprofeno, que presenta una tasa de conversión R en S mucho más elevada (63%), sería un buen trazador para investigar con mayor profundidad el mecanismo involucrado. Asimismo, siendo el Ibuprofeno ampliamente utilizado, si se logrará una optimización de los tratamientos con este fármaco, el impacto económico para la industria y el beneficio para los pacientes, sería muy alto.

El diseño del presente estudio está basado en los resultados referenciados por Torrado, et al. ⁷⁵ para un estudio de bioequivalencia entre dos formulaciones conteniendo Ibuprofeno. En él se puede constatar que una de las formulaciones, al poco tiempo de administrarse, presentó un espontáneo e inesperado cambio en el cociente S/R de concentraciones plasmáticas de Ibuprofeno, dado que no había habido ingesta de comida desde al menos 8 horas previas a la administración de la dosis. La otra formulación utilizada en el ensayo, recién modificó el cociente S/R luego del almuerzo recibido a las 4 horas post-dosis. En resumen, se detectó que: 1) la formulación que se absorbió más rápido (Referencia) presentó ya a los 45 minutos un aumento en la conversión R en S (más de 3 h antes de administrarse la comida). 2) la conversión R en S no fue mayor cuando la absorción se prolongó en el tiempo como se ha referenciado previamente, sino que la formulación de más rápida absorción obtuvo la mayor tasa de conversión; 3) el aumento del cociente S/R de concentraciones plasmáticas de Ibuprofeno se produjo en ambas formulaciones (Test y Referencia) después de administrarse una comida (apreciado a partir de las 6 h post-dosis, momento desde el cual la formulación con más lenta absorción apartó su cociente de concentraciones S/R significativamente del valor inicial).

La Figura 4.1 ilustra los resultados publicados.

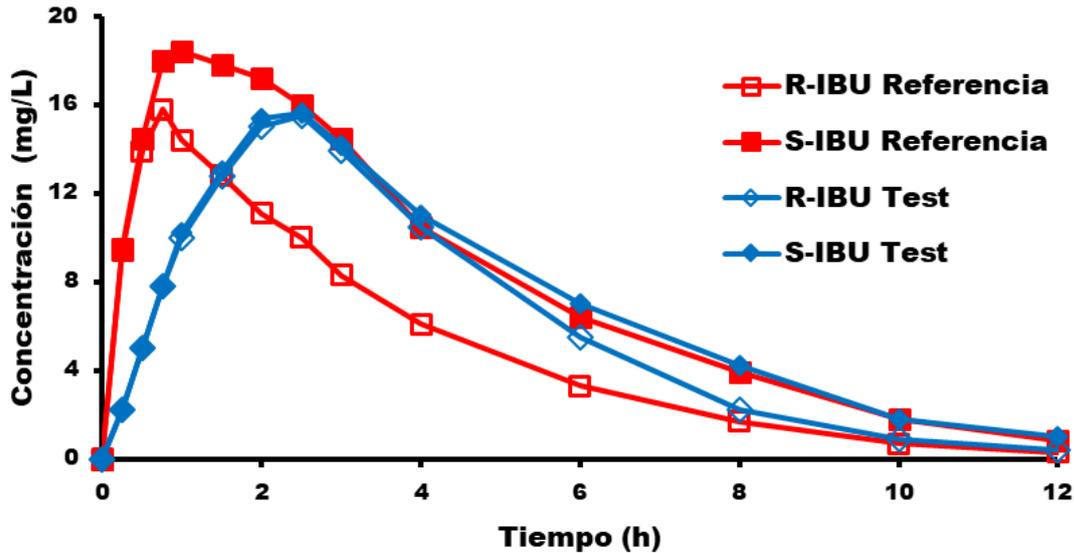


Figura 4.1 Perfiles plasmáticos de R- y S-Ibuprofeno (IBU) obtenidos tras la administración de 600 mg de racemato en suspensiones acuosas al 2% de fármaco (adaptado de Torrado et al., 2010)⁷⁵.

Consultadas las composiciones de ambas formulaciones ensayadas, se constató que la que presentó el anticipado cambio del cociente S/R contenía sacarosa como excipiente. La sacarosa estimula la secreción de jugo pancreático en su fase cefálica de manera importante y dependiente de su concentración ⁷⁶. Por lo tanto, la mayor tasa de inversión quiral obtenida luego de la administración de la formulación con sacarosa podría ser explicada gracias a la secreción pancreática del Ibuprofeno previamente absorbido.

Objetivos del estudio

El objetivo central del presente estudio es evidenciar la recirculación plasma - tracto gastrointestinal - plasma del Ibuprofeno. Se pretenden determinar factores influyentes en el proceso de absorción y de recirculación del Ibuprofeno, particularmente la sacarosa como estimulador de la secreción de jugo pancreático, además de estudiar el efecto que podría tener este fenómeno en la inversión quiral. Determinar de esta manera, el sitio donde ocurriría la conversión.

Se busca recomendar un régimen de ingestas o guiar el diseño de una formulación innovadora, de manera de prolongar la permanencia del isómero activo de Ibuprofeno en el organismo, logrando un mejor aprovechamiento de la dosis de racemato administrado y potenciando así su eficacia.

Metodología

Fase clínica

Seis voluntarios sanos (3 mujeres y 3 hombres) de entre 22 y 31 años de edad con un peso promedio de 61 y 92 kg, respectivamente, participaron de un estudio cruzado y compensado en el que se les administró una dosis única de 600 mg de Ibuprofeno en dos períodos. El período de lavado (*washout*) fue de una semana.

La elección de la formulación se hizo considerando que debía ser de rápida liberación, y por lo tanto absorción, y que no debía presentar excipientes que pudiesen interferir con la secreción de jugo pancreático. Para esto se eligió una cápsula de gelatina blanda (Actron®, Laboratorio Bayer), la cual no contiene sacarosa, y además la ingesta de gelatina no referencia estimulación de la secreción de jugo pancreático⁷⁷.

Todos los voluntarios comparecieron el primer día de cada instancia con un ayuno no menor a 8 horas (en dicho lapso solo se permitió la ingesta de agua). En todos los casos, tres horas antes de la administración de la dosis (06:00) recibieron un desayuno consistente en 4 galletas saladas, un vaso de leche o yogurt y agua, de manera de no prolongar el ayuno y velar por la seguridad del voluntario. Luego, a las 9:00, se administró la dosis de Ibuprofeno. En un caso, Sistema COMIDA, la administración de la dosis se realizó a la 9:00 de la mañana junto con una dosis de 20 g de sacarosa disuelta en 200 mL de agua. Se ingirió una segunda dosis de sacarosa a las 2 horas post dosis (11:00), además de un almuerzo a las 4 horas post dosis (13:00), finalizando el estudio a las 8 horas post dosis (17:00). En otro caso, Sistema AYUNO, la administración de la dosis se realizó solo con agua, prolongado así el ayuno hasta el final del estudio (8 horas post dosis).

El protocolo del estudio destaca por el mantenimiento de un ayuno total a lo largo de una de las fases del estudio. No se encontraron reportes de investigaciones similares ya que en general los voluntarios han ingerido al menos un almuerzo y una cena. Mediante este procedimiento se logró una diferenciación más pura entre ambas condiciones experimentales de ensayo, pudiéndose así analizar un sistema verdaderamente en ayuno, a diferencia de la investigación realizada para Ketoprofeno, donde el ayuno solamente operó al momento de administrarse la dosis.

El protocolo fue diseñado de acuerdo a guías sobre investigación clínica y fue aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Química (Uruguay). Se obtuvo un consentimiento informado para cada voluntario previo a su ingreso al estudio. El estudio se realizó CEBIOBE.

Fase analítica

Se tomaron muestras de sangre de la vena anticubital mediante cánula hacia un tubo heparinizado. Las muestras fueron tomadas a las 0 (previo a la administración de la dosis) y a los 20, 40, 60, 90, 120, 140, 160, 180, 210, 240, 360 y 480 minutos post dosis. Se separó el plasma por centrifugación y fue almacenado a -25°C hasta su análisis. La

preparación de muestra consistió en extracción del Ibuprofeno con una mezcla de Hexano y Acetato de Etilo desde 0,5 mL de plasma acidificado con ácido fosfórico 2,5 M, evaporación de la fase orgánica en baño seco bajo corriente de nitrógeno y reconstitución del residuo seco con fase móvil. Se utilizaron 50 μ L de una solución de Furosemide (3000 μ g/mL) como estándar interno. La cuantificación del fármaco se realizó mediante un método quiral validado de HPLC UV que fue una adaptación de un método previamente publicado ⁷⁸. La fase móvil consistió en un buffer fosfato 20 mM a pH 7,0 y Acetonitrilo en una proporción de 99/1. El flujo de fase móvil fue de 0,5 mL/min. Se usó una columna de fase estacionaria quiral (CHIRALPACK AGP®, 5 μ , 100 x 4,0 mm) con guarda columna de sílica. El detector midió a 220 nm. El análisis fue llevado a cabo a 15 °C y el volumen de inyección fue de 20 μ L. El límite de cuantificación inferior fue de 0,6029 μ g/mL y se probó linealidad hasta 17,23 μ g/mL. Para concentraciones localizadas en las porciones bajas, medias y altas de la curva de calibración, se obtuvieron coeficientes de variación intra- e inter-día (precisión) y errores relativos (exactitud) por debajo de 13%.

Fase estadística

Se construyeron perfiles medios de concentración plasmática de los isómeros de Ibuprofeno en función del tiempo, para ambos períodos, en hombres y mujeres.

Se determinó la media de la máxima concentración experimental de Ibuprofeno en plasma ($C_{M\acute{A}X} \pm DE$) y la mediana del tiempo en que se alcanzó la misma ($T_{M\acute{A}X}$ y rango). También se calculó la media del área bajo la curva de concentración vs tiempo, desde 0 hasta el tiempo de la última concentración cuantificable (T) ($AUC_T \pm DE$). Se calculó el AUC_T para cada voluntario utilizando la regla de los trapecios.

Además, se calculó el cociente de concentraciones S/R medio a cada tiempo de muestreo como un indicador de la tasa de conversión del isómero R en S.

Resultados y discusión

En la Figura 4.2. se muestra, a modo de ejemplo, un cromatograma obtenido tras la determinación de Ibuprofeno mediante el método de HPLC-UV quiral desarrollado y validado.

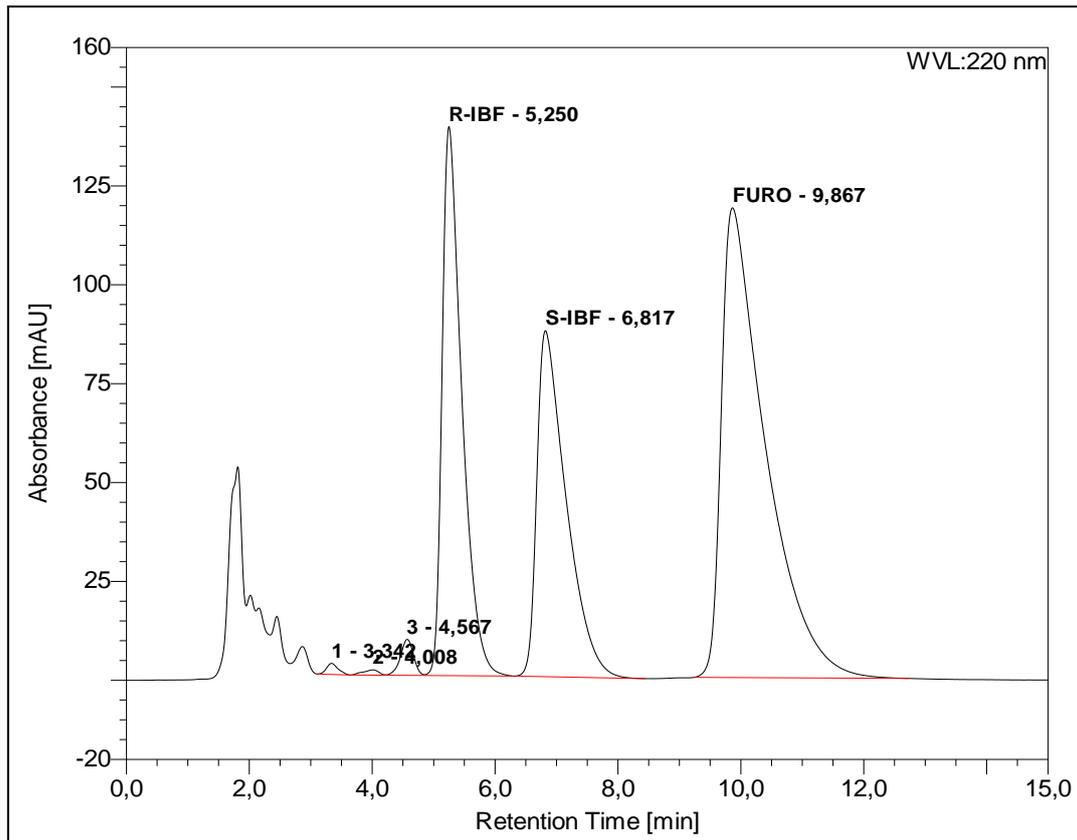


Figura 4.2. Cromatograma correspondiente a la determinación de Ibuprofeno en plasma para la muestra del voluntario 1 tras la administración del producto en el sistema COMIDA, obtenida a los 20 minutos post dosis.

La Tabla 4.1 resume los resultados farmacocinéticos obtenidos.

	$t_{1/2}$ (min) \pm DE	AUC (0-8) (mg/L) \pm DE		C_{MAX} (mg/L) \pm DE		T_{MAX} (min) (rango)		Cociente S/R AUC \pm DE
	R	R	S	R	S	R	S	
Promedio en Mujeres								
Ayuno	153,8	5937	4610	30,29	25,89	90	90	0,7761
Comida	80,57	3110	4392	20,24	24,71	90	90	1,398
Promedio en Hombres								
Ayuno	140,7	3719	4393	27,27	29,19	60	60	1,176
Comida	77,07	3043	4473	26,52	31,86	90	90	1,483
Medias y desviaciones estándar								
Ayuno	147,2 \pm 22,6	4828 \pm 1279	4502 \pm 670	28,78 \pm 6,52	27,54 \pm 4,56	75 (20- 160)	75 (20- 160)	0,9761 \pm 0,2523
Comida	78,82 \pm 7,68	3077 \pm 342	4432 \pm 1020	23,38 \pm 6,83	28,29 \pm 4,68	90 (90- 140)	90 (90- 140)	1,441 \pm 0,277

Tabla 4.1. Parámetros farmacocinéticos medios (\pm desviación estándar) obtenidos en los sistemas AYUNO y COMIDA, tras la administración de 600 mg de Ibuprofeno racémico, en hombres y mujeres.

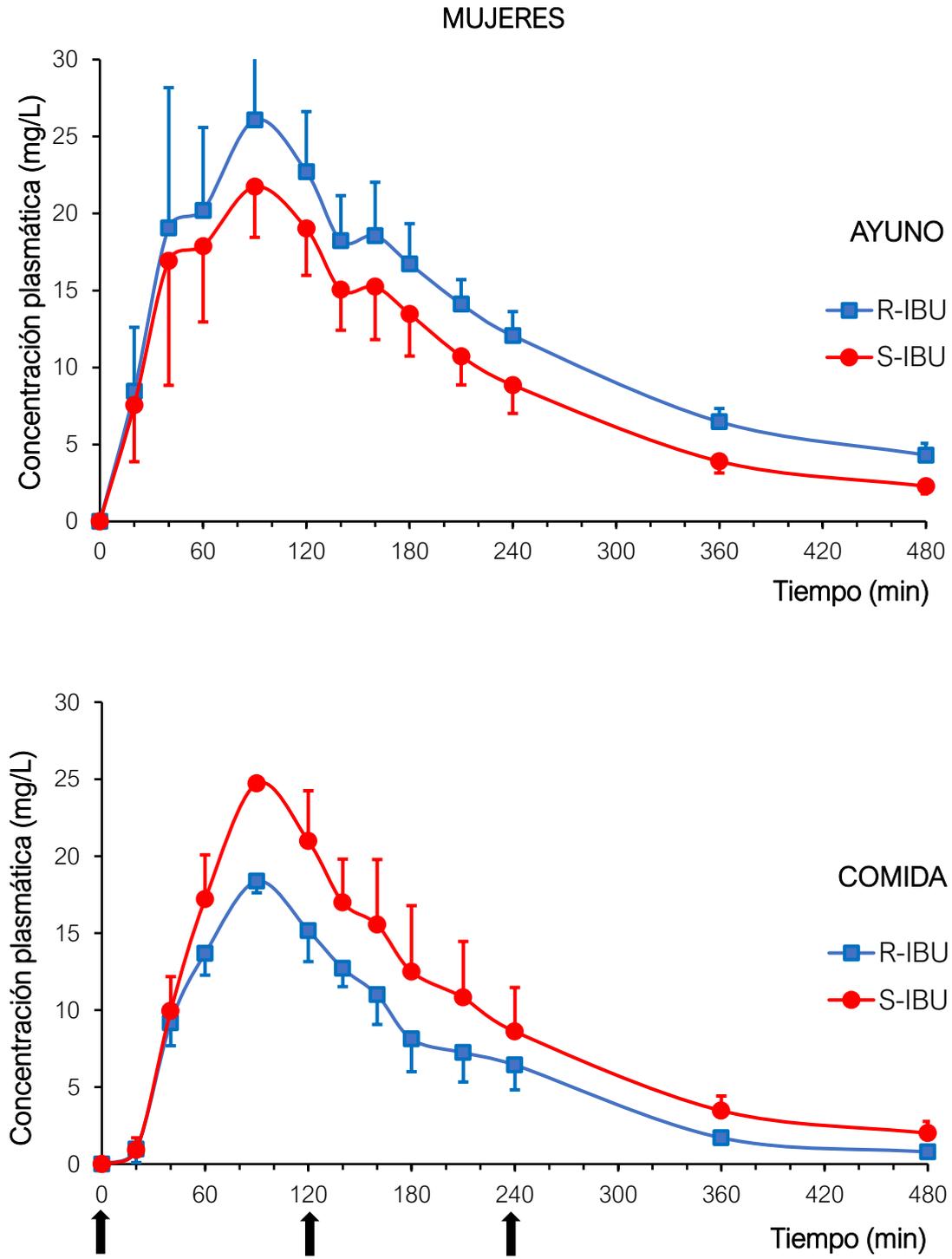


Figura 4.3. Concentración plasmática promedio de los isómeros R y S de ibuprofeno obtenidas en mujeres (n=3), luego de la administración de una formulación de liberación inmediata conteniendo 600 mg de racemato en los sistemas AYUNO y COMIDA. Las flechas indican la ingesta de sacarosa o almuerzo.

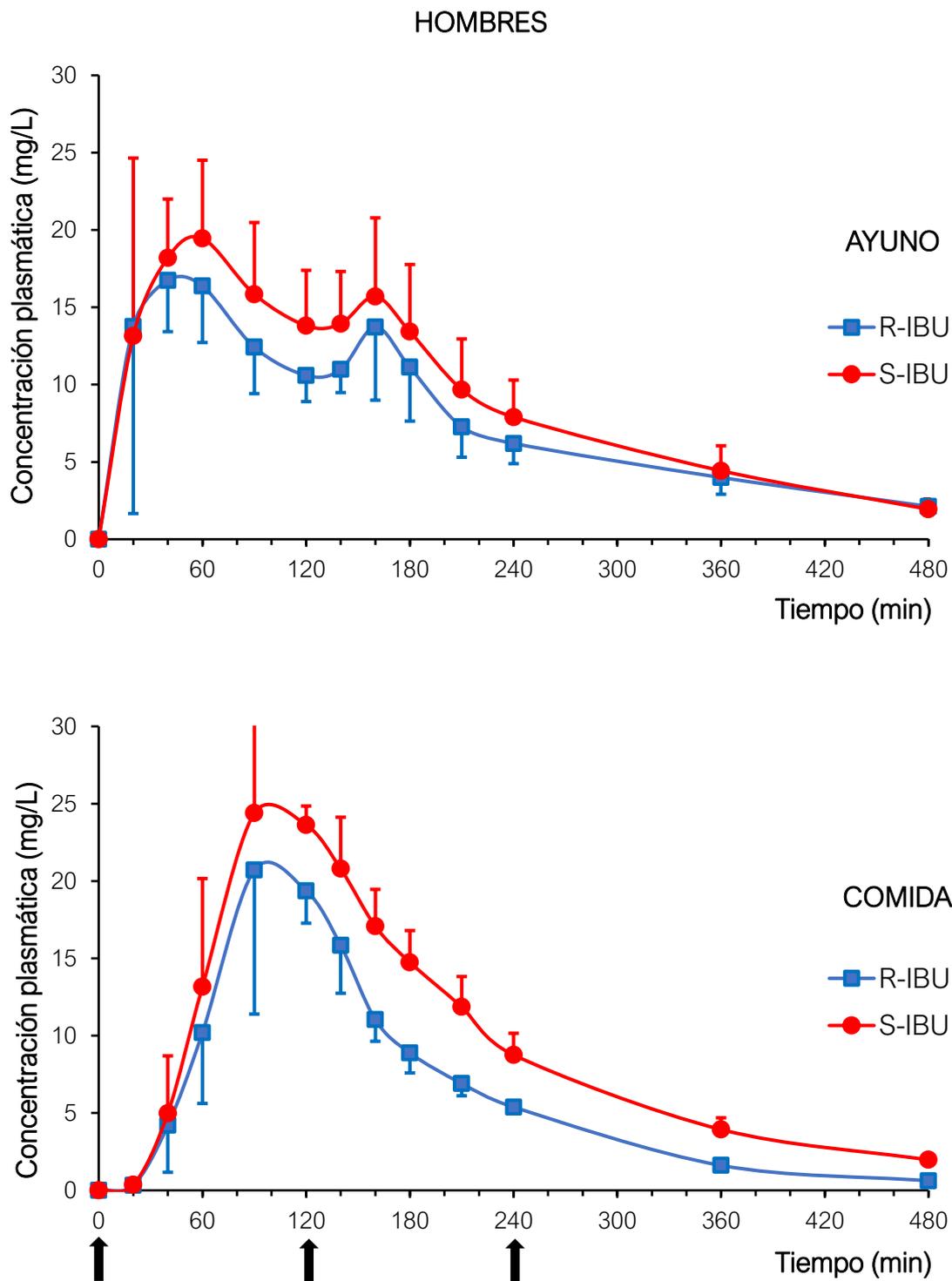


Figura 4.4. Concentración plasmática promedio de los isómeros R y S de ibuprofeno obtenidas en hombres ($n=3$), luego de la administración de una formulación de liberación inmediata conteniendo 600 mg de racemato en los sistemas AYUNO y COMIDA. Las flechas indican la ingesta de sacarosa o almuerzo.

Las Figuras 4.3 y 4.4 muestran los perfiles de concentraciones plasmáticas a lo largo del tiempo para mujeres y hombres tras la administración de 600 mg de Ibuprofeno en el Sistema AYUNO y COMIDA. A las 8 horas post dosis ya se eliminó la mayor parte del fármaco.

En los hombres, se observa que la exposición plasmática a R Ibuprofeno (R-IBF) es menor que para el isómero S (S-IBF), tanto en el sistema COMIDA como en el sistema AYUNO. Sin embargo, en mujeres, la relación entre isómeros es inversa en los distintos sistemas, siendo mayores los niveles de R-IBF respecto a S-IBF en el sistema AYUNO y contraria en el sistema COMIDA.

La Figura 4.5. muestra la evolución de la cantidad relativa entre isómeros a lo largo del tiempo para los distintos sexos y condiciones de administración.

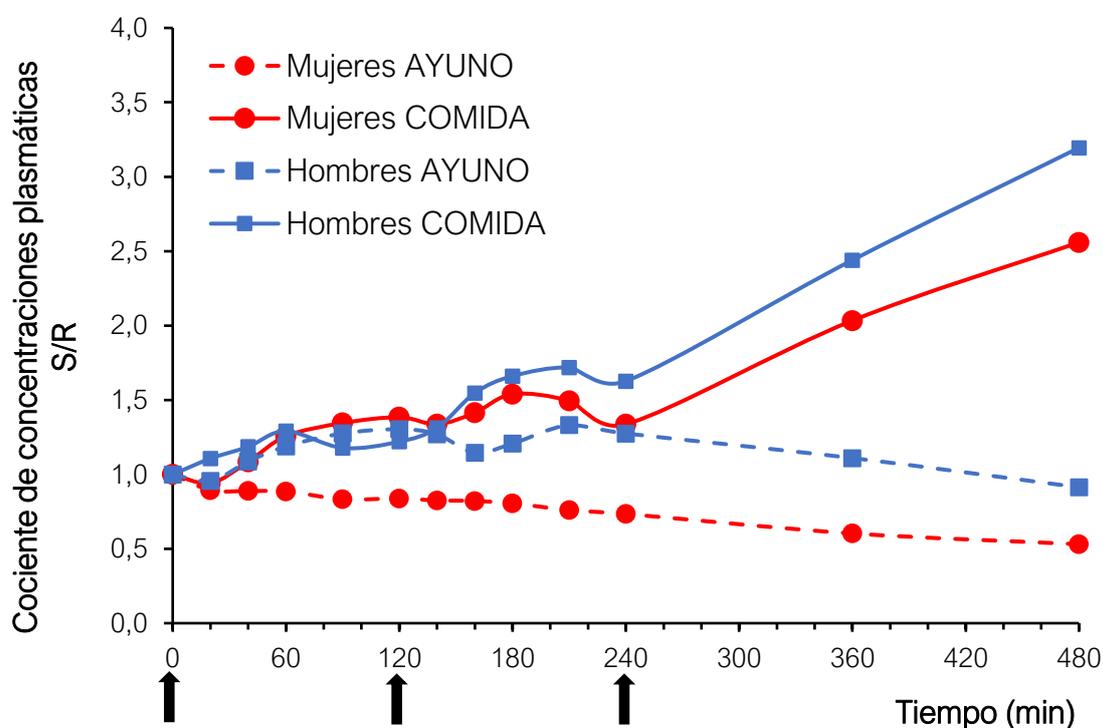


Figura 4.5. Evolución del cociente de concentraciones plasmáticas de los isómeros de Ibuprofeno (S/R) a lo largo del tiempo para hombres y mujeres, luego de la administración, en ayuno y con comidas, de una formulación de liberación inmediata conteniendo 600 mg de racemato. Las flechas indican la ingesta de sacarosa o comidas.

El área bajo la curva media para el isómero R obtenida tras la administración con sacarosa ($AUC R_{COMIDA}$) denota ya sea una pérdida de biodisponibilidad o un aumento del clearance, o ambas cosas, respecto al sistema AYUNO. Entonces, $(F/CL)_{COMIDA vs AYUNO} = AUC R_{COMIDA} / AUC R_{AYUNO} = 0,64$.

La disminución de la semivida de eliminación del isómero R en el sistema COMIDA hace pensar en un fuerte incremento del clearance sistémico. Si hubiese existido, además, una pérdida de biodisponibilidad, debería haber sido bastante menor al aumento de clearance.

En este sistema, al haberse administrado el Ibuprofeno con sacarosa, repitiéndose la ingesta a las dos horas post dosis y luego un almuerzo a las 4 horas post dosis, el gasto cardíaco hacia la región esplácnica estuvo favorecido de manera prácticamente continua durante toda la experiencia. Entonces, el clearance intestinal se vio incrementado. El aumento de caudal sanguíneo parecería haber provenido de la región extra-esplácnica y, dado el reajuste de la distribución de gasto cardíaco para mantener constante no solo allí el aporte de nutrientes, sino además en el hígado, necesariamente también se vio incrementado el clearance hepático del fármaco.

El clearance intestinal podría haber aumentado por encima de lo previsto por el aumento del gasto cardíaco esplácnico. El gradiente de pH existente entre plasma y jugo pancreático, así como su aumentado flujo sanguíneo, permitiría una gran secreción de Ibuprofeno hacia este fluido, que luego será vertido hacia el intestino y desde allí podría volver a circulación sanguínea. De esta manera, una cantidad suplementaria de moléculas, destinadas originalmente al páncreas, alcanza el enterocito y se ve aún más incrementado el clearance intestinal del fármaco. Se ha informado que las fracciones de gasto cardíaco dirigidas al páncreas y al intestino se incrementan un 50% con la ingesta de comida ⁷⁹. La alcalina secreción pancreática podría llevar bastante más moléculas de Ibuprofeno hacia el intestino, pudiendo multiplicar varias veces el incremento del clearance intestinal. Por otra parte, la quita de estas moléculas secretadas al suministro hepático por medio de la vena pancreática, podría evitar el incremento del clearance hepático que se planteaba, e incluso asumirse constante entre el sistema AYUNO y COMIDA.

Resumiendo, el $AUC R_{COMIDA}$ fue menor al $AUC R_{AYUNO}$ probablemente debido a un aumento del clearance intestinal del fármaco.

Sin embargo, el $AUC S_{COMIDA}$ no fue significativamente diferente al $AUC S_{AYUNO}$. Esto podría explicarse de dos maneras. La primera sería considerando un componente nulo de clearance intestinal en el clearance total de S-IBF, y, por tanto, los diferentes regímenes de alimentación no habrían afectado la exposición plasmática a este isómero. Ahora, si efectivamente hubo un aumento del clearance intestinal pero no se observó un cambio en el área bajo la curva, entonces debería haber ocurrido un aumento de la biodisponibilidad de S-IBU que lo compensara. Solamente una bioconversión R-en-S aumentada durante la experiencia con COMIDA podría ser la causa, ya que ésta es la única diferencia que existe entre el metabolismo de los enantiómeros. Esta hipótesis de clearance aumentado parece más factible dada la tendencia observada respecto a un aumento de la velocidad de eliminación (semivida de eliminación de $113,7 \pm 10,7$ min para el sistema AYUNO vs. $104,9 \pm 8,5$ min para el sistema COMIDA).

Tanto para S-IBF como para R-IBF los cambios en la distribución del gasto cardíaco fueron idénticos, y, por tanto, el aumento del clearance sistémico en el sistema COMIDA

debería ocurrir de igual manera para los isómeros. No obstante, la disminución de las semividas de eliminación fue muy disímil entre ambos isómeros (8% para S-IBU y 47% para R-IBU), y probablemente también lo haya sido el aumento de clearance. El mayor incremento del clearance para R-IBU solo sería posible si el componente metabólico intestinal del clearance para este isómero fuera más importante que para su enantiómero. Dado que la única diferencia de rutas metabólicas entre isómeros es la bioconversión R-en-S, se concluye que este proceso tendría una fuerte presencia en el intestino.

Se ha referenciado que la conversión presistémica de Ibuprofeno es baja debido a que la biodisponibilidad del R-Ibuprofeno es mayor al 80% y la conversión a S-Ibuprofeno aproximadamente 60% (bastante superior al 20% que podría suponer la conversión por efecto de primer paso)³⁶. Esto no contradice el hecho de que la conversión podría ocurrir a nivel intestinal. Una eventual saturación enzimática durante el primer ingreso de moléculas R podría ser causa de la baja tasa presistémica de conversión, tal vez por la poca abundancia de alfa-metil-acilCoA racemasa a nivel intestinal o por la demanda de energía y otros adyuvantes que requiere el accionar de esta enzima⁸⁰.

Cuando se secreta jugo pancreático hacia el duodeno, el importante volumen se esparce sobre una extensa zona del yeyuno, aumentando significativamente el pH intestinal, junto con moléculas de fármaco que pudieran estar presentes a ese nivel. Esparcir las moléculas sobre una mayor extensión de intestino delgado y elevar el pH luminal hace que la permeación hacia los enterocitos desde el lumen sea más lenta (por ionización de Ibuprofeno), pero una vez dentro de ellos, más enzimas dispondrían de las moléculas (más enterocitos entran en juego), evitando aproximarse a situaciones cinéticas de tipo Michaelis-Menten, manteniendo así vigentes las cinéticas de primer orden en la metabolización intestinal. Al momento del vertido de este fluido, el mecanismo es análogo tanto si se considera que la dosis de Ibuprofeno proviene desde el estómago tras una administración oral junto con comidas (presistémico), o desde el medio interno (sistémico) por procesos de recirculación plasma-tracto gastrointestinal-plasma. Esto podría explicar también una eventual pérdida de biodisponibilidad al administrar sacarosa junto a la dosis de Ibuprofeno. En ayuno la permeación sería más rápida y enfrentaría menos carga enzimática respecto al sistema COMIDA.

Resumiendo, el cambio en la distribución del gasto cardíaco dado por la ingesta de sacarosa y/o comidas, favorece el pasaje de una mayor cantidad de moléculas de fármaco a través del enterocito. Esto se ve aún más exacerbado al ocurrir procesos de recirculación entre el plasma y el jugo pancreático, aumentando la conversión R-en-S.

La Figura 4.6. muestra los cambios que podrían observarse en un sistema donde se ingieran continuas comidas e ilustra el impacto que estos podrían tener sobre la eliminación del fármaco a nivel intestinal, incluida la ruta metabólica de inversión quiral.

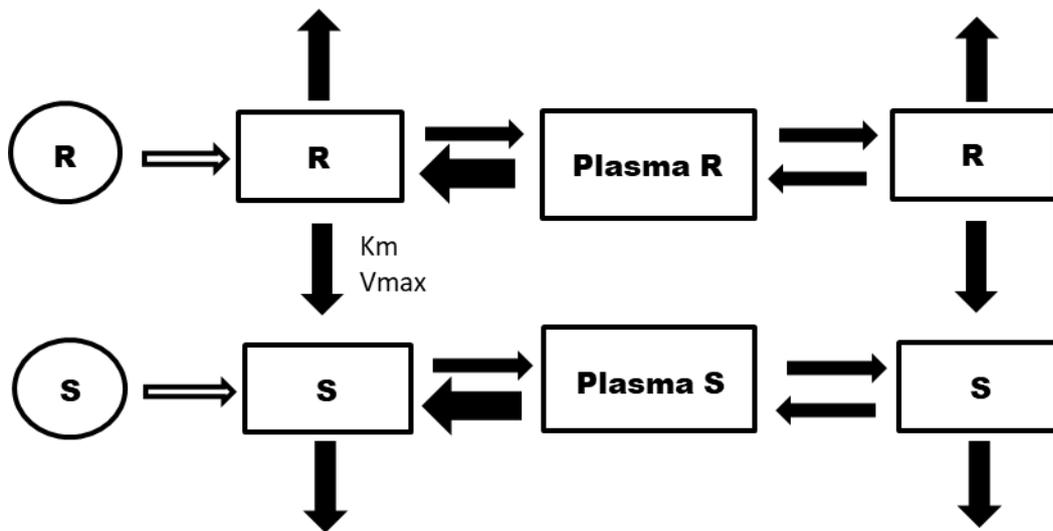


Figura 4.6. Modelo compartimental de Ibufeno para el sistema AYUNO, donde el flujo sanguíneo aumenta hacia zona esplácnica provocando un incremento del clearance intestinal del fármaco. Las flechas huecas denotan un ingreso más lento, y las flechas sólidas ensanchadas, denotan mayor intensidad (velocidad) de la transferencia.

Por otro lado, se observaron diferencias en la exposición a los isómeros para los distintos sexos. Las mujeres produjeron 60% más AUC R que los hombres en el sistema AYUNO, en tanto que resultaron prácticamente iguales las áreas en el sistema COMIDA. Las AUC S fueron similares entre los sexos en ambos sistemas. Al comparar áreas bajo la curva, se hace una comparación de clearance aparente (CL/F) entre sexos. El mayor tamaño corporal de los hombres provoca menores concentraciones plasmáticas, pudiendo evitar la saturación de algunos procesos saturables, como la conversión entre isómeros. Por tanto, ya en ayuno habría una mayor tasa de conversión de R-IBF frente a las mujeres. En el hombre, el cociente S/R fue mayor a 1 en todas las fases del estudio.

Se observa una mayor disminución del AUC R en el sistema COMIDA respecto al AYUNO en mujeres que en hombres. Considerando lo antes mencionado, el aumento en la tasa de conversión R-en-S y en otras rutas de metabolización saturables, podría ser mayor para las mujeres. La mayor alcalinización intestinal provocada por la secreción pancreática en éstas, pudo asimismo haber incrementado más que en el hombre la pérdida de biodisponibilidad, debido a la ionización del fármaco, cuando se pasó al sistema COMIDA.

Conclusiones

Se podría concluir que la administración conjunta de Ibufeno con las comidas, o con sacarosa, llevaría a un incremento de la biodisponibilidad del agente activo (S-IBF), pero al mismo tiempo un aumento de su clearance, tras lo cual no se lograría un aumento de su exposición sistémica.

Una estrategia farmacéutica podría ser la elaboración de gránulos con cubierta gastro resistente conteniendo bicarbonato de sodio e ibuprofeno. La prolongada duración del

vaciamiento gástrico lo proporcionaría el sistema multi particulado disperso en la cavidad estomacal. Los gránulos que se viertan al intestino descargarán el fármaco en un medio alcalino (provocado por la neutralización y alcalinización que el bicarbonato hará del jugo gástrico acompañante), evitando así la secreción pancreática y el proceso de redistribución de gasto cardíaco propiciado por la ingesta de comida. Un importante suministro de agua podría hacer que el vertido gástrico al intestino se desparramara sobre una mayor extensión del órgano, favoreciendo así la conversión R-en-S.

Capítulo 5: Alteración del patrón de estereoselectividad en la metabolización de Metadona causada por procesos de recirculación plasma- tracto gastrointestinal- plasma

Objetivos del estudio

El objetivo principal del estudio fue detectar cambios en la relación entre isómeros luego de posibles procesos de recirculación plasma- tracto gastrointestinal- plasma, favorecidos mediante la ingesta de comida. Además, evaluar la contribución del metabolismo a nivel intestinal respecto al hepático en la eliminación de Metadona (MTD).

Para cumplir con el objetivo, se monitorean los isómeros de Metadona en plasma, saliva y orina. En orina se miden, además, los niveles de su metabolito principal: EDDP.

Metodología

Fase clínica

Seis mujeres y seis hombres de entre 18 y 42 años con una media de peso (\pm DS) de 52,8 (\pm 6.6) y 68.8 (\pm 9.6) kg, respectivamente, fueron sometidos a un estudio en el que se les administró una dosis oral única de 10 mg de Metadona (Laboratorios Lazar, Montevideo, Uruguay) en ayuno. La dosis fue elegida en base a un reporte previo de un estudio donde se administraron 0,2 mg/kg⁸¹. Nuestro grupo tiene experiencia trabajando con la Unidad Interdisciplinaria del Dolor del Hospital de Clínicas, ahora situada en el Hospital Maciel, y esta es la menor dosis que se administra a los pacientes⁵⁶. Treinta minutos antes de la administración del medicamento, se administran 10 mg de Metoclopramida con el objetivo de prevenir la aparición de náuseas y vómitos, un efecto adverso que se ve muy comúnmente tras el uso clínico de Metadona.

Tras la administración del medicamento, se ingiere un almuerzo a las 4 horas post dosis y comidas livianas cada tres horas (7 y 10 horas post dosis), hasta la cena a las 13 horas post dosis.

El protocolo mediante el cual fue llevado a cabo el estudio fue diseñado de acuerdo a guías sobre investigación clínica y fue aprobado por la Comisión de Ética de la Facultad de Química (Uruguay). Se obtuvo un consentimiento informado para cada voluntario previo a su ingreso al estudio. El estudio se realizó en CEBIOBE.

Fase analítica

Se tomaron muestras de sangre de la vena anticubital mediante cánula hacia un tubo heparinizado. Se separó el plasma por centrifugación. Las muestras salivales se extrajeron en tubos de plástico tras la estimulación mediante masticación de parafilm. Las muestras plasmáticas y salivales fueron tomadas a las 0 (previo a la administración de la dosis) y a las 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 36 y 48 horas post dosis. La orina

fue tomada a las 0 (previo a la administración de la dosis) y al final de los siguientes intervalos 0-2, 2-4, 4-7, 7-8.5, 8.5-10, 10-11.5, 11.5-13, 13-14.5, 14.5-16, 16-24 horas post dosis. Se almacenan alícuotas de las muestras de orina recogidas para su análisis. Inmediatamente luego del muestreo, se mide el pH de la orina. Ambos fluidos fueron almacenados a -25°C hasta su análisis.

La preparación de muestra consistió en extracción de Metadona y EDDP con una mezcla de Hexano y Alcohol Isoamílico desde 2,0 mL de plasma o 1,0 mL de saliva u orina alcalinizados, evaporación de la fase orgánica en baño seco bajo corriente de nitrógeno y reconstitución del residuo seco con fase móvil. Se utilizaron 50 μL de una solución de Imipramina (10,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como estándar interno. La cuantificación de Metadona (en todos los fluidos) y de EDDP (en orina) se realizó mediante un método quiral validado de HPLC UV que fue una adaptación de un método previamente publicado⁸². Las fases móviles consistieron en un buffer fosfato 20mM pH 6,0 + 2mM diisopropil amina y Acetonitrilo en una proporción de 92/8 para la determinación en orina y, buffer fosfato 20mM pH 7,0 + 2mM diisopropil amina y Acetonitrilo en una proporción de 82/18 para la determinación en plasma y saliva. El flujo de fase móvil fue de 0,7 mL/min. Se usó una columna de fase estacionaria quiral CHIRALPACK AGP™ (100 x 4 mm; 5 μm), con guarda columna de sílica. El detector midió a 215 nm. El análisis fue llevado a cabo a 25°C y el volumen de inyección fue de 80 μL . Se probó linealidad para la determinación de Metadona en el rango de 4,90 hasta 108 ng/mL, 4,09 hasta 164 ng/mL y de 19,0 hasta 3280 ng/mL para muestras plasmáticas, salivales y urinarias, respectivamente. La linealidad para la determinación de EDDP en orina se probó desde 52,3 hasta 4200 ng/mL. Para concentraciones localizadas en las porciones bajas, medias y altas de la curva de calibración, se obtuvieron coeficientes de variación intra- e inter-día (precisión) y errores relativos (exactitud) por debajo de 14%.

Fase estadística

Se construyen perfiles de concentración plasmática y salival de Metadona en función del tiempo. Para las muestras urinarias se transforma la concentración determinada en velocidades de excreción, multiplicando por el volumen de orina recogido y dividiendo el valor entre el intervalo de tiempo en el que se obtuvo la muestra correspondiente. Luego, se construye una curva asignando este valor al tiempo medio del intervalo de recogida.

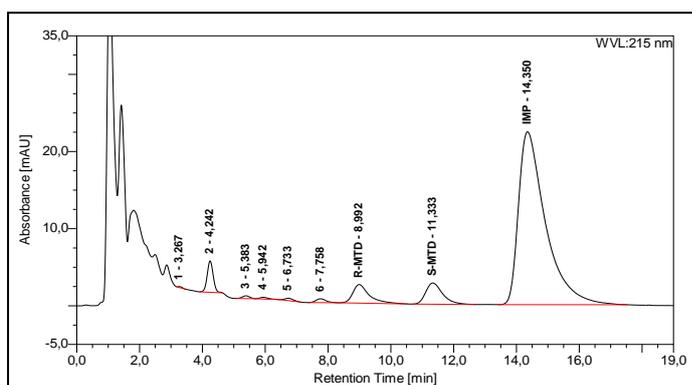
Se calculan los siguientes parámetros farmacocinéticos para ambos sexos y para cada enantiómero por separado: la máxima concentración experimental ($C_{\text{MÁX}}$) en plasma y saliva, la mediana del tiempo en que se alcanzó la misma ($T_{\text{MÁX}}$), el área bajo la curva de concentraciones plasmáticas vs tiempo desde 0 (o T_0) hasta el tiempo de la última concentración cuantificable (T) (AUC_T), la semivida de eliminación plasmática ($t_{1/2}$) y la cantidad excretada (U) de MTD y EDDP.

Se calcula el cociente de concentraciones plasmáticas R/S y los cocientes de velocidad de excreción R/S, de manera de obtener información respecto a los clearances relativos de los isómeros de Metadona. Por otro lado, también se calcula el cociente de velocidad de excreción R/S para EDDP que evidencia la estereoselectividad de la eliminación de Metadona mediante la formación de este metabolito.

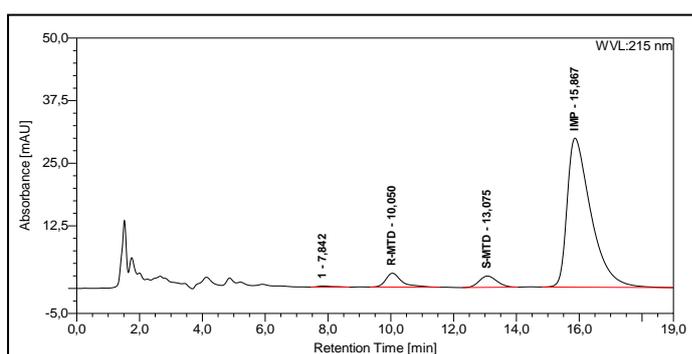
Resultados y discusión

En la Figura 5.1. se muestran, a modo de ejemplo, cromatogramas obtenidos tras la determinación de Metadona en plasma, saliva y orina, mediante el método de HPLC-UV quiral desarrollado y validado. En orina se determina también EDDP.

a)



b)



c)

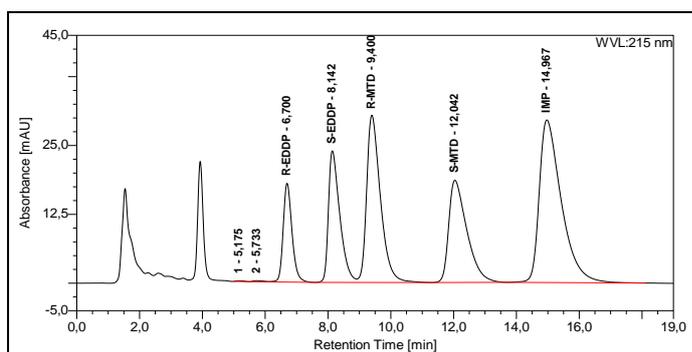


Figura 5.1. Cromatograma correspondiente a la determinación de Metadona en el voluntario 1 en: a) plasma obtenido a las 3 horas post dosis, b) saliva obtenida a las 0,5 horas post dosis y, c) orina obtenida en el intervalo entre 8,5-10 horas post dosis. En orina también se determina EDDP.

Las tablas 5.1. y 5.2. resumen algunos de los resultados obtenidos.

		$t_{1/2}$ ± DE (h)		AUC (0-24) ± DE (ng*h/mL)		AUC (0-inf) ± DE (ng*h/mL)		C_{MAX} ± DE (ng/mL)		T_{MAX} (rango) ^a (h)	
		R	S	R	S	R	S	R	S	R	S
		PLASMA	Mujeres	27.3 ±12.6	22.1 ±7.8	190 ^b ±61	302 ^b ±89	327 ^c ±213	502 ^c ±295	18.6 ^b ±10.3	32.2 ^b ±8.4
Hombres	25.0 ±4.7		24.6 ±6.8	192 ^b ±101	304 ^b ±118	374 ^c ±87	579 ^c ±138	17.5 ^b ±7.9	31.0 ^b ±6.3	3.0 (1.0- 10)	2.0 (1.0- 8.0)

^a mediana (rango).

^b $p < 0.01$, test t- student pareado entre isómeros

^c $p < 0.05$, test t- student pareado entre isómeros

Tabla 5.1. Parámetros farmacocinéticos plasmáticos medios (± DE) obtenidos en hombres y mujeres para los isómeros de Metadona luego de la administración oral de 10 mg del fármaco.

	U (0-24) * ± DE (µg)			
	MTD		EDDP	
	R	S	R	S
Mujeres	312 ± 175	270 ± 166	248 ± 88	463 ± 203
Hombres	472 ± 1221	340 ± 178	310 ± 136	606 ± 272

Tabla 5.2. Cantidades medias excretadas en orina (± SD) de MTD y EDDP para hombres y mujeres en las primeras 24 horas luego de la administración oral de 10 mg de Metadona.

Las Figuras 5.2.-5.4. muestran la exposición media en plasma, saliva y orina de los enantiómeros tras la administración oral de 10 mg de una mezcla racémica de Metadona en mujeres y hombres, respectivamente. Luego de las 24 horas post dosis la mayor parte de los voluntarios exhibe concentraciones de Metadona por debajo del límite de cuantificación por lo que se analizan los resultados hasta este tiempo únicamente.

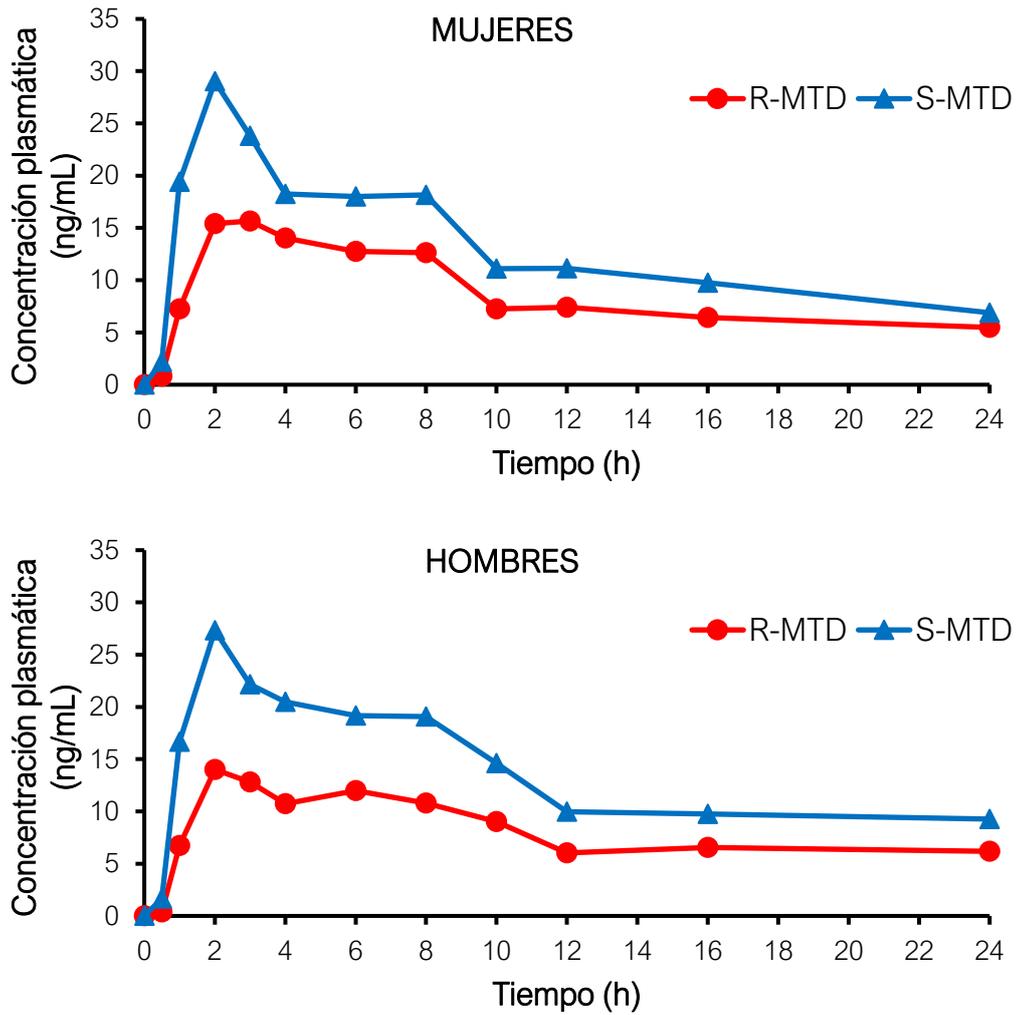


Figura 5.2. Concentración plasmática media de los isómeros R y S de Metadona obtenidas en hombres (n=6) y mujeres (n=6), luego de la administración oral de 10 mg de Metadona.

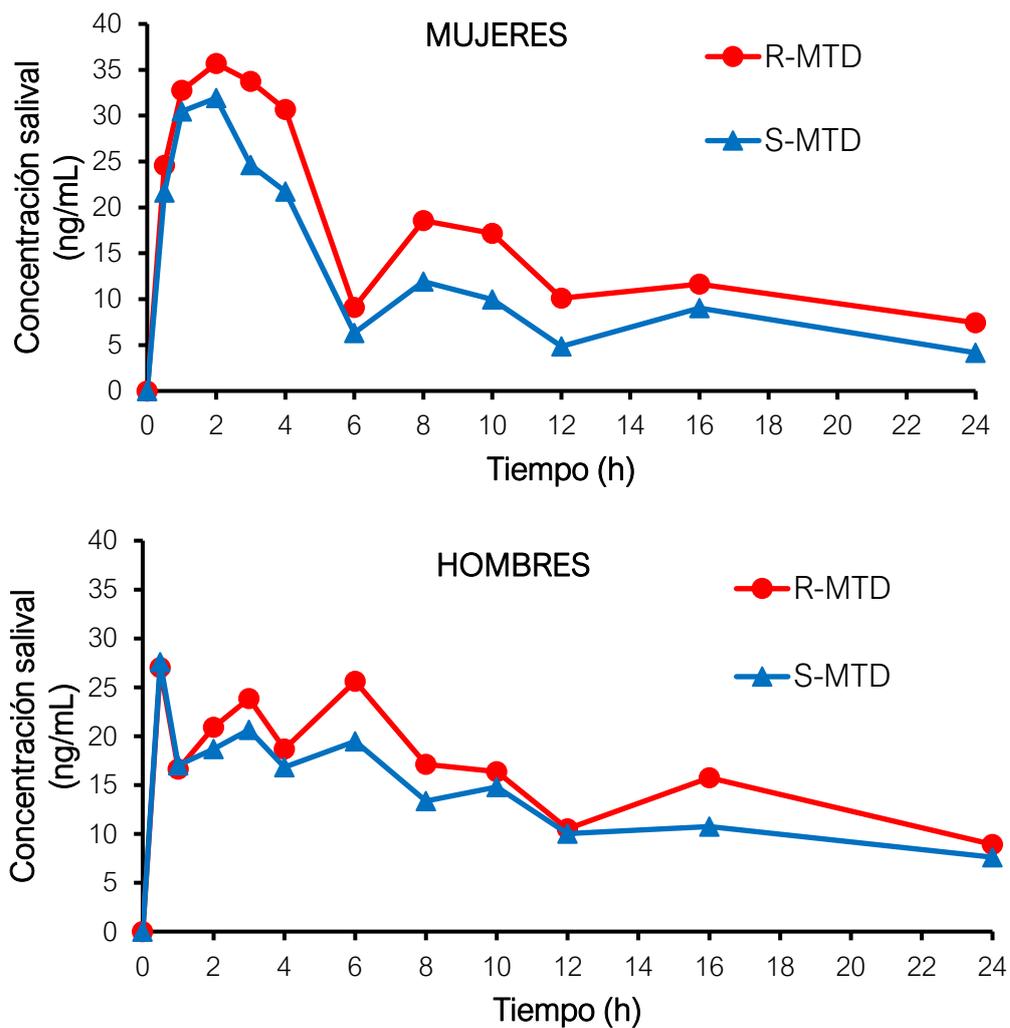


Figura 5.3. Concentración salival media de los isómeros R y S de Metadona obtenidas en hombres (n=6) y mujeres (n=6), luego de la administración oral de 10 mg de Metadona.

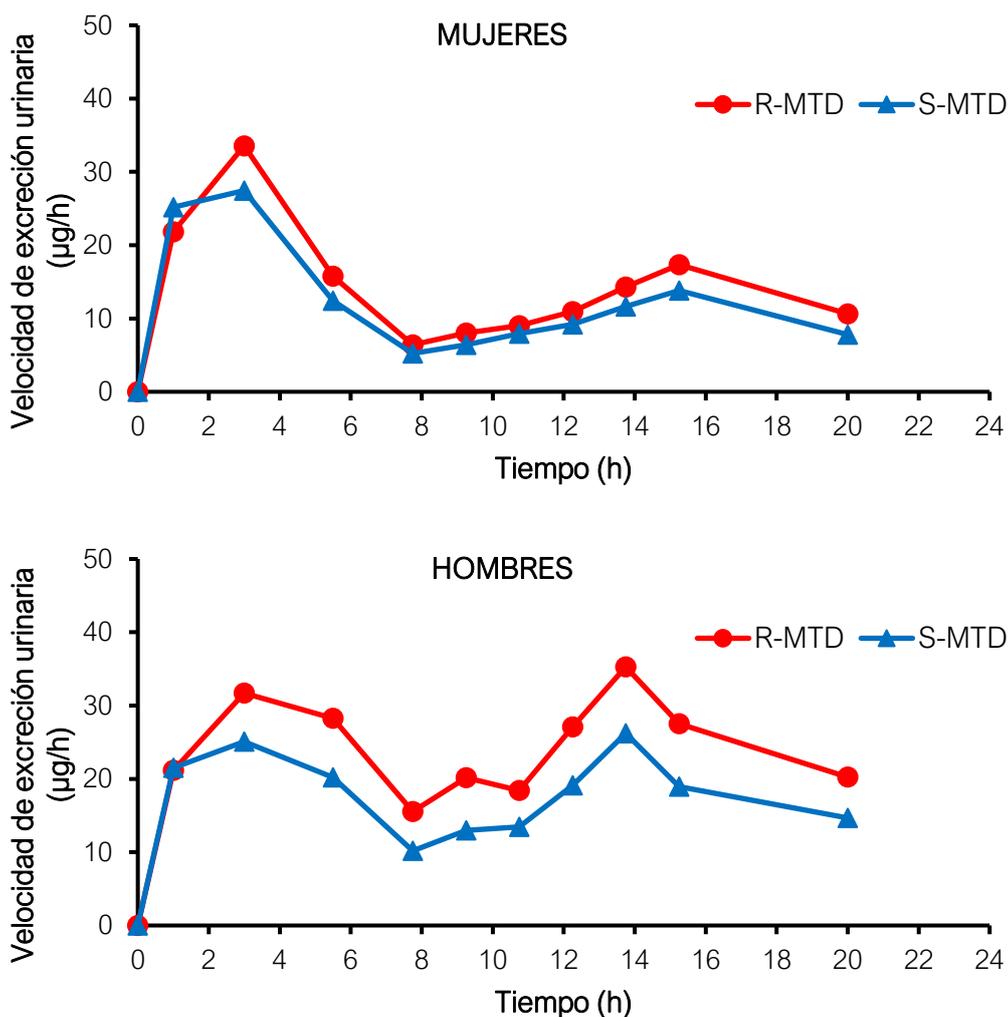


Figure 5.4. Velocidad de excreción urinaria media de los isómeros R y S de Metadona obtenidas en hombres (n=6) y mujeres (n=6), luego de la administración oral de 10 mg de Metadona.

Tanto hombres como mujeres presentan menores concentraciones plasmáticas del isómero R ($p < 0.001$) respecto al S (Figura 5.2.). Sin embargo, como se observa en las figuras 5.3 y 5.4, la exposición salival y urinaria muestra una relación inversa entre isómeros ($p < 0.01$).

El grupo de mujeres experimentó más efectos adversos que los hombres, principalmente náuseas. Las diferencias entre sexos pueden afectar la eficacia y seguridad de los tratamientos⁸³. La actividad farmacológica del isómero R, responsable del efecto sobre los receptores μ , se infiere de manera más adecuada a partir de concentraciones plasmáticas libres y no totales. Como se mencionó anteriormente, las concentraciones salivales y urinarias pueden subrogar la determinación de concentraciones plasmáticas libres. Entonces, las mayores concentraciones obtenidas para el isómero R en estos fluidos para mujeres respecto a hombres (Figura 5.3 y 5.4.), pueden correlacionarse con la prevalencia de efectos adversos en este grupo, sobre todo a tiempos cercano al T_{MAX} .

Respecto a los resultados plasmáticos, la mayor unión a proteínas plasmáticas que presenta el isómero S tiene como consecuencia un mayor nivel de exposición para este isómero (o sea un menor clearance). El cociente R/S respondería exclusivamente a la diferencia de clearance, resultando por tanto un valor menor a 1. Sin embargo, la evolución temporal de dicho cociente de concentraciones dependerá de las diferencias en absorción y disposición entre ambos isómeros. Según otros estudios de la literatura, la semivida de eliminación de R-MTD es mayor que la de su enantiómero, aunque en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas. El cociente R/S irá aumentando luego de finalizada la fase de absorción. Parece una contradicción que el isómero R presente un mayor clearance pero también mayor semivida de eliminación (mayor permanencia en el organismo). Esto podría indicar que la diferencia en las fracciones libres de los isómeros es tal, que al analizar clearance de fármaco total (libre + unido), incluso logra enmascarar una estereoselectividad en el metabolismo de Metadona, en favor del isómero S. Específicamente se menciona el metabolismo ya que no se ha referenciado estereoselectividad en la excreción renal de Metadona ⁵⁷. Nuevamente, las concentraciones libres serían más apropiadas para el análisis de la eliminación relativa entre isómeros.

Tanto hombres como mujeres presentaron segundos picos en los perfiles de concentración plasmática y salival en función del tiempo, evidenciando una posible recirculación plasma- tracto gastrointestinal- plasma, como se esperaba ^{55, 56}.

En este caso, los resultados en saliva fueron difíciles de analizar debido a los efectos adversos a nivel gastrointestinal (náuseas con reflujo) que presentaron las mujeres, pudiendo haber ocurrido contaminación de las muestras salivales. Además, en general, se recolectaron bajos volúmenes de muestra lo que dificultó la determinación analítica de Metadona en este fluido. Igualmente se calcularon los cocientes de concentraciones Saliva/Plasma (S/P) como indicadores de procesos de recirculación para los hombres, con la desventaja de que disminuye mucho el número de individuos para el análisis. Los cocientes se corrigen de acuerdo a la ecuación de Henderson-Hasselbach debido a la variabilidad del pH que presentan las muestras salivales. La Figura 5.5. muestra los resultados de los cocientes corregidos.

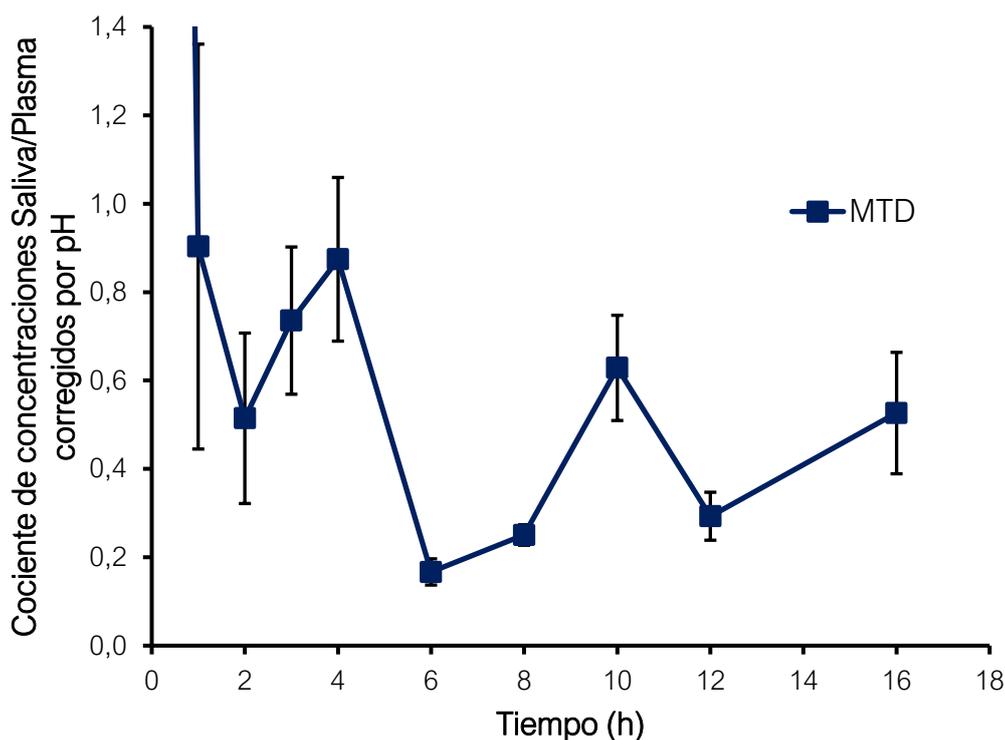


Figura 5.5. Cocientes medios (\pm DE, n=6) de concentraciones Saliva/Plasma para Metadona en hombres, luego de la administración oral de 10 mg del fármaco.

La media para los cocientes S/P fueron aproximadamente el doble para R-MTD respecto a S-MTD, aún mayor que la referenciada para el cociente de fracciones libres (1,4-1,5)^{39, 81}. Se observa un pico al inicio de la absorción, seguido por un pico a las 4 horas post dosis y otros más chicos a las 10 y 16 horas post dosis. Estos picos podrían evidenciar re entradas de fármaco debido a procesos de recirculación tras la ingesta de comidas.

En cuanto a la tasa de excreción del fármaco, aunque factores como la afinidad por transportadores de eflujo y el pH urinario pueden afectar el pasaje del fármaco hacia orina, las concentraciones urinarias de Metadona podrían también correlacionarse con los niveles plasmáticos libre de fármaco.

En primer lugar, se observa una caída de las concentraciones urinarias luego del almuerzo. Esto pudo deberse a un aumento del pH urinario tras la ingesta de comidas, tal como se referencia en la bibliografía (marea alcalina postprandial⁸⁴), a causa de una compensación frente al fuerte incremento del bicarbonato sanguíneo como consecuencia de la importante secreción ácida a nivel estomacal, lo que provocaría un aumento de la tasa de reabsorción tubular de Metadona.

Por otro lado, se observa una mayor velocidad de excreción urinaria para el isómero R. No se referencian diferencias en la excreción renal entre isómeros de Metadona tras la administración de una dosis única, ni aumento en la expresión de transportadores en tan corto lapso⁵⁷. La mayor velocidad de excreción que presenta el isómero R ($p < 0.01$)

respecto al S indicaría un mayor nivel de R libre en plasma, revelando así su menor clearance intrínseco como consecuencia de una eventual estereoselectividad en el metabolismo de la Metadona, en favor del isómero S.

La exposición media del metabolito EDDP en orina se muestra en la Figura 5.6

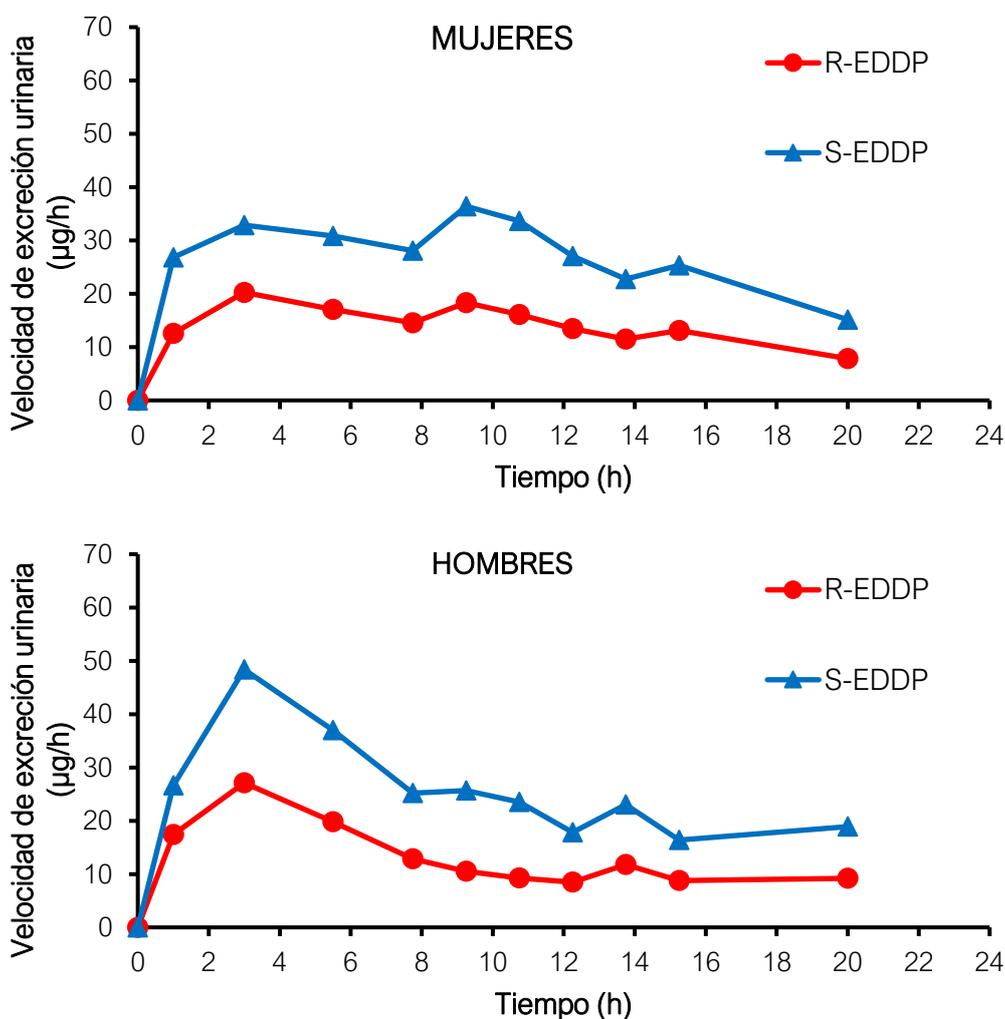


Figure 5.6. Velocidad de excreción urinaria media de los isómeros R y S de metabolito (EDDP) obtenidas en hombres (n=6) y mujeres (n=6), luego de la administración oral de 10 mg de Metadona.

También se observa una mayor velocidad de excreción urinaria para S-EDDP, lo cual podría explicarse por su mayor biodisponibilidad (mayor formación), aunque no se dispone de información respecto a la posible estereoselectividad del clearance de ambos metabolitos.

La Figura 5.7 muestra la evolución a lo largo del tiempo de los cocientes de velocidades de excreción urinaria entre isómeros, para Metadona y EDDP.

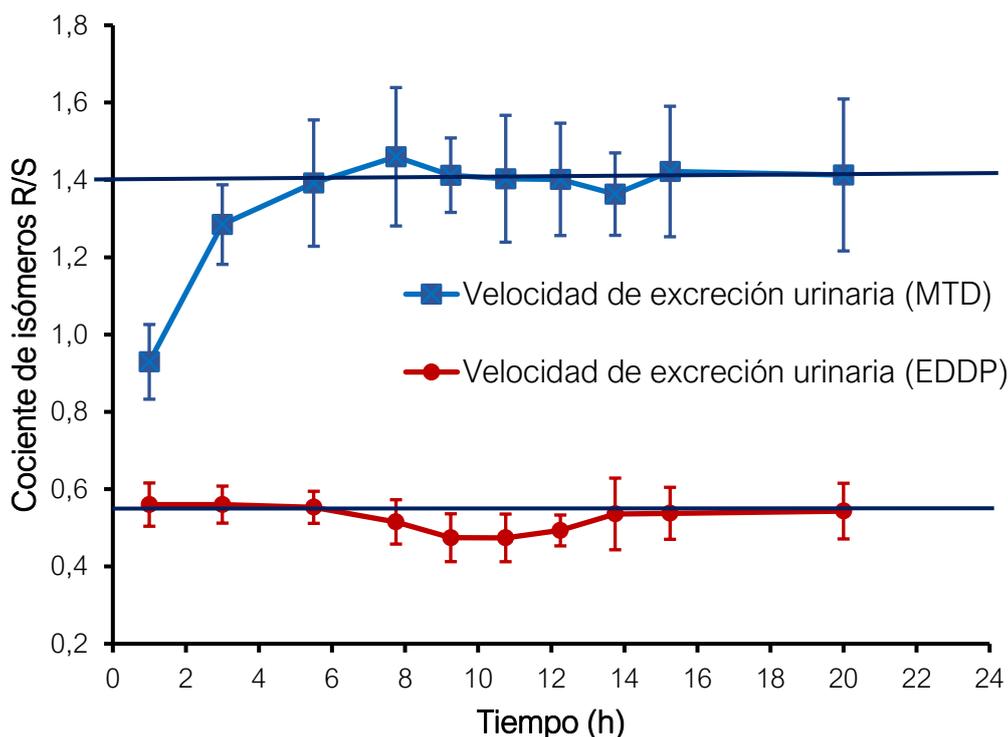


Figura 5.7. Cocientes medios (\pm 95%CI, n=12) de velocidad de excreción entre isómeros (R/S) para Metadona y su metabolito (EDDP), luego de la administración oral de 10 mg de Metadona. Se observa un descenso significativo del cociente de isómeros para EDDP respecto al valor basal de 0,55, entre las 8 y 12 horas post dosis.

Los perfiles de velocidad de excreción urinaria muestran un cociente de concentraciones R/S constante luego de haberse finalizado el proceso de absorción, en concordancia con la no diferencia significativa observada en las semividas de eliminación calculadas para los isómeros, como puede verse en la Tabla 5.1.

El cociente de concentraciones urinarias R/S para el metabolito es prácticamente constante desde el inicio del estudio, a excepción de tiempos posteriores a la ingesta de comidas. Dada la baja cantidad de EDDP presente sistémicamente (alrededor de un 10% de la dosis de MTD se convierte en EDDP¹³), cualquier estereoselectividad en su formación puede afectar significativamente el balance entre R y S- EDDP. El mayor cambio se observa entre las 3 y 7 horas post almuerzo. A estos tiempos podrían haber ocurrido procesos de recirculación, como consecuencia de las secreciones gástricas estimuladas por la ingesta del almuerzo y posteriores comidas livianas. Es poco probable que esta recirculación pudiese afectar el cociente R/S de concentraciones plasmáticas de Metadona ya que una baja cantidad de fármaco (fracción libre) estaría cursando este ciclo, ni tampoco el cociente R/S de velocidades de excreción urinaria, dado que cualquier afectación en las concentraciones libres por biotransformación estereoselectiva de alguno de los isómeros sería eficientemente amortiguada por el remanente unido a las proteínas plasmáticas. Es importante recordar que para Metadona

no existe bioconversión de un isómero en el otro, y que la velocidad de su biotransformación es muy inferior a la que se registra para en los fármacos arilpropiónicos aludidos en los capítulos previos.

Cuando ocurre un proceso de recirculación tras la ingesta de comidas, las moléculas secretadas gástricamente atraviesan nuevamente los enterocitos. Al ocurrir esto, los cocientes urinarios R/S para el metabolito, cambiaron. Es importante considerar nuevamente que, para la digestión de la comida, aumenta la distribución del gasto cardíaco hacia zona esplácnica, por lo que estos órganos reciben mayor cantidad de moléculas de fármaco en este período. Para fármacos secretados hacia jugo gástrico, la fracción que recibe el intestino es aún mayor ya que una cantidad suplementaria de moléculas, destinadas originalmente al estómago y posteriormente transportadas hacia lumen gástrico debido a la inducción de producción de jugo gástrico, alcanza el enterocito.

El cambio en el cociente de concentraciones urinarias R-EDDP/S-EDDP, podría explicarse entonces por un diferente patrón estereoselectivo en la metabolización de sus precursores entre enterocitos y hepatocitos. Es decir, si ambos órganos metabolizaran los isómeros de Metadona con el mismo patrón estereoselectivo, el aumento en la llegada de moléculas de fármaco al intestino no debería modificar la relación de isómeros de sus productos. Por lo tanto, es muy probable que la composición de enzimas biotransformadoras en intestino e hígado sea diferente, ya que es sabido que diferentes enzimas convierten MTD en EDDP y cada uno de ellas con diferente estereoselectividad. El metabolismo del isómero S-MTD parece verse favorecido en su pasaje a través del intestino. Por ejemplo, el intestino podría presentar mayor cantidad relativa de CYP3A4 (no estereoselectiva) respecto a CYP2C19 (estereoselectiva en favor del isómero R), en relación al hígado.

Es muy interesante mencionar que la enzima CYP2B6, habitualmente referida como de exclusiva localización hepática y estereoselectiva en favor de la biotransformación de S-MTD hacia S-EDDP, podría también hallarse en el intestino, tal como recientemente se ha comunicado⁸⁵. Por consiguiente, otra enzima intestinal a favor de la producción de S-EDDP estaría recibiendo una mayor carga de sustrato respecto a la situación basal, fruto del pasaje inducido tras la secreción gástrica por causa de la comida, y así contribuir a disminuir el cociente post-prandial R/S de EDDP. La estratégica posición del intestino entre el centro de la circulación sistémica y el hígado, favorecido para recibir solutos sistémicos también desde la membrana apical cuando se favorece la secreción de jugos digestivos, hace que juegue un papel trascendente en la biotransformación de tales sustratos.

La mayor formación de S-EDDP respecto a R-EDDP puede haber sido más pronunciada en hombres respecto a mujeres, debido a su mayor producción de jugo gástrico. Sin embargo, no se obtiene significancia para la diferencia observada probablemente debido al bajo número de sujetos participantes del estudio.

Estos resultados no contradicen lo reportado respecto a la falta de estereoselectividad durante la absorción de Metadona luego de la administración oral de una mezcla

racémica ⁸⁶. Al absorberse la dosis desde la formulación, la cantidad de fármaco presente a nivel intestinal, podría ser suficiente para saturar la biotransformación presistémica de ambos isómeros y, por lo tanto, ser el proceso gobernante la absorción de primer orden. Es preciso recordar que tras la primera administración del fármaco, aún no se indujeron las enzimas ni los transportadores de eflujo. Esto explicaría la alta y no estereoselectiva biodisponibilidad de la Metadona ³⁸.

Conclusiones

Estos resultados evidencian no solo que el metabolismo intestinal de MTD es relevante, sino que también estereoselectivo y diferente al hepático. Muchas veces los procesos de recirculación aumentan el tiempo de residencia de las moléculas en el organismo, sin embargo, en este caso, el isómero S podría no favorecerse de este proceso ya que cada vez que atraviesa el enterocito aumenta su eliminación.

Capítulo 6: Conclusiones generales

La respuesta clínica de un paciente tras un tratamiento farmacológico está condicionada, entre otras cosas, por la respuesta farmacocinética al fármaco. Esta respuesta es muy variable entre individuos y dependiente de distintos procesos y factores. Profundizar en estos aspectos tiene gran impacto sobre el perfil de seguridad y eficacia de los tratamientos, permitiendo la individualización de la terapia para lograr un uso racional de medicamentos. Como se expuso en la presente tesis, procesos de recirculación plasma-tracto gastrointestinal-plasma y, en algunos casos, consecuente inversión quiral, originan modificaciones perceptibles en los perfiles de concentración de fármaco a lo largo del tiempo.

La investigación realizada demostró la recirculación a la que son sometidos algunos fármacos. El seguimiento del proceso fue posible a través de diferentes fluidos biológicos como el plasma, la saliva y la orina. En algunos casos, incluso se lograron observar segundos picos en las curvas de concentración, evidenciando re ingresos de fármaco. Particularmente para Metadona, pudo comprobarse que el cociente Saliva/ Plasma es útil en la detección de este tipo de procesos como indicador del cociente de concentraciones arteriales/venosas. Sin embargo, también pudo observarse que el análisis de los resultados puede no ser simple debido a la alta variabilidad en la determinación de fármacos en saliva y la dificultad que se presenta cuando los volúmenes extraídos son pequeños.

Parece altamente probable que fármacos ionizables como los estudiados, recirculen a través de fluidos como el jugo gástrico o el jugo pancreático. Si bien no se comprobó mediante la determinación de fármaco a nivel de estos fluidos, el hecho de que la sacarosa, siendo un importante estimulante de la secreción pancreática, favoreciera el proceso para el Ibuprofeno, hace pensar que la hipótesis es factible.

Se pudo determinar que el modo de administración fue un factor influyente sobre este proceso. Tras la ingesta de comidas, ocurre un aumento del gasto cardíaco esplácnico, incluso de hasta un 50% para páncreas e intestino, exacerbando procesos de recirculación plasma- tracto gastrointestinal- plasma. Sin embargo, en estas condiciones, el clearance intestinal podría verse aumentado por encima de lo previsto por el aumento del gasto cardíaco esplácnico. El gradiente de pH existente entre plasma y jugo pancreático, y entre plasma y jugo gástrico, así como el aumentado flujo sanguíneo, permitiría una gran secreción de moléculas hacia estos fluidos. De esta manera, una cantidad suplementaria de moléculas, destinadas originalmente al páncreas o estómago, alcanzan el enterocito y se ve aún más incrementado el clearance intestinal del fármaco, lo que puede disminuir la exposición al mismo. Por otra parte, la quita de estas moléculas secretadas al suministro hepático por medio de la vena porta, podría evitar el incremento del clearance hepático por aumento del gasto cardíaco esplácnico, e incluso podría asumirse constante entre un sistema en ayuno y un sistema en el que se administran comidas frecuentemente.

En fármacos que además presenten isomería, este proceso también influiría sobre la tasa de inversión quiral. Como se explicó, una de las posibles rutas de metabolización de

fármacos estereoisómeros es justamente la conversión de un isómero en otro. Durante la presente investigación, se utilizó el cociente de concentraciones S/R como indicador de este proceso. Repetidamente se evidenció que luego de la ingesta de comidas, el cociente modificaba la tendencia que seguía. Dado lo expuesto anteriormente respecto a la influencia de las comidas, y la consecuente redistribución de flujo, sobre el clearance intestinal y hepático de los fármacos, se puede concluir que el intestino cumple un rol muy importante en la metabolización de los mismos. Asimismo, considerando los resultados obtenidos y el mecanismo por el cuál ocurre la inversión quiral, la localización del proceso en el enterocito parece altamente probable.

El impacto del modo de administración no es el mismo cuando se trata de diferentes fármacos. Muchas veces los procesos de recirculación aumentan el tiempo de residencia de las moléculas en el organismo, prolongando su acción, sin embargo, en algunos fármacos, como para Metadona, el isómero S podría no favorecerse de este proceso ya que cada vez que atraviesa el enterocito aumenta su eliminación. Para los AINES, la ingesta de comidas podría en algunos casos promover la relación entre isómeros que resulta más beneficiosa para la terapia, al favorecer la conversión R-en-S, pero en otros casos, como para Ibuprofeno, podría no impactar sobre la exposición al isómero activo ya que la mayor tasa de conversión no logra compensar el gran aumento de clearance intestinal que se ve para ambos isómeros.

En conclusión, parece claro que los procesos de recirculación plasma-tracto gastrointestinal-plasma estimulados por la ingesta de comidas, influyen sobre los perfiles de seguridad y eficacia de los fármacos. Serían de particular importancia los fármacos estereoisómeros ya que su exposición se ve afectada de manera disímil, y sus perfiles farmacodinámicos pueden ser diferentes entre sí. Sin embargo, estos factores no afectan de manera uniforme a todos los fármacos y debe considerarse cada caso en particular para poder hacer una recomendación respecto, por ejemplo, al modo de administración. Por esto es interesante destacar, que este tipo de investigaciones, si bien aportan valiosa información respecto a la farmacocinética de determinados fármacos, principalmente constituyen herramientas poderosas para el entendimiento de la fisiología, lo que permite la aplicación del conocimiento a diferentes casos.

Otro factor que demostró condicionar de manera importante la farmacocinética de los fármacos estudiados, fueron las diferencias fisiológicas entre hombre y mujeres. Se observó el más lento vaciado gástrico de las mujeres respecto los hombres y, principalmente, su mayor pH intestinal. Esta diferencia de pH a nivel intestinal, indujo una pérdida de biodisponibilidad desde una formulación de liberación modificada respecto a una formulación de liberación inmediata, en mujeres. Quizás, la diferencia de pH entre sexos en las primeras porciones del intestino no sea suficiente para impactar sobre la biodisponibilidad de formulaciones de liberación inmediata que liberan completamente su contenido en esta zona. Sin embargo, el impacto sí podría ser significativo en formulaciones de liberación prolongada cuya liberación se prolonga a lo largo del intestino. Además, se obtuvo una mayor tasa de conversión en hombres. El mayor tamaño corporal de los hombres provoca menores concentraciones plasmáticas, pudiendo evitar la saturación de algunos procesos saturables, como la conversión entre isómeros.

Estos resultados y las diferencias entre sexos, pudieron reproducirse *in vitro*. Los ensayos de disolución *in vitro* utilizando el aparato USP IV, junto con los coeficientes de distribución en n-octanol, fueron una herramienta útil de predicción de la absorción oral de fármacos ionizables, y por lo tanto su biodisponibilidad. El aparato de disolución utilizado logra simular el más lento vaciado gástrico que presentan las mujeres, su menor peristaltismo y su mayor pH intestinal. Estos ensayos permitirían prever resultados terapéuticos de manera más rápida y económica con el fin de realizar recomendaciones iniciales respecto a un tratamiento, que luego deberán confirmarse mediante estudios *in vivo* o en la práctica clínica.

Las diferencias entre sexos pueden afectar también los perfiles de seguridad de un tratamiento como pudo demostrarse cuando se realizó el estudio con Metadona en el que el grupo de mujeres experimentó más efectos adversos que los hombres.

Nuevamente se evidencia, la necesidad de considerar las características individuales de los pacientes a la hora de instaurar un tratamiento.

Resumiendo, se demostró la disímil exposición a los isómeros que puede obtenerse tras la administración de una mezcla racémica y cómo diferentes variables impactan sobre la relación entre los isómeros. Por más que la terapia estereoselectiva resulte beneficiosa, por ejemplo, porque solo uno de los isómeros sea farmacológicamente activo, la mayoría de los fármacos estereoisómeros que se encuentran en el mercado, se administran como racematos debido al coste económico y a la complejidad de la separación de los isómeros. Esto introduce la necesidad de considerar el seguimiento de la terapia con estos medicamentos a través de la determinación de los isómeros por separado, ya que, como se mencionó, el perfil farmacocinético y farmacodinámico de los isómeros puede ser diferente y, por lo tanto, carece de lógica el análisis de la mezcla racémica. En el presente trabajo, se pone de manifiesto la ventaja de la determinación quiral. De otra manera, no hubiese sido posible la detección de los procesos estudiados y el correcto análisis de los resultados. Por otro lado, la información recabada podría ser de utilidad para el desarrollo de formas farmacéuticas innovadoras que permitan un más eficiente uso de la dosis racémica contenida.

Es de destacar la importancia de la investigación, en este caso en farmacocinética y en los factores que impactan sobre la misma, además del entendimiento de diferentes aspectos de la fisiología humana, para lograr un mejor aprovechamiento de los fármacos disponibles en el mercado, promoviendo el uso racional de los mismos, y para guiar e incentivar el desarrollo de nuevos fármacos a nivel nacional, siempre con el fin último de mejorar los perfiles de seguridad y eficacia de los tratamientos farmacológicos en beneficio de los usuarios.

La investigación que dio origen a los resultados presentados en este trabajo de tesis recibió fondos de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación bajo el código POS_NAC_2014_1_102512, de la Comisión Académica de Posgrado y de la Comisión Sectorial de Investigación Científica.



AGENCIA NACIONAL
DE INVESTIGACIÓN
E INNOVACIÓN



Bibliografía

1. Holford N. Dose Response: Pharmacokinetic–Pharmacodynamic Approach. In: *Dose Finding in Drug Development*. ; 2006:73-88. doi:10.1007/0-387-33706-7_6
2. Fagiolino P. *Farmacocinética y Biofarmacia*. 1a edición. Gráfica Mosca; 2017.
3. T. Tozer. Concepts Basic to Pharmacokinetics. *Pharmacol Ther*. 1981;12:109-131.
4. Fagiolino P. *Monitorización de Fármacos En Saliva: Aplicaciones Biofarmacéuticas, Farmacocinéticas y Terapéuticas*. 1a edición. Gráfica Mosca; 1999.
5. Malon RSP, Sadir S, Balakrishnan M, Córcoles EP. Saliva-Based Biosensors: Noninvasive Monitoring Tool for Clinical Diagnostics. *Biomed Res Int*. 2014;2014(i). doi:10.1155/2014/962903
6. Drobitch R, Svensson C. Therapeutic drug monitoring in saliva. 2013;23(5):365-379. www.staffnet.com/pharmacy/guidelines/.
7. Benet LZ. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of furosemide in man: a review. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1979;7(1):1-27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/458552>.
8. Davies NM, Takemoto JK, Brocks DR, Yáñez J a. Multiple peaking phenomena in pharmacokinetic disposition. *Clin Pharmacokinet*. 2010;49(6):351-377. doi:10.2165/11319320-000000000-00000
9. Shore P.A., Brodie B.B. HC. The gastric secretion of drugs: A ph partition hypothesis. *J Pharmacol Exp Ther*. 1957;119(3):361-369.
10. Fagiolino P, Vazquez M, Alvariza S, Maldonado C, Ibarra M, Olano I. Antiepileptic drugs: Energy-consuming processes governing drug disposition. *Front Biosci - Elit*. 2014. doi:10.2741/e714
11. Secretory Functions of the Alimentary Tract. In: *Pocket Companion to Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. ; 2012. doi:10.1016/b978-1-4160-5451-1.00064-5
12. Milne M., Scribner BH, Crawford MA. Non ionic Diffusion and the excretion of weak acids and bases. *Am J Med*. 1958.
13. Fagiolino P, Vazquez M, Eiraldi R. Clearance and bioavailability study through arterio-venous drug concentrations relationship. *Eur J Pharm Sci*. 2013;48(4-5):825-829.
14. Maldonado C, Fagiolino P, Vázquez M, et al. Therapeutic carbamazepine (CBZ) and valproic acid (VPA) monitoring in children using saliva as a biologic fluid. *J Epilepsy Clin Neurophysiol*. 2008;14(2):55-58. doi:10.1590/S1676-26492008000200003
15. Ibarra M, Vázquez M, Fagiolino P, Mutilva F, Canale A. Total, unbound plasma

- and salivary phenytoin levels in critically ill patients. *J Epilepsy Clin Neurophysiol.* 2010;16(2):69-73. doi:10.1590/S1676-26492010000200006
16. Tucker GT, Lennard MS. Enantiomer specific pharmacokinetics. *Pharmacol Ther.* 1990;45(December 1988):309-329.
 17. Nguyen L, He H, Pham-Huy C. Chiral Drugs: An Overview. *Int J Biomed Sci.* 2006;2(2):85-100.
 18. Wsól V, Skálová L, Szotáková B. Chiral inversion of drugs: coincidence or principle? *Curr Drug Metab.* 2004;5(6):517-533. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15578945>.
 19. Brunton LL., Chabner BA. KB. Analgesic-Antipyretic and Anti-Inflammatory agents: Pharmacotherapy of Gout. In: *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics.* Mc Graw-Hill Professional; 2010:434-436.
 20. Furst DE., Ulrich RW. PS. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, Disease-Modifying Antirheumatic Drugs, Nonopioid Analgesics, & Drugs Used in Gout. In: *Basic & Clinical Pharmacology.* Mc Graw-Hill Professional; 2012:636-638.
 21. Geisslinger G, Schuster O, Stock KP, Loew D, Bach GL, Brune K. Pharmacokinetics of S(+)- and R(-)-ibuprofen in volunteers and first clinical experience of S(+)-ibuprofen in rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Pharmacol.* 1990;38(5):493-497. doi:10.1007/BF02336690
 22. Wechter WJ. Drug chirality: On the mechanism of R-aryl propionic acid class NSAIDs. Epimerization in humans and the clinical implications for the use of racemates. *J Clin Pharmacol.* 1994;34(11):1036-1042. doi:10.1002/j.1552-4604.1994.tb01977.x
 23. Yen CLE, Nelson DW, Yen MI. Intestinal triacylglycerol synthesis in fat absorption and systemic energy metabolism. *J Lipid Res.* 2015;56(3):489-501. doi:10.1194/jlr.R052902
 24. Selkälä E. Role of α -methylacyl-CoA racemase in lipid metabolism. 2016.
 25. Jamali F, Singh NN, Pasutto FM, Russell AS, Coutts RT. Pharmacokinetics of Ibuprofen Enantiomers in Humans Following Oral Administration of Tablets with Different Absorption Rates. *Pharm Res An Off J Am Assoc Pharm Sci.* 1988;5(1):40-43. doi:10.1023/A:1015811428066
 26. Ding G, Liu Y, Sun J, et al. Effect of absorption rate on pharmacokinetics of ibuprofen in relation to chiral inversion in humans. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59(11):1509-1513. doi:10.1211/jpp.59.11.0007
 27. Jamali F, Mehvar R, Russell AS, Sattari S, Yakimets WW, Koo J. Human pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers following different doses and formulations: Intestinal chiral inversion. *J Pharm Sci.* 1992;81(3):221-225. doi:10.1002/jps.2600810306
 28. Shohin IE, Kulinich JI, Ramenskaya GV, et al. Biowaiver Monographs for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms: Ketoprofen. *J Pharm Sci.*

- 2012;101(7):2271-2280. doi:10.1002/jps
29. Jamali F, Brocks DR. Clinical pharmacokinetics of ketoprofen and its enantiomers. *Clin Pharmacokinet*. 1990;19(3):197-217. doi:10.2165/00003088-199019030-00004
 30. Jamali F, Russell AS, Foster RT, Lemko C. Ketoprofen Pharmacokinetics in Humans : Evidence of Enantiomeric Inversion and Lack of Interaction. *J Pharm Sci*. 1990;79(5):460-461.
 31. Foster RT, Jamali F. Stereoselective pharmacokinetics of ketoprofen in the rat. Influence of route of administration. *Drug Metab Dispos*. 1988.
 32. Rudy C, Liu Y, Craig D, Hall D. Stereoselective Inversion Pharmacokinetics of (R) - Ketoprofen Healthy Volunteers in. *J Clin Pharmacol*. 1998;38:3-10.
 33. Grubb NG, Rudy DW, Brater DC, Hall SD. Stereoselective pharmacokinetics of ketoprofen and ketoprofen glucuronide in end-stage renal disease: Evidence for a "futile cycle" of elimination. *Br J Clin Pharmacol*. 1999. doi:10.1046/j.1365-2125.1999.00046.x
 34. Drug Bank. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01050>.
 35. Davies N. Clinical pharmacokinetics of ibuprofen: The first 30 years. *Clin Pharmacokinet*. 1998;34(2):101-154.
 36. Cheng H, Rogers JD, Demetriades JL, Holland SD, Seibold JR, Depuy E. Pharmacokinetics and Bioinversion of Ibuprofen Enantiomers in Humans. *Pharm Res An Off J Am Assoc Pharm Sci*. 1994;11(6):824-830. doi:10.1023/A:1018969506143
 37. Lee EJD, Williams K, Day R, Graham G, Champion D. Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in man. *Br J Clin Pharmacol*. 2004;19:669-674. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200490137/abstract>.
 38. Li Y, Kantelip JP, Gerritsen-Van Schieveen P, Davani S. Interindividual variability of methadone response: Impact of genetic polymorphism. *Mol Diagnosis Ther*. 2008;12(2):109-124. doi:10.1007/BF03256276
 39. Eap CB, Buclin T, Baumann P. Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone: Implications for the treatment of opioid dependence. *Clin Pharmacokinet*. 2002;41(14):1153-1193. doi:10.2165/00003088-200241140-00003
 40. Ebert B, Thorkildsen C, Andersen S, Christrup LL, Hjeds H. Opioid analgesics as noncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonists. *Biochem Pharmacol*. 1998;56(5):553-559. doi:10.1016/S0006-2952(98)00088-4
 41. Codd E, Shank R, Schupsky J, Raffa R. Serotonin and norepinephrine uptake inhibiting activity of centrally acting analgesics: structural determinants and role in antinociception. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;274(3):1263-1270.
 42. Mao J. NMDA and opioid receptors: Their interactions in antinociception, tolerance and neuroplasticity. *Brain Res Rev*. 1999;30(3):289-304.

- doi:10.1016/S0165-0173(99)00020-X
43. Bennett GJ. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: Focus on the NMDA-receptor. *J Pain Symptom Manage.* 2000;19(1 SUPPL. 1):2-6. doi:10.1016/S0885-3924(99)00120-7
 44. Eap C, Déglon J, Baumann P. Pharmacokinetics and Pharmacogenetics of Methadone: Clinical Relevance. *Heroin Add Rel Clin Probl.* 1999;1(1):19-34.
 45. Gorman A, Elliott K, Inturrisi C. The d- and l-isomers of methadone bind to the non-competitive site on the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor in rat forebrain and spinal cord. *Neurosci Lett.* 1993:5-8.
 46. Davis AM, Inturrisi CE. d-Methadone blocks morphine tolerance and N-methyl-D-aspartate-induced hyperalgesia. In: *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* ; 1999.
 47. Gilman G&. *Manual of Pharmacology and Therapeutics.*; 2008. doi:10.1002/9780470753316.ch73
 48. Lugo RA, Satterfield KL, Kern SE. Pharmacokinetics of methadone. *J Pain Palliat Care Pharmacother.* 2005. doi:10.1300/J354v19n04_05
 49. Ferrari A, Coccia CPR, Bertolini A, Sternieri E. Methadone - Metabolism, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Res.* 2004;50(6):551-559. doi:10.1016/j.phrs.2004.05.002
 50. Fonseca F, de la Torre R, Díaz L, et al. Contribution of cytochrome P450 and ABCB1 genetic variability on methadone pharmacokinetics, dose requirements, and response. *PLoS One.* 2011;6(5). doi:10.1371/journal.pone.0019527
 51. Iribarne C, Picart D, Dréano Y, Bail JP, Berthou F. Involvement of cytochrome P450 3A4 in N-dealkylation of buprenorphine in human liver microsomes. *Life Sci.* 1997;60(22):1953-1964. doi:10.1016/S0024-3205(97)00160-4
 52. Crettol S, Déglon J-J, Besson J, et al. Methadone enantiomer plasma levels, CYP2B6, CYP2C19, and CYP2C9 genotypes, and response to treatment. *Clin Pharmacol Ther.* 2005;78(6):593-604. doi:10.1016/j.clpt.2005.08.011
 53. Rostami-Hodjegan A, Wolff K, Hay AWM, Raistrick D, Calvert R, Tucker GT. Population pharmacokinetics of methadone in opiate users: Characterization of time-dependent changes. *Br J Clin Pharmacol.* 1999;48(1):43-52. doi:10.1046/j.1365-2125.1999.00974.x
 54. Garrido M, Trocóniz I. Methadone: a review of its pharmacokinetic/pharmacodynamic properties. *J Pharmacol Toxicol.* 1999;42:61-66.
 55. Miguez-Díez E, Modamio P, Vázquez M, et al. Correlation of methadone concentrations in plasma and saliva collected with and without stimulation in pain management patients. *Clin Chem Lab Med.* 2015;53(4):e109-e112. doi:10.1515/cclm-2014-0738
 56. Vázquez M, Fagiolino P, Lorier M, et al. Secondary-peak profile of methadone in

- saliva after administration of multiple doses in patients with chronic pain. *Curr Top Pharmacol*. 2015;19:21-26.
57. Lynn RK, Olsen GD, Leger RM, Gordon WP, Smith RG, Gerber N. The secretion of methadone and its major metabolite in the gastric juice of humans. Comparison with blood and salivary concentrations. *Drug Metab Dispos*. 1976.
 58. He X, Lin R, He H, Sun M, Xiao D. Chiral Separation of Ketoprofen on a Chirobiotic T Column and Its Chiral Recognition Mechanisms. *Chromatographia*. 2012;75(23-24):1355-1363. doi:10.1007/s10337-012-2352-z
 59. Kafková B, Bosáková Z, Tesařová E, Coufal P. Chiral separation of beta-adrenergic antagonists, profen non-steroidal anti-inflammatory drugs and chlorophenoxypropionic acid herbicides using teicoplanin as the chiral selector in capillary liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2005;1088(1-2):82-93. doi:10.1016/j.chroma.2005.02.027
 60. Shi D, Jin Y, Tang Y, et al. Stereoselective binding of mexiletine and ketoprofen enantiomers with human serum albumin domains. *Acta Pharmacol Sin*. 2012;33(5):710-716. doi:10.1038/aps.2012.8
 61. Podzeck F, Newton JM, Wilding IR, Kenyon CJ. The effect of food on the gastrointestinal transit and systemic absorption of naproxen from a novel sustained release formulation [1]. *J Control Release*. 1996;41(3):291-293. doi:10.1016/S0168-3659(96)90030-9
 62. Magallanes L, Lorier M, Ibarra M, Guevara N, Vázquez M, Fagiolino P. Sex and Food Influence on Intestinal Absorption of Ketoprofen Gastroresistant Formulation. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2016;5(3):196-200. doi:10.1002/cpdd.208
 63. Endrenyi L, Fritsch S, Yan W. Cmax/AUC is a clearer measure than Cmax for absorption rates in investigations of bioequivalence. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol*. 1991;29(10):394-399.
 64. Geisslinger G, Menzel S, Wissel K, Brune K. Pharmacokinetics of ketoprofen enantiomers after different doses of the racemate. *Br J Clin Pharmacol*. 1995. doi:10.1111/j.1365-2125.1995.tb04537.x
 65. Biguang Tuo et. al. Estrogen Regulation of Duodenal Bicarbonate Secretion and Sex-Specific Protection of Human Duodenum. *Gastroenterology*. 2011;141:854-863. file:///C:/Users/Marianela/Downloads/Estrogen regulation of duodenal bicarbonate secretion and sex-specific protection of human duodenum (1).pdf. Accessed January 13, 2015.
 66. Vessey MP, Villard-mackintosh L, Ph D, Painter R, Phil D. Oral contraceptives and pregnancy in relation to peptic ulcer. *Contraception*. 1992;46:349-357.
 67. Franconi F, Brunelleschi S, Steardo L, Cuomo V. Gender differences in drug responses. *Pharmacol Res*. 2007;55(2):81-95. doi:10.1016/j.phrs.2006.11.001
 68. Meibohm B, Beierle I, Derendorf H. How important are gender differences in pharmacokinetics? *Clin Pharmacokinet*. 2002;41(5):329-342.

doi:10.2165/00003088-200241050-00002

69. Schwartz JB. The current state of knowledge on age, sex, and their interactions on clinical pharmacology. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82(1):87-96. doi:10.1038/sj.clpt.6100226
70. Freire AC, Basit AW, Choudhary R, Piong CW, Merchant H a. Does sex matter? The influence of gender on gastrointestinal physiology and drug delivery. *Int J Pharm.* 2011;415(1-2):15-28. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.04.069
71. Hutson WR, Roehrkasse RL, Wald A. Influence of gender and menopause on gastric emptying and motility. *Gastroenterology.* 1989;96(1):11-17. doi:10.1016/0016-5085(89)90758-0
72. Feldman M, Barnett C. Fasting gastric pH and its relationship to true hypochlorhydria in humans. *Dig Dis Sci.* 1991;36(7):866-869. doi:10.1007/BF01297133
73. Prewett E, Smith J, Nwokolo C, Sawyerr A, Pounder R. Characterization of Fluids from the Stomach and Proximal Jejunum in Men and Women. *Clin Sci.* 1991;80:619-624.
74. Scott DC, Clymer JW. Estimation of distribution coefficients: From the partition coefficient and pKa. *Pharm Technol North Am.* 2002;26(11):30-40.
75. Torrado JJ, Blanco M, Farré M, Roset P, García-Arieta A. Rationale and conditions for the requirement of chiral bioanalytical methods in bioequivalence studies. *Eur J Clin Pharmacol.* 2010;66(6):599-604. doi:10.1007/s00228-010-0792-7
76. Ohara I, Otsuka SI, Yugari Y. Cephalic phase response of pancreatic exocrine secretion in conscious dogs. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 1988;254(3). doi:10.1152/ajpgi.1988.254.3.g424
77. Chandra R, Liddle RA. Regulation of Pancreatic Secretion 2 . Phases of Meal Response. *Am Pancreat Assoc.* 2015:1-40. doi:10.3998/panc.2015.38
78. Pettersson KJ, Olsson A. Liquid chromatographic determination of the enantiomers of ibuprofen in plasma using a chiral AGP column. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1991;563(2):414-418. doi:10.1016/0378-4347(91)80050-M
79. Koffert J, Honka H, Teuho J, et al. Effects of meal and incretins in the regulation of splanchnic blood flow. *Endocr Connect.* 2017;6(3):179-187. doi:10.1530/EC-17-0015
80. Hao H, Wang G, Sun J, Ding Z, Wu X, Roberts M. Unidirectional inversion of ibuprofen in Caco-2 cells: Developing a suitable model for presystemic chiral inversion study. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(4):682-687. doi:10.1248/bpb.28.682
81. Boulton DW, Arnaud P, DeVane CL. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methadone enantiomers after a single oral dose of racemate. *Clin Pharmacol Ther.* 2001;70(1):48-57. doi:10.1067/mcp.2001.116793
82. Foster DJR, Somogyi AA, Bochner F. Stereoselective quantification of methadone

- and its major oxidative metabolite, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine, in human urine using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 2000;744(1):165-176. doi:10.1016/S0378-4347(00)00246-2
83. Ibarra M, Vázquez M, Fagiolino P. Sex Effect on Average Bioequivalence. *Clin Ther.* 2017;39(1):23-33. doi:10.1016/j.clinthera.2016.11.024
84. Johnson CD, Harris PA, Wastell C. Quantitative relation between gastric acid secretion and changes in urinary acid secretion. *Gut.* 1990;31(8):862-866. doi:10.1136/gut.31.8.862
85. Li AP, Alam N, Amaral K, et al. Cryopreserved human intestinal mucosal epithelium: A novel in Vitro experimental system for the evaluation of enteric drug metabolism, cytochrome P450 induction, and enterotoxicity. *Drug Metab Dispos.* 2018;46(11):1562-1571. doi:10.1124/dmd.118.082875
86. Kristensen K, Blemmer T, Angelo HR, et al. Stereoselective pharmacokinetics of methadone in chronic pain patients. *Ther Drug Monit.* 1996. doi:10.1097/00007691-199606000-00001

Agradecimientos

A mis directores de tesis, Pietro Fagiolino y Marta Vázquez, por su dedicación y sus consejos.

A mis compañeros, Natalia, Manuel, Alejandra, Silvana, Martín, Cecilia, Federico, Maria Luisa, Rosa y Beatriz, por las alegrías y por su contribución a esta tesis.

A mi familia y amigos, por el amor, el apoyo y la paciencia.

A la Profesora Nikoletta Fotaki por recibirme tan cálidamente en la Universidad de Bath para cumplir mi pasantía.

Anexo I: Procedimiento para la dosificación de enantiómeros de Ketoprofeno en plasma

1. OBJETIVO

El objetivo de este procedimiento es disponer de una metodología normalizada para la dosificación de enantiómeros de Ketoprofeno (KETO S y KETO R) en plasma.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica al Área Analítica del CEBIOBE y a todos los ensayos de Ketoprofeno en plasma allí realizados.

3. RESPONSABILIDAD

La responsabilidad por la aplicación de este procedimiento corresponde a los analistas del CEBIOBE. Sin perjuicio de lo anterior el Supervisor del Área Analítica es responsable de verificar la correcta aplicación de este procedimiento y de evaluar periódicamente su adecuabilidad para el alcance previsto.

4. DEFINICIONES, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

TEAA: Acetato de Trietilamonio

TEA: Trietilamina

ACN: Acetonitrilo calidad HPLC

FB: Fenobarbital.

KETO: Ketoprofeno, mezcla racémica.

HPLC: Equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento.

MeOH: Metanol calidad HPLC.

AcOEt: Acetato de Etilo

5. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

5.1 Preparación de soluciones

5.1.1 Solución Amortiguadora de TEAA 1% pH 5,0. Tomar 10 mL de una solución de TEA calidad HPLC y llevar a 1 L de agua destilada en material graduado. Ajustar pH con ácido acético a $\text{pH}=5,0 \pm 0,05$. Filtrar por membrana de $0,45\mu\text{m}$.

5.1.2 Solución Fase Móvil. Tomar con material graduado 95 mL de solución amortiguadora de TEAA 1% pH 5,0 y 5 mL de MeOH, y mezclar en un recipiente adecuado. Sonicar durante 20 minutos.

5.1.3 Solución ácido fosfórico 2,5 M. Tomar 17,2 mL de ácido fosfórico concentrado (85% p/p, $d=1,686 \text{ g/mL}$), y llevar a 100 mL con agua destilada.

5.1.4 *Mezcla de extracción.* Tomar con material graduado 75 mL de Hexano y 25 mL de AcOEt, mezclarlos en un recipiente adecuado.

5.1.5 *Solución de Estándar Interno.* Pesar en forma exacta aproximadamente 50,0 mg de FB estándar, disolver y llevar a 25 mL con metanol utilizando un matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada de 2000 µg/mL (Solución SMEI). Tomar 10 mL de SMEI con material aforado y llevar a 50 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada de 400,0 µg/mL (Solución SEI).

5.1.6 *Solución Madre KETO (SM).* Pesar en forma exacta aproximadamente 50,00 mg de KETO estándar, disolver y llevar a 50 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 1000 µg/mL.

5.1.7 *Soluciones Metanólicas estándar:* se realizarán a partir de la solución madre de KETO de acuerdo a la siguiente tabla. Realizar todas las diluciones con material aforado.

Nombre Solución	Generada a partir de	Dilución	Concentración KETO (µg/mL)	Concentración KETO S - KETO R (µg/mL)
SM	-	-	1000	500,0
S1	SM	5/10	500,0	250,0
S2	SM	2/10	200,0	100,0
S3	SM	0,5/10	50,00	25,00
S4	SM	0,5/50	10,00	5,000

5.1.8 *Soluciones Plasmáticas estándar KETO para curva de calibración:* a 5 mL de plasma blanco tomados con pipeta aforada, agregar utilizando jeringa de vidrio de 50 µL, la solución metanólica y el volumen especificado en la tabla. Luego homogeneizar en vórtex por 10 segundos.

Nombre Solución	Plasma cargado con:	Volumen cargado:	Concentración KETO (ng/mL)	Concentración KETO S - KETO R (ng/mL)
CAL 1	S1	150	14563	7282
CAL 2	SM	50	9901	4951
CAL 3	S1	50	4950	2475
CAL 4	S2	50	1980	990,0
CAL 5	S3	50	495,0	247,5
CAL 6	S4	50	99,01	49,51

5.2 *Tratamiento de muestras*

A 1 mL de muestra plasmática tomada con pipeta automática agregar 50 µL de solución SEI utilizando jeringa de vidrio. La concentración resultante de estándar interno en plasma es de 19048 ng/mL. Agregar 1 mL de ácido fosfórico 2,5 M. Agitar en vórtex durante 10 segundos.

Agregar 4,0 mL de la *mezcla de extracción* utilizando material graduado.

Agitar en vórtex durante 1 minuto.

Centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos.

Tomar con pipeta pasteur de vidrio la fase orgánica (superior), pasarla al tubo de centrifuga.

Evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno en baño seco a 40 °C.

Retomar con 100 µL de solución fase móvil, tomados con pipeta automática, y agitar en vórtex aproximadamente 10 segundos.

Tomar la solución y pasar a vial de polipropileno de 250 µL.

Inyectar 40µL en HPLC.

5.3 Preparación curva de calibración para análisis de muestras de voluntarios

Realizar el tratamiento de muestras según ítem 5.2 por duplicado de cuatro a seis de los niveles de soluciones plasmáticas (CAL 1 a CAL 6).

5.4. Preparación de soluciones plasmáticas estándar para utilizar como controles en el análisis de muestras de voluntarios.

5.4.1 Soluciones metanólicas de KETO:

- C1: pesar en forma exacta aproximadamente 32,00 mg de KETO estándar, disolver y llevar a 10 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 3200 µg/mL.
- C30: pesar en forma exacta aproximadamente 32,00 mg de KETO estándar, disolver y llevar a 25 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 1280 µg/mL.
- C3': tomar 2,0 mL de la solución C20 con pipeta automática, y llevar a 25 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 102,4 µg/mL.

5.4.2 Soluciones plasmáticas control: a 25 mL de plasma blanco medidos con matraz aforado, agregar utilizando pipeta automática 100 µL de las soluciones metanólicas especificadas en la tabla. Homogeneizar.

Nombre Solución	Plasma cargado con:	Concentración KETO (ng/mL)	Concentración KETO S/R (ng/mL)
CTL A	C1	12749	6374
CTL M	C30	5100	2550
CTL B	C3'	408,0	204,0

5.5 Condiciones Cromatográficas

Equipo: HPLC Dionex Ultimate 3000 Series.

Columna: CHIROBIOTICS™ T (15cm x 4,6mm; 5µm).

Detector: de arreglo de diodos, DionexDAD-3000.

Fase móvil: Solución Amortiguadora TEAA 1% pH 5,0: MeOH (95:5).

Flujo: 1,0 mL/min.

Longitud de onda: 220nm hasta los 7,0 min., con posterior cambio a 260 nm.

Temperatura de horno de columna: 40 °C

Temperatura de compartimento de muestras: 10°C

Volumen de inyección: 40 µL

Tiempo de corrida total: 13 minutos

5.6 Tiempos de Retención

FB (E.I) ~ 4,2 minutos

KETO S ~ 9,0 - 8,0 minutos (según la concentración)

KETO R ~ 10,5 - 9,0 minutos (según la concentración)

5.7 Cálculos

Se determinarán las concentraciones de los enantiómeros KETO S y KETO R utilizando como variable independiente la relación de áreas que presenten respecto a la FB. El día de la dosificación, se realizará una curva de calibración para cada enantiómero que se utilizará para la cuantificación de los mismos.

Anexo II: Procedimiento para la dosificación de enantiómeros de Ibuprofeno en plasma

1. OBJETIVO

El objetivo de este procedimiento es disponer de una metodología normalizada para la dosificación de enantiómeros de Ibuprofeno (IBF R e IBF S) en plasma.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica al Área Analítica del CE BIOBE y a todos los ensayos de Ibuprofeno en plasma allí realizados.

3. RESPONSABILIDAD

La responsabilidad por la aplicación de este procedimiento corresponde a los analistas del CE BIOBE. Sin perjuicio de lo anterior el Supervisor del Área Analítica es responsable de verificar la correcta aplicación de este procedimiento y de evaluar periódicamente su adecuabilidad para el alcance previsto.

4. DEFINICIONES, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo calidad HPLC

FURO: Furosemide

IBF: Ibuprofeno, mezcla racémica.

HPLC: Equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento.

MeOH: Metanol calidad HPLC.

AcOEt: Acetato de Etilo

5. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

5.1 Preparación de soluciones

5.1.1 Solución Amortiguadora de Fosfato 20 mM pH 7,0. Pesar aproximadamente 2,8 g de Fosfato dibásico de sodio y llevar a 1 L de agua destilada en material graduado. Ajustar pH con ácido fosfórico a $\text{pH}=7,0 \pm 0,05$. Filtrar por membrana de $0,45\mu\text{m}$.

5.1.2 Solución Fase Móvil. Tomar con material graduado 99 mL de solución amortiguadora de Fosfato 20 mM pH 7,0 y 1,0 mL de ACN para preparar 100 mL de la solución. Mezclar en un recipiente adecuado y sonicar durante 20 minutos.

5.1.3 Solución ácido fosfórico 2,5 M. Tomar 17,2 mL de ácido fosfórico concentrado (85% p/p, $d=1,686\text{ g/mL}$), y llevar a 100 mL con agua destilada.

5.1.4 Mezcla de extracción. Tomar con material graduado 85 mL de Hexano y 15 mL de AcOEt, mezclarlos en un recipiente adecuado.

5.1.5 *Solución de Estándar Interno*. Pesar en forma exacta aproximadamente 30,0 mg de FURO estándar, disolver y llevar a 50 mL con metanol utilizando un matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada de 600,0 µg/mL (Solución SMEI). Tomar 5,0 mL de SMEI con material aforado y llevar a 10 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada de 300,0 µg/mL (Solución SEI).

5.1.6 *Solución Madre IBF (SM IBF)*. Pesar en forma exacta aproximadamente 30,00 mg de IBF estándar, disolver y llevar a 50 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 600,0 µg/mL.

5.1.7 *Soluciones estándar*: se realizarán a partir de la solución madre de IBF de acuerdo a la siguiente tabla. Realizar todas las diluciones en una mezcla Agua:MeOH (50:50) con material aforado.

Nombre Solución	Generada a partir de	Dilución	Concentración IBF (µg/mL)	Concentración IBF R - IBF S (µg/mL)
SM	-	-	600,0	300,0
S1	SM	5/10	300,0	150,0
S2	SM	2/10	120,0	60,00

5.1.8 *Soluciones Plasmáticas estándar IBF para curva de calibración*: a 5,0 mL de plasma blanco tomados con pipeta aforada, agregar utilizando pipeta automática, la solución estándar y el volumen especificado en la tabla. Luego homogeneizar en vórtex por 10 segundos.

Nombre Solución	Plasma cargado con:	Volumen cargado (µL):	Concentración IBF (µg/mL)	Concentración IBF R - IBF S (µg/mL)
CAL 0	SM	700	73,68	36,84
CAL 1	SM	300	33,96	16,98
CAL 2	SM	150	17,48	8,738
CAL 3	SM	100	11,76	5,882
CAL 4	S1	100	5,882	2,941
CAL 5	S2	150	3,495	1,748
CAL 6	S2	50	1,091	0,5455

5.2 *Tratamiento de muestras*

A 0,5 mL de muestra plasmática tomada con pipeta automática agregar 50 µL de solución SEI utilizando jeringa de vidrio. La concentración resultante de estándar interno en plasma es de 27,27 µg/mL.

Agregar 0,5 mL de ácido fosfórico 2,5 M.

Agitar en vórtex durante 10 segundos.

Agregar 3,0 mL de la *mezcla de extracción* utilizando material graduado.

Agitar en vórtex durante 1,5 minutos.

Centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos.

Tomar con pipeta pasteur de vidrio la fase orgánica (superior), pasarla al tubo de centrifuga.

Evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno en baño seco a 40 °C.

Retomar con 100 µL de solución fase móvil, tomados con pipeta automática, y agitar en vórtex aproximadamente 10 segundos.

Tomar la solución y pasar a vial de polipropileno de 250 µL.

Inyectar 20 µL en HPLC.

5.3 Preparación curva de calibración para análisis de muestras de voluntarios

Realizar el tratamiento de muestras según ítem 5.2 por duplicado de cuatro a seis de los niveles de soluciones plasmáticas (CAL 0 a CAL 6).

5.4. Preparación de soluciones plasmáticas estándar para utilizar como controles en el análisis de muestras de voluntarios.

5.4.1 Soluciones metanólicas de IBF:

- C1: pesar en forma exacta aproximadamente 20,00 mg de IBF estándar, disolver y llevar a 10 mL con MeOH en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 2000 µg/mL.
- C2: pesar en forma exacta aproximadamente 25,00 mg de IBF estándar, disolver y llevar a 25 mL con MeOH en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 1000 µg/mL.
- C3: pesar en forma exacta aproximadamente 20,00 mg de IBF estándar, disolver y llevar a 50 mL con MeOH en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 400,0 µg/mL.

5.4.2 Soluciones plasmáticas control: a 20 mL de plasma blanco medidos con matraz aforado, agregar utilizando pipeta automática 200 µL de las soluciones metanólicas especificadas en la tabla. Homogeneizar.

Nombre Solución	Plasma cargado con:	Concentración IBF (µg/mL)	Concentración IBF S/R (µg/mL)
CTL A	C1	20,00	10,00
CTL M	C2	10,00	5,000
CTL B	C3	4,000	2,000

5.5 Condiciones Cromatográficas

Equipo: HPLC Dionex Ultimate 3000 Series.

Columna: CHIRALPACK AGP™ (100 x 4 mm; 5µm)

Detector: de arreglo de diodos, DionexDAD-3000.

Fase móvil: Solución Amortiguadora de Fosfato 20mM pH 7,0: ACN (99:1).

Flujo: 0,5 mL/min.

Longitud de onda: 220 nm

Temperatura de horno de columna: 15 °C
Temperatura de compartimento de muestras: 5°C
Volumen de inyección: 20 µL
Tiempo de corrida total: 14 minutos

5.6 Tiempos de Retención

FURO (E.I) ~ 12,0 minutos
IBF R ~ 5,5 minutos
IBF S ~ 7,0 minutos

5.7 Cálculos

Se determinarán las concentraciones de los enantiómeros IBF R e IBF S utilizando como variable independiente la relación de áreas que presenten respecto a la de FURO. El día de la dosificación, se realizará una curva de calibración para cada enantiómero que se utilizará para la cuantificación de los mismos.

Anexo III: Procedimiento para la dosificación de enantiómeros de Metadona y su metabolito EDDP en diferentes fluidos biológicos

1. OBJETIVO

El objetivo de este procedimiento es disponer de una metodología normalizada para la dosificación de enantiómeros de Metadona (R-MTD y S-MTD) en plasma, saliva y orina y además para la dosificación de su metabolito principal (R-EDDP y S-EDDP) en orina solamente.

2. ALCANCE

Este procedimiento se aplica al Área Analítica del CEBIOBE y a todos los ensayos de Metadona en fluidos biológicos allí realizados.

3. RESPONSABILIDAD

La responsabilidad por la aplicación de este procedimiento corresponde a los analistas del CEBIOBE. Sin perjuicio de lo anterior el Supervisor del Área Analítica es responsable de verificar la correcta aplicación de este procedimiento y de evaluar periódicamente su adecuabilidad para el alcance previsto.

4. DEFINICIONES, SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

ACN: Acetonitrilo calidad HPLC

MTD: Metadona mezcla racémica base libre (PM=309.445 g/mol)

MTD estándar: como clorhidrato, PM=345.91 g/mol, contiene 89.46% de MTD.

R-MTD: Isómero R de Metadona

S-MTD: Isómero S de Metadona

EDDP: 2-etildieno- 1,5- dimetil-3,3- difenilpirrolidina mezcla racémica base libre.

EDDP estándar: como perclorato, PM=377.86 g/mol, contiene 73.68% de EDDP.

R-EDDP: Isómero R de EDDP

S-EDDP: Isómero S de EDDP

IMP: Imipramina

HPLC: Equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento.

HEX: Hexano

MeOH: Metanol

5. DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES

5.1 Preparación de soluciones.

5.1.1 Solución Amortiguadora de Fosfato 20mM : 2mM diisopropil amina pH 6,0 y 7,0. Pesar 2,8 g de Fosfato Dibásico de Sodio. Disolver en 1 L de agua destilada en material graduado y agregar 350 µL de diisopropil amina. Ajustar pH con ácido fosfórico a pH=6,0

$\pm 0,05$ para el análisis de muestras urinarias o $\text{pH}=7,0 \pm 0,05$ para el análisis de muestras salivales y plasmáticas. Filtrar por membrana de $0,45\mu\text{m}$.

5.1.2 *Soluciones Fase Móvil. De acuerdo al fluido en donde se realizará la determinación:*

5.1.2.1 *Orina.* Tomar con material graduado 92 mL de solución amortiguadora de Fosfato 20 mM con amina pH 6,0 y 8 mL de ACN, y mezclar en un recipiente adecuado. Sonicar durante 20 minutos.

5.1.2.2 *Plasma y Saliva.* Tomar con material graduado 82 mL de solución amortiguadora de Fosfato 20 mM con amina pH 7,0 y 18 mL de ACN, y mezclar en un recipiente adecuado. Sonicar durante 20 minutos.

5.1.3 *Solución carbonato 1 M pH 10,0.* Pesar 10,6 g de Carbonato de Sodio. Disolver en 100 mL de agua destilada. Ajustar pH con ácido fosfórico a $\text{pH}=10,0 \pm 0,05$.

5.1.4 *Mezcla de extracción.* Tomar con material graduado 99 mL de Hexano y 1 mL de Alcohol isoamílico, mezclarlos en un recipiente adecuado.

5.1.5 *Solución de Estándar Interno (SEI).* Pesar en forma exacta aproximadamente 25,0 mg de IMP estándar, disolver y llevar a 50 mL con metanol utilizando un matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada de $500 \mu\text{g/mL}$ (Solución SMEI). Tomar 2,0 mL de SMEI con material aforado y llevar a 100 mL con metanol en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada de $10,0 \mu\text{g/mL}$ (Solución SEI).

5.1.6 *Solución Madre MTD (SM MTD).* Pesar en forma exacta aproximadamente 56,00 mg de MTD Clorhidrato estándar, disolver y llevar a 100 mL con agua destilada en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a $500 \mu\text{g/mL}$ (MTD) .

5.1.7 *Soluciones acuosas estándar:* se realizarán a partir de la solución madre de MTD de acuerdo a la siguiente tabla. Realizar todas las diluciones con material aforado.

Nombre Solución	Generada a partir de	Dilución	Concentración MTD ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración R-MTD/S-MTD ($\mu\text{g/mL}$)
SM	-	-	500,0	250,0
S-MTD	SM MTD	1mL en 10mL	99,95	49,97
S1 MTD	SM MTD	1mL en 25mL	19,99	9,995
S2 MTD	SM MTD	0,5mL en 50mL	4,997	2,499
S3 MTD	SM MTD	0,2mL en 50mL	1,999	0,9995
S4 MTD	SM MTD	0,1mL en 100mL	0,4997	0,2499

5.1.8 *Solución Reconstituida de EDDP (SMM EDDP).* Reconstituir 10 mg de EDDP Perclorato con 0,5 mL de agua destilada y filtrada. Realizar un trasvase cuantitativo a un matraz aforado y llevar a volumen con 10 mL de MeOH, obteniendo una concentración aproximada a $732 \mu\text{g/mL}$ (EDDP).

5.1.9 Solución Madre de EDDP (SM EDDP). Tomar 5,0 mL de SMM EDDP con material aforado y llevar a 10 mL con MeOH en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 366 µg/mL (EDDP). Con los restantes 5,0 mL de SMM EDDP se puede preparar una segunda SM EDDP.

5.1.10 Soluciones acuosas estándar: se realizarán a partir de la solución madre de EDDP de acuerdo a la siguiente tabla. Realizar todas las diluciones con material aforado.

Nombre Solución	Generada a partir de	Dilución	Concentración EDDP (µg/mL)	Concentración R-EDDP/S-EDDP (µg/mL)
SM	-	-	366,0	183,0
S EDDP	SM EDDP	2mL en 10mL	73,22	36,61
S1 EDDP	SM EDDP	1mL en 10mL	36,61	18,31
S2 EDDP	SM EDDP	0,5mL en 50mL	3,661	1,831
S3 EDDP	SM EDDP	0,1mL en 50mL	0,7322	0,3661

5.1.11 Soluciones estándar MTD y EDDP para curva de calibración.

5.1.11.1. Orina: a 5 mL de orina blanco tomados con pipeta aforada, agregar utilizando pipeta automática de 1000µL, la solución acuosa y el volumen especificado en la tabla. Luego homogeneizar en vórtex por 10 segundos.

Nombre Solución	MTD		EDDP		Concentración (ng/mL)	
	Solución de carga	Volumen cargado (µL)	Solución de carga	Volumen cargado (µL)	R-MTD/S-MTD	R-EDDP/S-EDDP
CAL A	S MTD	800	S EDDP	700	3276,9	4201
CAL B	S MTD	300	S EDDP	300	1375,4	2015
CAL C	S1 MTD	300	S1 EDDP	300	535,4	980,7
CAL D	S1 MTD	150	S1 EDDP	150	282,9	518,1
CAL E	S2 MTD	250	S2 EDDP	700	105,0	215,4
CAL F	S3 MTD	300	S2 EDDP	300	53,54	98,07
CAL G	S3 MTD	100	S2 EDDP	150	19,04	52,30

5.1.11.2. Plasma: a 10 mL de plasma blanco tomados con pipeta aforada, agregar utilizando pipeta automática de 1000µL, la solución acuosa y el volumen especificado en la tabla. Luego homogeneizar en vórtex por 10 segundos.

MTD			
Nombre Solución	Solución de carga	Volumen cargado(µL)	R-MTD/S-MTD (ng/mL)
CAL A	S2 MTD	450	107.6
CAL B	S2 MTD	300	72.79
CAL C	S3 MTD	550	52.11

CAL D	S3 MTD	250	24,38
CAL E	S4 MTD	450	10,76
CAL F	S4 MTD	200	4,900

5.1.11.3. *Saliva:* a 10 mL de saliva blanco tomados con pipeta aforada, agregar utilizando pipeta automática de 1000 μ L, la solución acuosa y el volumen especificado en la tabla. Luego homogeneizar en vórtex por 10 segundos.

MTD			
Nombre Solución	Solución de carga	Volumen cargado (μ L)	R-MTD/S-MTD (ng/mL)
CAL A	S2 MTD	700	163,5
CAL B	S2 MTD	300	72,78
CAL C	S3 MTD	500	47,60
CAL D	S3 MTD	200	19,60
CAL E	S4 MTD	400	9,612
CAL F	S4 MTD	200	4,900

5.2 Preparación curva de calibración para análisis de muestras de voluntarios.

Realizar el tratamiento de muestras según ítem 5.2 por duplicado de cuatro a siete de los niveles de soluciones plasmáticas (CAL A a CAL G).

5.3. Preparación de soluciones plasmáticas estándar para utilizar como controles en el análisis de muestras de voluntarios.

5.3.1 *Soluciones acuosas de MTD:*

- C1 MTD: pesar en forma exacta aproximadamente 24,00 mg de MTD estándar, disolver y llevar a 20 mL con agua destilada en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 1068 μ g/mL de MTD.
- C10 MTD: tomar 1,0 mL de la solución C1 con pipeta automática, y llevar a 25 mL con agua en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 42,70 μ g/mL de MTD.
- C2 MTD: pesar en forma exacta aproximadamente 23,00 mg de MTD estándar, disolver y llevar a 20 mL con agua destilada en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 1023 μ g/mL de MTD.
- C20 MTD: tomar 1,0 mL de la solución C2 con pipeta automática, y llevar a 50 mL con agua en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 20,46 μ g/mL de MTD.
- C3 MTD: pesar en forma exacta aproximadamente 20,00 mg de MTD estándar, disolver y llevar a 50 mL con agua destilada en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 355,9 μ g/mL de MTD.
- C30 MTD: tomar 1,0 mL de la solución C1 con pipeta automática, y llevar a 10 mL con agua en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 35,59 μ g/mL de MTD.

- C300 MTD: tomar 1,0 mL de la solución C1 con pipeta automática, y llevar a 50 mL con agua en matraz aforado, obteniendo una concentración aproximada a 7,12 µg/mL de MTD.

5.3.2 *Soluciones control:* a 25 mL de fluido blanco medidos con matraz aforado, agregar utilizando pipeta automática de 1000µL, la solución acuosa y el volumen especificado en la tabla. Luego homogeneizar en vórtex por 10 segundos.

5.3.2.1 Orina.

MTD			
Nombre Solución	Orina cargada con:	Volumen cargado (µL)	Conc. R-MTD/S-MTD (ng/mL)
CTL OA	C1 MTD	150	3184
CTL OM	C2 MTD	100	2038
CTL OB	C30 MTD	200	141,2

5.3.2.2 Plasma.

MTD			
Nombre Solución	Plasma cargado con:	Volumen cargado (µL)	Conc. R-MTD/S-MTD (ng/mL)
CTL PA	C10 MTD	100	85,07
CTL PM	C20 MTD	100	40,76
CTL PB	C300 MTD	100	14,18

5.3.2.3 Saliva.

MTD			
Nombre Solución	Saliva cargada con:	Volumen cargado (µL)	Conc. R-MTD/S-MTD (ng/mL)
CTL SA	C10 MTD	150	127,3
CTL SM	C20 MTD	200	81,20
CTL SB	C300 MTD	100	14,18

5.4 Tratamiento de muestras.

5.4.1 Orina y Saliva.

A 1 mL de muestra tomada con pipeta automática agregar 50 µL de solución SEI utilizando jeringa de vidrio de 50 uL. La concentración resultante de estándar interno en la muestra es de 476.2 ng/mL.

Agregar 200 μL de buffer carbonato 1 M pH 10.
Agitar en vórtex durante 10 segundos.
Agregar 5,0 mL de la *mezcla de extracción* utilizando material graduado.
Agitar en vórtex durante 2 minutos.
Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
Tomar con pipeta pasteur de vidrio la fase orgánica (superior), pasarla al tubo de centrifuga.
Evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno en baño seco a 40 °C.
Retomar con 120 μL de solución fase móvil, tomados con pipeta automática, y agitar en vórtex aproximadamente 10 segundos.
Tomar la solución y pasar a vial de polipropileno de 250 μL .
Inyectar 80 μL en HPLC.

5.4.2 Plasma.

A 2 mL de muestra plasmática tomada con pipeta automática 50 μL de solución SEI utilizando jeringa de vidrio. La concentración resultante de estándar interno en plasma es de 250 ng/mL.
Agregar 400 μL de buffer carbonato 1 M pH 10.
Agitar en vórtex durante 10 segundos.
Agregar 6,0 mL de la *mezcla de extracción* utilizando material graduado.
Agitar en vórtex durante 2 minutos.
Centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos.
Tomar con pipeta pasteur de vidrio la fase orgánica (superior), pasarla al tubo de centrifuga.
Evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno en baño seco a 40°C.
Retomar con 120 μL de solución fase móvil, tomados con pipeta automática, y agitar en vórtex aproximadamente 10 segundos.
Tomar la solución y pasar a vial de polipropileno de 250 μL .
Inyectar 80 μL en HPLC.

5.5 Condiciones Cromatográficas.

5.5.1 Orina.

Equipo: HPLC Dionex Ultimate 3000 Series.
Columna: CHIRALPACK AGP™ (100 x 4 mm; 5 μm).
Detector: de arreglo de diodos, DionexDAD-3000.
Fase móvil: Solución Amortiguadora de Fosfato 20mM pH 6,0 + 2mM diisopropil amina: ACN (92:8).
Flujo: 0,7 mL/min.
Longitud de onda: 215 nm
Temperatura de horno de columna: 25 °C
Temperatura de compartimento de muestras: 10°C
Volumen de inyección: 80 μL
Tiempo de corrida total: 38 minutos

5.5.1 *Plasma y Saliva.*

Equipo: HPLC Dionex Ultimate 3000 Series.

Columna: CHIRALPACK AGP™ (100 x 4 mm; 5µm).

Detector: de arreglo de diodos, DionexDAD-3000.

Fase móvil: Solución Amortiguadora de Fosfato 20mM pH 7,0 + 2mM diisopropil amina: ACN (82:18).

Flujo: 0,7 mL/min.

Longitud de onda: 215 nm

Temperatura de horno de columna: 25 °C

Temperatura de compartimento de muestras: 10°C

Volumen de inyección: 80 µL

Tiempo de corrida total: 18 minutos

5.6 Tiempos de Retención.

5.6.1 *Orina.*

R-EDDP ~ 11,7 minutos

S-EDDP~ 16,8 minutos

R-MTD ~ 18,5 minutos

S-MTD ~ 24,9 minutos

IMP (E.I) ~ 30,5 minutos

5.6.2 *Plasma y Saliva.*

R-MTD ~ 9,1 minutos

S-MTD ~ 11,5 minutos

IMP (E.I) ~ 14,6 minutos

5.7 Cálculos.

Se determinarán las concentraciones de los enantiómeros de MTD y EDDP utilizando como variable independiente la relación de áreas que presenten respecto a la IMP. El día de la dosificación, se realizará una curva de calibración para cada enantiómero que se utilizará para la cuantificación de los mismos.