

00563



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

2E
t

**EVALUACION BIOFARMACEUTICA DEL
IBUPROFENATO DE IBUPROFILO, UN NUEVO
PRO FARMACO DEL IBUPROFENO.**

T E S I S

Que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN FARMACIA
(OPCION BIOFARMACIA)**

P r e s e n t a:

Q.F.B. VICENTE JESUS HERNANDEZ ABAD

Director: M. en C. Juan Manuel Rodriguez

México. 1999

275037

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A ÉL, QUE TODO LO VE Y SIEMPRE HA ILUMINADO MI CAMINO.

DEDICATORIAS.

Dedico este trabajo de Tesis de Maestría a mi Madre, Ma. De Lourdes Abad Lira y a mis hermanos, Ana y René. Gracias por su cariño y su apoyo en todo momento para que concluyera con mis estudios de Maestría.

Así mismo, dedico este trabajo a un gran amigo y maestro, el Dr. Andrés Navarrete Castro, quien con su ejemplo ha motivado mi gusto y cariño por la Biofarmacia y la ciencia en general. Sin su ejemplo, seguramente no hubiera ingresado a la Maestría y, sin su apoyo, tal vez no hubiera llevado a buen término este trabajo de tesis.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por seguir brindando su apoyo para mi superación científica y personal.

Agradezco profundamente al M. en C. Juan Manuel Rodríguez por haberme brindado la oportunidad de realizar este trabajo, así como por su apoyo e interés en el mismo.

Agradezco a todos mis profesores de la Maestría en Biofarmacia, quienes dieron su máximo esfuerzo y fueron siempre un apoyo para mí.

Agradezco el apoyo y camaradería de todos mis amigos del laboratorio de Biofarmacia, quienes hicieron más ligero el trabajo y fueron, en gran medida, coparticipes de este trabajo.

Agradezco a todos los sinodales que revisaron esta Tesis por sus valiosos comentarios y aportaciones.

Agradezco profundamente a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM (DGAPA) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), el apoyo económico brindado para concluir con mis estudios de Maestría.

Agradezco de igual manera a Hewlett-Packard y a la empresa ABC Instrumentación Analítica el préstamo del cromatógrafo HP-1100, en el cual desarrollé gran parte de este trabajo.

Agradezco al Dr. Mario González y a la M. en C. Verónica Tejeda su apoyo para la síntesis del ibuprofenato de ibuprofeno y del ibuprofeno, así como la donación de los mismos para llevar a cabo este proyecto.

ÍNDICE.

CONTENIDO.	PÁGINA.
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.	2
2. ANTECEDENTES.	4
2.1 Propiedades físicas y químicas del ibuprofeno.	5
2.2 Propiedades farmacodinámicas del ibuprofeno.	8
2.3 Farmacocinética del ibuprofeno.	13
2.4 Propiedades toxicológicas del ibuprofeno.	23
2.5 Utilización de profármacos del ibuprofeno para disminuir su ulcerogenicidad.	25
3. OBJETIVOS.	34
3.1 Objetivo general	34
3.2 Objetivos específicos.	34
4. HIPÓTESIS.	35
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.	
5.1 Materiales.	
5.1.1 Equipo.	36
5.1.2 Reactivos.	36
5.2 Determinación de algunas de las propiedades fisicoquímicas del ibuprofenato de ibuprofeno.	38
5.2.1 Determinación del coeficiente de extinción molar del ibuprofenato de ibuprofeno.	38

5.2.2 Determinación del coeficiente de partición octanol/agua del ibuprofenato de ibuprofílo.	39
5.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofílo en medios acuosos con diferentes pH's.	41
5.3.1 Desarrollo de un método analítico para cuantificar ibuprofenato de ibuprofílo, ibuprofol e ibuprofeno en mezclas acuosas.	41
5.3.2 Validación del método analítico para la cuantificación de muestras conteniendo ibuprofeno, ibuprofol e ibuprofenato de ibuprofílo en solución acuosa.	42
5.3.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofílo en soluciones acuosas con diferentes valores de pH.	43
5.4 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofílo en plasma de ratas y en presencia de esterases de hígado de cerdo.	44
5.4.1 Desarrollo de un método de extracción para ibuprofeno, ibuprofol e ibuprofenato de ibuprofílo a partir de plasma de rata.	44
5.4.2 Validación del método por CLAR para cuantificar ibuprofeno e ibuprofol en plasma de rata y en soluciones de esterases de hígado de cerdo.	45
5.4.3 Estudio de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofílo en plasma de rata y en solución de esterases de hígado de cerdo.	47
5.4.3.1 Cuantificación de proteínas en solución de esterasa de hígado de cerdo y en plasma de rata.	47
5.4.3.2 Determinación de la cinética de hidrólisis en plasma de rata o en presencia de solución de esterasa de hígado de cerdo.	48
5.5 Estudios preliminares de la farmacocinética del ibuprofeno liberado a partir del ibuprofenato de ibuprofílo en ratas.	49
6. RESULTADOS.	52
6.1 Determinación de las propiedades fisicoquímicas del ibuprofenato de ibuprofílo.	52
6.1.1 Determinación del coeficiente de absortividad molar (ϵ) del ibuprofenato de ibuprofílo.	52
6.1.2 Determinación del coeficiente de partición (Log P) del ibuprofenato de ibuprofílo.	54

6.2 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofilo en mezclas acuosas.	57
6.2.1 Desarrollo del método analítico para cuantificar ibuprofeno, ibuprofol e ibuprofenato de ibuprofilo en mezclas acuosas.	57
6.2.2 Validación del método analítico para la cuantificación de muestras conteniendo ibuprofeno, ibuprofol e ibuprofenato de ibuprofilo en medios acuosos.	58
6.2.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofilo en soluciones acuosas con diferentes valores de pH.	67
6.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofilo en plasma de rata y en presencia de esterazas de hígado de cerdo.	68
6.3.1 Desarrollo de un método de extracción del ibuprofeno e ibuprofol a partir de plasma de rata.	68
6.3.2 Validación del método por CLAR para cuantificar ibuprofeno e ibuprofol en plasma de rata y en soluciones de esterazas de hígado de cerdo.	70
6.3.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofilo en plasma de rata y en solución de esteraza de hígado de cerdo.	83
6.3.3.1 Cuantificación del contenido proteico del plasma de rata y la solución de esteraza de hígado de cerdo.	83
6.3.3.2 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofilo en plasma de rata.	84
6.3.3.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofilo en solución de esteraza de hígado de cerdo.	88
6.4 Farmacocinética del ibuprofeno liberado a partir de la administración de ibuprofenato de ibuprofilo en ratas.	92
6.4.1 Estudio preliminar en dosis de 99.22 mg de ibuprofenato de ibuprofilo/Kg de peso de la rata en administración oral.	92
6.4.2 Estudio preliminar en dosis de 18.02 mg de ibuprofenato de ibuprofilo/Kg de peso de la rata en administración intravenosa.	93
6.4.3 Estudio farmacocinético con la administración de una dosis de 49.61 mg/Kg de ibuprofenato de ibuprofilo por vía oral.	94

7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.	97
7.1 Determinación de las propiedades fisicoquímicas del ibuprofenato de ibuprofeno.	97
7.1.1 Determinación del coeficiente de absorción molar del ibuprofenato de ibuprofeno.	97
7.1.2 Determinación del coeficiente de partición octanol/agua (Log P) del ibuprofenato de ibuprofeno.	99
7.2 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en mezclas acuosas.	102
7.2.1 Desarrollo del método analítico para cuantificar ibuprofeno, ibuprofeno e ibuprofenato de ibuprofeno en mezclas acuosas.	102
7.2.2 Validación del método analítico para cuantificar ibuprofeno, ibuprofeno e ibuprofenato de ibuprofeno en muestras obtenidas a partir de medios acuosos.	103
7.2.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en soluciones acuosas con diferentes valores de pH.	104
7.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en plasma de rata y en presencia de esterasas de hígado de cerdo.	105
7.3.1 Desarrollo de un método de extracción del ibuprofeno e ibuprofeno a partir de plasma de rata.	105
7.3.2 Validación del método por CLAR para cuantificar ibuprofeno e ibuprofeno en plasma de rata y en soluciones de esterasas de hígado de cerdo.	106
7.3.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en matrices biológicas.	108
7.3.3.1 Cuantificación del contenido proteico del plasma de rata y la solución de esterasa de hígado de cerdo.	108
7.3.3.2 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en plasma de rata.	108
7.3.3.3 Determinación de la cinética de hidrólisis enzimática del ibuprofenato de ibuprofeno en solución de esterasa de hígado de cerdo.	111

7.4 Estudios de la farmacocinética del ibuprofeno liberado a partir del ibuprofenato de ibuprofeno en ratas.	114
8. CONCLUSIONES.	123
9. RECOMENDACIONES.	124
10. BIBLIOGRAFÍA.	126

RESUMEN.

En el presente trabajo se reporta el estudio de algunas de las propiedades del ibuprofenato de ibuprofilo, un nuevo candidato a profármaco del ibuprofeno recientemente sintetizado en nuestro país. La investigación abarcó la determinación de algunas de sus propiedades físicas (tales como su coeficiente de extinción molar en diferentes disolventes y su coeficiente de partición lípidos/agua, el establecimiento de su cinética de hidrólisis en medios acuosos, en plasma de rata y en presencia de carboxilesterasas de hígado de cerdo, así como un estudio preliminar de la farmacocinética del ibuprofeno liberado a partir de este compuesto tras su administración por vía oral a ratas Wistar macho. Para llevar a cabo los estudios de hidrólisis y farmacocinética del ibuprofenato de ibuprofilo, fue necesario desarrollar un nuevo método analítico, utilizando Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. El método fue validado de acuerdo con las recomendaciones internacionales.

1. INTRODUCCIÓN.

Los Anti-Inflamatorios No Esteroidales (AINE's) son un grupo de fármacos ampliamente utilizado en el ámbito mundial, debido a sus propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas. El grupo de los AINE's está integrado por compuestos de naturaleza química diferente, entre los que se encuentran: el ácido acetilsalicílico (aspirina), el piroxicam, la indometacina y el grupo de los profenos.

Los profenos se han aplicado con éxito en el tratamiento de pacientes que sufren de artritis reumatoide, debido a que disminuyen drásticamente el dolor y la inflamación provocados por esta enfermedad. Por otra parte, conforme aumentan las expectativas de vida en el ámbito mundial, aumenta el número de personas de la tercera edad, las cuales presentan los mayores niveles de incidencia de esta enfermedad, siendo entonces que la utilización de los profenos puede ser altamente benéfica para estos pacientes.

El ibuprofeno es uno de los fármacos en los que se ha centrado la atención para el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide y otras enfermedades que provocan dolor, inflamación y fiebre. Éste es un compuesto de alta eficacia clínica, pero algunas de sus propiedades toxicológicas (tales como el incremento en la formación de úlceras, debido al contacto directo del ácido con las mucosas gástricas) han restringido su uso en ciertos sectores de la población por periodos prolongados. Debido a lo anterior, existe un creciente interés en relación con el desarrollo de nuevos profármacos del ibuprofeno, en los que se mantengan los beneficios farmacológicos, pero con la disminución de las características químicas que brindan al compuesto sus propiedades tóxicas.

Los profármacos son sustancias que liberan al fármaco padre *in vivo*, utilizando para ello los sistemas de biotransformación presentes en el organismo una vez que han tomado contacto con el mismo, por lo que son útiles para mejorar la farmacoterapia con compuestos que pueden provocar daños a nivel gastrointestinal cuando son administrados en su forma primitiva.

En este trabajo, se reporta el estudio de algunas de las propiedades fisicoquímicas (coeficiente de absorción molar, coeficiente de partición, cinética de hidrólisis en medios con diferentes valores de pH y en presencia de plasma de rata y esterasas de hígado de cerdo) y farmacocinéticas del ibuprofenato de ibuprofilo. Este estudio, junto con nuevas investigaciones, servirá para conocer si el ibuprofenato de ibuprofilo es un buen candidato para ser considerado como un profármaco del ibuprofeno, el cual mantenga las características farmacológicas del compuesto padre, pero con una disminución notable de sus características tóxicas.

2. ANTECEDENTES.

El grupo de los Anti-Inflamatorios No Esteroidales (AINE's) está integrado por compuestos de naturaleza química diferente, entre los que se encuentran: los salicilatos, los derivados del indol, los derivados de la pirazolona, los derivados del ácido fenámico, y el grupo de los profenos¹.

Los profenos son fármacos derivados del ácido 2-fenilpropiónico. De manera general, estas sustancias, al igual que los otros AINE's, deben sus propiedades farmacológicas a que son inhibidores irreversibles de la ciclooxigenasa, por lo que interfieren con la síntesis de prostaglandinas, desencadenando el efecto clínico deseado¹. En la tabla 1, se encuentran los nombres de algunos de los profenos que han sido utilizados o probados clínicamente.

Tabla 1. Derivados del ácido 2-fenilpropiónico (profenos) que han sido probados o utilizados en la clínica ¹ .		
Alminoprofeno	Flurbiprofeno	Ibuprofeno
Benoxaprofeno	Indoprofeno	Naproxeno
Bermoprofeno	Ketoprofeno	Suprofeno
Carprofeno	Loxoprofeno	Acido tiaprofénico.
Cicloprofeno	Microprofeno	Pranoprofeno
Fenoprofeno	Pirprofeno	Flunoxaprofeno

Los profenos se han aplicado con éxito en el tratamiento de pacientes que sufren de artritis reumatoide, debido a que disminuyen drásticamente el dolor y la inflamación provocados por esta enfermedad. La utilización de los profenos en el tratamiento de la artritis reumatoide puede traer

gran cantidad de beneficios para la salud de la población y en la economía global ya que, conforme aumentan las expectativas de vida a nivel mundial, aumenta el número de personas de la tercera edad, las cuales presentan los mayores niveles de incidencia de esta enfermedad. En un estudio realizado en los Estados Unidos de Norteamérica en 1993², se encontró que la artritis reumatoide es la enfermedad con mayor incidencia en los ancianos de ese país, ya que la sufren 55 millones de estadounidenses; lo cual trae como consecuencia un gasto neto de 35,000 millones de dólares al año para el tratamiento de estos pacientes, y tanto el número de personas que padecen esta enfermedad como los gastos económicos derivados de ella tienden a aumentar con el paso del tiempo, por lo que, hacia 1993, existían alrededor de 42 fármacos en desarrollo para el tratamiento de pacientes con reumatismo². Esta información puede dar una idea de la importancia que tendría el desarrollo de nuevos compuestos antiinflamatorios y analgésicos en nuestro país, como es el caso del profármaco cuyo estudio se reporta en este trabajo.

El ibuprofeno es uno de los fármacos en los que se ha centrado la atención para el tratamiento de pacientes con artritis reumatoide y otras enfermedades que provocan dolor, inflamación y fiebre¹. Es un compuesto de alta eficacia clínica, pero algunas de sus propiedades toxicológicas han restringido su uso en ciertos sectores de la población o durante periodos prolongados por lo que, a continuación, se hará una revisión de sus propiedades farmacológicas, farmacocinéticas y toxicológicas y de la manera en que los profármacos derivados del ibuprofeno pueden ayudar a superar los inconvenientes derivados del uso de este fármaco.

2.1 Propiedades físicas y químicas del ibuprofeno.

El ibuprofeno se conoce con los nombres de ácido α -Metil-4-(2-metilpropil)bencenacético, ácido p-isobutilhidratrópico, ácido 2-(4-isobutilfenil)-propiónico, ibufrén, ibufreno, ibuprofén, y otros nombres comerciales derivados de los laboratorios que producen medicamentos con este compuesto. Fue desarrollado en el año de 1964 en Inglaterra por los laboratorios Upjohn^{3,4}. Se empezó a comercializar en Reino Unido hacia 1969, y en 1974 fue aprobada su venta en los Estados Unidos de Norteamérica⁴. Actualmente, se comercializa en México en un gran número de presentaciones para uso humano: tabletas (200, 400 y 800 mg), suspensiones (100 mg/5 mL), cápsulas de gelatina dura (400 mg) y cápsulas de gelatina blanda

(400 mg en emulsión). En Europa, está disponible además en forma de supositorios (400 mg, como sal de lisina)⁴.

El ibuprofeno es un sólido incoloro, cristalino, estable, el cual presenta dos estereoisómeros debido a la presencia de un carbono quiral en la cadena del ácido: el S(+)-Ibuprofeno y el R(-)-Ibuprofeno. Las estructuras de estos compuestos se muestran en la Figura 1.

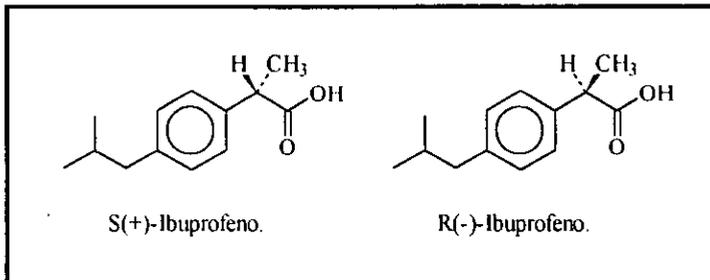


Figura 1. Estructura química de los enantiómeros del ibuprofeno⁵.

La mezcla racémica de ibuprofeno es relativamente insoluble en agua, pero es muy soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos. Es posible distinguir entre los isómeros y la mezcla racémica del ibuprofeno debido a su solubilidad en soluciones acuosas, como se observó en un estudio en donde se determinó que la solubilidad del S(+)-ibuprofeno fue de 9.61 mg/100, del R(-)-ibuprofeno fue de 9.51 mg/100 mL, y para la mezcla racémica fue de 4.65 mg/100 mL. Algo importante de hacer notar es que, debido a las características ácidas de la molécula del ibuprofeno ($pK_a = 4.60$), este compuesto es soluble en soluciones acuosas alcalinas (hidróxidos y carbonatos)^{3,5}.

Se ha evaluado la lipofilicidad del ibuprofeno mediante la determinación de su coeficiente de distribución octanol- amortiguadores de fosfatos: Bansal *et.al.*⁶ mencionan que el Log D^4 (coeficiente de distribución lípidos/agua) del ibuprofeno es de 2.22, mientras que Rao *et. al.*⁷ describen un valor de Log D cercano a 4.05, al hacer la determinación mediante la técnica de Hansch, con octanol- amortiguador de fosfato de sodio pH= 7.65. Las diferencias en el valor de

Log D pueden deberse a la diferencia en los valores de pH del amortiguador utilizado en cada caso.

Los enantiómeros del ibuprofeno pueden diferenciarse a partir de los datos de estudios de difracción de rayos X ya que, a pesar de mostrar el mismo número de moléculas de ibuprofeno en cada celda unitaria, el tamaño de las celdas es diferente para cada uno de los enantiómeros⁵, como puede verse en la tabla II.

Tabla II. Datos de la estructura cristalina del S(+)-ibuprofeno y la mezcla racémica ⁵ .		
Isómero	(+)-Ibuprofeno	(±)-Ibuprofeno
Fórmula	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	C ₁₃ H ₁₈ O ₂
Peso molecular	206.3	206.3
Sistema cristalino	Monoclinico	Monoclinico
Grupo espacial	P2 _{1/c}	P2 ₁
a [Å]	12.46	12.67
b [Å]	8.03	7.88
c [Å]	13.53	10.73
α [°]	-----	-----
β [°]	112.95	99.3
Moléculas/celda	4	4
Densidad (g/cm ³)	1.098	1.110

En lo que respecta a las propiedades ópticas del ibuprofeno, se ha encontrado que el isómero S(+) muestra un pico ancho a 221 nm cuando se determina su espectro U.V. con radiación polarizada en n-heptano, debido a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ del anillo de benceno 1,4-disustituido; este pico cambia de posición dependiendo del índice de refracción y polaridad del disolvente, y no se presenta para el R(-)-ibuprofeno. Cabe aclarar, que solamente es posible distinguir entre los enantiómeros si se utiliza luz polarizada en la obtención de sus espectros U.V.

⁵ Se reporta como valor de Log D debido a que en estos valores de pH, no se está determinando la distribución del compuesto totalmente no ionizado, sino la mezcla fármaco ionizado-fármaco no ionizado.

En estado sólido, puede distinguirse claramente entre los enantiómeros y la mezcla racémica utilizando espectrofotometría de fotoluminiscencia⁵.

Por otra parte, se ha encontrado que es posible diferenciar claramente entre el isómero S(+) y la mezcla racémica tomado como referencia el punto de fusión (52.1 ± 1 °C para el S(+), 75.3 ± 0.3 °C para la mezcla) y su entalpía de fusión (91.0 ± 1 J/g para S(+), 125 ± 2 J/g para la mezcla).

Finalmente, es importante mencionar que, a pesar de las claras diferencias en cuanto a propiedades fisicoquímicas (y, como se verá más adelante, en cuanto a propiedades farmacológicas y farmacocinéticas), los medicamentos que se distribuyen contienen a la mezcla racémica de ibuprofeno.

2.2 Propiedades farmacodinámicas del ibuprofeno.

El ibuprofeno es efectivo para el tratamiento de episodios de fiebre, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, fibrosis dorsolumbar, gota, tendinitis, bursitis, síndrome agudo del hombro doloroso, migraña, osteoartritis, espondilitis anquilosante, y lesiones de tejidos blandos como esguinces y torceduras. Se utiliza también en dismenorrea primaria, dolor dentario, cefalea, alivio del dolor postoperatorio y otalgias^{8,9}. Se han realizado estudios en los cuales se demuestra que el ibuprofeno es muy superior como analgésico y antiinflamatorio al compararlo con otros AINE's¹.

La actividad terapéutica del ibuprofeno se atribuye a su capacidad de inhibir reversiblemente a la ciclooxigenasa¹. Como se puede observar en la Figura 2, la ciclooxigenasa es una enzima necesaria para que se lleve a cabo la formación de los precursores de las prostaglandinas y el tromboxano; si el ibuprofeno interfiere con la formación de prostaglandinas, es posible entonces evitar una serie de reacciones que pueden ser desencadenadas por estas moléculas y que son causantes del dolor, la inflamación y la fiebre^{8,9}.

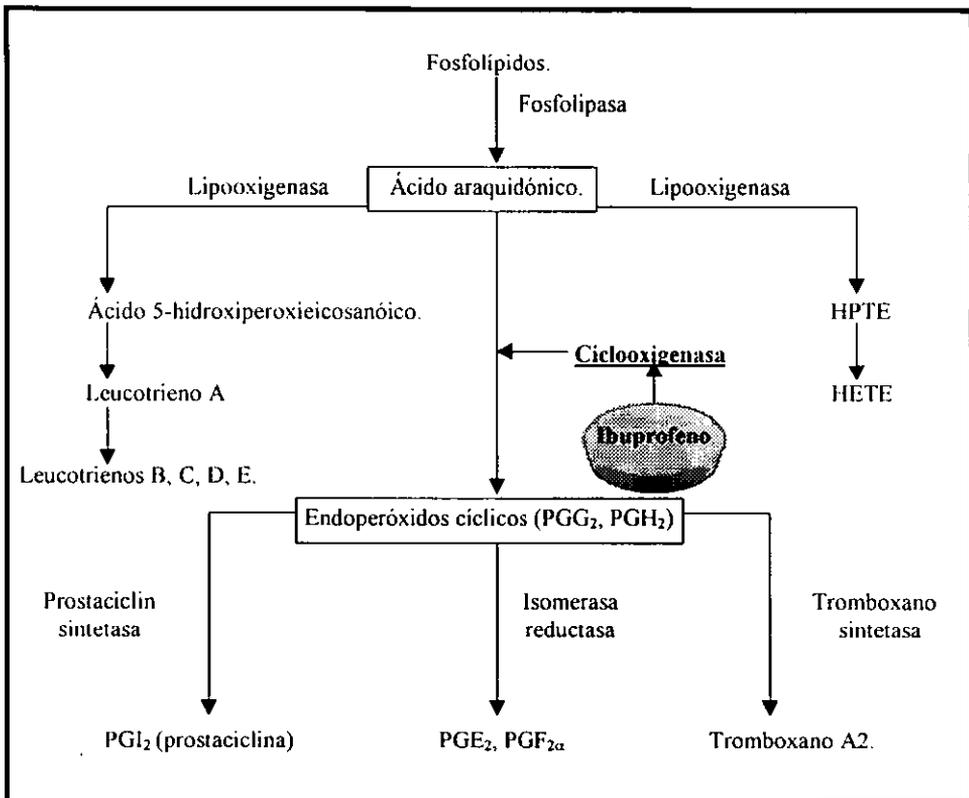


Figura 2. Metabolismo del ácido araquidónico. En el esquema, se puede observar el lugar donde actúa el ibuprofeno en esta “cascada”, debido a la inhibición de la ciclooxygenasa⁸.

En el caso de la artritis reumatoide, existe una controversia en cuanto al mecanismo de acción de fármacos tales como el ibuprofeno, ya que si éstos compuestos inhiben solamente la síntesis de prostaglandinas, actuarían tan sólo como paliativos de los síntomas, debido a la disminución del dolor y la inflamación. Esta duda puede despejarse mediante el conocimiento del modelo clásico de la artritis, en el que el evento fisiopatológico clave para desencadenar la enfermedad es la acumulación de linfocitos en el sinovio de la articulación como respuesta a estímulos desconocidos, junto con una predisposición genética. Los linfocitos producen altas cantidades de factores reumatoides los cuales, junto con las inmunoglobulinas, llevan a la formación de complejos inmunes, los que a su vez provocan la migración de células inflamatorias

a la articulación. Estas células, las cuales son monocitos y leucocitos polimorfonucleares, producen enzimas degradantes (principalmente colagenasa) y radicales oxígeno tóxicos, que son las sustancias responsables de la destrucción de las articulaciones. Los monocitos y leucocitos, a su vez, favorecen la síntesis de prostaglandinas, las cuales desencadenan la inflamación y el dolor. Se ha descubierto que, gracias a la actividad principal del ibuprofeno (inhibición de la ciclooxigenasa) y a otros mecanismos que no se han investigado completamente hasta la fecha, puede actuar en varios niveles durante el desarrollo de la artritis reumatoide⁸:

- 1) Disminuye la producción de IgM a partir de los linfocitos durante la artritis reumatoide en un 74%, debido a que el factor que desencadena su síntesis son las prostaglandinas,
- 2) Favorece a los factores supresores de células T, por lo que éstas no pueden asistir a las células B en la formación de los factores reumatoides,
- 3) Interfiere con la migración de los leucocitos a los lugares inflamados.
- 4) Inhibe la producción de colagenasa a partir de los monocitos.
- 5) Produce la aparición de una macromolécula termoestable que inhibe la adhesión de los granulocitos, interfiriendo con el proceso inflamatorio.
- 6) Inhibe la liberación de enzimas lisosomales y la agregación de neutrófilos.

Mediante estudios *in vitro*, se ha demostrado que el S(+)-ibuprofeno es un mejor inhibidor de la Ciclooxigenasa-1 (COX-1) y Ciclooxigenasa-2 (COX-2) que el R(-)-ibuprofeno. Esta marcada actividad enantioselectiva ha sido la fuente de un gran debate en cuanto a que el ibuprofeno se comercializa en la actualidad en medicamentos que contienen la mezcla racémica y no al enantiómero S(+) puro, lo cual implicaría una disminución en el potencial terapéutico del medicamento y, como se verá más adelante, un posible aumento en la toxicidad provocada por la mezcla racémica, al encontrarse presente el enantiómero R(-).

Por otra parte, algunas observaciones recientes¹ indican que la actividad del ibuprofeno, así como la de los AINE's en general, no necesariamente se debe a la inhibición de la ciclooxigenasa ya que:

- 1) Existen excepciones en cuanto a la correlación entre la inhibición *in vitro* de la ciclooxigenasa y el efecto antiinflamatorio y analgésico (p. ej., el ácido salicílico no inhibe a la ciclooxigenasa, pero es efectivo como AINE).
- 2) Algunos pacientes no muestran una reacción antiinflamatoria a un AINE en particular, a pesar de que éste sea un inhibidor efectivo de la COX.
- 3) A pesar de que el R(-)-flurbiprofeno no es un inhibidor efectivo de la COX, exhibe efectos analgésicos en la rata y el humano.
- 4) Generalmente, no hay una correlación entre la dosis o la concentración plasmática de los AINE's y la respuesta analgésica o antiinflamatoria, a pesar de que existe una relación excelente entre la concentración de los AINE's y la inhibición de la COX.

Con base en tales observaciones, se han propuesto hipótesis alternativas que puedan explicar de manera correcta la actividad farmacológica de estos compuestos, a partir de estudios que aún están aún en fase experimental:

- 1) Los AINE's pueden afectar los mecanismos de transporte del araquidonato¹⁰.
- 2) Pueden modificar las vías de secreción de las prostaglandinas¹⁰.
- 3) Es posible que exista un sitio de acción a nivel central para los AINE's¹.
- 4) Pueden inhibir la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos de manera no enantioselectiva¹.

- 5) Los AINE's no sólo inhiben a la COX, sino también a las lipooxigenasas⁸.
- 6) Este grupo de fármacos, presenta propiedades inmunorreguladoras⁸.

Finalmente, se mencionarán otras aplicaciones clínicas que se han encontrado para el ibuprofeno:

- Debido a que las altas concentraciones plasmáticas del ibuprofeno inhiben la migración, adherencia y agregación de los neutrófilos y favorecen la inhibición de la liberación de enzimas lisosomales, se ha observado que la administración de dosis altas de ibuprofeno durante periodos prolongados disminuye la declinación de la función pulmonar en pacientes con fibrosis quística y daño pulmonar moderado¹¹.
- La administración de ibuprofeno de manera periódica disminuye los niveles de tromboxano en sangre en pacientes con isquemia miocárdial, lo que puede ser benéfico en la prevención del infarto, además, al inhibir la agregación de las células polimorfonucleares, limita la magnitud del infarto al miocardio¹².
- El ibuprofeno es útil en el tratamiento del shock séptico y endotóxico en animales de laboratorio y domésticos¹³.
- Se ha administrado ibuprofeno a ovejas con la finalidad de disminuir el progreso de la permeabilidad de los edemas provocados por la endotoxina de la *Pasteurella hemolytica*¹³.
- Este fármaco es efectivo en el tratamiento de la mastitis coliforme aguda y otras condiciones endotóxicas en vacas, tales como la metritis tóxica, la pneumonia bacteriana y la diarrea aguda¹³.

2.3. Farmacocinética del ibuprofeno.

De manera general, puede mencionarse que la farmacocinética del ibuprofeno en humanos se describe adecuadamente mediante un Modelo Abierto de Dos Compartimientos (MADC), con un proceso pasivo de absorción de primer orden para las soluciones orales de ibuprofeno¹⁴, aunque Wagner *et. al.*¹⁵ discuten la posibilidad de una cinética de absorción de orden cero después de dosis elevadas de ibuprofeno (1200 mg o mayores) administradas por vía oral. A pesar de que el modelo farmacocinético derivado de las observaciones de Wagner resultó ser válido durante cierto tiempo, se han publicado reportes en los que se apoya que la absorción del compuesto se lleva a cabo de manera lineal¹⁶, además de que no es común administrar dosis de 1200 mg del compuesto en una sola toma. Es también importante aclarar que se prefiere el ajuste al MADC para los datos individuales de los sujetos y no para los datos promedio ya que, generalmente, los perfiles promedio en estudios farmacocinéticos tienden a enmascarar el segundo compartimiento, debido a que existe cierta variabilidad interindividual en los perfiles de concentración plasmática contra tiempo. Las posibles causas de esta variabilidad se discutirán posteriormente, así como la observación de la existencia de una posible dosis dependencia en la farmacocinética del ibuprofeno, la cual no se debe a que la absorción se lleve a cabo mediante un proceso saturable.

El fármaco presenta una biodisponibilidad absoluta cercana al 100% en voluntarios sanos¹⁷. Se sabe que la absorción tras la administración oral no se ve afectada generalmente en cantidad o velocidad por las diferencias de índole farmacéutica en los productos administrados¹⁸. Se ha encontrado que el factor limitante de la velocidad de absorción es la rapidez con que el ibuprofeno se disuelve en el tracto gastrointestinal, así como la proporción de ibuprofeno ionizado presente en la solución, siendo que estos dos factores dependen en gran medida del pH del entorno¹⁸.

La absorción del ibuprofeno no es enantioselectiva, como se ha demostrado al administrar la mezcla racémica del fármaco; sin embargo, es necesario considerar que las propiedades fisicoquímicas de los enantiómeros son diferentes y, por lo tanto, pueden afectar la velocidad de absorción, ya que depende de la velocidad de disolución del fármaco en el tracto gastrointestinal¹.

Se sabe también que la absorción del ibuprofeno se ve afectada en cierta manera por el efecto de los alimentos. En un estudio del efecto de una dieta vegetariana de alto contenido calórico (3093 KJ) en la biodisponibilidad del ibuprofeno administrado en tabletas de liberación sostenida a voluntarios hindúes¹⁹, se encontró que este tipo de alimentación produjo picos múltiples en los perfiles plasmáticos del ibuprofeno y, aunque el valor de concentración plasmática (C_p) de uno de los picos máximos es mayor debido al efecto de la dieta, no hay diferencias significativas en los valores de Área Bajo la Curva (ABC) o tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima (t_{max}). En otro estudio realizado en voluntarios británicos a los que se les administró un desayuno "local" ligero (646 KJ), se observaron mesetas cercanas al valor de la concentración plasmática máxima (C_{max}) en lugar de picos y, al administrar un desayuno de alto contenido calórico (3327 KJ), sólo se observó un pico de C_p . La conclusión que pudo obtenerse de ambos estudios es que, a pesar de que la absorción del ibuprofeno se lleva a cabo a lo largo de todo el intestino, su biodisponibilidad está en función del tiempo de tránsito a través de éste, pero las diferencias en el contenido de la dieta y en los hábitos alimenticios de diferentes zonas del planeta, pueden dar lugar a diferencias en la biodisponibilidad del ibuprofeno¹⁹, aunque aquí hay que aclarar que hace falta un mayor número de estudios y la consideración de que las diferencias también podrían deberse a la variación entre las poblaciones estudiadas.

Como ya se ha mencionado, la distribución del se ajusta al modelo bicompartimental. La distribución del fármaco es extravascular, pero con un bajo volumen de distribución en el estado estacionario ($V_{TE} = 12-15$ litros)¹.

En uno de los primeros estudios realizados para evaluar la unión del ibuprofeno a las proteínas plasmáticas, Whitlam *et. al.*²⁰ reportan porcentajes de fármaco unido a albúmina sérica humana y albúmina sérica bovina mayores al 99%, cuando el experimento se realiza con la mezcla racémica del ibuprofeno, lo que explica su bajo volumen de distribución. Los autores mencionan que existe una fuerte dependencia entre el porcentaje de fármaco unido y la concentración de proteínas en el plasma, además de que la unión es dependiente de la temperatura y de que sustancias endógenas como el palmitato, la bilirrubina, el colesterol y el

urato compiten por los sitios de unión con el ibuprofeno. Se reporta también la posibilidad de que el ibuprofeno se una a dos diferentes sitios en la molécula de albúmina, sólo que, en un estudio posterior, Lockwood *et. al.*²¹ retoman estos experimentos, realizándolos de manera similar a Whitlam, para comprobar que no existe evidencia de una segunda constante de asociación del ibuprofeno con la albúmina sérica humana. Por su parte, Tanaka *et. al.*²² realizaron un estudio en el cual se determinó el número de sitios de enlace del ibuprofeno en albúmina sérica bovina, encontrando que sólo existe un sitio de unión proteína- fármaco, que ocurre de manera hidrofóbica mediante enlaces débiles entre el fenilo y la albúmina y entre el metino adyacente al fenilo del ibuprofeno y la albúmina.

En un estudio más reciente acerca de la unión *in vivo* a proteínas del ibuprofeno, administrado a voluntarios sanos como mezcla racémica o como S(+) y R(-) de manera separada, Paliwal *et. al.*²³ concluyeron que el enlace a proteínas ocurre de manera mutuamente competitiva, enantioselectiva y no lineal, ya que: a) un estereoisómero desplaza al otro de los sitios de unión; b) la fracción libre (f_i) del S(+) ibuprofeno es mayor que la del R(-)-ibuprofeno ($Sf_i=0.006$ vs. $Rf_i=0.004$) y c) el desplazamiento de un enantiómero por el otro ocurre de manera dosis dependiente.

La información expresada en el párrafo anterior, sirve para explicar la observación de que la farmacocinética del ibuprofeno es dosis dependiente. Lockwood *et. al.*²⁴ reportaron la existencia de una no linealidad entre la dosis de ibuprofeno racémico administrada y el área bajo la curva de los perfiles farmacocinéticos del compuesto cuantificado como fármaco total, pero, cuando se determina la relación dosis-ABC para el fármaco libre, se pierde esa no linealidad, lo cual se debe al enlace dosis-dependiente de los estereoisómeros a las proteínas plasmáticas. Por otra parte, en un estudio en el que se administraron diferentes dosis de ibuprofeno racémico a voluntarios sanos (200, 400, 800 y 1200 mg)¹⁶, se encontró que, conforme aumenta la dosis, se observa una no linealidad de C_{max} para el enantiómero R(-) pero, para el enantiómero S(+) la proporcionalidad se mantiene en todo el intervalo; por otra parte, las relaciones ABC/dosis para fármaco no unido son iguales para todas las dosis pero, al hacer la cuantificación enantioselectiva de los isómeros, se observa que, conforme aumenta la dosis, disminuye el valor de ABC/dosis para el enantiómero R(-), y no así para el S(+), cuyos valores de ABC/dosis son iguales en todo el

intervalo de dosis. Estos datos son importantes ya que, al parecer, el enantiómero R(-) contribuye de manera significativa a la no linealidad en la farmacocinética del ibuprofeno.

Por otra parte, se han realizado estudios acerca de la distribución del ibuprofeno en fluido sinovial. Day *et al.*²⁵ realizaron un estudio en pacientes que presentaban problemas en las articulaciones debidos a la artritis, a los cuales se les administraron varias dosis de ibuprofeno racémico. Después de 4 días de administración, se cuantificaron los niveles de enantiómeros de ibuprofeno en líquido sinovial, y los datos se ajustaron a un modelo poliexponencial que puede verse de manera esquemática en la figura 3. Tras el estudio, se encontró que la entrada del fármaco al fluido sinovial sólo se lleva a cabo con el ibuprofeno libre, siendo que el valor de K_{ps} del isómero S(+) es 60% mayor que el del R(-), por lo que existe una relación entre este valor y la proporción libre de ambos enantiómeros; además, el valor de K_{sp} es mayor para el enantiómero S(+) con respecto al R(-). No se encontró una correlación entre la C_p y la concentración en fluido sinovial, por lo que se sugiere que las futuras comparaciones farmacocinética-farmacodinamia se lleven a cabo considerando al líquido sinovial ya que, al parecer, la eficacia terapéutica se mantiene debido a que el intercambio entre el plasma y el fluido sinovial es lento en ambas direcciones, lo que ocasiona que se mantengan concentraciones casi constantes de ibuprofeno en este compartimiento durante periodos prolongados. Se tienen resultados similares cuando se cuantifica el fármaco en fluido de ampollas generadas por succión²⁶. Todas estas observaciones implican que el transporte del ibuprofeno de la sangre al fluido de las articulaciones ocurre mediante un proceso pasivo a través de la membrana sinovial, el cual depende tanto de la porosidad de ésta membrana como de la permeabilidad de los vasos sanguíneos sinoviales.

En lo que respecta a la depuración del ibuprofeno, ésta se lleva a cabo principalmente por vías metabólicas (glucuronidación, hidroxilación y carboxilación), las cuales dependen de que el fármaco haya sido administrado como racemato o como enantiómero puro. El metabolismo del fármaco se lleva a cabo principalmente en el hígado, aunque el ibuprofeno es un compuesto de bajo coeficiente de extracción hepática, ya que no sufre un pronunciado efecto de primer paso después de su administración por vía oral. En la figura 4 se muestra un esquema general de las reacciones que forman parte de la biotransformación del ibuprofeno en el ser humano y en otras especies estudiadas²⁷⁻²⁸.

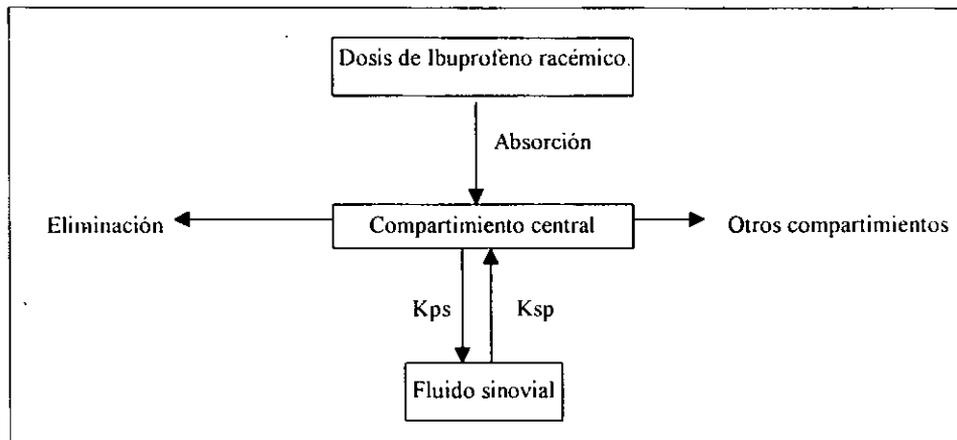


Figura 3. Modelo farmacocinético que explica la distribución del ibuprofeno hacia el fluido sinovial²⁵.

Como se puede observar en la figura 4, los enantiómeros tienen una vía común de biotransformación²⁸ a través de la cual son metabolizados a los siguientes compuestos: hidroxibuprofeno, carboxibuprofeno o glucurónido del ibuprofeno²⁷⁻²⁸. Después de administrar una dosis del fármaco por vía oral, entre el 50 y el 60 % de la misma aparece en la orina como los metabolitos hidroxibuprofeno o carboxibuprofeno y menos de un 10% de manera inalterada (la eliminación del ibuprofeno inalterado por vía renal se esquematiza en la figura 4 mediante la constante K_{Et}); la cantidad restante, se elimina en orina como glucurónido del ibuprofeno o de sus otros metabolitos²⁷. La reacción de oxidación en el grupo isobutilo del ibuprofeno se ve favorecida con la presencia de los metabolitos S(+)-S(+)-carboxibuprofeno y R(-)-R(-)-carboxibuprofeno²⁸⁻²⁹. La formación del hidroxibuprofeno ocurre al doble de velocidad para el S(+)-ibuprofeno en comparación con la velocidad de biotransformación del R(-)-ibuprofeno al metabolito hidroxilado³⁰.

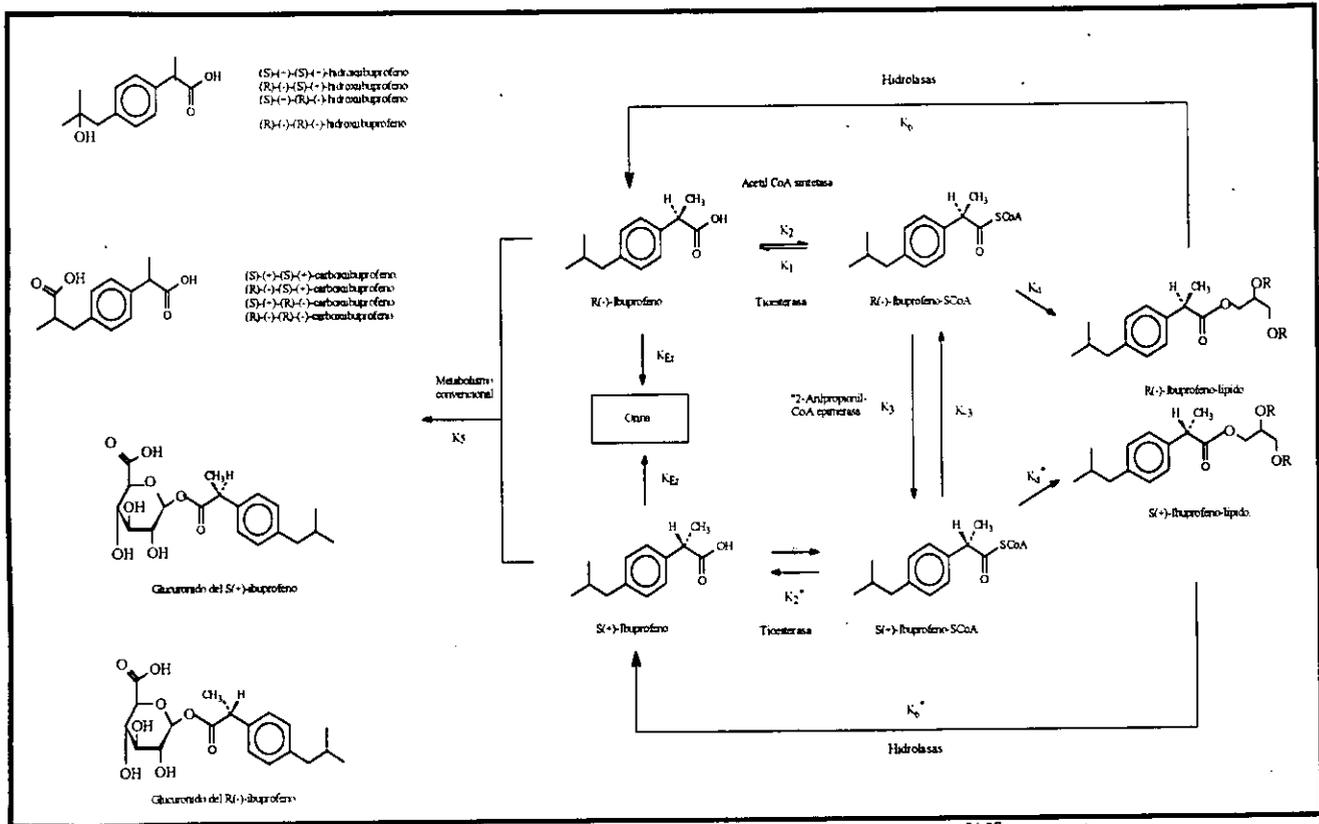


Figura 4. Metabolismo de los enantiómeros del ibuprofeno²⁶⁻²⁷.

Se cree que la glucuronidación del ibuprofeno puede llevarse tanto a nivel hepático como en otros órganos en el ser humano, ya que Jamali *et. al.*³¹ han reportado que puede formarse el glucurónido en el tracto gastrointestinal; por su parte, Cox *et. al.*³² encontraron que la rata excreta pequeñas cantidades de ibuprofeno conjugado y no conjugado en la bilis, además de que tiene la capacidad de sintetizar el glucurónido a nivel gastrointestinal. Finalmente, se ha postulado que puede existir estereoselectividad en cuanto a la conjugación del ibuprofeno: Oliary *et. al.*³³ mencionan que la velocidad de transformación del S(+)-ibuprofeno a glucurónido es mayor que la del isómero R(-), aunque Rudy *et. al.*²⁹ explican que debe tenerse cuidado en esta conclusión, ya que es posible que el efecto por la hidrólisis del conjugado, la cual se lleva a cabo de manera espontánea tanto en orina como en plasma, sea la causante de esta observación y no se deba en realidad a un proceso enantioselectivo.

Una vez que se han revisado algunos aspectos del metabolismo convencional del ibuprofeno, es necesario hacer una mención especial a una serie de reacciones que están involucradas en la biotransformación enantioselectiva del fármaco, las cuales tienen importantes implicaciones en la farmacodinamia, farmacocinética y toxicología de este compuesto. Como puede verse en la figura 4, el isómero R(-) del ibuprofeno está sujeto al ataque enantioselectivo de la enzima Acetil-CoA-sintetasa, lo que resulta en la formación reversible del tioéster del R(-)-ibuprofeno con la Coenzima-A; tal reacción no tiene lugar con el S(+)-ibuprofeno²⁷⁻²⁸. La primera consecuencia de este ataque enantioselectivo por parte de la enzima es que, tras la administración del isómero S(+) puro, se obtenga un número mucho menor de metabolitos que cuando se administra la mezcla racémica del ibuprofeno, sin embargo, éste no es el efecto más importante provocado por la formación del R(-)-Ibuprofeno-CoA.

Una vez formado el tioéster R(-)-Ibuprofeno-CoA, éste puede verse involucrado en una serie de reacciones en el organismo debido a su alta reactividad. La reacción más importante que sufre este tioéster es la epimerización o inversión de configuración del centro quiral, dando lugar a la formación del S(+)-ibuprofeno-CoA, lo que conlleva a que, después de administrar una dosis determinada del racemato, la relación (S):(R) en el organismo sea de aproximadamente (70:30), y no de (50:50) como podría esperarse²⁷. El mecanismo por el que se lleva a cabo la epimerización aún no ha sido estudiado en su totalidad, más se sabe que no involucra el desplazamiento del

protón del metilo en el centro quiral, sino cambios en la hibridación restringidos al carbono quiral que podrían involucrar a la función carboxilato adyacente³⁰. Por otra parte, ha habido cierta discusión acerca del sitio anatómico en donde se lleva a cabo la epimerización: Jamali *et. al.*³¹ reportan que existe la posibilidad de que la inversión se lleve a cabo en mayor grado a nivel presistémico; por su parte, Hall *et. al.*³⁴ contradicen tal hipótesis ya que, después de la administración del racemato tanto por vía oral como por vía intravenosa en humanos, no encontraron diferencias entre los valores de constante de eliminación para los isómeros entre una vía de administración y la otra. Nuevos estudios *in situ* e *in vitro*³² indican que, en la rata, la reacción de inversión es catalizada a nivel hepático³², siendo que el proceso se lleva a cabo principalmente en el espacio intermembranal de las mitocondrias³³. La estrecha similitud en el metabolismo del ibuprofeno entre ratas y humanos, hace pensar que estas observaciones pueden extrapolarse a nuestra especie.

Una vez formado el R(-)-ibuprofeno-CoA y su epímero, ambos compuestos pueden quedar involucrados en el metabolismo de los lípidos¹, lo que los lleva a ser precursores de la biosíntesis de ésteres del glicerol (en mayor proporción del R(-)-ibuprofeno), el cual a su vez puede hallarse unido también a ácidos grasos. Se ha observado que estos ésteres del R(-)-ibuprofeno y el glicerol se acumulan en el tejido adiposo de la rata, y a partir de ellos se va liberando de una manera extremadamente lenta al R(-)-ibuprofeno, mediante la hidrólisis mediada por carboxilesterasas inespecíficas, lo que ocasiona que su tiempo de vida media se vuelva exageradamente prolongado (se reportan valores de $t_{1/2}$ de eliminación de 116 horas y mayores)²⁷.

Las características del metabolismo complejo del ibuprofeno, aunadas a su unión a proteínas plasmáticas de manera enantioselectiva, no lineal y mutuamente competitiva, llevan a una serie de consecuencias farmacocinéticas que a continuación se enumeran:

- En estudios en ratas se ha observado que, conforme aumenta la edad, hay un aumento en la fracción de fármaco libre, como consecuencia de una disminución en la concentración de albúmina plasmática, lo que conlleva a un aumento en el valor del volumen de distribución, más no hay un aumento en el valor de la depuración (Cl)

debido a la disminución del contenido de proteína microsomal en el hígado³⁶. En estudios en humanos se encontraron datos similares, con una disminución en Cl/F del 11% y un aumento de Vd/F de 15% debido a la edad, pero la gran variabilidad en los resultados hace que estas diferencias no sean estadísticamente significativas³⁷.

- La variabilidad interindividual observada en los perfiles farmacocinéticos de los enantiómeros se debe, en gran medida, a las diferencias en la unión a proteínas y metabolismo entre los sujetos que participan en los estudios³³.
- El valor de la depuración aumenta conforme se incrementa la dosis administrada, debido a la saturación de los sitios de unión de las proteínas³¹.
- Las diferencias interindividuales en la velocidad de inversión del R(-)-ibuprofeno pueden ser una de las causas principales de la falta de correlación farmacocinética-farmacodinámica para el ibuprofeno cuando se administra como racemato^{1,31}.
- En general, la depuración del isómero R(-) es mayor que la del isómero S(+), debido a todos los procesos metabólicos que puede sufrir el primero, siempre y cuando no se vea conjugado con el glicerol³².

En lo que respecta a las alteraciones de la farmacocinética del ibuprofeno debidas a estados patológicos en el ser humano, se ha reportado que la presencia de disfunción renal provoca que los niveles plasmáticos del ibuprofeno, después de que éste ha sido administrado como racemato, se vean incrementados, aunque no en una proporción clínicamente significativa³⁸. Por otra parte, se sabe que la hemodiálisis no provoca variaciones significativas en la disposición del ibuprofeno³⁹.

Se sabe que el daño hepático provocado por el alcoholismo en humanos provoca un aumento de casi un 20% en el valor de vida media de eliminación, aunque la variabilidad de los datos obtenidos no permitió establecer que este efecto fuera en realidad significativo⁴⁰. En otro estudio, Cox et. al.³² establecieron un modelo del daño provocado por el alcoholismo

(principalmente, formación de depósitos de grasa) en el hígado de rata y encontraron que la permeabilidad hepática del isómero R(-) aumenta casi en un 100% en presencia de depósitos de grasa en el hígado, lo que no provoca un aumento en el valor de Cl para este enantiómero sino, por el contrario, una disminución, debido a que se ve favorecida su salida de los hepatocitos, lo que conlleva entonces al aumento de los niveles de R(-)-ibuprofeno en plasma; por otra parte, la permeabilidad y la depuración del isómero S(+) no se ven afectadas.

La farmacocinética del ibuprofeno en pacientes que sufren artritis reumatoide no se ve alterada en comparación con la de los voluntarios sanos¹⁴.

En niños de 3 a 12 años que padecen enfermedad febril aguda, se ha observado que no existen variaciones en los parámetros farmacocinéticos determinados con respecto a los reportados para voluntarios sanos, pero se menciona que en niños con edades menores a 2.5 años la depuración es menor, debido a que éstos presentan mayores valores de volumen aparente de distribución⁹.

En lo que respecta a las alteraciones en la farmacocinética del ibuprofeno provocadas por la interacción con otros fármacos, se ha encontrado que la administración conjunta con cimetidina afecta la farmacocinética del compuesto, ya que los valores de ABC se ven aumentados debido a una disminución en su depuración. Este efecto no se observa en presencia de ranitidina⁴¹. Se sabe también que el probenecid inhibe la secreción tubular de los glucurónidos de los AINE's, por lo que provoca un aumento en la inversión quiral del R(-)-ibuprofeno¹. La administración de aspirina de manera conjunta con ibuprofeno provoca una disminución del 50% en los niveles del profeno, debido a una posible competencia por los sitios de unión a proteínas¹⁴. No existen alteraciones en la farmacocinética del ibuprofeno debidas a la administración conjunta con acetaminofeno¹⁴.

Estudios realizados en animales tales como el perro⁴², vacas productoras de leche¹³, caballos¹³, cabras productoras de leche⁴³, ratas^{27, 36, 42} y conejos⁴⁴, muestran que los parámetros farmacocinéticos son comparables con los obtenidos en el hombre teniendo en cuenta, como es

lógico, la diferencia en masa corporal entre una y otra especie, y considerando algunos aspectos particulares:

- El ibuprofeno no se distribuye a la leche de las vacas o las cabras productoras de este alimento^{13, 43}.
- En los rumiantes, se ha observado que las dosis administradas deben ser mayores, debido a que el ibuprofeno puede enlazarse al rumen, lo que disminuye su biodisponibilidad¹³.
- En el perro y la rata, se reporta la posibilidad de que el S(+)-ibuprofeno inhiba la inversión quiral del isómero R(-), aunque todavía los estudios con este respecto son insuficientes⁴².
- Debe tenerse en cuenta, como ya se mencionó, que en la rata pueden existir diferencias considerables en los parámetros farmacocinéticos observados con respecto a los de los humanos, ya que el R(-)-ibuprofeno forma en mayor cantidad los conjugados con el glicerol en esta especie, lo que provoca un aumento exagerado en su vida media de eliminación²⁷.

2.4 Propiedades toxicológicas del ibuprofeno.

Una vez revisados los aspectos farmacodinámicos y farmacocinéticos del ibuprofeno, es posible hacer una explicación más adecuada de sus propiedades tóxicas. En primer lugar, se hablará acerca de los aspectos toxicológicos menos comunes del fármaco, para proceder a una explicación más amplia en lo que se refiere a los efectos sobre el tracto gastrointestinal derivados del uso de este compuesto.

La capacidad del R(-)-ibuprofeno de formar ésteres con el glicerol ha provocado un aumento en el debate acerca de que se siga permitiendo su administración en la forma de mezcla racémica en humanos. Como ya se ha mencionado, éstos ésteres tienen la capacidad de depositarse en el tejido graso debido a su lipofilicidad, provocando que el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) del fármaco en animales como la rata se vea aumentado de manera exagerada²⁷. La posibilidad del ibuprofeno de formar estos depósitos implicaría que el fármaco, después de una

administración durante periodos prolongados, llegue a acumularse de tal manera en la grasa que provoque una toxicidad asociada con los altos niveles del compuesto en el organismo, además de que la alta lipofiliidad de los ésteres del ibuprofeno con glicerol puede provocar que el fármaco alcance el sistema nervioso central con mayor facilidad, generando una serie de efectos tóxicos a este nivel³³, como es el caso de la meningitis aséptica¹² en pacientes que padecen de lupus eritomatoso.

Por otra parte, se sabe que el ibuprofeno-SCoA tiende a asociarse con las proteínas del plasma mediante enlaces que presentan una alta estabilidad, lo que provoca que se formen complejos tioéster-albúmina que son inmunogénicos, y pueden llevar a un proceso de hipersensibilización al fármaco en pacientes que lo tomen durante periodos muy prolongados¹.

En lo que respecta a la capacidad ulcerogénica del ibuprofeno se ha reportado que, en general, los AINE's provocan la formación de úlceras gástricas por dos mecanismos: ya sea por contacto directo⁸, debido a la acidez del fármaco, o por la inhibición de la síntesis de prostaglandinas⁸ siendo que el segundo mecanismo puede presentarse por acción local después de la administración de los compuestos tanto por la vía oral como por la parenteral. Para el ibuprofeno se menciona que los efectos tóxicos a nivel gastrointestinal tras la administración oral del fármaco son más significativos que cuando la administración se lleva a cabo por vía intravenosa³⁵. En un estudio en el cual se administraron conjuntamente paracetamol e ibuprofeno, se observó una potenciación del efecto erosivo del segundo, y se llegó a la conclusión de que esto se debía principalmente a que ambos tienen la capacidad de inhibir la síntesis de prostaglandinas⁴⁶. En trabajos más recientes²⁷ se observó que, en las ratas, el R(-)-flurbiprofeno exacerba la ulcerogenicidad del S(+)-ibuprofeno mediante un proceso aquiral, debido a que provocó un aumento de la marginación de neutrófilos hacia las venas mesentéricas postcapilares, lo cual no era resultado de una inhibición de la ciclooxigenasa. La marginación de leucocitos, al igual que la inhibición de la ciclooxigenasa, puede ser necesaria pero no suficiente para la formación de las úlceras, y ambos efectos pueden ser complementarios porque, en presencia de un inhibidor de la COX (como sería el S(+)-ibuprofeno), existen bajos niveles de prostaglandinas, lo que provoca una vasoconstricción local que, junto con la formación exacerbada de coágulos

blancos genera isquemia gástrica, la cual se conjunta con una ulceración inducida tanto por la acidez del fármaco como por la presencia de radicales libres²⁷.

Para finalizar con los aspectos toxicológicos del ibuprofeno, se menciona que éste fármaco no debe tomarse conjuntamente con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, el litio, el metotrexato y los anticoagulantes (esto último debido a su actividad como inhibidor de la síntesis de factores de coagulación)¹. Además, se ha hecho alusión a la posibilidad de que el ibuprofeno precipite o agrave el daño renal o el fallo cardíaco congestivo en pacientes que sufren estas enfermedades, debido a una posible isquemia aguda producida por vasoconstricción, ya que inhibe la síntesis de las prostaglandinas vasodilatadoras^{12,38}.

2.5 Uso de profármacos del ibuprofeno para disminuir su ulcerogenicidad.

El potencial ulcerogénico del ibuprofeno implica que este fármaco no pueda ser utilizado en pacientes que sufren de gastritis o úlcera péptica, además de que no puede administrarse durante periodos muy prolongados a un paciente sin que éste sufra alguna alteración a nivel gastrointestinal. Ha habido numerosos intentos para lograr disminuir estos efectos: dosificación conjunta del ibuprofeno con fármacos antagonistas de los receptores H-2 (cimetidina o ranitidina), administración del fármaco en tabletas formuladas con amortiguadores de pH, empleo de grageas en lugar de tabletas convencionales, etc. Sin embargo, una de las alternativas más promisorias para disminuir los efectos ulcerogénicos del ibuprofeno, sin comprometer su actividad farmacológica, ha sido la síntesis y posible administración de profármacos que enmascaren el grupo carboxilo del compuesto, evitando así la contribución de la acidez del fármaco a su toxicidad.

Los profármacos son compuestos que pueden ser utilizados para mejorar las propiedades farmacéuticas y biológicas de las sustancias activas, ya que modifican las características farmacocinéticas del compuesto, aumentan la biodisponibilidad y/o estabilidad del fármaco en el organismo o pueden aumentar la aceptación por parte del paciente y el cumplimiento de los regimenes de dosificación al eliminar problemas de sabor, olor, dolor de la inyección y/o al disminuir la irritación gástrica producida por sustancias agresivas al organismo⁴⁷.

Una de las características principales de los profármacos es que estas sustancias no son capaces de ejercer un efecto farmacológico por sí mismas, sino que requieren de un proceso de biotransformación en el organismo para liberar *in situ* a la sustancia activa, ya sea mediante un proceso de hidrólisis o mediante la transformación del profármaco al compuesto activo por algún mecanismo que implique la utilización de las vías metabólicas convencionales. En la figura 5, se ilustra, de manera esquemática, la forma en que las sustancias activas son liberadas a partir de los profármacos. Por otra parte, es necesario dejar claro que existen algunas sustancias que son farmacológicamente activas *per se* y que, por lo tanto, no requieren de ser transformadas en el cuerpo para ejercer su efecto, por lo que no son consideradas como profármacos, sino como análogos del fármaco⁴⁸.

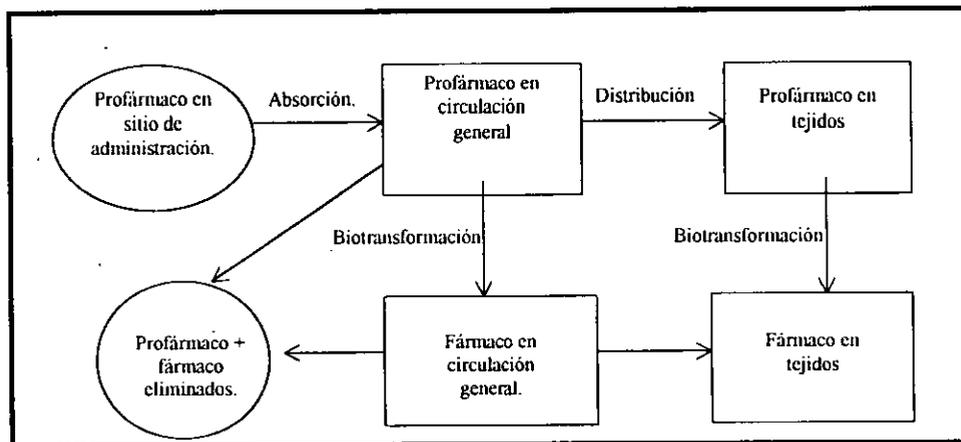


Figura 5. Liberación del fármaco a partir de un profármaco dentro del organismo.

En lo que respecta al ibuprofeno, la revisión bibliográfica exhaustiva realizada sirvió para observar que a la fecha no se han realizado muchos trabajos en relación a los profármacos de este principio activo. En los pocos reportes existentes se indica su síntesis y su potencial como sustancias que sirven para disminuir la ulcerogenicidad del fármaco; algunos contienen información acerca de la determinación de sus propiedades físicas, químicas, farmacológicas y farmacéuticas y, en un artículo, se reportan datos concernientes a la determinación de sus parámetros farmacocinéticos⁴⁹.

En la tabla III, se enumeran algunos de los profármacos del ibuprofeno que han sido sintetizados hasta la fecha. Como podrá observarse éstos son, en su mayoría, ésteres o amidas formadas entre el grupo carboxilo del compuesto y un alcohol o una amina, siendo que el grupo unido al carboxilo puede presentar una gran variedad en cuanto a su tamaño y sustitución.

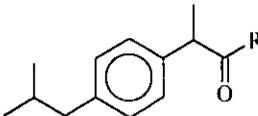
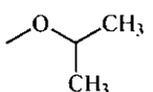
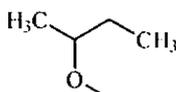
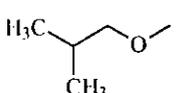
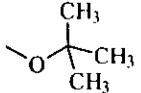
Tabla III. Profármacos del ibuprofeno reportados en la literatura científica.		
 <p>Estructura general del profármaco.</p>		
Substituyente (R).		
$-O-CH_3$ I ^o	$-O-CH_2-CH_3$ II ^o	$-O-(CH_2)_2-CH_3$ III ^o
 IV ^o	$-O-(CH_2)_3-CH_3$ V ^o	 VI ^o
 VII ^o	 VIII ^o	$-O-(CH_2)_4-CH_3$ IX ^o
$-O-(CH_2)_{13}-CH_3$ X ^o	$-O-(CH_2)_{15}-CH_3$ XI ^o	$-O-(CH_2)_{17}-CH_3$ XII ^o

Tabla III. Profármacos del ibuprofeno reportados en la literatura científica (continuación).

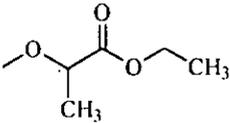
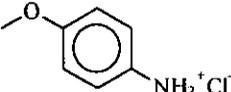
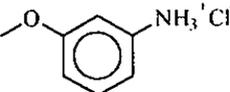
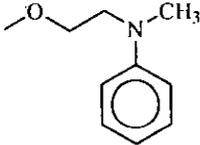
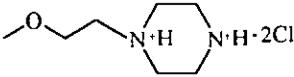
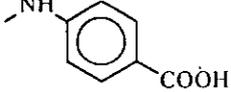
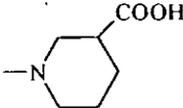
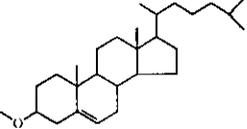
Substituyente (R).		
-O-(CH ₂) ₅ -CH ₃ XIII ⁶	-O-(CH ₂) ₆ -CH ₃ XIV ⁶	-O-(CH ₂) ₇ -CH ₃ XV ⁶
		
XVI ⁴⁹	XVII ⁴⁵	XVIII ⁴⁵
-O-(CH ₂) ₂ -NH ₃ ⁺ Cl ⁻ XIX ⁴⁵	-O-(CH ₂) ₂ -N(CH ₃) ₂ • HCl XX ⁴⁵	-O-(CH ₂) ₂ -N(C ₂ H ₅) ₂ • HCl XXI ⁴⁵
-O-(CH ₂) ₃ -N(CH ₃) ₂ • HCl XXII ⁴⁵	-O-(CH ₂) ₃ -N(C ₂ H ₅) ₂ • HCl XXIII ⁴⁵	-O-CH ₂ (CH ₃)-N(CH ₃) ₂ • HCl XXIV ⁴⁵
-O-CH ₂ (CH ₃)-N(C ₂ H ₅) ₂ • HCl XXV ⁴⁵	-O-(CH ₂) ₂ -N-morfolina • HCl XXVI ⁴⁵	-O-(CH ₂) ₂ -N-piperidina • HCl XXVII ⁴⁵

Tabla III. Profármacos del ibuprofeno reportados en la literatura científica (continuación).

Substituyente (R).		
 <p>XXVIII⁴</p>	<p>-O-(CH₂)₂-NH(CH₃) • HCl</p> <p>XXIX⁴⁵</p>	<p>-NH-CH₂-COOH</p> <p>XXX⁴⁵</p>
<p>-NH(CH₃)-N(C₂H₅)₂</p> <p>XXXI⁴⁵</p>	 <p>XXXII⁴⁵</p>	 <p>XXXIII⁴⁵</p>
 <p>XXXIV⁴⁵</p>	 <p>XXXV⁵⁰</p>	<p>Poli-(N-hidroxietyl)-DL-aspartamida</p> <p>XXXVI⁵¹</p>
<p>NH₃-CH₂-CH₃-O-</p> <p>XXXVII⁵²</p>	<p>Polietilenglicol-2000-1</p> <p>XXXVIII⁵³</p>	<p>Polivinilpirrolidona-1</p> <p>XXXIX⁵³</p>

En la tabla IV, se muestran algunas de las propiedades fisicoquímicas, el tiempo de vida media de hidrólisis del profármaco en plasma y solución acuosa, así como la ulcerogenicidad para algunos de los profármacos enumerados en la tabla III. Como podrá observarse, estos compuestos presentan una serie de características que los hacen diferentes al fármaco original, y que pueden llegar a ser determinantes en su comportamiento farmacocinético y toxicológico en el organismo:

1. En general, son menos solubles en agua que el ibuprofeno, por lo que tienden a tener valores más altos de Log P.
2. Presentan mayor estabilidad en soluciones acuosas alcalinas que en plasma, por lo que pueden permanecer inalterados en el fluido del tracto intestinal y pasar después de su absorción al torrente circulatorio, donde liberarán al fármaco de una manera rápida.
3. La mayoría de los profármacos son menos ulcerogénicos que el ibuprofeno.

Con respecto a las propiedades descritas en la tabla III, Bansal *et. al.*⁶ dividen a los compuestos que son candidatos a utilizarse como profármacos del ibuprofeno en cuatro grupos, los cuales tienen las siguientes características:

Grupo I. Son compuestos que mantienen una actividad farmacológica similar a la del fármaco, pero su inestabilidad ante las esterases provoca que sean hidrolizados rápidamente en el tracto gastrointestinal, por lo que no tienen efecto protector alguno (p. ej., profármaco I).

Grupo II. Presentan una menor actividad farmacológica que el fármaco, debida a una pobre absorción, hidrólisis ineficaz en plasma, o porque pueden presentar un metabolismo alterno que altera la actividad farmacológica. Generalmente, su cinética de hidrólisis evita que sean ulcerogénicos, pero impide que se llegue a concentraciones terapéuticas del fármaco (p. ej., profármacos IX, X, XI, XII, XIII, XIV y XV).

Tabla IV. Propiedades fisicoquímicas, tiempo de vida media de hidrólisis del profármaco en plasma y solución acuosa y ulcerogenicidad para profármacos del ibuprofeno.

Compuesto ^a	Solubilidad acuosa (mcg/mL)	Log P	t _{1/2} solución acuosa (h)	t _{1/2} plasma (h)	% de úlceras
Ibuprofeno	71.28	2.22	---	---	100
I ⁶	55.02	2.97	227.9	11.25	100
II ⁶	43.82	3.02	98.7	10.5	80
III ⁶	46.96	2.88	72.4	7.8	8.3
IV ⁶	67.75	2.30	40.5	11.3	66.6
V ⁶	36.33	3.13	42.9	4.9	40
VI ⁶	43.32	2.68	63.5	17.3	80
VII ⁶	13.45	3.06	79.7	14.7	20
VIII ⁶	89.94	2.37	34.0	14.5	100
IX ⁶	30.75	3.30	74.6	12.5	60
X ⁶	24.74	3.55	157.1	49.1	40
XI ⁶	21.10	3.75	151.3	45.3	40
XII ⁶	20.21	3.79	87.6	43.4	20
XIII ⁶	12.85	3.60	115.5	32.6	0
XIV ⁶	11.18	3.71	105.2	21.3	0
XV ⁶	6.80	3.71	138.6	23.9	0
XVII ⁴⁵	---	---	---	---	13.5
XX ⁴⁵	---	---	---	---	19.2
XXII ⁴⁵	---	---	---	---	11.2
XXIV ⁴⁵	---	---	---	---	15.3
XXXII	---	---	---	---	12.22
XXX ⁴⁵	---	---	---	---	27.2
XXXV ⁵⁰	---	---	---	4.0	---

^a Los números corresponden a los asignados en la tabla III.

Grupo III. Son profármacos que no reducen la ulcerogenicidad del ibuprofeno, aunque no sean hidrolizados en el tracto gastrointestinal y presentan menor actividad farmacológica que éste. Es posible que estas sustancias tengan actividad irritante al estómago por sí mismas, por lo que se comprueba que no es suficiente el enmascarar al ácido carboxílico, sino que esta sustitución debe hacerse con los grupos funcionales más adecuados. Ejemplos de este caso son los compuestos IV, VI y VIII (como podrá observarse, todos son derivados de alcoholes ramificados).

Grupo IV. Ejemplificado por las sustancias III y V, son los compuestos que presentan una retención de la actividad terapéutica y reducción en la ulcerogenicidad, aunque podrían tener características farmacocinéticas diferentes a las del compuesto original debido a su velocidad de hidrólisis en plasma y a las diferencias en el sitio de absorción a nivel del tracto gastrointestinal. Éstos son los mejores candidatos, y son el tipo de compuestos sobre los que hay que centrar la atención en los estudios que tienen como objetivo la obtención de profármacos eficientes del ibuprofeno.

A partir de esta clasificación, salta a la vista que las propiedades fisicoquímicas, tales como el coeficiente de partición lípidos/agua y la solubilidad, así como la estabilidad del compuesto en el organismo, son los factores determinantes para obtener un profármaco real del ibuprofeno, ya que influyen directamente en su actividad farmacológica y toxicológica, así como en su farmacocinética.

En lo que se refiere a las propiedades farmacocinéticas de los profármacos del ibuprofeno, Samara *et. al.*⁴⁹ encontraron que no existen diferencias significativas en cuanto a la farmacocinética del ibuprofeno liberado a partir del ibudice (compuesto XVI en la tabla III) en comparación con la farmacocinética del ibuprofeno cuando es administrado por vía oral o intravenosa como fármaco base, lo cual puede deberse a que el ibudice es hidrolizado rápidamente en el fluido intestinal simulado ($t_{1/2}$ = 3 minutos). Es interesante mencionar que, en este caso en especial, la vida media de hidrólisis del ibudice en plasma es mucho mayor que en el fluido intestinal simulado ($t_{1/2}$ = 7.3 horas en plasma). Su inestabilidad química y su "alta" estabilidad a la hidrólisis enzimática provocaron que este compuesto no fuera considerado como

una buena alternativa para su uso como profármaco del ibuprofeno.. Los datos farmacocinéticos obtenidos de los estudios en perros mestizos se reportan en la tabla V.

Tabla V. Parámetros farmacocinéticos del ibuprofeno después de haber sido administrado por vía oral e intravenosa como fármaco libre y por vía oral como profármaco (ibudice)⁴⁹.

Parámetro farmacocinético.	Ibudice p.o. (dosis equivalente a 175 mg de ibuprofeno)	Ibuprofeno p.o. (dosis de 175 mg)	Ibuprofeno i.v. (dosis de 175 mg)
$t_{1/2}$ (h)	2.9 ± 0.5	2.9 ± 1.3	3.0 ± 1.3
ABC ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$)	76 ± 26.0	77 ± 15.0	94 ± 21.0
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	14 ± 6.0	16 ± 6.0	—
t_{max} (h)	2.3 ± 1.7	3.4 ± 2.7	—
F_{rel} (%)	96 ± 16.0	—	—
F_{abs} (%)	84 ± 29.0	87 ± 31.0	—

Como se ha podido observar a lo largo de este texto, existe una necesidad en cuanto al desarrollo de nuevos profármacos del ibuprofeno, con el fin de encontrar sustancias que disminuyan la ulcerogenicidad del compuesto y puedan ser alternativas reales para sustituir al fármaco en la terapia de aquellos pacientes que no lo puedan utilizar en forma de fármaco libre. Una de estas sustancias puede ser el ibuprofenato de ibuprofilo, el cual se ha sintetizado recientemente en nuestro país⁵⁴ (su estructura se muestra en la figura 6). En las siguientes páginas, se detallará la evaluación biofarmacéutica que se realizó a este compuesto.

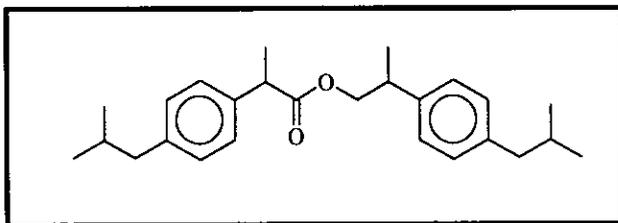


Figura 6. Estructura química del ibuprofenato de ibuprofilo, un nuevo candidato a profármaco del ibuprofeno.

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

Llevar a cabo la evaluación biofarmacéutica del ibuprofenato de ibuprofeno, para recabar datos que permitan establecer si este compuesto es un profármaco del ibuprofeno.

3.2 Objetivos específicos.

- I. Determinar el coeficiente de extinción molar (ϵ) del ibuprofenato de ibuprofeno en medios acuosos y orgánicos.
- II. Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para cuantificar al ibuprofenato de ibuprofeno y/o a sus precursores (ibuprofeno e ibuprofeno) tanto en soluciones acuosas como en plasma.
- III. Determinar el coeficiente de partición lípidos/agua del ibuprofenato de ibuprofeno.
- IV. Determinar la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno *in vitro* en medios acuosos de diferente pH, en plasma de rata y en presencia de esterasas hepáticas de cerdo.
- V. Obtener datos preliminares acerca de la farmacocinética del ibuprofeno liberado *in vivo* en ratas Wistar macho, tras la administración por vía oral e intravenosa del ibuprofenato de ibuprofeno.

4. HIPÓTESIS.

El conocimiento de las propiedades fisicoquímicas del ibuprofenato de ibuprofilo (lipofilidad, cinética de hidrólisis a diferentes pH's y cinética de hidrólisis enzimática) y de los datos preliminares de la farmacocinética del ibuprofeno liberado *in vivo* tras la administración del ibuprofenato de ibuprofilo en ratas, servirán como pauta para establecer si esta sustancia es un candidato viable para ser utilizado como un nuevo profármaco del ibuprofeno.

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

5.1 Materiales.

5.1.1 Equipo.

Balanza analítica OHAUS modelo AS-200.

Espectrofotómetro U.V.-visible marca Shimadzu, mod. UV-1601

Cromatógrafo de líquidos Shimadzu, equipado con:

Detector U.V. mod. SPD-10AV.

Bomba isocrática LC-10AS.

Automuestreador SIL-10⁺.

Controlador de sistema SCL-10⁺.

Software Class VP Chromatograph

Cartucho Beckman Ultrasphere-XL C₁₈, de 4.6 mm (d.i.) x 70 mm, y un tamaño de partícula de 3 µm.

Cromatógrafo Hewlett-Packard Series 1100, equipado con:

Desgasificador mod. G1322A

Bomba cuaternaria mod. G1311A.

Muestreador automatizado mod. G1313A

Detector U.V. de longitud de onda variable modelo G1314A

Software HP Chemstations.

Columna Zorbax cianopropil SB-CN de 4.6 mm (d.i.) x 250 mm, con un tamaño de partícula de 5 µm.

Baño para incubación Lab-Line/Dubnoff Incushaker.

Precolumna Waters Resolve-ciano, 4.5 mm (d.i.) x 10 mm con tamaño de partícula de 5 µm.

5.1.2 Reactivos.

Ibuprofeno estándar USP (donación PROMECO, análisis 062095).
Ibuprofenato de ibuprofeno (donación)^b.
Ibuprofeno (donación)^b.
Naproxeno, estándar USP (donación SYNTEX, análisis 261097).
Metanol Mallinckrodt UltimAR, lote H488KPCP.
Acetonitrilo Tecnolab, lote GL19/06/12/96.
Ácido acético glacial (JT Baker 99%).
Acetato de sodio pentahidratado (JT Baker ACS, 99.7%).
Benzaldehído (Sigma Chem. Co., lote 16H3434).
p-xileno (Sigma Chem. Co., lote 01920H0).
Tolueno (Sigma Chem. Co., lote 126H367).
Benceno (Aldrich HPLC, lote 033145W).
1,1-bis(p-clorofenil)-2,2,2-tricloroetano (DDT, Sigma Chem. Co., lote 7743614).
Naftaleno (Sigma Chem. Co., lote 65H3492).
Antraceno (Sigma Chem. Co., lote 54H3451).
Fosfato monobásico de sodio (JT Baker, 99%, lote 12536).
Fosfato dibásico de sodio (JT Baker, 99%, lote 54632).
Amortiguador de citratos (Sigma Chem. Co., lote H67589).
Sulfato cúprico pentahidratado (JT Baker, ACS, lote 6548).
Tartrato de sodio y potasio (JT Baker, ACS, lote 9865).
Hidróxido de sodio (JT Baker, ACS, lote 4712).
Ioduro de potasio (JT Baker, ACS, lote 3221).
Esterasa de hígado de cerdo (20000 UI^c, E.C. 3.1.1.1, Sigma Chem. Co., lote 64H7200).
heparina (100 UI/mL, Inhepar).

^b Los compuestos fueron donados. Se informa que se obtuvieron mediante síntesis química y se sometieron al análisis de sus propiedades físicas (T_m , rotación óptica) y espectrométricas (RMN-¹H y RMN-¹³C) para comprobar su identidad⁵¹.

^c Una Unidad internacional (UI) hidroliza 1.0 μmol de butirato de metilo por minuto, a pH 8.0 y 25 °C.

5.2 Determinación de algunas de las propiedades fisicoquímicas del ibuprofenato de ibuprofilo.

5.2.1 Determinación del coeficiente de extinción molar del ibuprofenato de ibuprofilo.

- 1) Se pesaron con exactitud 10 mg de ibuprofenato de ibuprofilo, por triplicado.
- 2) Cada una de las pesadas se disolvió con metanol y se llevó a un aforo de 10 mL en matraces volumétricos. Estas soluciones, se denominarán stock A, B ó C.
- 3) De cada uno de los stocks (A, B y C), se tomaron alícuotas de 100, 200, 300, 400 y 500 μL , y se llevaron a un aforo de 10 mL con cada uno de los siguientes disolventes: metanol, acetonitrilo y acetonitrilo-solución amortiguadora de acetatos pH 3 0.04 M^d (1:1). La concentración de las soluciones de prueba estaba entonces en el intervalo de 10 a 50 $\mu\text{g/mL}$.
- 4) A cada una de estas soluciones se les realizó un barrido en la región del espectro de radiación ultravioleta (200 a 370 nm). En cada uno de los espectros, se determinaron las zonas de máxima absorción de radiación y el valor de la absorbancia para estos máximos.
- 5) Se construyeron curvas de concentración molar vs. absorbancia a partir de los valores obtenidos experimentalmente en cada uno de los máximos observados, y se determinó el valor de la pendiente de las curvas obtenidas, para conocer el valor de el coeficiente de absortividad molar del ibuprofenato de ibuprofilo, considerando el ajuste de los datos a la ley de Lambert y Beer. El ajuste lineal se realizó utilizando el software STATISTICA for Windows, ver. 3.0, 1993.
- 6) Finalmente, se realizó un análisis de varianza para determinar si existían diferencias significativas en cuanto al valor de coeficiente de absortividad molar por efecto del disolvente utilizado.

^d La solución de acetatos se preparó a partir de la mezcla de 2.1 mL de ácido acético glacial mas 92.5 mg de acetato de sodio pentahidratado en 1000 ml de agua, ajustando el pH a 3.0 con HCl concentrado.

5.2.2 Determinación del coeficiente de partición octanol/agua del ibuprofenato de ibuprofeno.

- 1) Se pesaron con exactitud 10 mg de cada una de las siguientes sustancias, por separado: ibuprofenato de ibuprofeno (el cual se denominará IbIb), benzaldehído, p-xileno, tolueno, benceno, 1,1-bis(p-clorofenil)-2,2,2,-tricloroetano, naftaleno y antraceno.
- 2) Cada una de las sustancias se disolvió con metanol y se llevó a un aforo de 10 mL en matraces volumétricos.
- 3) Por separado, se prepararon mezclas de metanol-solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4^c en proporciones (50:50), (65:35), (70:30), (80:20), (85:15) y (90:10).
- 4) De las soluciones preparadas en el inciso 2, se tomaron 100 μ L, y se llevaron a un aforo de 10 mL con las mezclas preparadas en el inciso 3, siempre y cuando las sustancias fueran a ser eluidas con la mezcla respectiva.
- 5) Las soluciones preparadas en el inciso 4 fueron sometidas (por triplicado cada una) a elución en el cromatógrafo de líquidos Shimadzu. La fase estacionaria utilizada fue un cartucho Beckman Ultrasphere-XL C₁₈. En la tabla VI, se describen las fases móviles con que fueron eluidas cada una de las soluciones mencionadas.
- 6) Una vez que se eluyeron las sustancias en las fases móviles correspondientes, se procedió a calcular el valor de factor de capacidad en cada una de las condiciones, de acuerdo con la ecuación:

$$k' = (T_{r\text{substancia}} - T_{r\text{metanol}}) / T_{r\text{metanol}}$$

T_r = tiempo de retención de los compuestos de interés.

^c La solución amortiguadora se preparó adicionando 144.9 mg de NaH₂PO₄ • H₂O y 519.2 mg de Na₂HPO₄ • 12H₂O a 250 mL de agua desionizada.

- 7) Se construyeron gráficas de $\text{Log } k'$ vs. % de metanol en la solución. A partir de la curva ajustada, se calculó el valor de $\text{Log } k'_0$, el cual es el valor de factor de capacidad teórico cuando el % de metanol en la solución es de 0%.
- 8) Finalmente, se generó una gráfica de $\text{Log } P$ vs. $\text{Log } K_0$, en donde el valor de $\text{Log } P$ es el reportado en la literatura para las sustancias utilizadas como estándares de coeficiente de partición en el estudio (benzaldehído, tolueno, benceno, DDT, p-xileno, antraceno y naftaleno). En esta curva, se interpoló el valor de $\text{Log } K_0$ obtenido para el IbIb, y se predijo de esta forma su valor de $\text{Log } P$.

Tabla VI. Fases móviles utilizadas para la elución de las soluciones mencionadas en el inciso 4*

Compuesto	Mezclas Metanol-Amortiguador de fosfatos pH 7.4					
	(50:50)	(65:35)	(70:30)	(80:20)	(85:15)	(90:10)
Benzaldehído	✓	✓	✓	✓	—	—
Tolueno	✓	✓	✓	✓	—	—
Benceno	✓	✓	✓	✓	—	—
DDT	—	✓	✓	✓	✓	✓
Xileno	—	✓	✓	✓	✓	—
Antraceno	—	✓	✓	✓	✓	✓
Naftaleno	—	✓	✓	✓	✓	✓
IbIb	—	—	✓	✓	✓	✓

- * El símbolo ✓ representa que con esa fase móvil fue eluido el compuesto. Por el contrario, el símbolo — indica que el compuesto no se eluyó con esa fase móvil

5.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofilo en medios acuosos con diferentes pH's.

5.3.1 Desarrollo de un método analítico para cuantificar ibuprofenato de ibuprofilo, ibuprofol e ibuprofeno en mezclas acuosas.

Todo el desarrollo analítico se realizó utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard Series y una columna Zorbax cianopropil SB-CN. Tras una serie de experimentos encaminados al desarrollo del método analítico más adecuado, se llegó a un diseño experimental factorial 2 x 2, en el cual se variaron la velocidad de flujo y el pH de la fase móvil, y se utilizó un "doble gradiente" de metanol, con una cantidad inicial de 55% de metanol, con un gradiente de 0.25% de metanol/minuto el cual, a los 7.5 minutos, se aumentó a 9.375% de aumento de metanol/minuto hasta alcanzar 85% de metanol, para continuar con esta proporción hasta los 16 min. El diseño experimental utilizado se describe en la tabla VII. Se utilizaron amortiguadores de acetatos pH 2.8 y pH 4^f.

Tabla VII. Diseño experimental utilizado para la optimización del método analítico.

Experimento	Velocidad de flujo (mL/min)	pH
1	1	2.8
2	1.2	2.8
3	1	4.0
4	1.2	4.0

^f La solución de pH 2.8 se preparó mezclando 1.1 mL de ácido acético glacial y 26.33 mg de acetato de sodio trihidratado en 500 mL de agua desionizada. La solución de pH 4.0 se preparó mezclando 0.5 mL de ácido acético glacial y 201.3 mg de acetato de sodio trihidratado en 500 mL de agua desionizada

5.3.2 Validación del método analítico para la cuantificación de muestras conteniendo ibuprofeno, ibuprofol e ibuprofenato de ibuprofilo en solución acuosa.

- 1) En el primer día, se determinaron los parámetros de linealidad y precisión del sistema, así como la estabilidad de la muestra analítica en la fase móvil de Metanol-acetatos (55:45). Para ello, se pesaron con exactitud 10 mg de ibuprofeno, 10 mg de ibuprofol y 10 mg de ibuprofenato de Ibuprofilo, los cuales se mezclaron y se llevaron a un aforo de 10 mL con metanol (solución A). De la solución A, se tomaron alícuotas de 10, 20, 30, 40, 50, 200, 350, 500, 650 y 800 μL , las cuales se llevaron, por separado, a un aforo de 10 mL con la fase móvil; para obtener concentraciones de 1, 2, 3, 4, 5, 20, 35, 50, 65 y 80 $\mu\text{g/mL}$ de cada una de las sustancias (a cada una de estas diluciones, se les denominó "estándares" y, al conjunto de 10 estándares de diferente concentración, se le denominó "curva estándar"). El procedimiento se realizó por triplicado. Cada uno de los estándares se inyectó por duplicado, a excepción de aquellos en concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$, los cuales se inyectaron por sextuplicado al inicio y al final de la corrida de cada una de las curvas, cubriendo un periodo total de 24 horas de duración de las muestras en el cromatógrafo (el sistema utilizado fue el descrito en 5.3.1).
- 2) La determinación de los parámetros de linealidad, exactitud y precisión del método analítico se llevó a cabo de la siguiente manera: se pesaron con exactitud 25 mg de ibuprofeno, 25 mg de ibuprofol y 25 mg de ibuprofenato de Ibuprofilo, los cuales se mezclaron y se llevaron a un aforo de 25 mL con metanol (solución B). De la solución B, se tomaron alícuotas de 10, 20, 30, 40, 50, 200, 350, 500, 650 y 800 μL , las cuales se llevaron a un aforo de 10 mL con amortiguador de fosfatos 0.02 M pH 7.4⁶. (dando como resultado las soluciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, respectivamente). De cada una de las soluciones (1-10) se tomaron alícuotas de 500 μL , y se mezclaron con 500 μL de metanol HPLC antes de ser inyectadas al cromatógrafo (a estas diluciones, se les denominó "muestras"). Todo el procedimiento anterior se realizó por triplicado en un mismo día. Cada una de las muestras se inyectó por duplicado. Por otra parte, se inyectaron curvas de calibración en fase móvil de los compuestos (una por día), preparadas de acuerdo con el procedimiento descrito en el inciso 1 de esta

⁶ Se preparó mezclando 144.9 mg de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 519.9 mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ con 125 mL de agua desionizada.

sección (inyección también por duplicado a cada nivel de la curva). Todo lo descrito en este inciso, se repitió en otra sesión de trabajo.

- 3) Los resultados obtenidos tanto de la validación del sistema como de la validación del método se analizaron utilizando el programa Statgraphics, ver. 2.0.

5.3.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofilo en soluciones acuosas con diferentes valores de pH.

- 1) Se pesaron con exactitud 25 mg de ibuprofeno, 25 mg de ibuprofol y 25 mg de ibuprofenato de Ibuprofilo, los cuales se mezclaron y se llevaron a un aforo de 25 mL con metanol (Solución A).
- 2) De la solución A, se tomaron 5 alicuotas de 700 μ L. Una alicuota se llevó a un aforo de 10 mL con amortiguador de pH 1.7 en concentración 0.02 M^h, otra se llevó al mismo aforo, con amortiguador de pH 3.0 y las tres restantes se llevaron al mismo aforo, cada una con diferentes reguladores (de pH 5.0, 7.0 y 9.0, respectivamente). Estas diluciones se incubaron en un baño con agitación (60 rpm) y calentamiento (37 ± 0.5 °C). De cada una de las diluciones se tomaron alicuotas de 500 μ L a las 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 y 24 horas, y se mezclaron con 500 μ L de metanol HPLC antes de ser inyectadas al cromatógrafo. Todo el procedimiento anterior se realizó por triplicado. Además, se inyectaron curvas de calibración preparadas de acuerdo con el procedimiento descrito en el inciso 1 de la sección 5.3.2 (inyección también por duplicado a cada nivel de la curva).

^h pH 1.7: 4.9 mL de HCl concentrado en 250 mL de agua desionizada; pH 3.0: 300 μ L de ácido acético glacial + 10.5 mg de acetato de sodio trihidratado en 250 mL de agua desionizada; pH 5.0: 100 μ L de ácido acético glacial + 430.8 mg de acetato de sodio trihidratado en 250 mL de agua desionizada; pH 7.0: 289 mg de NaH₂PO₄ monohidratado + 1.0384 g de Na₂HPO₄ dodecahidratado en 250 mL de agua; pH 9.0: 395 mg de NaHCO₃ + 31.4 mg de Na₂CO₃ en 250 mL de agua desionizada.

5.4 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofilo en plasma de rata y en presencia de esterasas de hígado de cerdo.

5.4.1 Desarrollo de un método de extracción de ibuprofeno, ibuprofol e ibuprofenato de ibuprofilo a partir de plasma de rata.

- 1) Se preparó una solución stock de ibuprofeno, ibuprofenato de ibuprofilo e ibuprofol, pesando con exactitud 10 mg de cada uno de los compuestos, y llevándolo a aforo de 10 mL con metanol.
- 2) De la solución stock, se tomaron 600 μ L y se llevaron a un aforo de 10 mL con una mezcla Metanol-amortiguador de acetatos pH 4.0 (60:40) (a esta se le denominó solución en fase móvil). Por otra parte, se tomaron 600 μ L del stock, y se llevaron a un aforo de 10 mL con plasma de rata (solución en plasma).
- 3) Para encontrar el método de extracción más adecuado, de cada una de las soluciones preparadas en el inciso 2 de esta sección se tomaron 6 alícuotas de 200 μ L, las cuales se extrajeron de acuerdo con el esquema presente en la tabla VIII (cada experimento se realizó por triplicado). La centrifugación de estas muestras se llevó a cabo a 5000 rpm durante 10 min.

Tabla VIII. Diseño experimental para el desarrollo de un método de extracción para ibuprofeno, ibuprofol e ibuprofenato de ibuprofilo a partir de plasma.

Experimento	Solución de extracción*	Cantidad de disolvente (μ l).	Tiempo de agitación (segundos)
1	MeOH:AcOH (99:1)	500	30
2	AcN:AcOH (99:1)	500	30
3	MeOH:AcOH (99:1)	500	30
4	MeOH:AcOH (99:1)	500	10
5	AcN:AcOH (99:1)	500	10
6	MeOH:AcOH (99:1)	250	20

* Cada solución de extracción se adicionó con naproxeno USP, en una concentración de 5. μ g/ml. MeOH= metanol, AcN= acetonitrilo, AcOH= ácido acético glacial.

5.4.2 Validación del método por CLAR para cuantificar ibuprofeno e ibuprofol en plasma de rata y en soluciones de esterasa de hígado de cerdo.

- 1) **Preparación de soluciones patrón:** se pesaron 50 mg de cada uno de los estándares (ibuprofeno, ibuprofol e ibuprofenato de ibuprofilo), se mezclaron y se llevaron a un volumen de 25 mL con una solución de ácido acético al 1% en metanol. A ésta, se le denominó solución patrón A. De la solución patrón A, se tomó 1 mL y se llevó a 10 mL con una solución de ácido acético al 1% en metanol (solución patrón B).
- 2) **Preparación de la solución de estándar interno:** se pesaron 5 mg de naproxeno y se llevaron a un volumen de 100 mL con solución de ácido acético al 1% en metanol. Se tomaron 2.5 mL y se aforaron a 25 mL con la solución de ácido acético al 1% en metanol. A esta última, se le denominó solución de estándar interno.
- 3) **Método analítico.** El método analítico utilizado fue similar al desarrollado para la cuantificación de ibuprofeno e ibuprofol en soluciones acuosas, y consistió en colocar, en un tubo de ultracentrifuga de polipropileno, 100 μ L de la solución de muestra (ya sea en agua o en plasma) y adicionar 250 μ L de solución de estándar interno. Se agitó en vórtex durante 20 segundos, y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min. Se tomó el sobrenadante y se depositó en un microvial y se inyectaron 75 μ L de este sobrenadante al cromatógrafo. El sistema analítico estaba conformado por el cromatógrafo Hewlett-Packard Series 1100, una columna Zorbax SB-CN y una precolumna Waters Resolve-ciano. El análisis se realizó utilizando un método que consistía en la elución por gradiente de metanol (A):Buffer de acetatos pH=4 (B), iniciando con una proporción de 55% de A, con gradiente de 0.25% de A/min de 0 a 10 min. Se dio un tiempo de recuperación de 5 minutos después de terminada cada corrida, para volver a las condiciones iniciales. La velocidad de flujo fue de 1.2 ml/min.
- 4) **Linealidad del método y límites de detección y cuantificación.** Se prepararon, ya sea en agua (soluciones de calibración) o en plasma, diluciones de las soluciones patrón (en dos días diferentes, por cuadruplicado cada día en plasma y una sola vez en agua), siguiendo el esquema ilustrado en la tabla IX. Los primeros 5 niveles sirvieron para los datos de límite de

detección y de cuantificación). Todos los niveles se utilizaron para determinar la linealidad del método

- 5) **Muestras para la determinación de estabilidad.** De cada uno de los niveles marcados con (*) en la tabla IX se prepararon 40 muestras, separadamente de las muestras a analizar el primer día. Se guardó la mitad de éstas a -20°C en tubos de ultracentrífuga de polipropileno. Para el primer día, se analizaron 6 muestras de cada nivel antes de la corrida de cada curva y al finalizar la última curva, y se determinó el tiempo en que eran estables en el cromatógrafo. De manera similar, se analizaron las muestras almacenadas 8 días de a -20°C .
- 6) **Especificidad y selectividad del método.** Para determinar estos parámetros, se analizaron blancos de un pool de plasma de rata (obtenido a partir de 30 animales), y se verificó que no existieran picos debidos a sustancias endógenas que interfirieran con las señales de interés.

Tabla IX. Esquema para la validación del método analítico para cuantificar ibuprofeno e ibuprofrol en plasma de rata.

Volumen de Patrón A (μL)	Volumen de Patrón B (μL)	Aforo (mL)	Nivel de la curva ($\mu\text{g/mL}$)
0	50	10	1
0	100	10	2
0	150	10	3
0	200	10	4
0	250	10	5*
100	0	10	20
175	0	10	35*
250	0	10	50
325	0	10	65*
400	0	10	80

- 7) **Exactitud del método.** Se determinó a partir de las curvas de cantidad recuperada (relación altura del analito/altura del estándar interno en plasma) vs. cantidad adicionada (relación altura del analito/altura del estándar interno en agua).
- 8) **Precisión (precisión intermedia en dos días diferentes por un mismo analista, y repetibilidad por un analista en el mismo día).** Se determinó mediante el análisis estadístico de cada nivel de la relación concentración-respuesta para cada curva en cada día y entre los diferentes días.
- 9) **Validación cruzada (para el caso de cuantificación del ibuprofeno e ibuprofeno en soluciones de esterasa de hígado de cerdo).** Consistió en asegurar la especificidad y exactitud del método en solución de esterasa de hígado de cerdo, analizando por triplicado las muestras preparadas tanto en plasma de rata como en soluciones de esterasa de hígado de cerdo, en los niveles de concentración de 5, 35 y 65 $\mu\text{g/mL}$.

5.4.3 Estudio de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en plasma de rata¹ y en solución de esterasa de hígado de cerdo.

5.4.3.1 Cuantificación de proteínas en solución de esterasa de hígado de cerdo y en plasma de rata¹.

Se preparó una solución stock de albúmina bovina conteniendo 100 mg de la proteína en 10 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 0.02 M, a partir de la cual se realizaron diferentes diluciones para preparar la curva patrón. Por otra parte, se disolvió el contenido total del frasco en que se recibió la esterasa de hígado de cerdo en 100 mL del amortiguador de fosfatos, de esta solución, se tomaron 5 mL y se diluyeron a 10 mL. A su vez, se tomaron 0.25

¹ Debe aclararse que el plasma extraído para la validación se tomó a partir de 30 ratas Wistar macho, con un peso de entre 250 y 300 g, utilizando como anticoagulante heparina (20 UI/mL de sangre). El plasma para la hidrólisis se extrajo de 6 ratas Wistar macho del mismo peso, sólo que en este caso se utilizó amortiguador de citratos.

² El reactivo de Biuret utilizado se preparó de la siguiente manera: En un matraz volumétrico de 500 mL se colocaron 0.75 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ y 3.0 g de tartrato de sodio y potasio. Se agregaron 250 mL de agua destilada y se agitó hasta disolución total. Se adicionaron, con agitación constante, 150 mL de solución de NaOH 2.5 N. Se agregaron 0.5 g de KI y se agitó hasta disolución total, llevando finalmente al aforo⁵⁷.

mL de plasma de rata y se llevaron a un aforo de 10 mL con el amortiguador de fosfatos. Una vez preparadas, todas las soluciones se dejaron reposar durante 30 minutos, para proceder a la lectura de sus absorbancias a 540 nm en el espectrofotómetro. Como se puede observar en la tabla X, la determinación de la concentración de proteínas en las muestras problema se realizó 10 veces, y la curva patrón de albúmina se construyó por triplicado.

Tabla X. Muestras para la cuantificación de proteínas en solución de esterasa y en plasma de rata.

Tubos.	ML de Buffer de fosfatos.	ML de stock de albúmina.	ML de solución de Biuret.	ML de solución problema.	Nombre de la muestra.
1-3	0	1	4	0	Curva, 20 g/100mL.
2-6	0.2	0.8	4	0	Curva, 16 g/100mL.
7-9	0.4	0.6	4	0	Curva, 12 g/100mL.
10-12	0.6	0.4	4	0	Curva, 8 g/100mL.
13-15	0.8	0.2	4	0	Curva, 4 g/100mL.
16-18	1.0	0	4	0	Blanco
19-28	0	0	4	1.0	Esterasa
29-38	0	0	4	1.0	Plasma

5.4.3.2 Determinación de la cinética de hidrólisis en plasma de rata o en presencia de solución de esterasa de hígado de cerdo.

Se pesaron con exactitud 10 mg de ibuprofenato de ibuprofeno, y se llevaron a un aforo de 10 mL con metanol. De esta solución, se tomaron 20, 40 o 60 μ L, colocando cada volumen en un tubo de ensaye, y se adicionó la cantidad suficiente de plasma de rata al 80% (diluido con solución salina isotónica) para llevar a 1 mL (la concentración final de profármaco era de 80, 40 o 20 μ g/mL, o 2, 1 o 0.5 $\times 10^{-4}$ M). Cada una de las soluciones se preparó por triplicado. Inmediatamente después, las soluciones se sometieron a incubación con agitación (60 rpm) y

calentamiento (37 ± 0.5 °C). Se tomaron muestras de cada uno de los tubos a los 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 y 90 minutos y se depositaron en tubos de polipropileno conteniendo 250 μ l. de la solución de estándar interno (descrita en la sección 5.4.2, inciso 2). Las muestras se analizaron de acuerdo con el método descrito en la sección 5.4.2, inciso 3. Por separado, se prepararon curvas patrón en plasma conteniendo ibuprofeno e ibuprofol (en las concentraciones descritas en la tabla IX), las cuales se analizaron de manera conjunta con las muestras de la hidrólisis. Este mismo procedimiento se utilizó para la hidrólisis del profármaco en presencia de soluciones de esterases de hígado de cerdo.

5.5 Estudios preliminares de la farmacocinética del ibuprofeno liberado a partir del ibuprofenato de ibuprofeno en ratas.

Las dosis utilizadas en cada estudio se seleccionaron tomando como base los reportes encontrados en la literatura internacional, en los que se ha administrado desde 25 y hasta 50 mg/Kg de ibuprofeno a cada rata^{36 y 40}, además de que, al someter a los animales a estas dosis de ibuprofeno, no se corre el riesgo de provocar en las mismas efectos tóxicos o la muerte (la dosis letal para el 50% de la población en ratas adultas es de 626 mg/Kg tras la administración intraperitoneal y de 1026 mg/Kg tras la administración oral¹).

- 1) **Estudio I.** Se llevó a cabo en cuatro ratas, a las cuales se les administró una dosis de 99.22 mg de ibuprofenato por Kg de peso de la rata (equivalentes a 50 mg de ibuprofeno/Kg), por vía oral en forma de una emulsión conteniendo 0.05% de Tween 80. Los tiempos de muestreo se describen en la tabla XI.
- 2) **Estudio II.** Se realizó en dos ratas de 221 y 251 g, a las cuales se les administró una dosis de 18.02 mg de ibuprofenato de ibuprofeno/Kg de peso de la rata (equivalentes a 9.00 mg de ibuprofeno/Kg) por vía intravenosa, en forma de emulsión conteniendo 0.05% de Tween 80. Se tomaron muestras a las 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 y 4.0 horas.

Tabla XI. Esquema de muestreo de las ratas del estudio preliminar con dosis de 99.22 mg/Kg de peso del ibuprofenato de ibuprofeno.

Rata	Peso (g)	Esquema de muestreo (h).
1	287.0	0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0.
2	240.0	0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0.
3	264.0	0, 0.25, 0.33, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 7.0, 8.0.
4	261.0	0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0.

- 3) **Estudio III.** Se llevó a cabo en cuatro ratas con pesos de 310, 297, 270 y 316 g, a las que se administró una dosis oral de 49.61 mg/Kg de ibuprofenato de ibuprofeno (equivalentes a 25 mg de ibuprofeno/Kg), en forma de emulsión conteniendo 0.05% de Tween 80. Se tomaron muestras de sangre a las 0, 0.25, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 9.0, 12.0, 18.0 y 24 horas.

El protocolo experimental general utilizado fue el siguiente:

Tratamiento de las ratas antes del inicio de la toma de muestras. Los animales fueron sometidos a un ayuno previo de por lo menos 24 horas. El día del estudio se anestesió a cada animal, por separado, en un cámara de éter. Una vez anestesiado, se llevó a cabo la disección de la vena caudal, iniciando a partir de un corte longitudinal de aproximadamente 2 cm, a partir de una distancia de 2 cm de la base de la cola. A través de este corte, se aisló la vena y se insertó en ella una porción de 2 cm de cánula PE-10, la cual se conectó a una porción de 2 cm de cánula PE-50. Una vez canulada la vena, se hizo pasar a través del tubo una solución de heparina (100 UI/ml., Inhepar) en solución salina isotónica, y se verificó el correcto paso de sangre a través de la cánula. Si el sangrado era correcto, se suturaba la incisión, se pegaba el catéter a la cola con cinta Micropore, y se insertaba en la cánula una aguja acoplada a una jeringa para la toma de muestras. Para la administración intravenosa, se canuló la vena femoral de los animales de una manera similar a esta. Para la administración oral, se administró la dosis de ibuprofenato de

ibuprofeno correspondiente, utilizando una sonda para depositar la emulsión a nivel del estómago a través de la faringe de las ratas.

Recolección, conservación y análisis de las muestras. Las muestras de sangre se colectaron en tubos de polipropileno (Elkar) de 1000 μL , los cuales contenían 10 UI de heparina seca. Se centrifugaron las muestras a 5000 rpm por 10 minutos inmediatamente después de su recolección, y se separó el plasma, para su posterior cuantificación con el método descrito en la sección 5.4.2. El análisis de las muestras se realizó al día siguiente o en el mismo día de su toma. Cabe aclarar que, en cada corrida, se analizaron muestras de control de calidad preparadas en plasma de rata conteniendo ibuprofeno e ibuprofeno en concentración de 5, 35 y 65 $\mu\text{g/mL}$ (por triplicado en cada nivel).

6. RESULTADOS.

6.1 Determinación de las propiedades fisicoquímicas del ibuprofenato de ibuprofeno.

6.1.1 Determinación del coeficiente de absorptividad molar (ϵ) del ibuprofenato de ibuprofeno.

Los espectros obtenidos para el ibuprofenato de ibuprofeno en la región ultravioleta utilizando diferentes disolventes se muestran en la figura 7.

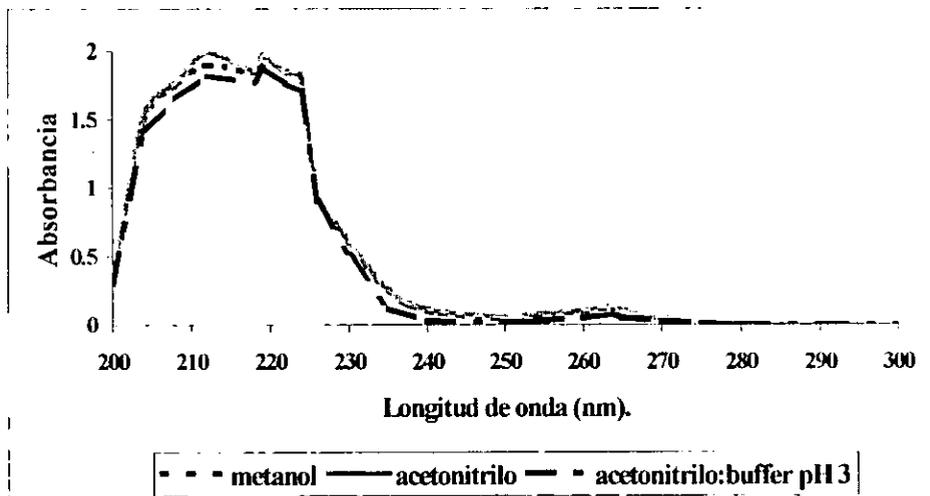


Figura 7. Espectros de absorción en la región ultravioleta para el ibuprofenato de ibuprofeno, en diferentes disolventes.

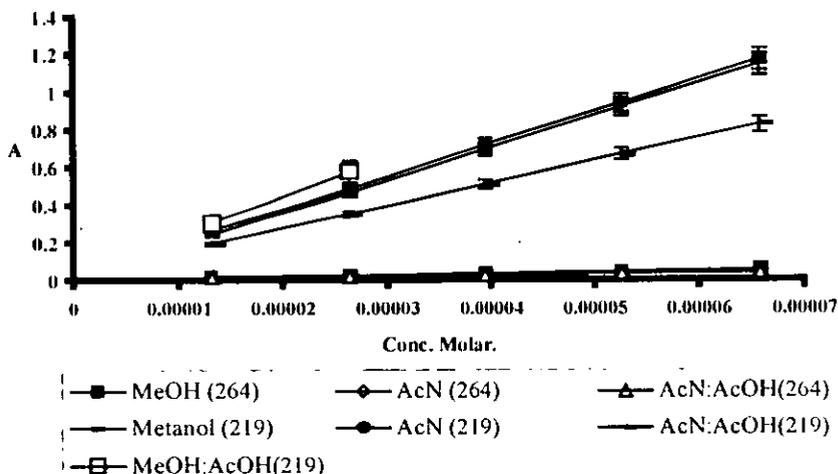
En la tabla XII y en la gráfica 1 se pueden observar los resultados de la regresión lineal aplicada a los datos de absorbancia obtenida experimentalmente en cada sistema vs. la concentración de las soluciones a partir de las cuales se llevó a cabo la cuantificación. Se encontraron dos máximos de absorción en la región U.V. para el ibuprofenato de ibuprofeno, uno en 219 nm (el más intenso) y el otro en 264 nm.

Tabla XII. Resultados del cálculo de ϵ del ibuprofenato de ibuprofeno en diferentes disolventes a partir de la regresión lineal de los datos de Absorbancia vs. Concentración Molar.

Disolvente	λ (nm)	n ^a	r ²	Intercepto	ϵ (L/(mol • cm))
Metanol	264	30	0.9938	0.0005 (0.00001)	679.78 (27.61)
Acetonitrilo	264	30	0.9973	0.0034 (0.0031)	692.76 (56.61)
Metanol	219	30	0.9966	0.0129 (0.0007)	17407.27 (463.11)
Acetonitrilo	219	30	0.9962	0.0325 (0.0007)	17292.33 (309.06)
AcN:AcOH (1:1)	264	30	0.9981	0.0021 (0.0001)	566.33 (41.80)
AcN:AcOH (1:1)	219	30	0.9920	0.0014 (0.0002)	12077.89 (410.61)

^a n representa el número total de observaciones, y corresponde al número de puntos en las curvas multiplicado por las réplicas. AcOH= Ácido acético.

Gáfica 1. Determinación del coeficiente de absortividad molar (ϵ) del ibuprofenato de ibuprofeno en diferentes disolventes.



6.1.2 Determinación del coeficiente de partición (Log P) del ibuprofenato de ibuprofeno.

Los cálculos del factor de capacidad (expresados como $\text{Log } k'$) para cada uno de los compuestos estudiados, que fueron obtenidos con la elución de los mismos en diferentes fases móviles, se muestran en la tabla XIII. A partir de estos datos, se realizó el cálculo de $\text{Log } k'_0$ para cada una de las sustancias (tabla XIV), mediante el ajuste por regresión lineal de los valores de $\text{Log } k'$ vs % de metanol en la fase móvil (gráfica 2). Finalmente, en la gráfica 3, se muestra la curva de $\text{Log } P$ vs. $\text{Log } k'_0$, junto con la ecuación ajustada de ésta, en la cual se interpoló el valor de $\text{Log } k'_0$ del ibuprofenato de ibuprofeno para predecir su valor de $\text{Log } P$ (ver tabla XIV).

Tabla XIII. Valores de k' para cada uno de los compuestos utilizados para determinar Log P.

Compuesto	Mezclas Metanol-Amortiguador de fosfatos pH 7.4.					
	(50:50)	(65:35)	(70:30)	(80:20)	(85:15)	(90:10)
Benzaldehído	0.3010	0.0077	-0.0537	-0.4660	ND	ND
Tolueno	0.9643	0.6626	0.5046	0.0954	ND	ND
Benceno	0.7409	0.3964	0.2838	-0.1259	ND	ND
DDT	ND	1.6986	1.5931	0.9913	0.5750	0.3511
Xileno	ND	0.9469	0.7373	0.1935	0.0654	ND
Antraceno	ND	1.2936	1.1124	0.6229	0.3792	0.2634
Naftaleno	ND	0.8795	0.6747	0.2248	0.0776	-0.0037
Ibfb	ND	ND	ND	1.6192	1.1517	0.8272

ND significa no determinado con esa fase móvil.

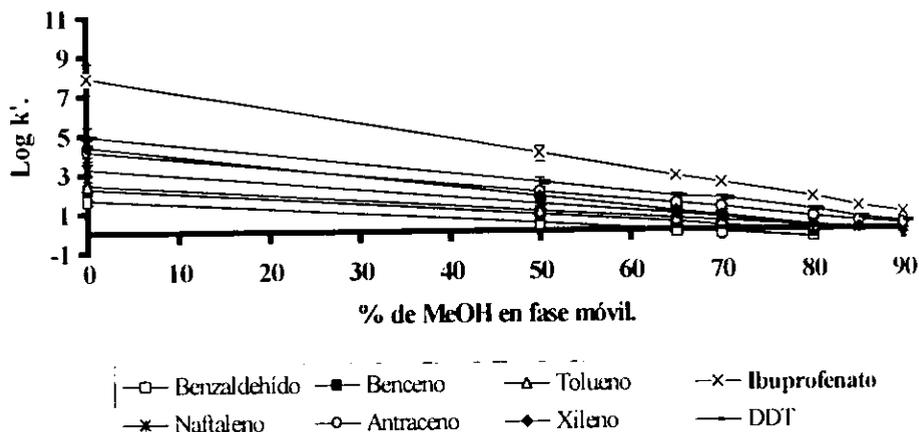
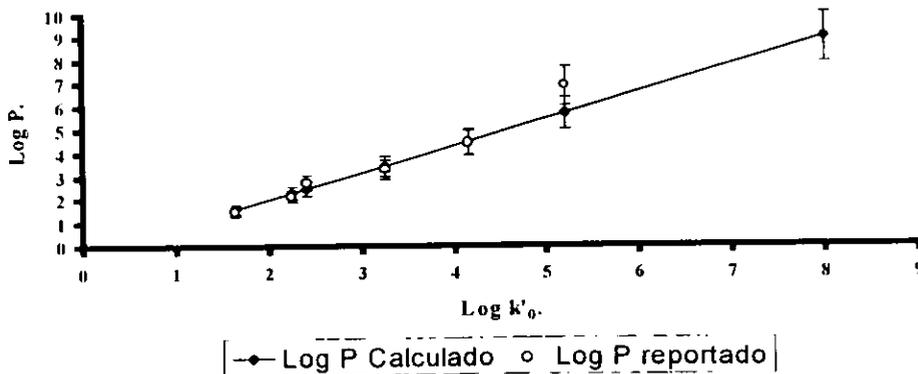
Gráfica 2. Correlación entre el valor de Log k' y el % de metanol en la fase móvil.

Tabla XIV. Valores de Log P y de Log k'_0 (obtenidos experimentalmente) para los estándares.
Predicción del valor de Log P del ibuprofenato de ibuprofeno.

Compuesto	Log k'_0	Log P ^{58,59}	I. de C. (95%)
Benzaldehído	1.2371	1.48	1.25-1.71
Tolueno	2.6748	2.51	2.11-2.80
Benceno	2.2267	1.99	1.56-2.15
DDT	5.8969	6.19	3.98-6.19
Xileno	4.3718	4.15	3.77-4.53
Antraceno	5.8969	5.85	5.66-6.04
Naftaleno	3.3305	3.30	3.01-3.59
IbIb	7.8789	6.1660	5.7404-6.3728

Gráfica 3. Correlación entre el valor de Log P y el de Log k'_0 para los diferentes compuestos estudiados.

Ecuación ajustada: $\text{Log P} = 0.3358 + 1.6638 \text{ Log } K_0$.



6.2 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofilo en mezclas acuosas.

6.2.1 Desarrollo del método analítico para cuantificar ibuprofeno, ibuprofol e ibuprofenato de ibuprofilo en mezclas acuosas.

Como se indicó en la sección 5.3.1, el diseño experimental fue una herramienta importante para desarrollar el método analítico para la cuantificación de los tres analitos de interés en soluciones acuosas. A partir de la elución de la mezcla conteniendo los tres compuestos de interés con fases móviles isocráticas, así como con la elución utilizando un gradiente simple de metanol o acetonitrilo en fases móviles conteniendo amortiguador de acetatos, se observó que no existía una separación adecuada de los componentes de la mezcla. Por lo anterior, se decidió continuar el desarrollo utilizando un doble gradiente, que iniciaba de forma lenta para resolver al ibuprofeno y al ibuprofol, continuando después de la salida de ambos compuestos con un gradiente rápido para eluir al ibuprofenato de ibuprofilo. Los resultados obtenidos finalmente en el desarrollo del método analítico, se indican en la tabla XV. Como se puede comprobar en la figura 8, las condiciones más adecuadas fueron: una cantidad inicial de 55% de metanol, con un gradiente de 0.25% de metanol/minuto el cual, a los 7.5 minutos, se aumentó a 9.375% de metanol/minuto hasta alcanzar 85% de metanol, para continuar con esta proporción hasta los 16 minutos, manteniendo constante la velocidad de flujo durante toda la corrida (1.2 ml/min).

Tabla XV. Resultados de la optimización del método analítico para cuantificar ibuprofeno, ibuprofol e ibuprofenato de ibuprofilo en mezclas acuosas.

Velocidad de flujo (ml/min).	pH del amortiguador.	Tr Ibu (minutos).	Tr Ibol (minutos).	Tr Iblb (min).	Resolución Ibu-Ibol.
1.0	2.8	9.296	9.768	16.285	0.9617
1.2	2.8	7.685	8.090	15.654	0.9132
1.0	4.0	8.795	9.678	18.952	2.0600
1.2	4.0	7.519	8.343	14.362	1.9700

Como se puede observar, se reportan los resultados del promedio de cada experimento, realizado por duplicado.

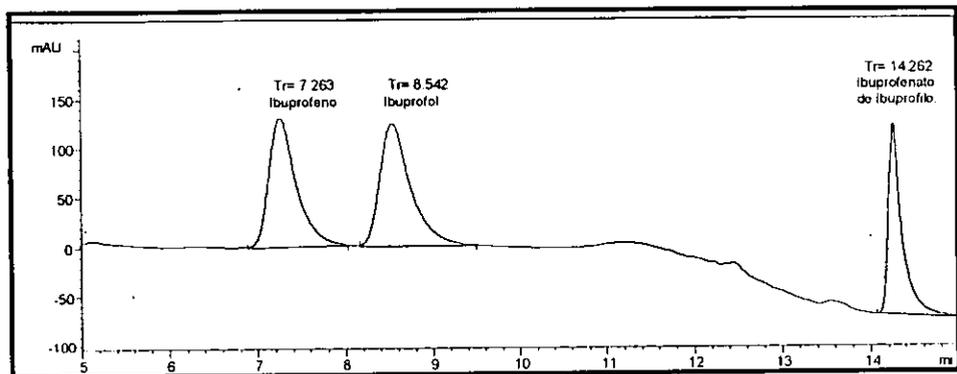


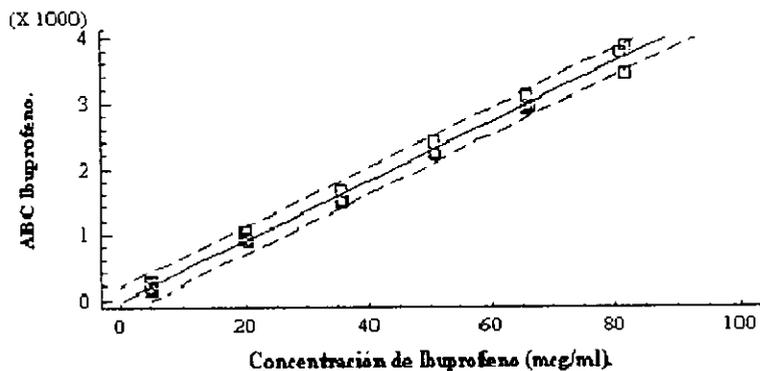
Figura 8. Cromatograma típico de la mezcla de ibuprofeno, ibuprofol e ibuprofenato de ibuprofeno con el método desarrollado.

6.2.2 Validación del método analítico para la cuantificación de muestras conteniendo ibuprofeno, ibuprofol e ibuprofenato de ibuprofeno en medios acuosos.

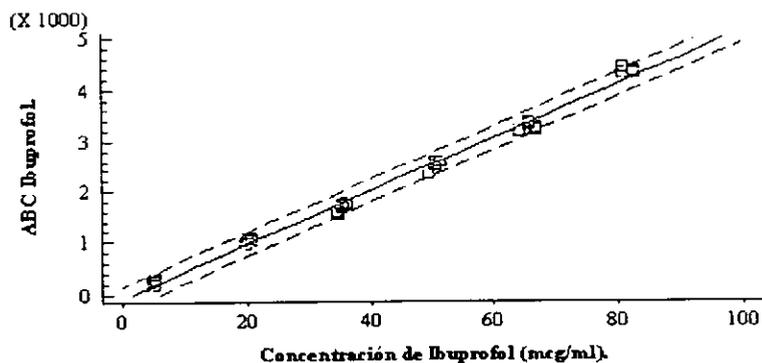
Los resultados de linealidad del sistema se muestran en las gráficas 4 a 6. La ecuación que define a la curva y los valores de coeficiente de correlación se detallan en la tabla XVI. En la tabla XVII, se muestran los resultados de la precisión del sistema, mientras que en la tabla XVIII y en las gráficas 7 a 9 se pueden observar los resultados para la exactitud del método. Los datos concernientes a la precisión del método se expresan en la tabla XIX a XXI.

Gráfica 4. Validación del sistema analítico. Linealidad para el ibuprofeno.

(Las líneas discontinuas representan el intervalo de confianza al 95%).

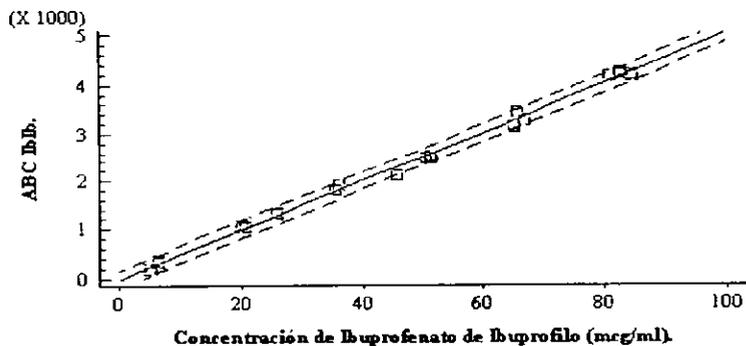
**Gráfica 5.** Validación del sistema analítico. Linealidad para el ibuprofol

(Las líneas discontinuas representan el intervalo de confianza al 95%).

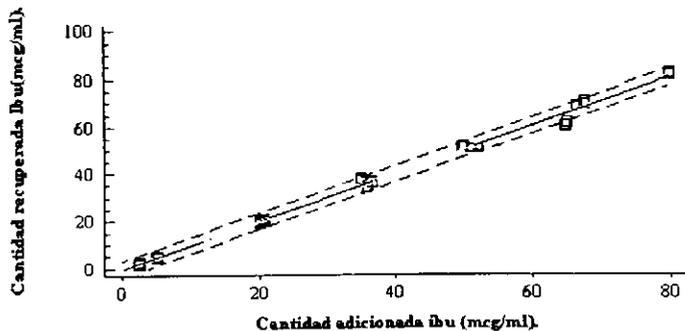


Gráfica 6. Validación del sistema analítico. Linealidad para el ibuprofenato de ibuprofilo.

(Las líneas discontinuas representan el intervalo de confianza al 95%).

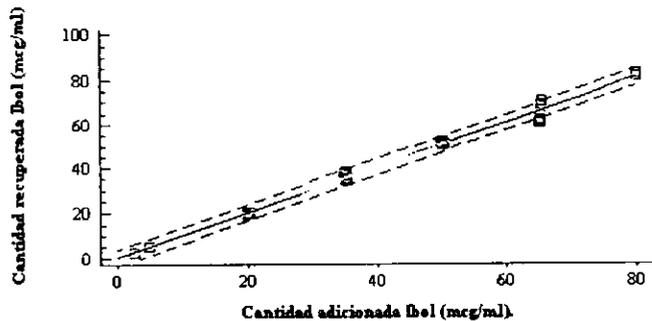
**Gráfica 7.** Validación del método analítico. Exactitud del método para cuantificar ibuprofeno. Resultados de ambos días (n=6 por cada nivel en la curva).

(Las líneas discontinuas representan el intervalo de confianza al 95%).



Gráfica 8. Exactitud del método analítico para cuantificar ibuprofeno. Resultados de ambos días de la validación (n=6 por cada nivel en la curva).

(Las líneas discontinuas representan el intervalo de confianza al 95%).



Gráfica 9. Exactitud del método analítico para cuantificar ibuprofenato de ibuprofeno. Resultados de ambos días de la validación (n=6 por cada nivel en la curva).

(Las líneas discontinuas representan el intervalo de confianza al 95%).

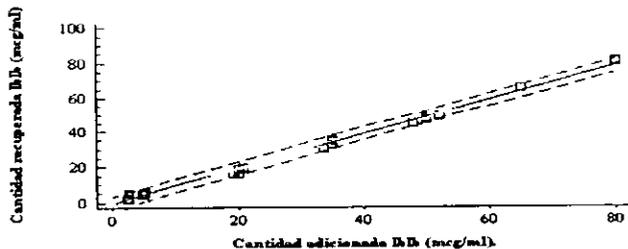


Tabla XVI. Linealidad del sistema para la cuantificación de los compuestos.					
Ibuprofeno.					
Curva	r^2	Pendiente	Intercepto	$p(m)^a$	$p(b)^b$
1	0.9961	49.2184	-17.9504	0.0000	0.0487
2	0.9975	48.7488	-18.5231	0.0000	0.0355
3	0.9972	46.3521	-11.3215	0.0000	0.0358
Ibuprofol					
Curva	r^2	Pendiente	Intercepto	$p(m)^a$	$p(b)^b$
1	0.9949	51.2051	-18.5749	0.0000	0.0063
2	0.9961	54.3379	-16.3254	0.0000	0.0058
3	0.9969	49.5213	-17.9263	0.0000	0.0052
Ibuprofenato de Ibuprofeno.					
Curva	r^2	Pendiente	Intercepto	$p(m)^a$	$p(b)^b$
1	0.9984	52.0421	-11.2365	0.0000	0.0021
2	0.9975	48.9562	-12.3251	0.0000	0.0036
3	0.9960	50.4609	-6.2354	0.0000	0.0045

^aCorresponde al valor de significancia después de la prueba de t para $H_0: m \neq 0$. ^bCorresponde al valor de significancia después de la prueba de t para $H_0: b = 0$.

Tabla XVII. Resultados de la determinación de precisión del sistema (en el nivel de 50 µg/ml).					
Ibuprofeno.					
Parámetro	n	Promedio	Varianza	D.E.	C.V%
ABC	24	2435.76	990.504	31.4651	1.29
Tr	24	7.5457	0.0042	0.0646	0.85
Ibuprofol					
Parámetro	n	Promedio	Varianza	D.E.	C.V%
ABC	24	2596.83	1109.43	33.3084	1.28
Tr	24	8.3191	0.0034	0.0589	0.70
Ibuprofenato de Ibuprofeno.					
Parámetro	n	Promedio	Varianza	D.E.	C.V%
ABC	24	2528.45	1637.26	40.4630	1.60
Tr	24	14.2275	0.0005	0.0219	0.15

Tabla XVIII. Resultados de la determinación de exactitud del método.

Ibuprofeno.					
Día	Curva	Niveles ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio de % de recobro	D.E.	C.V. %
1	1	5-80	98.2564	1.2789	1.30
1	2	5-80	98.5478	1.2874	1.30
1	3	5-80	98.7562	1.3652	1.38
2	1	5-80	99.2415	1.3521	1.36
2	2	5-80	99.2512	1.4123	1.42
2	3	5-80	98.9956	1.4236	1.44
Ibuprofol					
Día	Curva	Niveles ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio de % de recobro	D.E.	C.V. %
1	1	5-80	100.4256	1.4785	1.47
1	2	5-80	98.2875	1.2874	1.31
1	3	5-80	101.2451	1.3741	1.36
2	1	5-80	101.4584	1.5213	1.50
2	2	5-80	98.5261	1.2314	1.25
2	3	5-80	99.4123	1.8745	1.88
Ibuprofenato de Ibuprofilo.					
Día	Curva	Niveles ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio de % de recobro	D.E.	C.V. %
1	1	5-80	98.5214	1.3874	1.41
1	2	5-80	101.9985	1.8541	1.82
1	3	5-80	101.2132	1.4562	1.44
2	1	5-80	101.5241	1.2351	1.22
2	2	5-80	101.4752	0.5412	0.53
2	3	5-80	101.7456	0.9981	0.98

Tabla XIX. Precisión del método analítico para cuantificar ibuprofenato de ibuprofeno.

Día 1									
Concentración (µg/ml)	Promedio	D.E.	C.V.%	I.C 95%.					
2	54.4551	0.2890	0.5308	53.99-54.91					
3	80.9694	0.7599	0.9385	79.76-82.18					
4	113.3357	0.9053	0.7987	111.89-114.78					
5	135.1687	0.8296	0.6138	133.85-136.49					
20	558.6469	7.0518	1.2623	547.43-569.87					
35	874.7714	16.0087	1.8301	849.29-900.25					
50	1136.3613	10.6779	0.9396	1119.37-1153.35					
65	1491.0577	4.8771	0.3271	1483.3-1498.82					
80	2271.0975	14.6837	0.6465	2247.73-2294.46					
Día 2.									
Concentración (µg/ml)	ABC Promedio	D.E.	C.V.%	I.C 95%.					
2	54.8002	0.6952	1.2686	53.69-55.90					
3	81.0150	0.6492	0.8013	79.98-82.05					
4	113.4196	0.4847	0.4273	112.65-114.19					
5	135.9478	1.0015	0.7367	134.35-137.54					
20	566.2409	8.3841	1.4807	552.9-572.58					
35	894.8057	6.6067	0.7383	884.29-905.32					
50	1147.9122	5.2315	0.4557	1139.59-1156.24					
65	1498.5949	17.8073	1.1883	1470.26-1526.93					
80	2292.6770	35.1588	1.5335	2236.73-2348.62					
Comparación entre días.									
Concentración (mcg/ml)	2	3	4	5	20	35	50	65	80
I. de C. 95%	0.34 ±	0.04 ±	0.08 ±	0.78 ±	7.59 ±	20.03 ±	11.52 ±	7.54 ±	21.58 ±
para µ1=µ2	1.05	1.22	1.36	1.60	13.26	21.19	14.25	22.59	46.52

Tabla XX. Precisión del método analítico para cuantificar ibuprofeno.

Día 1									
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio	D.E.	C.V.%	I.C 95%.					
2	49.5047	0.2628	0.5308	48.76-50.23					
3	73.6087	0.6909	0.9386	72.05-74.26					
4	103.0325	0.8230	0.7987	101.02-105.26					
5	122.8801	0.7543	0.6138	120.15-125.62					
20	507.8609	6.4107	1.2623	500.21-512.65					
35	795.2474	14.5534	1.8300	785.63-801.25					
50	1033.0558	9.7072	0.9397	1025.36-1041.24					
65	1355.5071	4.4338	0.3271	1349.85-1361.78					
80	2064.6341	13.3489	0.6465	2051.24-2073.55					
Día 2.									
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	ABC Promedio	D.E.	C.V.%	I.C 95%.					
2	50.1321	0.3290	0.6562	49.26-51.47					
3	74.5425	0.8735	1.1719	72.56-76.87					
4	104.3386	0.9578	0.9180	101.56-107.89					
5	124.4359	0.5397	0.4337	121.65-127.66					
20	514.3055	7.5624	1.4704	508.23-520.14					
35	805.3539	16.9245	2.1015	792.89-720.19					
50	1046.1525	11.1357	1.0644	1035.21-1058.02					
65	1372.6888	7.5830	0.5524	1363.25-1382.06					
80	2090.8274	19.9364	0.9535	2070.45-2108.57					
Comparación entre días.									
Concentración (mcg/ml)	2	3	4	5	20	35	50	65	80
I. de C. 95%	0.45 \pm	0.22 \pm	0.87 \pm	0.89 \pm	8.29 \pm	29.63 \pm	17.99 \pm	6.42 \pm	6.71 \pm
para $\mu_1 = \mu_2$	1.54	1.17	1.89	1.88	10.12	30.22	25.69	15.24	6.99

Tabla XXI. Precisión del método analítico para cuantificar ibuprofeno.

Día 1									
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio	D.E.	C.V.%	I.C 95%.					
2	50.7784	0.6279	1.2365	49.16-50.99					
3	75.5006	0.9101	1.2055	74.58-76.05					
4	105.6831	1.4081	1.3324	103.25-107.98					
5	126.0450	1.9061	1.5122	124.02-128.71					
20	520.9114	7.3960	1.4198	517.42-522.91					
35	815.6525	13.6292	1.6710	804.21-827.79					
50	1059.6275	14.7257	1.3897	1044.11-1072.56					
65	1390.3785	15.5893	1.1212	1378.26-1408.20					
80	2117.7020	21.0987	0.9963	2095.12-2135.94					
Día 2.									
Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	ABC Promedio	D.E.	C.V.%	I.C 95%.					
2	50.7125	0.5451	1.0748	50.02-51.09					
3	75.4047	1.0180	1.3500	74.43-76.45					
4	105.5481	1.4843	1.4063	103.11-106.57					
5	125.8824	1.8505	1.4700	123.95-127.21					
20	520.2490	8.0021	1.5381	512.26-528.19					
35	814.6020	13.4020	1.6452	801.21-828.15					
50	1058.2801	15.9779	1.5098	1043.22-1073.01					
65	1388.5911	15.4171	1.1103	1363.20-1403.50					
80	2114.9973	23.0714	1.0908	2092.66-2147.54					
Comparación entre días.									
Concentración (mcg/ml)	2	3	4	5	20	35	50	65	80
I. de C. 95%	0.51 \pm	0.31 \pm	0.04 \pm	1.89 \pm	10.23 \pm	28.22 \pm	25.10 \pm	7.05 \pm	5.24 \pm
para $\mu_1 = \mu_2$	1.62	1.14	1.26	2.01	15.24	32.56	32.87	10.66	7.86

6.2.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en soluciones acuosas con diferentes valores de pH.

El ibuprofenato de ibuprofeno no sufrió hidrólisis en el intervalo de valores de pH estudiados durante un periodo de 24 horas. Ello se ejemplifica en las figuras 9 y 10, en las que se muestran los cromatogramas del ibuprofenato de ibuprofeno en condiciones de pH 9.0 a las 0 y a las 24 horas de tratamiento hidrolítico.

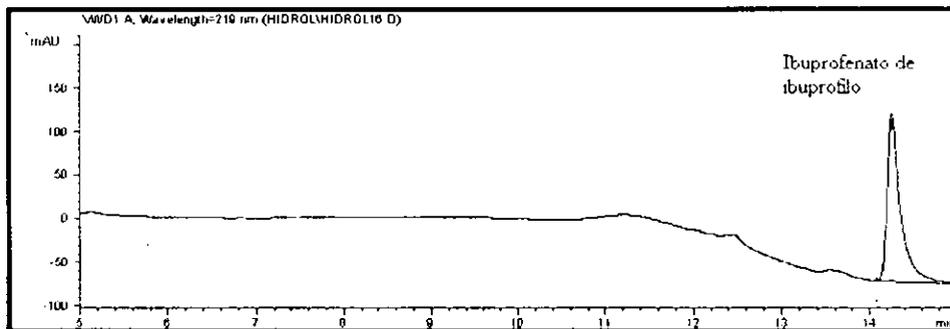


Figura 9. Cromatograma del experimento de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno a pH 9.0, a las 0 horas.

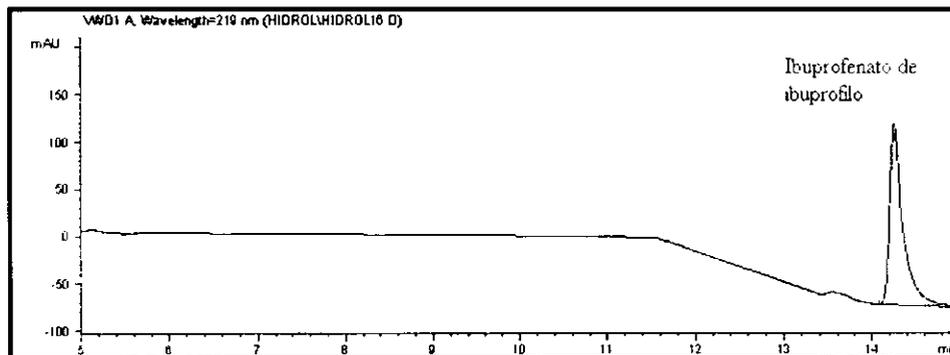


Figura 10. Cromatograma del experimento de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno a pH 9.0, a las 24 horas.

6.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en plasma de rata y en presencia de esterasas de hígado de cerdo.

6.3.1 Desarrollo de un método de extracción del ibuprofeno e ibuprofeno a partir de plasma de rata.

En todas las muestras en plasma, se detectó la presencia de un pico que interfería con la cuantificación del ibuprofenato de ibuprofeno (figura 11), el cual no fue posible eliminar o separar del compuesto de interés utilizando variaciones en el método analítico.

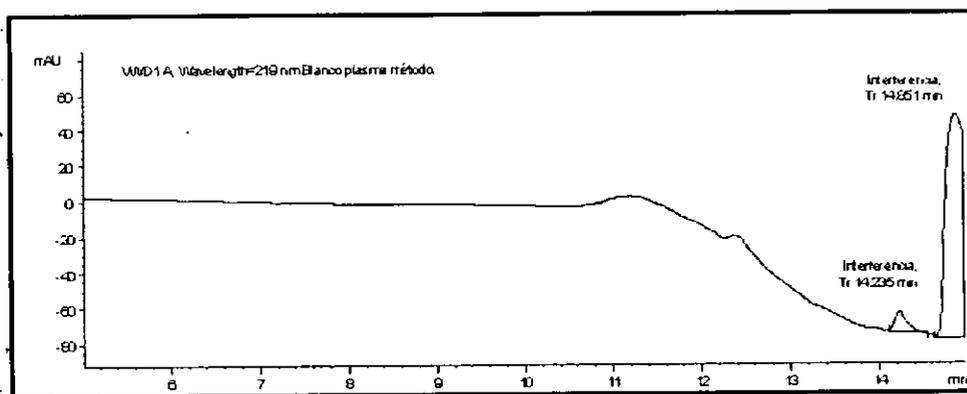


Figura 11. Cromatograma blanco en el cual se muestra que existe un componente endógeno del plasma que interfiere con el ibuprofenato de ibuprofeno.

De los resultados obtenidos durante la fase preliminar del desarrollo del método de extracción, se encontró que al aumentar la cantidad de disolvente de extracción adicionado así como al aumentar su polaridad, se incrementaba el % de recobro de los analitos, y que el tiempo de agitación no era un factor determinante en la extracción, por lo que, en la optimización del método, se cambió el pH del disolvente de extracción adicionando ácido acético glacial, y se probó además la utilización de un estándar interno (naproxeno) para mejorar la reproducibilidad entre determinaciones. En la tabla XXII, se muestran los valores de recobro promedio después de la optimización y, en la figura 12, se ilustra un cromatograma típico de una muestra de plasma conteniendo a los analitos y al estándar interno, donde ya no se muestra al ibuprofenato de

ibuprofeno, debido a que se decidió no continuar con su determinación dado que el (los) compuesto(s) endógeno(s) interfería(n) con su tiempo de retención, lo cual provocaba un exceso y variabilidad en sus valores de recobro (como puede verse en la tabla XXII).

Tabla XXII. Resultados la optimización del método de extracción a partir de plasma para cada uno de los analitos.

Experimento	Disolvente de extracción.	Volumen de disolvente (µl)	Tiempo de agitación (segundos).	% Recuperado Ibu.	% Recuperado Ibol.	% Recuperado Iblb.
1	Metanol	500	30	100.4275 (1.45)	100.3215 (1.77)	143.2562 (12.93)
2	Acetonitrilo	500	30	99.6231 (2.14)	100.0123 (2.03)	149.6521 (14.52)
3	Metanol	500	20	100.5423 (1.21)	100.5114 (1.17)	142.8874 (14.23)
4	Metanol	500	10	99.9987 (1.98)	100.4520 (1.03)	137.5401 (14.88)
5	Acetonitrilo	500	10	98.5210 (2.15)	99.6231 (2.13)	147.5231 (13.62)
6	Metanol	250	20	100.0206 (1.16)	99.2521 (1.21)	123.2544 (11.69)

Ibu=Ibuprofeno. Ibol= ibuprofol. Iblb= Ibuprofenato de ibuprofeno. Los valores entre paréntesis indican el % de coeficiente de variación entre tres repeticiones.

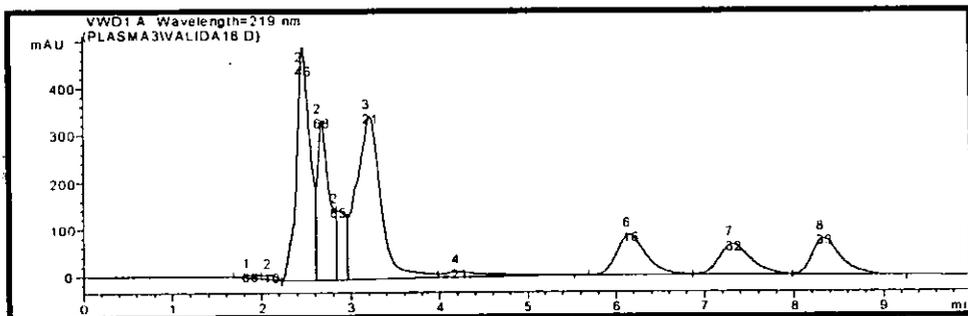
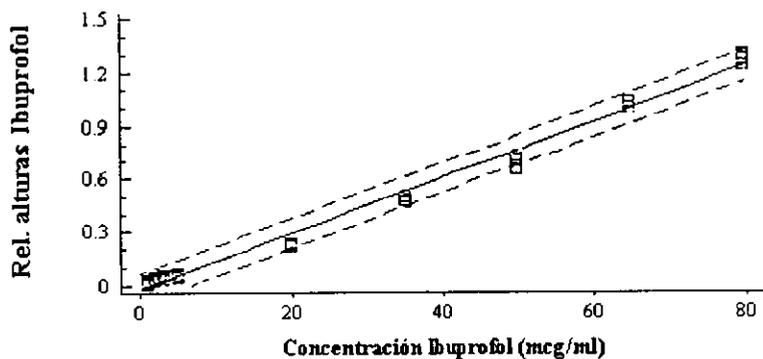


Figura 12. Cromatograma típico obtenido al utilizar el método analítico de extracción para ibuprofeno e ibuprofol a partir de muestras de plasma de rata. Los picos con los números 6, 7 y 8 pertenecen al naproxeno (0.5 µg/mL), ibuprofeno (35 µg/mL) e ibuprofol (35 µg/mL), respectivamente. Las condiciones cromatográficas son las descritas en la sección 5.3.2.

6.3.2 Validación del método analítico por CLAR para cuantificar ibuprofeno e ibuprofol en plasma de rata y en soluciones de esterasa de hígado de cerdo.

Los resultados de linealidad del método para ambos analitos, se muestran en las gráficas 10 y 11, así como en la tabla XXIII.

Gráfica 10. Linealidad del método para ibuprofeno. Resultados de dos días.
(las líneas punteadas representan el Intervalo de Confianza al 95%)



Gráfica 11. Linealidad del método para ibuprofol. Resultados de dos días.
(las líneas punteadas representan el Intervalo de Confianza al 95%)

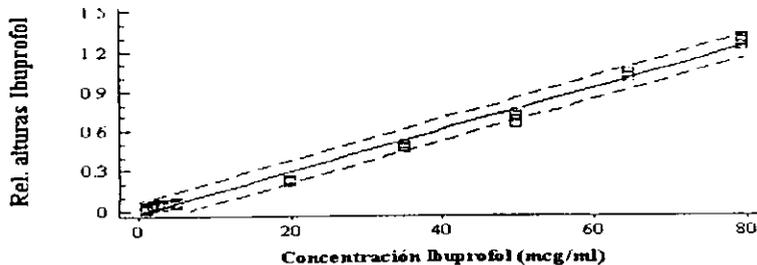


Tabla XXIII. Linealidad del método para la cuantificación en plasma de rata.

Ibuprofeno día 1.					
Curva	r^2	Pendiente	Intercepto	$p(m)^a$	$p(b)^b$
1	0.9936	0.0145	0.0021	0.0000	0.0321
2	0.9941	0.0142	0.0013	0.0000	0.0358
3	0.9898	0.0137	-0.0004	0.0000	0.0254
4	0.9916	0.0169	0.0014	0.0000	0.0198
Ibuprofeno día 2.					
Curva	r^2	Pendiente	Intercepto	$p(m)^a$	$p(b)^b$
1	0.9938	0.0128	0.0014	0.0000	0.0087
2	0.9947	0.0159	0.0012	0.0000	0.0114
3	0.9936	0.0127	-0.0074	0.0000	0.0398
4	0.9886	0.01499	0.0018	0.0000	0.0412
Ibuprofol día 1..					
Curva	r^2	Pendiente	Intercepto	$p(m)^a$	$p(b)^b$
1	0.9919	0.0171	0.0011	0.0000	0.0021
2	0.9939	0.0179	0.0014	0.0000	0.0025
3	0.9869	0.0184	0.0015	0.0000	0.0142
4	0.9930	0.0198	0.0026	0.0000	0.0325
Ibuprofol día 2..					
Curva	r^2	Pendiente	Intercepto	$p(m)^a$	$p(b)^b$
1	0.9946	0.0159	0.0987	0.0000	0.0421
2	0.9919	0.0177	0.0059	0.0000	0.0062
3	0.9965	0.0155	0.0002	0.0000	0.0021
4	0.9844	0.0191	0.0041	0.0000	0.0087

^aCorresponde al valor de significancia después de la prueba de t para $H_0: m \neq 0$. ^bCorresponde al valor de significancia después de la prueba de t para $H_0: b \neq 0$.

En la figura 13, se muestra un cromatograma de un blanco de plasma de rata donde se comprueba la selectividad del método. Esto puede corroborarse en la figura 12.

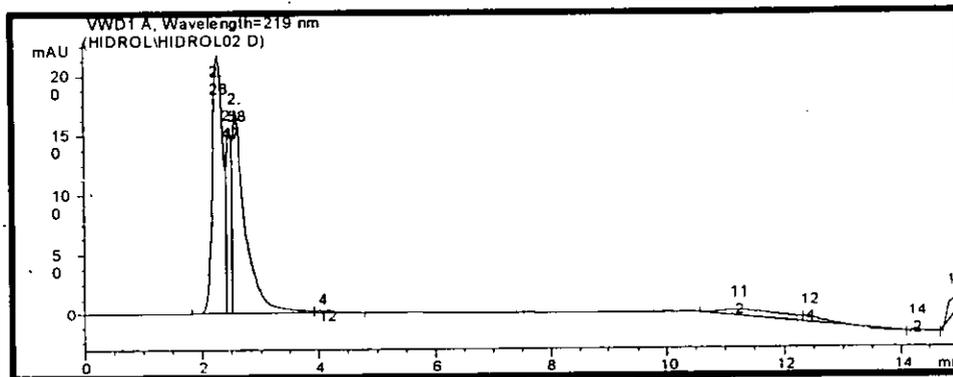


Figura 13. Cromatograma de un blanco de plasma de rata. Especificidad del método analítico.

En la figura 14, se presenta un cromatograma representativo de la elución de una muestra con una concentración de ambos analitos de $1 \mu\text{g/ml}$, la cual es el límite de detección del método. En la tabla XXIV, se expresan los resultados del límite de cuantificación del método analítico.

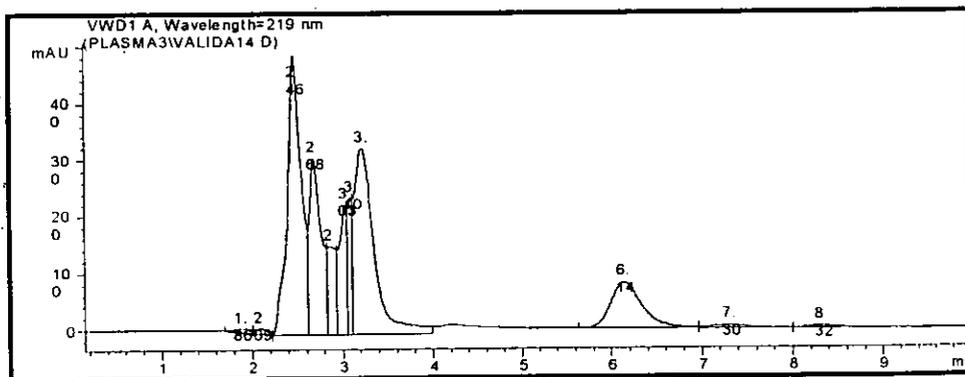


Figura 14. Cromatograma que ilustra el parámetro de límite de detección del método analítico. El ibuprofeno (pico 7) e ibuprofol (pico 8) están en una concentración de $1 \mu\text{g/ml}$ en la muestra.

Tabla XXIV. Resultados de la determinación del límite de cuantificación del método analítico en plasma de rata para ibuprofeno e ibuprofol.

Ibuprofeno				
Nivel (µg/ml)	Ruido (ASTM) (Promedio, n=8)^a	Altura (mAU) (Promedio, n=8)	Relación Altura/ruido	Valor de p (95%)^b
1	1.2598	2.1398	1.6986	0.0165
2	1.2531	4.3934	3.5060	0.0102
3	1.2661	6.5331	5.1600	0.0097
4	1.2598	8.7867	6.9750	0.0054
5	1.2761	10.9265	8.5627	0.0021
Ibuprofol.				
Nivel (µg/ml)	Ruido (ASTM) (Promedio, n=8)^a	Altura (mAU) (Promedio, n=8)	Relación Altura/ruido	Valor de p (95%)^b
1	1.2598	2.1859	1.7352	0.0187
2	1.2531	4.3718	3.4888	0.0112
3	1.2661	6.5577	5.1794	0.0103
4	1.2598	8.7436	6.9407	0.0062
5	1.2761	10.9295	8.5651	0.0024

^aDeterminado de los 4.5 a los 5.5 minutos, con el programa Shimadzu Class-VP Chromatograph.

^bComparación entre medias de altura y ruido. Un valor de $p < 0.05$, indica diferencia estadísticamente significativa

En las tablas XXV y XXVI y en las gráficas 12 y 13, se muestran los resultados de la exactitud del método analítico

Tabla XXV. Resultados de la exactitud del método para la cuantificación de ibuprofeno.

Día 1						
Cantidad Adicionada (µg/ml)	Promedio Recuperado (µg/ml)	D.E.	C.V.	Promedio % de recobro	D.E.	C.V. %
1	1.9148	0.4649	24.2790	191.4878	65.7453	48.0319
2	2.2189	0.3650	14.4919	110.5104	10.1810	9.1301
3	3.1402	0.1699	5.4106	102.5374	8.8242	8.6059
4	4.3474	0.3806	8.7550	104.1082	12.0355	11.5605
5	5.0876	0.5506	10.8217	102.2551	14.7734	14.4476
20	22.4123	0.6512	2.9054	103.4037	3.4716	3.3573
35	40.2185	0.8255	2.0524	103.8775	6.4865	6.2443
50	55.0169	2.0303	3.6903	103.4618	3.8648	3.7355
65	72.5788	1.5216	2.0965	103.5622	6.4664	6.2440
80	90.4313	1.0216	1.1297	103.6091	5.4722	5.2816
Datos de ajuste lineal para cada una de las curvas cantidad adicionada vs. cantidad recuperada						
Curva	r ²	m	b	p(m) ^a	p(b) ^b	
1	0.9946	1.1128	0.0564	0.0000	0.0412	
2	0.9880	1.0843	0.0425	0.0000	0.0416	
3	0.9903	1.0676	0.0324	0.0000	0.0398	
4	0.9928	1.0984	0.0541	0.0000	0.0419	
Día 2						
Cantidad Adicionada (µg/ml)	Promedio Recuperado (µg/ml)	D.E.	C.V.	Promedio % de recobro	D.E.	C.V. %
1	1.2603	0.4360	34.5970	110.4778	43.9384	39.7713
2	2.6223	0.3413	13.0164	110.8665	12.0129	10.8355
3	3.1785	0.1341	4.2177	101.2588	6.0709	5.9954
4	3.8786	0.1768	4.5596	100.4376	7.3881	7.3559
5	5.4089	0.3727	6.8899	101.5997	10.8669	10.6958
20	22.0843	0.6872	3.1117	103.3528	3.2782	3.1719
35	39.4448	0.5941	1.5061	103.1408	5.9369	5.7561
50	54.8984	2.4526	4.4675	103.4501	3.9815	3.8487
65	72.4042	1.3835	1.9108	102.5979	4.9693	4.8434
80	88.1321	2.8991	3.2895	102.9741	2.7471	2.6678
Datos de ajuste lineal para cada una de las curvas cantidad adicionada vs. cantidad recuperada.						
Curva	r ²	m	b	p(m) ^a	p(b) ^b	
1	0.9932	1.0123	0.0210	0.0000	0.0321	
2	0.9958	1.0078	0.0422	0.0000	0.0412	
3	0.9941	1.0541	0.0374	0.0000	0.0342	
4	0.9914	1.0152	0.0412	0.0000	0.0422	

^aCorresponde al valor de significancia después de la prueba de t para Ho: m ≠ 0. ^bCorresponde al valor de significancia después de la prueba de t para Ho: b = 0.

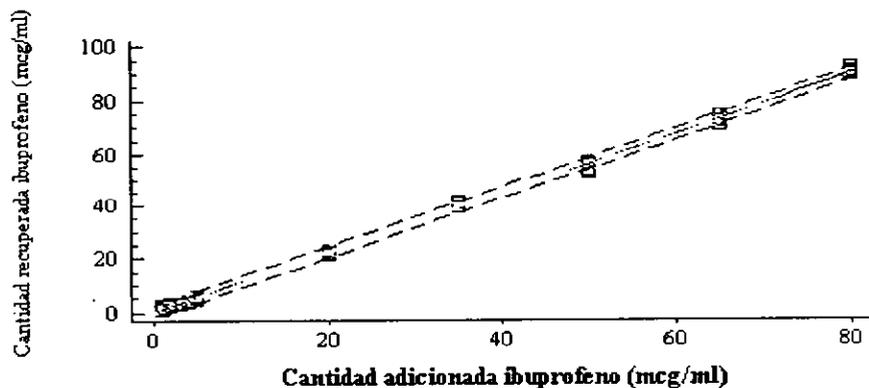
Tabla XXVI. Resultados de la exactitud del método para la cuantificación de ibuprofól.

Día 1						
Cantidad Adicionada (µg/ml)	Promedio Recuperado (µg/ml)	D.E.	C.V.	Promedio % de recobro	D.E.	C.V. %
1	0.9852	0.1404	14.2489	99.1140	19.1226	20.2489
2	2.2419	0.1236	5.5134	105.0648	8.6103	8.1952
3	3.3149	0.3739	11.2801	111.1644	12.5394	11.2801
4	3.5812	0.2046	5.7119	90.0710	5.1448	5.7119
5	5.0224	0.7835	15.6004	98.5697	11.8282	11.9998
20	21.9924	0.5979	2.7187	110.6257	3.0075	2.7187
35	39.4065	2.8439	7.2167	113.2695	8.1744	7.2167
50	55.4129	2.5245	4.5558	111.4948	5.0795	4.5558
65	72.9449	6.3037	8.6418	112.9003	9.7566	8.6418
80	88.7482	6.7082	7.5587	111.6049	8.4358	7.5587
Datos de ajuste lineal para cada una de las curvas cantidad adicionada vs. cantidad recuperada.						
Curva	r ²	m	b	p(m) ^a	p(b) ^b	
1	0.9920	1.1299	-0.0521	0.0000	0.0427	
2	0.9945	1.1069	0.0521	0.0000	0.0446	
3	0.9872	1.0850	0.0412	0.0000	0.0387	
4	0.9930	1.0872	0.0502	0.0000	0.0449	
Día 2						
Cantidad Adicionada (µg/ml)	Promedio Recuperado (µg/ml)	D.E.	C.V.	Promedio % de recobro	D.E.	C.V. %
1	1.0043	0.2230	22.2026	103.3521	43.6913	42.2742
2	2.2807	0.1151	5.0462	105.3540	9.0877	8.6259
3	3.3649	0.3855	11.4557	107.3390	11.3501	10.5741
4	3.6528	0.2086	5.7119	97.2251	10.6844	10.9893
5	4.8606	0.4561	9.3833	101.7463	12.8770	12.6559
20	22.4322	0.6099	2.7187	102.1341	7.2454	7.0940
35	40.1946	2.9007	7.2167	103.6930	13.5818	13.0981
50	56.3835	2.6148	4.6376	103.5823	9.6347	9.3015
65	74.4038	6.4298	8.6418	103.4438	15.0058	14.5062
80	91.1635	6.4672	7.0941	103.9563	13.4645	12.9520
Datos de ajuste lineal para cada una de las curvas cantidad adicionada vs. cantidad recuperada.						
Curva	r ²	m	b	p(m) ^a	p(b) ^b	
1	0.9981	1.0021	0.0012	0.0000	0.0210	
2	0.9942	1.0821	0.0431	0.0000	0.0422	
3	0.9971	1.0019	0.0041	0.0000	0.0254	
4	0.9921	1.0045	0.0487	0.0000	0.0356	

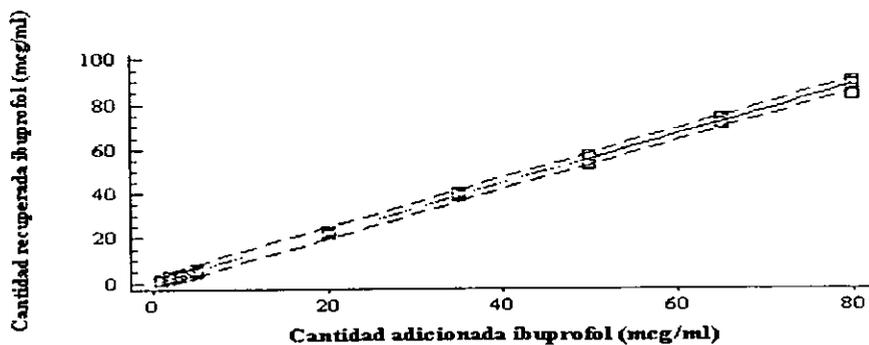
^aCorresponde al valor de significancia después de la prueba de t para Ho: m = 0. ^bCorresponde al valor de significancia después de la prueba de t para Ho: b = 0.

Gráfica 12. Exactitud del método para ibuprofeno. Ambos días.

(Las líneas punteadas representan el I. de C. al 95%).

**Gráfica 13. Exactitud del método para ibuprofol. Ambos días.**

(Las líneas punteadas representan el I. de C. al 95%).



En las tablas XXVII y XXVIII, al igual que en las gráficas 14 y 15, se muestran los resultados de la estabilidad de la muestra analítica a las 5, 10, 15, 20 y 25 horas, así como a los 8 días. La variable de respuesta en todos los casos es la relación de alturas analito/estándar interno.

Tabla XXVII. Resultados de la prueba de estabilidad de la muestra analítica para ibuprofeno (35 $\mu\text{g/mL}$)

Población	Observaciones	Promedio	Varianza	D.E.	C.V.%
Tiempo 0	6	0.4016	0.00001	0.0036	0.9041
Tiempo 5 h.	3	0.3925	0.00001	0.0072	1.8654
Tiempo 10 h.	3	0.3970	0.00011	0.0107	2.6978
Tiempo 15 h.	3	0.3894	0.00012	0.0109	2.8074
Tiempo 20 h.	3	0.3925	0.00007	0.0088	2.2314
Tiempo 25 h.	6	0.3901	0.00002	0.0052	1.3472
Tiempo 8 días.	6	0.4027	0.00001	0.0036	0.8409
Total	30	0.3949	0.00006	0.0079	1.9758

Análisis de varianza para las poblaciones.					
Fuente de variación.	Suma de cuadrados.	Grados de libertad.	Media de cuadrados.	Razón de F	Valor de p (95%).
Entre poblaciones.	0.00047	5	0.00009	1.83	0.1681
Dentro de la población.	0.0007	25	0.00005		
Total	0.0012	30			

Gráfica 14. Promedios e intervalos de confianza al 95% para la determinación de la estabilidad de la muestra analítica conteniendo ibuprofeno. Concentración de 35 $\mu\text{g/mL}$.

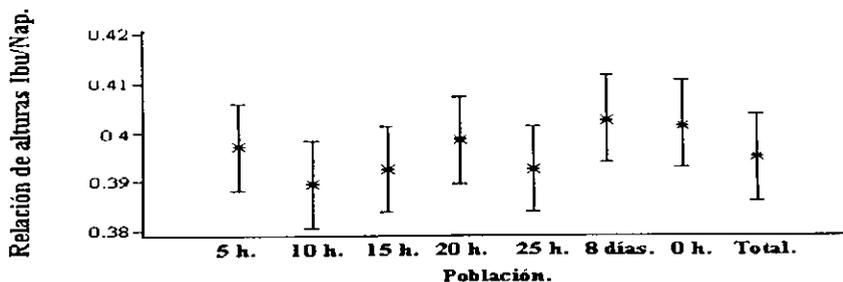
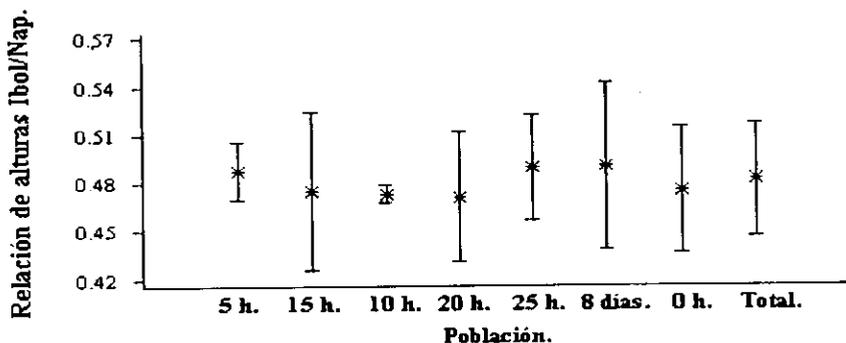


Tabla XXVIII. Resultados de la prueba de estabilidad de la muestra analítica para ibuprofeno.
Concentración de 35 $\mu\text{g/mL}$.

Población	Observaciones	Promedio	Varianza	D.E.	C.V. %
Tiempo 0	6	0.4875	0.00005	0.0072	1.4735
Tiempo 5 h.	3	0.4711	0.00027	0.0164	3.4901
Tiempo 10 h.	3	0.4733	0.00001	0.0023	0.5042
Tiempo 15 h.	3	0.4901	0.00044	0.0211	4.3082
Tiempo 20 h.	3	0.4752	0.00039	0.0199	4.1903
Tiempo 25 h.	6	0.4890	0.00017	0.0132	2.7121
Tiempo 8 días.	6	0.4729	0.00025	0.0154	2.6541
Total	30	0.4819	0.00020	0.0143	2.9674

Análisis de varianza para las poblaciones.					
Fuente de variación.	Suma de cuadrados.	Grados de libertad.	Media de cuadrados.	Razón de F	Valor de p (95%).
Entre poblaciones.	0.0012	5	0.00025	1.31	0.3111
Dentro de la población.	0.0028	25	0.00018		
Total	0.0012	30			

Gráfica 15. Valores promedio e intervalos de confianza al 95% para la determinación de la estabilidad de la muestra analítica conteniendo ibuprofeno. Concentración de 35 $\mu\text{g/mL}$.



En las tablas XXIX y XXX, se muestran los resultados de la precisión del método analítico.

Tabla XXIX. Resultados de la precisión del método para cuantificar ibuprofeno.

Día 1									
($\mu\text{g/ml}$)	Moles/L ($\times 10^6$)	Promedio (relación de alturas Ibu/Nap)	D.E.	C.V.%	I.C 95%.				
2	5.26	0.0249	0.0031	12.4524	0.0201-0.0286				
3	7.89	0.0348	0.0025	6.0865	0.0312-0.0378				
4	10.52	0.0457	0.0081	14.9341	0.0396-0.0516				
5	13.15	0.0545	0.0028	5.5639	0.0526-0.0578				
20	52.6	0.1940	0.0199	10.2669	0.1874-0.2048				
35	92.05	0.4230	0.0173	4.0964	0.4158-0.4397				
50	131.5	0.6005	0.0301	5.0071	0.5712-0.6321				
65	170.95	0.8074	0.0874	10.8312	0.7219-0.8891				
80	210.4	1.0709	0.0397	3.7137	1.0416-1.1106				
Día 2.									
($\mu\text{g/ml}$)	Moles/L ($\times 10^6$)	Promedio (relación de alturas Ibu/Nap)	D.E.	C.V.%	I.C 95%.				
2	5.26	0.0225	0.0015	6.5271	0.0208-0.0242				
3	7.89	0.0321	0.0011	3.3572	0.0306-0.0342				
4	10.52	0.0429	0.0015	3.6269	0.0408-0.0449				
5	13.15	0.0501	0.0045	8.9232	0.0468-0.0557				
20	52.6	0.1863	0.0046	2.4501	0.1802-0.1921				
35	92.05	0.4021	0.0122	2.0985	0.3916-0.4150				
50	131.5	0.5752	0.0378	6.5794	0.5410-0.6053				
65	170.95	0.8393	0.0151	1.8011	0.8217-0.8549				
80	210.4	1.0338	0.0294	2.8431	1.0051-1.0599				
Comparación entre días.									
Concentración (mcg/ml)	2	3	4	5	20	35	50	65	80
I. de C. 95%	0.02 \pm	0.03 \pm	0.04 \pm	0.05 \pm	0.19 \pm	0.41 \pm	0.58 \pm	0.84 \pm	1.03 \pm
para $\mu_1 = \mu_2$	0.05	0.06	0.06	0.07	0.56	0.99	0.85	1.23	1.26

ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

Tabla XXX. Resultados de la precisión del método para cuantificar ibuprofeno.

Día 1									
($\mu\text{g/ml}$)	Moles/L ($\times 10^{-6}$)	Promedio (relación de alturas Ibol/Nap)	D.E.	C.V.%	I.C 95%.				
2	5.26	0.0299	0.0037	12.5312	0.0254-0.0326				
3	7.89	0.0431	0.0043	9.8039	0.0392-0.04805				
4	10.52	0.0579	0.0044	9.2654	0.0508-0.0642				
5	13.15	0.0678	0.0031	11.0897	0.0654-0.0712				
20	52.6	0.2547	0.0196	7.7206	0.2315-0.2723				
35	92.05	0.5464	0.0647	11.8373	0.4826-0.6101				
50	131.5	0.8085	0.0502	6.2038	0.7511-0.8941				
65	170.95	1.1894	0.0923	7.7584	1.0897-1.2799				
80	210.4	1.4711	0.0871	5.9196	1.3912-1.5623				
Día 2.									
($\mu\text{g/ml}$)	Moles/L ($\times 10^{-6}$)	Promedio (relación de alturas Ibol/Nap)	D.E.	C.V.%	I.C 95%.				
2	5.26	0.0326	0.0042	11.2621	0.0289-0.0371				
3	7.89	0.0419	0.0009	2.1916	0.0401-0.0436				
4	10.52	0.0520	0.0030	5.7924	0.0492-0.0553				
5	13.15	0.0694	0.0051	7.3921	0.06412-0.0731				
20	52.6	0.2432	0.0085	3.5020	0.2326-0.2529				
35	92.05	0.5024	0.0264	5.2619	0.4812-0.5299				
50	131.5	0.7297	0.0359	4.9174	0.6895-0.7624				
65	170.95	0.9947	0.1462	14.6921	0.8526-1.1412				
80	210.4	1.3090	0.1245	9.5150	1.1716-1.4387				
Comparación entre días.									
Concentración (mcg/ml)	2	3	4	5	20	35	50	65	80
I. de C. 95%	0.03 \pm	0.04 \pm	0.05 \pm	0.06 \pm	0.24 \pm	0.51 \pm	0.73 \pm	1.01 \pm	1.35 \pm
para $\mu_1=\mu_2$	0.07	0.09	0.08	0.12	0.72	1.02	0.97	1.76	1.97

Finalmente, en las tablas XXXI y XXXII, se muestran los resultados de la validación cruzada para la cuantificación de ibuprofeno e ibuprofol en solución de esterasa de hígado de cerdo y, en la figura 15, se puede observar un cromatograma de un blanco de solución de esterasa de hígado de cerdo.

Tabla XXXI. Resultados de la precisión del método para la validación cruzada.					
Ibuprofeno en plasma, día 1.					
($\mu\text{g/ml}$)	Moles/L ($\times 10^{-6}$)	Promedio (relación de alturas Ibu/Nap)	D.E.	C.V.%	I.C 95%.
5	13.5	0.0545	0.0028	5.5639	0.0526-0.0578
35	92.05	0.4230	0.0173	4.0964	0.4158-0.4397
65	170.95	0.8074	0.0874	10.8312	0.7219-0.8891
Ibuprofeno en plasma, día 2.					
5	13.5	0.0501	0.0045	8.9232	0.0468-0.0557
35	92.05	0.4021	0.0122	2.0985	0.3916-0.4150
65	170.95	0.8393	0.0151	1.8011	0.8217-0.8549
Ibuprofeno en solución de esterasa, día 1.					
($\mu\text{g/ml}$)	Moles/L ($\times 10^{-6}$)	Promedio (relación de alturas Ibu/Nap)	D.E.	C.V.%	I.C 95%.
5	13.5	0.0498	0.0021	4.2874	0.0471-0.0519
35	92.05	0.4186	0.0036	0.8624	0.4142-0.4226
65	170.95	0.8216	0.0125	1.5249	0.8017-0.8416
Ibuprofeno en solución de esterasa, día 2.					
5	13.5	0.0501	0.0045	8.9232	0.0468-0.0557
35	92.05	0.4082	0.0116	2.0985	0.3921-0.4164
65	170.95	0.8416	0.0142	1.6957	0.8379-0.8561
Comparación entre días en solución de esterasa.					
Concentración (mcg/ml)	5		35		65
I. de C. 95% para $\mu_1 = \mu_2$	0.05 \pm 0.06		0.41 \pm 1.02		0.83 \pm 1.22

Tabla XXXII. Resultados de la determinación de precisión del método para la validación cruzada.					
Ibuprofeno en plasma, día 1.					
($\mu\text{g/ml}$)	Moles/L ($\times 10^{-6}$)	Promedio (relación de alturas Ibol/Nap)	D.E.	C.V.%	I.C 95%.
5	13.5	0.0678	0.0031	11.0897	0.0654-0.0712
35	92.05	0.5464	0.0647	11.8373	0.4826-0.6101
65	170.95	1.1894	0.0923	7.7584	1.0897-1.2799
Ibuprofeno en plasma, día 2.					
5	13.5	0.0694	0.0051	7.3921	0.06412-0.0731
35	92.05	0.5024	0.0264	5.2619	0.4812-0.5299
65	170.95	0.9947	0.1462	14.6921	0.8526-1.1412
Ibuprofeno en solución de esterasa, día 1.					
($\mu\text{g/ml}$)	Moles/L ($\times 10^{-6}$)	Promedio (relación de alturas Ibol/Nap)	D.E.	C.V.%	I.C 95%.
5	13.5	0.0654	0.0036	5.5042	0.0622-0.0691
35	92.05	0.4978	0.0028	0.5633	0.4951-0.5072
65	170.95	1.0206	0.0101	1.0031	1.0056-1.0309
Ibuprofeno en solución de esterasa, día 2.					
5	13.5	0.0622	0.0074	11.8974	0.0554-0.0712
35	92.05	0.5024	0.0026	0.4087	0.4982-0.5068
65	170.95	1.0159	0.0151	1.4864	1.0001-1.0318
Comparación entre días en solución de esterasa.					
Concentración (mcg/ml)	5	35	65		
I. de C. 95% para $\mu_1 = \mu_2$	0.06 \pm 0.12	0.51 \pm 1.10	1.00 \pm 1.21		

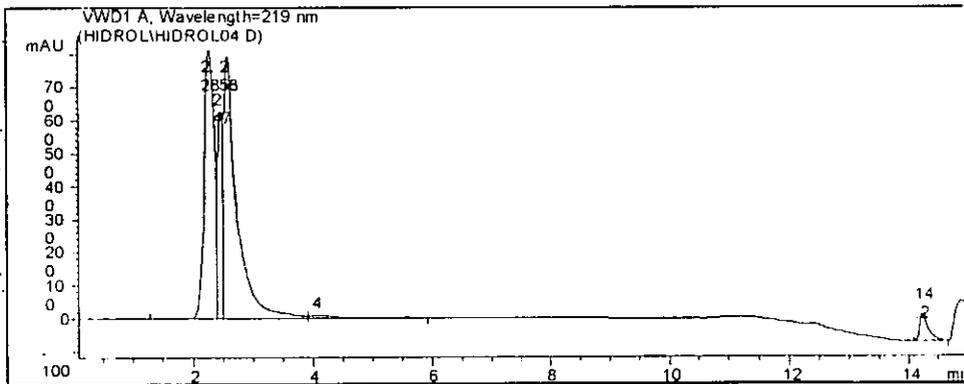


Figura 15. Cromatograma de un blanco de solución de esterasa de hígado de cerdo

6.3.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en plasma de rata y en solución de esterasa de hígado de cerdo.

6.3.3.1 Cuantificación del contenido proteico del plasma de rata y la solución de esterasa de hígado de cerdo.

En la tabla XXXIII se muestran los resultados de la cuantificación de proteínas en el plasma de rata y en la solución de esterasa de hígado de cerdo. En la gráfica 16 se presenta la curva de calibración de soluciones de albúmina bovina tratadas con el reactivo de Biuret

Gráfica 16. Curva de calibración para la cuantificación de proteínas en solución.

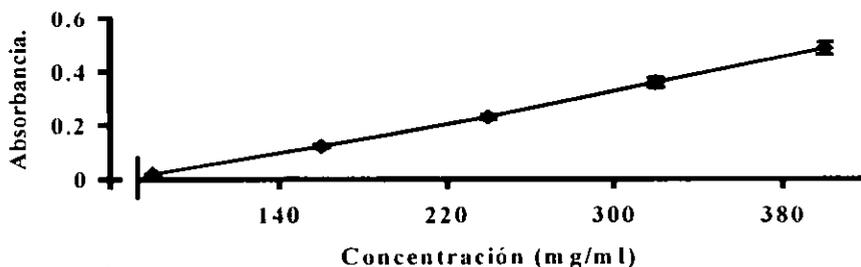


Tabla XXXIII. Resultados de la cuantificación de proteínas en plasma de rata y en solución de esterasa de hígado de cerdo.

Muestra	Número de observaciones	Promedio (g/100 ml)	D.E.	C.V. %.
Plasma de rata.	10	12.1255	0.1878	1.5488
Solución de esterasa.	10	32.6830	0.4111	1.2578

6.3.3.2 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en plasma de rata.

En la gráfica 17, así como en las tablas XXXIV a XXXVI, se muestran los resultados de la determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en plasma de rata en la cual se cuantificaron los productos obtenidos de la misma (ibuprofeno e ibuprofol). Las claves que explican la gráfica son: Ibu 5×10^{-5} , Ibu 1×10^{-4} e Ibu 2×10^{-4} = Ibuprofeno liberado a partir de la hidrólisis del Ibuprofenato de ibuprofeno en una concentración de 5×10^{-5} , 1×10^{-4} y 2×10^{-4} moles/L, respectivamente; Ibol 5×10^{-5} , Ibol 1×10^{-4} e Ibol 2×10^{-4} = Ibuprofol liberado a partir de la hidrólisis del Ibuprofenato de ibuprofeno en una concentración de 5×10^{-5} , 1×10^{-4} y 2×10^{-4} moles/L, respectivamente

Gráfica 17. Hidrólisis en plasma del ibuprofenato de ibuprofeno.

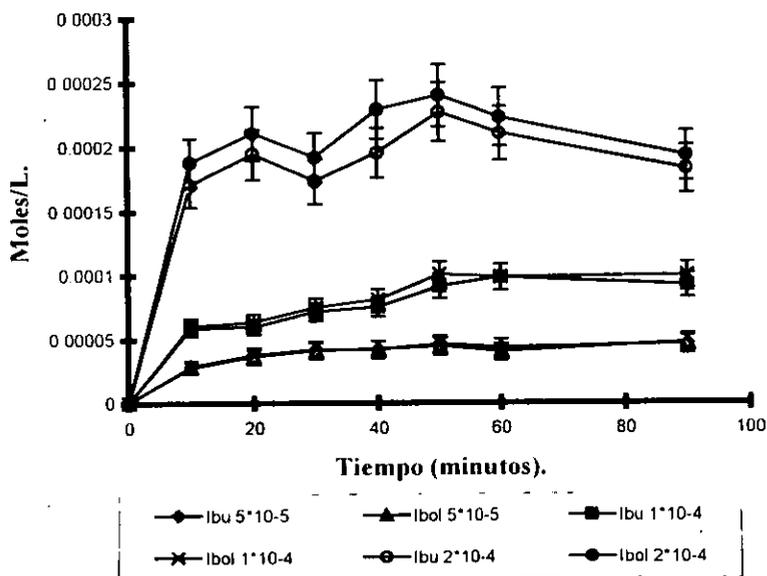


Tabla XXXIV. Hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en plasma de rata, a partir de una solución del profármaco en concentración 5×10^{-5} M.

Datos de formación de ibuprofeno.				
Tiempo (minutos)	Concentración de ibuprofeno formado ($\times 10^{-5}$ moles/L).	D.E. ($\times 10^{-7}$)	C.V. %	Concentración de ibuprofenato no hidrolizado ($\times 10^{-5}$ moles/L).
0	0	0	0	5.0000
10	2 9154	5.3638	1.8498405	2.1846
20	3 7693	21.5806	5.6206418	1.3307
30	4 1984	12.7403	3.03513111	0.9016
40	4 1843	19.6970	4.65240659	0.9106
50	4 5958	21.1579	4.75796981	0.5044
60	4 3602	5.1523	1.18977853	0.5032
90	4 5760	2.4363	0.55924665	0.5018
Datos de formación de ibuprofol.				
Tiempo (minutos)	Concentración de ibuprofol formado ($\times 10^{-5}$ moles/L).	D.E. ($\times 10^{-7}$)	C.V. %	Concentración de ibuprofenato no hidrolizado ($\times 10^{-5}$ moles/L).
0	0	0	0	5.0000
10	2.8549	4.6899	1.5354	2.2451
20	3.6606	26.9456	7.0179	1.4397
30	4.1194	25.7140	6.2421	0.9806
40	4.2483	12.2172	2.8756	0.8687
50	4.4304	31.1606	7.0526	0.6696
60	4.0415	7.9519	1.8664	1.0585
90	4.7372	13.5444	2.8962	0.3628

Los resultados son el promedio de tres determinaciones independientes en cada punto de muestreo.

Tabla XXXV. Hidrólisis en plasma de rata del ibuprofenato de ibuprofeno, a partir de una solución del fármaco en concentración 1×10^{-4} M.				
Datos de formación de ibuprofeno.				
Tiempo (minutos)	Concentración de ibuprofeno formado ($\times 10^{-5}$ moles/L).	D.E. ($\times 10^{-7}$)	C.V. %	Concentración de ibuprofenato no hidrolizado ($\times 10^{-5}$ moles/L).
0	0	0	0	10.0000
10	5.8623	63.5024	10.6158	4.3377
20	5.9669	45.2731	7.6125	4.2331
30	7.1395	3.1598	0.4383	3.0615
40	7.5391	42.214	5.5094	2.6609
50	9.1729	1.9972	0.1872	1.0271
60	9.2229	90.4446	11.1651	3.4363
90	9.8564	2.4363	0.5592	0.9771
Datos de formación de ibuprofol.				
Tiempo (minutos)	Concentración de ibuprofol formado ($\times 10^{-5}$ moles/L).	D.E. ($\times 10^{-7}$)	C.V. %	Concentración de ibuprofenato no hidrolizado ($\times 10^{-5}$ moles/L).
0	0	0	0	10.0000
10	6.0051	63.1126	10.3785	4.1949
20	6.3143	56.7566	9.2202	3.8857
30	7.4942	20.7380	2.7353	2.7058
40	8.1038	28.8236	3.6331	2.0962
50	10.0489	6.9998	0.6283	0.1521
60	9.8564	96.4321	10.2033	0.3463
90	10.0040	95.2145	10.0236	0.1963

Los resultados son el promedio de tres determinaciones independientes en cada punto de muestreo.

Tabla XXXVI. Hidrólisis en plasma de rata del ibuprofenato de ibuprofeno, a partir de una solución del profármaco en concentración 2×10^{-4} M.

Datos de formación de ibuprofeno.				
Tiempo (minutos)	Concentración de ibuprofeno formado ($\times 10^{-5}$ moles/L).	D.E. ($\times 10^6$)	C.V. %	Concentración de ibuprofenato no hidrolizado ($\times 10^{-5}$ moles/L).
0	0	0	0	20 0000
10	17.0731	23.9728	13.7014	3.3268
20	19.4741	3.27225	1.6526	0.9256
30	17.3612	17.8132	10.0604	3.0388
40	19.5698	3.1273	1.5568	0.8006
50	20.4000	1.4659	0.7826	0.0000
60	20.4000	3.2783	1.5405	0.0000
90	18.3325	18.4047	9.9833	2.0676
Datos de formación de ibuprofol.				
Tiempo (minutos)	Concentración de ibuprofol formado ($\times 10^{-5}$ moles/L).	D.E. ($\times 10^6$)	C.V. %	Concentración de ibuprofenato no hidrolizado ($\times 10^{-5}$ moles/L).
0	0	0	0	20 0000
10	18.8071	26.0615	13.8944	1.5932
20	20.4000	3.27695	1.54706	0.0000
30	19.2251	20.7910	10.8401	1.1751
40	20.4000	1.7077	0.2088	0.0000
50	20.4000	0.1847	0.6608	0.0000
60	20.4000	3.4035	1.5235	0.0000
90	19.3569	20.1546	10.3876	1.0431

Los resultados son el promedio de tres determinaciones independientes en cada punto de muestreo.

6.3.3.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en solución de esterasa de hígado de cerdo.

En la gráfica 18, así como en las tablas XXXVII a XXXIX, se muestran los resultados de la determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en solución de esterasa de hígado de cerdo, donde se cuantificaron los productos obtenidos de la misma (ibuprofeno e ibuprofol). Las claves que explican la gráfica son: Ibu 5×10^{-5} , Ibu 1×10^{-4} e Ibu 2×10^{-4} = Ibuprofeno liberado a partir de la hidrólisis del Ibuprofenato de ibuprofeno en una concentración de 5×10^{-5} , 1×10^{-4} y 2×10^{-4} moles/L, respectivamente; Ibol 5×10^{-5} , Ibol 1×10^{-4} e Ibol 2×10^{-4} = Ibuprofol liberado a partir de la hidrólisis del Ibuprofenato de ibuprofeno en una concentración de 5×10^{-5} , 1×10^{-4} y 2×10^{-4} moles/L, respectivamente.

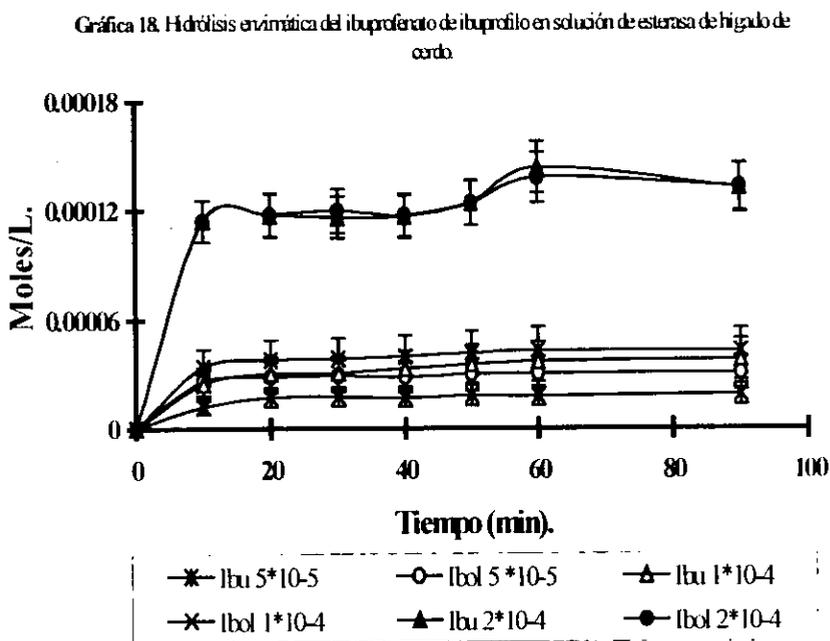


Tabla XXXVII. Hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofilo en solución de esterasa de hígado de cerdo, a partir de una solución del profármaco en concentración 5×10^{-5} M.

Datos de formación de ibuprofeno.				
Tiempo (minutos)	Concentración de ibuprofeno formado ($\times 10^{-5}$ moles/L).	D.E. ($\times 10^{-6}$)	C.V. %	Concentración de ibuprofenato no hidrolizado ($\times 10^{-5}$ moles/L).
0	0	0	0	5.0000
10	1.1978	0.6903	5.7314	3.8022
20	1.7202	0.7482	4.3498	3.2798
30	1.7453	0.8596	4.9254	3.2547
40	1.7017	0.5299	3.1143	3.2983
50	1.8133	0.8436	4.6523	3.1867
60	1.7885	0.5625	3.1453	3.2115
Datos de formación de ibuprofol.				
Tiempo (minutos)	Concentración de ibuprofol formado ($\times 10^{-5}$ moles/L).	D.E. ($\times 10^{-6}$)	C.V. %	Concentración de ibuprofenato no hidrolizado ($\times 10^{-5}$ moles/L).
0	0	0	0	5.0000
10	2.5742	0.6679	2.5903	2.4258
20	2.8115	0.8718	3.1014	2.1895
30	2.9108	0.9817	3.3728	2.0892
40	2.8305	0.5243	1.8524	2.1695
50	2.9645	0.9033	3.0470	2.0355
60	3.0537	0.5618	1.8398	1.9463
90	3.0824	0.8426	2.7337	1.9176

Los resultados son el promedio de tres determinaciones independientes en cada punto de muestreo.

Tabla XXXVIII. Hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en solución de esterasa de hígado de cerdo, a partir de una solución del profármaco en concentración 1×10^{-3} M.

Datos de formación de ibuprofeno.				
Tiempo (minutos)	Concentración de ibuprofeno formado ($\times 10^{-5}$ moles/L).	D.E. ($\times 10^{-6}$)	C.V. %	Concentración de ibuprofenato no hidrolizado ($\times 10^{-5}$ moles/L).
0	0	0	0	10.0000
10	2.4704	0.4686	1.8944	7.5296
20	3.0208	0.5617	1.8597	6.9792
30	3.0499	4.1046	13.4583	6.9501
40	3.2805	4.0243	12.2661	6.7192
50	3.5341	0.5476	1.5495	6.4659
60	3.6764	4.6151	12.5533	6.3236
90	3.8199	4.9688	13.0076	6.1801
Datos de formación de ibuprofol.				
Tiempo (minutos)	Concentración de ibuprofol formado ($\times 10^{-5}$ moles/L).	D.E. ($\times 10^{-6}$)	C.V. %	Concentración de ibuprofenato no hidrolizado ($\times 10^{-5}$ moles/L).
0	0	0	0	10.0000
10	3.3816	4.1075	12.1464	6.6184
20	3.7738	4.1498	10.9964	6.2262
30	3.8461	3.3265	8.6491	6.1539
40	3.9672	4.4418	11.1961	6.0328
50	4.1513	5.1261	12.3478	5.8487
60	4.3137	6.6611	15.4417	5.6863
90	4.2794	2.6509	6.1944	5.6206

Los resultados son el promedio de tres determinaciones independientes en cada punto de muestreo.

Tabla XXXIX. Resultados de la hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofilo en solución de esterasa de hígado de cerdo, a partir de una solución del profármaco en concentración 2×10^{-1} M.

Datos de formación de ibuprofeno.				
Tiempo (minutos)	Concentración de ibuprofeno formado ($\times 10^{-5}$ moles/L).	D.E. ($\times 10^{-6}$)	C.V. %	Concentración de ibuprofenato no hidrolizado ($\times 10^{-5}$ moles/L).
0	0	0	0	20.0000
10	11.4110	0.2555	2.2394	8.5887
20	11.7223	6.2688	5.3479	8.2781
30	11.6262	2.1092	1.8142	8.3743
40	11.6754	4.6658	3.9962	8.3251
50	12.4115	1.5487	1.2478	7.5886
60	14.3900	17.3675	12.0688	5.6099
90	13.2561	7.4304	5.6054	6.7444
Datos de formación de ibuprofol.				
Tiempo (minutos)	Concentración de ibuprofol formado ($\times 10^{-5}$ moles/L).	D.E. ($\times 10^{-6}$)	C.V. %	Concentración de ibuprofenato no hidrolizado ($\times 10^{-5}$ moles/L).
0	0	0	0	20.0000
10	11.4000	1.9351	1.6975	8.6004
20	11.7641	9.0454	7.6886	8.2359
30	11.9765	2.5062	2.0923	8.0223
40	11.7314	2.5775	2.1971	8.2687
50	12.4198	1.4628	1.1778	7.5812
60	13.8194	17.0675	12.7905	6.1813
90	13.3214	14.6752	11.0162	6.6788

Los resultados son el promedio de tres determinaciones independientes en cada punto de muestreo.

6.4. Farmacocinética del ibuprofeno liberado a partir de la administración oral del ibuprofenato de ibuprofilo en ratas.

6.4.1 Estudio preliminar en dosis de 99.22 mg de ibuprofenato de ibuprofilo/Kg de peso de la rata en administración oral.

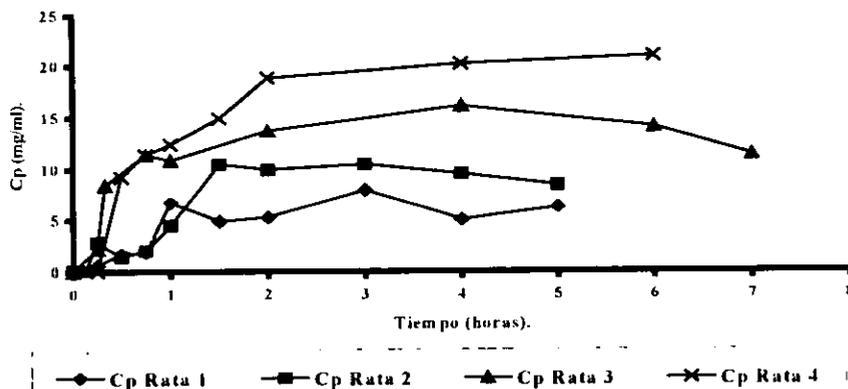
En la tabla XL, se muestran los valores de concentración plasmática de ibuprofeno vs. tiempo de muestreo en cada uno de los animales. Por otra parte, en la gráfica 19, pueden verse estos mismos valores representados en perfiles de concentración plasmática vs. tiempo.

Tabla XL. Datos crudos de la concentración plasmática del ibuprofeno liberado a partir del ibuprofenato de ibuprofilo en ratas Wistar macho, tras la administración de una dosis de profármaco de 99.22 mg/Kg de peso de rata.

Tiempo (horas)	Cp Rata 1 ($\mu\text{g/ml}$)	Cp Rata 2 ($\mu\text{g/ml}$)	Cp Rata 3 ($\mu\text{g/ml}$)	Cp Rata 4 ($\mu\text{g/ml}$)
0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.250	0.5714	2.8322	2.1654	0.0000
0.330	—	—	8.4198	—
0.500	1.7085	1.4057	—	9.2131
0.750	1.8730	2.0365	11.3386	11.3513
1.000	6.6710	4.4634	10.8089	12.3578
1.500	4.8707	10.4432	—	14.9224
2.000	5.2193	9.9242	13.6851	18.8284
3.000	7.9615	10.4656	—	—
4.000	5.0369	9.5010	16.1537	20.2129
5.000	6.2541	8.4128	—	—
6.000	—	—	14.0812	20.9374
7.000	—	—	11.3610	—

El símbolo —, indica que no se realizó muestreo a ese tiempo.

Gráfica 19. Perfiles de concentración plasmática vs. tiempo del ibuprofeno liberado tras una dosis de 99.22 mg/Kg de ibuprofenato de ibuprofilo por vía oral.



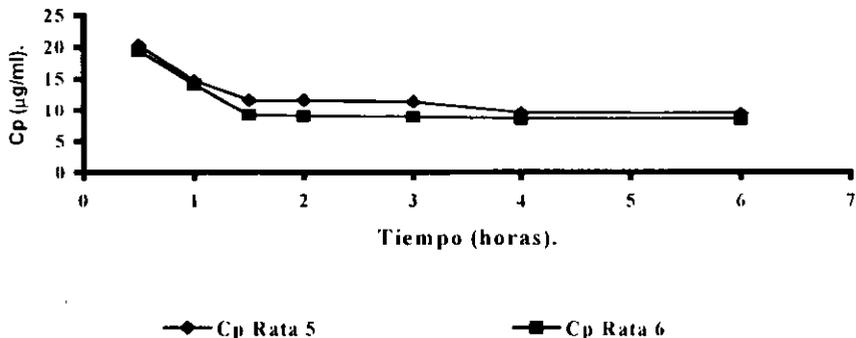
6.4.2 Estudio preliminar en dosis de 18.02 mg de ibuprofenato de ibuprofilo/Kg de peso de la rata en administración intravenosa.

En la tabla XLI, se muestran los valores de concentración plasmática de ibuprofeno en la rata vs. tiempo de muestreo en cada uno de los animales. Por otra parte, en la gráfica 20, estos mismos valores se encuentran representados en los perfiles correspondientes.

Tabla XLI. Datos crudos de los niveles plasmáticos del ibuprofeno obtenidos después de la administración de ibuprofenato de ibuprofilo en ratas Wistar macho, tras la administración de una dosis de profármaco de 18.02 mg/Kg de peso de rata por vía i.v.

Tiempo (horas)	Cp Rata 5 ($\mu\text{g/ml}$)	Cp Rata 6 ($\mu\text{g/ml}$)
0.500	20.2854	19.4506
1.000	14.6963	14.0562
1.500	11.5868	9.1292
2.000	10.4312	8.9416
3.000	9.8732	8.8199
4.000	9.5547	8.5009
6.000	9.3589	8.3502

Gráfica 20. Perfiles de Concentración plasmática vs. tiempo para el ibuprofeno liberado a partir del ibuprofenato de ibuprofilo, tras la administración i.v. de una dosis de 18.02 mg/Kg del profármaco.



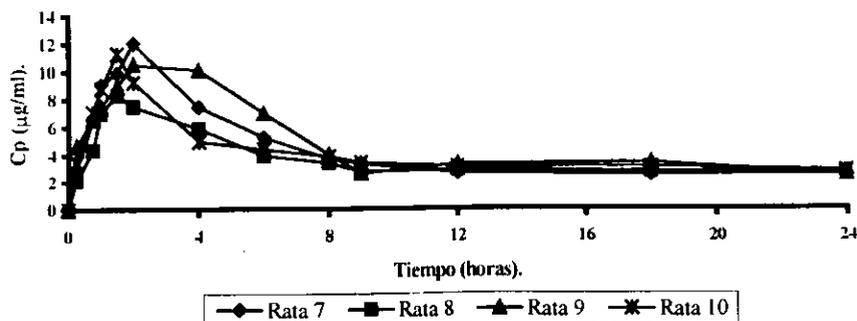
6.4.3 Estudio farmacocinético con la administración de una dosis de 49.61 mg/Kg de ibuprofenato de ibuprofilo por vía oral.

En la tabla XLII, se muestran los valores de concentración plasmática de ibuprofeno en la rata vs. tiempo de muestreo en cada uno de los animales. En la gráfica 21 se encuentra su representación gráfica. La gráfica 22 ilustra el perfil promedio de concentración plasmática vs tiempo del ibuprofeno derivado a partir del ibuprofenato de ibuprofilo en estas cuatro ratas

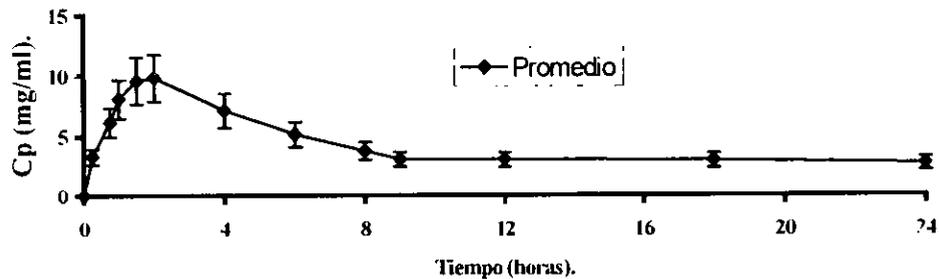
Tabla XLII. Datos crudos de los niveles plasmáticos del ibuprofeno liberado a partir del ibuprofenato de ibuprofilo en ratas Wistar macho, tras la administración de una dosis de profármaco de 49.61 mg/Kg de peso de rata por vía oral.

Tiempo (horas)	Cp Rata 7 (µg/ml)	Cp Rata 8 (µg/ml)	Cp Rata 9 (µg/ml)	Cp Rata 10 (µg/ml)	Promedio	D.E.	C.V. %
0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
0.250	2.8082	2.0997	4.6668	3.4903	3.2662	1.0928	33.4565
0.750	6.5576	4.3737	6.5594	7.0962	6.0838	1.0563	17.3630
1.000	9.0532	7.0208	7.4401	8.7699	9.6151	3.5581	37.0056
1.500	9.8876	8.2876	8.9161	11.2679	10.3534	2.0442	19.7444
2.000	12.0092	7.4936	10.5171	9.2256	10.6467	2.5000	23.4810
4.000	7.4680	5.8652	10.1027	4.9759	7.8154	2.5168	32.2038
6.000	5.2308	3.9139	6.9942	4.3964	5.7929	1.8835	32.5145
8.000	3.7055	3.3795	3.9840	3.8604	4.5437	1.8284	40.2396
9.000	3.3737	2.7374	2.6162	3.4280	3.8699	1.8939	48.9388
12.000	2.6418	2.8790	3.3272	3.1336	2.9954	0.2988	9.9737
18.000	2.5254	2.7512	3.4400	3.0753	2.9480	0.3981	13.5058
24.000	2.5633	2.7397	2.4857	2.8042	2.8931	0.5626	19.4459

Gráfica 21. Niveles plasmáticos del ibuprofeno liberado tras la administración de una dosis de 49.61 mg/Kg de ibuprofenato de ibuprofilo por vía oral.



Gráfica 22. Valores promedio de los niveles plasmáticos del ibuprofeno liberado tras la administración de una dosis oral de 49.61 mg/Kg de ibuprofenato de ibuprofeno.



7. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

7.1 Determinación de las propiedades fisicoquímicas del ibuprofenato de ibuprofilo.

7.1.1 Determinación del coeficiente de absortividad molar del ibuprofenato de ibuprofilo.

Como se puede observar en la figura 7, los espectros de absorción U.V. del ibuprofenato de ibuprofilo en diferentes disolventes son muy similares. El máximo más prominente se encuentra en una longitud de onda de aproximadamente 219 nm, y existe otro máximo de menor intensidad en la región de 264 nm; estos máximos pueden explicarse, principalmente, en función de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ de los dos anillos de benceno 1,4-disustituídos presentes en la molécula del ibuprofenato de ibuprofilo, siendo esto muy similar a lo que ocurre en la molécula del ibuprofeno. Así mismo, es posible que exista también una contribución de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ del grupo éster de la molécula en la absorción del ibuprofenato de ibuprofilo, las cuales pudieran estar involucradas en el marcado efecto debido al disolvente en la intensidad de su absorción.

Al analizar los resultados de la tabla XII, se observa que no existe diferencia significativa en cuanto a los coeficientes de absortividad molar del ibuprofenato de ibuprofilo en disolventes de diferente polaridad (como lo son el metanol y el acetonitrilo); a su vez, no existen desplazamientos en la posición del máximo de absorción debidos a cambios en la naturaleza del disolvente (figura 7). A pesar de que sólo se realizaron experimentos en dos disolventes diferentes, puede decirse que el efecto de la polaridad en las características de absorción de la radiación de la molécula es despreciable.

Al realizar modificaciones en el pH de la solución en que se disuelve la sustancia, así como en su polaridad, se encontró una variación significativa en el coeficiente de absorptividad molar del ibuprofenato de ibuprofeno, más no en la posición de sus máximos de absorción.

Al comparar el valor de ϵ de las soluciones en acetonitrilo con el obtenido en una mezcla acetonitrilo-amortiguador de acetatos pH 3, 0.04 M, se observa un efecto de hipocromismo ostensible, el cual puede deberse a la adición de agua al disolvente y el cambio de pH, ya que el soluto tiende a orientar las moléculas de disolvente en su proximidad para mantenerse en estado solvatado, obteniéndose de esta manera el sistema soluto-disolvente más estable. Por consiguiente, al recibir una radiación que excita a los electrones de la molécula, éstos sufren transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ en una relación cuantitativa diferente a como lo hacían en presencia del disolvente puro, la cual se ve condicionada debido a que los núcleos atómicos no cambian de posición (efecto Franck-Condon), ya que son más pesados que los electrones y requieren una mayor cantidad de energía para cambiar su orientación⁶⁰. Como una consecuencia de ello, la cantidad de energía necesaria para llevar a cabo la transición $\pi \rightarrow \pi^*$ es menor, con lo que la absorbancia de la muestra disminuye y se acompaña, generalmente, con un desplazamiento batocrómico en cuanto a la posición del máximo de absorción de la molécula, el cual es difícil de observar, ya sea debido a la gran amplitud del mismo (ver figura 7), o a la competencia que se origina por el desplazamiento hipsocrómico del máximo debido al aumento de energía necesario para llevar a cabo las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ dentro de la molécula⁶⁰. Por otra parte, el aumento en la polaridad y la variación de pH de las soluciones del compuesto en sistemas conteniendo metanol parecen tener un efecto contrario (al verse incrementada la intensidad de la absorción), lo cual puede explicarse también a través del efecto Franck-Condon pero, en este caso, el factor dominante sería el aumento en la cantidad de energía necesaria para las transiciones $n \rightarrow \pi^*$ en la molécula (el número de observaciones experimentales fue bajo debido a la baja solubilidad del ibuprofenato de ibuprofeno en la mezcla metanol-amortiguador de acetatos pH 3.5, 0.04 M).

Estas observaciones son importantes, ya que el cambio en el valor de ϵ debido al disolvente y su pH, puede tener un efecto importante en el método analítico empleado. De no considerarse esto, se correría el riesgo de afectar la precisión del método.

7.1.2 Determinación del coeficiente de partición octanol/agua (Log P) del ibuprofenato de ibuprofeno.

Como puede observarse en la tabla XIV, el ibuprofenato de ibuprofeno es un compuesto que presenta un valor de Log P de entre 5.74 y 6.37, lo que refleja, como podría presuponerse, que esta sustancia es altamente lipofílica, lo cual puede tener importantes implicaciones en sus propiedades farmacocinéticas.

El alto valor de Log P obtenido para este compuesto refleja las ventajas del uso de un método cromatográfico como el aquí implementado ya que, de haberse realizado la determinación del coeficiente de partición mediante métodos convencionales (como es el de partición en embudo), hubiera sido posible que se presentaran problemas de índole analítica (por la baja solubilidad del ibuprofenato de ibuprofeno en agua) o, posiblemente, de inestabilidad (ya que el compuesto es un éster)⁶¹. Por otra parte, al realizar la predicción matemática del valor de Log P del ibuprofenato de ibuprofeno utilizando el método propuesto por Dunn⁶², se obtiene un valor de 11.81 (tabla XLIII). Este último resultado podría estar altamente influenciado por varios factores ya que, como se ha demostrado experimentalmente⁵⁸, no siempre existe una aditividad real en cuanto al efecto de los sustituyentes en el valor de Log P. Por lo anterior, el método aquí empleado permitió predecir adecuadamente el comportamiento de partición octanol/agua de varias moléculas, cuyos valores de Log P fueron determinados utilizando métodos convencionales, por lo que esta técnica brinda resultados confiables, como ya se ha demostrado en numerosos trabajos⁵⁸⁻⁶³.

Tabla XLIII. Predicción matemática del valor de Log P del ibuprofenato de ibuprofeno, utilizando el método propuesto por Dunn⁶².

Sustituyente.	Número de veces que se repite en la molécula.	Valor unitario por efecto del sustituyente.	Contribución total por el efecto del sustituyente en el valor de Log P.
H	36	0.19	6.84
CH ₃	6	0.70	4.20
CH ₂	3	0.52	1.56
CH	4	0.44	1.76
C ₆ H ₆	2	1.73	3.46
O	2	-1.54	-3.08
COO	1	-1.24	-1.24
CO	-1.69	-1.69	-1.69
Valor de Log P predicho.			11.81

El valor de coeficiente de partición obtenido experimentalmente parece ser el correcto, ya que la molécula no presenta grupos ionizables o con un alto momento dipolar, por lo que se podría suponer que se comportara como un compuesto hidrofílico. El valor de Log P obtenido, indica que el compuesto es de 10^5 a 10^6 veces más soluble en octanol que en medios acuosos, aunque hay que considerar que varios autores⁴²⁻⁴³ han mencionado la posibilidad de sobrestimar el valor de Log P utilizando esta técnica, debido a que, en ella, se presupone que el único factor determinante en el valor de Log P, es la variación en el porcentaje de agua en la fase móvil, no existiendo un efecto significativo por la interacción soluto-fase estacionaria; para los ésteres, se ha observado que existen fuertes interacciones fase estacionaria-soluto, lo que provoca una sobreestimación en el valor de Log K', con la subsecuente sobreestimación del valor de Log K₀ y, por consiguiente, del Log P. A partir de lo anterior, sería necesario considerar una leve disminución en el valor de Log P determinado, aunque puede suponerse que el valor real estará dentro de los límites del intervalo de confianza para la regresión de Log K₀ vs. Log P.

Resulta interesante comparar los valores de Log D para el ibuprofeno (de entre 2.0 y 4.0^{6,7}) con el Log P obtenido para el ibuprofenato de ibuprofílo. La esterificación del grupo carboxilo de la molécula provoca que: 1) se pierda la parte ionizable del ibuprofeno y 2) aumente el tamaño de la cadena correspondiente al ácido propiónico. Lo anterior da lugar a una disminución drástica en la hidrofílicidad del ibuprofenato de ibuprofílo.

Al comparar los valores de Log P de otros candidatos a profármacos del ibuprofeno (tabla IV)⁶ con el del Ibuprofenato de ibuprofílo, se observa que este último tiene, en general, un valor de Log P que duplica al de los otros compuestos (los cuales están entre 2.3 y 3.8). La diferencia puede estribar en que el ibuprofenato de ibuprofílo es una molécula mucho más voluminosa y casi plana, lo cual ocasiona, posiblemente, que su solvatación sea aún más difícil en comparación con los otros compuestos. Los compuestos IV, VI, VII y VIII, derivados de alcoholes ramificados, tienen valores de Log P ligeramente más altos que los del ibuprofeno (de entre 2.3 y 3.0). Por otra parte, los compuestos X, XI y XII, derivados de alcoholes de 14, 16 y 18 átomos de carbono, presentan los valores de Log P más altos (3.55 a 3.8), lo que indica que el aumento en el valor de Log P se debe principalmente al incremento en el número de átomos de carbono enlazados en el grupo éster y, en cierta medida, al incremento en la ramificación de la misma, lo cual concuerda en cierta medida con la lipofílicidad encontrada para el ibuprofenato de ibuprofílo, ya que el alcohol con el que se esterificó al ibuprofeno (el alcohol ibuprofílico o ibuprofol) es un compuesto que contiene 13 átomos de carbono en su estructura lo cual, junto con su gran tamaño, impide una libre hidratación del éster, lo que lo hace más liposoluble. Cabe aclarar que la comparación entre el valor de Log P obtenido para el ibuprofenato de ibuprofílo en este estudio y el de los otros candidatos a profármacos reportados ha de realizarse con ciertas reservas, debido a que existen importantes diferencias metodológicas entre esta determinación y las otras, siendo que las previamente reportadas se realizaron utilizando una técnica poco conveniente para el tipo de compuestos estudiados (la del "matraz agitado").

7.2 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en mezclas acuosas.

7.2.1 Desarrollo del método analítico para cuantificar ibuprofeno, ibuprofeno e ibuprofenato de ibuprofeno en mezclas acuosas.

El desarrollo de un método analítico que permitiera cuantificar a los tres analitos de interés en mezclas acuosas se realizó mediante el uso de una estrategia fundamentada en el diseño experimental y el análisis inmediato de la información que brindaba cada uno de los experimentos. Las variables de respuesta más importantes fueron la resolución del par crítico ibuprofeno-ibuprofeno (se fijó como mínimo un valor de 1.6) y el tiempo de elución del ibuprofenato de ibuprofeno (el cual debía ser menor a 15 minutos) ya que, estos parámetros, serían los determinantes de la precisión de los resultados analíticos y del gasto de tiempo y recursos para el análisis de las numerosas muestras generadas a partir de este estudio

En un inicio, se planteó la posibilidad de obtener resultados adecuados mediante la elución isocrática de la mezcla con sistemas metanol-amortiguador de acetatos pH 2.8 o acetonitrilo-amortiguador de acetatos pH 2.8. Dado que con esta metodología la resolución del par crítico era extremadamente baja, además de que los tiempos de corrida eran exageradamente altos fue imposible obtener las respuestas necesarias.

A partir de los resultados anteriores, se decidió continuar el desarrollo utilizando elución por gradientes. En una primera fase, se realizó la elución utilizando un solo gradiente durante toda la corrida, más los resultados en cuanto a la resolución del par crítico ibuprofeno-ibuprofeno no fueron los más adecuados. La mejora en la resolución del par crítico y la disminución del tiempo de retención del ibuprofenato de ibuprofeno se logró con el conocimiento obtenido acerca de que la resolución entre analitos en una elución por gradiente dependía del valor del factor de capacidad promedio para éstos (K), es decir, a mayor valor de K , mayor resolución. Este valor, podía aumentarse aumentando la duración del gradiente (lo cual no era adecuado, debido al aumento resultante en el tiempo de retención del ibuprofenato de ibuprofeno) o disminuyendo la velocidad de gradiente (es decir, menor % de cambio en contenido de disolvente orgánico en la

mezcla con respecto al tiempo). Por lo anterior, se optó por la segunda posibilidad, llevando a cabo experimentos en los que se consideró un "doble gradiente" de elución, en el cual se tenía un cambio lento de % de disolvente orgánico al inicio, seguido por un cambio veloz para eluir al profármaco.

Con el aumento de pH del amortiguador de la fase móvil de 2.8 a 4.0, se logró obtener la mayor resolución del par crítico, además de que disminuyó ligeramente el tiempo de retención del ibuprofenato de ibuprofeno. El aumento en la resolución fue consecuencia del aumento en el porcentaje de ibuprofeno disociado, por lo que su tiempo de retención disminuyó, a la vez que el tiempo de retención del ibuprofeno aumentó debido a que la proporción de alcohol protonado presente en la mezcla era menor. Como resultado de este desarrollo, se obtuvieron cromatogramas del tipo del presentado en la figura 8, donde se observa que los analitos pueden cuantificarse en tiempos cortos con una buena resolución.

7.2.2 Validación del método analítico para cuantificar ibuprofeno, ibuprofeno e ibuprofenato de ibuprofeno en muestras obtenidas a partir de medios acuosos.

El método analítico desarrollado se validó de acuerdo con los criterios internacionales establecidos en diferentes referencias^{55, 64-65}.

En lo referente a la linealidad del sistema y del método, se observó que los parámetros obtenidos después de cuantificar muestras preparadas en fase móvil o en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 0.02 M eran equivalentes. Como se puede observar en las gráficas 4-6 y en la tabla XVI, el sistema y el método son lineales para los tres analitos en un intervalo de concentración de 5 a 80 µg/mL ya que el valor de coeficiente de determinación fue mayor a 0.98, la pendiente fue significativamente diferente de cero, y el intercepto no fue significativamente diferente de cero⁵⁵.

El sistema también fue preciso en el nivel de 50 µg/mL, ya que el coeficiente de variación fue menor a 2% para todos los analitos⁵⁵. Esta misma determinación, sirvió para demostrar que la muestra analítica es estable en el cromatógrafo durante 24 horas.

El método fue exacto en el intervalo de concentraciones de 5 a 80 $\mu\text{g/mL}$, ya que los valores de recobro de los tres analitos, en todos los niveles, fueron de 98 a 102%, con coeficientes de variación menores a 2% (tabla XVIII)⁶⁴⁻⁶⁵.

A partir de los datos de las tablas XIX a XXI, se demostró que el método era repetible en todos los niveles de concentración estudiados, ya que los valores de coeficiente de variación fueron menores al 2%⁶⁴⁻⁶⁵.

7.2.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofílo en soluciones acuosas con diferentes valores de pH.

El ibuprofenato de ibuprofílo fue estable en los diferentes valores de pH estudiados (pH 1, 3, 5, 7 o 9), lo cual puede explicarse a partir del conocimiento del alto coeficiente de partición octanol/agua determinado para el ibuprofenato de ibuprofílo, ya que su alta lipofílicidad impedirá que éste se mezcle (o disuelva) con el medio acuoso, por lo que la probabilidad de que las moléculas del mismo entren en contacto con los iones hidronio (H_3O^+ , presentes en medio ácido) o hidroxilo (HO^- presentes en medio alcalino) será casi nula, impidiendo entonces que la reacción transcurra de acuerdo con los mecanismos de hidrólisis comunes. Es posible que, de haber estado presente un agente que permitiera una emulsificación más fina del ibuprofenato de ibuprofílo, la reacción se hubiera verificado, ya que se aumentaría el contacto de las moléculas del mismo con el medio. Es necesario que, en investigaciones futuras, se considere el efecto de un emulsificante en la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofílo en medios acuosos.

La gráfica 23 muestra la comparación de los resultados de hidrólisis en medios acuosos obtenidos en este estudio y los observados con algunos de los compuestos sintetizados por Bansal *et. al.*⁶. En esta gráfica, se correlacionaron los valores de tiempo de vida media de hidrólisis en solución acuosa de pH 7.4 para 14 de los profármacos obtenidos por Bansal y sus valores de Log P (serie 1), encontrándose que existe una cierta correlación ($r^2 = 0.65$) entre la vida media de hidrólisis ($t_{1/2}$) y el valor de Log P, la cual puede expresarse también con el siguiente modelo

A partir de los resultados anteriores, se procedió a realizar una optimización del método de extracción (metodología, tabla VIII). En el caso del ibuprofeno e ibuprofol, los recobros fueron cercanos al 100% en todos los experimentos realizados, además de que se observó un bajo valor de % de coeficiente de variación para los mismos. Los recobros se debieron a la afinidad ambas sustancias por el medio preponderantemente orgánico, además de que la adición de ácido al líquido extractor pudo provocar que los analitos se desplazaran de sus sitios de unión a las proteínas. Finalmente, se utilizó para la extracción la adición a las muestras de 250 μl de una solución de metanol-acetonitrilo (99:1) conteniendo naproxeno (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), seguida por la agitación en vortex durante 20 segundos. Lo anterior, debido a que con este método los recobros fueron altos, y la dilución de la muestra fue mínima.

7.3.2 Validación del método analítico por CLAR para cuantificar ibuprofeno e ibuprofol en plasma de rata y en soluciones de esterasas de hígado de cerdo.

El método analítico fue selectivo, de acuerdo con lo mostrado en las figuras 12 y 13, ya que las sustancias endógenas del plasma y otros posibles contaminantes (precursores de la síntesis, productos de degradación, etc.) fueron resueltos de las señales del ibuprofeno y el ibuprofol^{55, 66}

El método analítico para cuantificar ibuprofeno e ibuprofol a partir de plasma de rata fue lineal, exacto y preciso en el intervalo de concentraciones de 2 a 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para ambos analitos, ya que:

- 1) El coeficiente de determinación fue mayor a 0.98, la pendiente fue significativamente mayor que cero y la ordenada al origen no significativamente diferente de cero⁶⁵ (sección 6.3.2).
- 2) En las gráficas 12 y 13, y en las tablas XXV y XXVI se mostró que existía una alta correlación entre los parámetros de cantidad recuperada vs. cantidad adicionada para ambos analitos. En las mismas tablas se observó que los promedios de porcentaje de recobro para ambos analitos estuvieron comprendidos dentro del intervalo de 85 a 115% en ambos días de la validación, además de que el coeficiente de variación en todos estos niveles fue menor al

15%. La única excepción fue el nivel de 1 $\mu\text{g/mL}$, en el cual se obtuvo, de manera general, una mayor variación en los recobros. A partir de lo anterior, y con base en los criterios de validación internacionales^{55, 65}, se demostró que el método analítico es exacto en el intervalo de concentraciones de 2 a 80 $\mu\text{g/mL}$.

- 3) Los coeficientes de variación intradías en todos los niveles fueron menores al 15%⁵⁵. Además, el método es repetible por un mismo analista en dos días diferentes, ya que los intervalos de confianza al 95% para la variable de respuesta (relación de alturas analito/estándar interno) se traslapan en cada uno de los niveles de concentración⁶⁵ al comparar entre ambos días de validación.

A partir de los resultados de linealidad, exactitud y precisión del método analítico, el límite de cuantificación del mismo fue de 2 $\mu\text{g/mL}$. Por su parte, el límite de detección fue de 1 $\mu\text{g/mL}$.^{55, 65}

Las muestras conteniendo ibuprofeno e ibuprofeno fueron estables durante 25 horas en el cromatógrafo y durante 8 días en congelación, de acuerdo con los resultados expresados en las tablas XXVII y XXVIII y las gráficas 14 y 15, donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras cuando éstas se cuantificaron a las 0, 5, 10, 15, 20 y 25 horas, así como a los 8 días después de estar en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En lo que respecta a la validación cruzada del método analítico, se encontró de acuerdo con lo expuesto en las tablas XXXI y XXXII, que el fue preciso y selectivo para la cuantificación de ibuprofeno e ibuprofeno a partir de la solución de esterasas, y que esta precisión era equivalente a la demostrada para las muestras en plasma.

7.3.3 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en matrices biológicas.

7.3.3.1 Cuantificación del contenido proteico del plasma de rata y de la solución de esterasa de hígado de cerdo.

La gráfica 19 demostró que el método utilizado para la cuantificación de proteínas en el plasma y en la solución de esterasa de hígado de cerdo brindaba resultados adecuados en el intervalo de concentraciones esperado, ya que fue lineal y presentó baja variabilidad. No se llevó a cabo una validación formal del método, debido a que este es un método rutinario en el área de bioquímica, y su robustez y confiabilidad han sido ampliamente demostradas⁵⁷

Los valores reportados para el contenido proteico de ambas matrices biológicas aparecen en la tabla XLII. En este caso, se observa que el plasma de rata parece contener una cantidad de proteínas (12.18 ± 0.18 mg/dL) similar a la reportada para el plasma humano (8-15 g/dL), la cual, a su vez, fue menor a la cantidad de proteínas presente en la solución de esterasa (32.68 ± 0.41 mg/dL)

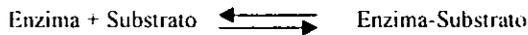
7.3.3.2 Determinación de la cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en plasma de rata.

A partir de los resultados de la gráfica 17 se observó que, en las tres concentraciones molares de profármaco probadas (5×10^{-5} , 1×10^{-4} y 2×10^{-4} M), la hidrólisis se llevó a cabo de manera muy rápida. Al analizar los datos crudos se encontró que, conforme aumentó la concentración del sustrato, la velocidad de la hidrólisis se vio incrementada. Por ejemplo, para la concentración más baja, la reacción había transcurrido en casi un 100% a los 90 minutos, para la concentración intermedia este tiempo se acortó a casi 40 minutos y, para la concentración más alta, la reacción se completó a los 20 minutos. Este es un comportamiento característico de las reacciones bioquímicas mediadas por enzimas⁶⁷, en las que la velocidad de la reacción aumenta conforme se incrementa la concentración del sustrato, hasta alcanzar un punto en el que existen cambios poco significativos en la velocidad de reacción aún cuando el aumento en la

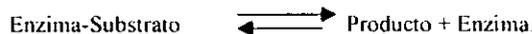
concentración del sustrato sea excesivo; en este punto, se dice que se ha alcanzado la velocidad máxima de la reacción (V_{max}), ya que el sistema enzimático está saturado con el sustrato, y no puede actuar más aprisa.

La cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno para cada una de las concentraciones probadas, se ajusta a un modelo de primer orden (tabla XLIV) Lo anterior se puede explicar así:

- 1) El valor de la constante de velocidad de hidrólisis aumenta conforme se incrementa la concentración del sustrato, lo cual se observó ya con los datos crudos
- 2) Lo anterior indica que el sistema enzimático todavía no se ha saturado, y el proceso cinético global de hidrólisis transcurre en una primera etapa mediante la formación reversible de un complejo enzima sustrato (figura 16):



Una vez que esto ocurre, el complejo se destruye mediante una segunda reacción reversible, que es la más lenta, y origina el producto de la reacción dejando libre a la enzima:



Como la segunda reacción es la etapa limitante, la velocidad global del proceso es proporcional a la concentración del complejo enzima-sustrato. Si no se ha saturado el sistema, la concentración del complejo depende, a su vez, de la concentración de sustrato presente, lo que explica que la cinética se ajuste a un modelo de primer orden para cada una de las concentraciones de ibuprofenato de ibuprofeno probadas, donde el cambio de concentración de sustrato se define por la ecuación:

$$-dS/dt = K_S$$

Tabla XLIV. Ajuste de los datos de hidrólisis en plasma de rata del ibuprofenato de ibuprofeno a modelos de orden cero o de primer orden.

Solución 5×10^{-5} M de ibuprofenato de ibuprofeno. Datos de ibuprofeno.

Modelo	Intercepto	Error estándar de intercepto	Pendiente	Error estándar de pendiente	r^2 .
Orden cero	3.7667 $\times 10^{-5}$ moles/L	0.9928 $\times 10^{-5}$ moles	-3.842 Mol/L/min	2.3733 Mol/L/min	0.7285
Primer orden.	-10.1691	0.2502	-0.0416 min^{-1}	0.0059 min^{-1}	0.9237

Solución 5×10^{-5} M de ibuprofenato de ibuprofeno. Datos de ibuprofeno.

Modelo	Intercepto	Error estándar de intercepto	Pendiente	Error estándar de pendiente	r^2 .
Orden cero	3.7945 $\times 10^{-5}$ moles/L	0.9717 $\times 10^{-5}$ moles/L	-7.647 Mol/L/min	2.3233 Mol/L/min	0.7300
Primer orden.	-10.1834	0.2378	-0.0383 min^{-1}	0.0056	0.9187

Solución 1×10^{-4} M de ibuprofenato de ibuprofeno. Datos de ibuprofeno.

Modelo	Intercepto	Error estándar de intercepto	Pendiente	Error estándar de pendiente	r^2 .
Orden cero	7.9724 $\times 10^{-5}$ moles/L	1.6589 $\times 10^{-5}$ moles/L	-14.876 Mol/L/min	3.9656 Mol/L/min	0.7787
Primer orden.	-9.3390	0.2753	-0.0379 min^{-1}	0.0065	0.8924

Solución 1×10^{-4} M de ibuprofenato de ibuprofeno. Datos de ibuprofeno.

Modelo	Intercepto	Error estándar de intercepto	Pendiente	Error estándar de pendiente	r^2 .
Orden cero	8.1559 $\times 10^{-5}$ moles/L	1.8773 $\times 10^{-5}$ moles/L	-17.697 Mol/L/min	5.9365 Mol/L/min	0.7476
Primer orden.	-9.4225	0.2237	-0.0360 min^{-1}	0.0071	0.8963

Solución 2×10^{-4} M de ibuprofenato de ibuprofeno. Datos de ibuprofeno.

Modelo	Intercepto	Error estándar de intercepto	Pendiente	Error estándar de pendiente	r^2 .
Orden cero	17.9555 $\times 10^{-5}$ moles/L	5.9898 $\times 10^{-5}$ moles/L	-97.372 Mol/L/min	4.2354 Mol/L/min	0.8409
Primer orden.	-8.5864	0.2181	-0.1546 min^{-1}	0.0154	0.9901

Solución 2×10^{-4} M de ibuprofenato de ibuprofeno. Datos de ibuprofeno.

Modelo	Intercepto	Error estándar de intercepto	Pendiente	Error estándar de pendiente	r^2 .
Orden cero	17.9897 $\times 10^{-5}$ moles/L	5.5241 $\times 10^{-5}$ moles/L	-98.823 Mol/L/min	6.2541 Mol/L/min	0.8312
Primer orden.	-8.1254	0.2312	-0.1424 min^{-1}	0.0094	0.9898

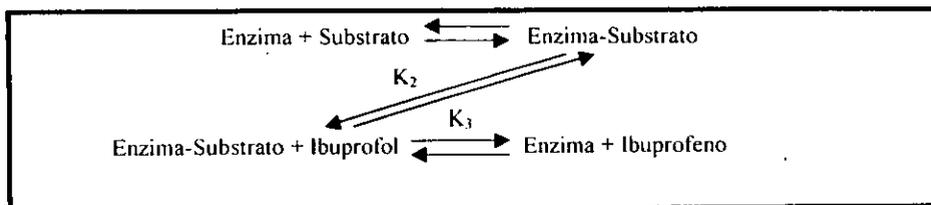


Figura 16. Esquema de la secuencia de reacciones probables en la hidrólisis enzimática del ibuprofenato de ibuprofílo.

Por otra parte, dado que no se alcanzó la saturación del sistema enzimático, no fue posible realizar un correcto cálculo de los parámetros para el modelo clásico de Michaelis- Menten. Solamente se puede suponer que, para llegar a la saturación del sistema *in vitro*, se necesitaría una concentración de sustrato muy alta, siendo mayor ésta en un sistema vivo

Al comparar los valores de tiempo de vida media de hidrólisis de los profármacos sintetizados por Bansal *et. al.*⁶ y Murtha *et. al.*⁵⁰ (tabla IV) con el obtenido aquí para el ibuprofenato de ibuprofílo, se observa que éste último presenta una velocidad de degradación muy superior a la de los compuestos mencionados. Para los compuestos de Bansal, la velocidad de hidrólisis enzimática disminuye conforme aumenta el tamaño del alcohol con que se esterifica al ibuprofeno pero, para el colesteril ibuprofeno, la velocidad de hidrólisis es mucho mayor, comparada con la de los profármacos derivados de alcoholes lineales. Estos resultados podrían llevar a suponer que el tamaño del alcohol enlazado al ibuprofeno no es el determinante de la velocidad de hidrólisis en el plasma sino que, posiblemente, el factor determinante sea la planaridad de la molécula. Esa planaridad puede favorecer el ataque de los grupos nucleófilos de la enzima (principalmente los restos de serina⁶⁸) sobre el sustrato, aumentando la velocidad de hidrólisis.

7.3.3.3 Determinación de la cinética de hidrólisis enzimática del ibuprofenato de ibuprofílo en presencia de solución de esterasas de hígado de cerdo.

Si se comparan los datos de la gráfica 18 y las tablas XXXVII a XXXIX con los obtenidos de la hidrólisis en plasma de rata al 80%, se observa que la hidrólisis en presencia de esterasas

porcinas hepáticas transcurre a una velocidad mucho menor, lo cual parece contradictorio, sin embargo, este fenómeno es explicable a partir de las siguientes observaciones:

- 1) El tipo de esterases de hígado de cerdo utilizadas corresponde a la clasificación bioquímica EC 3.1.1.1, o B-esterasas. En el plasma de rata no solamente se encuentran esterases B, sino también están presentes, en gran cantidad, esterases tipo A (EC 3.1.1.2)⁷⁰.
- 2) Se ha demostrado que existen importantes diferencias en cuanto a la actividad de una misma enzima presente en los tejidos de diferentes animales (por ejemplo, las esterases de hígado de cerdo hidrolizan algunos sustratos a una velocidad menor que las esterases de hígado de rata)⁶⁹.
- 3) En la solución de esterasa de hígado de cerdo puede darse el caso de que el profármaco sea menos soluble que en el plasma, pero la reacción de hidrólisis transcurre debido a que la eficiencia catalítica de las esterases de hígado de cerdo es 10^6 veces mayor que la de los grupos hidroxilo en solución de pH 7⁷⁰.
- 4) Se ha reportado que la albúmina sérica muestra actividad tipo esterasa con algunos sustratos⁷³ por lo que la presencia de albúmina en plasma, puede catalizar la reacción de hidrólisis.

En ninguna de las concentraciones de sustrato se alcanzó un proceso completo de formación de ibuprofeno e ibuprofeno. A pesar de ello, se observó que, conforme aumentó la concentración de sustrato, se incrementó la velocidad de la reacción enzimática, aunque es difícil describir los datos experimentales mediante un modelo de primer orden en la hidrólisis, a diferencia de cuando el proceso transcurre en presencia de plasma de rata (tabla XLV). Además, se observó que la cinética de aparición del ibuprofenato de ibuprofeno fue, en las concentraciones baja e intermedia, casi el doble de la velocidad de formación del ibuprofeno. Si se regresa al esquema planteado en la figura 16, se observa entonces que, en este caso, el valor de K_2 es mucho mayor que el de K_1 , lo que hace más complejo el modelo de cinética de hidrólisis.

Tabla XLV. Cinética de hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno en plasma de rata.

Ajuste a modelos de orden cero o de primer orden.

Solución 5×10^{-5} M de ibuprofenato de ibuprofeno. Datos de ibuprofeno.

Modelo	Intercepto	Error estándar de intercepto	Pendiente	Error estándar de pendiente	r^2 .
Orden cero	4.0873 $\times 10^5$ moles/L	0.4916 $\times 10^5$ moles/L	-1.5197 Mol/L/min	6.3739 Mol/L/min	0.4863
Primer orden.	-10.1192	0.1186	-0.0039 min^{-1}	0.0015 min^{-1}	0.5232

Solución 5×10^{-5} M de ibuprofenato de ibuprofeno. Datos de ibuprofeno.

Modelo	Intercepto	Error estándar de intercepto	Pendiente	Error estándar de pendiente	r^2 .
Orden cero	3.3089 $\times 10^5$ moles/L	0.8678 $\times 10^5$ moles/L	-2.2330 Mol/L/min	1.1251 Mol/L/min	0.3963
Primer orden.	-10.3835	0.2479	-0.0073 min^{-1}	0.0032	0.4884

Solución 1×10^{-4} M de ibuprofenato de ibuprofeno. Datos de ibuprofeno.

Modelo	Intercepto	Error estándar de intercepto	Pendiente	Error estándar de pendiente	r^2 .
Orden cero	8.3534 $\times 10^5$ moles/L	0.8581 $\times 10^5$ moles/L	-3.2267 Mol/L/min	1.1126 Mol/L/min	0.5836
Primer orden.	-9.3990	0.0992	-0.0042 min^{-1}	0.0013	0.6437

Solución 1×10^{-4} M de ibuprofenato de ibuprofeno. Datos de ibuprofeno.

Modelo	Intercepto	Error estándar de intercepto	Pendiente	Error estándar de pendiente	r^2 .
Orden cero	8.2245 $\times 10^5$ moles/L	1.0873 $\times 10^5$ moles/L	-5.2418 Mol/L/min	2.0548 Mol/L/min	0.5854
Primer orden.	-9.4244	0.1313	-0.0070 min^{-1}	0.0025	0.6171

Solución 2×10^{-4} M de ibuprofenato de ibuprofeno. Datos de ibuprofeno.

Modelo	Intercepto	Error estándar de intercepto	Pendiente	Error estándar de pendiente	r^2 .
Orden cero	12.9574 $\times 10^5$ moles/L	3.6685 $\times 10^5$ moles/L	-10.0569 Mol/L/min	4.7558 Mol/L/min	0.4266
Primer orden.	-9.0222	0.2794	-0.0092 min^{-1}	0.0036	0.5183

Solución 2×10^{-4} M de ibuprofenato de ibuprofeno. Datos de ibuprofeno.

Modelo	Intercepto	Error estándar de intercepto	Pendiente	Error estándar de pendiente	r^2 .
Orden cero	128774 $\times 10^5$ moles/L	3.6658 $\times 10^5$ moles/L	-9.8437 Mol/L/min	4.7523 Mol/L/min	0.4169
Primer orden.	-9.0307	0.2713	-0.0088 min^{-1}	0.0035	0.5142

Como se observó en la gráfica 18, los valores de concentración de sustrato probados no permitieron alcanzar la saturación del sistema, por lo que no se pudo determinar, de nueva cuenta, el valor de las constantes para el modelo de Michaelis-Menten.

Cabe mencionar que, hasta la fecha, este es el único estudio en donde se reporta la cinética de hidrólisis de profármacos del ibuprofeno en presencia de diferentes sistemas enzimáticos.

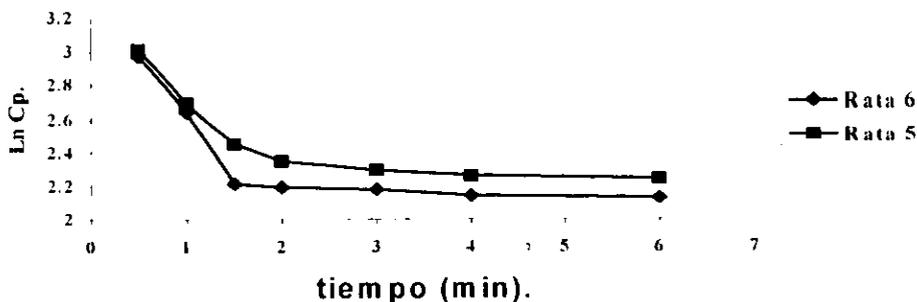
7.4 Estudios de la farmacocinética del ibuprofeno liberado a partir del ibuprofenato de ibuprofilo en ratas.

En el caso del estudio preliminar de la farmacocinética del ibuprofeno liberado a partir de una dosis oral de 99.22 mg de ibuprofenato de ibuprofilo por kilogramo de peso de la rata, no se observaron claramente la o las fases que ilustran la disposición del ibuprofeno y, por lo tanto, fue imposible realizar algún tipo de modelaje con estos datos. Además de esto, se observó una gran variabilidad interindividual en los perfiles de concentración plasmática del fármaco (tabla XI.) Los altos niveles y la variabilidad pudieron deberse a que el profármaco presentó diferentes velocidades de hidrólisis en cada animal, lo cual trajo como consecuencia una diferente velocidad de liberación del principio activo en el plasma. Por otra parte, existe la posibilidad de que la cinética de hidrólisis del profármaco absorbido no sea en realidad la que determine la farmacocinética del ibuprofeno liberado a partir de éste, sino que el paso que está condicionando al proceso sea la velocidad de absorción del profármaco. A pesar de que no se conoce el proceso mediante el cual se pueda absorber el ibuprofenato de ibuprofilo, ni su principal sitio de absorción, es posible que por efecto de la alta dosis administrada (equivalente a 50 mg de ibuprofeno/Kg), se tenga un problema de saturación en los sitios de absorción y, por consiguiente, una alteración de la farmacocinética de una manera dosis dependiente

Con la finalidad de estimar si el paso limitante en la farmacocinética del ibuprofeno liberado a partir del ibuprofenato de ibuprofilo *in vivo* podía ser la cinética de hidrólisis del profármaco, se decidió realizar un estudio en el cual se analizaran los perfiles plasmáticos del fármaco obtenidos en dos ratas después de la administración por vía intravenosa de una emulsión,

en dosis de 18.02 mg de ibuprofenato de ibuprofeno/Kg de peso de la rata. Se observó (en la tabla XLI y la gráfica 20) una cinética compuesta por dos fases: en la primera, el ibuprofeno se distribuyó de una manera rápida (en 1.5 horas, aproximadamente), para pasar a una fase de eliminación muy lenta. La transformación logarítmica de los datos demuestra los dos son procesos de primer orden (gráfica 24), sin que esto implique que el ibuprofeno liberado a partir del profármaco siga necesariamente una farmacocinética bicompartimental.

Gráfica 24. Perfiles de Ln de la concentración plasmática vs. tiempo para el Ibuprofeno liberado a partir de una dosis intravenosa de 18.02 mg de ibuprofenato de ibuprofeno/Kg



En la gráfica 24 no se observa un aumento en la concentración de ibuprofeno hasta alcanzar un máximo en el valor de concentración plasmática del mismo (como sería de esperarse para un fármaco que es liberado *in vivo*) sino que solamente se nota una porción de la fase de disposición del fármaco. Estos resultados indican que la hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno *in vivo* ocurre de manera extremadamente rápida debido a que existe gran disponibilidad de carboxilesterasas inespecíficas no solo en la sangre, sino también en otros tejidos. Por lo anterior, es posible considerar que la farmacocinética del ibuprofeno derivado a partir del profármaco no depende en gran medida de la velocidad de hidrólisis del mismo, sino de otros factores.

Al calcular el valor de la constante de velocidad de la segunda fase de los datos de la gráfica 24 por el método de mínimos cuadrados, se encontró que éste es muy bajo, lo que puede implicar que la eliminación del ibuprofeno es lenta a partir del organismo de la rata. Si se compara este valor con el obtenido por Satterwhite *et.al.*³⁶ para la fase de eliminación del ibuprofeno (Tabla XLVI) se observa que, a partir del profármaco, la eliminación es mucho más lenta para el ibuprofeno. La explicación del retardo en la eliminación del ibuprofeno podría deberse a que el fármaco tuviera un elevado valor de volumen de distribución tras ser administrado como profármaco.

Tabla XLVI. Parámetros farmacocinéticos calculados para el ibuprofeno, tras la administración de una dosis de 18.02 mg/Kg de ibuprofenato de ibuprofilo por vía intravenosa.

Parámetro	Promedio tras administrar IbIb	Satterwhite <i>et. al.</i> ³⁶
ABC ₀₋₁ (µg x h/ml)	2969.8675	---
α (h ⁻¹)	1.5683	—
β (h ⁻¹)	0.0032	0.2977
A (µg/ml)	23.5712	---
B (µg/ml)	9.5921	---
ABC _M (µg x h ² /ml)	910237.9854	---
TMR (h)	309.4909	2.181
V _d (mL)	157.4024*	20.2315
t _{1/2 β} (h)	216.5625	2.328

*Calculado como Vd=D/(A+B).

A partir de las observaciones anteriores, resulta necesario el explicar el por que de las diferencias en distribución y eliminación del ibuprofeno tras ser administrado como fármaco puro o como profármaco. En primer término, debe recordarse que el coeficiente de distribución octanol/agua del ibuprofenato de ibuprofilo es muy alto. Ahora bien, puede suponerse que, tras la administración intravenosa del ibuprofenato de ibuprofilo la aparición del ibuprofeno en plasma está determinada por un modelo farmacocinético similar al mostrado en la figura 17, en donde la

dosis intravenosa del profármaco se deposita directamente en sangre, y una porción del profármaco pasa a un compartimiento periférico poco irrigado (el cual podría tener dentro de sus componentes al tejido adiposo) mediante un proceso de primer orden cuya velocidad está limitada por la constante K_{12}^P . Ahora bien, el ibuprofeno puede aparecer en plasma mediante la hidrólisis del profármaco en el compartimiento central, cuya velocidad está determinada por la constante K_{d1} , además de que puede aparecer en el compartimiento periférico por la hidrólisis del profármaco a una velocidad determinada por el valor de K_{d2} . Una vez liberado el fármaco, éste continúa distribuyéndose en los dos compartimientos, y es eliminado a partir del central, mediante un proceso de primer orden delimitado en su velocidad por el valor de K_{10} .

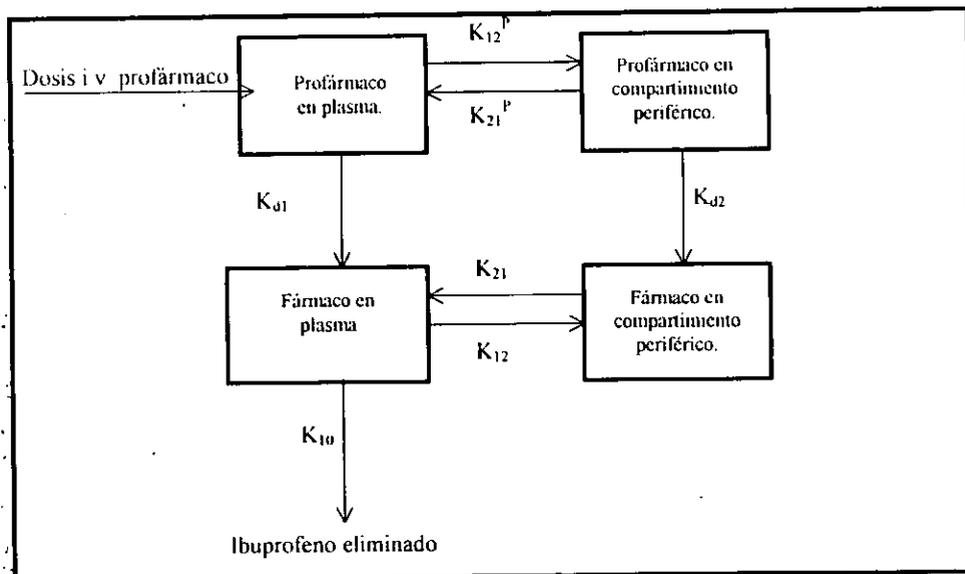


Figura 17. Modelo teórico de la farmacocinética del ibuprofeno tras su administración intravenosa como ibuprofenato de ibuprofeno.

Si este modelo teórico fuera cierto, sería posible que, ya que se sabe que la cinética de hidrólisis del profármaco en plasma es extremadamente rápida, el valor de K_{d1} no fuera limitante del proceso. Además, debido a la alta lipofiliidad del ibuprofenato de ibuprofeno, puede pensarse que éste sea distribuido casi de inmediato al compartimiento periférico, en donde podría depositarse en tejidos con alto contenido graso, de donde se liberaría al plasma de una manera

muy lenta, por lo que el valor de K_{21}^P sería casi de cero, dando como resultado que la cantidad inicial de profármaco en plasma fuera muy limitada. Finalmente, conociendo que las carboxilesterasas inespecíficas se encuentran altamente distribuidas en todos los tejidos, aún en órganos que tienen un alto contenido graso (tales como los testículos, sistema nervioso central y epitelio del intestino delgado de la rata⁶⁸), podría pensarse que el valor de K_{d2} sea bajo, no equiparable al de K_{d1} , por lo que los tejidos con alto contenido graso actuarían como un depósito del profármaco, a partir del cual el ibuprofeno sería liberado lentamente, lo que haría que el paso limitante de la farmacocinética del ibuprofeno liberado a partir del profármaco fuera el transporte del fármaco del compartimiento periférico al central determinado por el valor de K_{21} , ocasionando que la eliminación del mismo (K_{10}) sea lenta. Esta hipótesis puede apoyarse en las observaciones de Wechter *et. al.*²⁷ y Williams *et. al.*⁷⁵, quienes describen algo similar a lo que podría ocurrir aquí: el R-ibuprofeno forma ésteres con el glicerol, los cuales se depositan en tejido adiposo, liberando al ibuprofeno de una manera muy lenta, por lo que se encuentran concentraciones de hasta 15 μg de fármaco/g de grasa a las 116 horas después de su administración intraperitoneal.

Lo anteriormente expuesto es solamente una teoría para explicar el largo tiempo que tarda en eliminarse el ibuprofeno liberado a partir de una dosis intravenosa de ibuprofenato de ibuprofeno. No es posible corroborar el ajuste al modelo de la figura 17 ya que los datos son escasos. Sin embargo, puede asegurarse que el valor obtenido para la pendiente de la segunda fase exponencial de los datos de la gráfica 24 no depende de la sensibilidad del método analítico, ya que las concentraciones plasmáticas encontradas en ese estudio están en un intervalo que no se ve afectado por los traslapes entre las respuestas analíticas encontradas para niveles adyacentes de la curva respuesta vs. concentración.

En la tabla XLII y en las gráficas 21 y 22, se mostraron los resultados de la farmacocinética del ibuprofeno liberado a partir del ibuprofenato de ibuprofeno tras su administración por vía oral en una dosis de 49.61 mg/Kg. Estos datos, fueron tratados de la siguiente manera:

- 1) Se intentó ajustar los datos a un modelo con una sola exponencial en la fase de disposición, utilizando el programa WinNonlin, versión beta 1.1⁷⁴, con el algoritmo de Gauss-Newton modificado por Levenberg y Hartley.
- 2) Se llevó a cabo un ajuste de los valores experimentales a un modelo que tiene dos exponenciales en la fase de disposición del ibuprofeno. Esto se realizó por el método de las residuales.
- 3) Se ajustaron los datos a un modelo con dos exponenciales en la fase de disposición, considerando el cálculo de un tiempo de retardo (t_{lag}) en los parámetros del modelo, utilizando ajustes no lineales con el algoritmo de Gauss-Newton, y el programa STATISTICA for Windows ver. 4.5⁷⁷.
- 4) Finalmente, se consideró el ajuste a modelos con un mayor número de exponenciales en la fase de disposición (de 3 a 4), realizando una transformación de los datos de Cp vs. tiempo a Ln Cp vs. tiempo, seguida por un análisis de mínimos cuadrados. Los parámetros calculados para cada modelo eran introducidos como iniciales en un ajuste no lineal con el algoritmo de Gauss-Newton, en el programa STATISTICA for Windows ver. 4.5⁷⁷.

Cabe aclarar que, en todos los casos, se consideró que la aparición del ibuprofeno en plasma ocurría de acuerdo con un proceso de primer orden. En la tabla XLVII, se muestran los resultados del Criterio de Información de Akaike (AIC) para todos los ajustes realizados⁷⁷. El mejor ajuste se obtiene con el modelo de residuales, que considera una fase monoexponencial de aparición del ibuprofeno en plasma, seguida por una disposición que involucra también dos exponenciales, ya que el valor de AIC es menor. Este ajuste apoya lo observado con los datos intravenosos, pero parece ser insuficiente para la explicación teórica de la farmacocinética del ibuprofeno liberado a partir del profármaco. Además, no es adecuado hacer un mayor énfasis en un ajuste a un determinado modelo, ya que los datos y el número de observaciones son pocos.

Tabla XLVII. Resultados del Criterio de Información de Akaike para todos los ajustes realizados con los datos de niveles plasmáticos del ibuprofeno tras la administración oral de una dosis de 49.2 mg/Kg de ibuprofenato de ibuprofeno.

Rata	1 exponencial	2 exponenciales	t_{lag}	3 exponenciales	4 exponenciales
1	78.2563	26.5184	40.2473	47.2561	49.0167
2	87.5211	23.0031	28.3138	39.2114	40.7602
3	69.2563	35.2896	35.7861	43.2154	44.0289
4	79.6354	29.5109	32.4703	35.8879	36.2388

En la tabla XLVIII, se muestran los resultados de los parámetros calculados, considerando que el mejor modelo es el que resulta de la aplicación del AIC, y tomando en cuenta que los datos son escasos.

Tabla LIX. Parámetros farmacocinéticos calculados para el ibuprofeno, tras la administración de una dosis de 49.2 mg/Kg de ibuprofenato de ibuprofeno por vía oral.

Parámetro	Rata 7	Rata 8	Rata 9	Rata 10	Promedio	D.E.	C.V. %
t_{max} (h)	2	1.5	2	1.5	1.75	0.29	16.50
C_{max} (µg/ml)	12.0092	8.2876	10.5171	11.2679	10.52	1.61	15.29
ABC_{0-1} (µg x h/ml)	99.2958	86.3555	118.0759	96.7808	100.13	13.21	13.20
α (h ⁻¹)	0.5604	0.5869	0.4582	0.7669	0.59	0.13	21.66
β (h ⁻¹)	0.0011	0.0004	0.0011	0.0069	0.0023	0.0029	127.78
A (µg/ml)	25.3078	18.6235	19.2564	30.6946	23.47	5.68	24.20
B (µg/ml)	2.5031	2.586	2.1495	3.4333	2.67	0.54	20.40
$ABC_{N_{0-1}}$ (µg x h ² /ml)	870.6024	862.5845	1117.8628	940.9577	948.00	118.59	12.51
$t_{1/2}$ β (h)	630	1732.5	693	100.4347	788.98	682.84	86.55

Los datos obtenidos tras el ajuste al modelo presentan una variabilidad alta, principalmente aquellos relacionados con la fase de eliminación del ibuprofeno (es decir, β , $t_{1/2}$).

de β). Es en esta fase donde se encuentra la mayor variabilidad en los datos interindividuales. Esta variación puede deberse a la dificultad que existe para llevar a cabo el ajuste logarítmico de la pendiente de eliminación, debido a que se tienen en realidad pocos puntos para caracterizarla (los cuales, además, están muy espaciados entre sí en cuanto al tiempo de la toma de las muestras)

Es necesario llevar a cabo algunas suposiciones acerca de cual es el paso que limita la velocidad de aparición del ibuprofeno en plasma. La cinética de hidrólisis del profármaco en plasma transcurre de manera rápida, por lo que es de esperarse que este proceso no sea el limitante de la velocidad de aparición de ibuprofeno en plasma. Es posible explicar el por qué del largo tiempo requerido para que se alcance C_{max} (de aproximadamente 1.75 horas) ya que, por la lipofilia del profármaco, es necesario que las micelas del mismo ingresen a través de los lacteales, pasen a la linfa, y de ahí sean distribuidas a la circulación sanguínea⁷⁸, en donde se llevará a cabo la hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofeno de manera rápida. Ahora bien, este tipo de mecanismo de absorción involucra que el ibuprofenato de ibuprofeno sea distribuido preferentemente al tejido adiposo, de donde puede liberar al fármaco mediante el proceso ya descrito en la discusión de la farmacocinética del ibuprofeno tras administración intravenosa del profármaco. Otra explicación para la baja velocidad de aparición del fármaco en sangre sería la baja solubilidad del profármaco, la cual no permitió que este se absorbiera de manera rápida.

En lo referente a la disposición del ibuprofeno tras la administración oral del profármaco, se observa que tanto α como β son aún menores que cuando se comparan con las obtenidas por la administración intravenosa del ibuprofenato de ibuprofeno. Estas observaciones apoyan, en cierta manera, la teoría de que el ibuprofenato de ibuprofeno es absorbido en la linfa, ya que el profármaco se distribuirá aún con mayor preferencia en el tejido adiposo. Ahora bien, debe considerarse que, tras la administración de esta dosis oral de profármaco, las concentraciones alcanzadas en plasma en la fase terminal del proceso son muy cercanas al límite de cuantificación del método analítico utilizado, por lo que cualquier supuesto podría no ser del todo correcto. Sin embargo, al igual que en la administración intravenosa del profármaco, se puede asumir que la farmacocinética del ibuprofeno liberado en el organismo tras la administración oral del ibuprofenato de ibuprofeno se ajustara a un modelo poliexponencial.

No fue posible utilizar un análisis modelo-independiente de los datos farmacocinéticos utilizando momentos estadísticos, debido a que las concentraciones plasmáticas alcanzadas durante la fase de eliminación nunca fueron menores a 1/10 de la máxima concentración plasmática observada, lo cual es un requisito indispensable para tener certidumbre en los resultados del análisis farmacocinético utilizando momentos estadísticos⁷⁹.

8. CONCLUSIONES.

Con base en los resultados obtenidos se encontró que:

- 1) El ibuprofenato de ibuprofeno es un compuesto altamente lipofílico, ya que su coeficiente de partición lípidos/agua está en el intervalo de 5.74 a 6.37
- 2) Es estable a la hidrólisis en medios acuosos con diferente pH
- 3) El ibuprofenato de ibuprofeno se hidroliza rápidamente en presencia de plasma de rata al 80% y en contacto con soluciones que contienen esterasas de hígado de cerdo, aunque existen diferencias significativas en cuanto a la velocidad de hidrólisis en ambos medios, lo cual puede deberse al tipo de esterasa presente en cada uno de ellos.
- 4) Los resultados preliminares obtenidos del estudio de la farmacocinética del ibuprofeno formado después de la administración intravenosa y oral del ibuprofenato de ibuprofeno en ratas Wistar macho indican que, tras la administración del nuevo compuesto, el ibuprofeno permanece durante un periodo muy prolongado en el organismo, tal vez como consecuencia de su almacenamiento en los tejidos del organismo de la rata. La información del estudio farmacocinético preliminar del ibuprofeno liberado a partir del ibuprofenato de ibuprofeno en ratas Wistar macho es muy limitada, y no permitió definir un modelo farmacocinético adecuado para el curso temporal del fármaco en el organismo.

9. RECOMENDACIONES.

- 1) Se requiere que, antes de continuar con los estudios, se realicen experimentos (en modelos biológicos adecuados) para conocer si el ibuprofenato de ibuprofílo o el ibuprofol presentan actividad farmacológica y/o tóxica.
- 2) Es necesario desarrollar un método analítico que permita la adecuada cuantificación del ibuprofenato de ibuprofílo en el plasma de las ratas e, inclusive, en diferentes tejidos, ya que sin ello no es posible obtener resultados concluyentes en cuanto al comportamiento farmacocinético del compuesto y del ibuprofeno liberado a partir del mismo.
- 3) El estudio de la hidrólisis del ibuprofenato de ibuprofílo debe encaminarse ahora al conocimiento de la cinética con que el compuesto se degrada en homogenados de diferentes tejidos animales (incluyendo al tejido adiposo), para reforzar algunos de los planteamientos derivados del estudio farmacocinético preliminar realizado en este trabajo. Inclusive, debe considerarse la cinética de hidrólisis en los fluidos gástrico e intestinal, así como en presencia de microorganismos del tracto gastrointestinal, con la finalidad de saber si el ibuprofenato de ibuprofílo es absorbido en el organismo como tal, o si es hidrolizado antes de que ingrese al mismo.
- 4) Los estudios farmacocinéticos deben contemplar un nuevo esquema de muestreo, que permita obtener un mayor número de muestras durante períodos más prolongados de tiempo para ello, debe considerarse la utilización de un método con mayor sensibilidad, así como el aumento en el número de animales utilizados. El nuevo esquema de muestreo, debe permitir la caracterización total de la fase de eliminación del ibuprofeno y el ibuprofenato de ibuprofílo.

- 5) Es recomendable que, para poder inferir un modelo farmacocinético adecuado tanto para el ibuprofenato de ibuprofeno como para el ibuprofeno derivado de éste, se considere el muestreo no sólo de la sangre o plasma, sino la cuantificación de las sustancias en otros tejidos del organismo.

- 6) Finalmente, es recomendable el realizar estudios que permitan conocer el sitio de absorción principal del ibuprofenato de ibuprofeno, mediante experimentos del tipo del "asa aislada", con la finalidad de saber si esta sustancia se absorbe en la misma proporción en todo el tracto gastrointestinal, o si existen lugares donde se lleve a cabo el proceso de manera preferente, ya que esta información será muy importante para llevar a cabo una adecuada caracterización de la farmacocinética del compuesto

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Evans, A. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the profens: Enantioselectivity, clinical implications, and special reference to S(+)-Ibuprofen. *J. Clin. Pharmacol.* **36**: 7S-15S (1996).
2. Banker, G., Rhodes, C. (eds). Modern Pharmaceutics. In: Drugs and the pharmaceutical sciences. Vol. 40. Ed. Marcel- Dekker Inc. New York, NY (1990). pp 87-90
3. Boudavary, M (Ed.). The merck Index. An encyclopedia of chemicals, Drugs and Biologicals. The merck Co. Inc., 11 th. Edition, Rahway, N.J. (1994). p. 776.
4. Larios, P (Ed.). Sustancia activa. Ediciones Croissier, S.A. México, 1988. p. 337.
5. Leising, G., Resel, R., Stelzer, F., Tasch, F., Lanziner, A. and Hantich, G. Physical aspects of dexibuprofen and racemic ibuprofen. *J. Clin. Pharmacol.* **36**, 3S-6S (1996).
6. Bansal, A., Dubey, P. and Khar, R. Quantitation of activity of alkyl ester prodrugs of ibuprofen. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* **20**(12): 2025-2034 (1994).
7. Rao, C., Schoenwald, R., Balfnecht, C. and Laban, S. Biopharmaceutical evaluation of ibufenac, ibuprofen and their hydroxyethoxy analogs in the rabbit eye. *J. Pharmacokin. Biopharm.* **20**(4): 357-388 (1992).
8. Goodwin, J. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory agents *Am. J. Med.* **77**(1A): 157-164 (1984).
9. Kauffman, R. and Nelson, M. Effect of age on ibuprofen pharmacokinetics and antipyretic response. *J. Pediatr.* **121**(69): 969-973 (1992).
10. Boneberg, E., Zou, M. and Ullrich, V. Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 by R(-)- and S(+)-ibuprofen. *J. Clin. Pharmacol.* **36**: 16S-19S (1996).
11. Rifai, N., Sakamoto, M., Law, T., Galpelian, V., Harris, N. and Colin, A. Use of a rapid HPLC assay for determination of pharmacokinetic parameters of ibuprofen in patients with cystic fibrosis. *Clin. Chem.* **42**(11): 1812-1816 (1996).

12. Kantor, T. Summary: Ibuprofen- Past, present and future. *Am. J. Med.* 77(1A): 121-125 (1984).
13. De graves, F., Anderson, K. And Aucoin, D. Pharmacokinetics of ibuprofen in lactating dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 54(7): 1133-1135 (1993).
14. Albert, K. And Gernaat, C. Pharmacokinetics of ibuprofen. *Am. J. Med.* 77(1A): 40-46 (1984).
15. Wagner, J., Albert, K., Szpunar, G. and Lockwood, G. Pharmacokinetics of ibuprofen in man IV. Absorption and disposition. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 12(4): 381-399 (1984).
16. Evans, A., Nation, R., Samson, L., Bochner, F. and Somogyi, A. The relationship between the pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers and the dose of racemic ibuprofen in humans. *Biopharm. Drug Disposit.* 11, 507-518 (1990).
17. Martin, W., Koselowske, G., Töberich, H., Kerkmann, T., Mangold, B. and Augustin, J. Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ibuprofen after oral administration of ibuprofen lysine in man. *Biopharm. Drug. Disposit.* 11(3): 265-278 (1990).
18. Saano, V., Paronen, P., Peura, P. and Vidgren, M. Pharmacokinetics of two 200 mg ibuprofen film-coated tablets and effervescent tablet. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 18(4): 491-497 (1992).
19. Pargal, A., Kelkar, M. and Nayak, J. The effect of food on the bioavailability of ibuprofen and flurbiprofen from sustained release formulations. *Biopharm. Drug Disposit.* 17(6): 511-519 (1996).
20. Whitlam, J., Crooks, M., Brown, K. and Veng Pedersen, P. Binding of nonsteroidal anti-inflammatory agents to proteins- I. Ibuprofen- serum albumin interactions. *Biochem. Pharmacol.* 28: 675-678 (1979).
21. Lockwood, G., Albert, K., Szpunar, G. and Wagner, J. Pharmacokinetics of ibuprofen in man-III. Plasma protein binding. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 11(3): 469-482 (1983).
22. Tanaka, M., Asahi, Y., Masuda, S. and Ota, T. Binding position of ibuprofen with bovine serum albumin determined by measuring nuclear magnetic resonance relaxation time. *J. Pharm. Bull.* 39(1): 1-4 (1991).
23. Paliwal, J., Smith, D., Cox, S., Berardi, R., Dunn-Kucharski, V. and Elta, G. Stereoselective, competitive and nonlinear plasma protein binding of ibuprofen enantiomers as determined in vivo in healthy subjects. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 21(2): 145-161 (1993).
24. Lockwood, G., Albert, K., Gillespie, W., Bole, G., Harkcom, T., Szpunar, G. and Wagner, J. pharmacokinetics of ibuprofen in man. I. Free and total area/dose relationships. *Clin. Pharmacol. Ther.* 34(1):97-103 (1983).

- 25 Day, R., Williams, K., Graham, G., Lee, E., Knihinicki, R. and Champion, D. Stereoselective disposition of ibuprofen enantiomers in synovial fluid. *Clin. Pharmacol. Ther.* **43**: 480-487 (1988).
- 26 Walker, J., Knihinicki, R., Seidman, P. and Day, R. Pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers in plasma and suction blister fluid in healthy volunteers. *J. Pharm. Sci.* **82**(8) 787-790 (1993).
- 27 Wechter, W. Understanding the chiral pharmacology of nonsteroidal antiinflammatory drugs in the arylpropionic acid class: S(+)-Ibuprofen: Overview of the symposium "Update on S(+)-ibuprofen". *Clin. Pharmacol.* **36**: 1S-2S (1996).
- 28 Kaiser, D., Vangiessen, G., Reischer, R. and Wechter, W. Isomeric inversion of ibuprofen (R)-enantiomer in humans. *J. Pharm. Sci.* **65**(2) 269-273 (1976).
- 29 Rudy, A., Knight, P., Bater, D. and Hall, S. Stereoselective metabolism of ibuprofen in humans: administration of R-, S- and racemic ibuprofen. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **259**(3) 1133-1139 (1991).
- 30 Baillie, T., Adams, W., Kaiser, D., Olanoff, L., Halstead, G., Harpootlian, H. and Van Giessen, G. Mechanistic studies of the metabolic chiral inversion of R(-)-ibuprofen in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **249**(2): 517-523 (1989).
- 31 Jamali, F., Mehvar, R., Russel, A., Sattari, S., Yakimets, W. and Koo, J. Human pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers following different doses and formulations: intestinal chiral inversion. *J. Pharm. Sci.* **81**(3) 221-225 (1992).
- 32 Cox, J., Cox, S., Van Giessen, G. and Ruwart, M. Ibuprofen stereoisomer hepatic clearance and distribution in normal and fatty in situ perfused rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **232**(3): 636-643 (1985).
- 33 Oliary, J., Tod, M., Nicolas, P., Petitjean, O. and Coille, G. Pharmacokinetics of ibuprofen enantiomers after single and repeated doses in man. *Biopharm. Drug. Dispos.* **13**: 337-344 (1992).
- 34 Hall, S., Rudy, A., Knight, P. and Brater, D. Lack of presystemic inversion of (R)- to (S)-ibuprofen in humans. *Clin. Pharmacol. Ther.* **53**(4): 393-400 (1993).
- 35 Shieh, W., Gou, D., Liu, Y., Chen, C. and Chen, C. A ¹³C NMR study on ibuprofen metabolism in isolated rat liver mitochondria. *Anal. Biochem.* **212**: 143-149 (1993).
- 36 Satterwhite, J. and Boudinot, D. Effects of age and dose on the pharmacokinetics of ibuprofen in the rat. *Drug. Metab. Dispos.* **19**(1): 62-67 (1991).
- 37 Albert, K., Gillespie, A., Wagner, J., Pau, A. and Lockwood, G. Effects of age on the clinical pharmacokinetics of ibuprofen. *Am. J. Med.* **77**(1A): 47-50 (1984).

38. Chen, C. and Chen, C. Stereoselective disposition of ibuprofen in patients with renal dysfunction. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **286**(2): 590-594 (1994).
39. Antal, E., Wright, G., Brown, B., Albert, K., Aman, L. and Levin, N. The influence of hemodialysis on the pharmacokinetics of ibuprofen and its major metabolites. *J. Clin. Pharmacol.* **26**: 184-196 (1986).
40. Juhl, R., Van Thiel, D., Dittert, L., Albert, K. and Smith, R. Ibuprofen and sulindac kinetics in alcoholic liver disease. *Clin. Pharmacol. Ther.* **34**(1): 104-109 (1983).
41. Ochs, H., Greenblatt, D., Matlis, R. and Weinbrenner, J. Interaction of ibuprofen with the H-2 receptor antagonists ranitidine and cimetidine. *Clin. Pharmacol. Ther.* **38**(6): 648-651 (1985).
42. Smith, D., Paliwal, J., Cox, S., Berardi, R., Dunn-Kucharski, V. and Elta, G. The effect of competitive and nonlinear plasma protein binding on the stereoselective disposition and metabolic inversion of ibuprofen in healthy subjects. *Biopharm. Drug. Disposit* **15**: 545-561 (1994).
43. De graves, F., Anderson, K. and Aucoin, D. Pharmacokinetics of ibuprofen in lactating dairy goats. *Am. J. Vet. Res.* **54**(8): 1143-1145 (1993).
44. Hermann, T., Gtówka, F. and Garret, E. Bioavailability of racemic ibuprofen and its lysinate from suppositories in rabbits. *J. Pharm. Sci.* **82**(11): 1102-1111 (1993).
45. Shanbhag, V., Crider, M., Gokhale, R., Harpalani, A. and Dick, R. Ester and amide prodrugs of ibuprofen and naproxen: Synthesis, anti-inflammatory activity, and gastrointestinal toxicity. *J. Pharm. Sci.* **81**(2): 149-154 (1992).
46. Bhattacharya, S., Goel, R., Battacharya, S. and Tandos, R. Potentiation of gastric toxicity of ibuprofen by paracetamol in the rat. *J. Pharm. Pharmacol.* **43**: 520-521 (1991).
47. Sinkula, A. Perspectives on prodrugs and analogs in drug design. En: Design of biopharmaceutical properties through prodrugs and analogs. Ed. American Pharmaceutical Association- Academy of Pharmaceutical Sciences. Washington, D.C. (1977).
48. Morozowich, W., Cho, M. and Kexdy, F. Application of physical organic principles to prodrug design. En: Design of biopharmaceutical properties through prodrugs and analogs. Ed. American Pharmaceutical Association- Academy of Pharmaceutical Sciences. Washington, D.C. (1977).
49. Samara, E., Avnir, D., Ladkani, D. and Bialer, M. Pharmacokinetic analysis of diethyl carbonate prodrugs of ibuprofen and naproxen. *Biopharm. Drug. Disposit.* **16**: 201-210 (1995).

50. Murtha, J. and Ando, H. Synthesis of the cholesteryl ester prodrug cholesteryl ibuprofen and cholesteryl flufenamate and their formulation into phospholipid microemulsions. *J. Pharm. Sci.* **83**(9): 1222-1228 (1994).
51. Zorc, B., Antolic, S. and Butula, I. Macromolecular prodrugs. Part 1. Synthesis of nonsteroidal anti-inflammatory drug esters. *Acta Pharmaceutica.* **43**(2): 127-133 (1993).
52. Mork, N. and Bungaard, H. Stereoselective enzymatic hydrolysis of various ester prodrugs of ibuprofen and flurbiprofen in human plasma. *Pharm. Res.* **9**: 492-496 (1992).
53. Sartore, L., Peroni, I., Ferruti, P., Latini, R. and Bernasconi, R. Synthesis and pharmacokinetic behaviour of ester derivatives of 4-isobutylphenyl-2-propionic acid (ibuprofen) with end-hydroxylated poly (N-vinyl pyrrolidone) and poly (N-acryloyl morpholine) oligomers. *J. Biomater. Sci. Polym.* **8**(10): 741-754 (1997).
54. Tejada, V. Aplicación del diseño de experimentos (factorial y de mezclas) para estudiar las posibles interacciones de fármacos analgésicos antiinflamatorios no esteroideos. Trabajo de Informe Predoctoral, Facultad de Química de la UNAM, Julio de 1998.
55. Bressolle, F., Bromet-Petit, M. and Audran, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B.* **686**: 3-10 (1996).
56. Dolan, J. LC troubleshooting: Changing System conditions. *LC-GC Intl.* **4**(7): 16-17 (1991).
57. Lynch, M., Raphael, S., Mellor, L., Spare, P. and Inwood, M. Métodos de laboratorio. Cía Editorial Interamericana, México (1977) p. 222-229.
58. Garst, J. and Wilson, W. Accurate, wide-range, automated, high performance liquid chromatographic method for the estimation of octanol/water partition coefficients I. Effect of chromatographic conditions and procedure variables on accuracy and reproducibility of the method. *J. Pharm. Sci.* **73**(11): 1616-1623 (1984).
59. Garst, J. Accurate, wide-range, automated, high performance liquid chromatographic method for the estimation of octanol/water partition coefficients II. Equilibrium in partition coefficient measurements, additivity of substituent constants, and correlation of biological data. *J. Pharm. Sci.* **73**(11): 1623-1629 (1984).
60. Connors, K. Curso de análisis farmacéutico. Ed. Reverté, 2ª ed., Madrid (1981). pp. 195-233.
61. Unger, S., Cheung, P., Chiang, G. and Cook, J. "RP-HPLC determination of 1-octanol partition and distribution coefficients: experience and results". *J. Pharm. Sci.* **69**(10): 1345-1349 (1980).

62. Dunn, W. Structure effects of partitioning behaviour of drugs. En. Design of biopharmaceutical properties through prodrugs and analogs. Ed. American Pharmaceutical Association- Academy of Pharmaceutical Sciences. Washington, D.C. (1977)
63. Braumann, T. Determination of hydrophobic parameters by reversed-phase liquid chromatography: theory, experimental techniques and applications in studies on quantitative structure activity relationships. *J. Chrom.* **373**: 191-225 (1986).
64. Lang, J. and Bolton, S. A comprehensive method validation strategy for bionalytical applications in the pharmaceutical industry - 1. Experimental considerations. *J. Pharm. Biomed. Analysis* **9**(5): 357-361 (1991).
65. Lang, J. and Bolton, S. A comprehensive method validation strategy for bionalytical applications in the pharmaceutical industry - 2. Statistical analyses. *J. Pharm. Biomed. Analysis* **9**(6): 435-442 (1991)
66. CPMP Working Party on Quality of Medicinal Products- Commission of the European Communities- Directorate General for International Market and Industrial Affairs. Analytical Validation August 1989
67. Lehninger, A. Bioquímica Tomo II. Ed. Ciencias por una educación popular México (1994) pp 207-248
68. Heymann, E. Carboxylesterases and amidases. En. Enzymatic basis of detoxication, Vol II Ed. Academic Press Inc, New York (1980) pp 291-323
69. Barbato, F., La Rotonda, M. and Quaglia, F. Interactions of nonsteroidal antiinflammatory drugs with phospholipids: comparison between Octanol/buffer partition coefficients and chromatographic indexes on immobilized artificial membranes. *J. Pharm. Sci.* **86**(2): 225-229 (1997)
70. Krisch, K. Carboxylic ester hydrolases. En: The enzymes, Vol V, Ed. Academic Press Inc New York, NY pp 43-69
71. Bourne, D. and Dittert, L. Pharmacokinetics. In: Drugs and the pharmaceutical sciences Vol 38 Ed. Marcel- Dekker Inc New York, NY (1990). pp 75-119.
72. Ohta, N., Kurono, Y. and Ikeda, K. Esterase-like activity of human serum albumin II. Reaction with N-trans-cinnamoylimidazoles. *J. Pharm. Sci.* **74**(4): 385-388 (1983)
73. Mork, N. and Bungaard, H. Glycolamide esters as biolabile prodrugs of carboxylic acid agents. Synthesis, stability, bioconversion, and physicochemical properties. *J. Pharm. Sci.* **77**(4): 285-298 (1988)
74. Scientific Consulting Inc. WinNonLin, beta version 1.1, 1984-1995

75. Williams, K., Day, R., Knihinicki, R. and Duffield, A. The stereoselective uptake of ibuprofen enantiomers into adipose tissue. *Biochem. Pharmacol.* **35**(19): 3403-3405 (1986)
76. StatSoft Inc. Statistica for Windows, version 4.5. 1993.
77. Yamaoka, K., Nakagawa, T. and Uno, T. Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *J. Pharmacokin. Biopharm.* **6**(2): 165-175 (1978).
78. Rodríguez, M. Anatomía, fisiología e higiene. Ed. Progreso, S.A. de C.V., 7ª. ed., México (1977). p-p 147-167
79. Yamaoka, K., Nakawaga, T. and Uno, T. Statistical moments in pharmacokinetics. *J. Pharmacokin. Biopharm.* **6**(6): 547-558 (1978).