



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD



ÁREA ACADÉMICA DE FARMACIA

**APLICACIÓN DEL MÉTODO DE VELOCIDAD DE EXCRECIÓN DE
NANOPARTÍCULAS (AuNPs Y Au-LAN) MEDIANTE LA
SIMULACIÓN *IN VITRO* PARA LA DETERMINACIÓN DE
PARAMÉTROS FARMACOCINÉTICOS**

T e s i s

Para obtener el título de Licenciada en Farmacia

Presenta

Cruz López Sandibel

DIRECTOR

Dra. Eva María Molina Trinidad

Pachuca de Soto, Hgo. 2014



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO
DE HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD



ÁREA ACADÉMICA DE FARMACIA

**APLICACIÓN DEL MÉTODO DE VELOCIDAD DE EXCRECIÓN DE
NANOPARTÍCULAS (AuNPs Y Au-LAN) MEDIANTE LA
SIMULACIÓN *IN VITRO* PARA LA DETERMINACIÓN DE
PARAMÉTROS FARMACOCINÉTICOS**

T e s i s

Para obtener el título de Licenciada en Farmacia

Presenta

Cruz López Sandibel

DIRECTOR

Dra. Eva María Molina Trinidad

CODIRECTOR

LQC. Nora Mayte Villegas Balderas

Pachuca de Soto, Hgo. 2014

ÍNDICE

	ÍNDICE	i
	ÍNDICE DE FIGURAS	v
	ÍNDICE DE TABLAS	vi
	LISTA DE ABREVIATURAS	vii
	RESUMEN	viii
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	3
2.1	Farmacocinética	3
2.1.1	Absorción	4
2.1.1.1	Paso de los fármacos a través de las membranas biológicas	5
2.1.1.2	Mecanismo por los cuales los fármacos atraviesan las membranas	5
2.1.1.3	Filtración a través de poros	7
2.1.1.4	Difusión pasiva directa	7
2.1.1.5	Difusión facilitada	7
2.1.1.6	Transporte activo	8
2.1.1.7	Endocitosis y exocitosis	9
2.1.2	Biodistribución	10
2.1.2.1	Transporte de los fármacos en la sangre	11
2.1.3	Metabolismo	12
2.1.4	Excreción	13
2.1.4.1	Excreción renal	13

2.1.4.1.2	Riego sanguíneo de las nefronas	14
2.1.4.1.3	Filtración glomerular	16
2.1.4.1.3.1	Secreción tubular	17
2.1.4.1.3.2	Reabsorción tubular	17
2.1.4.2	Cinética de eliminación	18
2.1.4.2.1	Cinética lineal y no lineal	18
2.3	Nanopartículas de oro	19
2.3.1	Propiedades físicas y químicas de las nanopartículas de oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN	22
2.4	Parámetros farmacocinéticos	23
2.4.1	Constante de eliminación (ke)	24
2.4.2	Tiempo de vida media ($t_{1/2}$)	24
2.4.3	Volumen de distribución (Vd)	24
2.4.4	Depuración (CL)	25
2.4.5	Tiempo de máxima excreciónn (T _{máx. exc})	25
2.5	Monitoreo de muestras	26
2.6	Método de velocidad de excreción	26
III.	JUSTIFICACIÓN	29
IV.	HIPÓTESIS	31
V.	OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICO	32
VI.	METODOLOGÍA	33
6.1	Productos y reactivos	33
6.2	Equipo	33

6.3	Obtención de la síntesis de nanopartículas de oro (AuNPs) (Método de Turkevich-Frens) y del conjugado AuNPs-LAN	34
6.3.1	Nanopartículas de oro (AuNPs)	34
6.3.2	Conjugado AuNPs-LAN (AuNPs-LAN)	35
6.4	Determinación del perfil farmacocinético siguiendo una simulación <i>in vitro</i> de nanopartículas de Oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN	35
6.5	Determinación de parámetros farmacocinéticos	36
6.5.1	Cálculo de la constante de eliminación (<i>ke</i>)	36
6.5.2	Cálculo del tiempo de vida media ($t_{1/2}$)	36
6.5.3	Cálculo del volumen de distribución (Vd)	36
6.5.4	Cálculo de la depuración (CL)	37
6.5.5	Tiempo de máxima excreción (T máx. exc.)	37
6.6	Método de velocidad de excreción <i>in vitro</i> de nanopartículas de Oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN	37
6.7	Análisis estadístico (Prueba Q de Cochran)	38
VII.	RESULTADOS	39
7.1.	Síntesis de nanopartículas de Oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN	39
7.2	Comportamiento <i>in vitro</i> de las nanopartículas de oro (AuNPs) y del conjugado lanreótido (AuNPs-LAN).	40
7.3	Evaluación de la excreción de nanopartículas de Oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN <i>in vitro</i> . (Aplicación del método de velocidad de excreción)	43
7.4	Reajuste de datos experimentales considerando el comportamiento farmacocinético de las nanopartículas (AuNPs)	44

	y del conjugado AuNPs-LAN <i>in vitro</i>	
7.5	Análisis estadístico	45
7.5.1	Prueba Q de Cochran	45
VIII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
IX.	CONCLUSIONES	53
X.	RECOMENDACIONES	54
XI.	BIBLIOGRAFÍA	56
XII.	ANEXOS	61
XIII.	GLOSARIO	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema general de fármacos	4
Figura 2.- Mecanismo del paso de fármacos a través de las membranas biológicas	6
Figura 3.- Biodistribución intravascular de los fármacos	10
Figura 4.- Relaciones de las partes que componen una nefrona	14
Figura 5.- Anatomía de un riñón	15
Figura 6.- Dibujo esquemático de una nanocápsula y una nanoesfera	21
Figura 7.- Representación gráfica de la relación lineal entre dosis de medicamento administrado y concentración plasmática obtenida	25
Figura 8.- Color característico de las nanopartículas dependientes del tamaño	39
Figura 9.- Representación de espectros obtenidos por espectrofotometría UV- visible de las nanopartículas de oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN, en donde se visualiza el tamaño de partícula (A) en un área de 100 nm y (B) en un área de 10 nm, realizado por microscopía de alta resolución (TEM).	40
Figura 10.- Representación esquemática del modelo abierto un compartimiento <i>in vitro</i> utilizado para el estudio farmacocinético de las nanopartículas de Oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN	41
Figura 11.- Representación gráfica de la aplicación del método de velocidad de excreción de las nanopartículas de Oro (AuNPs)	42
Figura 12.- Representación gráfica de la aplicación del método de velocidad de excreción del conjugado AuNPs-LAN	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.-	Parámetros farmacocinéticos promedio constantes de las nanopartículas de Oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN <i>in vitro</i>	44
Tabla 2.	Valor calculado del estadístico de la prueba de Cochran (ji cuadrada)	46
Tabla 3.	Aplicación del método de velocidad de eliminación del conjugado AuNPs-LAN <i>in vitro</i> . (n:2)	62
Tabla 4.	Aplicación del método de velocidad de eliminación de nanopartículas de Oro (AuNPs) <i>in vitro</i> .(n:4)	64

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ATP	Adenosintrifosfato
Au	Oro
AuNPs	Nanopartículas de oro
AuNPs-LAN	Conjugado AuNPs-Lanreótido
CLr	Depuración renal
CL_T	Depuración total
DLS	Dispersión de Luz Dinámica
ke	Constante de eliminación
λ	Longitud de Onda
µg	Microgramos
min.	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milimetro
nm	Nanómetros
t_{1/2}	Tiempo de vida media
T_{máx.exc.}	Tiempo máximo de excreción
TEM	Microscopía de Transmisión Electrónica
Thr	Triptófano
UV	Ultravioleta

RESUMEN

La forma en que se sigue el paso de los fármacos en el organismo está delimitado por el sistema LABBE (liberación, absorción, biodistribución, biotransformación y excreción) reportado en otras fuentes bibliográficas como sistema LADME; éste puede ser representado *in vitro* siguiendo una simulación representativa del movimiento del fármaco en el organismo. En este trabajo se realizó una simulación *in vitro* de dos sistemas nanoestructurados (AuNPs y AuNPs-LAN), aplicando el método de velocidad de excreción. Se determinaron cinco parámetros farmacocinéticos. En el ajuste de datos por el programa *WinNonlin* se calculó una constante de eliminación k_e de ($0.0233 \pm 0.0046 \text{ min}^{-1}$) para las AuNPs y k_e ($0.0295 \pm 0.0097 \text{ min}^{-1}$) para el conjugado AuNPs-LAN; el tiempo de vida media $t_{1/2}$ ($101.0760 \pm 55.32 \text{ min}$) para las AuNPs y $t_{1/2}$ ($150.00 \pm 69.60 \text{ min}$) para el conjugado AuNPs-LAN; la depuración para las AuNPs y CL ($21.165 \pm 0.126 \text{ mL/min}$) para el conjugado AuNPs-LAN ($17.5 \pm 0.234 \text{ mL/min}$); el volumen de distribución V_d ($2682 \pm 1395 \text{ mL}$) para las AuNPs y V_d ($7128 \pm 956.9 \text{ mL}$) para el conjugado AuNPs-LAN; y el tiempo máximo excretado $t_{\text{máx.exc}}$ ($7.5 \pm 4.2426 \text{ min}$) para las AuNPs y $t_{\text{máx.exc}}$ ($7.5 \pm 4.25 \text{ min}$). Los datos reportados difieren del cálculo realizado utilizando el método de velocidad de excreción, donde la k_e ($0.0456 \pm 0.0030 \text{ min}^{-1}$) para las AuNPs y k_e ($0.0478 \pm 0.0025 \text{ min}^{-1}$) para el conjugado AuNPs-LAN; el tiempo de vida media $t_{1/2}$ ($18.35 \pm 4.66 \text{ min}$) para las AuNPs y $t_{1/2}$ ($17.27 \pm 3.58 \text{ min}$) para el conjugado AuNPs-LAN; la depuración para las AuNPs CL ($20.4286 \pm 0.927 \text{ mL/min}$) y para el conjugado AuNPs-LAN:CL ($12.0 \pm 0.848 \text{ mL/min}$); el volumen de distribución V_d ($479 \pm 66 \text{ mL}$) para las AuNPs y V_d ($257 \pm 9.1924 \text{ mL}$) para el conjugado AuNPs-LAN; y el tiempo máximo excretado para las AuNPs y para el conjugado es indefinido. Concluyendo así que el método aplicado es útil para la determinación de parámetros farmacocinéticos en muestras de orina y es confiable.

I. INTRODUCCIÓN

La Farmacocinética es la rama de la farmacología que estudia el paso de los fármacos a través del organismo en función del tiempo y de la dosis. Comprende los procesos de absorción, biodistribución, biotransformación y excreción de los fármacos. Incluye el conocimiento de parámetros tales como el volumen aparente de biodistribución de un fármaco, que se expresa al relacionar la dosis administrada con la concentración plasmática, dato útil para calcular la dosis inicial de carga ^[1]. Otro parámetro es la depuración del fármaco, que puede definirse como el volumen de plasma que es eliminado de un fármaco por unidad de tiempo. También el tiempo de vida media del fármaco ($t_{1/2}$) que representa el tiempo requerido para eliminar del organismo el 50% de la dosis de un fármaco, al igual es importante conocer la biodisponibilidad que es la cantidad del fármaco que llega a la circulación en forma inalterada ^[2 - 5].

Cuando se desea conocer el comportamiento de un nuevo fármaco en el organismo es necesario determinar dos factores farmacocinéticos importantes como es la constante de velocidad de eliminación y el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), donde la eliminación del fármaco depende de la concentración del fármaco en los diferentes fluidos o tejidos de biodistribución ^[1 - 5].

En el caso particular de las biomoléculas en estudio (AuNPs y AuNPs-LAN) se considera que deben tener una vía de eliminación, es decir, un mecanismo abierto donde la cinética de eliminación es de primer orden, entonces mediante el seguimiento de la excreción de los nanofármacos se puede determinar de forma indirecta las concentraciones de los mismos en muestras de orina, aplicando el método de velocidad de excreción *in vitro* para conocer los parámetros farmacocinéticos importantes como la depuración (CL) y la velocidad a la cual las nanopartículas (AuNPs) y el conjugado AuNPs-LAN se eliminan.

El interés en la documentación de la farmacocinética de estos nuevos productos radica en conocer los mecanismos de eliminación de nanopartículas de Oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN con datos obtenidos a partir del seguimiento farmacocinético de estos nanofármacos *in vitro*, aplicando el método de velocidad de excreción ^[1,5]. Sabiendo que el uso de éste método permite determinar parámetros farmacocinéticos con datos de orina cuando los datos obtenidos a través de un monitoreo con datos en plasma no son confiables.

II. MARCO TEÓRICO

La palabra Farmacocinética apareció por primera vez en el mundo en el año 1953 en el escrito por el Dr. FH Dost. Pero, la mejor definición que describe el alcance del término “Farmacocinética” se explica en el prefacio que en el año de 1975 Gibaldi & Perrier proponen en la primera edición del texto “Pharmacokinetics”. Donde afirman que la Farmacocinética es el estudio de las variaciones en las concentraciones de los fármacos y sus metabolitos en función del tiempo en los diferentes fluidos, tejidos y elementos de depuración del organismo y de las relaciones matemáticas necesarias para desarrollar modelos que permitan interpretar tales datos [2].

En México desde el año 1960 hasta principios del siglo XXI, con la aplicación de nuevos descubrimientos en el campo de la química y la informática se desencadenó un incremento en cantidad y calidad de trabajos farmacocinéticos. Aunque actualmente, la Farmacocinética está muy desarrollada en sus aplicaciones, es una ciencia relativamente joven, con fundamentos multidisciplinarios, por lo que ha recibido aportaciones procedentes de muy diversos campos y, en consecuencia, es frecuente encontrar errores de concepto y/o terminología equívoca, pues se han descrito los procesos de absorción y eliminación como reacciones químicas de primer orden, cuando en realidad y aunque obedecen a las mismas leyes, se trata de procesos físicos que en determinadas condiciones presentan comportamientos diferentes [3].

2.1. FARMACOCINÉTICA

La farmacocinética debe interpretarse como un proceso dinámico, donde todos los procesos ocurren simultáneamente. La figura 1 señala las diversas alternativas que puede seguir una molécula activa de un fármaco. Puede visualizarse que una

fracción del fármaco administrado sigue un cierto proceso farmacocinético, mientras otra fracción sigue otro, pero nunca se puede prever si una molécula aislada seguirá un proceso u otro, es decir, se puede predecir estadísticamente el destino del conjunto de las moléculas administradas, pero el destino de una molécula individual es aleatorio y no predecible [4].

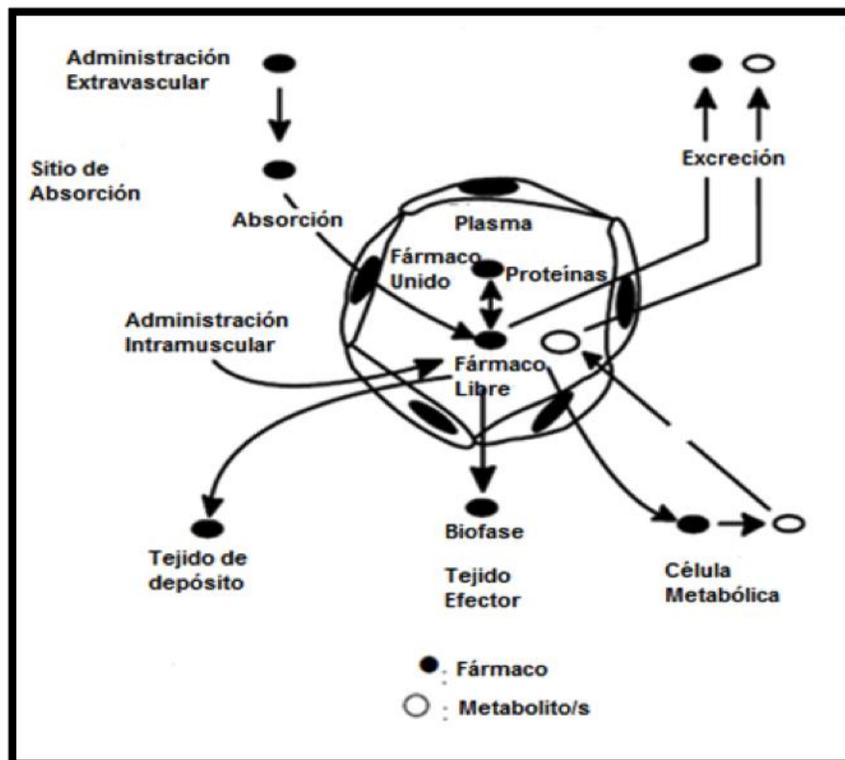


Figura 1. Esquema general de la farmacocinética [4].

2.1.1 Absorción

La absorción hace referencia a la entrada de los fármacos en el organismo desde el lugar donde se depositan cuando se administran. Incluye el paso de los fármacos desde el exterior al medio interno, es decir, a la circulación sistémica. Tanto este proceso como los restantes procesos a los que se encuentra sometido

el fármaco en el organismo requieren que sea capaz de atravesar membranas biológicas [6].

2.1.1.1 Paso de los fármacos a través de las membranas biológicas.

Los fármacos pasan usualmente a través de las células y de la membrana celular para que puedan desplazarse en el organismo. Las membranas de todas las células eucariotas presentan una estructura básica similar. En la mayoría de los modelos propuestos las moléculas de lípidos y proteínas se mantienen unidas por enlaces no covalentes, y los lípidos se disponen en dos capas, orientándose los fosfolípidos de forma perpendicular al plano de la membrana, con sus grupos polares hacia el exterior e interior celular, y con las largas cadenas hidrocarbonadas hidrófobas de los ácidos grasos dentro de la bicapa [6].

2.1.1.2 Mecanismo por los cuales los fármacos atraviesan las membranas.

El mecanismo más usual por el cual los fármacos atraviesan la membrana celular es mediante el proceso de disolución de los componentes lipídicos. Las sustancias polares o hidrofílicas atraviesan la membrana mediante el proceso de filtración. Donde los poros de la membrana constituyen las vías de acceso para que los iones y otras moléculas pequeñas atraviesen la membrana. Las moléculas que por sus características lipofílicas son capaces de disolverse en la membrana celular, y las que por su tamaño pueden pasar por los poros, atraviesan la membrana por mecanismos de transporte pasivo basados en leyes físicas (Ver figura 2) [6].

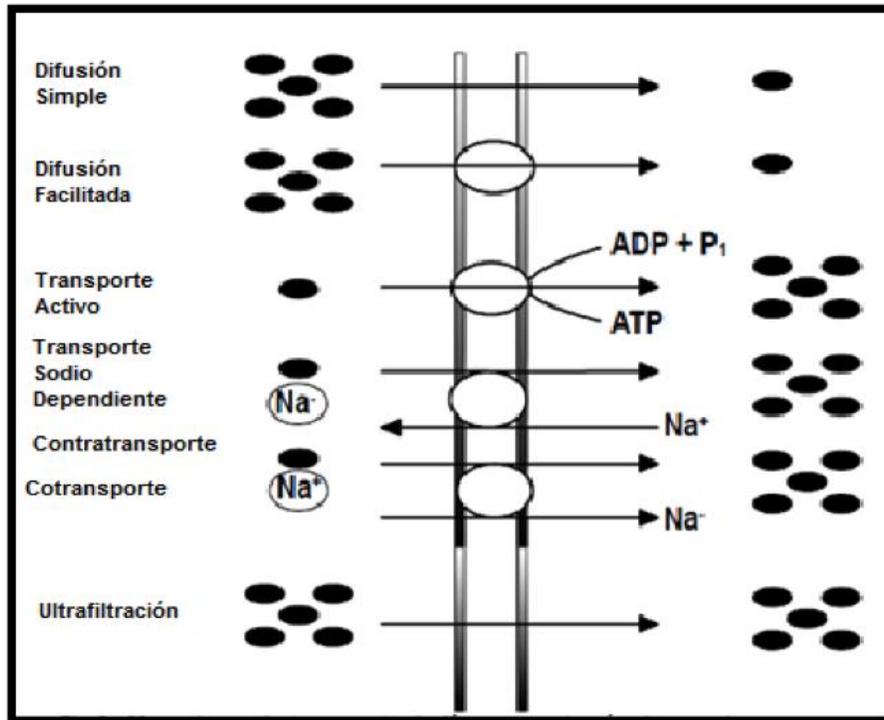


Figura 2. Mecanismo de transporte de fármacos a través de membranas [4].

Estos procesos no requieren energía, no son selectivos ni saturables y no son inhibidos por otras sustancias. Las moléculas polares de tamaño medio atraviesan la membrana celular mediante proteínas o sistemas transportadores, que fijan la molécula y la transfieren de un lado al otro. Si el transporte se realiza a favor del gradiente electroquímico y no requiere energía, se hace referencia a un proceso de difusión facilitada, pero cuando el paso se realiza contra gradiente, existe además un requerimiento energético que convierte el proceso en un transporte activo. Las moléculas de gran tamaño requieren del proceso de fagocitosis (endocitosis y exocitosis) para poder atravesar las membranas biológicas [6].

2.1.1.3 Filtración a través de poros.

La filtración es el paso de moléculas a través de canales acuosos localizados en la membrana. Puede considerarse un proceso de difusión pasiva, que involucra la circulación de gran cantidad de agua como resultado de una diferencia hidrostática u osmótica. El tamaño molecular y la carga regulan el paso de las biomoléculas por los poros cuando se encuentra en forma neutra. La pared de los poros está revestida de proteínas con carga positiva y, en general, aunque todos los iones inorgánicos son suficientemente pequeños para penetrar por los poros, solo los iones y las moléculas pequeñas con carga negativa son atraídos y son los que prioritariamente se filtrarán. Además hay que tener en cuenta que el gradiente, en general está determinado por el potencial transmembranal. De esta manera, los iones y las moléculas cargadas positivamente difícilmente podrán pasar por los poros. El paso de los iones electropositivos, como el potasio o el sodio, está condicionado por procesos de transporte activo [6].

2.1.1.4 Difusión pasiva directa.

El sistema más utilizado por los fármacos para atravesar las membranas biológicas es la difusión pasiva directa por disolución en la bicapa lipídica. Este proceso está condicionado por las características lipofílicas de las sustancias que pueden expresarse por su coeficiente de partición lípido/agua. Está también condicionado por el coeficiente de difusión, que es una medida de la movilidad de las moléculas en los lípidos [6].

2.1.1.5 Difusión facilitada

El transporte especializado requiere que una proteína transportadora de la membrana se fije a la molécula en cuestión y modifique su conformación formando

un complejo que puede atravesar la membrana por ser más liposoluble que el sustrato original. El complejo pasa a través de la membrana y, cuando alcanza el lado opuesto, se desdobra y libera el sustrato, difundiendo entonces el transportador hasta alcanzar el punto de partida para unirse de nuevo a otra molécula de sustrato. La formación y descomposición del complejo portador-sustrato son usualmente catalizadas por enzimas, por lo que el paso de la sustancia es rápido. Este mecanismo permite que biomoléculas grandes atraviesen las membranas para difundirse por los poros y que, debido a su polaridad se difundan. Los mecanismos de transporte especializado regulan el paso a través de las membranas biológicas de muchas moléculas fisiológicamente importantes, como glucósidos, aminoácidos, neurotransmisores o iones metálicos. Los sistemas de transporte especializado pueden funcionar de manera puramente pasiva en función de un gradiente electroquímico o de un gradiente de concentración. Cuando esto sucede se habla propiamente de un proceso de difusión facilitada [6].

2.1.1.6 Transporte activo.

Se denomina transporte activo al paso de una sustancia a través de una membrana biológica en contra de un gradiente electroquímico. Para ello se requiere consumo energético y el de una o varias proteínas de membrana con función transportadora, alguna de las cuales suele tener función enzimática. Existe semejanza entre este proceso y la difusión facilitada en cuanto a los fenómenos de saturación y competición ya que son selectivos para determinadas sustancias. Los factores que caracterizan el transporte activo son la selectividad, la saturabilidad, la inhibición competitiva y el movimiento contra gradiente electroquímico que requiere de un gasto de energía. En la mayoría de los casos la energía es aportada por la hidrólisis de adenosintrifosfato (ATP) por parte de la proteína transportadora. En ocasiones, el transporte de la molécula en cuestión se

asocia al de otra molécula que se transporta en la misma dirección o en dirección contraria. Tal es el caso de los iones de sodio y potasio, que se transfieren por una bomba de la membrana plasmática dependiente de estos iones, más conocida como bomba de sodio [6].

Los mecanismos de transporte especializado tienen importancia para el transporte de compuestos endógenos. Pocos fármacos se absorben activamente. Esta absorción está limitada a una zona del tubo gastrointestinal, que suele ser parte del intestino delgado. Algunos se transportan activamente a través de las membranas neuronales o en los plexos coroideos, en la vía biliar, en las células del túbulo proximal renal y en los hepatocitos. A veces pasan desde el líquido cefalorraquídeo a la sangre y desde la sangre a la saliva [6].

2.1.1.7 Endocitosis y exocitosis.

La endocitosis y la exocitosis son mecanismos mediante los cuales las macromoléculas y partículas pueden entrar en la célula o ser eliminadas de ella, respectivamente. Conllevan al rompimiento de la membrana celular.

La endocitosis supone el englobamiento de las partículas que rodean a la célula, mediante la formación de una invaginación que posteriormente se cierra al fusionarse los bordes de la cavidad formada, dando lugar a una vacuola que es liberada al citosol. Así se lleva a cabo la destrucción de microorganismos, de células envejecidas, y de restos celulares.

La exocitosis es el proceso en donde la membrana se abre para permitir la salida de componentes celulares. Por este mecanismo se liberan muchos neurotransmisores y hormonas. Estas sustancias se encuentran almacenadas en vesículas que, al iniciar el proceso, fusionan sus membranas con la membrana plasmática. Ésta se abre y las vesículas vierten su contenido al exterior.

Posteriormente, la membrana se cierra y las vesículas son liberadas al citosol. Para que se lleve a cabo este proceso es indispensable la presencia de calcio extracelular [6].

2.1.2 Biodistribución

La biodistribución estudia el transporte del fármaco dentro del comportamiento sanguíneo y su posterior penetración en los tejidos. Es decir es un proceso en el cual el fármaco abandona reversiblemente la corriente sanguínea y penetra en el espacio intersticial o en las células de los tejidos (Ver figura 3) [6].

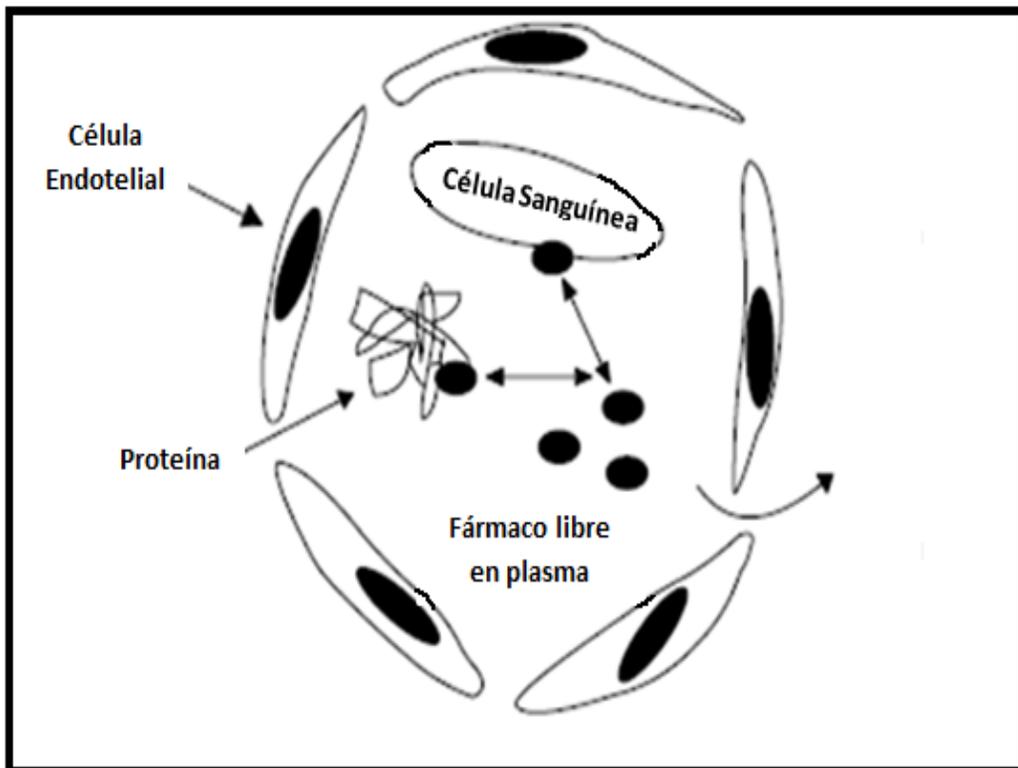


Figura 3. Biodistribución intravascular de los fármacos [4].

2.1.2.1 Transporte de los fármacos en la sangre.

Las moléculas de los fármacos en la sangre pueden ir disueltas en el plasma, incorporadas a las células y fijadas a las proteínas plasmáticas donde existe un equilibrio dinámico entre estas formas de transporte [6].

Es muy frecuente que los fármacos interaccionen con las proteínas del plasma, lo que condiciona sus efectos farmacológicos. En este sentido la albúmina es la proteína más importante, puesto que es la más abundante y la que tiene mayor superficie y capacidad de fijación a sustancias exógenas. Desarrolla interacciones con cationes y con aniones, y es capaz de interaccionar con muchos fármacos de naturaleza ácida y con algunos de naturaleza básica. La unión de los fármacos a la albúmina es reversible, y se favorece por la liposolubilidad. La albúmina reconoce cuatro sitios diferentes para la unión de los fármacos [6].

La unión de los fármacos a las proteínas del plasma podría considerarse un proceso reversible de adsorción a su superficie y se cuantifica como el porcentaje de la concentración plasmática unido a las mismas. Este porcentaje suele permanecer constante dentro de un intervalo de niveles plasmáticos amplio, pero el proceso es saturable y, si se satura, el porcentaje de fármaco libre será mayor [6].

Debido a la unión a proteínas plasmáticas, los fármacos no producen efectos biológicos, pero permiten el transporte y almacenamiento del fármaco y constituye uno de los mecanismos más importantes del organismo para el mantenimiento de los niveles plasmáticos y de las acciones farmacológicas. Solo el fármaco libre difunde a los tejidos diana y a los órganos de metabolismo y excreción, ya que la fracción unida no atraviesa el endotelio capilar con facilidad. El fármaco unido se va liberando hasta alcanzar un equilibrio con la fracción libre a medida que ésta va

teniendo acceso a los distintos órganos. En algunos casos la solubilidad de los fármacos favorece la unión a proteínas plasmáticas [6].

2.1.3 Metabolismo

Los fármacos y sustancias hidrosolubles pueden eliminarse sin sufrir transformación alguna. Existen sustancias poco ionizadas y más liposolubles, que se filtran por el riñón y pueden reabsorberse por difusión a través de las células tubulorreales. Para eliminar estas sustancias, es necesario su transformación previa en compuestos más polares como los metabolitos, que son productos del metabolismo o biotransformación, que es el proceso mediante el cual las sustancias extrañas sufren cambios bioquímicos para poder eliminarse.

El proceso de biotransformación se lleva a cabo de forma secuencial en dos fases o etapas. En la fase I se unen sustituyentes a la molécula o se liberan en ella grupos funcionales que aumenten su ionización e hidrosolubilidad. Las reacciones de esta fase son reacciones no sintéticas que pueden producir activación, cambio de actividad o inactivación del compuesto original. Al producto resultante se acoplan en la fase II compuestos endógenos poco liposolubles, como ácido glucurónico, ácido acético o ácido sulfúrico, que aumentan el tamaño de la molécula. Con ello, en general, se inactiva el fármaco y también se incrementa su hidrosolubilidad, facilitándose, en consecuencia, su excreción por la orina o la bilis. Así, en la fase II sólo se producen reacciones de síntesis o conjugación.

El sistema enzimático más utilizado en el metabolismo de fármacos está constituido por enzimas oxidativas del retículo endoplásmico liso hepático. La liposolubilidad del fármaco es determinante para que sea metabolizado por los microsomas hepáticos, pues la molécula debe acceder a las membranas que los conforman [6].

2.1.4 Excreción

Se denomina excreción de fármacos a la salida de éstos y de sus metabolitos desde el sistema circulatorio al exterior del organismo. Las vías de excreción principales son el riñón, el pulmón, y el sistema hepatobiliar. El riñón es el órgano más importante para la excreción de la mayoría de los fármacos y el pulmón lo es para gases y fármacos volátiles. Las sustancias excretadas en las heces son principalmente fármacos ingeridos no absorbidos o metabolitos excretados en la bilis y no reabsorbidos en el tubo intestinal [7].

2.1.4.1 Excreción renal

La excreción de medicamentos y metabolitos en orina lo constituyen tres fenómenos: filtración glomerular, secreción tubular activa y reabsorción tubular pasiva. El principal órgano de excreción es el riñón, órgano irrigado que recibe el 25 % del gasto cardíaco. Esta vía de excreción es particularmente relevante para fármacos que se eliminan de forma inalterada o como metabolitos activos.

Diversos procesos están involucrados en el acceso de los fármacos a la orina. El plasma sanguíneo se filtra completamente en los capilares del glomérulo renal. Cada riñón contiene cerca de un millón de nefronas; una de las cuales se ilustra de manera esquemática en la figura 4. Cada nefrona consta de un componente filtrador esférico, denominado *corpúsculo renal*, y un túbulo que se extiende desde este último. El corpúsculo renal es el encargado de la etapa inicial de la formación de orina: la separación, a partir del plasma, de un líquido filtrado libre de proteínas [7].

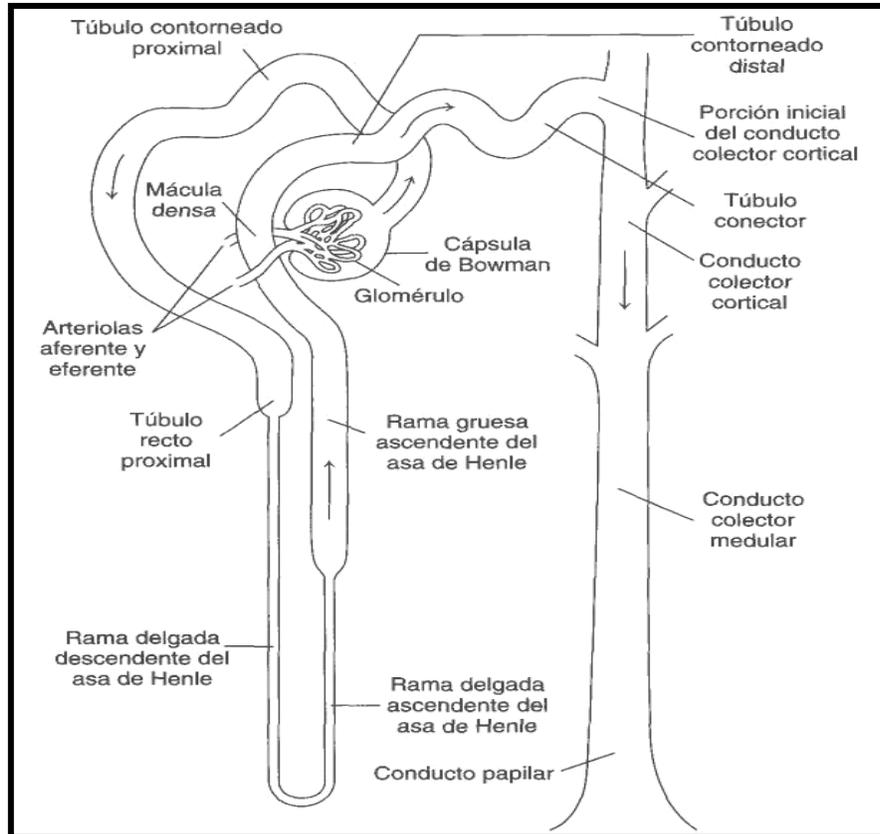


Figura 4. Relaciones de las partes que componen una nefrona de asa larga, que se "desenrolló" para exponerla con claridad (las longitudes relativas de los diferentes segmentos no se ilustran a escala). La combinación de glomérulo y cápsula de Bowman constituye el corpúsculo renal [6].

2.1.4.1.2 Riego sanguíneo de las nefronas

La sangre ingresa a cada riñón por la arteria renal, que luego se divide en ramas cada vez más pequeñas: interlobares, arqueadas y por último radiales corticales (arterias interlobulares). Conforme cada una de las arterias radiales corticales se proyecta hacia la superficie externa del riñón, nacen de ellas series de arterias aferentes paralelas en ángulos rectos, cada una de las cuales conduce la sangre

hacia un glomérulo. Obsérvese que estas arterias y sus glomérulos se hallan sólo en la corteza, nunca en la médula, (Ver la figura 5) [7].

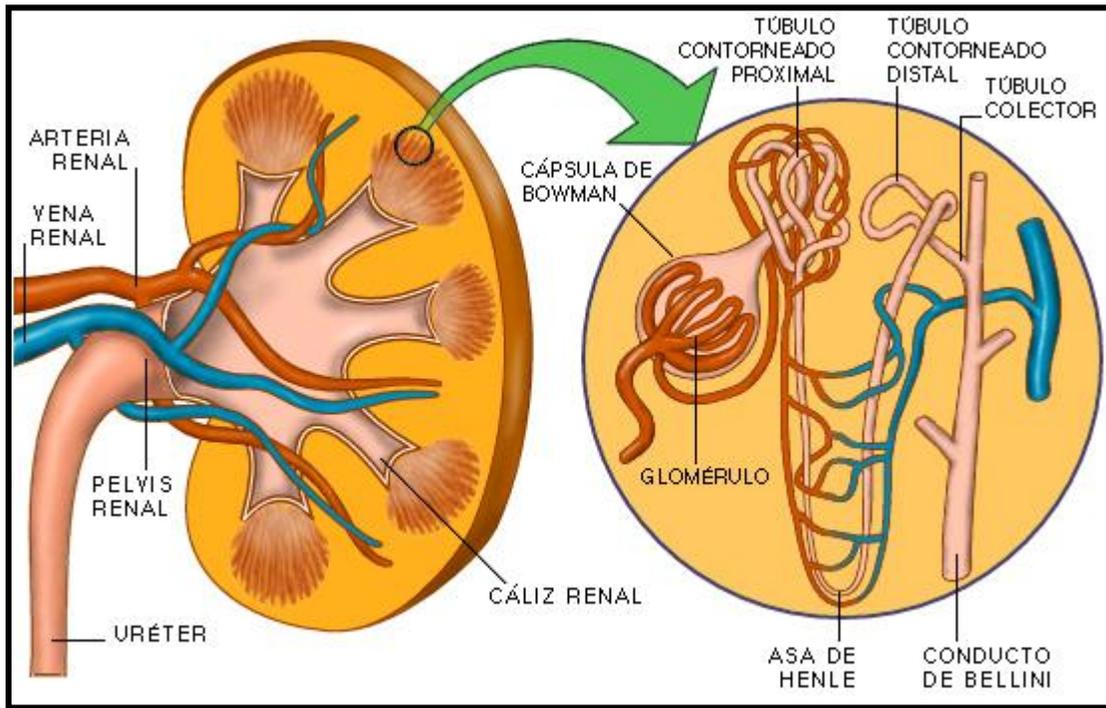


Figura 5.- Anatomía de un Riñón [4].

En condiciones normales cerca de 20% del plasma (y ninguno de los eritrocitos) que entra en el glomérulo se filtran hacia el interior de la cápsula de Bowman. El resto de sangre se dirige a casi todos los otros órganos, los capilares se recombinan para formar los inicios del sistema venoso [7].

Los elementos vasculares que riegan la médula difieren de los que lo hacen con la corteza. Desde los glomérulos yuxtamedulares (los que se encuentran justo por arriba del borde corticomédular) se extienden largas arteriolas eferentes hacia abajo en dirección externa de la médula, donde se dividen para formar haces de

vasos paralelos que penetran en la profundidad medular conocidos como vasos *rectos* descendentes. Se cree que una pequeña fracción de los vasos rectos descendentes se ramifica desde las arterias radiales corticales antes de los glomérulos [8].

Los vasos rectos situados en el exterior de los haces vasculares emiten capilares que rodean las asas de Henle y los conductos colectores en la porción externa de la médula. Los vasos rectos más centrales emiten capilares en el interior de la médula renal. Los capilares de esta zona medular confluyen y se convierten en vasos rectos ascendentes que corren en relación íntima con los vasos rectos descendentes dentro de los haces vasculares. Las propiedades estructurales y funcionales de los vasos rectos son muy complejas. Los inicios de estos vasos son muy semejantes a los de las arteriolas puesto que contienen músculo liso en sus paredes, pero se vuelven cada vez más del tipo capilar a medida que descienden [8].

Los vasos rectos ascendentes cuentan con endotelio fenestrado similar al que se observa en los capilares glomerulares. Por tanto los vasos rectos, además de funcionar como conductos para la sangre, participan en el intercambio de agua y solutos entre el plasma y los fluidos intersticiales. La distribución global de la sangre que fluye de manera paralela en sentidos descendente y ascendente tiene una gran importancia para la formación de orina concentrada porque esto hace que los constituyentes plasmáticos puedan intercambiarse entre los vasos descendentes y ascendentes [8].

2.1.4.1.3 Filtración glomerular

Los capilares del glomérulo renal poseen abundantes poros intercelulares por los cuales pasan todas las moléculas, con excepción de las que tienen un tamaño

muy grande y de las proteínas. Todos los fármacos disueltos en agua plasmática, no unidos a las proteínas y con un peso molecular inferior a 70.000, se filtran en el glomérulo y pasan desde los capilares a la cápsula de Bowman en cantidades que depende de la concentración del fármaco libre en plasma. La edad y las condiciones patológicas pueden condicionar la filtración de los fármacos en el glomérulo renal [6].

2.1.4.1.3.1 Secreción tubular

Las células de los túbulos renales pueden secretar fármacos desde el espacio peritubular a la luz de los túbulos renales. La secreción pasiva se lleva a cabo en la parte proximal del túbulo renal. Para el transporte activo, los fármacos utilizan, sistemas a través de los cuales secretan las sustancias naturales del organismo. Estos sistemas corresponden a dos mecanismos tubulares distintos. Uno secreta un grupo heterogéneo de compuestos, la mayoría de ellos aniones orgánicos (ácidos). Este mecanismo secreta sustancias de producción natural, como el ácido úrico y su función normal es la eliminación de metabolitos como los conjugados de glicina, los sulfatos y los glucurónidos. El otro mecanismo secreta bases endógenas como colina e histamina y diversos cationes orgánicos. Ambos sistemas son relativamente no selectivos, y los iones orgánicos de carga similar pueden competir por el transporte. Pueden ser bidireccionales, de tal forma que algunos compuestos se excretan y se reabsorben activamente [6].

2.1.4.1.3.2 Reabsorción tubular

Los fármacos filtrados por el glomérulo o secretados, que se encuentran en los túbulos renales, pueden ser reabsorbidos por las células del epitelio tubular, volviendo así a la circulación general. Algunos compuestos se reabsorben en forma activa, por lo general los fármacos se reabsorben en forma pasiva en los

túbulos proximal y distal por un proceso de difusión simple. La reabsorción del fármaco depende de su coeficiente de partición lípido/agua y su gradiente de ionización, ya que las células del epitelio tubular se comportan como membranas lipoideas. La reabsorción pasiva de las sustancias ácidas y básicas depende del pH del medio [6].

2.1.4.2 Cinética de Eliminación

La velocidad con que los fármacos se eliminan del organismo es función de una constante, denominada constante de velocidad de eliminación (k_e). Esta constante indica la probabilidad que tiene una molécula de eliminarse en la unidad de tiempo. La constante de eliminación expresa habitualmente la eliminación total del fármaco del organismo, considerando todos los procesos de eliminación. Sin embargo, puede hablarse de una constante de eliminación propia de cada uno de estos mecanismos (biotransformación, excreción renal, entre otros). La constante de eliminación representa la suma de las constantes individuales del metabolismo farmacológico y de la excreción.

Por otra parte, el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) es el tiempo que tarda la concentración plasmática de un fármaco en reducirse a la mitad. Será tanto menor cuando más rápida sea la eliminación del fármaco. Este valor tiene gran importancia para decidir la pauta de administración o intervalos de tiempo en la administración de fármacos y está relacionado con la constante de eliminación mediante la siguiente ecuación: $t_{1/2} = 0.693/k_e$ [6].

2.1.4.2.1 Cinética lineal y no lineal.

La cinética de un fármaco es lineal cuando sus constantes de absorción, biodistribución y eliminación no varían con el tiempo ni tampoco cuando se

modifica la dosis. En este caso, hay una relación lineal entre dosis administradas y niveles estables alcanzados, permaneciendo constante el tiempo que se tarda en alcanzar un estado en equilibrio o estado estacionario [$C_p = f(t)$]. Se dice, por el contrario, que un fármaco tiene una cinética no lineal cuando sus constantes de absorción, biodistribución o eliminación varían con el tiempo o con la dosis [$C_p = f(D)$]. Los mecanismos para la no linealidad pueden afectar a cualquiera de los procesos de absorción, biodistribución o eliminación, pero, generalmente, la cinética no lineal se debe a saturación de la unión con proteínas, metabolismo hepático o transporte activo del fármaco en el riñón [6].

2.3. Nanopartículas de oro (AuNPs).

En épocas antiguas, la síntesis de oro coloidal fue utilizada originalmente como método para pintar cristal. Desde 1850 se dio importancia científica al uso del oro con Michael Faraday. Debido a las características ópticas, electrónicas y moleculares de las nanopartículas de oro se pueden utilizar en áreas de electrónica y nanotecnología. Durante 1 año (1856-1857) Michael Faraday fue el primero en preparar oro coloidal mediante la reducción de cloruro de oro con fósforo para obtener una solución color “rubí”. Faraday mostró mediante ensayos químicos que el oro ya no permanecía en forma iónica y que los reactantes que se disolvían en metales eran capaces de eliminar el color. Su conclusión fue que el oro era dispersado en el líquido de forma finamente dividida, y su presencia podía ser detectada mediante la opalescencia azulada cuando un intenso y estrecho haz de luz atravesaba el líquido [9].

El oro coloidal, conocido como “nanogold”, es una suspensión de partículas clasificadas de oro en un líquido, generalmente agua. El líquido es de un color rojo intenso (para las partículas menos de 100 nanómetros), o un color amarillento

(para partículas más grandes). El color de las nanopartículas hace referencia al tamaño de las mismas; por ejemplo las nanopartículas de tamaño mediano (90 nm) absorben luz de longitud de onda amplia (rojo) y cuando se aglomeran, se agregan entre ellas para dar un color azul.

Se pueden detectar utilizando diferentes técnicas como:

- La microscopia electrónica de alta resolución
- La microscopia óptica:
 - Tinción con Ag (autometalografía): Histoquímica.
 - SPR: Por sus siglas en inglés Surface Plasmon Resonance (resonancia plasmónica de superficie).
 - Síntesis y conjugación a biomoléculas
 - Observando la longitud de onda donde se detecta la mínima toxicidad hepática y renal (sitios de acumulación).

La preparación de las nanopartículas de oro es sencilla, se obtienen sistemas coloidales monodispersos estables con un tamaño entre uno y cien nanómetros y una distribución de tamaño homogéneo. Existen documentos en donde se mencionan diferentes preparaciones para la obtención de nanopartículas de oro utilizando diversas técnicas, donde hacen resaltar la diferencia en el tamaño, la forma y las propiedades físicas de las mismas. Algunos ejemplos de estas nanopartículas de oro son: nanoesferas, nanocilindros, nanocubiertas, nanojaulas, y nanopartículas ^[10].

Según Brust y cols., en 1995 la síntesis de nanopartículas de oro derivadas con grupos tiol en un sistema líquido es estable, comprobaron que la relación de citrato/oro y la velocidad a la cual se adiciona el agente reductor puede influir en el tamaño de las nanopartículas de oro obtenidas: Cuanto más rápida es la adición

del agente reductor, más pequeñas y monodispersas son las nanopartículas de oro ^[11].

El uso de nanopartículas representa un ícono importante en el área de la investigación sobre todo en el campo de los sistemas de liberación de fármacos, ya que estos sistemas permiten dirigir una amplia variedad de biomoléculas a los distintos tejidos utilizándose como sistemas de liberación sostenida. Una de las ventajas de su uso son las siguientes: minimizan la degradación del principio activo, incrementan su tiempo de vida media en el interior del órgano blanco y disminuyen su toxicidad.

El término nanopartículas incluye a las nanocápsulas y nanoesferas. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los que el fármaco se localiza en el interior de la partícula, generalmente disuelto en un vehículo oleoso. Las nanoesferas, en cambio, son sistemas de tipo matricial donde el fármaco suele encontrarse encapsulado en el interior de la matriz, (Ver figura 6).

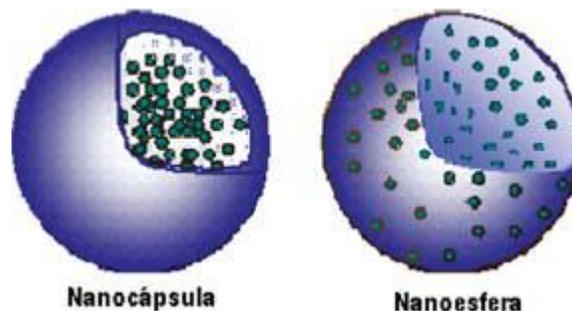


Figura 6.-Dibujo esquemático de una nanocápsula y una nanoesfera ^[12].

Dentro de la nanotecnología, la búsqueda de polímeros para aplicaciones biomédicas ha experimentado un importante avance en las últimas tres décadas.

Sobre todo, el estudio y desarrollo de polímeros y de péptidos sintéticos como componentes importantes de matrices utilizadas como vectores de moléculas terapéuticas. Dentro de los polímeros sintéticos destacan los poliésteres debido a su biodegradabilidad y a su biocompatibilidad y los péptidos derivados de la somatostatina [8]. Los polímeros y los péptidos empleados para formular las nanopartículas son factores que influyen en las propiedades fisicoquímicas y estructura de las partículas y condiciona sus posibles aplicaciones, así como la vía de administración [13]. Tal es el caso de las microesferas del octapéptido Lanreótido pues constituyen una formulación de liberación prolongada, en la que el péptido se encuentra encapsulado en un copolímero perfectamente biocompatible que es biodegradable, debido a su acción inhibitoria específica por la secreción de la somatotropina debido a su afinidad selectiva por los receptores de somatostatina de tipo 2 y 5 que permite una liberación del principio activo durante varios días [12].

2.3.1 Propiedades físicas y químicas de las Nanopartículas de Oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN.

Las nanopartículas de metales nobles, y más específicamente las nanopartículas de oro (AuNPs), presentan propiedades físicas, químicas y biológicas, que son intrínsecas a su tamaño. Por tal razón son elementos que pueden ser optimizados en la práctica para la funcionalización con diferentes moléculas como los péptidos [7]. Tal es el caso del octapéptido cíclico Lanreótido que es un análogo de la somatostatina de tiempo de vida media más prolongada que la hormona natural. Se ha demostrado que el Lanreótido administrado dos veces al mes en forma de microesferas es tan eficaz como la administración de la solución del péptido por vía subcutánea 3 veces al día [14].

Así mismo, es conocido que las nano estructuras catiónicas presentan mayor toxicidad que las aniónicas: las Nanopartículas aniónicas con núcleo de tamaño 2

nm son prácticamente menos tóxicas mientras que las equivalentes catiónicas son moderadamente tóxicas encontrándose la toxicidad probablemente relacionada con la lisis celular (mediada inicialmente por una unión electrostática) dependiente de la concentración [15].

Otra gran peculiaridad de las nanopartículas (AuNPs) son sus propiedades ópticas y fototérmicas pues estas provienen de las oscilaciones resonantes de sus electrones libres en presencia de luz (Resonancia localizada de plasmón de superficie), gracias a la cual las nanopartículas pueden radiar luz o absorber luz que se transforma rápidamente en calor es por ello que las nanopartículas de oro presentan una coloración rojo vino [16].

Por otra parte las AuNPs presentan una gran área superficial, por lo que pueden ser fácilmente funcionalizadas y bioconjugadas, modificando sus propiedades superficiales. El péptido Lanreótido tiene una estructura compuesta por ocho aminoácidos ciclados por un puente disulfuro entre las dos cisteínas, donde se ha sustituido el Thr (Triptófano) por un isómero dextrógiro que permite acotar la afinidad del análogo por los receptores con actividad biológica lo que le permite aumentar su resistencia a las peptidasas [14] y unirse a otros compuestos.

2.4 Parámetros Farmacocinéticos

La farmacocinética de un nanofármaco se resume con la determinación de parámetros relacionados con el comportamiento del fármaco en el organismo, mejor conocidos como parámetros farmacocinéticos, los cuales representan valores constantes que difirieren de sujeto a sujeto. Los más importantes son la constante de eliminación (k_e), tiempo de vida media de eliminación ($t_{1/2}$), Volumen de distribución (Vd), la depuración (CL) y tiempo máximo de eliminación ($t_{\text{máx. exc}}$).

Los cuales se definen de la siguiente manera considerando los factores por los cuales pueden ser modificados:

2.4.1 Constante de eliminación (ke): Expresa el porcentaje de fármaco eliminado. Es una medida de eliminación del fármaco y esta puede ser afectada por el tiempo de vida media del fármaco ^[17].

2.4.2 Tiempo de vida media ($t_{1/2}$): Es el tiempo necesario para eliminar el 50% del fármaco administrado del organismo. También puede definirse como el tiempo en que tarda la concentración plasmática en reducirse a la mitad ^[18].

Este parámetro nos permite conocer el periodo que permanece el fármaco en el organismo y la frecuencia de administración. El tiempo de vida media se va a ver influenciado por la biodistribución del fármaco desde la sangre a los tejidos y por la eliminación del fármaco a través del hígado y el riñón ^[19].

2.4.3 Volumen de distribución (Vd): Es el volumen en el que se biodistribuye un fármaco después de su administración i.v, relaciona la cantidad de fármaco en el organismo con la concentración del fármaco en la sangre o en el plasma. Una propiedad importante del Vd es que para cada fármaco en condiciones biológicas definidas (lactancia, patología, edad) el valor del Vd es constante y por lo tanto en cada una de esas condiciones las concentraciones plasmáticas son proporcionales a la cantidad administrada. Este parámetro dio origen al concepto de sistemas farmacocinéticos lineales como se representa (Ver figura 7). La principal utilidad del Vd reside en el cálculo de una dosis en función de la concentración plasmática ($Cp_0=D/Vd$) ^[17].

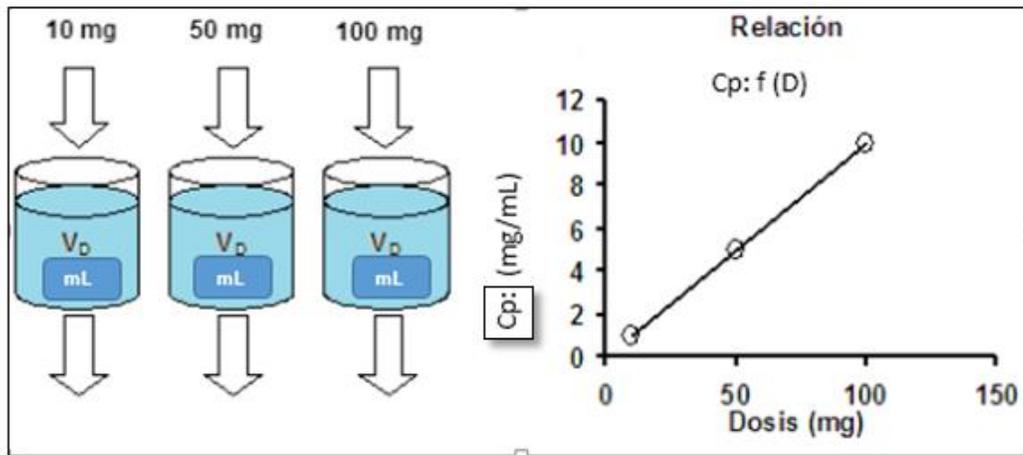


Figura 7. Representación gráfica de la relación lineal entre dosis de medicamento administrado y concentración plasmática obtenida ^[17].

El volumen de distribución (V_d) permite planificar el régimen de dosificación que depende del tamaño de los compartimientos de agua corporal (vascular, intersticial e intracelular), del tamaño del compartimiento lipídico, formado por el tejido adiposo, membranas celulares y tejidos del Sistema Nervioso Central (SNC), de la unión del fármaco a las proteínas plasmáticas y tisulares y de los factores hemodinámicos como el gasto cardíaco y el flujo sanguíneo regional ^[18, 19].

2.4.4 Depuración (CL): Es el volumen de plasma que se elimina del fármaco por unidad de tiempo y se define como el producto del volumen de distribución por la constante de eliminación. Es decir como la concentración de un fármaco en plasma, suero o sangre es medida mediante la pérdida de la misma con respecto al tiempo, la velocidad de eliminación depende de la concentración del fármaco en el organismo en la cual se lleva a cabo la eliminación. Por eso es un parámetro que relaciona la velocidad de eliminación con respecto a la concentración plasmática, sérica o sanguínea del fármaco ^[17].

2.4.5. Tiempo de máxima excreción ($T_{m\acute{a}x. exc.}$): Se define como el tiempo en el cual se ha excretado en el organismo más del 99.9 % del fármaco inalterado. Tiene relación con el tiempo de vida media y la constante de eliminación, así como de la depuración de los fármacos ^[17].

2.5. Monitoreo de muestras.

El monitoreo de muestras plasmáticas, constituye la forma más habitual de llevar a la rutina clínica los conceptos de la Farmacocinética. Así, el monitoreo de fármacos hace referencia a la técnica de control terapéutico basada en la medida de las concentraciones de los fármacos en fluidos biológicos mediante la aplicación de los principios de la farmacocinética siendo esta, pieza fundamental en la resolución de numerosos problemas terapéuticos, sabiendo que su objetivo fundamental es la individualización de la posología de fármacos con estrecho margen terapéutico ^[15].

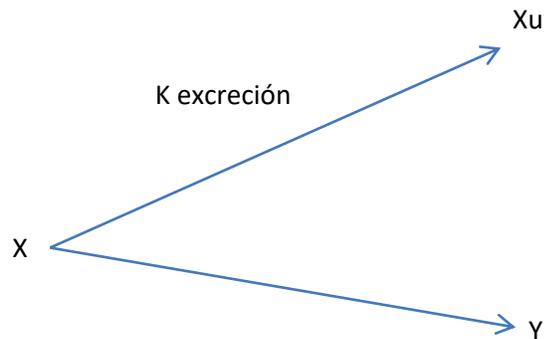
La finalidad de realizar un monitoreo de muestras plasmáticas es determinar la correlación entre niveles en plasma del fármaco y su respuesta farmacológica, así como la concentración del fármaco y sus metabolitos con respecto al tiempo, considerando la biodistribución del fármaco en el organismo y en los tejidos corporales. Así mismo, los análisis de la eliminación del fármaco en orina y la excreción de fármacos por heces nos proporciona información indirecta de la cantidad del fármaco que entra y sale del organismo de acuerdo a la dosis administrada del mismo. Por ejemplo, la recuperación del fármaco libre en la orina después de una administración i.v y la contribución de una ruta renal a la eliminación (método de velocidad de excreción), se pueden estudiar mediante estos mecanismos ^[15].

2.6 Método de velocidad de excreción

El principio de este método es predecir niveles plasmáticos de dosis múltiple en sistemas lineales y un procedimiento simple para calcular dosis de ataque. Este método proporciona valores estimados de niveles del fármaco en plasma en un régimen de dosificación por dosis múltiple a cualquier tiempo de muestreo y no tan solo el valor medio en estado estacionario ^[5].

El método de velocidad de excreción también puede aplicarse directamente a datos primarios sin recurrir al análisis farmacocinético. Da respuestas correctas para un sistema lineal cuando se administran regímenes de dosis múltiples, siempre que todos los elementos del sistema permanezcan constantes [1,5].

En este proyecto de tesis se consideran los datos obtenidos en la simulación utilizando muestras de orina humana. El fundamento de este método se basa en la determinación de la cinética de eliminación de un fármaco, en este caso de las nanopartículas (AuNPs) y del conjugado AuNPs- LAN a partir de datos de excreción urinaria considerando que una parte del fármaco se debe eliminar de forma inalterada, lo cual está representado por el siguiente modelo:



Donde X_u es la cantidad del fármaco eliminado por vía renal, y Y es la cantidad del fármaco eliminado por vía extrarenal [1,5].

La constante de velocidad representa la suma de las constantes de velocidad individuales que caracterizan a los procesos de eliminación.

La fórmula que representa la velocidad de eliminación del fármaco no biotransformado es:

$$\ln d X_u / dt = \ln K_{exc} * X_0 - k_e t$$

En la cual la pendiente $m = -k_e$.

Las velocidades de excreción determinadas experimentalmente no son velocidades instantáneas ($d X_u/dt$). Si no velocidades medias en un período finito de tiempo ($\Delta X_u / \Delta t$).

En este método, la velocidad de excreción se aproxima mucho a la velocidad instantánea en el punto medio del intervalo de recolección urinaria. Entonces, podemos ver que la aplicación del método depende de los intervalos de recolección de orina y de los tiempos de recolección relacionados con el tiempo de vida media del fármaco ^[1,5].

III. JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado que las AuNPs presentan una baja toxicidad y pueden ser modificadas mediante su funcionalización con múltiples ligandos, con la finalidad de obtener nano sistemas óptimos para las distintas aplicaciones terapéuticas específicamente las nanopartículas AuNPs y de los nano conjugados para su posible aplicación en clínica ^[11].

Investigaciones *in vivo* indican que AuNPs son captadas por las membranas celulares mediante un mecanismo de endocitosis. Explicando su biodistribución *in vivo* mediante un modelo biológico de ratones a los que se les administró por vía intravenosa e intraperitoneal AuNPs. Por otra parte se conoce que las AuNPs son internalizadas principalmente por las células Kupffer en el hígado y en, menor medida, por los macrófagos existentes en otros órganos como el bazo.

Una de las ventajas de utilizar las AuNPs es que dentro del organismo no parecen atravesar la barrera placentaria, ni la barrera hematoencefalica. Además no se observa acumulación en otros órganos analizados como el riñón, cerebro, pulmón, ovarios, placenta o hígado fetal y nanopartículas de menor tamaño (2 nm) parecen ser eliminadas no sólo por endocitosis macrofágica sino también por simple filtración glomerular en orina ^[20].

En el mismo sentido se ha demostrado que las características superficiales de las AuNPs influyen en su toxicidad dentro del organismo. Por ejemplo, las nano estructuras catiónicas presentan mayor toxicidad que las aniónicas, y en base al tamaño de partícula se ha demostrado que nanopartículas menores a 2 nm no son tóxicas. Las nanopartículas catiónicas son moderadamente tóxicas, ya que, provocan lisis celular (mediada inicialmente por la unión electroestática dependiente de la concentración) ^[21].

Considerando que el riñón es el principal órgano depurador o filtro del resto de los productos de desecho. Es de suma importancia conocer el proceso de eliminación por el cual una sustancia pasa desde el medio interno hacia el exterior. La eliminación de los fármacos se lleva a cabo, a su vez, mediante los procesos de metabolismo o biotransformación y excreción. Por lo anterior, en estudios de farmacocinética es importante considerar muestras plasmáticas para cuantificar y cuando se desconoce un procedimiento adecuado para el monitoreo de muestras plasmáticas o bien no es confiable, se pueden tener alternativas utilizando otra metodología que permita determinar la farmacocinética de un fármaco. En este caso se aplicó un método conocido como “método de velocidad de excreción” para determinar los parámetros farmacocinéticos de un nuevo conjugado en estudio (AuNPs-LAN) y de AuNPs utilizando muestras de orina, con el fin de conocer el comportamiento *in vitro* de los sistemas en estudio.

Finalmente hoy en día, no existen reportes del comportamiento de estos compuestos en el organismo, por lo cual este trabajo brinda información fiable para diseñar nuevos experimentos útiles para determinar parámetros de excreción de estas entidades químicas *in vivo* e *in situ*. Además la información plasmada en este proyecto permite seguir la investigación encaminada a la biotecnología aplicada en Biofarmacia.

IV. HIPÓTESIS

En los procesos de eliminación de un fármaco se establece el mecanismo de excreción. En el caso particular de las biomoléculas en estudio (AuNPs y AuNPs-LAN) se considera que deben tener una vía de eliminación, es decir, un mecanismo abierto donde la cinética de eliminación es de primer orden, entonces mediante el seguimiento de la excreción de los nanofármacos se puede determinar de forma indirecta las concentraciones de los mismos en muestras de orina, aplicando el método de velocidad de excreción *in vitro* para conocer los parámetros farmacocinéticos importantes como la depuración (CL), la constante de velocidad de eliminación (k_e), el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), el tiempo de máxima excreción ($t_{m\acute{a}x. exc.}$) y el volumen de distribución (Vd) con el fin de conocer el comportamientos de estos compuestos en el organismo “simulado”.

V. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICO

OBJETIVO GENERAL:

Aplicar el método de velocidad de excreción de AuNPs y del Au-LAN siguiendo una simulación *in vitro* en muestras de orina de humano para la determinación de parámetros farmacocinéticos.

OBJETIVO ESPECÍFICO:

Aplicando en método de velocidad de excreción:

- 1.-Determinar el perfil farmacocinético de las nanopartículas (AuNPs) y el conjugado Au-LAN, siguiendo su comportamiento de ambos compuestos en una simulación *in vitro*.
- 2.- Evaluar la excreción de los sistemas nanoestructurados en estudio en base a los valores de los parámetros farmacocinéticos calculados (k_e , $t_{1/2}$, CL, V_d y $t_{máx\ exc.}$) utilizando métodos gráficos y mediante el programa *WinNonlin*.
- 3.- Realizar el ajuste de datos experimentales considerando el comportamiento farmacocinético de las AuNPs y del conjugado AuNPs-LAN *in vitro*, utilizando modelos exponenciales asumiendo que la eliminación sigue una cinética de primer orden.

VI. METODOLOGÍA

6.1 Productos y reactivos

- Solución salina fisiológica de laboratorios Pisa
- Ácido cloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) de *Sigma*-Aldrich
- Citrato trisódico de *Sigma*-Aldrich
- Estándar de oro (AuNPs de oro de 5 nm de diámetro)

6.2 Equipo

- Espectrofotómetro UV- mini 1240.
- Espectrofotómetro GENESYS 10S UV Visible.
- Parrilla Thermo Scientific Model No. SP1316356.
- Refrigerador Tor Rey Modelo R-16.
- Centrifuga Science ED D1008.
- Campana de flujo laminar (labconco 800-522-7658).
- Pipeta volumétrica Kimble Chase 5 mL y 10 mL.
- Tubos de ensaye Pyrex 13x100 mL.
- Microtubo con tapa transparente de 2 mL CRM Globe.
- Vaso de precipitado Pyrex 50 mL.
- Botella de Mariotte.
- Matraz de destilación Kimble Chase.

- Barra magnética spinbar.
- Agitador de vidrio 30 cm Pyrex.
- Espátula acanalada de Pyrex.
- Perilla de succión de tres vías para pipetas de 10 mL Brand.
- Vidrio de reloj 60x15 mm de Pyrex.
- Gradilla para tubos de ensayo Keylab.
- Balanza analítica Ohaus Explorer.

6.3 Obtención de la Síntesis de Nanopartículas de Oro (AuNPs) (Método Turkevich-Frens) y del conjugado AuNPs-LAN.

6.3.1 Nanopartículas de oro (AuNPs).

Los métodos para la preparación de nanopartículas son distintos dependiendo de la síntesis y desarrollo de las mismas ^[14]. Aunque en las últimas décadas, se han desarrollado varias técnicas para la formulación de nanopartículas ^[17]. En este estudio se utilizó el método de síntesis Turkevich-Frens modificado por Kimling y reportado por Molina-Trinidad y cols (2011) en un medio acuoso mediante el siguiente procedimiento ^[22]:

Se pesaron 0.034 g de ácido cloroáurico ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) y se llevó a un volumen de 100 mL, de esta solución se tomó 90 mL y se llevó a ebullición, posteriormente se agregaron 5 mL de una solución de citrato trisódico 32 mM, y se mantuvieron en ebullición durante 15 min. La solución obtenida se dejó enfriar a temperatura ambiente y finalmente se midió el pH.

Después, se llevó a cabo un barrido de esta solución para determinar la longitud de onda óptima ($\lambda=523$ nm).

6.3.2. Conjugado AuNPs-LAN.

Para el conjugado con citrato, se tomó 5 mL de la solución de nanopartículas de oro y se agregaron 3 mL del péptido Lanreótido y finalmente se llevó a un volumen de 20 mL con agua desionizada estéril y libre de pirógenos. Posteriormente, se colocó en agitación constante durante 30 min. Se ajustó a un pH=9 con una solución de carbonato de potasio 0.1 N.

6.4. Determinación del perfil farmacocinético siguiendo una simulación *in vitro* de nanopartículas de Oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN.

Se realizó una simulación de nanopartículas de Oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN en orina humana.

Procedimiento

Se empleó una botella de Mariotte y se llenó con 3.5 L de orina humana, colocando el soporte universal y ayudándose de las pinzas de nuez, después se sujetó el matraz de vástago y al mismo tiempo se sostuvo sobre la superficie de una parilla.

Se colocó una probeta graduada de 250 mL en la salida de matraz de vástago para recolectar la muestra. Así mismo se colocó la botella de Mariotte a una distancia en la que el flujo de agua cayera sobre el matraz de vástago para hacer fluir la orina (20 mL/ min).

Enseguida se agregó 1 mL de AuNPs y de AuNPs-LAN respectivamente, en el matraz de vástago, se abrió el sistema de venoclisis y se comenzó a monitorear a los siguientes tiempos de muestreo: 3,6,9,10,13,16,20,23,26,29,30,33,36,40,43,46,50,53,56,60,63,66,70,73,76,80,83,86,90,93,96 y 100. Acto seguido, en un tubo de ensaye se tomó la muestra correspondiente a las concentraciones plasmáticas (Ac) al tiempo 3 (minutos) y

enseguida se tomó la muestra de orina (Au) de los 3 minutos, y se siguió monitoreando sucesivamente de la misma forma como se menciona anteriormente hasta el término del monitoreo en base a los tiempos estipulados. Entonces se midió el volumen obtenido y a ese tiempo se midió la respuesta (absorbancia) en un espectrofotómetro GENESYS 10S UV-Visible y el espectrofotómetro UV- mini 1240 a la longitud de onda determinada ($\lambda=523$ nm) en celdas de cuarzo.

Se graficó el perfil farmacocinético obtenido.

Se realizó el ajuste de los datos en base al perfil farmacocinético obtenido utilizando el programa *WinNonlin*.

Para el conjugado AuNPs-LAN se realizó el mismo procedimiento

Con respecto a la reproducibilidad; se realizó la simulación de AuNPs en orina por cuadruplicado y de Au-LAN por duplicado en días diferentes teniendo en común las mismas variables.

6.5 Determinación de parámetros farmacocinéticos.

6.5.1. Cálculo de la constante de eliminación (k_e).

Se realizó el cálculo de la constante de eliminación conociendo que:

$$k_e = CL/V_d$$

6.5.2 Cálculo del tiempo de vida media ($t_{1/2}$): Se identificó el tiempo necesario para que la concentración de las nanopartículas y del conjugado llegara a la mitad. Mediante la fórmula:

$$t_{1/2} = \ln 2/k_e$$

6.5.3 Cálculo del volumen de distribución (V_d): Se obtuvo la cantidad del fármaco que se encuentra en la simulación *in vitro* en ese instante (dosis administrada).

Con el cálculo del volumen de distribución con la fórmula:

$$Vd = D/Cp^{\circ}$$

6.5.4 Cálculo de la depuración (CL): Se reportó la depuración del fármaco por unidad de tiempo con la fórmula:

$$CL = Vd * ke$$

6.5.5 Tiempo de máxima excreción (T máx exc.): Se reportó el tiempo de máxima excreción definido como:

$T_{\text{máx exc.}}$ = tiempo en el cual se acumula la mayor cantidad del fármaco

6.6 Método de velocidad de excreción *in vitro* de nanopartículas de Oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN.

Las muestras de orina de humano se obtuvieron de 3 voluntarios masculinos (edad 20 ± 8 años, sanos). Del periodo Agosto-Diciembre 2012 donde el promedio de muestra fue de 500 ± 1 mL de orina.

El método consiste en realizar un monitoreo como se explicó en la simulación *in vitro* (sección 6.4). Para la aplicación de este método se consideran tiempos promedios y la medición del volumen de orina para poder determinar los parámetros farmacocinéticos como se explica en la parte teórica donde se fundamenta el método de velocidad de excreción (sección 2.6)

Al aplicar el método se determinó la cantidad acumulada y los tiempos promedios del nanofármaco en orina. En la tabla 1 se reporta la respuesta correspondiente a las sustancias en estudio.

6.7. Análisis estadístico (Prueba Q de Cochran)

Se aplicó la prueba de Q de Cochran ^[23] para los datos obtenidos de la aplicación del método de velocidad de excreción y del ajuste de datos del programa *WinNonlin* ocupando variables dicotómicas, X=1 (Igualdad), X= 0 (desigualdad) que se utilizaron para probar si hay diferencias entre las k muestras emparejadas respecto al método de velocidad de excreción para visualizar diferencias significativas en los parámetros determinados.

VII. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis se presentan a continuación.

7.1. Síntesis de nanopartículas de Oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN.

El oro coloidal, conocido como “nanogold” es una suspensión de partículas clasificadas de oro en un líquido, generalmente en agua. El líquido es de un color rojo intenso. El color de las nanopartículas hace referencia al tamaño de partícula, ya que entre más intenso sea el color de la solución, entonces el tamaño de partícula es menor como se muestra en la figura 8, donde indicamos el color característico de la nanopartículas de oro obtenidas (matraz volumétrico).



Figura 8.- Color característico de las nanopartículas dependientes del tamaño.

El tamaño de partícula obtenido fue de 5 ± 0.1 nm, como se confirma en la microfotografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión o de alta resolución (TEM) donde (A) representa las AuNPs en un área de 100 nm y en un área de 10 nm (B) y por dispersión de luz dinámica (DLS). Así mismo los espectros obtenidos por espectrofotometría UV-vis de los compuestos en estudio se muestran en la figura 9.

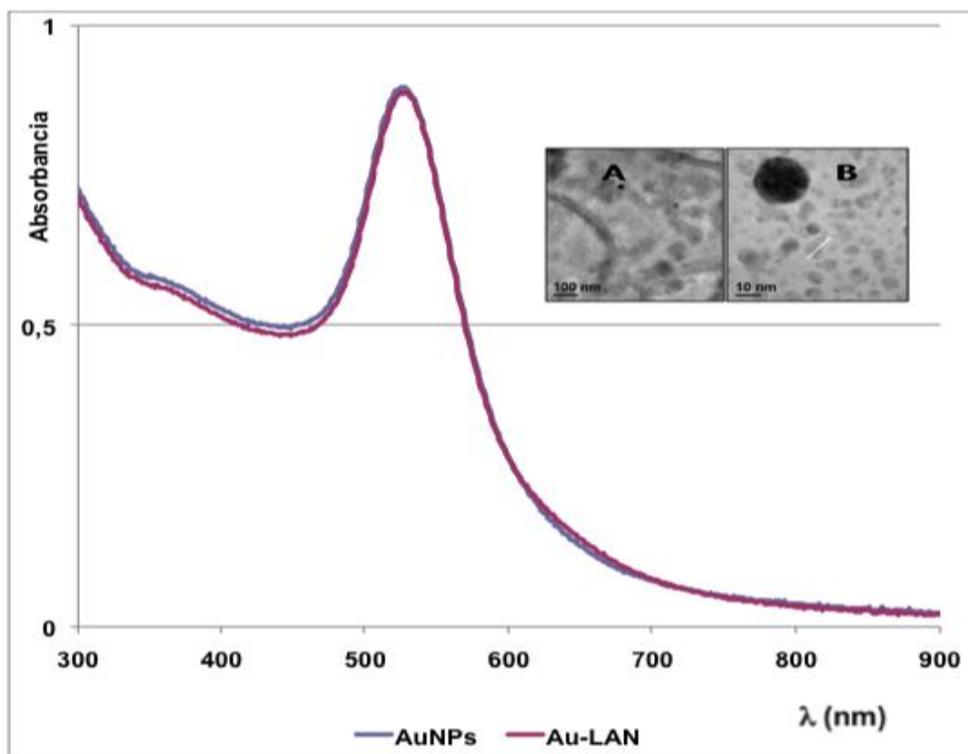


Figura 9- Representación de espectros obtenidos por espectrofotometría UV- visible de las nanopartículas de oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN, en donde se visualiza el tamaño de partícula (A) en un área de 100 nm y (B) en un área de 10 nm, realizado por microscopía de alta resolución (TEM).

7.2. Comportamiento *in vitro* de las nanopartículas de oro (AuNPs) y del conjugado Lanreótido (AuNPs-LAN).

El principio fundamental de realizar una simulación *in vitro* mediante una botella de Mariotte es lograr simular el comportamiento del fármaco en el organismo. La botella de Mariotte representa el fluido biológico, el cual contiene un volumen de líquido determinado (en este caso orina humana) y donde las moléculas de un fármaco una vez ingresadas se biodistribuyen de manera instantánea logrando concentraciones uniformes en cualquier sitio del mismo. Cada fármaco presenta cierto grado de biodistribución a los tejidos y órganos, y las concentraciones que

se pueden medir en estos pueden ser mayores o menores a las concentraciones plasmáticas. Así, la botella de mariotte es un modelo que por su simplicidad es una herramienta didáctica poderosa para calcular y comprender el significado de los parámetros farmacocinéticos.

El procedimiento se realizó 4 veces para las nanopartículas de oro (AuNPs) y 2 veces para el conjugado Lanreótido (AuNPs-LAN). La siguiente figura se muestra la representación de la simulación *in vitro* de las nanopartículas de oro (AuNPs) y del conjugado lanreótido (AuNPs-LAN), utilizando la botella de Mariotte.

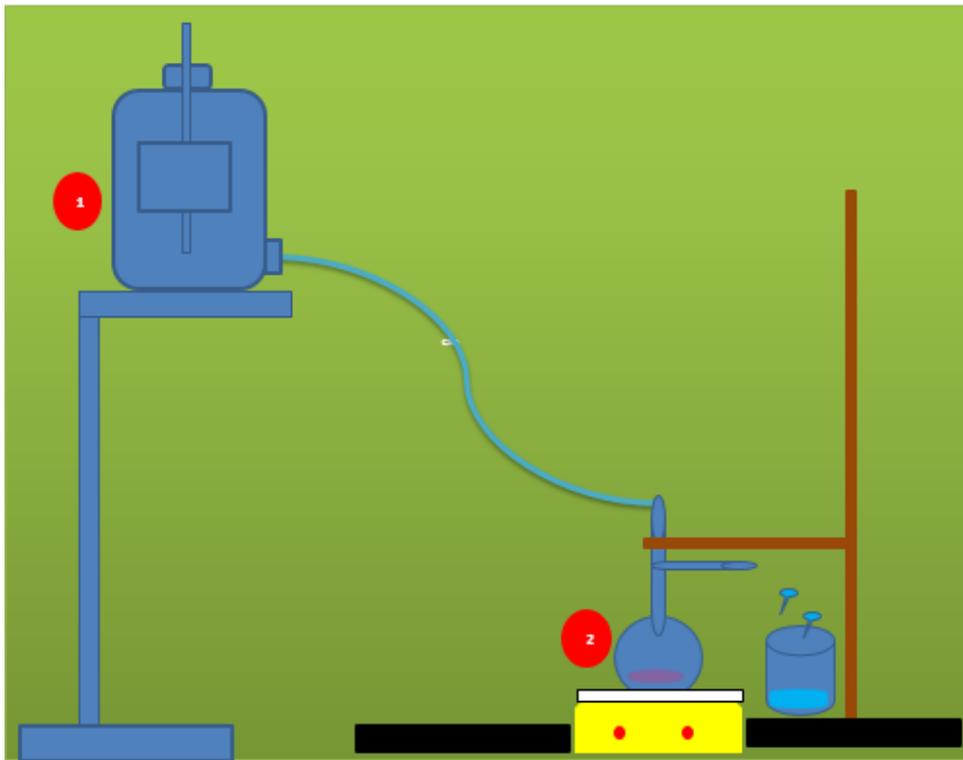


Figura 10. Representación esquemática del modelo abierto un compartimiento *in vitro* utilizado para el estudio farmacocinético de las nanopartículas de oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN.

1.- Botella de Mariotte 2.- Matraz de vástago

En la siguiente figura se puede observar del comportamiento de las AuNPs de la simulación *in vitro* (n=4).

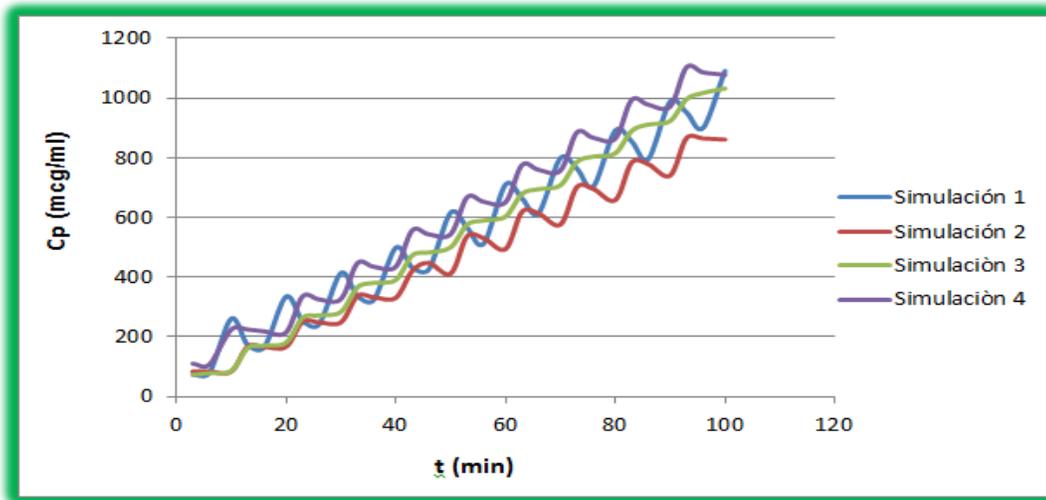


Figura 11.- Representación gráfica de la aplicación del método de velocidad de excreción de las nanopartículas de oro (AuNPs).

En la siguiente figura se puede observar del comportamiento de las AuNPs-LAN de la simulación *in vitro* (n=2).

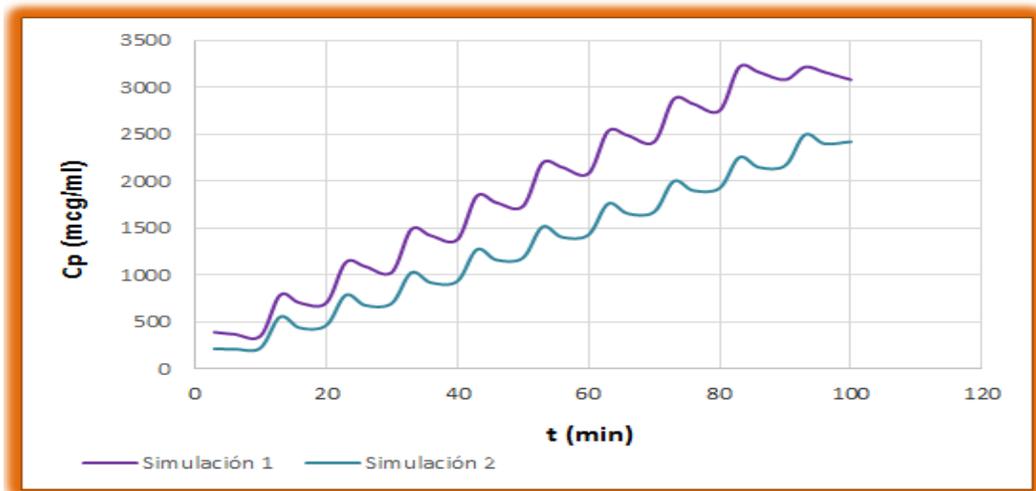


Figura 12.- Representación gráfica de la aplicación del método de velocidad de excreción del conjugado AuNPs-LAN.

7.3. Evaluación de la excreción de nanopartículas de Oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN *in vitro*. (Aplicación del método de velocidad de excreción).

En base a lo mencionado en el apartado VI se llevó a la práctica la aplicación del método de velocidad de excreción reportado en el libro de Farmacocinética Básica de Molina-Trinidad [1] donde se hace mención de la importancia y uso de éste método. En este trabajo se pueden observar los parámetros farmacocinéticos obtenidos en la siguiente tabla donde la constante de velocidad de eliminación (k_e) obtenida de las AuNPs fue de $0.0456 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$ utilizando para el cálculo el método de velocidad de excreción y de $0.0233 \pm 0.0046 \text{ min}^{-1}$ ajustado por el programa *WinNonlin*. La depuración calculada fue $CL = 20.4286 \pm 0.927 \text{ mL/min}$ y $21.165 \pm 0.126 \text{ mL/min}$, utilizando los métodos anteriormente mencionados, para las nanopartículas de oro. Con lo que respecta al conjugado AuNPs-LAN la k_e fue de $0.0478 \pm 0.0025 \text{ min}^{-1}$ utilizando el método de velocidad de excreción y de $0.0295 \pm 0.0097 \text{ min}^{-1}$ ajustado por el programa *WinNonlin*. La depuración calculada fue $CL = 12.0 \pm 0.848 \text{ mL/min}$ y $17.5 \pm 0.234 \text{ mL/min}$ utilizando los métodos anteriormente mencionados.

7.4.-Reajuste de datos experimentales considerando el comportamiento farmacocinético de las nanopartículas (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN *in vitro*.

Tabla 1. Parámetros Farmacocinéticos promedio constantes de las de las nanopartículas de Oro (AuNPs) y del conjugado AuNPs-LAN *in vitro*.

Parámetros	AuNPs-LAN		AuNPs	
	<i>WinNonlin</i>	Método	<i>WinNonlin</i>	Método
ke (min ⁻¹)	0.0295 ± 0.0097	0.0478 ± 0.0025	0.0233 ± 0.0046	0.0456 ± 0.0030
t 1/2 (min)	150.00 ± 69. 60	17.27 ± 3.58	101.0760 ± 55.32	18.35 ± 4.66
CL (mL/min)	17.5 ± 0.234	12.0 ± 0.848	21.165 ± 0.126	20.4286 ± 0.927
Vd (mL)	7128 ± 956.9	257 ± 9.1924	2682 ± 1395	479 ± 66
T máx. exc (min)	7.5 ± 4.25	∞	7.5 ± 4. 2426	∞

7.5 Análisis Estadístico.

7.5.1 Prueba de Q de Cochran.

Sustituyendo en la siguiente ecuación los valores obtenidos de la aplicación del método de velocidad de excreción y del ajuste de datos del programa *WinNonlin* para los sistemas nanoestructurados en estudio se determinó la prueba estadística de Cochran con fundamento en la siguiente ecuación:

$$Q_A = \frac{k(k-1) \sum_{j=1}^k \left(y_j - \frac{y}{k} \right)^2}{ky - \sum_{i=1}^n y_i^2}$$

De esta manera se formularon las hipótesis de prueba para comprobar el grado de significancia de los parámetros farmacocinéticos, utilizando el método de velocidad de excreción y con el ajuste del programa *WinNonlin*, como se describe a continuación.

HO: No existe diferencia significativa con los valores obtenidos de los parámetros farmacocinéticos de las AuNPs y del conjugado AuNPs-LAN con respecto a la aplicación del método de velocidad de excreción y del ajuste de datos *WinNonlin*.

HA: Existe diferencia significativa con los valores obtenidos de los parámetros farmacocinéticos de las AuNPs y del conjugado AuNPs-LAN con respecto a la aplicación del método de velocidad de excreción y del ajuste de datos *WinNonlin*.

Tabla 2.- Valor calculado del estadístico de prueba Cochran (ji cuadrada).

Prueba de Cochran (Q) ∞ : $p = 0.05$		
	Valor calculado	Valor en tablas
Q (χ^2)	0.00393	0.975

VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se llevó a cabo las síntesis de Turkevich-Frens modificado por Kimling en base a lo reportado por Molina y cols. (2011) respecto a la síntesis de nanopartículas de oro, con el fin de darles uso para realizar las simulaciones reportadas en este estudio. Cabe mencionar que la longitud de onda para detectar las AuNPs y el conjugado AuNPs-LAN fue de 523 nm y de 533 nm, respectivamente; en base a reportes publicados [25] se comprueba que en el espectro de absorción del conjugado se observa un desplazamiento a la derecha en la banda de absorción (longitud de onda en el espectro electromagnético) correspondiente al desplazamiento del plasmón de resonancia característico de las AuNPs, lo cual indica que las nanopartículas se unen específicamente con el péptido lanreótido para dar lugar al conjugado AuNPs-LAN y dado que es un nuevo compuesto la longitud de onda de absorción característica del conjugado es mayor (533 nm) que la longitud de onda de identificación de las AuNPs (523 nm), la diferencia es de tan solo 10 nm, lo que indica que son especies químicas diferentes. La reacción que se llevó a cabo en base a la metodología experimental valida la formación de un conjugado estable y muy específico, donde el análisis se realizó por espectrofotometría UV-vis.

La fase experimental donde se mencionan los procedimientos seguidos para realizar la simulación *in vitro* de los compuestos en estudio se llevó a cabo por cuadruplicado en el caso de las AuNPs y para la simulación del conjugado solo se realizó por duplicado. Los perfiles farmacocinéticos obtenidos de las mismas, representan un comportamiento representativo de la administración de los compuestos siguiendo una dosis múltiple (Ver figura 11 y 12) [1, 2 y 21] donde podemos visualizar el comportamiento característico de lo anteriormente mencionado. En base a los resultados de las mismas y a los parámetros farmacocinéticos obtenidos utilizando el método de velocidad de excreción y considerando el ajuste de los datos obtenidos por el programa *WinNonlin*

podemos observar en la tabla 1 que los parámetros farmacocinéticos como la constante de eliminación k_e ($0.0233 \pm 0.0046 \text{ min}^{-1}$) para las AuNPs y k_e ($0.0295 \pm 0.0097 \text{ min}^{-1}$) para el conjugado AuNPs-LAN se puede observar que la velocidad a la cual las AuNPs se eliminan es parecida al dato correspondiente de la constante de eliminación del conjugado, lo cual quiere decir que la velocidad a la cual se eliminan los compuestos en estudio esta delimitada por el comportamiento de las AuNPs en el organismo simulado, es decir las AuNPs se eliminan a una velocidad tal que permite que las nanoparticulas se excreten siguiendo un mecanismo de eliminación sin afectar la velocidad a la cual son excretadas, es decir la eliminación de los compuestos depende de la velocidad a la cual se biodistribuyan y se eliminen. Asi mismo la k_e nos permite interpretar la via y el proceso de eliminación de dichos compuestos asumiendo que la eliminación sigue una cinética de primer orden, considerando que es un sistema abierto en donde existe una ingreso del compuesto en el organismo simulado que tiene que eliminarse por alguna vía (equilibrio de masas), en este caso la eliminación se lleva a cabo por via renal, fundamentando esta afirmación por el valor obtenido del ajuste de datos utilizando el programa matemático *WinNonlin*, donde a simple vista no existe una diferencia significativa respecto a este parámetro y confirmado en base al análisis estadístico realizado aplicando la prueba de Cochran.

Respecto al tiempo de vida media $t_{1/2}$ ($101.0760 \pm 55.32 \text{ min}$) para las AuNPs y $t_{1/2}$ ($150.00 \pm 69.60 \text{ min}$) para el conjugado AuNPs-LAN; se puede observar que existe diferencia en los datos obtenidos, lo cual quiere decir que el tiempo en el cual se llegan a su máxima eliminación las AuNPs es menor que el tiempo en el cual se elimina el conjugado AuNPs-LAN, esto queda manifestado por la permanencia en el organismo de este compuesto, ya que, es mayor el tiempo en que permanece el conjugado en el organismo, probablemente este comportamiento lo definen las características fisicoquímicas del compuesto como

su peso molecular, así como el tamaño de partícula y la forma de las partículas en estudio (AuNPs). Lo mencionado anteriormente es útil para estudiar el comportamiento del nanofármaco en el organismo, ya que entre mayor sea el tiempo en el cual permanece el compuesto en el organismo es más probable que se pueda cuantificar adecuadamente y determinar la concentración plasmática a la cual el fármaco llega a la mitad de su concentración, para determinar los mecanismos de biodistribución y eliminación posibles.

La depuración es otro de los parámetros farmacocinéticos que nos indican la pauta de seguimiento de eliminación de un fármaco, específicamente en este trabajo de tesis aplicando el método de velocidad de excreción, como se había mencionado en la sección 6.2. Los datos reportados de depuración obtenidos indican que para las AuNPs los valores de depuración fueron: $CL = 21.165 \pm 0.126$ mL/min y para el conjugado AuNPs-LAN $CL=17.5 \pm 0.234$ mL/min; lo cual quiere decir que a simple vista existe una diferencia de aproximadamente 4 mL/min, estos datos confirman que el conjugado permanece más tiempo en el organismo y por lo cual su eliminación es más lenta, pues existe una relación directamente proporcional del $t_{1/2}$ y la depuración, esto explica porque las nanopartículas tardan menos tiempo en llegar a la mitad de la concentración plasmática o bien eliminarse, pero permanecen más tiempo en el organismo, probablemente por la infiltración y el tamaño de partícula.

Es sabido que el volumen de distribución es un parámetro fundamental para determinar la capacidad del proceso de biodistribución en el organismo y esta relacionado con la velocidad a la cual el fármaco se elimina y la depuración del mismo, en este caso el volumen de distribución obtenido para las AuNPs fue $Vd=2682 \pm 1395$ mL y para el conjugado AuNPs-LAN $Vd=7128 \pm 956.9$ mL; se puede observar que en base a los valores obtenidos el conjugado AuNPs-LAN se biodistribuye en líquidos intracelulares y extracelulares, lo cual es un factor determinante porque este nos indica que al permanecer a nivel intracelular puede

llegar a lugares específicos de la célula y puede interactuar con organelos específicos dando lugar a una función limitada y muy específica (en base al mecanismo de acción puede actuar a nivel de receptores específicos y atravesar la membrana mediante vectorización dirigida), así mismo puede interactuar fuera de la célula, lo cual también es importante porque nos indicaría específicamente la localización de algún daño en algún órgano a nivel extracelular e intracelular. Por lo anterior, con esta información se confirma la posible utilidad de este parámetro que es muy importante ya que tiene relación directa con la constante de velocidad de eliminación y la depuración. Cabe recordar también que la unión a proteínas influye en el proceso de biodistribución del fármaco en el organismo, por lo cual hacemos saber que en este trabajo no reportamos la unión a proteínas plasmáticas, pero en futuros estudios farmacocinéticos los debemos considerar para evaluar la trascendencia y el alcance de la unión a proteínas y/o tejidos, así como la potencialización de este nuevo compuesto. Aunque es sabido que el fármaco libre o inalterado es el que influye directamente en la respuesta farmacológica y terapéutica, de aquí la importancia de determinar la unión a proteínas de este compuesto. En el caso de las AuNPs el valor obtenido del volumen de distribución es menor (37.64% menor), esto quiere decir que la cantidad inalterada de las AuNPs se biodistribuye a nivel extracelular, permitiendo así confirmar en base a estudios reportados que se pueden utilizar para fines de diagnóstico [24, 25].

Respecto al tiempo máximo excretado $t_{m\acute{a}x.exc} = 7.5 \pm 4.2426$ min para las AuNPs y $t_{m\acute{a}x.exc} = 7.5 \pm 4.25$ min para el AuNPs-LAN, se puede observar que no existe diferencia ya que este valor está limitado por las AuNPs y la excreción de un biosistema depende de muchos factores (sistema de transporte, mecanismo de eliminación y de la variabilidad biológica de cada sistema), este dato aunque no forma parte de los parámetros farmacocinéticos es muy importante porque nos permite visualizar el tiempo en el que la concentración máxima del fármaco es

excretada, o bien la máxima cantidad del fármaco excretada y de esta forma considerar el tiempo de tratamiento de un fármaco, así como el ajuste de dosis en un régimen de dosificación determinado.

En base a lo anteriormente analizado los datos reportados aplicando el método de velocidad de excreción (cálculos realizados mediante una hoja electrónica) indican que los parámetros farmacocinéticos obtenidos no difieren mucho respecto a los datos obtenidos en el ajuste de los mismos utilizando el programa *WinNonlin*. Respecto a la constante de eliminación obtenida donde $k_e=0.0456 \pm 0.0030 \text{ min}^{-1}$ para las AuNPs y $k_e=0.0478 \pm 0.0025 \text{ min}^{-1}$ para el conjugado AuNPs-LAN se puede observar que no existe una diferencia entre los valores obtenidos, lo cual quiere decir, como se explico anteriormente, que la velocidad a la que el conjugado y las AuNPs se eliminan es aproximadamente la misma. Respecto a los datos reportados por el programa *WinNonlin* el valor obtenido no es el mismo pero se observa en mismo comportamiento para el conjugado y para las AuNPs. Considerando que el ajuste de datos es más preciso los datos determinantes para el análisis fueron los reportados por el programa.

El tiempo de vida media obtenido mediante estos cálculos indican que si existe una diferencia significativa en los datos reportados y con los datos obtenidos por el programa *WinNonlin* mencionado con anterioridad, ya que, $t_{1/2}=18.35 \pm 4.66 \text{ min}$ para las AuNPs y $t_{1/2}=17.27 \pm 3.58 \text{ min}$ para el conjugado AuNPs-LAN. Aunque el comportamiento de los dos compuestos es similar aplicando él método, no así con la aplicación del programa. Dado que el tiempo de vida media es un parámetro que nos permite identificar el tiempo a la cual los niveles en plasma de las AuNPs y del conjugado llegan a la mitad de su concentración, consideramos que el dato más confiable es el obtenido en el ajuste utilizando el programa.

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos como la depuración, para las AuNPs $CL=20.4286 \pm 0.927 \text{ mL/min}$ y para el conjugado AuNPs-LAN, $CL=12.0 \pm 0.848$

mL/min; indican que no existe un cambio significativo en los datos obtenidos para este parámetro respecto a los dos métodos de cálculo para obtener el valor de la depuración, lo cual se confirma con el análisis estadístico realizado que se mencionó en la sección 7.5. Confirmamos con los datos reportados respecto a este parámetro que el comportamiento de las AuNPs y del conjugado manifiestan una depuración similar limitado como se menciona anteriormente por la eliminación de las AuNPs.

El valor del volumen de distribución reportados $V_d=479 \pm 66$ mL para las AuNPs y $V_d=257 \pm 9.1924$ mL para el conjugado AuNPs-LAN, muestran que si existe diferencia significativa respecto a los datos reportados en el ajuste (*WinNonlin*), dado que el programa nos permite realizar un ajuste de datos más preciso, este parámetro lo consideraremos para futuros estudios farmacocinéticos. Sabiendo que el V_d es un parámetro importante para la biodistribución de los fármacos en el organismo es importante delimitar los alcances a nivel intracelular y extracelular de los compuestos en estudio ^[26], por tal razón es importante considerar la unión a proteínas como se menciona con anterioridad.

Respecto al valor calculado del tiempo máximo excretado para las AuNPs y para el conjugado no reportamos dato alguno, ya que matemáticamente nos arroja un valor indefinido, lo cual no tiene respuesta biológica.

Finalmente el trabajo experimental realizado se justifica con el uso del programa *WinNonlin*, para ajustar los datos obtenidos en base a la teoría de Lieberman-Newton, la cual minimiza los errores debidos del ajuste matemático obtenido por otros medios (manual o en hojas de cálculo) para el ajuste de datos de sistemas lineales y no lineales, pero esto es solo para determinar la precisión de los parámetros farmacocinéticos obtenidos y la confiabilidad de los mismos. Para fortalecer el cálculo de estos parámetros se realizó la prueba de Cochran, donde en base a la prueba si existe una diferencia significativa con los datos reportados

de los parámetros farmacocinéticos utilizando el método de velocidad de excreción, como el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) y la depuración (CL). Considerando que el valor calculado de Q fue de 0.00393 y el valor de tablas fue de 0.975 donde se demuestra que éste último es mayor que el calculado [$Q (\chi^2) 0.00393 < 0.975, p < 0.05$], justificando así la hipótesis alterna indicada, pues toda investigación experimental requiere que esta cumpla con los objetivos delimitados y con un fin específico para dar confianza a los datos obtenidos y para robustecer el trabajo experimental. Cabe decir que es la primera vez que se reportan éstos datos por lo cual están sujetos a la reproducibilidad.

Por último observamos que los parámetros farmacocinéticos aplicando el método de velocidad de excreción son representativos y permitirá diseñar posteriormente nuevos experimentos que justifiquen los parámetros farmacocinéticos reportados y correlacionarlos con datos *in vivo*. En cuanto al método es importante resaltar su uso, ya que no es muy conocido pero puede ser útil cuando se complica el monitoreo con muestras en plasma o bien el tiempo de monitoreo es corto.

IX. CONCLUSIONES

A través de la aplicación del método de velocidad de excreción se logró determinar el perfil farmacocinético de las nanopartículas (AuNPs) y el conjugado Au-LAN, siguiendo su comportamiento de ambos compuestos en una simulación *in vitro*. Así mismo, se evaluó la excreción de los sistemas nanoestructurados en estudio en base a los valores de los parámetros farmacocinéticos calculados (k_e , $t_{1/2}$, CL, V_d y $t_{\text{máx. excretada}}$) de las AuNPs y del conjugado AuNPs-LAN *in vitro*. También se realizó el ajuste de los datos experimentales siguiendo una simulación de los sistemas nanoestructurados, utilizando modelos matemáticos exponenciales y gráficos, asumiendo que la eliminación sigue una cinética de primer orden mediante el ajuste lineal del programa *WinNonlin*.

Por último se realizó un ajuste de datos utilizando un software matemático para sistemas no lineales (*WinNonlin*) que permitió visualizar el comportamiento de los dos compuestos en estudio minimizando errores propios o inherentes al comportamiento de los mismos considerando el proceso de mínimos cuadrados de Gauss-Newton y de Lieberman-Newton.

X.RECOMENDACIONES

Comprendiendo que los estudios farmacocinéticos son de relevante importancia en los procesos orgánicos cuando se administra un fármaco en el organismo y poniendo de antemano la utilidad de los parámetros farmacocinéticos en la práctica clínica, este estudio forma parte de los estudios reportados en la FEUM, USP y por la FDA en relación a los criterios que se consideran para la realización de la farmacocinética de cualquier fármaco en desarrollo. Propiamente estos dos compuestos (AuNPs y AuNPs-LAN) son especies químicas en estudio con la finalidad de ser considerados como nanofármacos. Por tal razón es relevante en el desarrollo de nuevos fármacos fortalecer la confianza en la efectividad de los mismos asumiendo los criterios que marca la normatividad en lo referente al desarrollo de nuevos fármacos y de los estudios biofarmacéuticos. En este caso en particular se comprueba que las especies nanoestructuradas también pueden utilizarse con fines a la Biomedicina, por lo cual es indispensable conocer el comportamiento de los mismos en el organismo ^[27], mediante simulaciones prospectivas *in vitro* y reafirmando su comportamiento en futuros estudios *in vivo*.

Estos estudios permitirán diseñar nuevos experimentos *in vivo* en la fase pre clínica para dar a conocer las nuevas tecnologías de aplicación en fármacos y su funcionalización como los sistemas de liberación (nanocápsula y nanoesferas) con el fin de calcular la dosis ponderal de dichos nanofármacos en estudio, pues estos sistemas resultan atractivos para su empleo como nuevos tratamientos de enfermedades por la gran versatilidad de los compuestos a encapsular, ya que estas partículas son capaces de incorporar desde pequeñas moléculas de fármaco hasta macromoléculas (como péptidos, proteínas o genes), por la capacidad de proteger la molécula encapsulada así como de liberarla de manera controlada y con una cinética dependiente de la composición de la formulación, además de poder dirigir las partículas al tejido, célula u orgánulo intracelular adecuado

(blancos terapéuticos o células diana), y por el hecho de ser totalmente biocompatibles y biodegradables.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Molina Trinidad EM. Farmacocinética Básica. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, 1ra. Edición, Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, 2011, 110-114.
- 2) Formentini AE. Análisis Farmacocinético y Parámetros Farmacocinéticos. Facultad de Ciencias Veterinarias, 1ra. Edición, Ed. Universidad Nacional del Buenos Aires, Argentina, 2001,1-3.
- 3) Pazo C S. Farmacocinética de los Medicamentos Nuevos Métodos y Criterios para su evaluación. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Diaz de Santos, 2001, 1-5.
- 4) Tesseler, J., Sardi, S., Rothlin, R. Farmacología general: Farmacocinética, Universidad de Buenos Aires, Argentina, 2007. 4-12.

Disponible:
http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacologia/temas_farma/volumen1/cap2_farmacocinet.pdf. Fecha de última visita: 6 Junio 2014.
- 5) Wagner Jhon G. Farmacocinética Clínica, Reverté Barcelona España. 4ta. Edición. Ed. El Manual Moderno, 1983, 57-129.
- 6) Lorenzo, P., Moreno, A., Leza J, C., Lizasoain, I., Moro, M. A. Farmacología básica y clínica. 17 ta Edición. Ed. Panamericana, 2004, 15-57.

7) Thibodeau, G. A. y Parker A. C. Anatomía y Fisiología Humana, 6ta. Edición. Ed. Elsevier España, 2000. 154-163.

8) Eaton, C. D y Pooler, P. J. Vander Renal Physcology University School of Medicine, Atlanta Georgia, 6 ta Edición. Ed. Mc Graw Hill, 2004. 2-6.

9) Chacón M F, Narros C, Serrano Soraya, Introducción a Nanociencia y Nanotecnología en España, Centro de Excelencia en Nuevos Materiales CENM. 2010, 10-14.

Disponible en:

<http://t3innovacion.larioja.org/uploads/media/NanocienciaEnEspana.pdf>

Fecha de última visita: 6 Junio 2014.

10) Marzán, L. L. Nanopartículas para la medicina del futuro, El Mundo es, Unidad Editorial Información General S.L. 2012 12-14.

11) Al-Qadi, S. y Remuñan, L. C. Nanopartículas metálicas de oro. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 2009 223-241.

Disponible en:

<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/994/1028>

Fecha de última visita: 6 Junio 2014.

- 12) Barranco, O. Innovación en Medicina: la Nanomedicina (Parte I), (Review).Salud.com.3.2007.
- 13) Cedrós Carreras, J. P. Estudio Farmacocinético de Análogos de la Somatostatina, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, 2006 49-5.
- 14) Takeuchi, N, Nanociencia y Nanotecnología: Algunas aplicaciones de la nanociencia y nanotecnología en la medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. 21 (3). Anestesia en México. 2009, 231-233.
- 15) Rocha Formiga, F., Ansoren, A. E., Hermoso de Mendoza, E. Imbuluzqueta, A., Gonzalez, E. D., Blanco Prieto, M. J. Nanosistemas a base de poliésteres, Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra,2009, 1-4.
- 16) Pinto-Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*. 2006, 2: 8-21.
- 17) M. V. Calvo. M. J. García. J. Martínez. M. M. Fernández. *Farmacocinética Clínica*, 1 ed. Sociedad Española de Farmacéuticos de Hospital. Madrid España. Editorial Reverté. 2001.1-5

- 18) Ismael Lares Asseff. Farmacocinética y Farmacogenómica. Farmacología Clínica en Pediatría. 1ra. Edición. Editorial Prado S.A de C.V. México D.F., 2005, 3-111
- 19) Formentini E. A. Biodisponibilidad y bioequivalencia. Universidad Autónoma de Nuevo Leon. 2001. También disponible en: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8180/tesis/bitstream/1/157/1/tesis.pdf>.
Fecha de última visita: 6 Enero 2014.
- 20) Sadauskas, E., Wallin, H., Stoltenberg, M., Vogel, U., Doering, P., Larsen, A. & Danscher, G. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. Part Fibre Toxicol. Chemistry Central Journal, 2007; 4: 10.
- 21) Goodman C M, McCusker C D, Yilmaz T y Rotello V M. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains, Department of Chemistry, University of Massachusetts, Bioconjugate Chem 2005. 1356–1359.
- 22) Molina Trinidad E M, Estévez Hernández O, Rendón L, Gari Gay Febles V, Reguera Ruiz E. Electronic and vibrational spectro of novel Lanreotide peptide capped gold nanoparticle Spectrochimical Acta Part: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Submission SAA-D 05567121, 2011, 283-9.

- 23) González Monteiga M T, Pérez de Vargas L A. Estadística Aplicada Una visión instrumental, 8 va. Edición, Ed Diaz de Santos, 2009, 519-521.
- 24) Couvreur P., Dubernet C., Puisieux F. Controlled drug delivery with nanoparticles current possibilities and future trends, biopharmaceutical department 1995, 2-3.
- 25) Hans M.L, Lowman A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting, Curropin Solid State and Materials Science. 6 2002, 319-327
- 26) Moreno Frigols JL. Radiofarmacos: Perspectivas actuales Departamento de Química Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Vol 78, No.2, 2012 España 2-5.
- 27) Hernández Guijo JM. Absorción, Distribución y Eliminación de los tóxicos en el organismo, Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, American Jornal 2010,1-6.

XII.- ANEXOS

Tabla 3. Aplicación del método de velocidad de eliminación del conjugado AuNPs-LAN *in vitro*. (n: 2).

Cu	Xc	Xu	Xu acum.	ΔXu	Δt	$\Delta Xu/\Delta t$	$\ln \Delta Xu/\Delta t$	t medio		ke		
(mcg/ml)	mcg		mcg	Xu-Xu (t)	tn -t (t)				b	m	r	r2
440.5	19493.75	171739.9	171739.9	171739.9	3	57246.65	10.95512433	1.5	11.12119	-0.08804	-0.98222	0.964757
394.25	14745	145330.4	317070.3	145330.4	3	48443.47	10.7881528	4.5				
371.75	18161	129833.7	446904	129833.7	4	32458.42	10.38771522	8				
373	16611	147521.5	594425.5	147521.5	3	49173.83	10.80311692	11.5	11.60562	-0.068	-0.98901	0.978146
382.375	10008.75	127569.9	721995.4	127569.9	3	42523.29	10.65780712	14.5				
361.125	12640.5	126800	848795.4	126800	4	31700	10.36407208	18				
382.375	13224	133066.5	981861.9	133066.5	3	44355.5	10.69999199	21.5	12.18945	-0.06482	-0.80741	0.651909
371.75	10846.5	144006.7	1125869	144006.7	3	48002.22	10.77900251	24.5				
360.5	11785.5	118018.7	1243887	118018.7	4	29504.67	10.2923039	28				
366.75	11276	129233.5	1373121	129233.5	3	43077.84	10.67076408	31.5	12.24868	-0.04855	-0.89638	0.803495
390.5	7887	128328.1	1501449	128328.1	3	42776.02	10.66373296	34.5				
363	11853.25	126550.9	1628000	126550.9	4	31637.72	10.36210532	38				
354.875	10665	126158.1	1754158	126158.1	3	42052.69	10.64667858	41.5	12.4627	-0.04234	-0.82446	0.67974
374.25	4213.5	131408.5	1885566	131408.5	3	43802.84	10.68745402	44.5				
363.625	11336	128814.2	2014380	128814.2	4	32203.54	10.37983163	48				
359.25	10533.75	126141.7	2140522	126141.7	3	42047.22	10.64654852	51.5	13.38426	-0.05193	-0.85555	0.73196
342.375	8316	129417.8	2269940	129417.8	3	43139.25	10.67218853	54.5				
346.75	11176	121102.4	2391042	121102.4	4	30275.61	10.3180977	58				
354.25	10177.5	120179.3	2511222	120179.3	3	40059.77	10.59812789	61.5	13.53749	-0.04712	-0.91722	0.841296
346.125	4071	117422.9	2628645	117422.9	3	39140.97	10.57492499	64.5				
352.375	10102.5	118662.3	2747307	118662.3	4	29665.57	10.2977424	68				
341.75	10956	117006.7	2864313	117006.7	3	39002.22	10.57137381	71.5	14.07845	-0.0484	-0.90388	0.817005
343.625	7394.75	115501	2979814	115501	3	38500.32	10.55842177	74.5				
342.375	10046.25	114652.8	3094467	114652.8	4	28663.21	10.26336959	78				
344.875	10252.5	117861	3212328	117861	3	39287.01	10.57864922	81.5	15.13937	-0.05544	-0.93612	0.876319
333	7436	112554	3324882	112554	3	37518	10.5325761	84.5				
334.875	9877.5	110257.6	3435140	110257.6	4	27564.4	10.22428031	88				
335.5	10027.5	112140.9	3547281	112140.9	3	37380.29	10.52889888	91.5	15.11782	-0.04954	-0.87376	0.763463
344.875	7229.75	113334.5	3660615	113334.5	3	37778.18	10.53948703	94.5				
327.375	6672.5	109220.5	3769836	109220.5	4	27305.12	10.21482955	98				

Cu	Xc	Xu	Xu acum.	ΔX_u	Δt	$\Delta X_u/\Delta t$	$\ln \Delta X_u/\Delta t$	t medio		ke		
(mcg/ml)	mcg		mcg	Xu-Xu (t)	tn -t (t)				b	m	r	r2
198	11502	42174	4130953	42174	3	14058	9.550946908	51.5	9.49686	0.000899	0.227988	0.051979
209.875	8630.5	44178.69	4175132	44178.69	3	14726.23	9.59738548	4.5				
219.25	9040.5	48344.63	4223476	48344.63	4	12086.16	9.399815965	8				
273.625	17461.13	93682.36	4317159	93682.36	3	31227.45	10.34905289	11.5	11.67984	-0.1241	-0.93345	0.871336
218	9444.75	49022.75	4366182	49022.75	3	16340.92	9.701427466	14.5				
229.25	10314.63	54991.34	4421173	54991.34	4	13747.84	9.528636704	18				
230.5	11787.38	53274.31	4474447	53274.31	3	17758.1	9.784597263	21.5	10.73832	-0.03898	-0.56326	0.317261
274.875	10074.75	65935.64	4540383	65935.64	3	21978.55	9.997822115	24.5				
237.375	9445	56050.17	4596433	56050.17	4	14012.54	9.547708134	28				
241.75	11514	57989.78	4654423	57989.78	3	19329.93	9.8694098	31.5	11.51075	-0.05057	-0.90346	0.816234
236.125	9937.375	57230.8	4711654	57230.8	3	19076.93	9.856235151	34.5				
238.625	9864.75	56047.05	4767701	56047.05	4	14011.76	9.547652379	38				
242.375	12060.13	59654.55	4827355	59654.55	3	19884.85	9.897713362	41.5	11.68574	-0.04206	-0.89491	0.800864
244.875	9452.625	59351.58	4886707	59351.58	3	19783.86	9.892621701	44.5				
244.25	9970	60879.31	4947586	60879.31	4	15219.83	9.630354339	48				
248	11574	59799	5007385	59799	3	19933	9.900131929	51.5	12.3355	-0.04623	-0.86269	0.744238
250.5	9477	60871.5	5068257	60871.5	3	20290.5	9.917908075	54.5				
242.375	9820	59503.06	5127760	59503.06	4	14875.77	9.6074887	58				
255.5	11303.5	61447.75	5189207	61447.75	3	20482.58	9.927330211	61.5	13.20928	-0.05244	-0.8803	0.774925
246.125	9793.875	61808.14	5251016	61808.14	3	20602.71	9.933178071	64.5				
241.125	9501.375	58744.08	5309760	58744.08	4	14686.02	9.594651268	68				
240.5	11544	57840.25	5367600	57840.25	3	19280.08	9.86682789	71.5	12.44054	-0.03526	-0.80606	0.649729
245.5	9352.75	60423.69	5428024	60423.69	3	20141.23	9.910524196	74.5				
243	9661.5	61782.75	5489806	61782.75	4	15445.69	9.645085117	78				
246.75	11920.38	62581.97	5552388	62581.97	3	20860.66	9.945620188	81.5	11.61351	-0.02034	-0.97189	0.944579
244.875	9152.875	60575.95	5612964	60575.95	3	20191.98	9.913040992	84.5				
303.625	8921.625	73211.58	5686176	73211.58	4	18302.89	9.814814497	88				
240.5	11845.75	58140.88	5744317	58140.88	3	19380.29	9.872011935	91.5	12.88615	-0.0323	-0.74268	0.551576
248	9566.5	62434	5806751	62434	3	20811.33	9.943252989	94.5				
249.25	9153	63371.81	5870123	63371.81	4	15842.95	9.670480083	98				

Tabla 4.- Aplicación del método de velocidad de eliminación de nanopartículas de oro (AuNPs) in vitro (n: 4).

Cu	Xc	Xu	Xu acum.	ΔX_u	Δt	$\Delta X_u/\Delta t$	$\ln \Delta X_u/\Delta t$	t medio		ke		
(mcg/ml)	mcg		mcg	Xu-Xu (t)	tn - t (t)				b	m	r	r2
77.375	3681.25	5696.734	3775533	5696.734	3	1898.911	7.549036084	51.5	8.66568	-0.02102	-0.77837	0.605866
130.5	3645.5	10342.13	3785875	10342.13	3	3447.375	8.145368351	4.5				
119.25	12504	31064.63	3816939	31064.63	4	7766.156	8.95753063	8				
199.25	6352	19775.56	3836715	19775.56	3	6591.854	8.793589949	11.5	11.32399	-0.22666	-0.98644	0.973059
94.25	3762	8058.375	3844773	8058.375	3	2686.125	7.895854914	14.5				
80.5	3267	5977.125	3850750	5977.125	4	1494.281	7.309400601	18				
79.875	4830	6429.938	3857180	6429.938	3	2143.313	7.670107808	21.5	7.032174	0.02779	0.811476	0.658494
81.125	3223.5	6226.344	3863407	6226.344	3	2075.448	7.637932273	24.5				
129.875	4560.25	10211.42	3873618	10211.42	4	2552.855	7.844967803	28				
94.25	3818	7822.75	3881441	7822.75	3	2607.583	7.866179145	31.5	8.878673	-0.032	-0.99764	0.995294
87.375	3459.75	7197.516	3888638	7197.516	3	2399.172	7.782878905	34.5				
99.875	4922.75	8476.891	3897115	8476.891	4	2119.223	7.658804629	38				
223.625	4174.5	21216.42	3918332	21216.42	3	7072.141	8.863918489	41.5	14.64234	-0.14186	-0.935	0.874217
99.25	4095	10160.72	3928492	10160.72	3	3386.906	8.127672173	44.5				
94.875	6304.5	11076.66	3939569	11076.66	4	2769.164	7.926300771	48				
122.375	5612.25	16352.36	3955921	16352.36	3	5450.786	8.603515182	51.5	15.01598	-0.1263	-0.94049	0.884514
99.875	3445	8601.734	3964523	8601.734	3	2867.245	7.961106845	54.5				
101.125	5055.75	9467.828	3973991	9467.828	4	2366.957	7.769360456	58				
105.5	3920	10339	3984330	10339	3	3446.333	8.145066143	61.5	12.93467	-0.07711	-0.95636	0.91462
92.375	3866.5	9399.156	3993729	9399.156	3	3133.052	8.049762915	64.5				
94.875	4785.75	8408.297	4002137	8408.297	4	2102.074	7.650679859	68				
103	3995	10287.13	4012424	10287.13	3	3429.042	8.140036104	71.5	13.03708	-0.06828	-0.99392	0.987881
96.75	3439	8755.875	4021180	8755.875	3	2918.625	7.978867894	74.5				
96.125	4771	8819.469	4030000	8819.469	4	2204.867	7.698422554	78				
96.75	2733.75	8816.344	4038816	8816.344	3	2938.781	7.985750234	81.5	11.28079	-0.03994	-0.89745	0.805423
96.125	3462.75	8759.391	4047576	8759.391	3	2919.797	7.979269329	84.5				
94.25	5031	9118.688	4056694	9118.688	4	2279.672	7.731786797	88				
102.375	3870	9904.781	4066599	9904.781	3	3301.594	8.102160585	91.5	10.09809	-0.02131	-0.68102	0.463786
101.125	3565.75	10605.48	4077205	10605.48	3	3535.161	8.170514251	94.5				
112.375	5150	11574.63	4088779	11574.63	4	2893.656	7.97027612	98				

Cu	Xc	Xu	Xu acum.	ΔXu	Δt	$\Delta Xu/\Delta t$	$\ln \Delta Xu/\Delta t$	t medio		ke		
(mcg/ml)	mcg		mcg	Xu-Xu (t)	tn -t (t)				b	m	r	r2
83	7666.75	6992.75	5877.115	6992.75	3	2330.917	7.754016888	51.5	7.610499	0.002581	0.440837	0.194337
83.625	6857.25	6993.141	5884.108	6993.141	3	2331.047	7.754072748	4.5				
85.5	7024.5	7149.938	5891.258	7149.938	4	1787.484	7.488564533	8				
88	7526.25	7359	5898.617	7359	3	2453	7.805067044	11.5	8.318009	-0.04189	-0.93838	0.880556
86.125	6754.75	7094.547	5905.712	7094.547	3	2364.849	7.768469433	14.5				
91.125	6919.5	7506.422	5913.218	7506.422	4	1876.605	7.537219822	18				
87.375	7636	7252.125	5920.470	7252.125	3	2417.375	7.79043752	21.5	6.441451	0.059481	0.863684	0.745951
86.125	6754.75	7094.547	5927.565	7094.547	3	2364.849	7.768469433	24.5				
172.375	6867	14091.66	5941.657	14091.66	4	3522.914	8.167043785	28				
85.5	7751.25	7363.688	5949.020	7363.688	3	2454.563	7.805703817	31.5	9.605296	-0.0556	-0.91927	0.845058
84.875	6740	7150.719	5956.171	7150.719	3	2383.573	7.776355866	34.5				
84.25	7030.5	6887.438	5963.058	6887.438	4	1721.859	7.451160018	38				
85.5	7414	7203.375	5970.262	7203.375	3	2401.125	7.783692657	41.5	10.26566	-0.0559	-0.57183	0.326984
84.25	9190	9678.219	5979.940	9678.219	3	3226.073	8.079020861	44.5				
84.25	6490	6834.781	5986.775	6834.781	4	1708.695	7.443485383	48				
86.125	10395	9947.438	5996.722	9947.438	3	3315.813	8.106457971	51.5	13.25884	-0.10039	-0.99611	0.992241
84.25	6640	6992.75	6003.715	6992.75	3	2330.917	7.754016888	54.5				
83.625	6590	6888.609	6010.604	6888.609	4	1722.152	7.45133015	58				
88	7249	7249	6017.853	7249	3	2416.333	7.790006519	61.5	11.03484	-0.05199	-0.91233	0.832355
85.5	6474	7096.5	6024.949	7096.5	3	2365.5	7.768744695	64.5				
84.25	6590	6940.094	6031.889	6940.094	4	1735.023	7.458776201	68				
83	7304	6889	6038.778	6889	3	2296.333	7.739068927	71.5	10.83226	-0.04278	-0.92952	0.864002
81.75	6376.5	6683.063	6045.461	6683.063	3	2227.688	7.708719331	74.5				
85.5	6376.5	6989.625	6052.451	6989.625	4	1747.406	7.465887825	78				
86.75	7030.5	7091.813	6059.543	7091.813	3	2363.938	7.76808394	81.5	11.80719	-0.04886	-0.8675	0.752563
86.75	6308	7200.25	6066.743	7200.25	3	2400.083	7.783258738	84.5				
84.875	6213	6938.531	6073.682	6938.531	4	1734.633	7.458551035	88				
86.125	6919.5	7094.547	6080.776	7094.547	3	2364.849	7.768469433	91.5	12.41511	-0.05012	-0.85834	0.736745
84.875	6669	7256.813	6088.033	7256.813	3	2418.938	7.791083673	94.5				
83.625	6260.5	6888.609	6094.921	6888.609	4	1722.152	7.45133015	98				

Cu	Xc	Xu	Xu acum.	ΔX_u	Δt	$\Delta X_u/\Delta t$	$\ln \Delta X_u/\Delta t$	t medio		ke		
(mcg/ml)	mcg		mcg	Xu-Xu (t)	tn -t (t)				b	m	r	r2
73	4455	5420.25	6100342	5420.25	3	1806.75	7.49928493	51.5	7.562096	-0.00131	-0.49138	0.24145
76.75	3962.5	6082.438	6106424	6082.438	3	2027.479	7.614548511	4.5				
83.625	4275	7149.938	6113574	7149.938	4	1787.484	7.488564533	8				
89.25	4641	7965.563	6121540	7965.563	3	2655.188	7.884270563	11.5	8.297947	-0.03085	-0.72723	0.528861
93	4434	8590.875	6130131	8590.875	3	2863.625	7.959843584	14.5				
92.375	3984.75	8764.078	6138895	8764.078	4	2191.02	7.692122254	18				
108	4221	10854	6149749	10854	3	3618	8.193676666	21.5	9.28655	-0.04939	-0.95497	0.911968
101.125	6674.25	10226.27	6159975	10226.27	3	3408.755	8.134102462	24.5				
102.375	4841	10544.63	6170520	10544.63	4	2636.156	7.877077169	28				
104.875	5392.75	10671.03	6181191	10671.03	3	3557.01	8.1766757	31.5	9.387941	-0.03645	-0.75872	0.575662
105.5	4779.5	11459.94	6192650	11459.94	3	3819.979	8.248000248	34.5				
106.125	4803.75	11328.84	6203979	11328.84	4	2832.211	7.948812936	38				
104.25	5551	11128.69	6215108	11128.69	3	3709.563	8.218669224	41.5	9.881478	-0.03942	-0.94817	0.899032
104.875	5087.5	10671.03	6225779	10671.03	3	3557.01	8.1766757	44.5				
106.125	5322.625	11527.83	6237307	11527.83	4	2881.957	7.966224867	48				
107.375	5356	11059.63	6248367	11059.63	3	3686.542	8.21244408	51.5	10.97797	-0.05227	-0.82098	0.674002
109.25	5230.75	11662.44	6260029	11662.44	3	3887.479	8.265516197	54.5				
103	4841	10609	6270638	10609	4	2652.25	7.883163615	58				
103.625	5459	10673.38	6281311	10673.38	3	3557.792	8.176895313	61.5	9.61789	-0.02261	-0.67051	0.449579
109.875	5243.75	11523.14	6292834	11523.14	3	3841.047	8.253500232	64.5				
118	4929.125	12375.25	6305210	12375.25	4	3093.813	8.037159428	68				
108.625	5230.75	11595.72	6316805	11595.72	3	3865.24	8.259778947	71.5	11.8557	-0.04934	-0.82664	0.683334
111.125	4807	12140.41	6328946	12140.41	3	4046.802	8.305682239	74.5				
105.5	4831.875	11328.06	6340274	11328.06	4	2832.016	7.948743972	78				
110.5	5388.5	11450.56	6351724	11450.56	3	3816.854	8.247181846	81.5	11.39448	-0.03805	-0.85633	0.733298
109.25	4803.75	11662.44	6363387	11662.44	3	3887.479	8.265516197	84.5				
111.125	4860	12001.5	6375388	12001.5	4	3000.375	8.00649256	88				
108	5518.5	11461.5	6386850	11461.5	3	3820.5	8.248136583	91.5	12.21851	-0.04279	-0.84416	0.712598
111.125	4987.875	11793.14	6398643	11793.14	3	3931.047	8.27666105	94.5				
106.75	4697.75	11662.44	6410305	11662.44	4	2915.609	7.977834125	98				

Cu	Xc	Xu	Xu acum.	ΔX_u	Δt	$\Delta X_u/\Delta t$	$\ln \Delta X_u/\Delta t$	t medio		ke		
(mcg/ml)	mcg		mcg	Xu-Xu (t)	tn -t (t)				b	m	r	r2
110.5	6006	12762.75	6423068	12762.75	3	4254.25	8.355673762	51.5	8.127869	0.004175	0.550294	0.302824
109.875	4862	12141.19	6435209	12141.19	3	4047.063	8.305746588	4.5				
109.875	4617.125	11797.83	6447007	11797.83	4	2949.457	7.989376375	8				
109.25	5648.5	11867.28	6458875	11867.28	3	3955.76	8.282928129	11.5	8.905588	-0.04838	-0.82742	0.684625
114.875	4752	12406.5	6471281	12406.5	3	4135.5	8.327363519	14.5				
108	4752	11664	6482945	11664	4	2916	7.977968093	18				
110.5	5746	12210.25	6495155	12210.25	3	4070.083	8.311418753	21.5	9.324284	-0.04519	-0.91098	0.829876
111.75	4617.125	11999.16	6507154	11999.16	3	3999.719	8.293979325	24.5				
109.25	5028.75	12208.69	6519363	12208.69	4	3052.172	8.023608706	28				
116.75	5525	12900.88	6532264	12900.88	3	4300.292	8.366438129	31.5	10.30362	-0.06047	-0.96687	0.934846
108.625	4345	11799.39	6544063	11799.39	3	3933.13	8.277190879	34.5				
108	4536	11664	6555727	11664	4	2916	7.977968093	38				
109.875	5713.5	12072.52	6567800	12072.52	3	4024.172	8.300074423	41.5	10.36543	-0.04873	-0.9159	0.838867
108.625	4562.25	11799.39	6579599	11799.39	3	3933.13	8.277190879	44.5				
108.625	4562.25	11799.39	6591399	11799.39	4	2949.848	7.989508806	48				
110.5	5746	12210.25	6603609	12210.25	3	4070.083	8.311418753	51.5	11.1496	-0.05416	-0.91299	0.833559
109.25	4697.75	11935.56	6615544	11935.56	3	3978.521	8.288665379	54.5				
107.375	5154	11529.39	6627074	11529.39	4	2882.348	7.966360399	58				
108	5400	11664	6638738	11664	3	3888	8.265650166	61.5	11.42485	-0.05064	-0.91532	0.837817
106.75	4590.25	11395.56	6650133	11395.56	3	3798.521	8.242367016	64.5				
106.125	5518.5	11262.52	6661396	11262.52	4	2815.629	7.942940928	68				
108.625	5865.75	11799.39	6673195	11799.39	3	3933.13	8.277190879	71.5	11.9298	-0.05051	-0.92841	0.861944
106.75	4270	11395.56	6684591	11395.56	3	3798.521	8.242367016	74.5				
106.75	4910.5	11395.56	6695986	11395.56	4	2848.891	7.954684943	78				
109.25	5681	11935.56	6707922	11935.56	3	3978.521	8.288665379	81.5	12.65316	-0.05277	-0.85965	0.738999
110.5	4641	12210.25	6720132	12210.25	3	4070.083	8.311418753	84.5				
106.75	5124	11395.56	6731528	11395.56	4	2848.891	7.954684943	88				
109.25	5899.5	11935.56	6743463	11935.56	3	3978.521	8.288665379	91.5	12.96137	-0.05058	-0.91505	0.83731
108	5400	11664	6755127	11664	3	3888	8.265650166	94.5				
107.375	4724.5	11529.39	6766657	11529.39	4	2882.348	7.966360399	98				

XIII. GLOSARIO

Absorción: Mecanismo mediante el cual el fármaco se dispersa en el organismo a partir de los procesos de desintegración y de disolución en los sitios de absorción (mucosas, epitelios, líquidos intersticiales).

Barrera hematoencefalica: Es una formación densa de células endoteliales entre los vasos sanguíneos y el sistema nervioso central. La barrera impide que muchas sustancias tóxicas la atraviesen, al tiempo que permite el pasaje de nutrientes y oxígeno. De no existir esta barrera muchas sustancias nocivas llegarían al cerebro afectando su funcionamiento. Las células de la barrera poseen proteínas específicas que transportan de forma activa sustancias como la glucosa a través de la barrera.

Biotransformación: Es un proceso que involucra acciones metabólicas referidas al fármaco en el organismo.

Constante de Eliminación (ke): Expresa el porcentaje del fármaco eliminado en el tiempo.

Biodisponibilidad: Es un término farmacocinético que alude a la fracción y la velocidad a la que la dosis administrada de un fármaco alcanza su diana terapéutica (canales, transportadores, receptores, que son macromoléculas proteicas) lo que implica llegar hasta el tejido sobre el que realiza su actividad biológica.

Biomoléculas: Son las moléculas constituyentes de los seres vivos. Los seis elementos químicos o bioelementos más abundantes en los seres vivos son el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre (C,H,O,N,P,S) representando alrededor del 99% de la masa de la mayoría de las células, con ellos se crean todo tipos de sustancias o biomoléculas (proteínas, aminoácidos, neurotransmisores).

Biodistribución: Proceso mediante el cual el fármaco ingresa al torrente sanguíneo y se biodistribuye hacia los tejidos y a otros fluidos biológicos.

Concentración plasmática: Todo medicamento que se administra a un paciente vá a ser absorbido en mayor o menor cantidad y/o porcentaje hacia la sangre, ya sea que se administre por vía oral, tópica o parenteral.

Dosis: Es la cantidad de principio activo de un medicamento, expresado en unidades de volumen o peso para lograr eficazmente un efecto determinado

Excreción: Proceso mediante el cual el organismo tiene la capacidad de deshacerse de las sustancias externas eliminadas directamente (excreción), o bien después de transformarlas en sustancias que pueden ser excretadas más fácilmente debido a procesos metabólicos.

Farmacocinética: Es el estudio de las variaciones en las concentraciones de los fármacos y sus metabolitos en función del tiempo en los diferentes fluidos y tejidos del organismo y de las relaciones matemáticas necesarias para desarrollar modelos que permitan interpretar tales datos.

Intervalo: El tiempo es una magnitud física creada para medir el intervalo en el que suceden una serie ordenada de acontecimientos

In vitro: Conjunto de fenómenos observados en el laboratorio a partir de productos biológicos vivos.

Microscopia electrónica de transmisión (MET): Esta es una técnica en la que un haz de electrones es transmitido a través de un espécimen ultra delgado (nm de grosor). La información que se usa es la de los electrones transmitidos; la imagen en una pantalla fluorescente. La resolución de los microscopios electrónicos también está determinada por el diámetro del haz de electrones.

Metabolismo: Es el tiempo general empleado para denominar las distintas transformaciones químicas que ocurren en el organismo encaminadas, sobre todo, a reducir la Liposolubilidad y la actividad biológica de los fármacos.

Membrana celular: Es una bicapa lipídica que delimita todas las células. Es una estructura laminada formada por fosfolípidos, glicolípidos y proteínas que rodea, limita, da forma y contribuye a mantener el equilibrio entre el interior (medio intracelular) y el exterior (medio extracelular) de las células. Regula la entrada y salida de muchas sustancias entre el citoplasma y el medio extracelular.

Simulación: Es el proceso de diseñar un modelo de un sistema real y llevar a término experiencias con él, con la finalidad de comprender el comportamiento del sistema o evaluar nuevas estrategias (dentro de los límites impuestos por un cierto criterio o un conjunto de ellos) para el funcionamiento del sistema.

Parámetro: Se conoce como parámetro al dato que se considera como imprescindible y orientativo para lograr evaluar o valorar una determinada situación.

Plasma: Es un fluido coloidal de composición compleja que contiene numerosos componentes. Abarca el 55 % del volumen sanguíneo. Está compuesto por un 90 % de agua, un 7 % de proteínas, y el 3 % restante por grasa, glucosa, vitaminas, hormonas, oxígeno, gas carbónico y nitrógeno, además de productos de desecho del metabolismo como el ácido úrico.

Nanopartículas: Partícula que cuenta con una o más dimensiones en el intervalo de 0.1 milésimas de milímetro (100 nanómetros) o menos.

Tiempo de vida media ($t_{1/2}$): Es el tiempo en el cual la concentración del fármaco en plasma llega a la mitad.

Volumen de distribución (Vd): Relaciona la cantidad del fármaco en el organismo con la concentración del fármaco en la sangre o en el plasma.

WinNonlin: Programa matemático diseñado para resolver ecuaciones no lineales.