



UADY

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y  
BIOQUÍMICAS

Evaluación farmacocinética de MIX-160  
(hesperidina-naringenina) en ratas  
Wistar sanas.

TESIS

PRESENTADA POR

Priscila Vazquez Garcia

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2020





**UADY**  
UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE YUCATÁN

Evaluación farmacocinética de MIX-160  
(hesperidina-naringenina) en ratas  
Wistar sanas.

TESIS

PRESENTADA POR

Priscila Vazquez Garcia

EN OPCIÓN AL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2020



## **AGRADECIMIENTOS**

En primera instancia, a la Universidad Autónoma de Yucatán, por la oportunidad que se me dio para formarme académicamente dentro de un programa nacional de posgrados de calidad.

Al PICQB por el apoyo, los procesos realizados y los aprendizajes de mi formación.

A la Facultad de Química UADY, por brindarme los espacios e instalaciones necesarios para el desempeño de mis actividades académicas y de investigación.

A CONACYT, por otorgarme una beca para el sostenimiento de mis estudios.

A mis directores Dr. Rolffy Rubén Ortiz Andrade y M. en C. Jesús Alfredo Araujo León por sus enseñanzas, y las oportunidades brindadas durante mi estadía en los laboratorios y a lo largo de mi formación como maestrante.

A mis sinodales M. en CF. Mario Alberto Ramírez Camacho, Dr. David Muñoz Rodríguez y Dr. Oswaldo Hernández Abreu por su tiempo y atenciones como comité tutorial a lo largo de estos dos años.

A la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Dr. Efrén Hernández Baltazar y Dr. Julio César Rivera Leyva por el espacio y tiempo que se me dedicó en mi estadía en la institución, que, aunque fue corta fue de gran aprendizaje y experiencia.

A toda mi familia y amigos que me apoyaron desde antes de iniciar éste gran paso en mi vida que además significó muchos cambios que no había imaginado y continuaron haciéndolo durante todo el proceso.

A mis compañeros del posgrado y de los laboratorios de farmacología y cromatografía con quienes se formaron relaciones de retroalimentación en favor del avance de todos.



Este trabajo fue realizado en el Área de Farmacología Experimental del Laboratorio de Farmacología y en el Laboratorio de Cromatografía de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección del M. en C. Jesús Alfredo Araujo León y el Dr. Rolffy Rubén Ortiz Andrade. Los resultados obtenidos forman parte del proyecto “Estudio preclínico de una forma farmacéutica sólida de citroflavonoides con propiedades hipoglucemiantes e hipotensoras: caracterización farmacocinética y farmacodinámica de un potencial fitofármaco” financiado por CONACYT (Problemas Nacionales No. 756) con el apoyo de la beca No. 724269.







Mérida, Yuc., 30 de noviembre de 2020  
Oficio Num.: PICQB/284/2020

**Asunto:** Autorización de digitalización

La tesis "Evaluación farmacocinética de MIX-160 (hesperidina-naringenina) en ratas wistar sanas" presentada por Priscila Vazquez Garcia, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestra en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la digitalización de los ejemplares correspondientes.

**Directores de la tesis**

Dr. Rolffy Rubén Ortiz Andrade

M. en C. Jesús Alfredo Araujo León

**Sinodales**

Dr. David Muñoz Rodríguez

M. en C. Mario Alberto Ramírez Camacho

Dr. Oswaldo Hernández Abreu

**Firmas**

**ATENTAMENTE  
"LUZ, CIENCIA Y VERDAD"**

**DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS  
COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

c.c. Archivo  
MRSC



## RESUMEN

El presente trabajo de investigación corresponde al estudio preclínico farmacocinético de una mezcla (MIX-160) de los citroflavonoides hesperidina (hsd) y naringenina (ngn) contenidos en una forma farmacéutica sólida (tab) evaluados en un modelo de suero de roedor. Esta mezcla, demostró tener actividad antihiper glucémica y antihipertensiva a una dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ) de 161 mg/kg en diversos estudios *in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*.

El estudio farmacocinético se realizó a partir de cuatro grupos experimentales que consistieron: naringenina libre (ngn-free), hesperidina libre (hsd-free), MIX-160 (-mix) y tableta (-tab). La administración se realizó por vía intragástrica a 161 mg/kg y las muestras sanguíneas fueron tomadas por punción caudal a 14 tiempos entre las 0 y 24 h seguido de la separación del suero centrifugando a 2500 rpm. Las muestras se procesaron por extracción en fase sólida (EFS) y la cuantificación de los flavonoides se realizó por UHPLC-MS/MS. Las concentraciones obtenidas fueron utilizadas para construir gráficas de concentración-tiempo y calcular los parámetros farmacocinéticos.

Los parámetros farmacocinéticos área bajo la curva ( $AUC$ ), tiempo máximo ( $T_{max}$ ), concentración máxima ( $C_{max}$ ), tiempo medio de residencia ( $TMR$ ), constante de eliminación ( $k_{el}$ ), constante de absorción ( $k_{abs}$ ), volumen de distribución ( $VD/F$ ) y velocidad de aclaramiento ( $CL/F$ ) fueron obtenidos bajo un modelo no compartimental utilizando herramientas computacionales y comparados mediante pruebas estadísticas t, ANOVA y Tukey.

Los resultados obtenidos demostraron que tanto hsd como ngn muestran una cinética de absorción y eliminación de primer orden, en sus tres tratamientos, donde  $k_{abs} > k_{el}$ . También se encontró que el comportamiento farmacocinético de hsd no se modifica al coadministrarse con ngn; en tanto que la  $CL/F$  de ngn disminuyó significativamente provocando un aumento en el  $AUC$  en presencia de hsd con un valor de  $p < 0.05$ . Al no encontrar diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos de los flavonoides en la mezcla y la tableta; se concluyó que la formulación y las operaciones unitarias relacionadas a la tableta, no modifican el comportamiento *in vivo* de los flavonoides desde el punto de vista farmacocinético. Un estudio de disolución *in vitro* respaldó que la tableta no modifica el comportamiento de los flavonoides.



## ABSTRACT

The present research work describes the pharmacokinetic preclinical study of a citrus flavonoid mixture of hesperidin (hsd) and naringenin (ngn) contained in a solid pharmaceutical form evaluated using a murine serum model. This mixture has previously shown antihyperglycemic and antihypertensive activity at a medium effective dose ( $DE_{50}$ ) of 161 mg/kg in multiple *in vitro*, *in vivo* and *ex vivo* evaluations.

The pharmacokinetic study used four experimental groups: single hesperidin (hsd-free), single naringenin (ngn-free), mixture (-mix) and tablet (-tab). An intragastric administration was given at a 161 mg/kg single dose. Blood samples were obtained by tail-vein puncture at 14 points between 0 and 24 h. Serum was separated by centrifugating at 2500 rpm. Samples were processed by solid phase extraction (SPE) and flavonoid quantification was made by UHPLC-MS/MS. The obtained concentrations were used to construct concentration vs time plots and calculate pharmacokinetic parameters.

The following pharmacokinetic parameters were obtained: area under the curve ( $AUC$ ), maximum time ( $T_{max}$ ), maximum concentration ( $C_{max}$ ), mean residence time ( $TMR$ ), volume distribution ( $VD/F$ ), and clearance ( $CL/F$ ). These parameters were obtained using a noncompartmental model with computational and statistical tools including t-test, ANOVA test and Tukey multiple comparison test.

The results showed that both hesperidin and naringenin present first-order elimination and absorption kinetic behavior in the three treatments, where  $k_{abs} > k_{el}$ . In addition, the pharmacokinetic behavior of hsd was not modified when co-administered with ngn. Concurrently, a significant decrease in ngn clearance was shown, causing an AUC increase in the presence of hsd with a probability of  $p < 0.05$ . No significant differences were shown between the flavonoids in mixture and in tablet form, which led us to conclude that the formulation and unit operations related to the tablet, do not modify the *in vivo* pharmacokinetic flavonoid behavior. The results of an *in vitro* dissolution evaluation supported the conclusion of this study that the tablet does not modify flavonoid behavior.



## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
ANTECEDENTES .....	3
Citroflavonoides: Hesperidina, naringenina y su interés clínico.....	3
Formas farmacéuticas a base de citroflavonoides actualmente comercializadas .....	5
Biofarmacia y farmacocinética .....	6
Modelos farmacocinéticos .....	11
Estudios de disolución en un modelo farmacocinético .....	18
Análisis farmacocinético de flavonoides y la importancia de la cromatografía para su evaluación. ....	20
Estudios previos para la formulación de una tableta a base de citroflavonoides con actividad antidiabética y antihipertensiva. ....	24
HIPÓTESIS.....	27
JUSTIFICACIÓN .....	29
OBJETIVO GENERAL .....	31
OBJETIVOS PARTICULARES .....	31
MATERIALES Y MÉTODOS .....	33
Reactivos y animales de experimentación. ....	33
Elaboración de tabletas .....	34
Dosificación, toma de muestra y almacenamiento. ....	34
Tratamiento de la muestra .....	35
Análisis de la muestra: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a detector de Masas con triple cuadrupolo .....	35
Manejo de datos para obtención de parámetros farmacocinéticos.....	36
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
Datos farmacocinéticos iniciales: cinéticas de primer orden .....	41
Datos farmacocinéticos finales: parámetros farmacocinéticos .....	46
Pruebas farmacopéicas .....	54
CONCLUSIONES .....	59
REFERENCIAS.....	61
ANEXO 1: Abreviaturas.....	71
ANEXO 2: Estadística .....	73





## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales efectos sobre síndrome metabólico de los citroflavonoides .....	4
Tabla 2. Variables biológicas en farmacocinética. ....	10
Tabla 3. Manejo de datos farmacocinéticos para la aplicación de diversos modelos... ..	16
Tabla 4. Sistema de Clasificación Biofarmacéutica .....	19
Tabla 5. Modelos farmacocinéticos en ratas.....	20
Tabla 6. Técnicas analíticas de detección de flavonoides para estudios farmacocinéticos a partir de varias vías de administración en matrices de sangre y orina.....	21
Tabla 7. Vidas medias, tiempos máximos y concentraciones máximas de flavonoides en ratas por vía oral. ....	23
Tabla 8. Parámetros de validación del método analítico optimizado.....	25
Tabla 9. Precisión y límites de detección y cuantificación del método optimizado. ....	26
Tabla 10. Ecuaciones y constantes de absorción y eliminación de hesperidina en sus tres tratamientos .....	43
Tabla 11. Ecuaciones y constantes de absorción y eliminación de naringenina en sus tres tratamientos. ....	44
Tabla 12. Parámetros farmacocinéticos de hesperidina. ( $p < 0.05$ ) .....	47
Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos de naringenina. ( $p < 0.05$ ) .....	47
Tabla 14. Resultados farmacopéicos sobre la tableta. ....	55



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de la hesperidina, su carbohidrato corresponde a la L-ramnosa, un disacárido con unión glicosídica $\alpha$ ,1-6 a D-glucopiranososa.....	3
Figura 2. Estructura química de naringenina, orgánicamente corresponde a la aglicona de naringina, que es un rutinósido al igual que hesperidina. ....	3
Figura 3. Proceso de liberación de una forma de dosificación sólida de liberación inmediata .....	8
Figura 4. Curva de distribución LADME de un fármaco por vía oral .....	9
Figura 5. Modelo de un compartimento a) administración intravascular y b) administración extravascular .....	13
Figura 6. Modelo de dos compartimentos por administración extravascular .....	13
Figura 7. Modelo de tres compartimentos para una administración extravascular (a) en paralelo y (b) en serie.....	14
Figura 8. A) curva de absorción: orden 1 y orden cero, B) curva de eliminación de primer orden en representación numérica y C) curva de eliminación de primer orden en representación semilogarítmica.....	17
Figura 9. Proceso de disolución de una forma farmacéutica sólida oral de desintegración inmediata. ....	19
Figura 10. Esquema de un analizador de triple cuadrupolo. ....	22
Figura 11. Cromatograma de la elución de los 6 flavonoides. Tiempos de retención= 1.67 min: Rtn, 2.58 min: Nrg, 2.975 min: Hsd, 5.134 min: Qct, 5.933 min: Ngn y 6.557 min: Hst. ....	26
Figura 12. Esquemas de ion precursor y ion producto para (a) quercetina (I.S), (b) naringenina y (c) hesperidina del método validado.....	26
Figura 13. Diagrama de flujo metodología experimental.....	33
Figura 14. Toma de muestra y separación de suero.....	34
Figura 15. Extracción en fase sólida.....	35
Figura 16. Equipo HPLC-MS/MS para detección y cuantificación de flavonoides. ....	36
Figura 17. Pruebas preliminares de disolución de flavonoides. ....	38
Figura 18. Equipo multifuncional para prueba de disolución, desintegración, friabilidad y dureza. ....	39
Figura 19. Prueba disolución de la tableta, los medios presentan turbidez y polvos en suspensión. La disgregación se observó en un periodo menor a tres minutos para las 12	

tabletas evaluadas en cada medio. No se observó tendencia a la aglomeración o resistencia a la liberación. ....	40
Figura 20. Gráfica de concentración de (a) hesperidina y (b) naringenina frente al tiempo en sus tres tratamientos: libre, mezcla y tableta. ....	41
Figura 21. Gráficas de absorción y eliminación de hsd en sus tres tratamientos. ....	43
Figura 22. Gráficas de absorción y eliminación de naringenina en sus tres tratamientos. ....	44
Figura 23. Gráfica de los principales parámetros y etapas farmacocinéticas de hesperidina.....	46
Figura 24. Gráfica de los principales parámetros y etapas farmacocinéticas de naringenina. ....	46
Figura 25. Curvas de biodisponibilidad de hesperidina-naringenina administrada: (a) en su forma libre, grupos independientes, (b) en la mezcla MIX-160 .....	49
Figura 26. Gráficas de la disolución preliminar de (a) hesperidina y (b) naringenina a 8 horas a 37°C en matraz Erlenmeyer. Se utilizaron seis matraces por medio conteniendo 15 mg MIX-160 en 100 mL de medio de disolución (n=6).....	54



## INTRODUCCIÓN

Los citroflavonoides hesperidina y naringenina, abundantes en frutos como el limón, la toronja y la naranja presentan alto interés clínico debido a sus actividades farmacológicas relacionadas al sistema nervioso central, procesos carcinogénicos y principalmente sobre síndrome metabólico, como procesos inflamatorios, oxidativos, hiperglucémicos, hipertensivos e hiperlipidémicos.<sup>1-5</sup>

El alcance de los efectos terapéuticos de los flavonoides ha llegado a la existencia de diversos productos farmacéuticos y nutracéuticos en diversos mercados a nivel mundial, tal es el caso del Daflón<sup>®</sup>, la Diosmina Teva<sup>®</sup>, y el Favrobén<sup>®</sup>, utilizados como venolíticos y vasoprotectores para la sintomatología relacionada a la insuficiencia venosa crónica. Además, desde hace muchos años, la farmacopea China refiere el uso de flores y cáscaras de cítricos para diversas actividades biológicas. En México, los flavonoides no se encuentran registrados en la farmacopea (FEUM), no obstante, existen productos a base de flavonoides autorizados por la Secretaría de Salud.<sup>1, 6-11</sup>

Todo producto farmacéutico, para ser colocado en el mercado o ser administrado a un público receptor, debe contar con una etapa de investigación preclínica, que corresponde a la búsqueda de satisfacer una necesidad terapéutica. En esta etapa se incluyen los estudios que responderán a tres interrogantes: ¿qué le hace el fármaco al organismo?, ¿qué le hace el organismo al fármaco?, ¿sus ventajas superan sus desventajas? Para esto, se realizan diversas pruebas *in vitro*, *in situ*, *in vivo* y *ex vivo*, en modelos animales experimentales que demuestran su actividad biológica y su seguridad, lo que incluye una evaluación farmacocinética para la evaluación de su desplazamiento cronológico a través del organismo desde su administración hasta su eliminación por una o más vías. Esta evaluación se realiza utilizando técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta eficiencia para la cuantificación tanto del fármaco como de sus metabolitos en una o varias matrices biológicas, principalmente sangre y orina.<sup>12-15</sup>

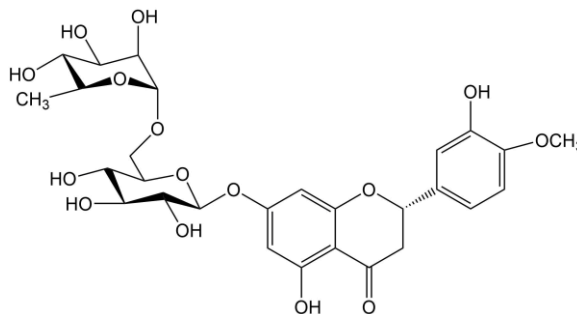
En el grupo de investigación de los laboratorios de cromatografía y farmacología de la Universidad Autónoma de Yucatán se desarrolló una tableta a base una mezcla de los citroflavonoides hsd y ngn (MIX-160), la cual posee actividad vasorrelajante-antihipertensiva y antihiperglucémica a una dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) de 161 mg/kg en modelos murinos. La mezcla fue sometida a un proceso de preformulación para obtener una tableta vía compactación directa. En el estudio que aquí se presenta se aprovecharon los métodos validados para la preparación de la muestra por extracción en fase sólida (EFS) y de cuantificación de flavonoides por UHPLC-MS/MS para la evaluación farmacocinética de la tableta en un modelo de suero murino como parte de los estudios preclínicos que demanda el desarrollo farmacéutico de una sustancia o mezcla de sustancias que se sugiere posee actividad biológica.<sup>16-21</sup>



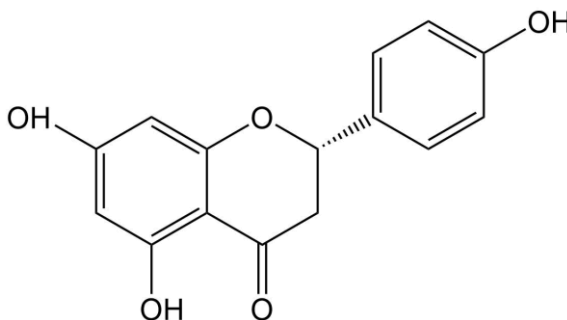
## ANTECEDENTES

### Citroflavonoides: Hesperidina, naringenina y su interés clínico

Hesperidina (figura 1) y naringenina (figura 2) son compuestos orgánicos pertenecientes al grupo de los citroflavonoides debido a su abundancia en frutos cítricos como la naranja dulce, la toronja y el limón<sup>2,22</sup>. Los citroflavonoides pueden encontrarse en su forma glicosilada, es decir; pueden tener un carbohidrato como parte de su estructura orgánica, como la naringina (nrg) y la hsd o en forma de agliconas, como la ngn y la hesperetina (hst)<sup>2,23</sup>. Clínicamente, suelen tener interés farmacológico debido a una amplia variedad de actividades biológicas principalmente relacionadas a procesos inflamatorios, oxidativos y metabólicos<sup>4,22</sup>.



**Figura 1.** Estructura química de la hesperidina, su carbohidrato corresponde a la L-ramnosa, un disacárido con unión glicosídica  $\alpha$ ,1-6 a D-glucopiranososa<sup>23</sup>.



**Figura 2.** Estructura química de naringenina, orgánicamente corresponde a la aglicona de naringina, que es un rutinósido al igual que hesperidina<sup>2</sup>.

Mozaffarian y cols.<sup>24</sup>, describen diversas actividades de los flavonoides (tabla 1). Estos efectos se relacionan a diversos mecanismos moleculares entre los que se puede mencionar el incremento de la fosforilación de AMPK y de la expresión del peroxisoma activador-proliferador receptor y coactivador 1- $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) y la disminución de la



expresión del receptor tipo trol 4 (TRL4) y del elemento regulador de estero-proteína de unión-1c (SREBP-1c). Como se ve en la tabla, un mismo mecanismo molecular puede generar efectos sobre diversos tejidos o células, así como activar una cadena de efectos relacionados entre sí. Tal es el caso del complejo AMPK, el cual influye en mecanismos sobre tejido adiposo, muscular, vascular, hepático y pancreático, generando una serie de eventos benéficos sobre el metabolismo de lípidos, carbohidratos y sobre la señalización apoptótica celular, lo que puede inducir incluso una actividad anticancerígena<sup>25</sup>.

**Tabla 1.** Principales efectos sobre síndrome metabólico de los citroflavonoides<sup>2, 24,28</sup>

Celular	Músculo estriado	Hígado y páncreas	Lipídico	Células endoteliales y MLV	Metabolismo de CHO's en tracto G.I.
↓ Citocinas proinflamatorias	↑ Biogénesis mitocondrial	↓ Gluconeogénesis	↓ Lipogénesis	↑ Niveles de óxido nítrico	*Inhibe enzimas digestivas
↓ Infiltración de células inflamatorias	↑ Tolerancia a la glucosa	↓ Síntesis de colesterol	↑ Lipólisis	↑ Vasodil.	↑ Vasodil.
↓ Apoptosis	↑ Consumo de glucosa	↑ Degradación de ácidos grasos	↑ Expresión de GLUT4	↓ Presión sanguínea	*Inhibe enzimas digestivas
	↓ TG	↓ Esteatosis celular		↓ ROS	

MLV: músculo liso vascular; CHO's: carbohidratos; G.I.: gastrointestinal; TG: triglicéridos; Vasodil: vasodilatación ROS: Especies reactivas de oxígeno; GLUT4: Proteína Transportadora de Glucosa 4; ↓ disminución; ↑ incremento.

Las principales actividades de los flavonoides sobre síndrome metabólico: prevención de la obesidad, hepatoprotector, hipolipidémico, antiinflamatorias, antioxidantes, hipoglucémicas, antidiabéticas, cardioprotectoras, antihipertensivas se han relacionado a mecanismos regulatorios de energía, como el incremento de AMPK y de PGC-1 $\alpha$ , ya mencionados; así como a mecanismos antiinflamatorios donde interviene la disminución del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina 6 (IL-6), la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1) y el factor nuclear kappa b (NFk-B)<sup>2, 26</sup>.

La expresión de la proteína adiponectina promovida por ngn resulta en una diferenciación de adipocitos siendo un factor importante en la inhibición de la inflamación celular e infiltración de macrófagos a tejido adiposo. Por otro lado, el efecto antihiperlipidémico se da a partir de la disminución de lípidos plasmáticos mediante la disminución de HMG-CoA sin afectar la actividad de la enzima colesterol acil-transfereraza (ACAT). La actividad hipolipidémica de nrg produce la disminución de LDL sin afectar los niveles de HDL, siendo este un beneficio en comparación a otros tratamientos antihiperlipidémicos. Además, su efecto hepatoprotector incrementa las actividades enzimáticas de AST, ALT y ALP, reduciendo la fibrosis y acumulación de lípidos<sup>2</sup>.

Se ha demostrado que los efectos antihipertensivos de los flavonoides se dan mediante la inhibición de TNF- $\alpha$  y la disminución de ROS y de la proliferación y migración de células de tejido muscular vascular, característicos de la patología de la aterosclerosis y la hipertensión<sup>2</sup>. El efecto vasorrelajante sugiere ser dependiente de endotelio y estar mediado por la liberación de factores relajantes como la liberación de NO, prostaciclina y la apertura de canales de K<sup>+</sup> - bloqueo de canales de Ca<sup>2+</sup>, así como la recaptura de iones Ca<sup>2+</sup> en el retículo sarcoplásmico y un efecto inhibidor de las ciclooxigenasas<sup>2, 19</sup>.

Las altas concentraciones de glucosa plasmática se han relacionado a las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-6 ya que causan disfunción en los receptores de insulina generando una resistencia a la insulina<sup>28</sup>. Es por esto, que los mecanismos de los flavonoides sobre las citocinas proinflamatorias son capaces de incrementar la concentración de insulina y prevenir el estrés oxidativo, así como incrementando el consumo de glucosa por músculo esquelético mediado por AMPK, lo que conduce a una disminución de glucosa plasmática generando un efecto antihiper glucémico<sup>2</sup>.

También se ha reportado la actividad antihiper glucémica de los flavonoides mediante la inhibición de las  $\alpha$ -glucosidasas, enzimas intestinales que hidrolizan los carbohidratos polisacáridos como el almidón, la maltosa y la sucralosa hacia monosacáridos biodisponibles. El inhibir a estas enzimas, genera una disminución de la hiper glucemia postprandial, además de que los inhibidores de estas enzimas suelen ser moderadores de los niveles de triglicéridos e incrementar la respuesta a la insulina. Como una ventaja adicional, los flavonoides han mostrado casi nula inhibición sobre las  $\alpha$ -amilasas comparados con los fármacos inhibidores de las  $\alpha$ -glucosidasas, lo que disminuye los malestares gastrointestinales relacionados al consumo de fármacos como la acarbosa debido a la fermentación bacteriana en el tracto intestinal<sup>27</sup>.

### **Formas farmacéuticas a base de citroflavonoides actualmente comercializadas**

En los mercados tanto nacionales como internacionales, se comercializan algunos productos nutracéuticos y farmacéuticos conteniendo citroflavonoides. Estos productos han demostrado poseer efectos farmacológicos significativos, y tienen presentaciones establecidas, lo que da evidencia de la posibilidad de utilizarse en formas farmacéuticas reconocidas en las farmacopeas internacionales; algunos productos se mencionan a continuación.

*Daflon*<sup>®</sup>: Comprimidos recubiertos a partir de la fracción flavonoide purificada diosmina 90% y hsd 10%. Se utiliza en el tratamiento de manifestaciones de insuficiencia venosa crónica, aumenta el tono de las venas y la resistencia de los capilares, disminuye la sintomatología a dicho padecimiento como lo son el dolor de extremidades inferiores, la sensación de pesadez, hormigueo e hinchazón<sup>6</sup>. También posee efecto vasoprotector, disminuye la distensibilidad y reduce la estasis venosa. Su vida media farmacocinética

es de 11 h y presenta una excreción del 14% por vía urinaria, matriz en la que se encuentra evidencia de su metabolismo mediante la presencia de sus ácidos fenólicos y el resto de la excreción se realiza por vía fecal<sup>28</sup>.

*Diosmina Teva*<sup>®</sup>: Comprimidos recubiertos utilizados para alivio a corto plazo del edema y síntomas relacionados a la insuficiencia cardíaca crónica, agente venolítico y vasoprotector con acción similar a Daflon<sup>7</sup>.

*Normogingko*<sup>®</sup>: Comprimidos recubiertos a partir del extracto seco cuantificado de *Gingko biloba* L. Su indicación terapéutica es para el tratamiento sintomático de alteraciones de la microcirculación cerebral como vértigos, mareos y tinnitus o síntomas asociados a insuficiencia circulatoria en extremidades. A nivel farmacodinámico, se ha observado un aumento de la tolerancia a la hipoxia cerebral, así como la compensación de algunas alteraciones del equilibrio y el aumento de la microcirculación mejorando las propiedades reológicas de la sangre, así como efecto neuroprotector<sup>29</sup>.

### **Biofarmacia y farmacocinética**

De acuerdo con Cáceres Guido<sup>30</sup>, podría decirse que Buchanan fue el primero en explicar un fenómeno farmacocinético aún sin conocer el término ni los modelos que actualmente le rigen. Buchanan describió la dependencia de actividad anestésica del éter con la concentración arterial y la cantidad inhalada de éter. Posteriormente autores como Noyes y Whitney, Nerst y Burner relacionaron la velocidad de disolución y las concentraciones de fármaco con la permeabilidad del tejido y la aplicación de la ley de difusión de Fick.

Los inicios de la farmacocinética son atribuidos a E. M Widmark, quien entre 1919 y 1932, publicó junto a otros autores estudios relacionados al tránsito de moléculas en el organismo<sup>30</sup>. Widmark expresó en un lenguaje matemático la relación entre la concentración plasmática y la actividad farmacológica<sup>30</sup>. Widmark centró sus estudios farmacocinéticos en metanol<sup>31</sup>, acetona<sup>31</sup> y etanol, del cual particularmente describió una cinética de eliminación de orden cero<sup>30</sup>. A partir de sus estudios en etanol, desarrolló un método de cuantificación que fue aplicado en 1941 para introducir límites permitidos de alcohol en sangre en motociclistas, dándole una aplicación en ciencias forenses<sup>31</sup>.

En 1937 Torton Teorrel publicó dos artículos científicos refiriéndose a modelos extravasculares e intravenosos respectivamente, desarrollando la teoría general del tratamiento de la cinética de distribución, ilustrando órganos con la capacidad de eliminar al fármaco de la sangre como el riñón y el hígado<sup>32</sup>. Teorrel describió además los casos típicos de curvas de porcentaje de dosis de fármaco frente al tiempo de las vías de administración extravasculares tanto en forma de concentración como de cantidad de fármaco en sangre y tejidos<sup>33</sup>. Más adelante, en 1953 el pediatra y matemático Friedrich Dost acuña la palabra farmacocinética como “la ciencia del análisis cuantitativo entre

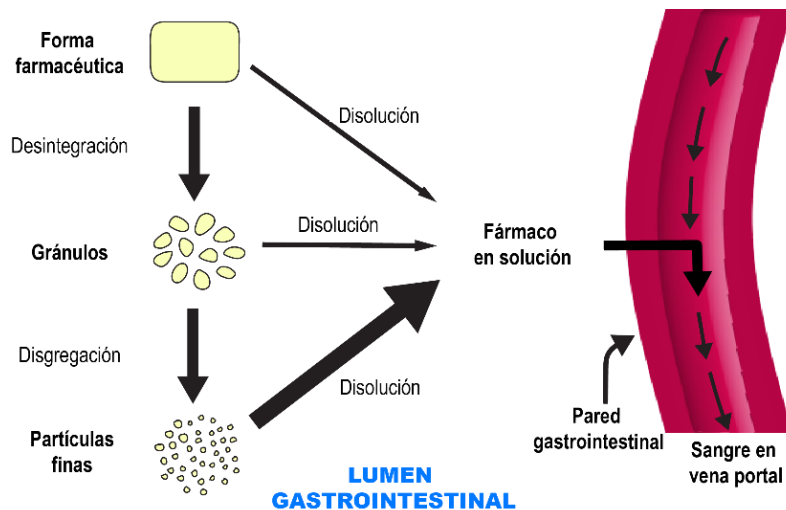
organismo y medicamento”<sup>34</sup>, siendo a partir de aquí que diversos autores y científicos han profundizado en este campo de estudio<sup>32</sup>.

Más adelante, J.G. Wagner en su obra “Fundamentals of Chemical Pharmacokinetics” en 1975<sup>33</sup>, definió la farmacocinética como “disciplina que corresponde al estudio de las velocidades de cambio de la concentración del fármaco y sus metabolitos en los fluidos biológicos, tejidos y excretas, así como también el de la respuesta farmacológica y la construcción de modelos adecuados para la interpretación de tales datos”<sup>34</sup>, introduciendo los modelos farmacocinéticos compartimentales<sup>33</sup>, y dándole mayor énfasis al ámbito clínico para la aplicación de regímenes posológicos, intervenciones en situaciones especiales, análisis retrospectivo de errores terapéuticos e investigación en la evaluación del costo-beneficio de cada medicamento, problemas de biodisponibilidad y evaluación de interacciones medicamentosas<sup>35</sup>.

Actualmente, los procesos farmacocinéticos se estudian mediante el sistema LADME, que representa mediante modelos matemáticos los diferentes procesos de liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación a nivel biológico<sup>36</sup>. Estos estudios se han logrado profundizar debido al desarrollo y ampliación de metodologías analíticas para la medición tanto de fármacos<sup>37</sup> como de sus metabolitos en concentraciones por debajo de las partes por billón (ng/mL)<sup>15</sup>.

El proceso LADME puede ser estudiado a partir de los parámetros farmacocinéticos, los cuales son definidos como los valores numéricos simplificados que se obtienen a partir de las curvas de decaimiento de las concentraciones del fármaco principalmente en fluidos biológicos en función del tiempo, reflejando el comportamiento dinámico del fármaco a una dosis y por una vía de administración definida bajo ciertas condiciones en un tiempo determinado<sup>38</sup>. Los procesos del sistema LADME se encuentran en función de las características intrínsecas del fármaco, la forma farmacéutica, la vía de administración, las condiciones del tejido del sitio de disposición y de los sitios relacionados a su absorción, biotransformación y eliminación<sup>39</sup>.

*Liberación:* Para una administración gastrointestinal de un fármaco contenido en una forma farmacéutica sólida, antes de que el fármaco sea biodisponible, deberá desintegrarse, disgregarse y disolverse en los fluidos gastrointestinales<sup>40</sup>. Este proceso depende de las características fisicoquímicas del fármaco y de la forma de dosificación, la fisiología del tracto gastrointestinal y la presencia de anormalidades en el tracto gastrointestinal. Una vez en solución el fármaco podrá atravesar las membranas del tracto para entrar en circulación por las venas mesentéricas que le llevarán a la vena porta y de ahí a circulación sistémica y al hígado<sup>39</sup>. La liberación puede ser inmediata o retardada, dependiendo de la formulación y los objetivos que esta tenga<sup>41</sup>. El proceso de liberación hacia la vena porta está representado en la figura 3.



**Figura 3.** Proceso de liberación de una forma de dosificación sólida de liberación inmediata<sup>39</sup>.

*Absorción:* es el proceso o grupo de procesos por los cuales un fármaco administrado alcanza el sitio de medición, la vía de administración intravascular considera una absorción completa; pero en el caso de una administración extravascular, la absorción no será completa porque el fármaco podría ser sometido a procesos de descomposición, metabolismo o excreción directa previo a alcanzar el sitio de muestreo. Para que esto ocurra, las moléculas del fármaco deben atravesar barreras fisiológicas desde el sitio de disposición<sup>40</sup>.

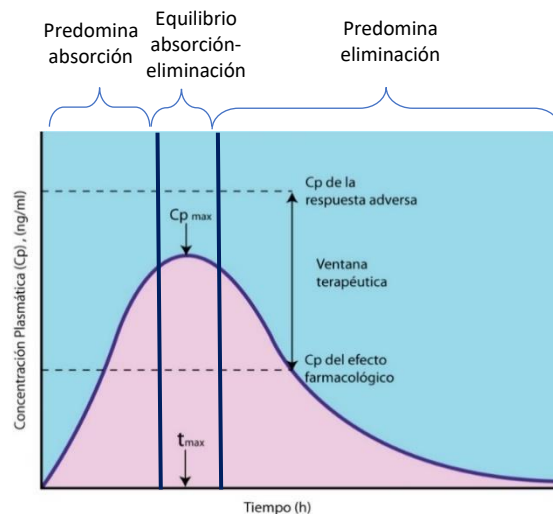
*Distribución:* Es el movimiento del fármaco tras la absorción<sup>40</sup>. Se refiere a los procesos involucrados en el intercambio de masa entre la sangre<sup>38</sup> y los diferentes tejidos incluido el sitio de acción y los órganos de eliminación como el riñón y el hígado<sup>40</sup>. La distribución se ve afectada por la afinidad del fármaco a las proteínas, su capacidad y mecanismos de ingreso a la célula y su regreso al medio extracelular para dirigirse a órganos de eliminación, donde puede haber procesos de reciclamiento o reabsorción principalmente hepática<sup>40</sup>.

*Metabolismo:* Son las reacciones que sufre el fármaco cuando entra en contacto con las enzimas y otras moléculas del organismo, generando diferentes metabolitos como productos. Éstas reacciones suelen estar encaminadas a transformar al fármaco en moléculas que sean más fáciles de eliminar, no obstante, pueden generarse algunos metabolitos que pudieran también ser farmacológicamente activos de forma similar al fármaco, también pudiesen llegar a competir con el fármaco en su sitio de acción o pueden ser inactivos o tóxicos<sup>40</sup>. La biotransformación con gran frecuencia se da de tipo enzimático con reacciones donde están involucradas diversas isoenzimas del citocromo P450, que a su vez puede interactuar o verse alterado por diversos inductores e inhibidores por agentes xenobióticos, modificando el metabolismo de un fármaco de estudio. También las reacciones de metabolismo pueden variar entre los individuos

debido a condiciones fisiológicas como el sexo, edad, genética, dieta y patologías no necesariamente relacionadas al fármaco<sup>36</sup>.

**Eliminación:** Es la salida del fármaco y de sus metabolitos hacia el exterior del cuerpo, puede realizarse por una o varias vías, siendo las más comunes la eliminación renal y hepática para la excreción urinaria y fecal respectivamente<sup>36</sup>; sin embargo, la eliminación también puede darse por las vías pulmonar, cutánea, glándulas mamarias, glándulas lagrimales, glándulas salivales, pelo y piel<sup>36</sup>.

En una administración oral, la concentración del fármaco a través del tiempo está en función de los procesos de absorción representados por la constante  $k_{abs}$ , y los procesos de eliminación representados por la constante  $k_{el}$ <sup>39</sup>. Las curvas farmacocinéticas (figura 4) son gráficas de concentración de fármaco en plasma ( $C$ ) frente al tiempo ( $t$ ) posterior a la administración del fármaco. El momento en que el fármaco es colocado en el sitio de disposición se denomina “tiempo cero” ( $t_0$ ), al cual le corresponde una concentración cero ( $C_0$ ), a este momento le continúa un incremento de la concentración plasmática con una cinética de primer orden, a lo que llamamos fase de absorción, en tanto que la fase de decaimiento de concentración es llamada eliminación<sup>39</sup>. Tanto la absorción como la eliminación suelen ser procesos de primer orden que muestran la velocidad a la cual el fármaco ingresa al organismo y al mismo tiempo es eliminado. Al momento en que se alcanza la concentración máxima ( $C_{max}$ ) se le denomina tiempo máximo ( $T_{max}$ ) y éstos dos parámetros se utilizan para caracterizar a la fase de absorción<sup>40</sup>. Entre más rápido se absorba un fármaco, la concentración máxima será mayor y el tiempo máximo será menor<sup>42</sup>.



**Figura 4.** Curva de distribución LADME de un fármaco por vía oral, modificado de Alan Talevi (2016)<sup>32</sup> y Gilman y col. (2018)<sup>41</sup>.

La ventana terapéutica de un fármaco es el rango de concentraciones que se encuentran entre la concentración mínima efectiva, también llamada concentración del efecto terapéutico y la concentración máxima tolerada, también llamada concentración mínima tóxica o concentración mínima del efecto adverso. El estudio de esas concentraciones de fármaco dentro y fuera de la ventana terapéutica son parte del estudio de la farmacocinética<sup>38</sup>.

El estudio farmacocinético en modelos animales, es parte de los estudios de la fase preclínica *in vivo* del desarrollo farmacéutico y se realiza para proveer los elementos necesarios para tomar importantes decisiones en cuanto a la dosis, toxicidad, formulación y el planteamiento de estudios clínicos<sup>12</sup>.

Cuando se administra más de un fármaco o un agente xenobiótico de interés farmacocinético, cada uno debe ser estudiado tanto de manera independiente como en su administración conjunta; evaluando las propiedades fisicoquímicas, los usos terapéuticos y la disposición fisiológica de cada uno, así como las posibles modificaciones fisicoquímicas que pudiera conferir la formulación farmacéutica cuando ésta aplique<sup>12</sup>.

Adicional a los procesos de absorción y eliminación antes mencionados, existen diversas variables biológicas que afectarán el estudio farmacocinético, ejemplo de ellas son el flujo sanguíneo en el sitio de absorción, la motilidad intestinal, la velocidad de vaciado gástrico, actividad hepatocelular, reabsorción activa, pH y velocidad de flujo urinario, factores genéticos, sexo, edad, perfil hormonal, dimensiones corporales y estado patológico<sup>43</sup>. La tabla 2 muestra algunos estudios donde una variable biológica representó cambios significativos en la absorción, metabolismo y eliminación de fármacos.

**Tabla 2.** Variables biológicas en farmacocinética.

<b>Variable biológica</b>	<b>Efecto observado</b>
Flujo sanguíneo en el sitio de absorción <sup>44</sup>	En un estudio clínico con pacientes insulino-dependientes, un incremento de flujo sanguíneo mediante incremento de temperatura en el sitio de aplicación de insulina subcutánea incrementó el AUC en 21%.
Velocidad de vaciado gástrico y motilidad intestinal <sup>45</sup>	Incremento en AUC y excreción renal de metformina en pacientes con (a) pretratamiento de propantelina para disminuir motilidad gastrointestinal y aumentar vaciado gástrico o (b) metoclopramida para el efecto opuesto. Se observó incremento en AUC y CL de metformina en los tratados con propantelina.
Velocidad de flujo sanguíneo hepático <sup>46</sup>	Explican que el CL de verapamil, nifedipino y diltiazem es dependiente del flujo sanguíneo hepático.

**Tabla 2 (continúa).** Variables biológicas en farmacocinética

Variable biológica	Efecto observado
Perfil hormonal <sup>47</sup>	El hipotiroidismo provocó inducción de CYP3A2 y supresión de CYP2C11. La ausencia de glándula tiroidea incrementó CYP8B1. El uso de hormonas anticonceptivas en tratamiento de reemplazo hormonal incrementó CYP1A, CYP2B1, CYP2B2.
Estado patológico <sup>48</sup>	Disminución de CL del antibiótico linezolid en pacientes con falla renal o hepática grave.
Transportadores, pH y velocidad de flujo urinario <sup>49</sup>	Realizaron estudios simulados de eliminación renal para predecir el CL de 8 fármacos utilizando diferentes pH, velocidades de flujo urinario modificadas y el uso u omisión de transportadores, los fármacos evaluados presentaron diferencias significativas ante las variables presentadas. Por ejemplo, un elevado flujo urinario (5 ml/min) disminuyó significativamente el $C_{max}$ de aciclovir y sulfametoxazol, CL tuvo cambios únicamente en cloranfenicol, nicotinamida y sulfametoxazol.
Genética <sup>50</sup>	En un estudio clínico sobre metformina, pacientes con el genotipo OCT1, presentaron concentraciones plasmáticas más elevadas, mayor $C_{max}$ , AUC, Vd/F menor, en tanto que $T_{max}$ y CL/F no presentaron cambios entre pacientes con y sin el genotipo.
Dimensiones corporales <sup>51</sup>	Incremento de AUC de atazanavir en vía intravenosa, oral e intraportal, y disminución del CL a la mitad en un modelo de ratas obesas comparadas con el control, lo que sugirió disminución de metabolismo hepático.

AUC: área bajo la curva; CL: aclaramiento; CL/F: aclaramiento en administración extravascular;  $C_{max}$ : concentración máxima;  $T_{max}$ : Tiempo máximo; Vd/F: volumen de distribución en administración extravascular; OCT1: catión orgánico transportador 1

## Modelos farmacocinéticos

El objetivo principal de la farmacocinética es explicar los fenómenos biológicos que ocurren al fármaco en el organismo, esto se realiza mediante modelos matemáticos que permiten describir, analizar e interpretar la información obtenida del fármaco en el tejido o fluido de estudio<sup>35</sup>. Una forma de explicarlo, es considerar al cuerpo como un conjunto de varios compartimentos a través de los cuales el fármaco entra y sale obedeciendo a cinéticas de primer orden<sup>52</sup>. Los compartimentos no son entidades reales anatómicas o fisiológicas<sup>53</sup>, son un concepto matemático de un estado virtual o ficticio que representa las relaciones de entradas y salidas del fármaco en el biosistema<sup>43</sup>. Wagner<sup>25</sup> explicó que un compartimento físico no existe como tal; pero puede representar el promedio de uno o varios procesos farmacocinéticos. Así pues, podemos imaginar un biosistema compuesto por un número infinito de compartimentos, el cuál sería matemáticamente impráctico por su complejidad<sup>36</sup>. Sin embargo, experimentalmente se ha observado que



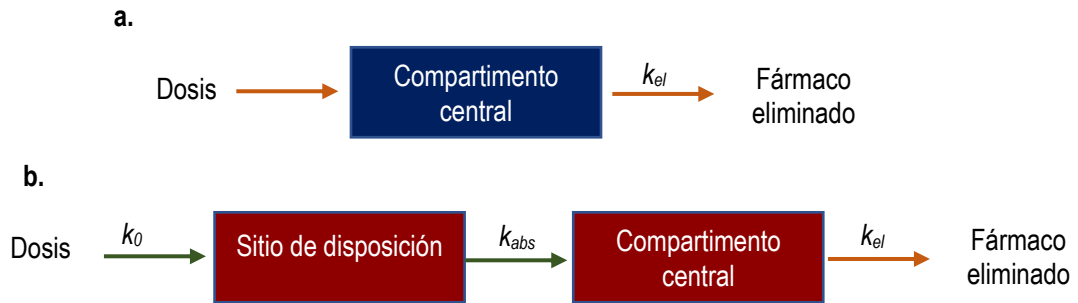
las cinéticas de la gran mayoría de los procesos biológicos se pueden describir por modelos hipotéticos de uno, dos o hasta tres compartimentos<sup>37</sup>. El modelaje matemático ofrece opciones prácticas para representar los datos cuantitativos a partir de una serie de consideraciones, variables y la relación entre éstas para explicar los procesos del proceso LADME a nivel biológico<sup>25</sup>.

En el estudio de los modelos compartimentales, Domínguez en 1934 introdujo el concepto *volumen de distribución* ( $V_d$ )<sup>31</sup>, este parámetro es utilizado como una guía para evaluar la distribución del fármaco en los compartimentos del organismo. Este volumen es estudiado a partir de las principales fuentes de agua del organismo: plasma, líquido extracelular, líquido intracelular; y no representa un volumen fisiológico real, si no una constante de proporcionalidad entre la cantidad total de fármaco en el organismo y las concentraciones plasmáticas<sup>54</sup>.

El modelo de un compartimento, es muy utilizado para estudios farmacocinéticos de una sola administración. Considera al organismo como un solo compartimento sin barreras de transferencia donde el fármaco se distribuye de manera instantánea y homogénea a través de todo el organismo; bajo el supuesto de que el fármaco se encuentra en equilibrio en la circulación y en el resto de los tejidos. Este equilibrio, no implica que las concentraciones sean las mismas en todo el biosistema, si no que guarda proporcionalidad y, por tanto, una variación en el plasma, implicará variaciones en el resto de las partes del biosistema<sup>43</sup>. Este modelo, introduce el concepto de *fracción del fármaco absorbido* ( $F$ ) a partir de una *dosis* ( $D$ ) y considera al *fármaco excretado* por heces como  $1-F$ ; así pues, la dosis será la suma de  $FD + (1-F)D$ <sup>43</sup>.

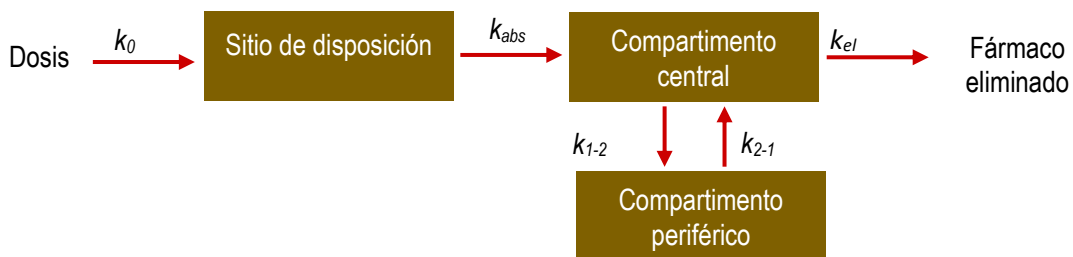
Podemos decir que un fármaco no se apega a un modelo de un compartimento, cuando el fármaco requiere un cierto tiempo para distribuirse a través de los tejidos y fluidos del organismo, y se observan fluctuaciones en la concentración plasmática con cinéticas de diferente orden; éste fenómeno suele deberse a la diferencia de perfusión sanguínea de los tejidos y a la afinidad química del fármaco por un determinado tejido<sup>53</sup>.

La figura 3, representa al modelo farmacocinético de un compartimento, (a) administración intravenosa, el fármaco es administrado directamente sobre la biofase, donde la constante de absorción ( $k_{abs}$ ) es cero, (b) administración extravascular, como la vía oral, en la cual el fármaco se coloca en un sitio de disposición del cual deberá ser absorbido.



**Figura 5.** Modelo de un compartimento a) administración intravascular y b) administración extravascular<sup>43</sup>.

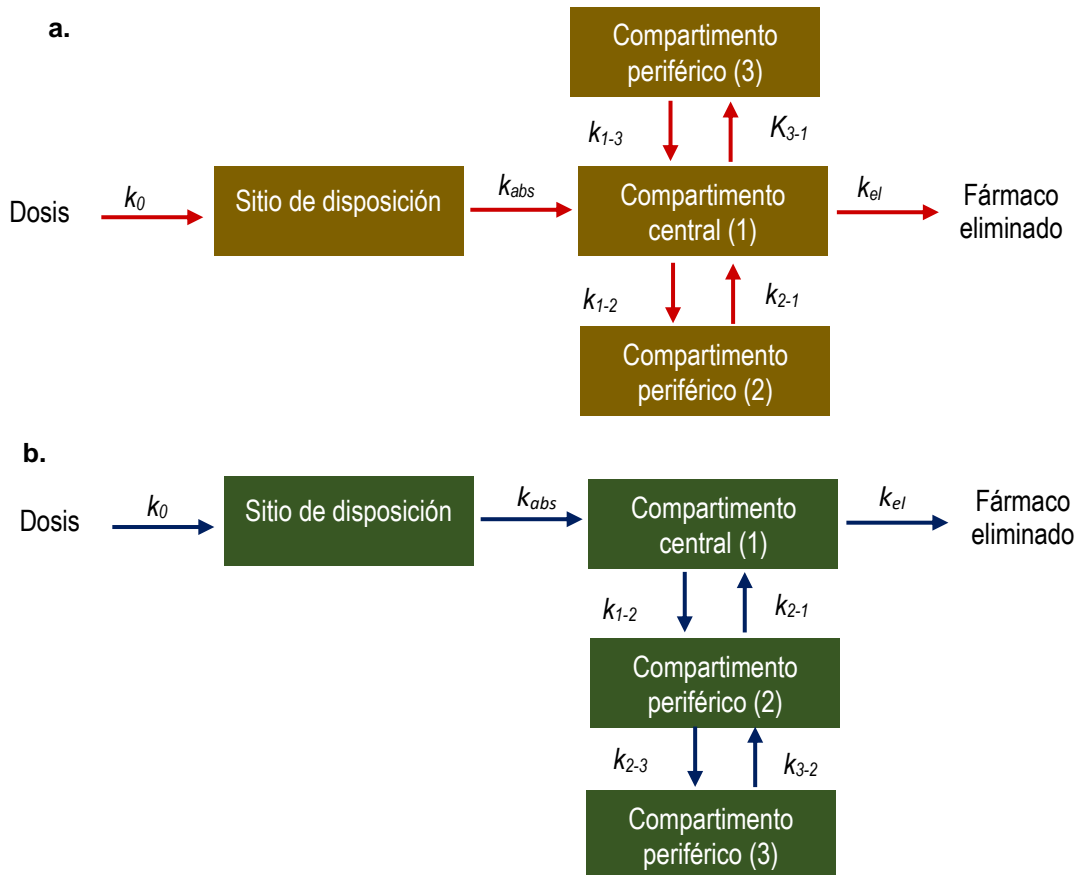
El modelo farmacocinético de dos compartimentos (figura 6), visualiza al cuerpo con dos compartimentos en equilibrio termodinámico. Al igual que en el modelo de un compartimento, el compartimento central puede o no ser el sitio de disposición. El primer compartimento es el llamado "compartimento central" en el que el fármaco es absorbido y del que el fármaco es eliminado y el segundo es un "compartimento periférico", no involucrado directamente con la absorción y eliminación, si no que solo interactúa con el compartimento central. A pesar de que un compartimento no debe ser visto como una entidad fisiológica, frecuentemente se identifica al torrente sanguíneo, hígado, riñón y tejidos de alta perfusión como compartimento central y a los tejidos como músculo, grasa y órganos de baja perfusión como compartimento periférico<sup>43</sup>.



**Figura 6.** Modelo de dos compartimentos por administración extravascular<sup>34</sup>.

Existen otros modelos farmacocinéticos de dos compartimentos donde la excreción se puede representar desde el compartimento periférico o desde ambos compartimentos con cinéticas diferentes. Los modelos de tres o más compartimentos son llamados multicompartmentales y se utilizan para describir el decremento de la concentración de fármaco en plasma en función del tiempo, de igual manera puede estudiarse la eliminación sólo desde el compartimento central y/o desde los compartimentos periféricos<sup>34,35</sup>. El modelo de tres compartimentos (figura 7) se utiliza frecuentemente para fármacos que se distribuyen hacia tejidos profundos como el tejido óseo y el tejido

graso. En este modelo, los compartimentos pueden ser en paralelo (a) donde cada compartimento interactúa únicamente con el compartimento central, o en serie (b), donde los compartimentos interactúan entre sí y con el compartimento central respectivamente<sup>34</sup>.



**Figura 7.** Modelo de tres compartimentos para una administración extravascular (a) en paralelo y (b) en serie<sup>34</sup>.

El modelo fisiológico de un fármaco fue introducido de la década de los 70's para ampliar el conocimiento de la relación de las funciones fisiológicas con el comportamiento del fármaco<sup>43</sup>. Estudia los coeficientes de partición de la relación tejido-plasma, la unión de tejidos y el manejo de la información de una forma realista para los órganos involucrados en los procesos de distribución y eliminación y es específico para un fármaco en los tejidos, por lo que genera muchos datos que son difícilmente explicables<sup>53</sup>. Este modelo se ha aplicado a algunos antibióticos betalactámicos por administración intravenosa y a la lidocaína por perfusión intravenosa, por mencionar algunos ejemplos<sup>43</sup>.

El modelo no compartimental, a diferencia de los modelos compartimentales y el modelo fisiológico, es aplicable de manera universal; es decir, que no tiene que diseñarse específicamente para cada fármaco, si no que cualquier fármaco bajo ciertas premisas

que se han diseñado para la interpretación del proceso puede explicarse bajo este modelo<sup>53</sup>. Este modelo es enteramente matemático, por lo que puede ser aplicado a casi todos los fármacos y sus metabolitos en tanto la cinética de primer orden sea aplicable. El modelo introduce el concepto de *tiempo medio de residencia* (TMR) que es el tiempo promedio que permanecen las moléculas del fármaco en el organismo y que, a su vez, el fármaco está siempre en equilibrio entre el torrente sanguíneo (plasma) y los órganos de eliminación. Matemáticamente el TMR se puede estudiar de la siguiente manera<sup>43</sup>:

$$TMR = \frac{AUMC}{AUC} \quad \text{donde} \quad AUMC = \int_0^{\infty} tC(t) dt \quad \text{y} \quad AUC = \int_0^{\infty} C(t) dt$$

Donde AUMC es el área bajo la curva en el primer momento, y se obtiene de la gráfica del producto de la concentración plasmática del fármaco y el tiempo contra el tiempo [ $C(t)$  vs  $(t)$ ] de cero a infinito. AUC es el área bajo el momento cero de la curva y se obtiene de graficar la concentración plasmática contra el tiempo de cero a infinito. [ $C$  vs  $(t)$ ]. El TMR es considerado una analogía estadística de la vida media ( $t_{1/2}$ ). Representa el tiempo en que se elimina el 63.2% de la cantidad de fármaco absorbido<sup>43</sup>.

El estudio farmacocinético de un modelo no compartimental, suele llevarse a cabo con datos sanguíneos (cuantificación en suero o plasma) o a partir de datos urinarios siempre que el fármaco intacto se elimine por vía renal y sea cuantificable en esta matriz biológica. En el primer caso se estudia la concentración del fármaco en torrente sanguíneo a tiempos definidos en el diseño del experimento, y en el segundo caso se estudia la cantidad de fármaco acumulado a diferentes tiempos. Con datos urinarios es importante recopilar y medir la cantidad total de orina excretada por micción para calcular el fármaco excretado a partir de la concentración de muestra que se analiza, también se debe considerar el total de orina para calcular la cantidad de fármaco excretado<sup>12</sup>.

En el caso de la cuantificación en sangre, basta con obtener la cantidad suficiente de suero o plasma necesarios para el método instrumental a utilizar para calcular las concentraciones del fármaco y graficar contra el tiempo. Las gráficas resultantes de concentración contra tiempo serán distintas, sin embargo, permiten obtener los mismos parámetros si se manejan los datos de manera satisfactoria. La curva de fármaco en plasma (figura 1) será una función exponencial la cual tendrá en un principio una tendencia ascendente hasta alcanzar una concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ) y posteriormente comenzará a disminuir de forma progresiva hasta estar por debajo del método de cuantificación desarrollado o hasta ser eliminado completamente<sup>12</sup>.

Existen diversos métodos para el manejo de datos farmacocinéticos desde el punto de vista matemático, Milo Gibaldi los describe en su obra "Farmacocinética"<sup>52</sup> y se mencionan a continuación (tabla 3).

**Tabla 3.** Manejo de datos farmacocinéticos para la aplicación de diversos modelos.

Método	Descripción
Transformada de Laplace (TdeL)	Parte de que la mayoría de los procesos farmacocinéticos son fenómenos lineales y usa la TdeL para la resolución de ecuaciones diferenciales, convirtiéndolos a expresiones algebraicas. Reemplaza la velocidad por el dominio de Laplace
Modelos Mamilares lineales (compartimental en paralelo)	Permite obtener las ecuaciones de cualquier modelo lineal con proceso de entrada de orden cero, uno o instantáneo mediante funciones generales de entrada y disposición. Utiliza fracciones parciales para la resolución de la TdeL, donde la función obtenida final describe todos los fenómenos que ocurren con el fármaco.
Método de los residuales	Utilizado para la descripción del proceso de absorción como la velocidad con que el fármaco deja el sitio de disposición. Describe la evolución temporal del fármaco en el organismo como una función exponencial suponiendo que $k_{abs} > k_{el}$ , utiliza la concentración extrapolada en la fase de absorción a partir de la ecuación de eliminación.
Método de los trapecios	Es la aplicación de una fórmula aproximada de integración mediante la formación de trapecios en las curvas de concentración-tiempo, logrando obtenerse las AUC en diversos intervalos que permiten el estudio de los procesos a diferentes tiempos. Su precisión depende del número de puntos de concentración en el intervalo.
Principio de superposición	Predice niveles de fármaco en dosis múltiples. El método consiste en que en cada nueva dosis se superpone una curva unidosis a la curva anterior, superponer curvas unidosis en cada tiempo de administración de una nueva dosis.
Sigma menos	Para datos urinarios, también llamado método de las cantidades residuales, evalúa la cantidad de fármaco excretado acumulado por vía urinaria mediante la medición del volumen de orina y la concentración por unidad de volumen hasta que la gráfica de cantidad de fármaco excretado acumulado frente al tiempo deje de tener una tendencia ascendente, esto será cuando el fármaco sea indetectable en orina o las concentraciones estén por debajo del límite de cuantificación del método analítico.

La cinética de primer orden de un fármaco es aplicable cuando tanto la absorción como la eliminación se describen como un par de funciones exponencial del tipo<sup>42</sup>:

$$\ln C = -m(t) + b \quad \text{o lo que es igual:} \quad C = e^{-mt+b}$$

Donde la pendiente de la ecuación ( $m$ ) es negativa en ambos casos y representa a las constantes de absorción ( $k_{abs}$ ) y de eliminación ( $k_{el}$ ). La constante de absorción puede expresarse como la probabilidad que tiene una molécula de absorberse en la unidad de tiempo, dicha probabilidad disminuye conforme la cantidad de moléculas disminuyen en función del tiempo<sup>55</sup>. La semivida de absorción ( $t_{1/2abs}$ ) es el tiempo que tarda en reducirse

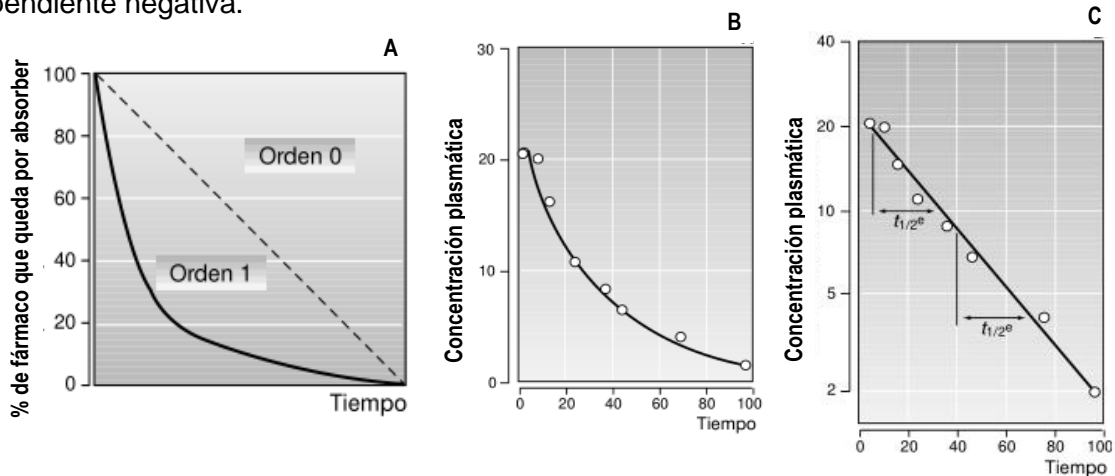
a la mitad el número de moléculas que quedan por absorberse y es la inversa de la constante de absorción<sup>53</sup>:

$$t_{1/2_{abs}} = \frac{\ln 2}{k_{abs}}$$

La constante de eliminación por su parte, representa la velocidad de eliminación, es decir, la disminución de la concentración del fármaco por unidad de tiempo, la cual es mayor cuando las concentraciones son altas que cuando son bajas<sup>55</sup>. Dado que el fármaco se encuentra en solución en el organismo, la mayor parte de los mecanismos de eliminación como la difusión pasiva, filtración, metabolismo y excreción, son de orden uno<sup>53</sup>. La vida media de eliminación ( $t_{1/2_{el}}$ ) representa el tiempo que demora el organismo en llegar a la mitad de la concentración máxima alcanzada y es calculada mediante la ecuación<sup>56</sup>:

$$t_{1/2_{el}} = \frac{\ln 2}{k_{el}}$$

La figura 8 representa los fenómenos de absorción y eliminación en una cinética de primer orden. La cinética de primer orden, al representarse en escala numérica, será una curva de decaimiento, en tanto que, en escala semilogarítmica, será rectilínea con pendiente negativa.



**Figura 8.** A) curva de absorción: orden 1 y orden cero, B) curva de eliminación de primer orden en representación numérica y C) curva de eliminación de primer orden en representación semilogarítmica<sup>42</sup>.

A partir de la constante de eliminación es posible calcular la velocidad de eliminación en función de la dosis y la distribución del fármaco utilizando la siguiente ecuación<sup>57</sup>:

$$Cl/F = \frac{D}{AUC} \quad \text{y} \quad Vd/F = \frac{D}{AUC * k_{el}}$$

Los datos de un estudio farmacocinético son ampliamente utilizados en la industria farmacéutica y en la investigación farmacéutica tanto en el desarrollo de nuevos fármacos como en los estudios de bioequivalencia. Es debido a esto que actualmente existen una gran variedad de herramientas y softwares tanto de libre acceso como de suscripción privada, capaces de realizar los cálculos matemáticos los modelos farmacocinéticos tanto compartimentales, no compartimentales y el modelo fisiológico. WinNonlin<sup>58</sup> en sus distintas versiones, Mathworks<sup>59</sup>, Biopak<sup>60</sup>, Pk-quest<sup>61</sup>, Pharmacalc<sup>62</sup> son algunas opciones para el manejo de datos experimentales y modelaje farmacocinético. Además, Microsoft Office ofrece *pK Solver*<sup>63</sup>, *pK 1* y *pK 2*<sup>58</sup>, complementos en Excel que permiten realizar cálculos farmacocinéticos y farmacodinámicos de manera sencilla, práctica, con bajos requerimientos computacionales, de libre acceso, y el uso de distintos modelos por diversas vías de administración a diferentes dosis.

### **Estudios de disolución en un modelo farmacocinético**

Como ya se mencionó, al realizar estudios farmacocinéticos, los principales procesos que intervienen en las curvas de concentración frente al tiempo en el compartimento central (circulación sanguínea) están en función de los procesos de absorción y eliminación; en la fase previa a  $C_{max}$ , predominan los procesos de absorción, mientras que al alcanzarse  $C_{max}$  predominan los procesos de eliminación. La absorción está en función del grado de disolución del fármaco y de la permeabilidad del tejido con respecto al fármaco; es decir, la velocidad en que el fármaco se disuelve en los fluidos del medio en el que se deposita el fármaco, el cual por la vía oral corresponde al tracto gastrointestinal, donde el pH es de  $2 \pm 0.5$  en el caso del estómago y de  $8.2 \pm 0.4$  para el intestino grueso, principales sitios de absorción del fármaco; y en segundo lugar, las condiciones del tejido donde el fármaco ya se encuentra en solución y preparado para ser absorbido<sup>64</sup>. Así pues, se desarrolló un diagrama (tabla 4) que representa esquemáticamente éstos dos factores, al que se le denominó *Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS)* el cual separa a los fármacos en cuatro grupos como se muestra a continuación y es reconocido por la farmacopea de los Estados Unidos de Norte América (USP)<sup>63</sup>.

**Tabla 4.** Sistema de Clasificación Biofarmacéutica<sup>63</sup>

	Solubilidad	Permeabilidad
Grupo I	alta	alta
Grupo II	alta	baja
Grupo III	baja	alta
Grupo IV	baja	baja

El estudio de la disolución de un fármaco se puede realizar mediante el método general de análisis “disolución”, el cual es reconocido por las diferentes farmacopeas alrededor del mundo para evaluar cómo el fármaco se libera de la forma de dosificación y entra en solución en uno o varios medios de disolución simulando las condiciones fisiológicas a las que se someterá el fármaco al ser administrado por la vía oral<sup>65</sup>.

La prueba de disolución tiene gran utilidad en el control de calidad y el paso de lotes piloto a escalas industriales del desarrollo farmacéutico; permite optimizar la distribución del fármaco, monitorear su estabilidad y hacer correlaciones entre las condiciones *in vitro* e *in vivo*<sup>66</sup>. Las dos principales aplicaciones a nivel de desarrollo farmacéutico del perfil de disolución de sólidos orales se dan durante el desarrollo de patentes y de productos bioequivalentes<sup>67</sup>. En un principio, al desarrollar patentes y productos innovadores, para asegurar la presencia del fármaco en la biofase en las concentraciones necesarias para el efecto farmacológico. En segundo lugar; cuando la patente ha vencido, para que los laboratorios de genéricos intercambiables demuestren que el perfil de disolución de su producto es idéntico al perfil de disolución del producto de referencia o patente. El proceso de disolución de un fármaco desde un sólido oral, está descrito en la figura 9. En un principio, el fármaco se disgrega en el medio a partir de la forma farmacéutica, después se disuelve para ser absorbido por las diferentes barreras del tracto gastrointestinal<sup>68</sup>. Por la vía oral, la fracción de fármaco que no logra disolverse en la parte superior del tracto gastrointestinal alto; estómago y/o primera sección del intestino, pasa al tracto gastrointestinal bajo para su excreción biliar sin haber pasado por la biofase. Esta fracción de fármaco se considera no biodisponible<sup>64</sup>.



**Figura 9.** Proceso de disolución de una forma farmacéutica sólida oral de desintegración inmediata.



## Análisis farmacocinético de flavonoides y la importancia de la cromatografía para su evaluación.

El interés en las últimas décadas sobre los flavonoides se encuentra en la variedad de efectos farmacológicos que han mostrado tras su administración por vía oral tanto en extractos, fórmulas alimenticias, formulaciones tanto herbales como nutracéuticas y farmacéuticas<sup>1</sup>. Los estudios farmacocinéticos de flavonoides se han realizado en diversas matrices, desde plasma<sup>69</sup> y orina<sup>70</sup>; para evaluar la distribución y eliminación de los analitos, hasta el desarrollo de metodologías para la extracción y cuantificación en tejidos específicos como cerebro, aorta, intestino, hígado y riñón permitiendo evaluar la distribución y acumulación tanto del flavonoide intacto como de varios metabolitos que se generan por la interacción del fármaco con las enzimas y otras sustancias propias del organismo<sup>71</sup>. Muchos estudios farmacocinéticos de flavonoides tanto en modelos experimentales en animales como en humanos, se han descrito siguiendo el modelo no compartimental. No obstante, se han reportado algunos estudios cuyos datos describen de modelos de uno y dos compartimentos. En la tabla 5, se presentan algunos modelos farmacocinéticos en ratas a partir de diversas matrices de administración.

**Tabla 5.** Modelos farmacocinéticos en ratas.

Flavonoides	Administración	Dosis	Modelo
Hsd <sup>72</sup>	FL - VO	31 µmol/kg	No compartimental
Ngn <sup>69</sup>	FL - VO	30, 90, 270 mg/kg	No compartimental
Hsd: Hst (como metabolito) <sup>73</sup>	FL - VI	4.5 µg Hsd	Uno y dos compartimentos
Ngn / Nrn / Hsd / Hst / Nhd <sup>74</sup>	Ext <i>Fractus aurantii</i> , VO	8 ml/kg	Dos compartimentos
Amf / Iht / Ngn / Qct <sup>75</sup>	Ext <i>Shixiao san</i> , VO	2.8 g/ kg	No compartimental
Nrg: Ngn (como metabolito) <sup>71</sup>	FL - VO	42 mg/kg Nrn	No compartimental
8-prenil-ngn <sup>76</sup>	FL-VO	10 mg/kg	No compartimental
Lqt / Ngn / Hsd <sup>77</sup>	Ext diversos - VO.	2.5 g/kg	No compartimental

Hsd: hesperidina; Hst: hesperetina; Nrn: naringina; Ngn: naringenina; Nhd: neohesperidina; Amf: amentoflavone; Iht: isoharmnetina; Qct: Quercetina; Lqt: liquiritigenina. VO: Vía oral; VI: intravitreal; Ext: extracto; FL: forma libre

Los estudios clínico-farmacológicos de los flavonoides se han popularizado desde finales del siglo XX. Desde 1960, la química analítica ha sido ampliamente utilizada para la

identificación, caracterización y cuantificación de estas moléculas<sup>78</sup>. En este sentido, la cromatografía ha impulsado en gran medida el estudio de los flavonoides mediante el desarrollo de técnicas analíticas utilizadas para su caracterización, desde la cromatografía de capa fina (TLC por sus siglas en inglés), hasta el uso de diferentes cromatógrafos tanto de líquidos como de gases, acoplados a una gran variedad de detectores, como tiempo de vuelo (TOF), fluorescencia (FL), trampa lineal de iones (LIT), espectrometría de masas (MS) y algunas combinaciones entre éstas; lo que ha aumentado la especificidad y la sensibilidad en la identificación y cuantificación de los metabolitos en diferentes matrices<sup>79</sup>.

La cromatografía es la principal herramienta analítica para la cuantificación de flavonoides en diversas matrices, así como en la detección de flavonoides en matrices biológicas por diferentes vías de administración y matrices de administración (extractos, formas libres, frutos o vegetales). La tabla 6, muestra diversos estudios de cuantificación de flavonoides en matrices biológicas con su respectivo orden de cuantificación.

**Tabla 6.** Técnicas analíticas de detección de flavonoides para estudios farmacocinéticos a partir de varias vías de administración en matrices de sangre y orina.

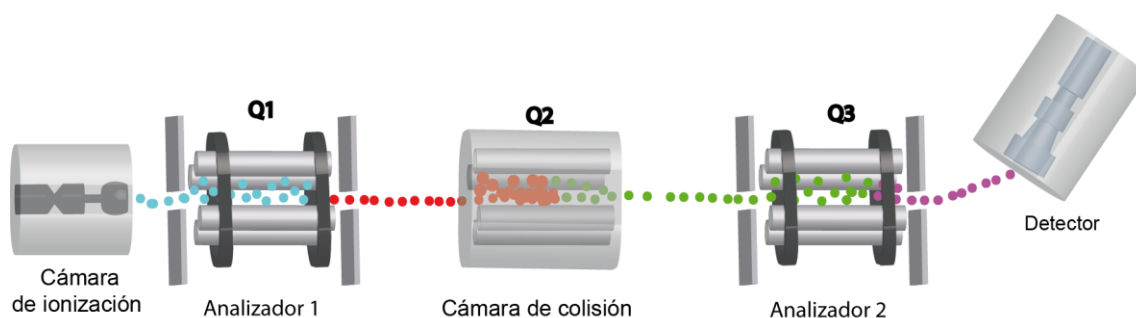
Flavonoide; vía de administración – forma; matriz de cuantificación	Detector y orden de cuantificación
Hesperidina y hesperetina en rata, intravitreal. Sangre y orina. <sup>73</sup>	HPLC-UV (µg/mL)
Hesperidina, naringina, neohesperidina, hesperetina y naringenina a partir de extracto de <i>Fractus aurantii</i> en rata. <sup>74</sup>	HPLC-MS/MS (ng/mL)
Metabolitos de quercetina en plasma y orina humano provenientes de la cebolla roja frita. <sup>70</sup>	LC-fotodiodo HPLC-DAD-UV (ng/mL)
Hesperetina y naringenina en plasma y orina humanos. VO 135 mg/kg c/u. <sup>80</sup>	HPLC-UV (ng/mL)
Hesperetina y naringenina en plasma y orina humano provenientes de muestra de jugo de naranja y uva. <sup>81</sup>	HPLC-EC (ng/mL)
Naringenina en plasma de rata. Administración intragástrica. <sup>82</sup>	HPLC-MS/MS (ng/mL)
Hesperetina y naringenina IG multidosis en rata. <sup>83</sup>	HPLC-UV (µg/mL)

HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia; EC-detector electroquímico; UV- ultravioleta; DAD: arreglo de diodos; MS/MS: espectrometría de masas de triple cuadrupolo; IG: intragástrico; VO: vía oral

La espectrometría de masas se ha popularizado en los últimos 20 años, permitiendo determinar la fórmula molecular y la fragmentación molecular de diferentes analitos utilizando colisiones en sistemas con una o varias etapas de colisión de masas; así pues, la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) acoplada a masas (MS) ha tomado la delantera en el campo del análisis de flavonoides<sup>78</sup>.

El uso de técnicas HPLC-MS proveen herramientas para separar e identificar mezclas complejas de flavonoides en una gran variedad de matrices con diferentes órdenes de magnitud de concentración, lo que se consideraba imposible hace apenas un par de décadas<sup>79</sup>. En el campo de la HPLC-MS, las técnicas de ionización son una pieza importante en el análisis directo de flavonoides, esto incluye a la ionización química (CI), el impacto electrónico (EI) y la ionización por electrospray (ESI); ésta última es considerada la más importante y avanzada en el análisis de flavonoides, ya que los flavonoides se ionizan de forma más eficiente en esta forma de ionización<sup>78</sup>. M. Holcapek y col.<sup>58</sup>, realizaron una revisión bibliográfica encontrando que el 48% de las aplicaciones del estudio de los flavonoides utilizando ESI, tuvieron mejor ionización en modo negativo, 33% utilizando ambos modos de ionización y el resto en modo positivo.

El uso de un triple cuadrupolo (QqQ) en la espectrometría de masas se ha considerado superior a otras técnicas instrumentales como la trampa de iones (IT); al tener un mayor rango dinámico para la cuantificación de moléculas como los flavonoides. Los detectores de masas con QqQ, combinan dos cuadrupolos con una cámara de colisión entre ellas; cada cuadrupolo puede ser operado en monitoreo de ion selectivo (SIM) o modo escaneo en un rango determinado. Para estudios de sobre la estructura, el primer cuadrupolo (Q1) se utiliza para la selección de un ion precursor el cual es colisionado en Q2 generando al ion producto que se selecciona en Q3 para ser dirigido hacia el detector. Así pues, en el detector de MS-QqQ, se cuantifican los iones que poseen una relación  $m/z$  específica, brindándole mayor selectividad a la técnica<sup>84</sup>. Este principio fue descrito por Paul y Steinweger en la Universidad de Bonn en 1952<sup>85</sup>.



**Figura 10.** Esquema de un analizador de espectrometría de masas de triple cuadrupolo.

Como ya se mencionó, las técnicas analíticas principalmente por HPLC han permitido el estudio de flavonoides y sus metabolitos en diferentes matrices. Actualmente, se sabe que, los flavonoides glicosilados administradas por vía oral, tienen la facilidad de hidrolizarse por acción de la microbiota intestinal, perdiendo su grupo carbohidrato. Tanto los glucósidos como las agliconas han sido encontradas en plasma como glucorónidos y sulfoglucorónidos, también convertidos en ácidos fenólicos por acción de las enzimas de la microflora intestinal. Además, las agliconas pueden ser excretadas por orina, mientras que los glucósidos al tener menor solubilidad en agua, poseen baja absorción y suelen excretarse por vía fecal<sup>71</sup>.

Diversos autores han descrito la farmacocinética de los citroflavonoides mediante sus parámetros farmacocinéticos, principalmente  $t_{1/2el}$ ,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $AUC_0^t$ ,  $AUC_0^\infty$ . Estos parámetros varían en función no solo de la vía de administración, sino también en función de la dosis, su administración como compuestos químicos libres, en extractos, alimentos o formulaciones nutraceuticas y farmacéuticas y, de las condiciones biológicas específicas de los sujetos de estudio. La tabla 7, muestra algunos parámetros farmacocinéticos obtenidos en estudios en ratas.

**Tabla 7.** Vidas medias, tiempos máximos y concentraciones máximas de flavonoides en ratas por vía oral.

Flavonoide(s)	$T_{1/2}$ (h)	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ (ng/mL)
Ngn <sup>69</sup>			
30mg/kg	0.15	0.083	2925
90 mg/kg	6.3	0.25	03717.5
270 mg/kg	8.25	0.083	4420
Hsd (ext)	3.17 ± 1.21	0.25 ± 0.09	17.04 ± 3.042
Ngn (ext) <sup>74</sup>	4.43 ± 0.60	0.42 ± 0.21	1088 ± 198.7
Ngn <sup>86</sup>	.98±0.24	0.50	5745.79±78
Ngn	1.19 ± 0.15	4.67 ± 1.03	651.33 ± 230.72
Hst <sup>87</sup>	2.95 ± 1.85	7.00 ± 1.10	298.15 ± 96.25
Hsd (ext)	3.25 ± 1.32	0.18 ± 0.09	29.40 ± 3.73
Nrg (ext) <sup>88</sup>	6.58 ± 3.50	0.11 ± 0.04	282.4 ± 50.7
Hsd	9.6 ± 0.7	9.3 ± 1.9	313.06 ± 27.8
y su metabolito			
Hst <sup>89</sup>	6.2 ± 1.1	14 ± 3.1	43.5 ± 16.0

$T_{1/2}$ : Tiempo de vida media;  $T_{max}$ : Tiempo máximo;  $C_{max}$ : Concentración máxima; Hsd: hesperidina; Hst: hesperetina; Ngn: Naringenina; Nrg: naringina; ext: flavonoide a partir de extracto.

## **Estudios previos para la formulación de una tableta a base de citroflavonoides con actividad antidiabética y antihipertensiva.**

En el grupo de investigación se desarrolló una mezcla de los citroflavonoides hsd y ngn. A esta mezcla se le han realizado diversos estudios, que van desde la selección de las dosis efectivas medias ( $DE_{50}$ ), estudios *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* sobre el efecto farmacológico, toxicológico, dosis efectiva, métodos de detección y cuantificación para la biodisponibilidad, los cuales se mencionan a continuación.

Para la selección de los flavonoides y sus proporciones en mezcla, se realizaron ensayos *ex vivo* e *in vivo* para determinar el efecto antihipertensivo e hipoglucemiante de los flavonoides. La actividad antihiper glucémica y la influencia en el metabolismo de los carbohidratos de los flavonoides, fue estudiada por Cabañas Wuan<sup>20</sup> y Ramírez Herrera<sup>90</sup>, utilizando modelos *in vivo*, tanto en ratas normoglucémicas como en ratas con diabetes inducida, se evaluaron mezclas a diferentes concentraciones (mg/kg), realizando curvas de tolerancia a la glucosa utilizando glibenclamida y metformina como control y agua purificada como blanco. En el efecto antihipertensivo, González Rivero<sup>91</sup> utilizó un modelo *ex vivo* en anillos de aorta aislada de rata evaluando mediante curvas de contracción-respuesta, siete mezclas de hsd-ngn a diferentes proporciones encontrando un efecto vaso relajante dependiente de endotelio con acción sobre los canales de  $Ca^{2+}$  produciendo relajación, el cual se vio potenciado en la mezcla seleccionada. Posteriormente, Correa Polanco<sup>21</sup> evaluó la dosis efectiva para obtener los efectos farmacológicos estudiados de la mezcla en modelos *in vivo* mediante curvas de glucosa y curvas de presión arterial, obteniendo la dosis que se trabaja en este proyecto de investigación de 160 mg/kg. Otros estudios previos, determinaron que la mezcla es segura, mediante prueba de toxicidad aguda<sup>21</sup>, realizados de acuerdo a la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE, Guía 423), se encontró que la Dosis Letal 50 ( $DL_{50}$ ) es superior a los 2000 mg/kg, ubicando al fármaco en la categoría 5 de la Globally Harmonized Classification System (GSH).

A partir de la dosis efectiva media y conociendo su  $DL_{50}$  en ratas, se realizó una formulación preliminar de un comprimido con diversos excipientes compatibles que le dieron a los flavonoides mejores propiedades de compactación<sup>18</sup> los cuales cumplen con los requerimientos farmacopéicos de dureza, friabilidad y uniformidad de dosis; así mismo, la formulación presenta una rápida disgregación en medios acuosos<sup>10</sup>.

Oney-Montalvo<sup>17</sup>, desarrolló método de preparación de la muestra por EFS de seis flavonoides en suero murino: rtn, qct, hsd, hst, nrg y ngn; el método fue validado con la obtención de sus respectivos datos de validación linealidad, repetibilidad, exactitud, robustez, y límites de detección y cuantificación, validando también un método de cuantificación por HPLC-UV. Posteriormente, Vera-Sánchez<sup>16</sup> optimizó el método de cuantificación, adecuándolo a un equipo HPLC-MS/MS, ajustando los mejores parámetros para la ionización y cuantificación.<sup>16</sup>

La tabla 8 resume los parámetros de la validación desarrollada por Vera-Sánchez<sup>16</sup>, comenzando con un modelo Plackett Burman de 7 factores: temperatura del gas (TG), flujo del gas (FG), nebulizador (Nb), temperatura del gas de recubrimiento (TGF), flujo de gas de recubrimiento (SGF), voltaje capilar y voltaje del inyector, cada uno en tres niveles. Los cuatro factores que resultaron significativos, se llevaron a un diseño de primer orden 2<sup>4</sup> para un estudio final Box-Behen de 3 factores: nebulizador, temperatura del gas de recubrimiento y voltaje del inyector evaluados en tres niveles cada uno, obteniendo los respectivos parámetros de validación indicados por la FDA. La tabla 9 muestra los límites de detección, cuantificación y precisión del método optimizado por Vera-Sánchez<sup>16</sup>, así como el porcentaje de recuperación, precisión y exactitud en los 3 niveles evaluados durante la validación.

**Tabla 8.** Parámetros de validación del método analítico optimizado<sup>16</sup>.

Parámetro	Especificaciones
Primer modelo estadístico: Plackett-Burman	4 parámetros: Confianza: p<0.05 Corridas: 12 Factores: Temperatura del gas, flujo de gas, nebulizador, SGT, SGF, voltaje capilar, voltaje del inyector.
Segundo modelo estadístico: Diseño factorial 2 <sup>4</sup>	Factores: flujo de gas, nebulizador, SGT, voltaje de inyector. No se ajustaron a modelo de primer orden.
Tercer modelo estadístico: Box-Behen	3 factores: nebulizador, SGT, voltaje de inyector Confianza: p<0.05
Documento de validación: FDA	Validación analítica. Especificación: 80-110%
Linealidad y repetibilidad instrumental	3 curvas de calibración; 5 niveles 3 días (variación interdía). m>0; R>0.99
Sensibilidad	0.24 a 0.68pg Veracidad: >90% Precisión: <5% DER: dentro de la normativa.
Límite de detección	Curvas de 5 niveles (5,10,15,20,25 ng/mL)

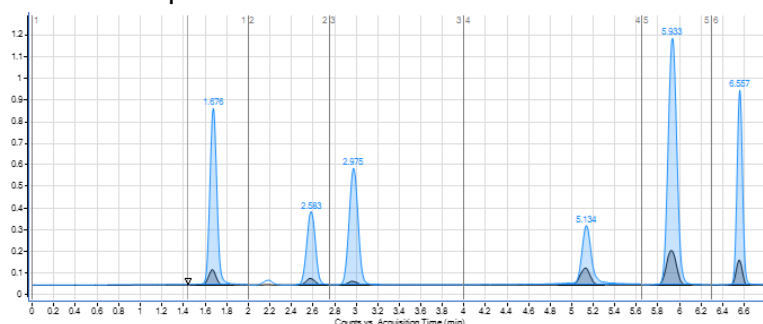
SGT: temperatura de recubrimiento; SGF: flujo de gas de recubrimiento; DER: Desviación estándar residual

**Tabla 9.** Precisión y límites de detección y cuantificación del método optimizado<sup>16</sup>.

Flavonoide	LD (ng/mL)	LD (pg)	LQ (ng/mL)	LQ (pg)	Rec %	PI %	MA %
Hsd	0.34	0.24	1.13	2.26	93.13	88.84	96.03
Ngn	0.16	0.32	0.53	1.07	92.6	86.40	95.53

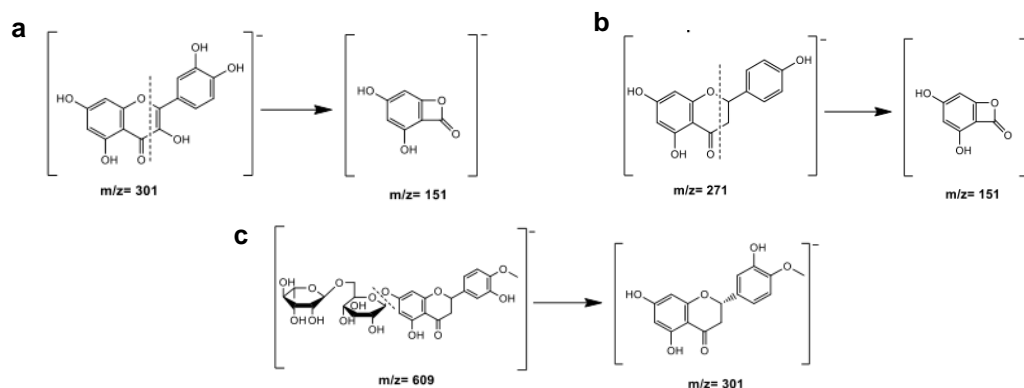
LD: límite de detección; LQ: límite de cuantificación; %Rec: porcentaje promedio de recuperación  
PI: Precisión intradía; MA: precisión del método analítico

La figura 11 muestra el cromatograma de la optimización del método analítico por Vera-Sánchez para seis flavonoides. En azul oscuro en la parte inferior de la gráfica se observan las señales que fueron el punto de partida al realizar el tuning en el equipo a partir del cual se realizaron los diseños experimentales. En azul celeste, el cromatograma final producto de la optimización, elevando el área bajo la curva y la sensibilidad 15 veces aproximadamente.



**Figura 11.** Cromatograma de la elución de los 6 flavonoides. Tiempos de retención= 1.67 min: rutina, 2.58 min: naringenina, 2.975 min: hesperidina, 5.134 min: quercetina, 5.933 min: naringenina y 6.557 min: hesperetina.<sup>16</sup>

La figura 12, muestra los esquemas de fragmentación de ion precursor y ion producto obtenidos por Vera-Sánchez<sup>16</sup>.



**Figura 12.** Esquemas de ion precursor y ion producto para (a) quercetina (I.S), (b) naringenina y (c) hesperidina del método validado<sup>16</sup>.

## **HIPÓTESIS**

Las concentraciones séricas los citroflavonoides hsd y ngn pueden verse modificadas al coadministrarse por la vía oral en su de forma mezcla y tableta, comparado con su administración individual, generando cambios en sus parámetros farmacocinéticos y biodisponibilidad.





## JUSTIFICACIÓN

Los citroflavonoides son moléculas de alto interés preclínico y clínico los cuales han demostrado diversas actividades biológicas relacionadas principalmente al tratamiento de padecimientos relacionados al síndrome metabólico como los procesos inflamatorios, oxidativos, y del metabolismo de lípidos y carbohidratos. Existen productos como el Daflón® (hesperidina-diosmina) que se comercializan principalmente con actividad sobre la insuficiencia venosa crónica.<sup>28, 69, 92</sup>

En este sentido, surge el proyecto “*Estudio preclínico de una forma farmacéutica sólida de citroflavonoides con propiedades hipoglucemiantes e hipotensoras: caracterización farmacocinética y farmacodinámica de un potencial fitofármaco*” registrado ante Problemas Nacionales (CONACYT No. 756), liderado por el Dr. Rolffy Ortiz Andrade, del cual surge MIX-160 (hsd:ngn) con actividad antihiper glucémica y antihipertensiva a una  $DE_{50}$  de 161 mg/kg, que a su vez demostró que su  $DL_{50}$  se encuentra entre los 2000 y 5000 mg/kg representando una relación  $DL_{50} > 10DE_{50}$ , demostrando una ventana terapéutica amplia.<sup>19-21</sup>

La evaluación farmacocinética es una parte elemental en la investigación preclínica y clínica al estudiar la cronología del fármaco en el organismo, respondiendo principalmente al cuestionamiento ¿qué le hace el organismo al fármaco? Esta pregunta se responde mediante la cuantificación del fármaco en una o varias matrices biológicas, siendo sangre y orina las que se utilizan con mayor frecuencia<sup>52,53</sup>. La farmacocinética permite obtener información valiosa para el planteamiento de futuros estudios en el desarrollo farmacéutico tales como: proponer o modificar un régimen posológico, conocer el comportamiento del fármaco en la biofase, proponer, evaluar y/o modificar alguna formulación, predecir comportamientos en dosis únicas y múltiples, evaluar interacciones entre el fármaco de interés, sus metabolitos y otros xenobióticos así como realizar una nueva evaluación costo-riesgo-beneficio<sup>93</sup>.

Así pues, en este estudio se realizó el estudio farmacocinético de hsd y ngn, obteniendo los principales parámetros farmacocinéticos:  $C_{max}$ , la cual se alcanza a un  $T_{max}$ ,  $AUC_0^t$ ,  $AUC_0^\infty$ ,  $t_{1/2abs}$ ,  $t_{1/2el}$ ,  $Cl/F$ , y  $Vd/F$ , para la evaluación de diferencias significativas en la coadministración de los flavonoides así como la posibilidad de que la formulación y las operaciones unitarias relacionadas al tableteo causen una modificación a la farmacocinética. Los resultados podrán utilizarse para el planteamiento de otras interrogantes y proyectar a futuro la posibilidad del estudio de la mezcla y/o la tableta en la fase clínica para el tratamiento de diabetes e hipertensión que son problemas de salud pública en México y en el mundo.



## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar los parámetros farmacocinéticos de los citroflavonoides hesperidina-naringenina contenidos en la mezcla MIX-160 en un modelo de ratas Wistar sanas.

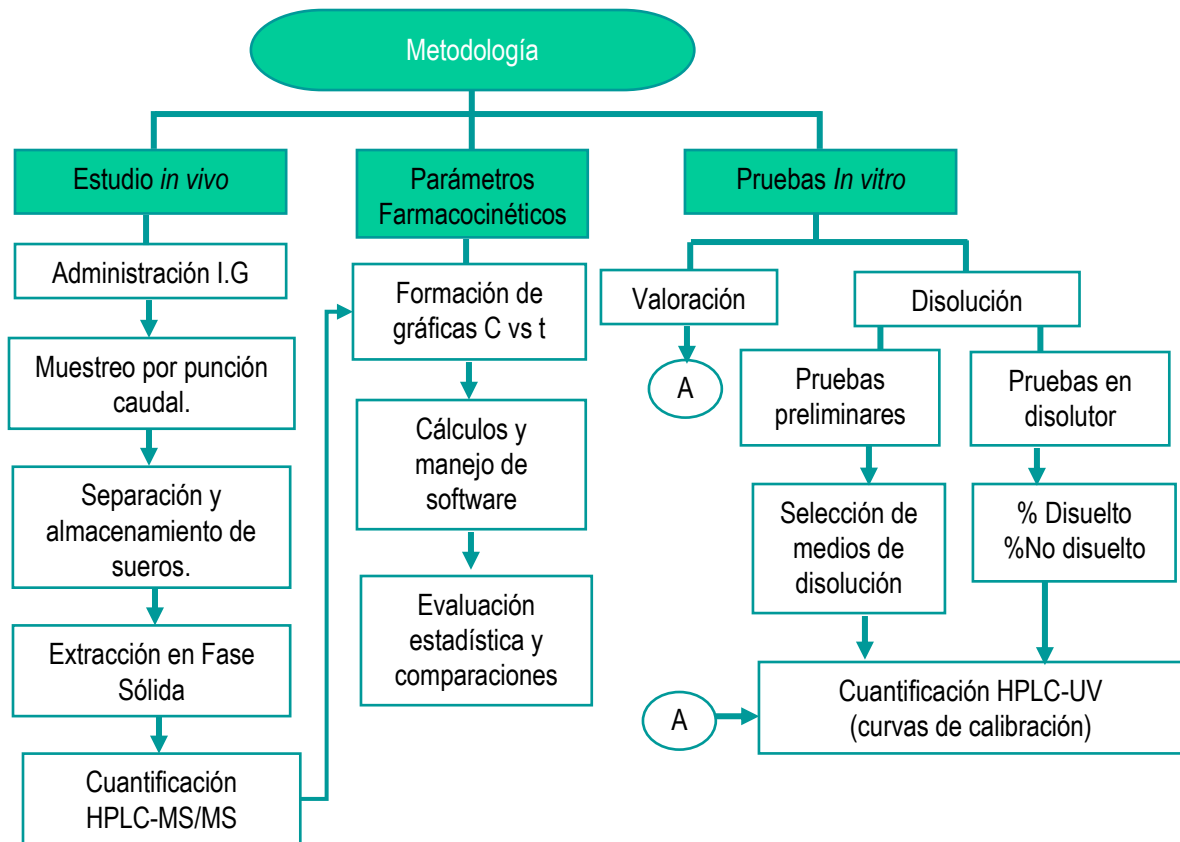
## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Cuantificar las concentraciones séricas de naringenina y hesperidina en su forma independiente, en la mezcla libre (MIX-160) y mezcla contenida en la tableta a diferentes tiempos para la formación de curvas farmacocinéticas.
2. Comparar los parámetros farmacocinéticos: Concentración plasmática máxima, tiempo máximo, área bajo la curva, vida media obtenidos para cada uno de los tratamientos de hesperidina y naringenina.
3. Realizar los estudios farmacopéicos: uniformidad de contenido, valoración y disolución, a la forma farmacéutica previamente diseñada que pudieran ayudar a explicar resultados farmacocinéticos.



## MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología fue separada en tres fases correspondientes a: muestreo in vivo, cálculos farmacocinéticos y pruebas in vitro, cada una correspondiente a una serie de pasos ordenados los cuales se explican en la figura 13.



**Figura 13.** Diagrama de flujo metodología experimental.

### Reactivos y animales de experimentación.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar provenientes del bioterio de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Los animales recibieron una previa adaptación a las condiciones del laboratorio de entre dos y tres semanas, hasta alcanzar un peso de  $280 \pm 70$  g para la experimentación. Los procedimientos con animales se llevaron a cabo en apego a la NOM-062-ZOO-1999<sup>94</sup>, Norma Oficial Mexicana: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Los flavonoides hsd, ngn, nrg, hst y qct utilizados en las curvas de calibración y soluciones estándares fueron grado analítico marca Sigma-Aldrich con pureza >98%. La hsd y ngn para la administración intragástrica fueron de la misma marca grado experimental, pureza  $\geq 80\%$

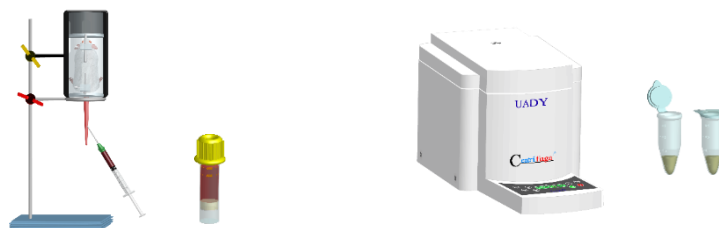
y  $\geq 96\%$  respectivamente. La elaboración de las tabletas se llevó a cabo con excipientes grado farmacéutico. Para la fase analítica se utilizaron solventes grado HPLC.

### Elaboración de tabletas

Las tabletas utilizadas en el estudio fueron elaboradas en el Laboratorio 01 de Investigación en Tecnología Farmacéutica y Planta Piloto de Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Para esto, se pesaron tanto excipientes como ingredientes farmacéuticos activos para un total de 120 g de sólidos polvulentos (flavonoides + excipientes). Los polvos se mezclaron en un contenedor de polipropileno de doble cono durante 15 min. Se pesaron individualmente  $301 \pm 2$  mg de sólidos polvulentos en canastillas de papel encerado, se vaciaron en un punzón de 10 mm de diámetro y el cual se montó en una prensa mecánica marca Zhermack, la compresión se realizó a 1400 psi durante 5 s<sup>18</sup>. Se elaboró un total de 400 tabletas. Para evaluar la calidad de la compresión, se evaluó la friabilidad de 20 tabletas tomadas al azar y otras 20 para dureza<sup>10</sup>. Ambos estudios realizados en un equipo multifuncional Guoming PJ-3 tablet four-usage tester HS code 903180909.

### Dosificación, toma de muestra y almacenamiento.

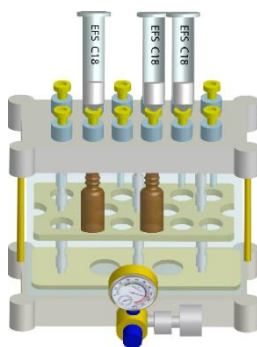
Las ratas se separaron en cuatro grupos experimentales para el estudio de las tres formas de cada flavonoide: individual, mezcla y tableta. Para cada grupo, la administración se realizó por vía intragástrica en un horario matutino con un ayuno de 16 horas. La dosis utilizada fue de 161 mg/kg de MIX-160 y sus equivalentes masa para la administración de los flavonoides individuales y tableta. La obtención de muestras se realizó a los tiempos de 5, 15 y 30 min y 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 18 y 24 h. La toma de muestra (figura 14), se realizó por punción caudal<sup>95</sup> utilizando aguja calibre 21 G acoplado a aguja de insulina de 100 unidades. Las muestras se colocaron en tubos microtainer de 0.8 mL con gel separador de suero, se reposaron 30 min y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min. El suero sobrenadante se transfirió a microtubos de 0.5 mL, los cuales se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . desde el momento de la separación hasta 4 horas previas al tratamiento de la muestra<sup>96</sup>, 2 horas permanecieron en refrigeración a una temperatura de entre  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y 2 horas a temperatura ambiente.



**Figura 14.** Toma de muestra por punción caudal y separación de suero por centrifugación.

## Tratamiento de la muestra

Se realizó por extracción en fase sólida (EFS, figura 15) utilizando cartuchos C<sub>18</sub> marca Agilent Technologies con 1000 mg de fase estacionaria y volumen de 6 mL en un sistema de vacío múltiple manifold Visiprep Supelco con válvula de control de presión. Para el acondicionamiento y activación de los cartuchos se hizo pasar 5 mL de metanol, seguido de 5 mL de agua pH 7, se adicionaron 200 µL de la muestra, se añadió a los cartuchos una solución a 20 ppm de qct como estándar interno para una concentración final de 1 ppm en la muestra final. Se lavó dos veces el cartucho con agua destilada y se extrajeron los analitos de interés con 2 mL de metanol grado HPLC, recibéndolos en viales de vidrio color ámbar<sup>17</sup>.

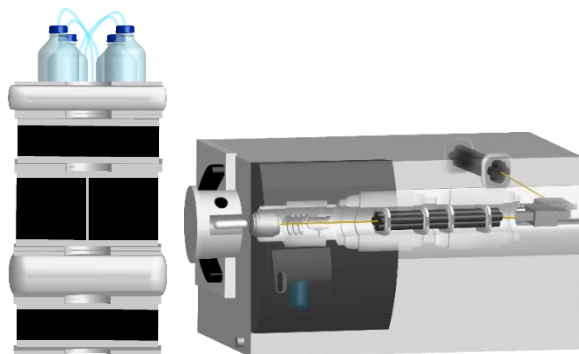


**Figura 15.** Extracción en fase sólida utilizada para la preparación de las muestras.

## **Análisis de la muestra: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplada a detector de Masas con triple cuadrupolo**

Los flavonoides fueron eluidos y cuantificados por UHPLC-MS/MS (figura 16) en un equipo marca Agilent Technologies 1290 Infinity equipado con una bomba cuaternaria e inyector automatizado acoplado a un espectrómetro de masas QqQ de la misma marca, modelo 6470 con fuente de ionización ESI-Jet Stream. Se utilizó una columna Zorbax Eclipse Plus RRHD de 50 mm de longitud con 3.6 mm de diámetro interno y fase estacionaria C<sub>18</sub> con tamaño de partícula 1.8 µm. Como fase móvil se utilizó agua 1% (A) con ácido fórmico, metanol (B) y acetonitrilo (C). El volumen de inyección fue de 5 µL de muestra y el análisis se llevó a cabo en un sistema por gradiente iniciando en 75%A, 12.5%B, 12.5%C; hasta alcanzar 50%B y 50%C en un tiempo de análisis de 7 minutos. Los compuestos de interés fueron identificados en modo negativo con una relación  $m/z$  de ion precursor → ion producto de 271.1 → 151.1 para ngn; 609.2→301.1 para hsd y 301.1→151.1 para qct como estándar interno. Este método fue previamente validado por los laboratorios de Cromatografía y Farmacología de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán<sup>16</sup>.





**Figura 16.** Equipo HPLC-MS/MS para detección y cuantificación de flavonoides.

### Manejo de datos para obtención de parámetros farmacocinéticos

Se obtuvieron las concentraciones séricas a partir de los datos obtenidos de la cuantificación y se procesaron bajo un modelo no compartimental mediante cálculos matemáticos utilizando las herramientas computacionales: Microsoft Excel (complemento pk-Solver)<sup>63</sup>, WinNonlin 2.0, GraphPad Prism 8.0.2, Origin 8.6 (32 bits) para la obtención de gráficas, parámetros farmacocinéticos de la fase de eliminación<sup>97</sup>, obtención de los datos de absorción por extrapolación y conversión matemática para generar las ecuaciones tanto de absorción como de eliminación<sup>39</sup> de ambos flavonoides en sus tres tratamientos. Donde:

$$t = \text{tiempo de muestreo (h)} \quad C = \text{concentración} \left( \frac{\text{ng}}{\text{ml}} \right) \quad \text{Dosis} = \frac{\text{mg}}{\text{kg}} \text{ administrados}$$

$$C_{max} = \text{concentración máxima alcanzada} \left( \frac{\text{ng}}{\text{kg}} \right)$$

$$T_{max} = \text{tiempo en que se alcanza } C_{max} \text{ (h)}$$

$$C_{ult} = \text{última concentración analizada} \left( \frac{\text{ng}}{\text{kg}} \right)$$

Las constantes de eliminación, así como la intersección en el eje y para cada flavonoide en cada uno de sus tratamientos se obtienen a partir de las gráficas [t vs ln C] donde la constante de eliminación es el valor absoluto de la pendiente de eliminación<sup>52</sup>.

$$\ln C = -mx + b$$

$$k_{el} = -m \text{ de eliminación (h}^{-1}\text{)}$$

La constante de absorción se obtiene por el método de los residuales mediante extrapolación a partir de la ecuación de eliminación obteniéndose un valor denominado [ln C<sub>pl</sub>], el cual al obtenerse su exponencial Euleriana se obtiene el valor [C<sub>pl</sub>]; se restan individualmente los valores experimentales obtenidos de la concentración (C) en

la fase de absorción y se obtienen los valores corregidos de absorción, donde se considera el valor absoluto de dicha resta. Estos valores nuevamente se grafican [ $t$  vs  $\ln |C_{p_{ll}} - C|$ ] donde se obtiene nuevamente una recta con pendiente negativa<sup>55</sup>:

$$\ln |C_{p_{ll}} - C| = -mx + b$$

$$k_{abs} = -m \text{ de absorción } (h^{-1})$$

Los valores  $t_{1/2_{abs}}$  y  $k_{abs}$ <sup>39</sup>,  $t_{1/2_{el}}$  y  $k_{el}$ <sup>56</sup>,  $TMR$ <sup>43</sup>,  $AUC$ <sup>52</sup>,  $Vd/F$ <sup>54</sup> y  $Cl/F$ <sup>57</sup> fueron calculados mediante los softwares antes mencionados, los cuales se basan en las fórmulas mencionadas con anterioridad, realizando algunas conversiones de unidades para facilitar el manejo de datos:

$$\frac{Vd}{F} = \frac{Dosis}{AUC * k_{el}} = \frac{\frac{mg}{kg}}{\frac{ng}{ml}} = \frac{mg * ml}{ng * kg} * \frac{10^6 ng}{1 mg} * \frac{1 l}{1000 ml} = \frac{kl}{kg} = \frac{l}{g}$$

$$\frac{Cl}{F} = Vd * k_{el} = \frac{l}{g * h} = \frac{l}{g} * \frac{1}{h} * \frac{1000 g}{1 kg} = \frac{l}{kg * h}$$

CL y Vd, frecuentemente se calculan en relación a la fracción absorbida (F) ya que suele ser desconocida cuando únicamente se analiza la vía extravascular. De hecho, los softwares farmacocinéticos como pk-Solver y WinNonlin los calculan de esta manera, donde F es una fracción de fármaco, por lo que carece de unidades de medida.

La evaluación estadística se llevó a cabo en tres pasos: primero, sometiendo los datos a pruebas de normalidad logarítmica para determinar el tipo de pruebas a realizar. Después, se realizó un análisis estadístico mediante pruebas ANOVA de una vía utilizando cada parámetro farmacocinético como variable de respuesta en sus tres tratamientos. Finalmente, en los parámetros que resultaron con diferencias estadísticamente significativas se realizó la prueba post hoc Tukey de comparaciones múltiples.

## Pruebas farmacopéicas

### Variación de masa:

Para asegurar una administración precisa de flavonoides en el grupo experimental "tableta", se realizó un estudio de valoración para conocer el contenido de hsd y ngn en una tableta. Para esto, se pesaron 20 tabletas de forma individual, los pesos fueron registrados y se calculó promedio, desviación estándar y coeficiente de variación<sup>10</sup>.

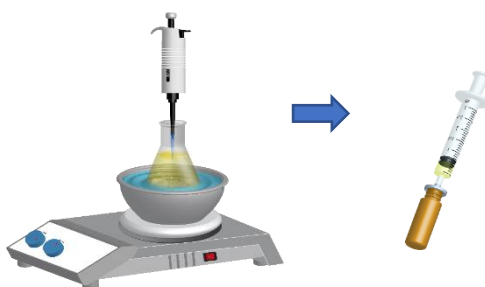
### Valoración:

Las tabletas evaluadas en variación de masa, fueron trituradas, y se colocó 50 mg del polvo resultante en un matraz Erlenmeyer de 50 mL. Al matraz se añadió 40 mL de disolvente MeOH:DMSO 8:2 y se sometió a ultrasonido 10 min. El contenido de cada matraz, se transfirió un tubo cónico de 50 mL y los tubos se centrifugaron a 4500 rpm

durante 5 min para la precipitación de los excipientes. El sobrenadante fue transferido a un matraz aforado de 100 mL y el precipitado se lavó dos veces con 20 mL de disolvente y se centrifugó 5 min a 4500 rpm, el sobrenadante fue transferido al matraz, se aforó y se vertió una alícuota de 1 mL en viales ámbar de 1.5 mL. Concentración teórica: 150 ppm MIX-160.<sup>10</sup> Las muestras resultantes fueron analizadas en un cromatógrafo marca ThermoScientific con una columna Phase Sep Spherisorb de C<sub>18</sub> de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno con tamaño de partícula 5µm. Como fase móvil CH<sub>2</sub>OH 1% (A), metanol (B) y acetonitrilo (C) y sistema detector de UV ajustado a 280 nm. Para la cuantificación se preparó una curva de calibración a 50, 75,100,150 y 250 ppm de cada flavonoide a partir de una solución madre de 1000 ppm de hsd y 1000 ppm de ngn<sup>98</sup>.

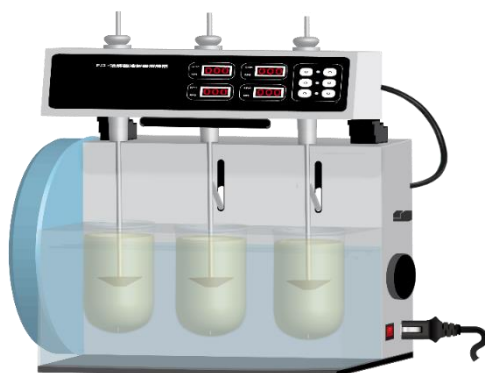
#### *Disolución:*

Primeramente, se realizó un estudio preliminar para la selección de los medios de disolución a evaluar en el disolutor. Para esto, se seleccionaron cuatro medios: agua, agua + 1% tween 80, HCl pH 1.2 y solución amortiguadora de fosfatos pH 8.2 (PBS). La preparación de medios se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones de los medios de disolución indicados en la FEUM 11<sup>a</sup> edición<sup>10</sup>. Se preparó 2 g de MIX-160 y se homogenizó la mezcla en agitación por inmersión durante 15 min. Para cada medio, por triplicado se colocaron 15 mg de MIX-160 en matraces Erlenmeyer de 150 mL y se agregaron 100 mL de medio de disolución en un termobañó a 36 ± 2 °C (figura 17), se colocaron en agitación durante 8 horas y se tomaron alícuotas de 0.5 mL a los tiempos 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360 y 480 min. Los resultados se graficaron y en base a estos se determinó realizar el estudio en el disolutor únicamente con PBS y HCl en un tiempo de 60 min<sup>98</sup>.



**Figura 17.** Pruebas preliminares de disolución de flavonoides

El estudio en el disolutor (figura 18) se llevó a cabo en un equipo multifuncional Guoming PJ-3 tablet four-usage tester HS code 903180909 a temperatura  $37 \pm 0.5$  °C. Se utilizó el aparato 2 (propela)<sup>10</sup> a 100 rpm y se colocó una tableta por vaso en 1000 mL de medio de disolución y se dejó en agitación constante durante 60 min; se tomaron muestras de 0.5 mL a los tiempos 5, 10, 15, 30 y 60 min. Posteriormente se aumentó la velocidad a 150 rpm durante 15 min más y se tomó una muestra más<sup>98</sup>. A la par, se prepararon soluciones referencia (S.Ref) colocando 15 mg de la mezcla en 100 mL del medio de disolución a condiciones similares a las del disolutor. Se analizaron en total seis tabletas por medio y tres soluciones referencia por cada medio de disolución (PBS y HCl)<sup>10</sup>.



**Figura 18.** Equipo multifuncional para prueba de disolución, desintegración, friabilidad y dureza.

Posteriormente, se repitió el experimento anterior utilizando tres tabletas, se tomó una alícuota de 1 mL a los 60 min, se filtró y se colocó en un vial ámbar. La fracción no disuelta de los flavonoides fue recuperada filtrando con embudo Büchner el contenido de cada vaso transcurrido el tiempo de disolución. Cada papel filtro se colocó en una caja Petri y se dejó secar 12 h a temperatura ambiente (TA). Se realizó una extracción sólido líquido utilizando MeOH:DMSO 8:2 y aforando a 100 mL; se dejó reposar 48 h en condiciones de oscuridad para extraer por maceración los flavonoides unidos a los excipientes precipitados, se resuspendió y se diluyó 1:10 para una concentración teórica de 120-150 ppm. Se tomó una alícuota de 1 mL, se filtró y se colocó en viales ámbar<sup>17</sup>.

Todas las muestras fueron analizadas por HPLC-UV-DAD en un equipo cromatógrafo Thermo Scientific utilizando una columna Agilent C18 de 150 mm x 2.6 mm con 2.7  $\mu$ m tamaño de partícula. La fase móvil consistió en 75% MeOH, 12.5% agua con ácido fórmico al 1% y 12.5% ACN. La detección se realizó a una longitud de onda de 284 nm para ambos compuestos. Las cuantificaciones se realizaron mediante curvas de calibración en un intervalo del 0, 20, 40, 60, 80 y 100% de cada uno de los flavonoides basándose en 1/10 de la concentración teórica contenida en la tableta esto es 1500 ppm MIX-HN en la tableta y 150 ppm MIX-HN en el método analítico. La figura 19 es una fotografía tomada durante la prueba de disolución.

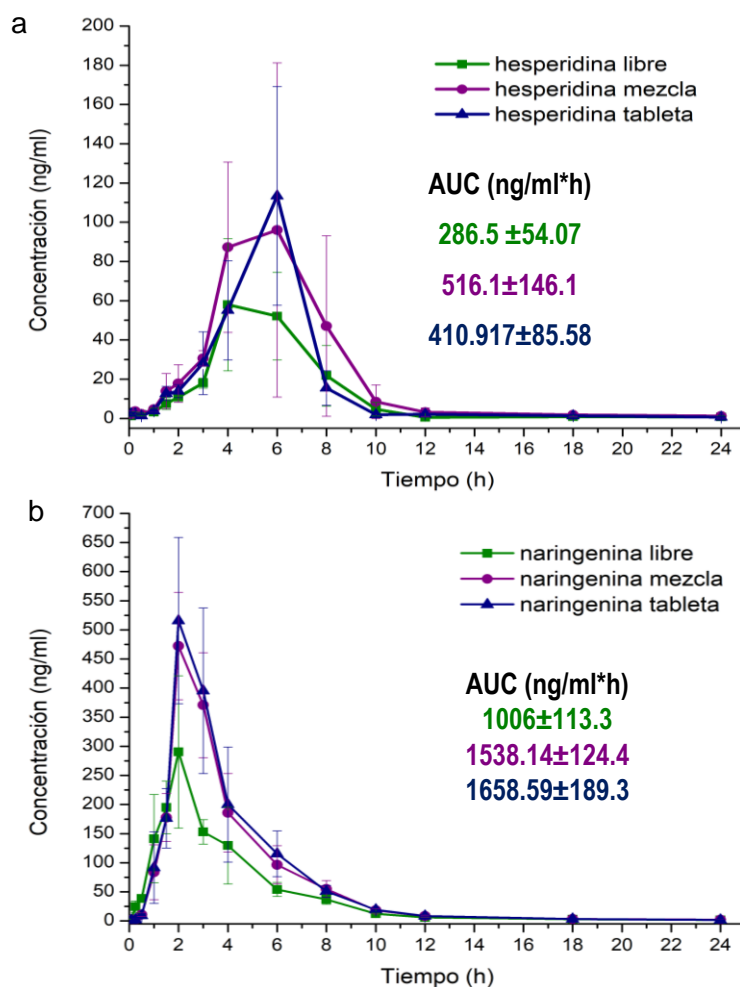


**Figura 19.** Prueba disolución de la tableta, los medios presentan turbidez y polvos en suspensión. La disgregación se observó en un periodo menor a tres minutos para las 12 tabletas evaluadas en cada medio. No se observó tendencia a la aglomeración o resistencia a la liberación.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Datos farmacocinéticos iniciales: cinéticas de primer orden

Las concentraciones obtenidas fueron graficadas para cada uno de los tratamientos de los flavonoides hsd y ngn (figura 20). Al examinar las gráficas se observó un incremento en las concentraciones de ambos flavonoides. Estos datos fueron utilizados para calcular cada una de las áreas bajo la curva (AUC). El AUC de ngn resultó con una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre la forma libre (ngn-free) respecto a las formas mezcla (ngn-mix) y tableta (ngn-tab), valores que no presentaron diferencias significativas entre sí. Para hsd, los tres valores de AUC no tuvieron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).



**Figura 20.** Gráfica de concentración de (a) hesperidina y (b) naringenina frente al tiempo en sus tres tratamientos: libre, mezcla y tableta.

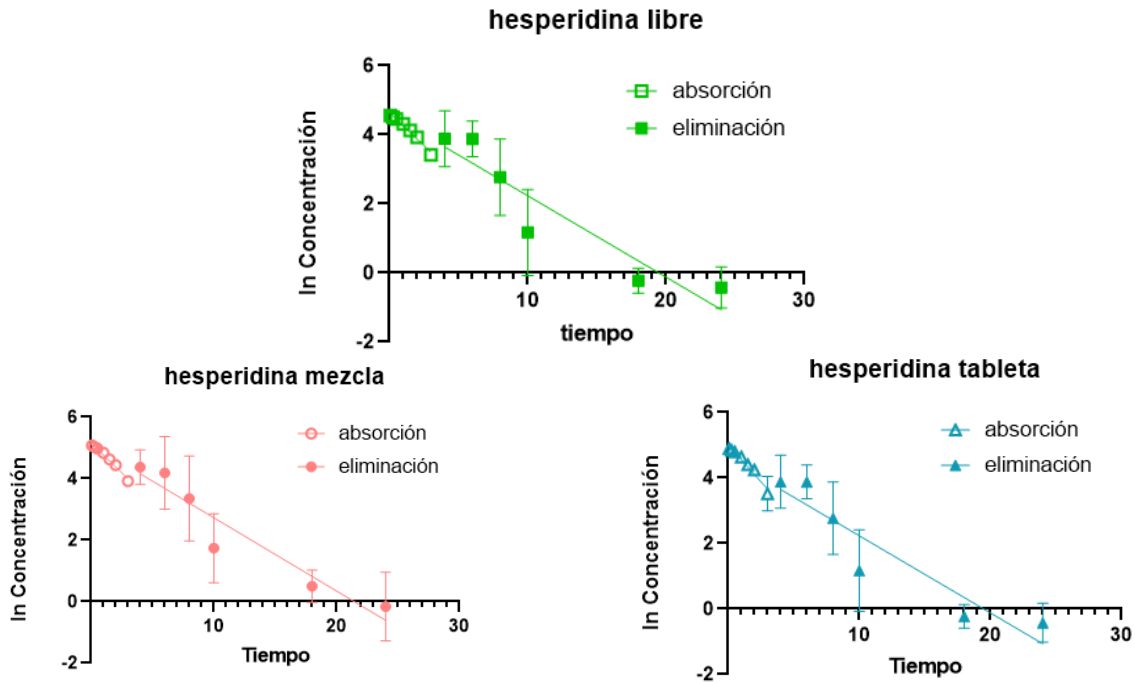
Las gráficas de concentración frente al tiempo obtenidas en este estudio, al igual que la mayoría de estudios que se mostraron en la sección de antecedentes, presentan un solo

pico de concentración máxima, lo que permite asumir que modelo farmacocinético es mono compartimental y puede ajustarse matemáticamente al estudio no compartimental. La obtención de ecuaciones de primer orden de la forma  $y = mx + b$  al graficar  $\ln [C]$  vs  $t$  y  $\ln [C_{II} - C]$  frente al tiempo, corrobora las cinéticas de primer orden para los procesos de absorción y eliminación.

La separación de los procesos de absorción y eliminación de flavonoides se consideró a partir del punto de pseudoequilibrio, es decir el punto  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ . El punto de corte fue a las 4 h y 2 h para hsd y ngn respectivamente. A partir de  $C_{max}$ , se consideró el intervalo en el cual  $\frac{\partial \ln C}{\partial t} = k$ , correspondiendo al periodo entre las 2 y las 12 h para ngn y 4 a 24 h para hsd. Hsd presentó un fenómeno en el cual, el punto de pseudoequilibrio se encontró entre las 4 y las 6 horas mostrando una especie de meseta en su gráfica concentración-tiempo con cambios apenas perceptibles entre las concentraciones observadas en estos tiempos. El método de residuales permitió la obtención de ecuaciones lineales que describen la cinética de absorción de primer orden para ambos flavonoides en sus tres tratamientos.

Mediante pruebas t ( $p < 0.05$ ) sobre las constantes de absorción y de eliminación, se puede corroborar que  $k_{abs} \neq k_{el}$ , demostrando que  $k_{abs} > k_{el}$  para las premisas del modelo no compartimental.<sup>99</sup>

Las figuras 21 y 22 representan las rectas de absorción y eliminación obtenidas para cada uno de los flavonoides en sus tres tratamientos. Las tablas 10 y 11 muestran las ecuaciones de absorción y eliminación obtenidas a partir de los datos experimentales, así como las constantes  $k_{abs}$  y  $k_{el}$  para hsd y ngn respectivamente.



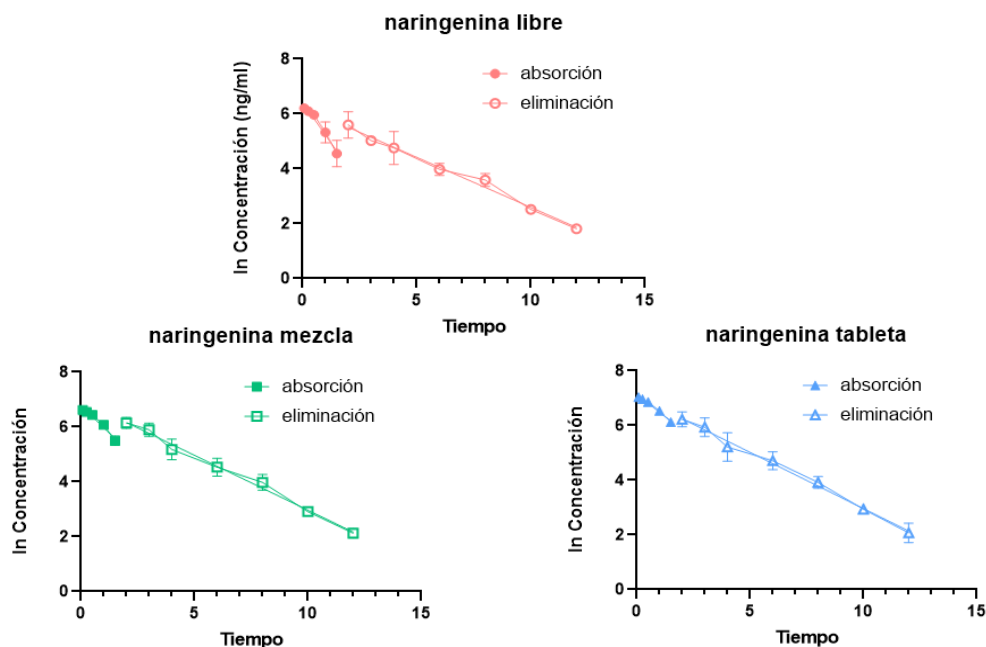
**Figura 21.** Gráficas de absorción y eliminación de hesperidina en sus tres tratamientos.

**Tabla 10.** Ecuaciones y constantes de absorción y eliminación de hesperidina en sus tres tratamientos.

	hsd-free	hsd-mix	hsd-tab
Ecuación.	$Y = -0.24 \cdot X + 4.59$	$Y = -0.24 \cdot X + 5.11$	$Y = -0.25 \cdot X + 4.93$
Eliminación			
$R^2$	0.7610	0.7432	0.7804
$k_{el}$	$0.24 \pm 0.03$	$0.24 \pm 0.05$	$0.25 \pm 0.03$
$t^{1/2}_{el}$	$3.02 \pm 0.80$	$3.03 \pm 0.70$	$2.92 \pm 0.27$
Intercepto $Y_{el}$	$4.59 \pm 0.45$	$5.11 \pm 0.48$	$4.93 \pm 0.46$
Ecuación	$Y = -0.38 \cdot X + 4.64$	$Y = -0.39 \cdot X + 5.16$	$Y = -0.45 \cdot X + 5.01$
Absorción			
$R^2$	0.9745	0.9652	0.8438
$k_{abs}$	$0.38 \pm 0.01$	$0.39 \pm 0.02$	$0.45 \pm 0.04$
$t^{1/2}_{abs}$	$1.82 \pm 0.07$	$1.78 \pm 0.08$	$1.54 \pm 0.15$
Intercepto $Y_{abs}$	$4.64 \pm 0.02$	$5.16 \pm 0.03$	$5.01 \pm 0.07$
$p(k_{el} \text{ vs } k_{abs})$	0.0016	0.0085	0.0104
$p(b_{el} \text{ vs } b_{abs})$	0.8569	0.8776	0.7807
$k_{abs} \div k_{el}$	1.58	1.62	1.80

$X = \text{tiempo (h)}$ ;  $k_{el}$ : constante de eliminación;  $k_{abs}$ : constante de absorción  
 Intercepto  $Y_{el}$  = Intersección en el eje Y expresado como  $\ln [c]$  para la recta de eliminación  
 Intercepto  $Y_{abs}$  = Intersección en el eje Y expresado como  $\ln [C-CII]$  para la recta de absorción  
 $t^{1/2}_{el} = \ln(2) \div k_{el}$ ;  $t^{1/2}_{abs} = \ln(2) \div k_{abs}$  ( $p > 0.05$ , prueba t student)





**Figura 22.** Gráficas de absorción y eliminación de naringenina en sus tres tratamientos.

**Tabla 11.** Ecuaciones y constantes de absorción y eliminación de naringenina en sus tres tratamientos.

volumen	ngn-free	ngn-mix	ngn-tab
Ecuación.	$Y = -0.37 \cdot X + 6.24$	$Y = -0.40 \cdot X + 6.965$	$Y = -0.41 \cdot X + 7.07$
Eliminación			
$R^2$	0.9497	0.9692	0.9590
$k_{el}$	$0.37 \pm 0.02$	$0.40 \pm 0.02$	$0.41 \pm 0.02$
$t^{1/2}_{el}$	$1.90 \pm 0.10$	$1.74 \pm 0.07$	$1.69 \pm 0.08$
Intercepto $Y_{el}$	$6.24 \pm 0.14$	$6.97 \pm 0.12$	$7.07 \pm 0.14$
Ecuación	$Y = -1.18 \cdot X + 6.41$	$Y = -0.79 \cdot X + 6.77$	$Y = -0.64 \cdot X + 7.13$
Absorción			
$R^2$	0.8604	0.9373	0.9635
$k_{abs}$	$1.18 \pm 0.13$	$0.79 \pm 0.06$	$0.64 \pm 0.03$
$t^{1/2}_{abs}$	$0.59 \pm 0.07$	$0.87 \pm 0.07$	$1.08 \pm 0.06$
Intercepto $Y_{abs}$	$6.41 \pm 0.11$	$6.77 \pm 0.05$	$7.13 \pm 0.03$
$p(k_{el} \text{ vs } k_{abs})$	0.0005	0.0004	0.0004
$p(b_{el} \text{ vs } b_{abs})$	.1735	0.0561	0.5081
$k_{abs} \div k_{el}$	3.19	1.97	1.56

X = tiempo (h);  $k_{el}$ : constante de eliminación;  $k_{abs}$ : constante de absorción

Intercepto  $Y_{el}$  = Intersección en el eje Y expresado como  $\ln [c]$  para la recta de eliminación

Intercepto  $Y_{abs}$  = Intersección en el eje Y expresado como  $\ln [C-CII]$  para la recta de absorción

$t^{1/2}_{el} = \ln(2) \div k_{el}$ ;  $t^{1/2}_{abs} = \ln(2) \div k_{abs}$  ( $p > 0.05$ , prueba t student)

En hsd, para cada tratamiento se realizaron pruebas estadísticas t sobre las constantes de absorción y eliminación, así como las intersecciones con el eje de las ordenadas. Se puede observar que las pendientes mostraron diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) y que guardaron una relación de alrededor de 1.6 a 1.8 abs:elim; se cumple la premisa de que la constante de absorción es más rápida que la constante eliminación<sup>102</sup>. Además, en los tres tratamientos la proporción de absorción-eliminación es similar.

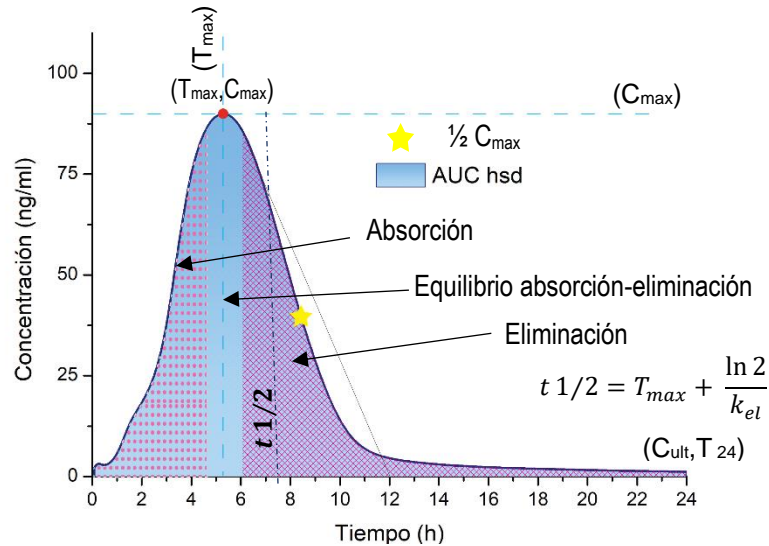
En el caso de ngn, las constantes de absorción fueron mayores y presentaron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a las constantes de eliminación; representando por lo menos 1.5 veces el valor de  $k_{el}$ . Para ambos flavonoides, el tener  $k_{abs} > k_{el}$ , representa la expectativa de los modelos farmacocinéticos ideales, donde la absorción no es limitada, no se presenta el fenómeno flip-flop por lo que, para una misma dosis, cuando la velocidad de eliminación aumenta,  $C_{max}$  disminuye y  $T_{max}$  aumenta<sup>99</sup>. La proporción que tienen las constantes de absorción y eliminación de los flavonoides cambia entre los tratamientos; por un lado en ngn-free guardan una proporción  $> 3$ ; en tanto que en -mix y -tab ésta proporción disminuye, en primer lugar a 1.9 en presencia de hsd, y en segundo lugar a 1.6 contenido en la tableta en presencia de hsd, por lo que dicho cambio en la proporcionalidad de las constantes puede atribuirse a la presencia de hsd, al mantenerse semejante en mezcla y tableta.

Para ambos flavonoides las intersecciones en el eje Y de absorción y eliminación respectivamente, no resultaron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ), por lo que se puede decir que ambas rectas tienen la misma intersección en el eje de las ordenadas, lo que implica que el tiempo de latencia es cero, dicho de otra forma, la absorción comienza inmediatamente después de la administración. Este parámetro fue evaluado en tres ocasiones: en primer lugar, hsd fue cuantificable en las muestras séricas desde el primer tiempo muestreado de cinco minutos; en segundo lugar, los parámetros de WinNonlin indican un  $T_{lag}$  cero; en tercer lugar, la semejanza en las intersecciones de las ecuaciones de absorción y eliminación. Cuando un agente xenobiótico presenta un tiempo de latencia positivo, se observa la intersección de las rectas de absorción y eliminación a la derecha del eje de las ordenadas; en tanto que, si la intersección se encuentra a la izquierda de dicho eje, representando un tiempo negativo, implicaría que el analito ya se encontraba en suero previo a la administración, o un error en los tiempos muestreados o en el tratamiento o análisis de la muestra, fenómeno que no observamos en este estudio.<sup>99</sup>

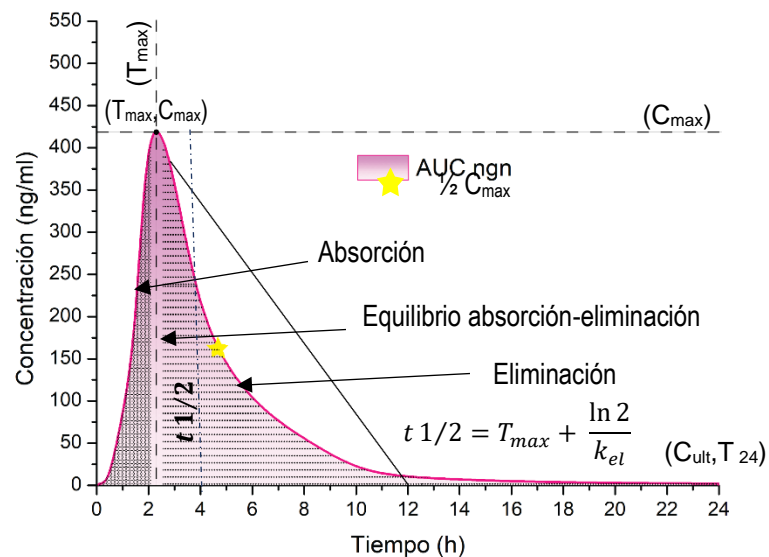
A partir de las concentraciones obtenidas de ngn y hsd y sabiendo que la cinética de primer orden se cumple tanto para las fases de absorción como las de eliminación, se procesaron los datos mediante los cálculos matemáticos y utilizando, WinNonlin 2.0 y Excel pk-Solver complemento Excel, se obtuvieron los parámetros farmacocinéticos siguiendo un modelo no compartimental.

## Datos farmacocinéticos finales: parámetros farmacocinéticos

En las figuras 23 y 24, se muestra una gráfica del flavonoide correspondiente con los parámetros observables en el plano: AUC,  $C_{max}$ ,  $T_{max}$ ,  $t_{1/2}$ ,  $C_{ult}$ , así como la distinción entre las fases de absorción y eliminación.



**Figura 23.** Gráfica de los principales parámetros y etapas farmacocinéticas de hesperidina.



**Figura 24.** Gráfica de los principales parámetros y etapas farmacocinéticas de naringenina.

Los parámetros para hsd y ngn se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple de Tukey con un intervalo de confianza del 95%

mediante software estadístico GraphPad Prism 8.0. Los modelos de ANOVA fueron univariantes, considerando cada parámetro farmacocinético como la variable de respuesta y el tratamiento las formas -free, -mix, -tab. (Tablas 12 y 13).

**Tabla 12.** Parámetros farmacocinéticos de hesperidina. (p<0.05)

Parámetro	hsd-free	hsd-mix	hsd-tab	Valor de P
$k_{abs}$	0.38 ± 0.01	0.39 ± 0.02	0.45 ± 0.04	0.9334
$k_{el}$	0.24 ± 0.03	0.24 ± 0.05	0.25 ± 0.03	0.1725
$T_{1/2\ elim}$ (h)	7.71 ± 1.55	7.71 ± 1.55	8.67 ± 1.15	0.6568
$T_{max}$ (h)	4.66 ± 1.16	4.66 ± 1.15	5.333 ± 1.15	0.7316
$C_{max}$ (ng/mL)	71.80 ± 9.59	120.00 ± 72.46	121.352 ± 43.70	0.2083
AUC <sub>0→24</sub> (ng/mL*h)	288.30 ± 35.13	516.10 ± 146.10	410.80 ± 85.58	0.0873
AUC <sub>0→∞</sub> (ng/mL*h)	290.09 ± 35.95	522.12 ± 147.27	413.79 ± 86.14	0.0892
Vd/F (L/kg)	1061.89 ± 363.74	745.17 ± 558.31	732.78 ± 200.98	0.5568
CL/F (L/kg*h)	240.33 ± 29.673	157.96 ± 78.62	173.14 ± 38.44	0.2128
TMR (h)	6.14 ± 0.79	6.51 ± 1.08	6.22219 ± 0.4776	0.8538

**Tabla 13.** Parámetros farmacocinéticos de naringenina. (p<0.05)

Parámetro	ngn-free	ngn-mix	ngn-tab	Valor de P
$k_{abs}$	1.18 ± 0.13	0.79 ± 0.06*	0.64 ± 0.03*	0.0005*
$k_{el}$	0.37 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.1106
$T_{1/2\ elim}$ (h)	3.55 ± 0.67	4.67 ± 0.61	4.02 ± 0.65	0.0511
$T_{max}$ (h)	1.66 ± 0.577	2.00 ± 00	2.00 ± 00	0.4311
$C_{max}$ (ng/ml)	310.±103.2	472.308 ± 92.18	515.937±142.783	0.1481
AUC <sub>0→24</sub> (ng/mL*h)	1006.11 ± 101.30	1538.14 ± 124.40*	1648.57 ± 181.3*	0.0029*
AUC <sub>0→∞</sub> (ng/mL*h)	1011.09 ± 101.57	1543.64 ± 191.9*	1653.14 ± 181.70*	0.0029*
Vd/F (L/kg)	255.85 ± 55.24	151.93 ± 29.2*	141.79 ± 44.25*	0.0098*
CL/F (L/kg*h)	91.97 ± 11.355*	60.20 ± 7.32*	56.614 ± 11.24**	0.0356*
TMR (h)	4.45±0.294	4.38102±0.134	4.32512 ± 0.38048	0.8778

\*Presentó diferencia significativa

\*\*Grupos homogéneos de la prueba pos-huc TUKEY

El análisis por ANOVA mostró que los parámetros farmacocinéticos de hsd no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sus tratamientos (p>0.05). Por lo que se puede decir que su farmacocinética no varía con respecto a su coadministración con

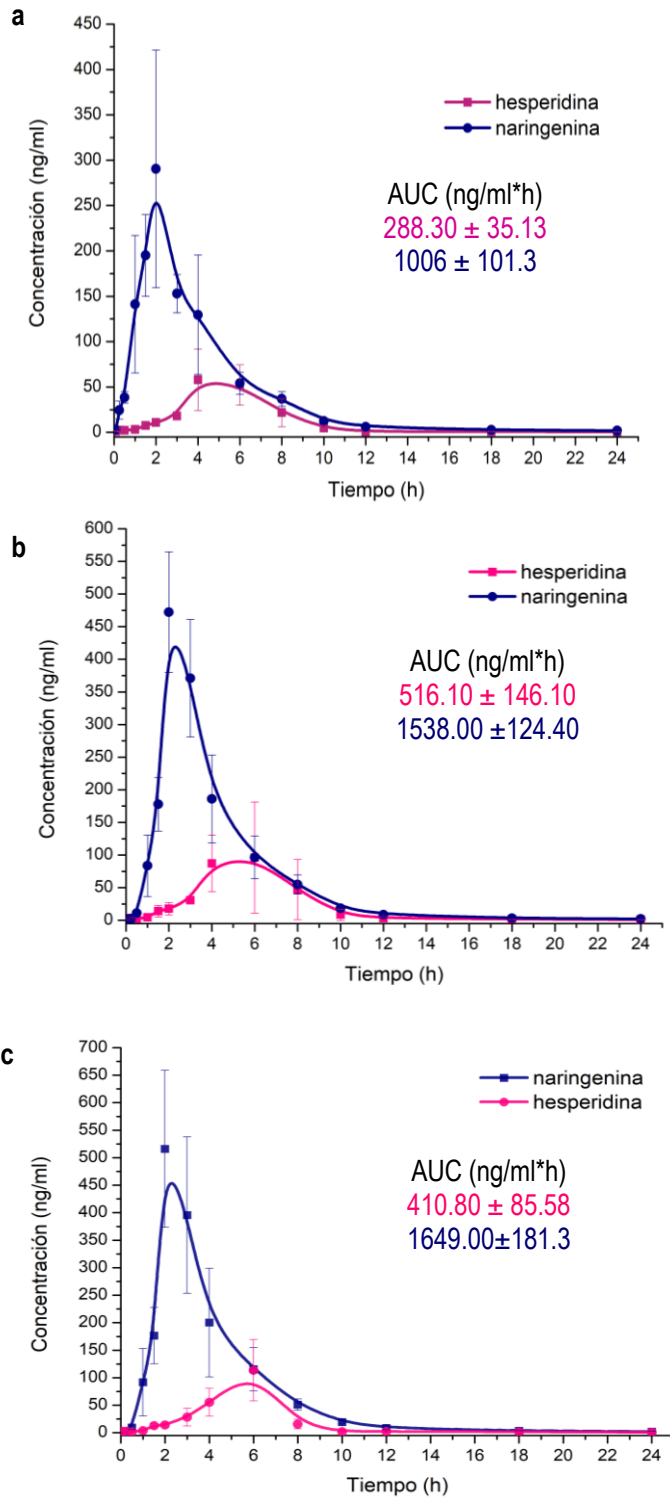
ngn. Ngn en cambio, mostró un incremento significativo en las  $k_{abs}$  (33%),  $AUC_0^t$  y  $AUC_0^\infty$ , así como una disminución en el CL/F y el Vd/F del flavonoide en la mezcla y la tableta, con respecto al flavonoide libre. Los parámetros farmacocinéticos de ngn en mezcla y tableta no presentaron diferencias significativas entre sí. Con estos resultados, se determinó que la variación en los parámetros farmacocinéticos de ngn se debió a su coadministración con hsd y que la formulación y el proceso de compactación no modifican los procesos farmacocinéticos de los flavonoides.

En nuestro estudio, se puede observar que tanto ngn como hsd son detectables desde el primer tiempo muestreado ( $T = 0.083$  h) representando con un  $T_{lag} < 5$  min; dato que coincide con  $T_{lag}$  de los interceptos de las ecuaciones de absorción y eliminación, lo que coincide con la literatura que refiere la presencia de hsd y ngn en la biofase entre los 5 y 15 min posteriores a la administración oral<sup>69, 73</sup>.

También se observa que a  $T = 24$  h, ambos flavonoides fueron detectables a concentraciones menores a 3 ng/mL. Este fenómeno Wang y cols<sup>100</sup> lo relacionan con fenómenos de recirculación enterohepática previo a la eliminación.

Al evaluar  $AUC_0^\infty$ , vemos que su valor fue similar a  $AUC_0^t$ , si obtenemos las relaciones entre ambos, podemos observar que hacia las 24 h, se ha eliminado más del 99% del fármaco absorbido, ya que  $AUC_t^\infty$ , el cual representa la fracción de fármaco a eliminar después de la última cuantificación, es menor al 1%. Esto también se puede observar en las relaciones entre  $C_{max}$  y las  $C_{ult}$  evaluadas para cada flavonoide en cada tratamiento, donde  $C_{ult}$  también es menor al 1% de  $C_{max}$ .

Los fenómenos mencionados en los párrafos previos se pueden visualizar en la figura 25, la cual presenta los tres tratamientos de flavonoides: hsd y ngn administrados individualmente (flavonoides libres), administración de la mezcla MIX-160, y administración de la tableta la cual contiene MIX-160; en todos los casos utilizando una dosis equivalente a 161 mg/kg.



**Figura 25.** Curvas de biodisponibilidad de hesperidina-naringenina administrada: (a) en su forma libre, grupos independientes, (b) en la mezcla MIX-160

Diversos autores refieren no detectar los flavonoides después de cierto tiempo, por ejemplo, en el estudio de Hsui y col.<sup>101</sup>, ngn no fue detectable después de dos horas. En cambio, después de las 3.5 horas, los metabolitos presentaron concentraciones séricas en el orden de los  $\mu\text{g/ml}$ . Estas cuantificaciones pudieran estar limitadas por el límite de cuantificación (LOQ) del método, sin embargo, la presencia de metabolitos puede ser la explicación al decremento de flavonoide intacto al llevarse a cabo reacciones de biotransformación. El tiempo de cuantificación de los metabolitos de ngn coincide con el periodo de mayor decremento de concentraciones presentado en nuestro estudio, lo que podemos interpretar como un periodo de biotransformación del flavonoide.

Otro ejemplo fue reportado por Tong y col.<sup>74</sup>, donde para varios flavonoides en un extracto vegetal, hsd no fue detectable posterior a las 12 horas, a pesar de que la dosis equivalente de hsd fue relativamente alta (113.6 mg/kg), casi el doble de la utilizada en nuestro estudio y que el LOQ fue  $< 1\text{ng/ml}$ , por lo que la rápida eliminación puede deberse a interacciones con otros metabolitos propios del extracto, además estos autores sugieren procesos de reabsorción tanto del flavonoide como de sus metabolitos.

Nectoux y col.<sup>102</sup>, refieren a otros autores los cuales encontraron hsd a tiempos inferiores a 1 hora, tras una administración oral; en tanto que también se ha detectado hsd alrededor de las 4 horas posteriores a la administración oral de hsd, lo que concuerda con otras referencias, que sugieren la absorción intestinal de hsd y, la hidrólisis por bacterias del microbioma intestinal. Nectoux refiere que cuatro horas después de administrar 10 mg/kg de hsd, las concentraciones de metabolitos glucoronidados fueron mayores a las de hsd.

En los tres tratamientos de ngn de nuestro estudio,  $C_{max}$  presentó ligeros incrementos no significativos al pasar de ngn-free a ngn-mix y ngn-tab. Sin embargo, en los tres casos fue alcanzado a un tiempo de aproximadamente dos horas ( $T_{max}$ ). El equilibrio entre los procesos de absorción y eliminación es muy pequeño, pues desde 0 hasta 1.5 h predomina la absorción y a partir de las 2 h predomina la eliminación la cual es pronunciada y constante hacia las 12 horas. Escudero y col.<sup>103</sup>, refieren que los metabolitos glucoronidados de ngn son indetectables durante las primeras dos horas posteriores a la administración, sin embargo, hacia las seis horas alcanzan su pico máximo de concentración y disminuye hacia las diez horas. Este fenómeno de glucoronidación reportado por Escudero, puede explicar el rápido decaimiento de las concentraciones de ngn en nuestro estudio entre las 2 y las 12 horas.

El caso de hsd es diferente comparado con ngn; sin embargo, los tratamientos se comportan de forma similar entre sí. Se puede observar la formación de una meseta en el intervalo de 4 a 6 horas en los tres tratamientos, con un ligero desplazamiento a la derecha de la gráfica de hsd-tab con respecto a hsd-mix y hsd-free. Esta meseta, se puede explicar ya sea como una tendencia al equilibrio entre los procesos de absorción y eliminación de hsd en dicho intervalo o como un punto ( $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ) en algún momento no muestreado en este periodo de tiempo. A las seis horas, los procesos de eliminación

tienden a predominar provocando el decaimiento brusco de las concentraciones. Kanaze y col.<sup>80</sup>, reportan un  $C_{max}$  de hsd entre 3.5 y 4 h, similar al encontrado en nuestro estudio. Además, Manach y col.<sup>104</sup> reportan que al administrar los glicósidos hsd y narirutina, los metabolitos conjugados, principalmente glucoronidos y sulfoglucoronidos son detectables a partir de las tres horas alcanzando su máxima concentración entre las 5 y las 7 horas. Los procesos de formación de los metabolitos conjugados de hsd podrían ser explicación de la meseta que se observa en este estudio en el intervalo de las 4 a las 6 h, por lo que después de este periodo, los flavonoides tienden a descender hacia la eliminación total debido a la rápida biotransformación en el intervalo de 5-7 horas que reporta Manach<sup>104</sup> y se refleja en el decaimiento de la concentración en las curvas farmacocinéticas de hsd en este estudio.

Zeng y col.<sup>71</sup>, describieron el metabolismo y la distribución en estómago, duodeno, yeyuno, íleon, riñón, bazo, músculo y tejido lipídico de los flavonoides nrg y su aglicona ngn, encontrando que los flavonoides sufren metabolismo de primer paso mediado por la enzima lactasa-floricina hidrolasa en el tracto gastrointestinal, así como la hidrólisis de nrg a ngn por la microbiota intestinal. Tanto nrg como ngn, ingresan a la célula por mecanismos tanto de difusión pasiva como de transporte activo. Reportan metabolismo de primer paso por interacción enzimática del transporte activo y metabolismo de segundo paso donde se reconocieron un total de 38 metabolitos de nrg, siendo ngn el primero de éstos. Los 23 metabolitos de segundo paso correspondieron a compuestos glucoronidados y sulfatados en diferentes carbonos de la cadena principal del flavonoide, en tanto que los 15 metabolitos de primer paso fueron catabolitos fenólicos donde predominaron los derivados del ácido propiónico y benzóico. El metabolismo de fase I fue principalmente mediado por la microbiota intestinal, correspondiendo a flavonoides no absorbidos que fueron excretados por circulación enterohepática. Este metabolismo de fase I es evidencia de que parte de los flavonoides administrados no llega íntegramente a la biofase, sino que se eliminan por vía fecal, lo que explica las bajas concentraciones de los flavonoides en torrente sanguíneo resultando en AUC pequeñas comparadas con las dosis administradas por vía enteral, como la utilizada en nuestro estudio.

Es conocido, que el jugo de toronja y otros cítricos generan interacción con diversos fármacos, principalmente debido a la inhibición o inducción de diversas enzimas del citocromo P450. Dichas interacciones, se han atribuido a la presencia de flavonoides, los cuales además de ser metabolizados por el citocromo, pueden inhibirlo o inducirlo en sus diversas isoformas. Guo y col.<sup>82</sup>, detectaron que una administración crónica de ngn es capaz de disminuir el contenido total de enzimas del citocromo P450 y que disminuye la actividad metabólica de las isoformas CYP3A y CYP1A2. Bai y col.<sup>105</sup> refieren que ngn puede tener diversas reacciones de deshidrogenación, fisión de enlaces, glucosidaciones, glucoronidaciones e hidroxilaciones con las isoformas CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4/5 y CYP1A2, derivando en más de seis metabolitos como la apigenina, naringenina-O-glucósido, naringenina-O-glucoronido y el eriodictiol. Además,



la farmacocinética de ngn como producto de la hidrólisis de nrg administrada a diferentes dosis por la vía oral, mostró un  $T_{max}$  de 2 a 4 h y vidas medias de alrededor de tres horas en ratas macho. Describieron además un metabolismo principalmente renal para ngn y hepático para nrg. Las reacciones de biotransformación por las isoformas CYP3A, CYP1A2, CYP2D6 pueden ser la explicación de los incrementos tanto de ngn como de hsd en nuestro estudio. A pesar de que el análisis estadístico de hsd en nuestro estudio no mostró diferencias significativas entre los tres tratamientos, fue observable que las concentraciones de los flavonoides aumentaron al coadministrarse con ngn y que CL/F y el Vd/F disminuyeron en comparación con la administración independiente de hsd.

En este contexto, Luong y col.<sup>106</sup>, utilizaron ngn en estudios *in vitro* para sintetizar flavonoides hidroxilados vía CYP450 BM3-M13 con diversas actividades farmacológicas; notando que concentraciones mayores a 100  $\mu\text{mol/ml}$  de ngn, la conversión disminuía, es decir que una alta concentración de ngn puede inhibir su propia hidroxilación en estudios *in vitro*. En sus estudios preliminares sobre las actividades farmacológicas también se trabajó con hst, sin embargo, para el estudio de la hidroxilación se consideró a la ngn por tener mayor bioconversión a eriodictol. Las reacciones de hidroxilación de ngn referidas por Luong<sup>106</sup> sobre el CYP pudieran ser una de las razones por las cuales incrementa la concentración de hsd en los grupos -mix y -tab; sin embargo, al ser concentraciones por debajo de las estudiadas por Luong, es posible que los efectos sobre el citocromo sean apenas perceptibles y, por tanto, no significativos en el estudio farmacocinético de hsd.

Como ya se mencionó, la inhibición del CYP por diversos metabolitos entre ellos los flavonoides, es conocida desde hace varias décadas. Se ha identificado CYP3A4 como la principal isoforma relacionada a los flavonoides<sup>107</sup>. Particularmente, Ho y col.<sup>108</sup> evaluaron la inhibición de dicha isoforma en tejido hepático humano por diversos flavonoides de la toronja como la quercetina, apigenina, neohesperidina, kaempferol, hsd, hst, ngn y nrg. Los glicósidos estudiados tuvieron baja actividad inhibitoria, sin embargo, las agliconas produjeron mayor inhibición. Quintieri y col.<sup>109</sup> refieren la inhibición de hst y diosmetina de la isoforma 2C9; principal metabolizador de ngn, afectando al metabolismo y el CL/F de esta, haciéndolos más lentos. Si recordamos que es común la conversión de hsd a hst por hidrólisis de la microbiota intestinal; en nuestros modelos murinos, posiblemente hsd y una fracción de ésta que pudiera hidrolizarse a hst, logran inhibir las isoformas 2C9, y 3A4, reflejándose en la disminución de los valores del CL/F de ngn en la mezcla y la tableta estaría explicada por estas reacciones a nivel de citocromo.

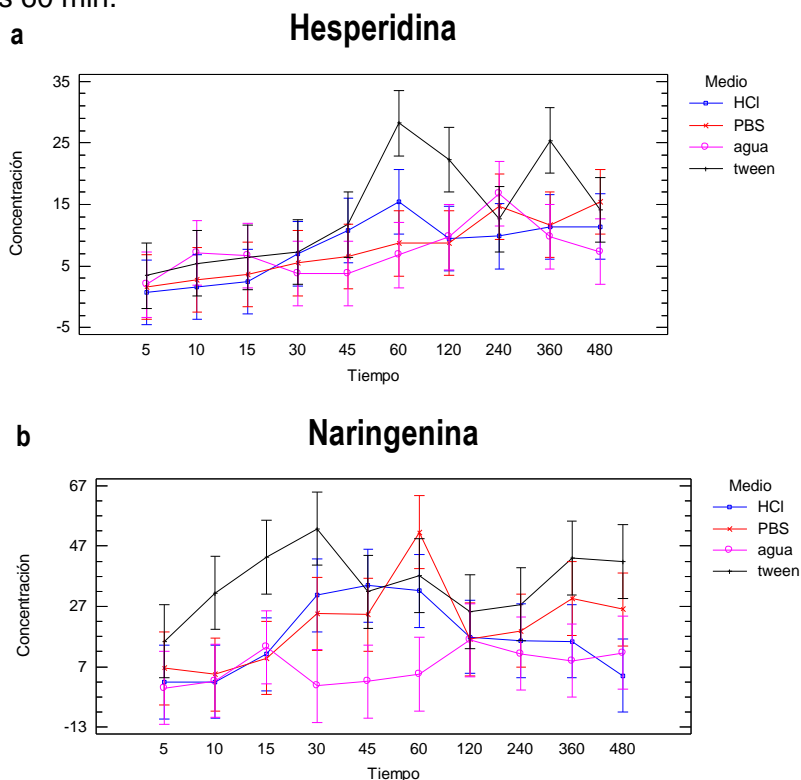
En el estudio de los flavonoides y su relación con la farmacocinética de otros fármacos, Cho y col.<sup>110</sup> reportan incrementos de hasta el 65% en el AUC de diltiazem (15 mg/kg I.V) al administrarse hsd a dosis de 1, 5 y 15 mg/kg, sin modificar significativamente el  $T_{max}$  y el  $T_{1/2}$  terminal. Nuestros resultados presentaron un comportamiento similar, las AUC de ngn y hsd aumentaron hasta en un 50% al ser coadministrados manteniendo  $T_{max}$  y  $T_{1/2el}$  semejantes a las obtenidas en una administración individual por la vía oral.

A partir de los resultados obtenidos y la información que se cita en la literatura científica, se puede conocer que los flavonoides hsd y ngn tienen su ruta metabólica con las isoformas CYP2C9 y CYP3A4 y que a su vez pueden inhibirla generando modificaciones en el metabolismo y eliminación de otros fármacos, pudiendo aumentar las concentraciones plasmáticas uno de otro y generando un CL/F más lento así como aumentando las AUC manteniendo los parámetros cronológicos  $T_{max}$ , TMR y  $T_{1/2el}$  en intervalos de tiempo semejante que no se afectaron a las dosis utilizadas en este estudio. También se puede estipular que una fracción de los flavonoides administrados por una vía gastrointestinal será sujeto a metabolismo catabólico de fase I, convirtiéndose a moléculas pequeñas derivadas del ácido propiónico y benzoico que serán eliminados sin que el flavonoide llegue a ser biodisponible. La fracción biodisponible será metabolizada a diversas moléculas glucoronizadas principalmente en el intervalo de 4 a 10 h después de la administración, por lo que las concentraciones de ambos flavonoides intactos decaen en forma exponencial en este intervalo de tiempo.

## Pruebas farmacopéicas

El resultado de la prueba farmacopéica de uniformidad de dosis tanto por uniformidad de masa como por valoración, se utilizó para garantizar la dosis de flavonoide equivalente contenida en la tableta. Por lo que se puede asegurar que las dosis de ambos flavonoides fueron iguales en todos los tratamientos. La farmacopea permite un margen de 90-110% del fármaco teórico en la forma farmacéutica. Nuestro estudio reveló una concentración superior al 98% del teórico para cada uno de los flavonoides, lo que farmacopéicamente es un resultado dentro de especificación<sup>10</sup>.

Las pruebas preliminares de disolución donde se evaluaron cuatro medios de disolución (PBS, HCl, agua y agua + 1% tween 80) fueron utilizadas para seleccionar los medios a utilizar en las pruebas en el disolutor. Se realizó una cinética de disolución de 8 horas en matraces y al presentarse comportamientos similares en las ocho gráficas (figura 26), se determinó utilizar los medios que mejor simulan las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal, HCl pH 1.2 para condiciones estomacales y PBS pH 8.2 para condiciones intestinales. También con base a que la disolución no presenta una tendencia a incrementar hacia las 2, 4, 6, 8 horas, se determinó finalizar el ciclo en el disolutor a los 60 min.



**Figura 26.** Gráficas de la disolución preliminar de (a) hesperidina y (b) naringenina a 8 horas a 37°C en matraz Erlenmeyer. Se utilizaron seis matraces por medio conteniendo 15 mg MIX-160 en 100 mL de medio de disolución (n=6).

Para las pruebas en el disolutor, tanto para el PBS como para el HCl, las máximas concentraciones encontradas en el medio se determinaron entre los tiempos 45 y 60, sin mostrar diferencia significativa al aumentar las rpm entre el minuto 60 y 75. Por lo que se tomó 60 min como el tiempo de disolución. Además, al observarse una gran cantidad de polvos precipitados al concluir el proceso de los 75 min, se decidió calcular el flavonoide no disuelto, por lo que se repitió el proceso y se realizó un filtrado del medio de disolución. Los filtros se dejaron secar y se realizó la extracción sólido-líquido por el procedimiento mencionado en la metodología de la investigación.

Al haber calculado menos del 1% de flavonoides disueltos en las pruebas anteriores, se hizo notar que el flavonoide no disuelto superaría los límites de cuantificación de la curva de calibración y que podría incluso saturar la columna, por lo que se aplicó un factor de dilución 1:10 a las muestras de flavonoide no disuelto previo a la evaluación por HPLC-UV-DAD.

Las pruebas de friabilidad y dureza se realizaron antes de utilizar las tabletas para asegurar un adecuado proceso de compactación, similar al que se determinó durante los estudios para la obtención de la formulación. Estos resultados fueron satisfactorios por lo que se procedió a utilizar los comprimidos para los diversos estudios aquí descritos. La tabla 14 resume los resultados obtenidos en las pruebas farmacopéicas realizadas. Es importante destacar, que como hsd y ngn no están citados en la FEUM 11<sup>a</sup> edición<sup>10</sup>, no se cuenta con una especificación farmacopéica, por lo que el resultado se expresa como porcentaje total de fármaco disuelto en el medio.

**Tabla 14.** Resultados farmacopéicos sobre la tableta.

MGA FEUM 11 <sup>a</sup>	Descripción del método	Especificación	Resultado	DE o FE
0291	Disolución: monografía individual	ND	< 1% disuelto > 98 % No disuelto	ND
0299	Uniformidad de dosis: variación de masa	< 7.5%	0.8%	DE
0299	Uniformidad de dosis: Uniformidad de contenido	90-110%	Hsd 98.7% Ngn: 98.13	DE
1041	Friabilidad	< 1%	0.98%	DE
1051	Dureza	Dep. Diseño (ND)	35.2 N	ND

\*ND: no disponible; DE: dentro de especificación; FE: fuera de especificación; Dep: dependiente

La prueba de disolución fue de utilidad para evaluar las variantes por las que los flavonoides tuvieron una baja biodisponibilidad, partiendo de que fármaco que no se disuelve es fármaco que no se absorbe y por tanto no será cuantificable en la biofase. Sin embargo, no por el hecho de que cierta fracción del fármaco se absorba significa que la totalidad de esa fracción sea biodisponible, pues existen otras variantes que disminuyen la biodisponibilidad, como la unión a proteínas, la cual no fue evaluada en este estudio. La prueba de disolución es una prueba farmacopéica que, a diferencia de uniformidad de dosis, la cual tiene un parámetro general para la especificación, su criterio dentro o fuera de especificación único para cada fármaco en base a sus propiedades fisicoquímicas y es evaluado en cada forma farmacéutica de manera individual.

Inanova y col.<sup>98</sup>, realizaron estudios farmacopéicos y de biodisponibilidad sobre ocho diferentes productos a base de hesperidina-diosmina existentes en el mercado búlgaro. Sus estudios de disolución se realizaron utilizando PBS a pH 1.5, 4.5 y 7.2, reportaron que la solubilidad incrementó ligeramente con el incremento del pH. Sin embargo, el porcentaje disuelto estuvo por debajo del 1.6% del total de flavonoide en el comprimido de acuerdo con la etiqueta del producto, lo que refuerza la baja solubilidad de los flavonoides que se observa en nuestro estudio.

Según Inanova y col.<sup>98</sup>, diversos estudios farmacocinéticos *in vivo* muestran que las moléculas de flavonoide glicosiladas, como hsd, diosmina y nrg, se absorben en su forma aglicona (diosmetina, ngn y hst); los cuales son productos hidrolizados del metabolismo de la flora intestinal; y que, las formas glicosiladas no se suelen encontrar intactas en circulación sanguínea. En comparación, tanto nuestro estudio como otros previamente reportados en la sección de antecedentes, permitieron cuantificar a los glicósidos en circulación sistémica, lo que se atribuye no solo a los procesos fisiológicos si no a los límites de detección y cuantificación de los métodos analíticos utilizados.

La baja biodisponibilidad de los flavonoides se puede relacionar a su baja solubilidad a pH estomacal e intestinal, evaluados en las pruebas preliminares de disolución tanto para los analitos libres como en tableta. Las pruebas de solubilidad mostraron que menos del 1% se solubiliza en una hora en medios a pH intestinal y estomacal en ambos casos, además, se cuantificaron los flavonoides no disueltos por HPLC-UV-DAD donde más del 98% del fármaco permanece sin solubilizarse en un periodo de 60 min en el disolutor. Las pruebas de disolución demostraron que la tableta se desintegra de forma casi inmediata (< 3 minutos) a pH tanto intestinal como estomacal, lo cual representa una rápida liberación del fármaco desde la forma farmacéutica al medio sin que eso conlleve a una disolución eficiente. En la literatura se reportó que la forma micronizada de hsd mejora su disolución con respecto a tamaños de partícula mayores, refiriendo que, a menor tamaño de partícula, mayor área de contacto y mayor solubilidad<sup>111</sup>. Las diversas formas farmacéuticas de circulación en el mercado a base de flavonoides hablan también de la forma micronizada de hsd<sup>98</sup>; para esta prueba, el fármaco no disuelto fue capaz de retenerse en una membrana de 11  $\mu\text{m}$ ; la ngn tuvo un tamaño de

partícula menor, al traspasar dicha membrana; sin representar mayor disolución en la prueba *in vitro*.

Gu y col.<sup>22</sup>, encontraron que todos los parámetros farmacocinéticos, incluida la biodisponibilidad de hst a una misma dosis de fármaco, pero utilizando en formulaciones diferentes: suspensión, micelios con D- $\alpha$ -tocoferil polietilen glicol 1000 succinato y complejos con fosfodilcolina, por ejemplo,  $C_{max}$  tuvo una relación de 1:10:1.6,  $T_{max}$ , fue mayor en el fármaco libre, lo que expresa el proceso de liberación del fármaco en las formulaciones. La eliminación del fármaco en la forma libre fue muy rápida, siendo indetectable a las 4 horas posteriores a la administración, en tanto que en las formulaciones fue detectable aún a las 9 h, última hora de muestreo; esto nos habla de la gran influencia que puede llegar a tener una formulación en los procesos LADME de cualquier fármaco cuando el objetivo de la formulación es modificar su biodisponibilidad; sin embargo, también existen formulaciones inertes que solo facilitan la dosificación y administración.

Con base a la comparativa de los parámetros farmacocinéticos de nuestro estudio, se puede considerar que la formulación y las operaciones unitarias relacionadas al tableteado, tienen un carácter neutral en el comportamiento farmacocinético de los flavonoides, mejorando solo las propiedades reológicas de compactación y confiriéndole una forma práctica de dosificación para la administración oral con la seguridad de que la biodisponibilidad de los flavonoides no se verá modificada.



## CONCLUSIONES

Hsd y ngn mostraron cinéticas de primer orden tanto para absorción como para eliminación, permitiendo la obtención de parámetros farmacocinético mediante el modelo no compartimental. Ambos flavonoides mostraron tiempo de latencia cero, lo que representó que la absorción inició inmediatamente después de la administración.

Mediante las pruebas estadísticas, se demostró que hsd no presentó diferencias significativas al coadministrarse con ngn. En cambio, ngn al ser coadministrado con hsd, mostró una velocidad de aclaramiento más lenta ( $CL/F_{ngn-mix} < CL/F_{ngn-free}$ ), causando a su vez, un Vd/F menor e incrementando la biodisponibilidad (AUC) de ngn. Tanto para ngn como para hsd, los parámetros farmacocinéticos de cada flavonoide en la mezcla y en la tableta no presentaron diferencias significativas, lo que representó que la tableta no modifica la cronología de tránsito de los flavonoides en el biosistema comparado con la mezcla.

Las pruebas farmacopéicas proporcionaron información relevante sobre la formulación: en primer lugar, que la tableta cumple con la cantidad teórica de cada flavonoide, lo que permite asegurar la dosis administrada al utilizar la tableta. En segundo lugar, la solubilidad de los flavonoides en las pruebas preliminares (mezcla en matraces) y las pruebas en el disolutor (tableta) a pH gástrico e intestinal fue menor al 1%; esta baja solubilidad puede representar una limitante en la absorción y por lo tanto en la biodisponibilidad de los flavonoides. La utilización del comprimido no modificó la cantidad de flavonoides disueltos, por lo que se demostró que la tableta no tiene un efecto sobre las características fisicoquímicas de los flavonoides relacionadas a la solubilidad.

La evaluación *in vitro* e *in vivo* de la tableta y la mezcla de flavonoides, permiten concluir que la formulación y las operaciones unitarias relacionadas al tableteado, proporcionan a los ingredientes farmacéuticos activos una forma de dosificación y administración sin modificar solubilidad y biodisponibilidad de hsd y ngn. Lo anterior propone que la formulación cumplirá con las mismas características que posee la mezcla respecto a los estudios previos de esta, como sus efectos terapéuticos, DE<sub>50</sub> y DL<sub>50</sub> al mantener las mismas concentraciones en la biofase en función del tiempo.





## REFERENCIAS

1. Kanaze, F. I.; Gabrieli, C.; Kokkalou, E.; Georgarakis, M.; Niopas, I., Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin and naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* **2003**, *33* (2), 243-9.
2. Alam, M. A.; Subhan, N.; Rahman, M. M.; Uddin, S. J.; Reza, H. M.; Sarker, S. D., Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)* **2014**, *5* (4), 404-17.
3. Roohbakhsh, A.; Parhiz, H.; Soltani, F.; Rezaee, R.; Iranshahi, M., Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin--a mini-review. *Life sciences* **2014**, *113* (1-2), 1-6.
4. Parhiz, H.; Roohbakhsh, A.; Soltani, F.; Rezaee, R.; Iranshahi, M., Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytotherapy research : PTR* **2015**, *29* (3), 323-31.
5. Ali, S. H.; Sulaiman, G. M.; Al-Halbosiy, M. M. F.; Jabir, M. S.; Hameed, A. H., Fabrication of hesperidin nanoparticles loaded by poly lactic co-Glycolic acid for improved therapeutic efficiency and cytotoxicity. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2019**, *47* (1), 378-394.
6. Ministerio de sanidad y política social. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. DAFLON 500 mg comprimidos recubiertos con película - hoja técnica. Daflon500MSDS, Ed. 2019. Archivo de internet. Consulta: 14/09/2018. <https://botplusweb.portalfarma.com/documentos/2009/9/1/40094.pdf>
7. Ministerio de sanidad y política social. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios. Diosmina Teva 500 mg comprimidos recubiertos con película. 500, Ed. 2019. [https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/77530/FT\\_77530.pdf](https://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/77530/FT_77530.pdf)
8. Ministerio de sanidad y política social. Agencia española de medicamentos y productos sanitarios., Favroben 150 mg/150 mg/100 mg cápsulas duras. FavrobenMSDS, Ed. 2019. <http://www.aemps.gob.es>. Consulta: 19/05/2020
9. Lu, Y.; Zhang, C.; Bucheli, P.; Wei, D., Citrus flavonoids in fruit and traditional Chinese medicinal food ingredients in China. *Plant foods for human nutrition (Dordrecht, Netherlands)* **2006**, *61* (2), 57-65.
10. Secretaría de Salud, Comisión permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM). 11a edicion*. Secretaria de Salud: 2014.
11. GENERAL, C. D. S., ACUERDO que determina el tipo de prueba para demostrar intercambiabilidad de medicamentos genéricos y se definen los criterios que deberán aplicárseles. Salud, S. d., Ed. México, 19 de Septiembre de 2017.
12. Aiache, J. M., Devissaguet, J. PH., Guyot-Hermann, A.M, *Biofarmacia*. México, 1983.

13. Elizabeth, L. L. Exploring the Drug Development Process. <https://www.technologynetworks.com/drug-discovery/articles/exploring-the-drug-development-process-331894>.
14. Román., F. D., *Innovación y desarrollo Farmacéutico*. 1.<sup>a</sup> ed.; Asociación Farmacéutica Mexicana: México D.F., 1990; p 305.
15. Kostianen, R.; Kotiaho, T.; Kuuranne, T.; Auriola, S., Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in drug metabolism studies. *Journal of mass spectrometry : JMS* **2003**, 38 (4), 357-72.
16. Vera-Sánchez, R. Desarrollo, optimización y validación de una metodología analítica por CLAEEM/EM-QqQ para la cuantificación de citroflavonoides en plasma de murino. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, 2018.
17. Montalvo, J. E. O. Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para la cuantificación de citroflavonoides en plasma de roedor. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, 2017.
18. Baltazar, E. H., Preformulación de una forma farmacéutica sólida a base de citroflavonoides. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 2018.
19. Sánchez-Recillas, A.; Gonzalez, N.; Barrera, V.; Ibarra-Barajas, M.; Estrada-Soto, S.; Ortiz-Andrade, R., Vasorelaxant and Antihypertensive Activities of Citroflavonoids (Hesperidin/Naringenin Mixture): Potential Prophylactic of Cardiovascular Endothelial Dysfunction. *Pharmacognosy Magazine* **2019**, 15, S84-91.
20. Cabañas-Wuan, A. F. Evaluación del efecto hipoglucemiante y/o antihiperoglucemiante de los flavonoides obtenidos de las cáscaras de naranja dulce (*Citrus sinensis* Osbeck) var. nacional en ratas normoglucémicas y diabéticas. Universidad Autónoma de Yucatán., Mérida, Yucatán, México-, 2013.
21. Correa Polanco, O. I. Evaluación del efecto hipoglucemiante y/o antihiperoglucemiante de los flavonoides obtenidos de las cáscaras de naranja dulce (*Citrus sinensis* Osbeck) var. nacional en ratas normoglucémicas y diabéticas. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, 2013.
22. Gu, S. F.; Wang, L. Y.; Tian, Y. J.; Zhou, Z. X.; Tang, J. B.; Liu, X. R.; Jiang, H. P.; Shen, Y. Q., Enhanced water solubility, antioxidant activity, and oral absorption of hesperetin by D- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate and phosphatidylcholine. *Journal of Zhejiang University. Science. B* **2019**, 20 (3), 273-281.
23. Kay, C. D.; Pereira-Caro, G.; Ludwig, I. A.; Clifford, M. N.; Crozier, A., Anthocyanins and Flavanones Are More Bioavailable than Previously Perceived: A Review of Recent Evidence. *Annual review of food science and technology* **2017**, 8, 155-180.
24. Mozaffarian, D.; Wu, J. H. Y., Flavonoids, Dairy Foods, and Cardiovascular and Metabolic Health. **2018**, 122 (2), 369-384.
25. Lyons, C. L.; Roche, H. M., Nutritional Modulation of AMPK-Impact upon Metabolic-Inflammation. *Int J Mol Sci* **2018**, 19 (10), 3092.

26. Zhao, C.; Wang, F.; Lian, Y.; Xiao, H.; Zheng, J., Biosynthesis of citrus flavonoids and their health effects. *Critical reviews in food science and nutrition* **2020**, *60* (4), 566-583.
27. Zhu, J.; Chen, C.; Zhang, B.; Huang, Q., The inhibitory effects of flavonoids on  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Critical reviews in food science and nutrition* **2020**, *60* (4), 695-708.
28. Rizk, S. M.; Sabri, N. A., Evaluation of clinical activity and safety of Daflon 500 mg in type 2 diabetic female patients. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society* **2009**, *17* (3), 199-207.
29. Sanitarios, A. E. d. M. y. P., Normoginko 70mg comprimidos recubiertos con película. España, 2006.
30. Caceres Guido, P., Historia Farmacocinetica Clinica. *LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY* **2007**, *26*, 462-467.
31. Andréasson, R.; Jones, A. W., Erik M.P. Widmark (1889–1945): Swedish pioneer in forensic alcohol toxicology. *Forensic Science International* **1995**, *72* (1), 1-14.
32. Hochhaus, G.; Barrett, J. S.; Derendorf, H., Evolution of pharmacokinetics and pharmacokinetic/dynamic correlations during the 20th century. *Journal of clinical pharmacology* **2000**, *40* (9), 908-17.
33. Paalzow, L., Torsten Teorell, the Father of Pharmacokinetics. *Upsala journal of medical sciences* **1995**, *100*, 41-6.
34. Sánchez, E. F.; Nacional, I. P.; Superior, M. d. E., *Biofarmacia*. Ipn: 1997.
35. Wagner, J. G., *Fundamentals of Clinical Pharmacokinetics*. 1<sup>a</sup> ed.; Editorial Reverté, S.A.: Barcelona, España, 1983; p 471.
36. Lorenzo, M. G. L. L. H. M. S. P. P.; Fernández, P. L., *Velázquez. Farmacología Básica y Clínica (eBook online)*. Editorial Médica Panamericana S.A.: 2015.
37. Marzo, A.; Dal Bo, L., Chromatography as an analytical tool for selected antibiotic classes: a reappraisal addressed to pharmacokinetic applications. *Journal of chromatography. A* **1998**, *812* (1-2), 17-34.
38. Alan Talevi, P. Q., María Esperanza Ruiz, Carolina L. Bellera, Andrea V. Enrique, Emilia Alberdi, *Procesos biofarmacéuticos: Su relación con el diseño de formas farmacéuticas y el éxito de la farmacoterapia*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP), 2016.
39. Rowland, M.; Tozer, T. N., *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: Concepts and Applications*. Wolters Kluwer Health/Lippincott William & Wilkins: 2011.
40. Bonate, P. L., Pharmacokinetics. *WIREs Computational Statistics* **2011**, *3* (4), 332-342.
41. Gilman, A. G., *Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 13.<sup>a</sup> ed.; McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. DE C.V.: University of California, San Diego, 2018.
42. Flórez, J., *Farmacología humana*. 4.<sup>a</sup> ed.; Masson: Madrid, España, 2001; p 1340.
43. Abdou, H. M., *Dissolution, Bioavailability & Bioequivalence*. Mack: 1989.

44. Freckmann, G.; Pleus, S.; Haug, C.; Bitton, G.; Nagar, R., Increasing local blood flow by warming the application site: beneficial effects on postprandial glycemic excursions. *J Diabetes Sci Technol* **2012**, 6 (4), 780-785.
45. Marathe, P. H.; Wen, Y.; Norton, J.; Greene, D. S.; Barbhaiya, R. H.; Wilding, I. R., Effect of altered gastric emptying and gastrointestinal motility on metformin absorption. *Br J Clin Pharmacol* **2000**, 50 (4), 325-332.
46. Echizen, H.; Eichelbaum, M., Clinical pharmacokinetics of verapamil, nifedipine and diltiazem. *Clinical pharmacokinetics* **1986**, 11 (6), 425-49.
47. Sarlis, N. J.; Gourgiotis, L., Hormonal effects on drug metabolism through the CYP system: perspectives on their potential significance in the era of pharmacogenomics. *Current drug targets. Immune, endocrine and metabolic disorders* **2005**, 5 (4), 439-48.
48. Sazdanovic, P.; Jankovic, S. M.; Kostic, M.; Dimitrijevic, A.; Stefanovic, S., Pharmacokinetics of linezolid in critically ill patients. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* **2016**, 12 (6), 595-600.
49. Matsuzaki, T.; Scotcher, D.; Darwich, A. S.; Galetin, A.; Rostami-Hodjegan, A., Towards Further Verification of Physiologically-Based Kidney Models: Predictability of the Effects of Urine-Flow and Urine-pH on Renal Clearance. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2019**, 368 (2), 157-168.
50. Shu, Y.; Brown, C.; Castro, R. A.; Shi, R. J.; Lin, E. T.; Owen, R. P.; Sheardown, S. A.; Yue, L.; Burchard, E. G.; Brett, C. M.; Giacomini, K. M., Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1, OCT1, on metformin pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* **2008**, 83 (2), 273-280.
51. Kobuchi, S.; Fukushima, K.; Aoyama, H.; Ito, Y.; Sugioka, N.; Takada, K., Effects of obesity induced by high-fat diet on the pharmacokinetics of atazanavir in rats. *Drug metabolism letters* **2013**, 7 (1), 39-46.
52. Gibaldi, M.; Perrier, D., *Farmacocinética*. Editorial Reverte: 1982.
53. Hu, M.; Li, X., *Oral Bioavailability: Basic Principles, Advanced Concepts, and Applications*. Wiley: 2011.
54. Toutain, P.-L.; Bousquet-Mélou, A., Volumes of distribution. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* **2004**, 27 (6), 441-53.
55. Ros, A. A.; Somoza, M. C.; Martín, F. R. M.; Rubio, M. C. M., *BIOFARMACIA Y FARMACOCINÉTICA Ejercicios y problemas resueltos*. 2.<sup>a</sup> ed.; Elsevier España, S.L.: Barcelona, España, 2014; p 338.
56. Toutain, P.-L.; Bousquet-Mélou, A., Plasma terminal half-life. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* **2004**, 27 (6), 427-39.
57. Toutain, P.-L.; Bousquet-Melou, A., Plasma clearance. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* **2004**, 27, 415-25.
58. Srimani, J.; Moffitt, R. A.; Wang, M. D., WebPK, a web-based tool for custom pharmacokinetic simulation. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc* **2010**, 2010, 1494-1497.
59. Figueroa, I.; Leipold, D.; Leong, S.; Zheng, B.; Triguero-Carrasco, M.; Fourie-O'Donohue, A.; Kozak, K. R.; Xu, K.; Schutten, M.; Wang, H.; Polson, A. G.; Kamath,

- A. V., Prediction of non-linear pharmacokinetics in humans of an antibody-drug conjugate (ADC) when evaluation of higher doses in animals is limited by tolerability: Case study with an anti-CD33 ADC. *MAbs* **2018**, *10* (5), 738-750.
60. Dobs, A. S.; Meikle, A. W.; Arver, S.; Sanders, S. W.; Caramelli, K. E.; Mazer, N. A., Pharmacokinetics, Efficacy, and Safety of a Permeation-Enhanced Testosterone Transdermal System in Comparison with Bi-Weekly Injections of Testosterone Enanthate for the Treatment of Hypogonadal Men\*. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **1999**, *84* (10), 3469-3478.
61. Levitt, D. G., PKQuest: a general physiologically based pharmacokinetic model. Introduction and application to propranolol. *BMC Clin Pharmacol* **2002**, *2*, 5-5.
62. Charles, B.; Duffull, S., Pharmacokinetic Software for the Health Sciences. *Clinical pharmacokinetics* **2001**, *40*, 395-403.
63. Zhang, Y.; Huo, M.; Zhou, J.; Xie, S., PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Computer methods and programs in biomedicine* **2010**, *99* (3), 306-14.
64. Jambhekar, S. S.; Breen, P. J., Drug dissolution: significance of physicochemical properties and physiological conditions. *Drug Discov Today* **2013**, *18* (23-24), 1173-1184.
65. Siew, A., Dissolution Testing. *J. Pharmaceutical Technology* **2016**, *40* (11), 56-57.
66. Rohrs, B., Dissolution Method Development for Poorly Soluble Compounds. *Dissolution Technologies* **2001**, *8*, 6-12.
67. Nurhikmah, W.; Sumirtapura, Y. C.; Pamudji, J. S., Dissolution Profile of Mefenamic Acid Solid Dosage Forms in Two Compendial and Biorelevant (FaSSiF) Media. *Scientia pharmaceutica* **2016**, *84* (1), 181-90.
68. Phillips, D. J.; Pygall, S. R.; Cooper, V. B.; Mann, J. C., Overcoming sink limitations in dissolution testing: a review of traditional methods and the potential utility of biphasic systems. **2012**, *64* (11), 1549-1559.
69. Ma, Y.; Li, P.; Chen, D.; Fang, T.; Li, H.; Su, W., LC/MS/MS quantitation assay for pharmacokinetics of naringenin and double peaks phenomenon in rats plasma. *International journal of pharmaceutics* **2006**, *307* (2), 292-9.
70. Mullen, W.; Boitier, A.; Stewart, A. J.; Crozier, A., Flavonoid metabolites in human plasma and urine after the consumption of red onions: analysis by liquid chromatography with photodiode array and full scan tandem mass spectrometric detection. *Journal of chromatography. A* **2004**, *1058* (1-2), 163-8.
71. Zeng, X.; Yao, H.; Zheng, Y.; He, Y.; He, Y.; Rao, H.; Li, P.; Su, W., Tissue distribution of naringin and derived metabolites in rats after a single oral administration. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2020**, *1136*, 121846.
72. Li, Y.-M.; Li, X.-M.; Li, G.-M.; Du, W.-C.; Zhang, J.; Li, W.-X.; Xu, J.; Hu, M.; Zhu, Z., In vivo pharmacokinetics of hesperidin are affected by treatment with glucosidase-like BglA protein isolated from yeasts. *J Agric Food Chem* **2008**, *56* (14), 5550-5557.

73. Srirangam, R.; Hippalgaonkar, K.; Majumdar, S., Intravitreal kinetics of hesperidin, hesperetin, and hesperidin G: effect of dose and physicochemical properties. *Journal of pharmaceutical sciences* **2012**, *101* (4), 1631-8.
74. Tong, L.; Zhou, D.; Gao, J.; Zhu, Y.; Sun, H.; Bi, K., Simultaneous determination of naringin, hesperidin, neohesperidin, naringenin and hesperetin of Fractus aurantii extract in rat plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* **2012**, *58*, 58-64.
75. Wang, X.; Zhao, X.; Gu, L.; Lv, C.; He, B.; Liu, Z.; Hou, P.; Bi, K.; Chen, X., Simultaneous determination of five free and total flavonoids in rat plasma by ultra HPLC–MS/MS and its application to a comparative pharmacokinetic study in normal and hyperlipidemic rats. *Journal of Chromatography B* **2014**, *953-954*, 1-10.
76. Martinez, S.; Lakowski, T.; Davies, N., Enantiospecific Analysis of 8-Prenylnaringenin in Biological Fluids by Liquid-Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry: Application to Preclinical Pharmacokinetic Investigations. *Chirality* **2014**, *26*, 419-426.
77. Huang, X.; Xu, J.; He, J.; Shi, S.; Yan, H.; Wang, J.; Ren, P., Pharmacokinetic study of the prokinetic ABCs liquiritigenin, naringenin and hesperitin following the oral administration of Si-Ni-San decoction to functional dyspepsia patients. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* **2019**, *49* (6), 708-717.
78. de Villiers, A.; Venter, P.; Pasch, H., Recent advances and trends in the liquid-chromatography–mass spectrometry analysis of flavonoids. *Journal of Chromatography A* **2016**, *1430*, 16-78.
79. Forcisi, S.; Moritz, F.; Kanawati, B.; Tziotis, D.; Lehmann, R.; Schmitt-Kopplin, P., Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *Journal of chromatography. A* **2013**, *1292*, 51-65.
80. Kanaze, F. I.; Bounartzi, M. I.; Georgarakis, M.; Niopas, I., Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *European journal of clinical nutrition* **2007**, *61* (4), 472-7.
81. Erlund, I.; Meririnne, E.; Alfthan, G.; Aro, A., Plasma Kinetics and Urinary Excretion of the Flavanones Naringenin and Hesperetin in Humans after Ingestion of Orange Juice and Grapefruit Juice<sup>1</sup>. *The Journal of nutrition* **2001**, *131*.
82. Guo, P.; Dong, L.; Yan, W.; Wei, J.; Wang, C.; Zhang, Z., Simultaneous determination of linarin, naringenin and formononetin in rat plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after oral administration of Bushen Guchi Pill. *Biomedical chromatography : BMC* **2015**, *29* (2), 246-53.
83. Pingili, R.; Vemulapalli, S.; Mullapudi, S.; Nuthakki, S.; Pendyala, S.; Naveenbabu, K., Pharmacokinetic interaction study between flavanones (hesperetin, naringenin) and rasagiline mesylate in wistar rats. *Drug development and industrial pharmacy* **2015**, *42*, 1-33.
84. Academy, C. Mass Spectrometry, Fundamental LC-MS. Mass Analyzers. [https://www.chromacademy.com/lms/sco36/Fundamental\\_LC-MS\\_Mass\\_Analysers.pdf](https://www.chromacademy.com/lms/sco36/Fundamental_LC-MS_Mass_Analysers.pdf).

85. de Hoffmann, E.; Stroobant, V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. Wiley: 2013.
86. Khan, A. W.; Kotta, S.; Ansari, S. H.; Sharma, R. K.; Ali, J., Enhanced dissolution and bioavailability of grapefruit flavonoid Naringenin by solid dispersion utilizing fourth generation carrier. *Drug development and industrial pharmacy* **2015**, *41* (5), 772-9.
87. Xu, Z.-r.; Jiang, C.-h.; Fan, S.-y.; Yan, R.-j.; Xie, N.; Wu, C.-z., Comparative pharmacokinetics of naringin and neohesperidin after oral administration of flavonoid glycosides from *Aurantii Fructus Immaturus* in normal and gastrointestinal motility disorders mice. *Chinese Herbal Medicines* **2019**, *11* (3), 314-320.
88. Zhu, H.; Guan, J.; Shi, J.; Pan, X.; Chang, S.; Zhang, T.; Feng, B.; Gu, J., Simultaneous determination of eight bioactive constituents of Zhi-Zi-Hou-Po decoction in rat plasma by ultra high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of separation science* **2020**, *43* (2), 406-417.
89. Lee, J.-T.; Pao, L.-H.; Hsieh, C.-D.; Huang, P.-W.; Hu, O. Y.-P., Development and validation of an LC-MS/MS method for simultaneous quantification of hesperidin and hesperetin in rat plasma for pharmacokinetic studies. *Analytical Methods* **2017**, *9* (22), 3329-3337.
90. Ramírez Herrera, E. M. Evaluación in vitro e in vivo del efecto de los citroflavonoides sobre la absorción de carbohidratos en un modelo de ratas. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, 2013.
91. González Rivero, N. A. Evaluación del efecto cardiovascular de diferentes combinaciones de hesperidina:naringenina en un modelo experimental exvivo de roedor. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México, 2018.
92. Liu, M.; Yang, C.; Zou, W.; Guan, X.; Zheng, W.; Lai, L.; Fang, S.; Cai, S.; Su, W., Toxicokinetics of naringin, a putative antitussive, after 184-day repeated oral administration in rats. *Environmental toxicology and pharmacology* **2011**, *31* (3), 485-9.
93. Wagner, J. G., History of pharmacokinetics. *Pharmacology & Therapeutics* **1981**, *12* (3), 537-562.
94. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, G., Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Ed. 1999.
95. Omaye, S. T.; Skala, J. H.; Gretz, M. D.; Schaus, E. E.; Wade, C. E., Simple method for bleeding the unanaesthetized rat by tail venipuncture. *Laboratory animals* **1987**, *21* (3), 261-4.
96. Pereira-Caro, G.; Ludwig, I. A.; Polyviou, T.; Malkova, D.; García, A.; Moreno-Rojas, J. M.; Crozier, A., Identification of Plasma and Urinary Metabolites and Catabolites Derived from Orange Juice (Poly)phenols: Analysis by High-Performance Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry. *J Agric Food Chem* **2016**, *64* (28), 5724-5735.
97. Bruce Clark, D. A. S., *Introducción a la farmacocinética*. 1.<sup>a</sup> ed.; Editorial Acribia S.A.: España, 1989.



98. Ivanova, N. A.; Hyusein, Y.; Slavov, I. Z.; Kumanov, I., Biopharmaceutical and marketing evaluation of diosmin- and hesperidin-containing products on the Bulgarian market. *Scripta Scientifica Pharmaceutica* **2019**, 5 (2), 61-70.
99. Sunil S Jambhekar, P. J. B., *Basic Pharmacokinetics*. 1.<sup>a</sup> ed.; The Pharmaceutical Press: Great Britain by J International, Padstow, Cornwall, 2009; p 424.
100. Chen, J.; Wang, S.; Jia, X.; Bajimaya, S.; Lin, H.; Tam, V. H.; Hu, M., Disposition of flavonoids via recycling: comparison of intestinal versus hepatic disposition. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **2005**, 33 (12), 1777-84.
101. Hsiu, S.-L.; Huang, T.-Y.; Hou, Y.-C.; Chin, D.-H.; Chao, P.-D. L., Comparison of metabolic pharmacokinetics of naringin and naringenin in rabbits. *Life sciences* **2002**, 70 (13), 1481-1489.
102. Nectoux, A. M.; Abe, C.; Huang, S. W.; Ohno, N.; Tabata, J.; Miyata, Y.; Tanaka, K.; Tanaka, T.; Yamamura, H.; Matsui, T., Absorption and Metabolic Behavior of Hesperidin (Rutinosylated Hesperetin) after Single Oral Administration to Sprague-Dawley Rats. *J Agric Food Chem* **2019**, 67 (35), 9812-9819.
103. Escudero-López, B.; Calani, L.; Fernández-Pachón, M.-S.; Ortega, Á.; Brighenti, F.; Crozier, A.; Del Rio, D., Absorption, metabolism, and excretion of fermented orange juice (poly)phenols in rats. **2014**, 40 (3), 327-335.
104. Manach, C.; Donovan, J. L., Pharmacokinetics and metabolism of dietary flavonoids in humans. *Free radical research* **2004**, 38 (8), 771-85.
105. Bai, Y.; Peng, W.; Yang, C.; Zou, W.; Liu, M.; Wu, H.; Fan, L.; Li, P.; Zeng, X.; Su, W., Pharmacokinetics and Metabolism of Naringin and Active Metabolite Naringenin in Rats, Dogs, Humans, and the Differences Between Species. *Frontiers in Pharmacology* **2020**, 11 (364).
106. Luong Chu, L.; Pandey, R.; Jung, N.; Jung, H.; Kim, E.-H.; Sohng, J. K., Hydroxylation of diverse flavonoids by CYP450 BM3 variants: Biosynthesis of eriodictyol from naringenin in whole cells and its biological activities. *Microbial Cell Factories* **2016**, 15.
107. Basheer, L.; Kerem, Z., Interactions between CYP3A4 and Dietary Polyphenols. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015**, 2015, 1-15.
108. Ho, P. C.; Saville, D. J.; Wanwimolruk, S., Inhibition of human CYP3A4 activity by grapefruit flavonoids, furanocoumarins and related compounds. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques* **2001**, 4 (3), 217-27.
109. Quintieri, L.; Bortolozzo, S.; Stragliotto, S.; Moro, S.; Pavanetto, M.; Nassi, A.; Palatini, P.; Floreani, M., Flavonoids diosmetin and hesperetin are potent inhibitors of cytochrome P450 2C9-mediated drug metabolism in vitro. *Drug metabolism and pharmacokinetics* **2010**, 25 (5), 466-76.
110. Cho, Y. A.; Choi, D. H.; Choi, J. S., Effect of hesperidin on the oral pharmacokinetics of diltiazem and its main metabolite, desacetyldiltiazem, in rats. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **2009**, 61 (6), 825-9.

111. Bouskela, E.; Cyrino, F. Z.; Lerond, L., Effects of oral administration of different doses of purified micronized flavonoid fraction on microvascular reactivity after ischaemia/reperfusion in the hamster cheek pouch. *Br J Pharmacol* **1997**, *122* (8), 1611-1616.



## ANEXO 1

### Abreviaturas Relacionadas a farmacocinética de flavonoides

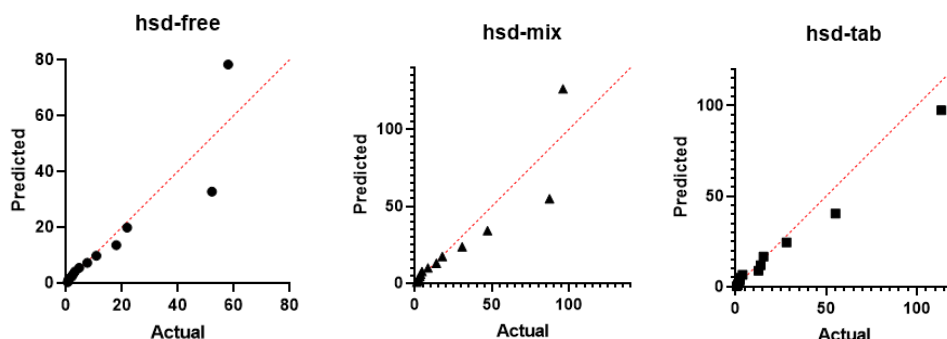
Abreviatura	Significado
MIX-160	Mezcla de citroflavonoides hesperidina: naringenina
hsd	Hesperidina
ngn	Naringenina
tab	Tableta
hst	Hesperetina
nrg	Naringina
rtn	Rutina
qct	Quercetina
hsd-free	Hesperidina administrada individualmente
hsd-mix	Hesperidina administrada en MIX HN
hsd-tab	Hesperidina administrada en tableta
ngn-free	Naringenina administrada individualmente
ngn -mix	Naringenina administrada en MIX HN
ngn -tab	Naringenina administrada en tableta
LADME	Liberación, absorción, distribución, metabolismo y eliminación a nivel biológico
$t_0$	Tiempo cero, momento de la administración
$C_0$	Concentración cero, al momento de la administración
$t$	Tiempo: tiempo muestreado (h)
$C$	Concentración
$C_{ult}$	Última concentración muestreada y/o cuantificable
$T_{ult}$	Tiempo de la última concentración muestreada y/o cuantificable
$C_{max}$	Concentración máxima alcanzada en suero
$T_{max}$	Tiempo máximo: tiempo en que se alcanza la concentración máxima
$T_{lag}$	Tiempo de latencia o tiempo que tarda el fármaco en comenzar a absorberse
$k_{abs}$	Constante de absorción
$t^{1/2}_{abs}$	Vida media de absorción
$k_{el}$	Constante de eliminación
$t^{1/2}_{el}$	Vida media de eliminación
$F$	Fracción de fármaco absorbido
$D$	Dosis
$CL$	Velocidad de aclaramiento
$CL/F$	Velocidad de aclaramiento para vía extravascular
$V_d$	Volumen de distribución
$V_d/F$	Volumen de distribución para vía extravascular
$AUC$	Área bajo la curva
$AUC_0^\infty$	Área bajo la curva de tiempo cero a tiempo infinito
$AUC_0^t$	Área bajo la curva de tiempo cero a un tiempo definido.
$AUC_t^\infty$	Área bajo la curva del último tiempo muestreado a tiempo infinito
$AUMC$	Área bajo la curva en el primer momento
$TMR$	Tiempo medio de referencia
$C_{II}$	Concentración de absorción obtenida por extrapolación de la ecuación de eliminación



## ANEXO 2: ESTADÍSTICA

### Evaluación estadística de las pruebas *in vivo*.

Las figuras AF-1 y AF-2 así como las tablas AT-1 y AT-2, muestran el comportamiento de normalidad logarítmica de los datos obtenidos de las gráficas de *concentración vs tiempo* de hesperidina y ngn respectivamente, los cuales cumplen con los supuestos para ser evaluados mediante estadística paramétrica.

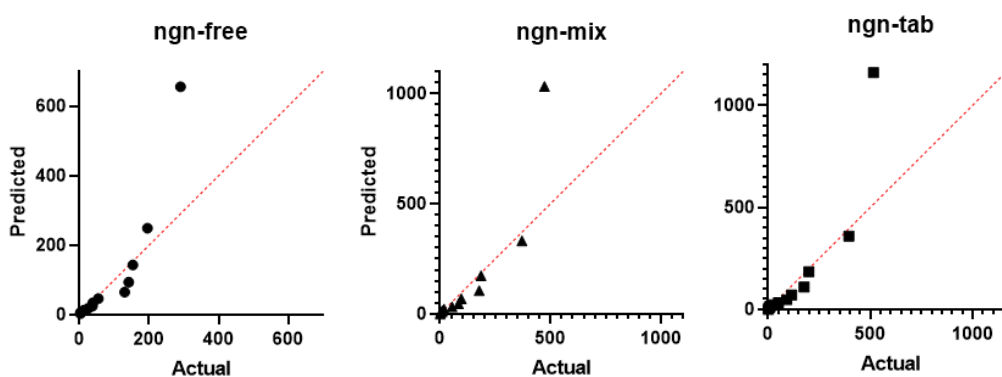


**Figura AF-1.** Gráficas de normalidad logarítmica para hesperidina en sus tres tratamientos.

**Tabla AT-1.** Prueba de normalidad logarítmica para las concentraciones de hesperidina.

Shapiro-Wilk test	hsd-free	hsd-mix	hsd-tab
W	0.9477	0.9264	0.9280
Valor p	0.5258	0.2717	0.2863
¿Pasa normalidad logarítmica ( $\alpha=0.05$ )?	Si	Si	Si
Resumen Valor p	ns	ns	ns

ns: no significativo



**Figura AF-2.** Gráficas de normalidad logarítmica para naringenina en sus tres tratamientos.

**Tabla AT-2.** Prueba de normalidad logarítmica para las concentraciones de hesperidina.

Shapiro-Wilk test	ngn-free	ngn-mix	ngn-tab
W	0.9204	0.9185	0.9161
Valor p	0.2227	0.2092	0.1930
¿Pasa normalidad logarítmica ( $\alpha=0.05$ )?	Si	Si	Si
Resumen Valor p	ns	ns	ns

ns: no significativo

**Prueba t para evaluación de diferencias significativas entre absorción y eliminación****Tabla AT-3.** Prueba T para constantes de absorción y eliminación de hesperidina

Prueba T- no pareada	$k_{abs}$ vs $k_{el}$ free	$k_{abs}$ vs $k_{el}$ mix	$k_{abs}$ vs $k_{el}$ tab
Valor p	0.0016	0.0085	0.0104
Resumen Valor p	**	**	*
¿Diferencia significativa? ( $p < 0.05$ )?	Si	Si	Si
Valor p ¿una o dos colas?	Dos colas	Dos colas	Dos colas
t, GL	t=7.668, GL=4	t=4.825, GL=4	t=4.549, GL=4

GL: Grados de libertad;  $k_{abs}$ : constante de absorción;  $k_{el}$ : constante de eliminación; free: flavonoide administrado individualmente; mix: flavonoide en mezcla; tab: flavonoide en tableta; \*: significativo; \*\*muy significativo**Tabla AT-4.** Prueba T para constantes de absorción y eliminación de naringenina

Prueba T- no pareada	$k_{abs}$ vs $k_{el}$ free	$k_{abs}$ vs $k_{el}$ mix	$k_{abs}$ vs $k_{el}$ tab
Valor p	0.0005	0.0004	0.0004
Resumen Valor p	***	***	***
¿Diferencia significativa? ( $p < 0.05$ )?	Si	Si	Si
Valor p ¿una o dos colas?	Dos colas	Dos colas	Dos colas
t, GL	t=10.50, GL=4	t=10.92, GL=4	t=10.09, GL=4

GL: Grados de libertad; \*\*\*: extremadamente significativo

**Tabla AT-5.** Prueba T para interceptos de absorción y eliminación de hesperidina

Prueba T- no pareada	$b_{abs}$ vs $b_{el}$ free	$b_{abs}$ vs $b_{el}$ mix	$b_{abs}$ vs $b_{el}$ tab
Valor p	0.8569	0.8776	0.7807
Resumen Valor p	ns	ns	ns
¿Diferencia significativa? ( $p < 0.05$ )?	No	No	No
Valor p ¿una o dos colas?	Dos colas	Dos colas	Dos colas
t, GL	t=0.1923, GL=4	t=0.1675, GL=3	t=0.2978, GL=4

GL: grados de libertad; b: intersección; abs: absorción; el: eliminación; free: flavonoide administrado individualmente; mix: flavonoide en mezcla; tab: flavonoide en tableta; ns: no significativo

**Tabla AT-6. Prueba T para interceptos de absorción y eliminación de naringenina**

Prueba T- no pareada	$b_{abs}$ vs $b_{el}$ free	$b_{abs}$ vs $b_{el}$ mix	$b_{abs}$ vs $b_{el}$ tab
Valor p	0.1735	0.0561	0.5081
Resumen Valor p	ns	ns	ns
¿Diferencia significativa? ( $p < 0.05$ )?	No	No	No
Valor p ¿una o dos colas?	Dos colas	Dos colas	Dos colas
t, GL	t=1.654, GL=4	t=2.665, GL=4	t=0.7258, GL=4

GL: grados de libertad; b: intersección; abs: absorción; el: eliminación; free: flavonoide administrado individualmente; mix: flavonoide en mezcla; tab: flavonoide en tableta; ns: no significativo

**Evaluación estadística de parámetros farmacocinéticos****Tabla AT-7. Prueba ANOVA para  $k_{abs}$  de hesperidina**

Análisis de Varianza	SC	GL	MC	Valor p
Tratamiento (entre columnas)	0.01892	2	0.009460	p<0.0001
Residual (dentro de columnas)	0.0002226	6	3.711e-005	
Total	0.01914	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-8. Prueba ANOVA para  $k_{el}$  de hesperidina**

Análisis de Varianza	SC	GL	MC	Valor p
Tratamiento (entre columnas)	0.0002000	2	0.0001000	p=0.9334
Residual (dentro de columnas)	0.008600	6	0.001433	
Total	0.008800	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-9. Prueba ANOVA para  $T_{1/2}$  de hesperidina.**

Análisis de Varianza	SC	GL	MC	Valor p
Tratamiento (entre columnas)	0.02220	2	0.01110	p=0.9739
Residual (dentro de columnas)	2.511	6	0.4185	
Total	2.533	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-10. Prueba ANOVA para  $T_{max}$  de hesperidina.**

Análisis de Varianza	SC	GL	MC	Valor p
Tratamiento (entre columnas)	0.8712	2	0.4356	p=0.7316
Residual (dentro de columnas)	7.935	6	1.323	
Total	8.806	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio



**Tabla AT-11.** Prueba ANOVA para  $C_{\max}$  de hesperidina.

<b>Análisis de Varianza</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>MC</b>	<b>Valor p</b>
Tratamiento (entre columnas)	6464	2	3232	p=0.2083
Residual (dentro de columnas)	9410	6	1568	
Total	15874	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-12.** Prueba ANOVA para  $AUC_0^t$  de hesperidina.

<b>Análisis de Varianza</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>MC</b>	<b>Valor p</b>
Tratamiento (entre columnas)	79255	2	39627	p=0.0873
Residual (dentro de columnas)	63185	6	10531	
Total	142440	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-13.** Prueba ANOVA para  $AUC_0^\infty$  de hesperidina.

<b>Análisis de Varianza</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>MC</b>	<b>Valor p</b>
Tratamiento (entre columnas)	79482	2	39741	p=0.0892
Residual (dentro de columnas)	64206	6	10701	
Total	143688	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-14.** Prueba ANOVA para  $CL/F$  de hesperidina.

<b>Análisis de Varianza</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>MC</b>	<b>Valor p</b>
Tratamiento (entre columnas)	11529476956	2	5764738478	p=0.2128
Residual (dentro de columnas)	17080070137	6	2846678356	
Total	28609547093	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-15.** Prueba ANOVA para  $Vd/F$  de hesperidina.

<b>Análisis de Varianza</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>MC</b>	<b>Valor p</b>
Tratamiento (entre columnas)	208784227635	2	104392113817	p=0.5568
Residual (dentro de columnas)	968829413480	6	161471568913	
Total	1177613641115	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-16.** Prueba ANOVA para  $k_{abs}$  de naringenina.

<b>Análisis de Varianza</b>	<b>SC</b>	<b>GL</b>	<b>MC</b>	<b>Valor p</b>
Tratamiento (entre columnas)	0.4519	2	0.2259	p=0.0005
Residual (dentro de columnas)	0.04398	6	0.007330	
Total	0.4959	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-17.** Prueba post hoc para  $k_{abs}$  de naringenina

Prueba Tukey de comparación múltiple	Mean Diff.	Significant ?	Summary	Valor p ajustado
ka ngn-free vs. ka ngn-mix	0.3815	Si	**	0.0038
ka ngn-free vs. ka ngn-tab	0.5325	Si	***	0.0007
ka ngn-mix vs. ka ngn-tab	0.1510	No	ns	0.1575

Mean Diff.: diferencia media; Significant?: ¿es significativo?; ka: constante de absorción; ngn-free: naringenina libre; ngn-mix: naringenina en mezcla; ngn-tab: naringenina en tableta; \*\*: muy significativo; \*\*\* extremadamente significativo; ns: no significativo

**Tabla AT-18.** Prueba ANOVA para  $k_{el}$  de naringenina

Análisis de Varianza	SC	GL	MC	Valor p
Tratamiento (entre columnas)	0.002600	2	0.001300	P=0.1106
Residual (dentro de columnas)	0.002400	6	0.0004000	
Total	0.005000	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-19.** Prueba ANOVA  $T_{max}$  de naringenina.

Análisis de Varianza	SC	GL	MC	Valor p
Tratamiento (entre columnas)	0.2178	2	0.1089	p=0.4311
Residual (dentro de columnas)	0.6728	6	0.1121	
Total	0.8906	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-20.** Prueba ANOVA  $C_{max}$  de naringenina.

Análisis de Varianza	SC	GL	MC	Valor p
Tratamiento (entre columnas)	70402	2	35201	p=0.1481
Residual (dentro de columnas)	79100	6	13183	
Total	149502	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-21.** Prueba ANOVA  $T_{1/2}$  de naringenina.

Análisis de Varianza	SC	GL	MC	Valor p
Tratamiento (entre columnas)	0.07220	2	0.03610	p=0.0511
Residual (dentro de columnas)	0.04260	6	0.007100	
Total	0.1148	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-22.** Prueba ANOVA TMR de naringenina.

Análisis de Varianza	SC	GL	MC	Valor p
Tratamiento (entre columnas)	0.02180	2	0.01090	p=0.8778
Residual (dentro de columnas)	0.4908	6	0.08180	
Total	0.5126	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-23.** Prueba ANOVA para  $AUC_0^t$  de naringenina.

	SC	GL	MC	Valor p
Tratamiento (entre columnas)	708794	2	354397	p=0.0029
Residual (dentro de columnas)	117213	6	19536	
Total	826007	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-24.** Prueba post hoc para  $AUC_0^t$  de naringenina.

Prueba Tukey de comparación múltiple	Mean Diff.	Significant?	Valor p ajustado
ngn-free vs. ngn-mix	-532.0	Si	0.0083
ngn-free vs. ngn-tab	-643.0	Si	0.0032
ngn-mix vs. ngn-tab	-111.0	No	0.6188

Mean Diff.: diferencia media; Significant?: ¿es significativo?; ngn-free: naringenina libre; ngn-mix: naringenina en mezcla; ngn-tab: naringenina en tableta

**Tabla AT-25.** Prueba ANOVA para  $AUC_0^\infty$  de naringenina.

Análisis de Varianza	SC	GL	MC	Valor p
Tratamiento (entre columnas)	709280	2	354640	p=0.0029
Residual (dentro de columnas)	117813	6	19635	
Total	827092	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-26.** Prueba post hoc para  $AUC_0^\infty$  de naringenina.

Prueba Tukey de comparación múltiple	Mean Diff.	Significant?	Valor p ajustado
ngn-free vs. ngn-mix	-532.3	Si	0.0083
ngn-free vs. ngn-tab	-643.2	Si	0.0033
ngn-mix vs. ngn-tab	-110.9	No	0.6209

Mean Diff.: diferencia media; Significant?: ¿es significativo?; ngn-free: naringenina libre; ngn-mix: naringenina en mezcla; ngn-tab: naringenina en tableta

**Tabla AT-27.** Prueba ANOVA para  $Vd/F$  de naringenina.

Análisis de Varianza	SC	GL	MC	Valor p
Tratamiento (entre columnas)	2272213821	2	1136106910	p=0.0098
Residual (dentro de columnas)	617802515	6	102967086	
Total	2890016336	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-28.** Prueba post hoc para *Vd/F* de naringenina.

Prueba Tukey de comparación múltiple	Mean Diff.	Significant?	Valor p ajustado
ngn-free vs. ngn-mix	31769	Si	0.0202
ngn-free vs. ngn-tab	35356	Si	0.0125
ngn-mix vs. ngn-tab	3587	No	0.9034

Mean Diff.: diferencia media; Significant?: ¿es significativo?; ngn-free: naringenina libre; ngn-mix: naringenina en mezcla; ngn-tab: naringenina en tableta

**Tabla AT-29.** Prueba ANOVA para *CL/F* de naringenina.

Análisis de Varianza	SC	GL	MC	Valor p
Tratamiento (entre columnas)	23911438754	2	11955719377	p=0.0356
Residual (dentro de columnas)	11724601977	6	1954100329	
Total	35636040731	8		

SC: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; MC: Cuadrado medio

**Tabla AT-30.** Prueba post hoc para *CL/F* de naringenina.

Prueba Tukey de comparación múltiple	Mean Diff.	Significant?	Summary	Valor p ajustado
ngn-free vs. ngn-mix	103923	No	ns	0.0632
ngn-free vs. ngn-tab	114056	Si	*	0.0447
ngn-mix vs. ngn-tab	10133	No	ns	0.9578

Mean Diff.: diferencia media; Significant?: ¿es significativo?; ngn-free: naringenina libre; ngn-mix: naringenina en mezcla; ngn-tab: naringenina en tableta; \*: significativo; ns: no significativo



