

**Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas**

**Facultad de Química y Farmacia**

**Departamento de Farmacia**



**Tesis presentada en opción al grado científico de master en Ciencias Farmacéuticas**

**Título: Saco intestinal aislado para estudio in vitro de transporte de flavonoides**

**Autor: Boniface Kidega**

**Tutora: Dra.C. Leisy Nieto Reyes**

**Santa Clara, Cuba**

**2012**

## Dedicatoria

A mi familia

A mi Tu Lê

Por su ayuda, apoyo y ejemplo.

*“La naturaleza es el gran médico y el hombre posee a este en sí mismo”*

*Paracelso*

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios todo poderoso el haberme permitido llegar hasta estos momentos tan importantes en mi vida y culminar una de mis grandes metas. Él dispuso para mí la orientación de todas las personas en quienes encontré todo lo necesario para el desarrollo personal hasta ahora alcanzado.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado en cualquier forma durante la realización de todo el trabajo que culmina con la escritura de esta memoria.

Agradezco de manera especial a mis padres Kidega Severino Oywak, Lillian Kidega Amon por ser la mayor escuela y haber sido gran parte de mi formación en los inicios de mi vida y por entregarme todo su apoyo en los caminos que he elegido, y a mis hermanos Adyero Stella, Ouma Deo, Ocira Tony, Okumu seph y Amony Irene por haberme permitido ser el mayor.

*I am most grateful and enormously indebted to mum and family members for their love, support and encouragement during this period. They provided a lot of inspiration and zeal for me to work hard.*

En forma respectiva deseo agradecer a la profesora y mi tutora Dra.C. Leisy Nieto Reyes por su constante apoyo, dedicación, ayuda y liderazgo académico tanto para la realización de este proyecto como para hacerme sentir como en casa estando tan lejos. Si eres una gran tutora aún eres mejor persona. Gracias por todo.

Debo manifestar, mi agradecimiento a todos mis profesores por su sabiduría, comprensión y compartir sus experiencias y conocimientos que me ayudaron a crecer intelectualmente.

Quiero agradecer al Departamento de Farmacia por permitirme formar parte de su gran familia, por su amistad y cariño, por todos los hermosos momentos que pase junto a ustedes; los atesoro y los llevo en el corazón.

Por supuesto no me olvido del resto de compañeros que forman parte del departamento de relación internacional y de los que también guardo mis mejores recuerdos

En especial no podría concluir los agradecimientos sin dedicar este trabajo al amor de mi vida; Tu Lê Thi Câm, que poco a poco ha ido penetrando en mi corazón para quedarse a vivir en él. Aquí nos conocimos y aquí nos enamoramos.

Has vivido conmigo cada pequeño pasito que he ido avanzando en mi formación, y siempre has estado a mi lado, apoyándome, devolviéndome la confianza en mí misma cuando la pierdo, soportando mis cambios de humor, haciéndome sonreír y sobre todo queriéndome. Gracias por transmitirme tus inquietudes por la vida y por la ciencia, gracias por ser como eres y, gracias por compartir tu vida conmigo. Te quiero.

*“La felicidad es la suma de los pequeños momentos que tienes el privilegio de compartir con personas especiales”*

A todas aquellas personas que han pasado, cruzado por mi vida y me han dejado pasar por la de ellas, a todas las personas que están y que estarán. Gracias por Ser.

## GLOSARIO

BAMPA	Ensayo de permeabilidad en membranas biomimeticas artificiales
BBMV	Vesículas de membrana del borde en cepillo
BLMV	Vesículas de la membrana basolateral
CYP	Citocromo P450
CLAE	Cromatografía líquida de alta eficacia
KHB	Tampón Krebs-Henseleit
KRB	Tampón Krebs-Ringer
MeOH	Metanol
MDCK	Células epiteliales de riñón canino de Madin y Darby
MRP2	Transportador multifarmaco resistente asociado a proteina-2
MDR1	Transportador multifarmaco resistente asociado a proteina-1
PAMPA	Ensayos de permeabilidad en membranas artificiales
$P_{app}$	Coefficiente de permeabilidad aparente
QSAR	Relaciones Cuantitativas Estructura-Actividad
QSPR	Relaciones Cuantitativas Estructura-Propiedad
TEER	Resistencia eléctrica transepitelial
ABC	Área bajo la curva
$t_R$	Tiempo de retención

## RESUMEN

La *Boldoa purpurascens* Cav. (nitro blanco) ha sido utilizada tradicionalmente en Cuba como diurética, debido principalmente a los flavonoides presentes en los extractos acuosos y etanólico, sin embargo, no cuenta con los estudios de la absorción intestinal. El propósito del presente trabajo fue investigar la absorción intestinal de flavonoides mayoritaria de la *Boldoa purpurascens*. Se establecieron los parámetros cromatográficos para la cuantificación de Rutina y Quercetina en base a los patrones Rutina y Quercetina, presentes en extracto de las hojas de la especie por CLAE, utilizando columna- RP-18 Agilent Eclipse, 5  $\mu$ m, 4.6x150 mm; detector UV: 258 nm, flujo: 0,8 mL/min, inyección de 20  $\mu$ L, utilizando MeOH:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 % (60:40). como fase móvil. Los tiempos de retención para la Rutina y Quercetina fueron 2,7 y 4,7  $\pm$  0,5 min respectivamente. Se determinó la absorción de Quercetina, Rutina y el extracto de la *Boldoa purpurascens* Cav en diferentes segmentos de saco intestinal aislado *in vitro*. Los resultados muestran que en ambas la Rutina y Quercetina puede ser absorbido en diferentes segmentos intestinales, pero la absorción de Rutina fue significativamente menor que la Quercetina.

## ÍNDICE

GLOSARIO.....	iv
RESUMEN.....	v
ÍNDICE.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO.....	4
1.1. Aspectos generales de las plantas medicinales.....	4
1.1.2. Importancia de las plantas medicinales.....	5
1.1.2 Perspectivas sobre el uso de las plantas medicinales.....	6
1.2. <i>Boldoa purpurascens</i> .....	6
1.2.1 Generalidades de <i>Boldoa purpurascens</i> Cav.....	6
1.2.2 Descripción botánica de la especie.....	7
1.2.3 Hábitat: y Distribución geográfica:.....	7
1.2.4 Usos tradicionales y acciones farmacológicas.....	7
1.2.5 Composición química y actividad biológica.....	8
1.3 Flavonoides.....	8
1.3.1 Estructura química y Clasificación.....	9
1.3.2 Distribución y estado natural.....	9
1.3.3 Propiedades físicas.....	10
1.3.4 Actividad biológica.....	11
1.3.5 Farmacocinética.....	11
1.3.6 Estudios analíticos.....	12
1.3.6.i Linealidad.....	13
1.4 Absorción gastrointestinal.....	14
1.4.1 Lugares de absorción del tracto gastrointestinal.....	15

1.4.2 Mecanismos de absorción .....	15
1.4.2a Difusión pasiva .....	16
1.4.2b Mecanismos especializados de transporte. ....	16
1.4.3 Modelos experimentales para el estudio de la absorción intestinal .....	18
1.4.3 i Métodos <i>in silico</i> .....	18
1.4.3 ii Métodos <i>in vitro</i> .....	18
1.4.3 iii Métodos <i>in situ</i> .....	24
1.4.3 iv Métodos <i>in vivo</i> .....	25
1.4.4 Métodos de estudio de la permeabilidad intestinal .....	25
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
2.1. Equipos y reactivos .....	27
2.2 Condiciones experimentales.....	28
2.2 Determinación de parámetros de desempeño de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) .....	28
2.2.1. Establecimiento de los parámetros cromatográficos.....	28
2.2.2 Ensayo de linealidad .....	29
2.3 Procedimiento experimental de ensayos de absorción <i>in vitro</i> .....	30
2.3.1 Preparación de las disoluciones de estudio.....	30
2.3.2 Ensayos de absorción de saco intestinal .....	30
CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
3.1 Evaluación de las técnicas analíticas .....	33
3.1.1 Estudio de Linealidad.....	35
3.2 Ensayo de absorción <i>in vitro</i> .....	37
3.3 Absorción de la Quercetina en saco intestinal aislado. ....	38
3.3.1 Absorción de Quercetina a través de saco intestinal aislado.....	38
3.3.2 Estudio de la permeabilidad intestinal de la Quercetina.....	39

3.4 Absorción de la Rutina a través de saco intestinal aislado.....	40
3.4.1 Efecto de la concentración en la absorción de la Quercetina .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.5 Absorción de Quercetina y Rutina presentes en extracto alcohólico de la <i>Bolbo purpurascens Cav</i> .....	45
3.6 Interacción de la glicoproteína P (P-gp) con flavonoides .....	48
3.7 Interacción de MRP con flavonoides .....	49
CONCLUSIONES .....	51
RECOMENDACIONES.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
ANEXO	

## INTRODUCCIÓN

Los productos naturales y en particular las plantas medicinales, siguen constituyendo una fuente importante de nuevas moléculas de gran complejidad y especificidad, como lo demuestra el hecho de que gran parte del arsenal terapéutico internacional tiene su origen en ellas <sup>1</sup>. Se ha practicado la Medicina Tradicional desde los albores de la humanidad a través de tentativas y desaciertos, la que comprende la suma de todos los conocimientos y prácticas puedan ser explicados o no, empleadas en la prevención, diagnóstico y eliminación de desbalances físicos, mentales o sociales, obtenidas exclusivamente sobre la experiencia práctica y observación transmitidas de generación a generación, de forma oral o escrita <sup>2</sup>.

En la actualidad existe un reconocimiento del empleo de fuentes naturales de medicamentos y en especial de la fitoterapia, justificado en muchos casos por razones económicas, de residualidad o de disminución de los efectos tóxicos crónicos muy frecuentes en sustancias químicas puras, con una tendencia en los países desarrollados al "retorno del empleo de productos naturales en el tratamiento de diversas afecciones"; en lo que se destaca el importante papel de la Organización Mundial de la Salud (**OMS**), en cuanto a la utilización de la fitoterapia dentro de los programas de salud de los distintos países, a través de la validación de efectos etnobotánicos adjudicados a las plantas durante la existencia de la humanidad <sup>3</sup>. El 80% de la población mundial, más de cuatro mil millones de personas, utiliza las plantas como principal remedio medicinal, según nos señala la Organización Mundial de la Salud <sup>4</sup>. Esta práctica está asociada al empirismo en muchos casos, y faltan estudios químicos, preclínicos, clínicos y epidemiológicos que confirmen de forma fehaciente los efectos farmacológicos de las plantas y los principios activos responsables de estos efectos <sup>5</sup>.

Evidentemente Cuba país ubicado en la zona tropical, posee condiciones favorables para la existencia de una extensa y variada flora donde el 50% de las plantas son especies endémicas y posee una rica tradición en el uso de las plantas medicinales, lo que unido a las riquezas de su flora, ofrece ilimitadas posibilidades para el desarrollo de las investigaciones en el campo de la producción de fármacos; por tanto, es necesario enfocarlas hacia nuestras mayores necesidades y en la búsqueda de principios activos que sirvan de materia prima para la industria farmacéutica <sup>6</sup>.

Una de las especies de las plantas medicinales comúnmente utilizada por la población cubana es *Boldoa purpurascens* Cav, conocida como nitro blanco y usada en el tratamiento de afecciones renales. La actividad diurética de esta especie es atribuida, al menos en parte, a flavonoides presentes en la planta <sup>7</sup>.

Los flavonoides constituyen una de las subfamilias de polifenoles naturales a las que la comunidad científica ha dedicado más atención en los últimos años. Sus múltiples propiedades biológicas, observadas experimentalmente, y su abundancia en la dieta, junto con su presencia en numerosos remedios de la medicina tradicional, los convierten en posibles candidatos a explicar la asociación encontrada entre el consumo de determinados productos de origen vegetal y la disminución del riesgo de presentar determinadas enfermedades crónicas <sup>8</sup>, en la mayoría de casos el consumo es por vía oral.

La administración oral sigue siendo la vía más favorable y preferida, actualmente más de 60% de los fármacos son comercializados como productos orales. Sin embargo, muchos fármacos no pueden ser administrados efectivamente por esta vía en su forma original debido a razones de inestabilidad, baja permeabilidad membranal, pobre solubilidad y mecanismos de transporte *efflux* <sup>9</sup>.

Han sido estudiadas las actividades antioxidantes y antiinflamatorias de los extractos ricos en flavonoides de las partes aéreas de *Boldoa purpurascens* Cav, pero no se ha demostrado científicamente la absorción intestinal de la misma para los nuevos flavonoides aislados <sup>7</sup>.

Consecuentemente la magnitud de absorción de un fármaco *in vivo* puede ser investigada basada en la medida de permeabilidad *in vitro*, pues representa una parte esencial en la predicción de la biodisponibilidad oral de cualquier nuevo fármaco <sup>10</sup>. Se han desarrollado diferentes métodos experimentales para determinar la absorción intestinal de los fármacos (*in silico*, *in vitro*, *in situ* e *in vivo*) con el objetivo fundamental de predecir absorción intestinal y definir el mecanismo involucrado en dicho proceso <sup>11</sup>.

Hasta este momento, los estudios predictivos de absorción oral se desarrollan mediante distintas técnicas que requieren la utilización de animales de experimentación. Los modelos *in vitro* resultan una buena alternativa frente a los métodos existentes ya que permiten la determinación rápida de la permeabilidad y metabolismo de los fármacos, bajo condiciones controladas, capaz de mantener las características de absorción, transporte y actividad metabólica a un nivel análogo al que presentan las células intestinales *in vivo*, así como reducir y en ocasiones reemplazar la experimentación animal <sup>12</sup>. Los estudios de permeabilidad resultan esenciales para obtener información acerca de la capacidad de absorción del fármaco disuelto y en consecuencia poder establecer las vías de administración más apropiadas y seleccionar la forma del compuesto que ofrece mejores características potenciales de absorción.

En el departamento de Farmacia de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV), se logró a partir de extractos de la planta *Boldoa purpurascens* Cav aislar flavonoides de los cuales no se tenían referencias anteriores, y algunos ya conocidos, por lo que resulta necesario estudiar los perfiles

de absorción de los mismos, contenidos en la mezcla del extracto de la planta, razón por la cual se plantea el siguiente problema científico:

### **Problema científico**

No se dispone, en el departamento de Ciencias farmacéuticas de la UCLV, de una metodología que permita el estudio de transporte intestinal de flavonoides, con vistas al desarrollo de estudios biofarmacéuticos de extractos vegetales que los contengan.

### **Hipótesis**

Es posible desarrollar la metodología de saco intestinal aislado *in vitro*, con las condiciones de laboratorio del departamento de Ciencias farmacéuticas de la UCLV, que permite el estudio de mecanismos de transporte de flavonoides contenidos en extractos vegetales.

Para comprobar dicha hipótesis se propusieron los objetivos siguientes:

### **Objetivo general**

Implementar una metodología de estudio *in vitro* de transporte, mediante saco intestinal aislado, para la caracterización biofarmacéutica de flavonoides.

Dicho objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos específicos:

### **Objetivos específicos**

1. Desarrollar la técnica de cuantificación de flavonoides, Rutina y Quercetina, por cromatografía líquida de alta eficacia.
2. Establecer las condiciones experimentales, para el estudio de transporte de flavonoides, Rutina y Quercetina, **reactivo químico**, a través de la metodología de saco intestinal *in vitro*
3. Desarrollar la metodología de saco intestinal *in vitro* con un extracto vegetal de *Bolbo purpurascens* Cav con vistas a comprobar el transporte de flavonoides, Rutina y Quercetina, contenidos en el mismo.

## CAPITULO I. ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO

### 1.1. Aspectos generales de las plantas medicinales.

Desde hace mucho tiempo el ser humano, por la misma necesidad de supervivencia, ha recurrido al uso y provecho de las plantas, poco a poco se han ido descubriendo las propiedades curativas de las mismas. Las plantas medicinales han sido utilizadas para el tratamiento de distintas enfermedades desde la presencia de los primeros seres humanos hasta nuestros días, basándose en observaciones y en experiencias. Las plantas usadas en la actualidad eran ya conocidas 5000 años antes de Cristo en la farmacopea egipcia y mesopotámica <sup>3</sup>.

En la actualidad, el uso de las plantas medicinales ha cobrado importancia; los estudiosos han dedicado tiempo y esfuerzo para conocer y profundizar el valor curativo que representan. Los productos naturales han sido la principal fuente de agentes terapéuticos de la humanidad durante siglos, no solo para tratar padecimientos ya existentes, si no también para prevenir la aparición de los desórdenes de la salud; esto, fundamentalmente guiado por la existencia de numerosas evidencias de su actividad terapéutica y porque en la mayoría de los casos, son más seguros en función de presentar menores contraindicaciones y efectos secundarios, que los encontrados en los productos de síntesis <sup>13</sup>. El estudio de las plantas medicinales ha ganado importancia. Los países en vías de desarrollo han enfocado sus investigaciones principalmente en la obtención de medicamentos a partir de los diferentes compuestos extraídos de plantas medicinales autóctonas que no han sido estudiadas <sup>3</sup>.

Plantas medicinales. Son aquellos vegetales que elaboran unos metabolitos secundarios, llamados «principios activos», sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo. Su utilidad primordial, a veces específica, es servir como droga o medicamento que alivie las enfermedades o restablezca la salud perdida. Constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies existentes, un 14,5% de éstas <sup>2</sup>.

En Cuba, la introducción de la Medicina Tradicional comienza en el siglo XV, primero por la colonia española contando con la importante contribución de los esclavos venidos de África y los chinos que arribaron fundamentalmente a finales del siglo XVIII. No es hasta mediados del siglo XX que alcanza su máxima expresión con el insigne Doctor Juan Tomás Roig, quién identificó 595 especies de plantas medicinales empleadas por la población cubana para diferentes usos curativos e hizo un llamado a la comunidad científica nacional para que se estudiaran las mismas con el objetivo de comprobar su seguridad y eficacia, planteando además la necesidad de desarrollar la industria nacional <sup>5</sup>.

Los estudios etnobotánicos han tomado una gran relevancia en los últimos años, ya que varias compañías farmacéuticas están interesadas en las plantas como un gran potencial para la obtención de fármacos de origen natural útiles en el tratamiento de las enfermedades que más afectan a las comunidades. Cada día se presta más atención al estudio de las especies medicinales de manera tal que la etnobotánica, la fitoterapia y la fitoquímica están tomando un auge, tanto en la práctica de la medicina complementaria como en el ámbito académico <sup>14</sup>.

### **1.1.2. Importancia de las plantas medicinales**

Desde siempre, las plantas han jugado un papel fundamental en el tratamiento de las enfermedades. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estima que el 80% de los habitantes de países en desarrollo, depende de la medicina tradicional, principalmente de plantas, para atender sus necesidades de salud <sup>4, 15</sup>.

Además, en todo el mundo existe un interés creciente en las plantas medicinales, lo cual se refleja en el hecho de que en países desarrollados la población usuaria de productos herbolarios es de alrededor del 60% <sup>4</sup> y el monto de las ventas de estos productos, a nivel mundial alcanza los 100 mil millones de dólares <sup>16</sup>. El interés también se debe a que en la actualidad se presenta un resurgimiento de enfermedades que se creían erradicadas como la malaria y la tuberculosis, así como la creciente incidencia del cáncer y la aparición de nuevas enfermedades como el SIDA y el síndrome agudo respiratorio (SARS), por lo que es necesario y urgente intensificar la búsqueda de nuevas sustancias para el tratamiento de estos problemas de salud, particularmente en las plantas, teniendo como guía el conocimiento tradicional que poseen los pueblos indígenas, los campesinos y en general la gente que vive en el medio rural. Esta es una estrategia bien fundamentada, ya que se ha demostrado que la posibilidad de detectar bioactividad en plantas es mayor si para los bioensayos se seleccionan remedios herbolarios tradicionales, en cuyo caso muestran actividad del 20 al 60% de los extractos probados; en contraste, si la selección de especies a probar es al azar, sólo el 5% de los extractos son activos <sup>17</sup>. El valor que tienen las plantas de uso medicinal pone en evidencia de que al menos 119 medicamentos importantes, como la vinblastina y la vincristina, alcaloides usados en quimioterapia para el tratamiento de la leucemia pediátrica y la enfermedad de Hodgkin, son derivados de 90 especies de plantas, la mayoría de las cuales se usan en medicina tradicional <sup>6</sup>; además poco más del 25% de los medicamentos alopáticos contienen por lo menos una sustancia de origen vegetal. Todos estos datos reflejan la importancia que tienen estos recursos vegetales, pero su potencial es mayor si se considera que la basta mayoría de las especies que componen la flora mundial no se ha investigado, sólo se ha estudiado químicamente o farmacológicamente una pequeña fracción de la flora que va del 5 al 15 % <sup>18</sup>.

Por otra parte, el interés actual por la herbolaria, como se conoce a la práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales, continúa vigente y tiene gran arraigo en nuestro país y en otros, debido a una creciente insatisfacción hacia la medicina convencional. En esto también influye el aspecto económico (precios más bajos en la herbolaria) y la tendencia, cada vez más evidente en ciertos sectores de la población, de reencontrar valores y de adoptar modos de vida más “naturales”<sup>19</sup> Además de ser significativamente más barata, la medicina indígena está localmente disponible y es usualmente más fácil de aceptar por los pueblos locales.

### **1.1.2 Perspectivas sobre el uso de las plantas medicinales.**

En el mundo creció el interés por las terapias alternativas y/o complementarias que se utilizan en lugar de o conjuntamente con la medicina convencional. Es decir, además de los fármacos derivados de plantas que se comercializan a través de la industria farmacéutica, existe un mercado de hierbas medicinales que se venden como suplementos dietarios o “medicinas naturales o tradicionales” que se encuentra en expansión. Si bien en muchos países pobres de África y Asia no tienen otra opción que usar medicinas naturales, los tratamientos con este tipo de fármacos se han convertido en una alternativa en muchos países ricos.

El conocimiento sobre la medicina tradicional en el tratamiento de enfermedades, es una práctica empírica que se ha llevado a cabo desde tiempos ancestrales, sin embargo estas prácticas han sufrido profundas transformaciones y los valores que la población tiene en relación con las plantas, están desapareciendo con vertiginosa rapidez.

En la actualidad, el uso de las plantas medicinales disminuye gradualmente, al mismo tiempo que el conocimiento tradicional se ve afectado por la revolución científica, perdiéndose gran parte del legado cultural. Este hecho es generado por diversas causas de tipo socioeconómico, que afectan la continuidad y la reproducción de los conocimientos tradicionales. Se estima que dentro de las mayores causas de pérdida cultural en conocimiento tradicional se encuentran la poca valoración respecto al uso de las plantas medicinales<sup>20</sup>.

## **1.2. *Boldoa purpurascens***

### **1.2.1 Generalidades de *Boldoa purpurascens* Cav**

*Boldoa purpurascens*, Cavanilles ex Lag. Es conocida comúnmente en nuestro país como nitro blanco o tostón y se le conoce también con las sinonimias: *Boldoa ovatifolia* Lag, *Cryptocarpus globosus* H.B.K, *Salpianthus purpurascens* Hook & Arn.<sup>21</sup>. Dentro del género abordado existen aproximadamente siete especies conocidas: *Boldoa arenareus*, *Boldoa lanceolata* var. *Macrodonia*, *Boldoa ovatifolia*, *Boldoa paniculata*, *Boldoa repens* y *Boldoa purpurascens*<sup>22</sup>.

### 1.2.2 Descripción botánica de la especie

*Bolbo purpurascens*, Cav. ex Lag es una yerba de un metro o poco más de altura, con tallo erecto, ramoso y las ramas delgadas, angulosas, lampiñas. Hojas alternas, pecioladas, anchamente ovales, agudas, enteras, con base subtruncada y decurrente en el pecíolo; lampiñas de color verde claro; flores verdosas, pequeñas, sésiles, conglomerado racemosas. El cáliz es fructífero, pubescente, cuadridentado en el ápice. Presenta cuatro estambres, con hipoginos libres, anteras biloculares, dídimas. Los ovarios son ovoideos, sésiles. Los estilos son simples, adelgazándose insensiblemente hasta terminar en el estigma aleznado, agudo. Aquenio comprimido, apeciado. Embrión subanular, endospermo carnosofarináceo Fruto de 1,5 mm de diámetro, semilla negra lustrosa <sup>23</sup>. Las hojas de la planta y los aspectos taxonómicos más importantes pueden apreciarse en el anexo 1.

### 1.2.3 Hábitat: y Distribución geográfica:

El Nitro blanco es una hierba o arbustillo silvestre que crece en terrenos de serpentina y calcáreos. En Cuba florece de diciembre a mayo, las hojas alcanzan su mayor tamaño en los meses de junio y julio y es abundante en las cercanías de La Habana, Guanabacoa y también cerca de la costa de Jaimanita y Marianao, de igual forma se encuentra distribuida en otros lugares del país, entre los cuales podemos citar la parte norte de Villa Clara. Además se le puede encontrar en países tales como México, Venezuela, Nicaragua, Costa Rica y Guatemala. Es una planta poco conocida por la población y quizás a eso se deba los escasos estudios que posee <sup>7</sup>.

### 1.2.4 Usos tradicionales y acciones farmacológicas

Las hojas de *Bolbo purpurascens* Cav. (Nitro) se emplean en medicina tradicional en Cuba en forma de decocciones acuosas para el tratamiento de afecciones renales con buenos resultados <sup>6</sup>. Se reportan usos tradicionales de la planta empleando una dosificación de dos o tres hojas hervidas en agua durante 5 minutos suficientes para obtener una taza de cocimiento, el cual puede tomarse varias veces al día, sin embargo, no se han desarrollado estudios farmacológicos con una administración continuada que justifiquen esta forma de uso <sup>23</sup>. Estudios recientes mostraron que los extractos de esta planta poseen elevada actividad diurética ayuda a expulsar cálculos, útil en las enfermedades de las vías urinarias <sup>7</sup>. La actividad diurética de *Bolbo purpurascens* Cav tras su administración oral única ha sido comprobada en estudios preclínicos <sup>6</sup>. Por definición los diuréticos son fármacos que estimulan la excreción renal de agua y de electrolitos por lo que son utilizados para regular tanto el volumen como la composición del medio interno en diferentes afecciones como la hipertensión, insuficiencia cardíaca, síndromes nefróticos, entre otros <sup>20</sup>.

Análogamente, distintos estudios de experimentación realizados han corroborado otras de las posibles indicaciones atribuidas a esta planta, como son

- Actividad antibacteriana <sup>6</sup>
- Toxicidad aguda de un extracto acuoso <sup>1</sup>
- Estudio de la actividad hemolítica <sup>24</sup>

### 1.2.5 Composición química y actividad biológica

Se demostró que esta planta presenta en su composición un predominio de ácidos grasos como el palmítico, el esteárico, el oleico, el mirístico y el pentadecanoico entre sus metabolitos secundarios, además de poseer triterpenos y esteroides, saponinas, fenoles y/o taninos, flavonoides y grupos aminos <sup>25</sup>. Además de poseer estos componentes, el alto contenido de potasio presente en sus cenizas (1%) pueden ser los responsables de la potente actividad diurética, comparable con la furosemida <sup>6</sup>.

Se comprobó que el extracto acuoso de las hojas de *Boldoa purpurascens* Cav tiene actividad diurética similar a la furosemida, pues es capaz de eliminar una orina abundante y diluida; además tiende a conservar los niveles normales de agua y sales en el medio interno <sup>7</sup>, comprobándose dicha acción para nuevos compuestos de tipo flavonoides aislados y caracterizados a partir de este extracto.

De igual forma se evaluó la actividad antibacteriana de un extracto acuoso al 5; 8; 10 y 20% de las hojas de *Boldoa purpurascens* Cav frente a cepas de bacterias de los géneros *Escherichia*, *Klebsiella* y *Proteus*, obtenidas a partir de urocultivos humanos, no detectándose efecto antimicrobiano del extracto, ya que en ningún cultivo mostró halo de inhibición, a pesar de que el extracto se aplicó en concentración elevada (20%), mucho mayor a la empleada por la población. Otro tipo de metabolito de interés que se encuentra en esta especie son las saponinas <sup>6</sup>

### 1.3 Flavonoides

El primer flavonoide fue identificado en 1930 por el premio Nobel de Fisiología y Medicina Szent-Györgyi, quien aisló de la cáscara de limón una sustancia, la citrina, que probó regular la permeabilidad de los capilares al ser consumida, aunque probablemente la primera vez que se describió a los flavonoides fue cuando Robert Boyle en 1664 hizo una primera descripción de los efectos de los pigmentos de las flores en medio ácido y en medio básico <sup>26</sup>.

La búsqueda de principios activos dentro de los flavonoides tiene, desde el punto de vista farmacológico, algunas ventajas respecto a otros grupos de compuestos naturales. La más importante es la uniformidad de la configuración química de toda la familia, de modo que las relaciones entre estructura y actividad son más fáciles de establecer. Por otro lado, la disponibilidad de las moléculas flavónicas y la relativa facilidad de su obtención por síntesis favorecen la evaluación de sus propiedades <sup>27</sup>.

### 1.3.1 Estructura química y Clasificación

Los flavonoides fueron descubiertos por el premio nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cascara de limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares sanguíneos. Los flavonoides se denominaron en un principio vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C (por que se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950 <sup>28</sup>.

En las plantas, los flavonoides se encuentran en estado libre o en forma de heterósidos, que es lo más frecuente. Estos heterósidos son generalmente solubles en agua, mientras que sus geninas o agliconas, parte no azucarada del heterósido lo son sólo ligeramente. Estructuralmente, los flavonoides se caracterizan por poseer un esqueleto difenilpropano  $C_6-C_3-C_6$ , donde los componentes  $C_6$  son anillos aromáticos unidos por tres átomos de carbono que pueden formar o no un tercer anillo pirano o pirona (anillos A-C). Las distintas clases de flavonoides se diferencian en la concentración de saturación y en los sustituyentes del anillo C (Anexo 2), mientras que los compuestos individuales, dentro de cada uno de estos grupos, se distinguen por la diferente sustitución de los anillos A y B. De esta forma, se han identificado hasta 4.000 compuestos diferentes <sup>8</sup> Se pueden distinguir entre compuestos que poseen un radical cetónico en el heterocido: flavonas, flavonoles, flavanonas (dihidroflavonas) y calconas, y los que no lo poseen: flavanoles y antocianidinas. La existencia de un hidroxilo en posición 3 es otra característica común a antocianidinas, flavanoles y flavonoles. Dentro de cada uno de estos grupos los compuestos se diferencian entre sí por los sustituyentes en el anillo B y por los sustituyentes en los diferentes hidroxilos de la molécula (metilos, azúcares y/o ácidos orgánicos, más habitualmente).<sup>29</sup>. Tres características estructurales son importantes para su función: La presencia en el anillo B de la estructura catecol u O-dihidroxi, la presencia de un doble enlace en posición 2,3, la presencia de grupos hidroxilo en posición 3 y 5 <sup>29-30</sup>.

### 1.3.2 Distribución y estado natural

Los flavonoides se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas verdes (especialmente las angiospermas), y sólo algunos pocos se han detectado en hongos y algas. Se han encontrado en las diferentes partes de las plantas, especialmente en las partes aéreas; y se les encuentra en forma libre (también llamados agliconas flavonoides), como glicósidos (la mayoría de las veces), como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros <sup>31</sup>. Los glicósidos pueden ser de dos clases: con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) es decir como O-glicósidos; o con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C, es decir como C-glicósidos. De todas estas

formas naturales, los O-glicósidos son los más comunes de hallar. Las antocianinas por su parte se encuentran como sales principalmente en flores, frutos y tejidos con coloraciones que van del rojo hasta el violeta y el azul <sup>27</sup>.

La presencia de los flavonoides en la naturaleza y sus potenciales beneficios en la salud humana ha consitado un creciente interés en su estudio, prueba de ello son las numerosas publicaciones que hay sobre actividad biológica de estos componentes <sup>28</sup>.

### 1.3.3 Propiedades físicas

En las plantas, los flavonoides se encuentran en estado libre o unido a azúcares formando heterósidos, que es lo más frecuente, debido a que les confiere mayor estabilidad química. Los azúcares que aparecen unidos con más frecuencia a las geninas son la D-glucosa, la D-galactosa, la L-ramnosa, la L-arabinosa, la D-xilosa y el D-ácido glucurónico. Pueden aparecer como O-heterósidos (con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno) o como C-heterósidos (con los carbohidratos ligados a través de enlaces C-C). De todas estas formas naturales, los O-glicósidos son los más comunes <sup>27</sup>.

Las propiedades físicas dependen de la clase de flavonoide considerado y su forma (libre, glicósido ó sulfato), Anexo 3 de los patrones. Por ejemplo las flavonas, flavonoles y auronas, debido al sistema conjugado son compuestos sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo. Las antocianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul. Las flavanonas y flavanonoles debido al carbono quiral C-2 presentan el fenómeno de la rotación óptica. Los glicósidos son en general sólidos amorfos, mientras que las agliconas y los altamente metoxilados son cristalinos <sup>31</sup>.

La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes. Los glicósidos, las antocianidinas y los sulfatos son solubles en agua y alcohol. Las agliconas flavonoides altamente hidroxiladas son solubles en alcohol (etanol, metanol y n-butanol), mientras que las poco hidroxiladas lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona. Las agliconas flavonoides altamente metoxiladas son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo.

Los flavonoides con hidroxilos fenólicos son solubles en soluciones alcalinas, pero algunos altamente hidroxilados se descomponen por acción de las bases fuertes, un hecho que permite reconocerlos y diferenciarlos de otros, y que hace años se utilizó para su elucidación estructural <sup>31</sup>. Los glicósidos flavonoides son sólidos amorfos que se funden con descomposición, mientras que las correspondientes agliconas son sólidos cristalinos.<sup>31</sup>

### 1.3.4 Actividad biológica

La importancia del papel que desempeñan en la naturaleza ha permitido que hayan permanecido durante la evolución, haciendo posible el extraordinario rango de actividades farmacológicas y bioquímicas que manifiestan en mamíferos y otros sistemas celulares.

La acción farmacológica es también extensa y variada, son bien conocidas sus actividades contra la fragilidad capilar (bioflavonoides del género *Citrus*: Rutina y derivados), dilatadoras de las coronarias (proantocianidinas de *Crataegus*, *Amica* y *Gingko*), espasmolítica (glicósidos de apigenina), antihepatóxica (silimarina de *Silybum*), colerética, estrógeno y diurética<sup>32</sup>. La actividad antimicrobiana de flavonoides prenilados y otros fenoles y la acción fungitóxica de isoflavonas, como las de algunas especies de *Lupinus*. Como diurético y antiséptico de las vías urinarias (*Bolbo purpurascens*, Cav. ex Lag). Propiedades giardicas de las especies *Cuphea pinetorum*, *Geranium mexicanum*, *Helianthemum glomeratum* y *Rubus coriifolius*<sup>7,33</sup>.

### 1.3.5 Farmacocinética

Los flavonoides son compuestos no lipofílicos y, en adición, la presencia de los grupos fenólicos tanto los conjugados sulfatados como los glicosilados, facilitan su eliminación<sup>27</sup>. Antes de ser absorbido un flavonoide es escindido, dando como resultado, por una parte su aglicona y por otro su glicósido; teniendo este último mayor solubilidad en agua, por lo que se absorbe rápidamente. Sin embargo la aglicona puede tardar hasta tres horas en ser absorbida. Por lo que en promedio las concentraciones pico de los flavonoides se observa a las 1,75 horas. Consiguen una distribución homogénea en todos los tejidos corporales. Incluso logran atravesar la barrera hemato-encefálica; permitiendo mayor paso, por supuesto, a los flavonoides más lipofílicos (como la naranjina) y su transportación hacia los receptores<sup>34</sup>.

Los flavonoides sufren metabolismo de primer paso y sus metabolitos, excretados por la bilis, aunque se reabsorben ya no tienen funcionalidad, logrando una biodisponibilidad del 1,5% en comparación con la administración intravenosa, es decir:  $F = 0,015$ <sup>35</sup>. Es intensa la transformación de los flavonoides, llevándose a cabo en dos sitios: (1) hígado, por medio de reacciones de biotransformación de fase I, en las que se adicionan o exponen grupos polares; (2) colon, mediante la fase II de la biotransformación, en donde la microbiota intestinal degrada los flavonoides no absorbidos<sup>34-35</sup> y son conjugados con glicina, ácido glucurónico y sulfatados<sup>36</sup>

La excreción se sucede después de que se forman estos conjugados y por dos mecanismos. Los no solubles en agua se excretan junto con la bilis al duodeno, y los solubles por la vía urinaria con la orina, siendo esta última la excreción predominante<sup>34</sup>. Pero al final lo que importa es la ruta por la cual

se metabolizaron; pues si un flavonoide sólo es glucuronidado se excretará por vía renal (como la catequina), pero si es metilado y sulfatado será excretado por la vía hepática (como la Quercetina) <sup>30</sup>.

### 1.3.6 Estudios analíticos

#### **Técnicas analíticas empleadas para la determinación y cuantificación de flavonoides en plantas medicinales.**

Es conocido que los métodos analíticos, constituyen herramientas imprescindibles para el desarrollo del control de la calidad, estudios de estabilidad y biofarmacéuticos de los ingredientes activos, y de las diferentes formas farmacéuticas diseñadas a partir de ellos. En el caso particular de los estudios analíticos aplicados a los productos farmacéuticos de origen vegetal, se requiere de técnicas muy específicas y sensibles para su implementación, debido a la alta complejidad de las muestras; que presentan gran variedad en sus composiciones y las bajas concentraciones de los metabolitos presentes <sup>37</sup>.

Numerosas técnicas analíticas se emplean en la identificación y caracterización estructural de las variadas estructuras flavonoides presentes en la naturaleza. La combinación de la cromatografía en capa delgada, la espectroscopía ultravioleta visible, la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masa aportan evidencias de incuestionable valor en este sentido. Como características generales de estos compuestos debemos su carácter fenólico y su intensa absorción en la región ultravioleta y visible del espectro debido a la presencia de sistemas aromáticos y conjugados <sup>7</sup>.

Con el objeto de analizar cualitativa y cuantitativa los flavonoides pueden detectarse en una cromatografía en capa delgada por el color que desarrollan en el espectro Visible (Vis) o en Ultravioleta (UV); debido a la relación que existen entre los colores y la posible estructura del flavonoide. Los espectros de los flavonoides son determinados usualmente en solución metanólica. El espectro típicamente consiste de dos máximos de absorción en los rangos de 240-285 nm y 300-550 nm. La variación de estos rangos depende del modelo de hidroxilación y del grado de sustitución de los hidroxilos. La reacción de flavonoides con sales metálicas como el cloruro de aluminio actúa como excelente catalizador para la reacción de cloración <sup>32</sup>.

Los espectros UV de los flavonoides en metanol presentan bandas características debidas a los sistemas conjugados de los anillos aromáticos. Las flavonas y flavonoles muestran dos bandas definidas: La banda I, de mayor longitud de onda en el rango 300-390 nm asociada con la funcionalidad cinamoilo, y la banda II, entre 250-280 nm debida al anillo aromático A (funcionalidad benzoilo), aunque a veces se observan otras bandas de absorción. La posición de la banda I depende

del tipo de flavonoide: las flavonas la muestran en 310-350 nm, los flavonoles 3-O-sustituidos en 330-360 nm, y los flavonoles en 350-385 nm<sup>31</sup>.

La técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (CLAE) es un método que permite separar en forma eficiente los flavonoides presentes en los extractos alcohólicos de la planta estudiada. Un volumen de la muestra previamente filtrada con un filtro de teflón con el objeto de eliminar las impurezas solubles en metanol que pudiera dañar la columna es inyectada a un flujo controlado por una bomba peristáltica, a temperatura ambiente y con una longitud de onda de detección a 330 nm utilizando un detector UV-visible. La longitud de onda es elegida de acuerdo a los espectros de absorción de las muestras y estándares y a la comparación de las alturas, separaciones y resoluciones de los picos que permiten una buena identificación y cuantificación de los flavonoides en las corridas cromatográficas<sup>35b</sup>.

La cromatografía en fase reversa se caracteriza por tener una columna cromatográfica con una fase estacionaria no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo, y la fase móvil es relativamente polar (agua, metanol, acetonitrilo). En la fase reversa los componentes más polares aparecen primero, y un aumento de la polaridad de la fase móvil acorta el tiempo de retención<sup>38</sup>. La interacción que se produce es según la polaridad de los componentes de la muestra; el componente más polar eluye con la fase móvil saliendo primero y el componente menos polar eluye al final<sup>39</sup>.

### **Linealidad.**

La linealidad es la capacidad del procedimiento analítico para obtener resultados de ensayos que sean directamente proporcionales a la concentración de un analito en la muestra dentro de un rango dado.

Se elaboran rectas de calibración, que abarcan el ámbito de concentraciones necesario para valorar las muestras por interpolación. Las diluciones de patrón correspondientes para la curva de calibración se someten al mismo tratamiento que las muestras experimentales a valorar. Se realiza una regresión lineal entre las áreas del cromatograma obtenidas y las concentraciones teóricas de acuerdo con la ecuación 1<sup>38, 40</sup>.

$$y = mx + b \quad (1)$$

Donde  $y$  área del pico del cromatograma y  $x$  a la concentración de patrón. Puede expresarse como la pendiente de la línea de regresión y su varianza o como el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y el coeficiente de correlación ( $r$ ).

Este estudio se efectuará sobre muestras que contengan concentraciones crecientes de analito. Se evaluarán los datos estadísticamente a fin de verificar la linealidad según se describe a continuación:

Coefficiente de correlación (r): refleja el grado de relación entre las variables X (concentración), y la variable Y (la respuesta), ecuación 10. Su valor máximo es 1. Si (r) es cercano a 0, el ajuste es pobre y la relación es débil, por lo tanto se considera que no existe; si r es cercano a la unidad, entonces el ajuste es bueno siendo esto un indicativo de una fuerte relación entre X e Y, es decir, existe correlación con una probabilidad elevada.

### **Eficiencia de una Columna.**

Para lograr una buena separación, aún cuando se tenga un factor de selectividad alto para estos picos en una columna particular, se deben tener en cuenta los factores que afectan el ancho de un pico para la separación cromatografía. Es decir que mientras mayor es la capacidad de la columna de producir picos más estrechos mayor es su eficiencia.

La anchura de una banda aumenta a medida que se mueve a través de la columna, debido a que cuanto más tiempo transcurre mayor es la dispersión que puede tener lugar. Por ello la anchura de la zona está relacionada directamente con el tiempo de residencia en la columna, e inversamente con la velocidad a la que fluye la fase móvil <sup>40</sup>.

Se utilizan dos términos afines con frecuencia como medida cuantitativa de la eficiencia de una columna cromatográfica: la altura equivalente de plato teórico o H y el número de platos teóricos N. Los dos están relacionados por la ecuación 2.

$$N = \frac{L}{H} \quad \text{Donde L: longitud del relleno de la columna (cm).} \quad (2)$$

La eficacia de la columna cromatográfica aumenta cuando mayor es el número de platos, y cuando menor es la altura de plato. La evaluación experimental de H y N se puede realizar a partir de la siguiente ecuación 3.

$$H = \frac{LW^2}{16t_R^2} \quad \text{Donde L: longitud de la columna, W: ancho del pico a considerar, } t_R: \text{ tiempo de retención.}$$

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (3)$$

### **1.4 Absorción gastrointestinal**

El intestino delgado constituye el lugar fundamental para la absorción de nutrientes y fármacos administrados por vía oral. No obstante, en algunos casos, y en función de sus características, pueden absorberse también en el colon y en el estómago <sup>12c</sup>. La absorción es un proceso farmacocinético que comprende el ingreso de la molécula de fármaco al organismo, desde su sitio de administración inicial, a través de una membrana biológica, hasta alcanzar la circulación sistémica.

### 1.4.1 Lugares de absorción del tracto gastrointestinal.

Morfológicamente el tracto gastrointestinal se compone de tramos bien diferenciados: esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso y recto. Aunque la absorción puede producirse en todos los tramos, el intestino delgado está especializado en esta función. Las características morfológicas de la mucosa del intestino delgado corresponden a las funciones altamente especializadas en la absorción que realiza. La característica más sobresaliente son las numerosas estructuras morfológicas, encaminadas a aumentar su superficie, y por tanto, su capacidad de absorción mediante difusión pasiva

Así, destaca la presencia de las modificaciones que se desarrollan a partir de la estructura cilíndrica fundamental <sup>41</sup>; Válvulas conniventes o pliegues de Kerkring que se extienden de forma circular en la superficie de la mucosa, y están especialmente desarrollados a nivel de duodeno y yeyuno. Recubriendo la superficie del intestino delgado, se encuentran las vellosidades intestinales que incrementan el área de absorción. Cada vellosidad es una proyección en forma de dedo de 0,5-1  $\mu\text{m}$  de longitud. Cada vellosidad intestinal contiene una red de capilares y un vaso linfático y se encuentra recubierta de células epiteliales, fundamentalmente de enterocitos con función de absorción de nutrientes, Anexo 4 <sup>42</sup>.

Las células del epitelio intestinal presentan uniones estrechas entre ellas, haciendo del epitelio una barrera defensiva frente a la penetración de microorganismos e impiden que las proteínas de transporte, naturalmente presentes en las membranas apical y basolateral del enterocito, migren, cumpliendo así una función importante en el mantenimiento de la polaridad funcional del enterocito <sup>43</sup>.

El epitelio presenta numerosas proteínas transportadoras que son indispensables para la incorporación de nutrientes y el mantenimiento de la homeostasis. Estos constituyentes son un punto clave en la comprensión del fenómeno de la absorción. Por ende, es muy relevante comprender los mecanismos de transporte de las moléculas de fármacos a través de las membranas biológicas, las que constituyen barreras a su paso a través de las células de los distintos tejidos.

### 1.4.2 Mecanismos de absorción

La absorción de los xenobióticos a través del tracto gastrointestinal se realiza por varios mecanismos que permiten su entrada al torrente sanguíneo <sup>44</sup>. La absorción intestinal de cualquier xenobiótico depende, por una parte de sus características físico-químicas, de las características químicas y dinámicas, se esquematiza en el anexo 5. Los mecanismos de absorción a través de la membrana de las células que forman el epitelio de la mucosa son básicamente de dos tipos: Difusión pasiva, Mecanismos especializados de transporte, entre los que se distingue; transporte activo y transporte

facilitado. La absorción de cualquier sustancia puede incluir uno de los mecanismos citados o la combinación de los mismos como se muestran en anexo 6.

#### **1.4.2a Difusión pasiva**

La absorción por difusión pasiva es el proceso predominante en la absorción de sustancias. Se caracteriza por realizarse siempre a favor de gradiente de concentración y sin consumo de energía. Engloba dos tipos principales de procesos o rutas:

*Ruta transcelular:* difusión a través de membranas lipóideas. Consiste en un reparto de las moléculas de soluto entre el fluido del lumen intestinal y la bicapa lipídica que forma la membrana celular, de tal modo que las moléculas se desplazan desde la zona donde se encuentran más concentradas hasta aquella donde la concentración es menor.

*Ruta paracelular:* Paso a través de los poros acuosos de la membrana. Ocurre a través de los poros acuosos de la membrana y/o los espacios intercelulares, es decir, entre las aberturas que dejan las uniones entre las células columnares adyacentes. En este caso, la difusión es una función inversa del tamaño molecular del fármaco. En general esta vía queda restringida a los solutos de bajo peso molecular e hidrofilia elevada <sup>45</sup>.

#### **1.4.2b Mecanismos especializados de transporte.**

Los mecanismos especializados de transporte dependen de la existencia de estructuras, generalmente proteicas, capaces de transportar el soluto de una cara a otra de la membrana. El transporte se caracteriza por la unión específica entre la sustancia y la proteína, cuya translocación provoca el paso del compuesto a través de la membrana <sup>46</sup>.

#### **Transportadores**

Los transportadores de membrana se encuentran en numerosos epitelios; entre ellos la membrana intestinal, que se caracteriza por gran riqueza y diversidad de los mismos. En concreto, el intestino delgado presenta numerosas estructuras que actúan como transportadores específicos de sustancias tales como nutrientes (azúcares, vitaminas, aminoácidos y ácidos biliares) y compuestos estructuralmente relacionados. Estas proteínas portadoras se encuentran en las membranas lumbales y/o basales de los enterocitos y pueden facilitar el paso de sustancias a la zona citosólica o serosa. Por tanto, pueden condicionar la absorción o la secreción de sus sustratos <sup>47</sup>

#### **Tipos de transporte especializado**

##### **Difusión facilitada**

Se denomina también difusión mediada por portadores, ya que aunque se realiza mediante proteínas específicas de membrana, no requiere consumo de energía metabólica. Las moléculas que no pueden cruzar la membrana por libre difusión, pueden hacerlo por la acción de proteínas transmembrana

específicas, que actúan como transportadoras. Existen dos tipos de proteínas transportadoras: las proteínas canales, las cuales una vez abiertas, forman pequeños poros a través de los cuales los iones de tamaño y carga apropiada pueden cruzar la membrana por difusión libre; y las proteínas portadoras (*carriers*) que se unen a moléculas específicas y luego sufren cambios conformacionales abriendo los canales a través de los cuales las moléculas que van a ser transportadas pueden pasar a través de la membrana y ser liberadas luego del otro lado. Los sistemas de cotransporte se pueden clasificar en <sup>42</sup>.

- **Simporte**; transporte simultáneo de dos moléculas en la misma dirección.
- **Antiporte**; transporte simultáneo de dos moléculas en direcciones opuestas.

Es un proceso rápido y presenta una especificidad por el sustrato. Las proteínas transportadoras son a menudo inducibles y la velocidad de transporte sigue una cinética de Michaelis-Menten <sup>48</sup>.

### **Transporte activo**

Se produce de forma unidireccional, en contra de gradiente electroquímico y de concentración. Es el transporte neto de un soluto en contra de un gradiente de concentración, no puede producirse espontáneamente, sino que requiere una fuente de energía para conducir un soluto a través de la membrana celular desde un compartimiento de baja concentración a uno de alta. Es necesaria la participación de proteínas integrales de la membrana. La unión entre sustrato y transportador es específica y dado que existe un número determinado de los mismos, el proceso es saturable.

El transporte activo se divide en subtipos, de acuerdo con <sup>42</sup>.

**(a)** La fuente de energía utilizada para producirlo.

- **Transporte activo directo**; La energía se deriva directamente de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP).
- **Transporte activo indirecto**; Transporte facilitado donde la molécula cotransportada pasa a través de la membrana a favor de un gradiente de concentración iónico entre ambos lados.

**(b)** El sentido del transporte en el lumen intestinal.

- **Transporte activo de absorción**; Las proteínas transportan el fármaco a través de la membrana en sentido lumen-sangre. Las proteínas de la familia MRP actúan de este modo, excepto las MRP2.
- **Transporte de secreción o efflux**; Las proteínas que intervienen impiden el paso del fármaco a través de la membrana, devolviendo al lumen intestinal las moléculas de fármaco que atraviesan la membrana del enterocito. Como resultado, la absorción es menor de la esperada. Las principales proteínas de membrana implicadas en este tipo de transporte son la Glicoproteína-P y MRP2.

### 1.4.3 Modelos experimentales para el estudio de la absorción intestinal

La necesidad de profundizar en el conocimiento de los mecanismos de la absorción y metabolismo de las sustancias clínicamente activas es un hecho y para ello, lo ideal sería disponer de un instrumento de trabajo sencillo y rápido, económico y fiable en cuanto a resultados. Por desgracia, las técnicas disponibles no siempre gozan de estas características; todas ellas presentan ventajas e inconvenientes que conviene analizar <sup>10a</sup>.

Los factores que afectan la absorción de un fármaco modifican sus parámetros cinéticos. Por ello, es indispensable comprender los procesos fisiológicos y moleculares de la absorción y los factores que potencialmente pueden modificarlos. Para lograr este objetivo, se debe disponer de modelos con una capacidad predictiva confiable, que ofrezcan información sobre los mecanismos de absorción, sitios de óptima absorción y permitan el estudio de la influencia de los factores fisiopatológicos.

En los últimos años se han desarrollado distintas técnicas con el objetivo de modelizar y cuantificar la transferencia de un principio activo en condiciones experimentales a través de una membrana biológica. A continuación se detallan algunos de los modelos utilizados <sup>49</sup>.

#### 1.4.3 i Métodos *in silico*

La predicción *in silico* incluye los estudios QSPR/QSAR que constituyen enfoques cuantitativos orientados a encontrar relaciones entre la estructura molecular y las actividades moleculares medidas o calculadas basado en modelos farmacocinéticos y farmacodinámicos <sup>50</sup>.

Dado que los métodos experimentales necesitan que el fármaco esté sintetizado y disponible en ciertas cantidades para efectuar los estudios, la investigación orientada hacia el descubrimiento de nuevas moléculas necesita un cribado inicial. Este cribado se realiza con métodos computacionales (*in silico*) que, mediante sistemas informáticos basados generalmente en redes neuronales, predicen la absorción intestinal a partir de las estructuras químicas de los compuestos. Estos sistemas se basan en la elaboración de bases de datos que incluyen determinados parámetros estructurales, como solubilidad acuosa, lipofilia o tamaño molecular, que inciden en la absorción de sustancias para las cuales ésta es conocida <sup>51</sup>.

Posteriormente, se introducen las estructuras químicas de los fármacos que se desea estudiar para estimar el parámetro de absorción <sup>52</sup>. Un método viable *in silico* ahorra recursos por facilitar una virtual selección de fármacos candidatos previa a la síntesis <sup>53</sup>.

#### 1.4.3 ii Métodos *in vitro*

Son conjunto de experimentos que se realizan y fenómenos que se observan a partir de componentes biológicos fuera del organismo vivo (células, tejidos, órganos, enzimas etc.). Pues, para investigar cuantitativamente el metabolismo intestinal de fármaco con tejidos intestinales, los métodos *in vitro* son

evidentemente requeridos. El acceso limitado a tejidos de intestino humano afecta la disponibilidad de un método *in vitro* altamente eficiente. También en estudios animales, el método *in vitro* es necesario para discriminar entre la contribución de hígado y intestino, para estudiar la diferencia regional y disminuir el número de animales necesario para experimentación<sup>54</sup>. Se ha usado numerosos métodos *in vitro* para estudio de absorción intestinal. Un factor universal a todos métodos *in vitro* es el efecto de factores fisiológicos como velocidad de vaciamiento gástrico, tránsito gastrointestinal, pH gastrointestinal, que no pueden ser incorporados. El éxito de aplicación de modelos *in vitro* para predecir la absorción a través la mucosa intestinal depende de cuánto el modelo reproduce las características de epitelio intestinal *in vivo*. Aunque es difícil desarrollar un sistema único *in vitro* que puede simular todas las condiciones existentes en el intestino humano, varios de estos sistemas son usados en la toma de decisiones en la fase temprana de desarrollo de medicamentos<sup>55</sup>. Algunos de los modelos *in vitro* que han sido aplicados en el estudio de absorción intestinal de fármacos;

**(a) Membranas artificiales.** El método PAMPA fue introducido en 1998 por Kansy, como un experimento rápido *in vitro* para estudio de permeación transcelular. Desde entonces ha ido ganando un interés considerable en la industria farmacéutica. Actualmente es usado en muchos estudios farmacéuticos y se ha introducido una versión mejorada, la BAMPA<sup>56</sup>. El principal objetivo de los ensayos de permeabilidad en membranas artificiales (PAMPA) es la clasificación de los compuestos que se absorben de forma pasiva y fundamentalmente, aquellos que lo hacen por transporte transcelular. Este método utiliza una capa de fosfolípidos sobre un filtro que actúa como soporte, de modo que se distinguen dos compartimentos acuosos, que permiten mimetizar la situación en la que se produce la difusión pasiva de moléculas pequeñas<sup>57</sup>.

Por tanto, su principal ventaja es que este sistema permite la realización de ensayos múltiples, debido a su velocidad, bajo costo y versatilidad, es un complemento particularmente útil a los modelos de permeabilidad celular.

Por el contrario, la desventaja que presenta es que proporciona una clasificación sencilla de los solutos estudiados en baja, media y alta probabilidad de absorción intestinal.

**(b) Fracciones subcelulares.** Uno de los métodos para estudiar los mecanismos de transporte de los compuestos que se absorben a través de la vía transcelular son las fracciones subcelulares, como las BBMV o BLMV<sup>58</sup>. En ocasiones, se han realizado estudios utilizando preparaciones simultáneas de BBMV y BLMV.

Estas vesículas se preparan a partir de diversos tejidos, por homogeneización y sedimentación diferencial de los mismos (producida generalmente por centrifugación en gradiente de densidad y precipitación diferencial) y posterior fraccionamiento. En el caso de BLMV se lleva a cabo, además, un

subfraccionamiento. Finalmente se caracterizan los transportadores de membrana mediante marcadores enzimáticos <sup>58</sup>. Los tejidos utilizados para la preparación de estas vesículas proceden del hombre o, más frecuentemente, de especies animales como la rata, el ratón y el cerdo.

Estas técnicas estudian los mecanismos de transporte de los solutos y su localización en la vesícula. El soluto puede transportarse hacia el espacio intravesicular o disolverse en la membrana lipídica. Sin embargo, las fracciones subcelulares pueden no ser útiles para el estudio de la absorción oral, ya que la extrapolación de la magnitud y la velocidad de absorción obtenidas en este sistema a un sistema *in vivo* resulta muy difícil. Por otra parte, en el proceso de aislamiento, la membrana y sus portadores pueden resultar parcialmente dañados.

**(c) Tejidos aislados.** Los tejidos aislados que se utilizan para la realización de estudios de permeabilidad de fármacos se obtienen generalmente de animales, si bien, en ocasiones, se emplean tejidos humanos. Existen dos grandes tipos de sistemas experimentales que se basan en ellos: cámaras de difusión y saco intestinal aislado.

**Las cámaras de difusión** son modelos de absorción que cuantifican el flujo transepitelial de fármacos a través del tejido epitelial intacto. El segmento intestinal que se somete a estudio se aísla y secciona convenientemente con el fin de obtener capas planas de tejido. Éstas se disponen posteriormente sobre las células de difusión estándar, disponible comercialmente, que se rellenan con un tampón adecuado que simula los fluidos extracelulares <sup>59</sup>.

Este sistema experimental es muy versátil y permite la cuantificación de la permeabilidad de un tejido, el transporte intestinal paracelular y transcelular, la secreción intestinal y la influencia del metabolismo intestinal en la biodisponibilidad de un fármaco <sup>60</sup>. Actualmente se están usando 2 versiones, que difiere en el tamaño de muestra de tejido. La cantidad de tejido necesaria varía de 3,8 – 5,0 mm<sup>2</sup> para la primera versión pequeña y 0,65 – 1,78 cm<sup>2</sup> para la segunda. Hasta ahora se han usado las cámaras pequeñas (rango de mm<sup>2</sup>) para estudio de absorción y son muy prometedoras en vista de escaso biodisponibilidad de intestino humano <sup>54</sup>.

La ventaja principal de la cámara es la posibilidad de estudiar el transporte bidireccional y metabolismo en locaciones específico de intestino.

La limitación importante de la técnica es que el rendimiento del estudio de absorción es por definición una subestimación, debido que no hay un flujo sanguíneo intacto y los compuestos deben atravesar todas las capas del intestino para llegar a la cámara serosal, pero este aspecto varía dependiendo del fármaco <sup>54</sup>.

**El método de saco intestinal aislado** de rata fue descrito por primera vez por Wilson y Wiseman en 1954 como modelo para el estudio de la absorción de azúcares y aminoácidos <sup>54</sup>. Se emplea la técnica

en la realización de estudios de acumulación de fármacos en segmentos intestinales completos. Para ello, los segmentos intestinales se dividen en pequeñas secciones a modo de anillos. Éstos se incuban, en tampones oxigenados que contienen el fármaco problema, en condiciones de agitación y temperatura controladas. El periodo de disección incluyendo preparaciones no deben exceder 8 minutos y el tejido debe ser conservados en una solución de buffer oxigenado todo el tiempo. Como buffers se usan KHB, KRB, medios TC 199, etc. El pH usualmente oscila entre 7,2- 7,4. Bajo condiciones óptimos el saco intestinal es viable hasta aproximadamente 120 minutos<sup>61</sup>.

Dependiendo de la dirección del transporte de fármaco a estudiar, basal-apical o bien apical-basal, se trabaja con segmentos intestinales evertidos o no evertidos respectivamente (Anexo 7). En el caso del estudio de la permeabilidad de fármaco en la dirección basal-apical, el segmento intestinal es evertido con la ayuda de una varilla de vidrio y posteriormente atado en ambos extremos.

El sistema de sacos intestinales permiten el estudio de las limitaciones a la absorción intestinal de un fármaco debido a su solubilidad, la evaluación de la conversión de un profármaco en fármaco por la acción del tejido intestinal, así como la discriminación de los mecanismos de absorción de fármacos en transporte pasivo o activo<sup>55</sup>.

Si bien una ventaja del modelo es que están presentes todos los tipos celulares que pueden participar o modificar la absorción del fármaco, el modelo presenta ciertas limitaciones. Una de ellas, que afecta especialmente el estudio de aquellos fármacos propensos a la unión a proteínas musculares, es la presencia de la capa muscular que no se remueve de la preparación. Por ello, su transporte se verá sometido a un error por defecto. Además, el modelo no refleja de manera fidedigna la barrera intestinal ya que los compuestos estudiados se transfieren desde el lumen intestinal hacia la lámina propia, sitio de localización de los vasos sanguíneos, y a través de la muscularis mucosae<sup>12c, 59</sup>.

Otro inconveniente es que al trabajar con un segmento aislado, se pierde el componente fisiológico correspondiente al flujo sanguíneo que irriga al intestino y que arrastra el fármaco absorbido, manteniendo el gradiente de concentración del fármaco desde el lumen intestinal hacia la cara serosal intestinal y la integridad del tejido dura poco tiempo. Sus usos son;

- Estudiar y caracterizar el mecanismo de transporte de fármaco en el sistema biológico elegido.
- Determinar la correlación entre la estructura química base de una molécula y el mecanismo de absorción.
- Evaluar la influencia de proteínas de transporte tales como la glicoproteína-P sobre la transferencia de un fármaco en estudio.

- Estimar la incidencia de excipientes o principios activos administrados de manera conjunta sobre la biodisponibilidad.
- Estimar el metabolismo de primer paso a nivel del epitelio intestinal.
- Caracterizar los factores fisiológicos que pueden modificar la absorción (pH, ayuno, secreciones).

**(d) Modelos celulares.** Dentro de los métodos *in vitro* encontramos los procedimientos que utilizan células intestinales aisladas y cultivadas que están limitados a estudios de acúmulo de fármaco en el interior de las células más que a estudios de transporte. La principal dificultad de trabajo con estas células (generalmente enterocitos) es que están altamente polarizados bioquímicamente, morfológicamente y funcionalmente <sup>62</sup>.

Las zonas apical y basolateral de la membrana son esencialmente diferentes. Las células en suspensión rápidamente se fusionan y despolarizan, perdiendo de esta forma la diferenciación entre las zonas antes mencionadas. Siempre que se mantenga la polaridad y se formen uniones intercelulares ajustadas, estas células serán representativas de la función de barrera que realiza el tracto intestinal <sup>60</sup>, pero no se consigue con células aisladas. Así pues, el sistema *in vitro* consistente en una monocapa de células del epitelio intestinal, similares a las que se encuentran en el intestino delgado, con la polarización descrita, es el más adecuado para realizar estudios de transporte y metabolismo.

Se han realizado numerosos intentos para reproducir la barrera intestinal, pero no siempre se han obtenido resultados satisfactorios porque las células del epitelio intestinal en cultivo no mantienen las características morfológicas y biológicas deseadas. Sin embargo, los resultados han sido satisfactorios con determinadas líneas celulares transformadas <sup>63</sup>. Las células Caco-2 monocapa y células MDCK son las que se han estudiado de forma más minuciosa por presentar, de forma espontánea, mayor diferenciación <sup>64</sup>.

**Línea celular Caco-2.** Las células del epitelio gastrointestinal humano no pueden utilizarse directamente para la realización de estos estudios puesto que se obtienen fácilmente, pero no son susceptibles de formar monocapas celulares, imprescindibles para realizar ensayos de absorción. Como alternativa se utilizan células humanas procedentes de cáncer de colon (células Caco-2). Estas células dan lugar a monocapas celulares y presentan características morfológicas y bioquímicas similares a las de los enterocitos maduros diferenciados, y algunas diferencias puntuales. Por ello constituyen un buen modelo, especialmente para xenobióticos susceptibles de absorberse únicamente por difusión pasiva. De hecho, se ha demostrado la existencia de una excelente correlación entre los

coeficientes de permeabilidad en células Caco-2 y la biodisponibilidad oral en humanos de este tipo de fármacos <sup>62, 65</sup>.

Las ventajas que presentan los cultivos celulares frente a los modelos de absorción convencionales son;

- La rápida determinación de la permeabilidad y metabolismo de los fármacos
- El estudio de los mecanismos de absorción bajo condiciones controladas
- La evaluación rápida de métodos que mejoren la absorción de fármacos
- La realización de estudios con líneas celulares humanas
- Minimizar la experimentación animal

Actualmente, las monocapas de células Caco-2 cultivadas en filtros permeables se utilizan para la realización de estudios de transporte transepitelial de numerosos fármacos y nutrientes. En muchos casos es posible investigar si un fármaco es transportado de forma activa o pasiva a través del epitelio intestinal y, si el transporte es activo, permite identificar el portador más importante <sup>65-66</sup>.

Es la única línea celular capaz de diferenciarse morfológicamente y funcionalmente a células con gran similitud a enterocitos, de manera espontánea <sup>65</sup>. Este tipo de células presentan uniones estrechas (*tight junctions*) además de una clara polarización (cara apical y basal). En la cara apical muestran el borde en cepillo.

Otra característica importante que asemeja esta línea celular a la membrana intestinal es la existencia de muchas de las enzimas del borde en cepillo como hidrolasas (aminopeptidasa-N, fosfatasa alcalina, olipeptidilpeptidasa IV, sacarosa-isomaltasa, lactasa) y enzimas de fase III como la Glicoproteína-P y otros sistemas de transporte especializado para aminoácidos, dipéptidos, vitaminas y citostáticos. Asimismo, la membrana basolateral está asociada a actividad ATP-asa dependiente de sodio-potasio y a receptores hormonales. También se encuentran enzimas intracelulares, tanto de fase I (oxidación), como las CYP, incluida la CYP3A, y de fase II (conjugación), como la glutatión S-transferasa y sulfotransferasa <sup>66</sup>.

El primer estudio en el que se estableció una correlación entre el coeficiente de permeabilidad obtenido en monocapas Caco-2 y la fracción de fármaco absorbida después de su administración oral en humanos, sugería que estas monocapas podrían utilizarse para identificar fármacos con posibles problemas a nivel de absorción.

Estudios más recientes indican que este modelo *in vitro* permite clasificar la permeabilidad de los fármacos de forma similar a otros modelos de absorción más complejos, como los tejidos intestinales aislados o los modelos de perfusión *in situ* <sup>54</sup>.

**Línea celular MDCK.** Las MDCK son la línea celular epitelial más estudiada con respecto a su genética, composición lipídica, expresión de proteínas y otros parámetros. Más recientemente, las MDCK comenzaron a usarse en estudios de transporte celular. Esta línea celular fue establecida en los años 50. Existen dos subclones. El tipo I, con unos valores de TEER sobre los 4000  $\text{cm}^2$  y el tipo II que posee unas medidas de TEER alrededor de 200 a 300  $\text{cm}^2$ . Para los ensayos de transporte se usan las MDCK tipo II.

Las células MDCK tipo II fueron transfectadas con el gen *mdr-1*, que codifica a la P-gp, creando así una nueva línea celular denominada MDCK-MDR1. El éxito de este hecho reside en la construcción de una herramienta para el estudio de sustratos e inhibidores potenciales de la P-gp. Las MDCK-MDR1 presentan una curva de crecimiento similar a las MDCK, bajo idénticas condiciones de crecimiento. Presentan unas medidas de TEER superiores a 1000  $\text{cm}^2$ , con una fluctuación máxima de 10000  $\text{cm}^2$ . Como consecuencia de la transfección con el gen *mdr-1*, las MDCK-MDR1 expresan grandes cantidades de P-gp <sup>67</sup>.

La resistencia eléctrica transepitelial (TEER), es un indicador de la confluencia celular y de la integridad de la monocapa, así como de la formación de uniones estrechas entre las células, también se emplea para controlar si las células se encuentran polarizadas midiendo la resistencia entre el compartimiento apical y el baso lateral de los pocillos bicamerales, ya que esta aumenta cuando el cultivo en monocapa se encuentra polarizado <sup>68</sup>. Su valor se determina con un micropolímetro, que mide el potencial de membrana y la resistencia de las células epiteliales en cultivo.

Estudios más recientes, en los que se utilizó intestino de ratones *knock out* para el gen *mdr1a*, han demostrado variaciones región-dependiente en la actividad de los transportadores celulares tanto en intestino delgado como grueso, con picos de mayor actividad en intestino delgado <sup>69</sup>. Estos resultados concuerdan con estudios *in vitro* realizados en intestino de rata donde la mayor actividad de P-gp se observó en Íleon, con menores niveles de actividad en el resto de los segmentos intestinales <sup>70</sup>.

#### 1.4.3 iii Métodos *in situ*

Experimento que se realiza exactamente en el sitio anatómico del animal donde ha de observarse el resultado esperado, por lo general implica la manipulación quirúrgica del animal. En el animal anestesiado, un segmento intestinal es canulado y perfundido en una solución de fármaco en estudio. Este método evita el contacto del fármaco con los componentes ácidos del estómago, permiten el estudio de la transferencia de fármaco a través de un segmento del tracto gastrointestinal en particular y como se trabaja con el animal entero, se trabaja en presencia de todos los factores fisiológicos que pueden influir sobre el pasaje del fármaco ej. flujo sanguíneo <sup>55</sup>.

La técnica de perfusión *in situ* en rata, como revisado por Olavi <sup>64</sup>, los estudios de perfusión en órganos aislados se consideran técnicas intermedias entre los estudios *in vivo* y los ensayos con tejidos aislados. Estos estudios se realizan, en la mayoría de los casos, en animal de experimentación, pero también se han realizado estudios similares en humanos <sup>71</sup>. Los órganos en estudio deben aislarse de los tejidos periféricos. Este aislamiento no es necesariamente físico, ya que es importante mantener una buena vascularización del órgano. Entre las técnicas de perfusión intestinal más utilizadas destaca el método de paso único sin recirculación (*single pass*) y el método de Doluisio (*closed loop*) <sup>54</sup>.

En el método de paso único (con recirculación), en anexo 8. El intestino delgado o segmento de interés se perfunde a velocidad controlada con la solución medicamentosa. De esta forma el sistema permite el control de la concentración del fármaco, el pH, la osmolaridad y la velocidad de entrada del mismo. El cálculo de la permeabilidad se realiza por medida de la desaparición del fármaco del lumen intestinal, en estado estacionario <sup>72</sup>.

En el método de Doluisio (sin recirculación), en anexo 9. La solución a ensayar se mantiene en el segmento intestinal del cual se toman muestras para observar la desaparición del fármaco.

#### **1.4.3 iv Métodos *in vivo***

Son un conjunto de experimentos que se realizan y fenómenos que se observan directamente sobre animal intacto vivo. Las técnicas de perfusión intestinal son utilizadas para estudiar los mecanismos de absorción y secreción, como así también para determinar la influencia del vaciado gástrico sobre la absorción en el hombre. La técnica consiste en perfundir un segmento intestinal humano con una solución del fármaco en estudio, utilizando una sonda con la que se llega al segmento del tracto a estudiar <sup>64</sup>. La diferencia de concentración del fármaco entre la solución perfundida y el que abandona el segmento en el perfusato, refleja la cantidad de fármaco absorbida y/o metabolizada.

Este método permite investigar de manera precisa el proceso de absorción en el hombre, pero sus principales desventajas son la imposibilidad de separar las variables que limitan el proceso de absorción, y la de trabajar con voluntarios, con la limitaciones éticas que esto implica.

#### **1.4.4 Métodos de estudio de la permeabilidad intestinal**

Los métodos de estudios se enfocan desde perspectivas distintas, que se combinan para conseguir la máxima información acerca de la absorción del fármaco, dónde se expresan, en cuanto proporción lo hacen, cómo actúan, qué fármacos son sustratos de ellos, etc.

La permeabilidad es uno de los factores que afectan la absorción intestinal de los fármacos, siendo su determinación el objeto de los modelos experimentales desarrollados por muchos investigadores. Por ello, los modelos predictivos de la absorción intestinal de los fármacos son importantes en las etapas

tempranas del desarrollo de medicamentos para acelerar la identificación de compuestos prometedores<sup>10</sup>.

### **Cálculo de la permeabilidad**

El ensayo debe realizarse en condiciones de mínima concentración, condiciones sumidero o de gradiente máximo ("sink"), de modo que la concentración de fármaco en el compartimento receptor a tiempo  $t$  no rebase nunca el 10% de la concentración inicial en el compartimento dador. El proceso puede tratarse como una difusión pasiva. De esta forma el proceso puede describirse mediante la ecuación 1. (*Condiciones sink*).<sup>9, 51a, 73</sup>.

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{V}{AC_0} \quad (1)$$

En la que  $P_{app}$  en (cm/s),  $dQ/dt$  ( $\mu\text{g/mL} \cdot \text{s}$ ) representa la velocidad de cantidad permeada por unidad de tiempo calculada a partir de línea de regresión de los puntos de tiempo,  $V$  ( $\text{cm}^3$ ) el volumen de solución en compartimento receptor,  $A$  ( $\text{cm}^2$ ) el área disponible para la permeación [0,18 cm como radio] y  $C_0$  ( $\mu\text{g/mL}$ ), la concentración inicial del fármaco en el compartimento donador en el  $t= 0$  minuto,<sup>51a, 72</sup>.

## CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Equipos y reactivos

#### Equipamiento:

- Desionizador de agua ultra pura: D7033 serie IT-13. país
- Balanza Analítica Digital: Sartorius, BS 124S Max- 120 g, d = 0,1 mg.
- Instrumento de cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE): Agilent 1100 series
- pH-metro: modelo PHSJ-4A.
- Agitador magnético: modelo MS01.
- Baño termostático: Modelo ED. JULABO Labortechnik GmbH 77960
- Oxigenador

#### Instrumental:

- Instrumental quirúrgico: Tijera de Mayo; pinza de disección; pinza Michel; hilos de suturas; válvulas de 3 pasos; sistema de tubería;
- Micropipetas: RONTAI (0,5-10; 5-50,100-1000 $\mu$ L).
- Filtros de membranas MILLIPORE 0,45  $\mu$ m de diámetro del poro
- Jeringuilla de plástico marca de 1 y 2,5 mL
- Tubos eppendorf marca de 1,5 mL.
- Cristalería apta para uso en el laboratorio.

#### Reactivos

- Rutina ACROS ORGANICS calidad analítica o reactivo químico, país.
- Quercetina ACROS ORGANICS
- Flavonoides aislados de *Boldoa purpurascens* Cav, generosamente donado por laboratorio de Química farmacéutica, obtenidos según <sup>7</sup>
- Agua desionizada
- Metanol para análisis: EMSURE®, ACS, ISO, Reag. Ph Eur.
- Metanol para CLAE en gradiente: Scharlau UN 1230.
- Dimetilsulfóxido UNI- CHEM
- Hidróxido de sodio (NaOH) (1 %) Merck,
- Ácido clorhídrico (HCl) (1 %)
- Ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) al 0,1% UNI- CHEM

- Cloruro de sodio, (NaCl) UNI-CHEM
- Cloruro de potasio (KCl) UNI- CHEM
- Sulfato de magnesio ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) UNI- CHEM
- Dihidrogeno fosfato de potasio ( $KH_2PO_4$ ) RIEDEL –DE HAEN
- Hidrogeno carbonato de sodio ( $NaHCO_3$ ) UNI- CHEM
- Cloruro de calcio hidratado ( $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ) UNI- CHEM
- Glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) UNI- CHEM
- Etanol absoluto, UNI-CHEM
- Diazepam, QUIMEFA
- Ketamina, QUIMEFA

## 2.2 Condiciones experimentales

### Animales de experimentación:

Se emplearon ratas macho, raza Wistar, con rango de peso  $304 \pm 6g$ , procedentes de la Unidad de Toxicología Experimental (UTEX), Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara. Recibieron alimento concentrado y agua potable apta para consumo *ab libitum* y en perfectas condiciones de higiene y climatización. Los animales fueron mantenidos en condiciones experimentales controladas con una temperatura de  $27 \pm 2^\circ C$ , humedad relativa de  $60 \pm 5\%$  y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Se alojaron en jaulas de polietileno con rejilla metálica a razón de 5 animales por jaula. La alimentación se les retiró 12-16 horas antes de iniciar el experimento.

### Consideraciones éticas:

Se respetaron los principios éticos que rigen la experimentación animal, garantizando el bienestar y la protección de los mismos, tanto por la sensibilidad humana ante el sufrimiento animal, como por garantizar la validez de los resultados obtenidos, cumpliéndose con las Normas de Bioética y Bioseguridad establecidas.

## 2.2 Determinación de parámetros de desempeño de la técnica analítica por cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE)

### 2.2.1. Establecimiento de los parámetros cromatográficos.

El método analítico empleado para este trabajo se adecuó a partir de la técnica reportada por Willy y col <sup>74</sup>, utilizando las condiciones operacionales que se describen en la tabla 4. Se realizó el análisis del comportamiento cromatográfico de una disolución patrón de Rutina y Quercetina a una concentración

de 25 µg/mL, disuelto en una mezcla de MeOH:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% (60:40), simulando la fase móvil del sistema

**Tabla 1:** Condiciones cromatográficas

La fase estacionaria		Columna cromatográfica RP-18 Agilent Eclipse XDB-C18, diámetro: 5 µm, longitud: 4.6x150 mm
La fase móvil		MeOH:H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 0,1 % (60:40).
Longitud de onda		258 nm
Volumen de inyección		20 µL
Temperatura de la columna		25 °C
Flujo		0,8 mL/min
Tiempo de retención	Rutina	2,7 ± 0,5 min
	Quercetina	4,7 ± 0,5 min

Para de determinación de la eficacia de la columna se calculó el número de platos teóricos

$$\left( N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \right) \text{ y la altura de los platos } \left( H = \frac{L}{N} \right).$$

### 2.2.2 Ensayo de linealidad

Se pesó con exactitud en una balanza analítica, alrededor de 0,1 g de flavonoide (Quercetina y Rutina, respectivamente), que se disolvió en 1 mL de Dimetilsulfóxido de calidad analítica en un matraz aforado de 10 mL, el volumen se completó con KRB obteniéndose así una disolución de concentración 0,01 g/mL (Disolución madre). A partir de la disolución madre, se prepararon disoluciones en un matraz aforado de 10 mL, completando el volumen con solución nutritiva KRB, a las siguientes concentraciones: 0,25; 0,5; 1,5; 2,5; 1; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 20; 25; µg/mL para la Quercetina y para la Rutina.

Posteriormente, 1mL de cada una de las disoluciones patrones fueron transferidas a un tubo de eppendorff, que contenía igual cantidad de metanol, calidad analítica, se agitaron y filtraron.

De las diluciones así obtenidas se inyectó un volumen de 20 µL, en el CLAE, empleando la fase móvil anteriormente mencionada, con un flujo de 0.8 mL/min. La detección se realizó a longitud de onda de 258 nm. Este ensayo se repitió hasta obtener dos curvas de calibración, una vez determinada el ABC de cada una de las disoluciones de concentración conocida <sup>74</sup>.

## 2.3 Procedimiento experimental de ensayos de absorción *in vitro*

### 2.3.1 Preparación de las disoluciones de estudio

Se pesó con exactitud en una balanza analítica, alrededor de 0,1 g del flavonoide (Quercetina y Rutina, respectivamente) que se disolvió en 1 mL de Dimetilsulfóxido de calidad analítica en un matraz aforado de 10 mL, obteniéndose así una disolución de concentración 0,01 g/mL (Disolución madre). A partir de la disolución madre, se preparó una disolución de 25, 50 y 100 µg/mL de Quercetina, 25, 50 µg/mL de Rutina y 50 µg/mL de extracto de *Boldba puerpurascens* Cav en un matraz aforado de 10 mL, con solución nutritiva KRB.

### 2.3.2 Ensayos de absorción de saco intestinal

#### Obtención e incubación de los sacos <sup>51a, 75</sup>.

Primeramente se preparó la disolución nutritiva *Krebs Ringer Buffer*, cuya composición se describe en la tabla 2.

**Tabla 2:** Composición de la disolución nutritiva KRB:

Componentes	Masa molecular (g/mol)	g/1000 mL	Concentración (mM)
NaCl	58,55	6,89	117,84
KCl	74,55	0,35	4,69
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	246,51	0,29	1,19
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	0,16	1,17
NaHCO <sub>3</sub>	84,01	2,10	25,00
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	147,10	0,28	1,90
Glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	180,18	1,99	11,09

Para su elaboración, se pesaron los componentes por separado en una balanza analítica y se añadieron los mismos a un matraz aforado de 1000 mL, que contenía 500 mL de agua desionizada, en el orden siguiente: NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, una vez bien disuelto con agitación magnética, se adicionó CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O y Glucosa. Posteriormente, se completó el volumen a 1000 mL con agua ultra pura. Se ajustó el pH a 7,4 y después de 10 minutos se controló nuevamente el pH.

Antes del ensayo, la solución nutritiva se colocó en un baño termostático a 37,5° C y se oxigenó, durante un tiempo de 15 a 30 min. Además, se transfirieron 300 µL de metanol calidad analítica a tubos eppendorf con vistas a adicionar las muestras obtenidas.

A continuación se pesó la rata Wistar, macho, en ayunas por 16 horas y se anestesió con una mezcla de Ketamina (75 mg/kg) y Diazepam (5 mg/kg) por vía intraperitoneal. Para comprobar el efecto anestésico se presionó con una pinza en las extremidades traseras y los ojos.

Una vez anestesiada, se procedió a la fijación de la rata a la tabla de disección y se limpió el abdomen con etanol al 70 %. Posteriormente se realizó una incisión en la línea media abdominal para exponer el intestino delgado y se extrajo cada parte del intestino delgado, cortando tres segmentos de 10 cm, de forma progresiva.

El segmento intestinal extraído se colocó rápidamente en una placa de Petri conteniendo KRB termostatzado a 37,5° C y burbujeadado con aire del ambiente. Se lavó el interior del saco suavemente con Krebs termostatzado y aireado hasta observar límpido el líquido efluente. Luego, el Krebs del interior del saco intestinal se eliminó por inyección de aire.

Posteriormente se ligó un extremo del segmento intestinal, se rellenó el mismo con 1 mL de la disolución de flavonoides a estudiar, con una jeringuilla plástica de 2 mL. A continuación, se ligó el otro extremo, y se lavó exteriormente con KRB a 37,5°C. El saco elaborado se transfirió a un tubo de ensayo conteniendo 15 mL de KRB, oxigenado con aire del ambiente, incubado a 37,5° C.

Los sacos se preparan de forma paulatina, hasta obtener tres de ellos.

Dado que la rata anestesiada siguió viva se la aplicó la eutanasia por medio de una dislocación cervical considerado este un paso crítico desde el punto de vista bioético.

Se extrajeron 300 µL del compartimento receptor (disolución del tubo de ensayo) sin tocar el saco intestinal a tiempo 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90 minutos. Esta muestra se transfirió a los tubos eppendorf que contienen 300 µL de metanol, anteriormente preparados.

Se cuantificó la concentración de flavonoide en las muestras mediante la técnica de CLAE, mediante la inyección cromatográfica de 20 µL, previa filtración con filtros de membrana de 0,45 µm de diámetro del poro.

### **2.3.2.a. Ensayos de absorción de saco intestinal para flavonoides patrones**

Se desarrolló el ensayo anteriormente descrito para el estudio de disoluciones de Quercetina a concentraciones: 25, 50 y 100 µg/mL, respectivamente, y de disoluciones de Rutina a concentraciones de 25 y 50 µg/mL, respectivamente.

Se realizaron tres réplicas de este experimento para cada una de las concentraciones de flavonoide.

### 2.3.2.b. Ensayos de absorción de saco intestinal para flavonoides presentes en extracto alcohólico de la *Boldoa purpurascens* Cav.

Se desarrolló el ensayo anteriormente descrito para el estudio de transporte intestinal *in vitro* de Quercetina y Rutina, a partir de un extracto alcohólico de hojas de *Boldoa purpurascens* Cav. Para la elaboración de la disolución de estudio, se cuantificó la cantidad de flavonoides presente en el extracto, en base a Quercetina, correspondiente a 1,2 mg/mL, a partir del cual se preparó una disolución de 50 µg/mL en un matraz de 10 mL con la adición de la cantidad necesaria de KRB. Se realizaron tres réplicas de este experimento..

#### Determinación de coeficiente de permeabilidad

Se realizó la representación gráfica de la concentración de flavonoide en la disolución receptora de los sacos en función del tiempo de incubación. Para el análisis de los datos se aplicó un modelo de regresión lineal, a partir del cual se calculó el  $P_{app}$ , empleando la ecuación 1.

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{V}{AC_0}$$

## 2.4 Tratamiento de los resultados

El procesamiento de los resultados se realizó utilizando las posibilidades de cálculo estadístico del Microsoft Office Excel <sup>76</sup>.

## CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1 Evaluación de las técnicas analíticas

Para la cuantificación del flavonoides en muestras biológicas se han empleado diferentes métodos analíticos, por ejemplo la determinación espectrofotométrica, pero sus resultados han sido poco satisfactorios y algunos autores <sup>77</sup>consideran que estas técnicas no son lo suficientemente específicas para estudiar la farmacocinética y biodisponibilidad de este fármaco debido a interferencias espectrales. Otros autores reportan que la cromatografía de gases tiene la sensibilidad analítica adecuada, pero presenta problemas debido a la presencia de productos de descomposición por las altas temperaturas a la que se opera. CLAE parece ser el método analítico que ofrece una determinación más precisa, considerándose el método de referencia <sup>78</sup>, pues permite cuantificar con precisión y exactitud los niveles tras su administración, además puede ser de gran utilidad en los ensayos clínicos desarrollados en humanos debido a su elevada sensibilidad ( <sup>74, 79</sup>. La determinación de algunos parámetros de desempeño, exigida como parte integral del estudio, permite establecer el grado de confianza y la actitud del procedimiento analítico para el uso en estudios biofarmacéuticos.

#### **Establecimiento de los parámetros cromatográficos para la determinación de flavonoides por CLAE**

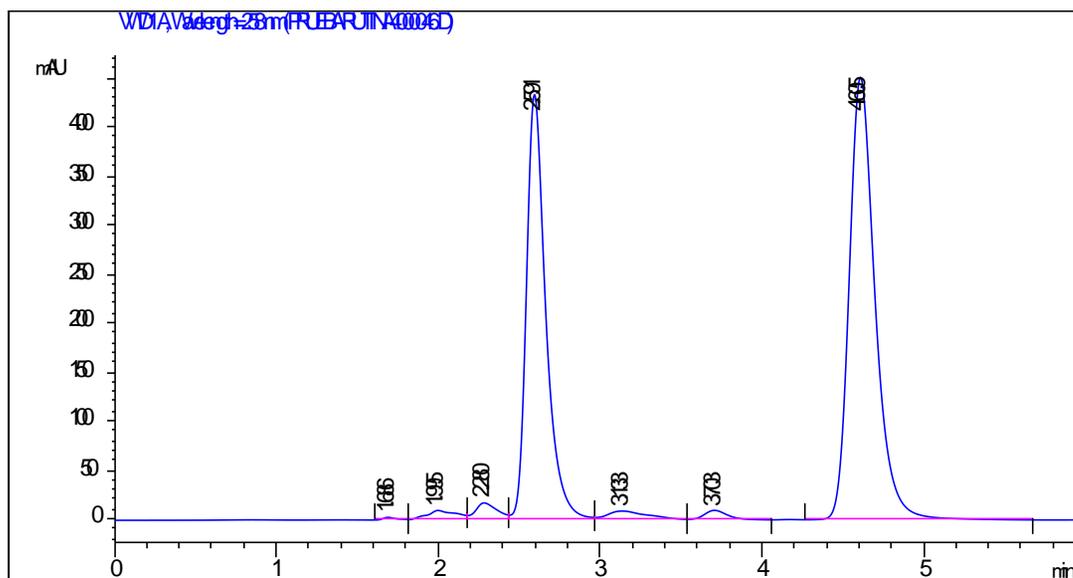
Para la definición de las condiciones cromatográficas a utilizar en nuestro trabajo se tuvieron en cuenta los estudios publicados en múltiples trabajos científicos, sobre la determinación de Rutina y Quercetina tales como el reportado por <sup>74</sup> donde se emplea una columna C-18 de 250 x 4,6 mm, 0,5 µm, fase móvil compuesta por H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% en metanol y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% en agua en proporción 40:60 v/v, flujo 1,2 mL/min, volumen de inyección 20 µL y una longitud de onda 258 nm. Por otra parte, también se hacen referencias a las técnicas que emplean: columna C-18 de 150 x 2,1 mm, 3,5 µm, fase móvil compuesta por metanol:acetonitrilo:agua (40:15:45) con un flujo de 1 mL/min, volumen de inyección 10 µL a una longitud de onda 257 nm y una temperatura de 45°C <sup>80</sup>; columna C-18 150 x 4,6 mm, 0,5 µm con una fase móvil consistiendo de 0,5% de ácido fórmico :acetonitrilo (70:30 v/v), a una temperatura de 45°C, volumen de inyección 50 µL , flujo de 0,9 mL/min a temperatura ambiente con la detección a 340 nm <sup>81</sup> entre otros.

Existe coincidencia en que se deben emplear columna de fase reversa (C18), detección a 257-340 nm, una temperatura ambiente (25-45° C), volumen de inyección 20 µL y la fase móvil debe estar constituida por un disolvente orgánico polar (acetonitrilo, metanol) y una solución acuosa ácida a diferentes proporciones, para prevenir la formación de picos asimétricos en el cromatograma.

Teniendo en cuenta lo reportado por <sup>74</sup> adecuamos estos parámetros, en función de nuestras condiciones de trabajo, para lo cual utilizamos una columna RP-18 de longitud 15 cm y escogimos como fase móvil una mezcla de MeOH:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 % en una proporción de 60:40, a flujo de 0,8 mL/min, manteniendo los demás parámetros cromatográficos.

Partiendo de estas nuevas condiciones se realizaron todos los experimentos.

Primeramente se realizó la inyección cromatográfica de una disolución patrón de Quercetina y Rutina de 25 µg/mL en MeOH:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 % (60:40). Como se puede observar en el cromatograma obtenido (Figura 1), el tiempo de retención ( $t_R$ ) fue de 2,5 min para la Rutina y 4,8 para la Quercetina, en contraste con los  $t_R$  obtenidos por Willy <sup>74</sup>, de 3,2 min para la Rutina y de 6,5 min para la Quercetina. Consideramos que esta diferencia está determinada por la modificación en la velocidad de flujo empleada por nuestro grupo de investigación (0,8 mL/min). Ambos picos presentan buena simetría.



**Figura 1:** Cromatograma correspondiente al patrón Quercetina y Rutina, concentración de 30 µg/mL, disuelto en Fase Móvil. Método CLAE con fase móvil MeOH:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1%, (60:40).

Además, para la determinación cuantitativa de la eficiencia de la columna cromatográfica, se calculó el número de platos teóricos (N), así como la altura equivalente de los platos teóricos (H). Los resultados se exponen en la tabla 3. Demostrándose de esta manera que la columna es eficiente bajo estas condiciones operacionales.

Lo antes expuesto demuestra la validez de la técnica empleada.

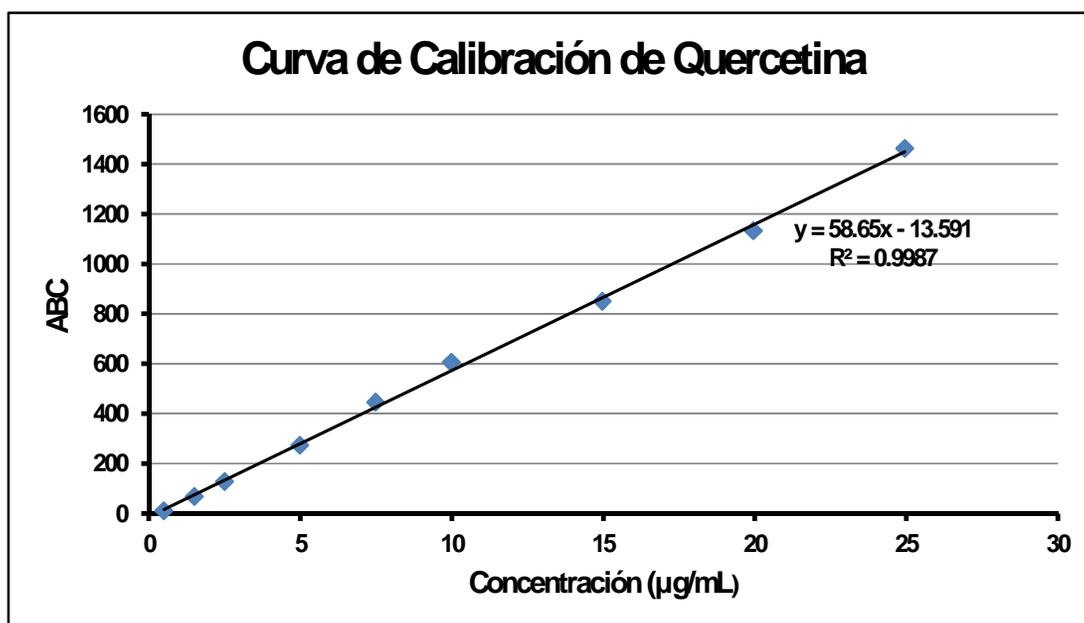
Tabla 3: Determinación de la eficacia de la columna

	Rutina	Quercetina
Tiempo de retención experimental (min)	2,5	4,8
Tiempo de retención reportado (min)	3,2	6,1
Ancho de pico (min)	0,6	0,6
Longitud (cm)	15	15
Número de platos teóricos	277,7	1024
Altura de los platos (cm)	0,0540	0,0146

### 3.1.1 Estudio de Linealidad

El estudio de la linealidad del método, se llevó a cabo mediante la realización de curvas de calibración para disoluciones patrones de Rutina y de Quercetina, elaboradas tal y como se describe en el capítulo de Materiales y métodos, que fueron inyectadas al instrumento de CLAE, por triplicado <sup>38</sup>.

La curva de calibración de la Quercetina, elaborada para disoluciones patrones en el intervalo de concentración de 0,5 a 25 µg/mL, acompañada de la ecuación de la recta y del coeficiente de correlación correspondiente, se muestra en la figura 2.



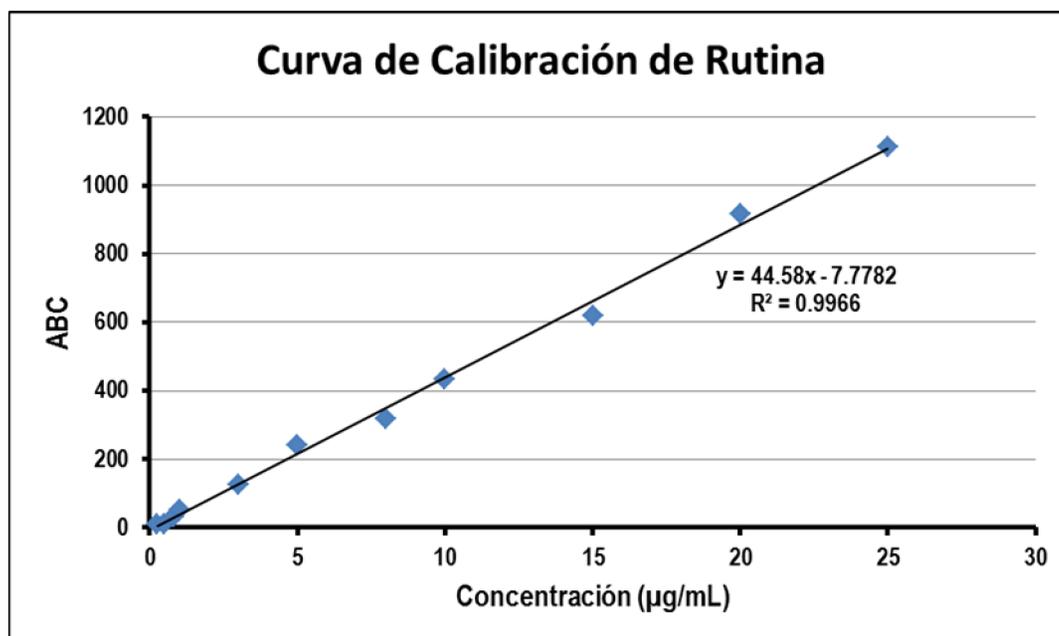
**Figura 2:** Representación gráfica de la curva de calibración de Quercetina por CLAE (FM: MeOH:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1%, 60:40) para la linealidad. Los valores se muestran como la media estadística. n=20.

Dentro del intervalo de concentración de Quercetina estudiado, como se muestra en la tabla 4, se obtuvo una tendencia al comportamiento lineal, por lo que se puede afirmar que la técnica analítica es adecuada para valorar las muestras intestinales.

**Tabla 4:** Parámetros para evaluar la linealidad de la Quercetina

Parámetros estadísticos	Valores experimentales	Criterio de aceptación
Número de datos	20	—
Intervalo de linealidad ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,5 - 25	—
Coefficiente de correlación ( $r^2$ )	0,9987	$r \geq 0,99$
Pendiente	58,65	—
Desviación estándar relativa de la pendiente	1,027	$S_{b_{rel}} \leq 2\%$
Ordenada en el origen	-13,59	—

Asimismo, en la figura 3 se presenta la curva de calibración de la Rutina, acompañada de la ecuación de la recta y del coeficiente de correlación correspondiente.



**Figura 3:** Representación gráfica de la curva de calibración de Rutina por CLAE (FM: MeOH:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1%, 60:40) para la linealidad. Los valores se muestran como la media estadística. n=22.

Se observa una tendencia al comportamiento lineal en el intervalo de concentración estudiado para la Rutina. El respectivo análisis estadístico se presenta en la tabla 5, por lo que se puede afirmar que el método es aceptado para ser usado en la cuantificación de las muestras biológicas a estudiar.

**Tabla 5:** Parámetros para evaluar la linealidad de la Rutina

Parámetros estadísticos	Valores experimentales	Criterio de aceptación
Número de datos	22	—
Intervalo de linealidad ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,25 - 25	—
Coefficiente de correlación ( $r^2$ )	0,9966	$r \geq 0,99$
Pendiente	44,58	—
Desviación estándar relativa de la pendiente	0,956	$S_{b_{rel}} \leq 2\%$
Ordenada en el origen	-7,77	—

### 3.2 Ensayo de absorción *in vitro*

Es conocido que el intestino delgado es el sitio más importante para la absorción de los fármacos administrados por vía oral, aunque algunos pueden ser absorbidos en el colon. En este presente estudio nos enfocamos exclusivamente en el estudio del comportamiento de absorción en el intestino delgado. Los fármacos son absorbidos a través de la mucosa intestinal por diferentes mecanismos que dependen de sus características físico-químico., 73b, 82.

La biodisponibilidad oral es consecuencia de la absorción intestinal, los procesos de exorción y metabolismo y además, está modulado por la diferente actividad de los segmentos intestinales.

Hoy en día, la predicción de absorción es una dificultad a la hora de desarrollar componentes activos. Idealmente, un método de predicción debe ser altamente predictivo, rápido, fiable, costo efectivo y que requiera pequeña cantidad de compuesto<sup>83</sup>. Sin embargo no existe un método que posea todas estas características. Cada modelo tiene su ventaja y desventaja y, probablemente, solo la combinación de diferentes modelos puede proporcionar una predicción precisa de la absorción intestinal humana.

Para la selección y desarrollo de métodos *in vitro*, es necesario demostrar que el mismo puede aplicarse con buenos resultados y que además, funciona en todo momento, de acuerdo con las numerosas publicaciones hechos varios autores<sup>75a, b, 77c, 84</sup>.

La técnica de los sacos intestinales es una versión mejorada de técnica *in vitro* previamente descrita por Wilson y Wseman en 1954. Permite estudiar el transporte de sustancias a través de la pared intestinal, identificando si la molécula se absorbe por mecanismos activos o pasivos, donde se puede realizar la eversión de un segmento intestinal.

### 3.3 Absorción de la Quercetina y Rutina en saco intestinal aislado.

#### 3.3.1 Absorción de Quercetina a través de saco intestinal aislado.

La Quercetina es uno de los flavonoides naturales más comunes, presentándose principalmente en forma glicosídica como la Rutina (Quercetina-3-rutinósido), en la cebolla donde ocurre la mayor cantidad de Quercetina, esta ligado a uno o dos moléculas de glucosa (Quercetina -4'-glucosido, Quercetina-3-4'-glucosido).

En el presente estudio se determinó la absorción de Quercetina en diferentes segmentos o regiones del tracto del intestino delgado. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.

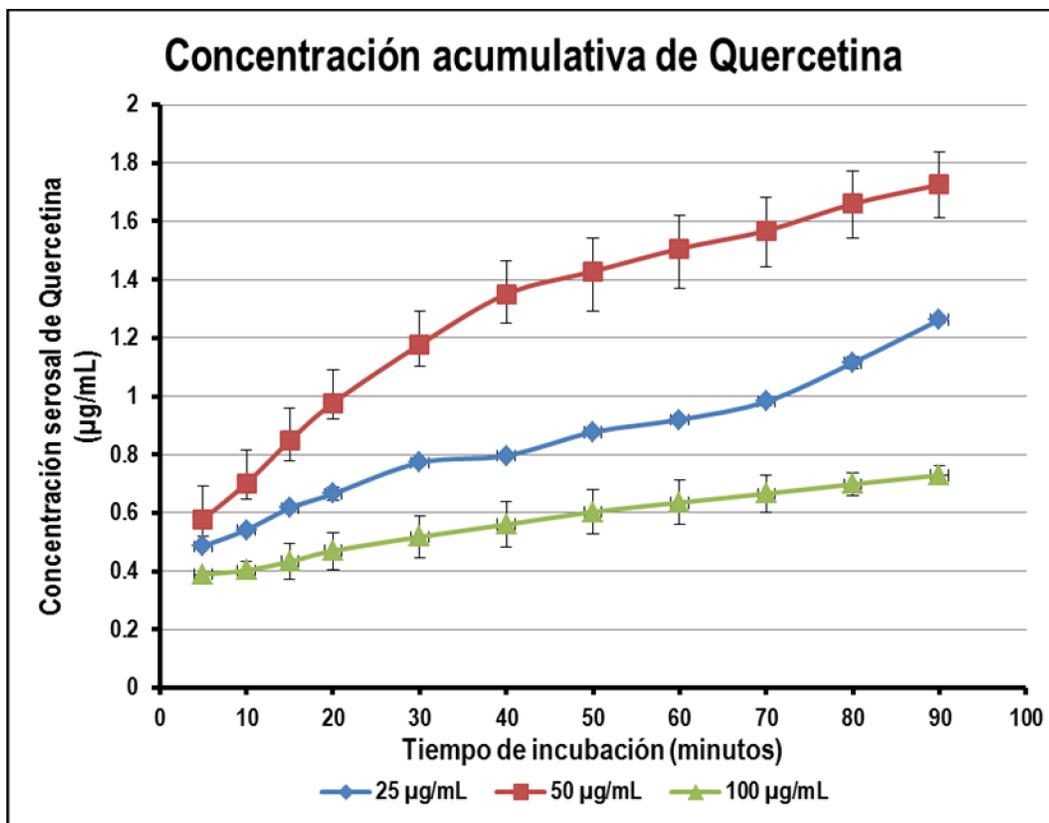


Figura 4: Absorción de Quercetina en los segmentos intestinales a diferentes concentraciones.

Se determinó que la Quercetina, a las concentraciones de 25, 50 y 100 µg/mL, respectivamente, es capaz de atravesar la membrana del intestino delgado aislado de la rata. Los diferentes segmentos del intestino delgado absorben la Quercetina de igual manera, respaldando los resultados obtenidos por Brigitte y col.<sup>85</sup> que plantea que la Quercetina y otros flavonoides agliconas son absorbidos adecuadamente, y no se obtuvieron diferencias significativas, lo que es indicativo de que el transporte

de Quercetina ocurre con la misma intensidad a través de cada porción, siendo permeables todos los segmentos (fig 4) <sup>86</sup>

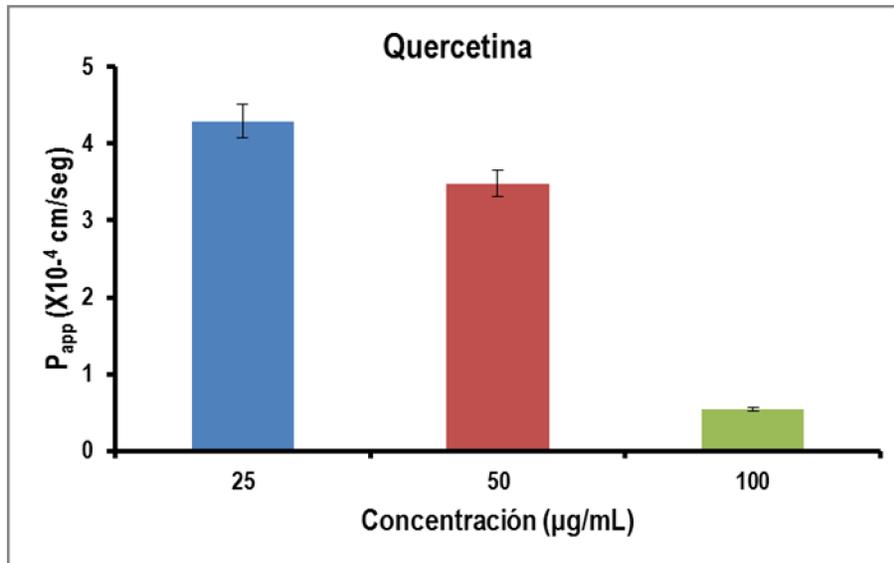
Las características anátomo-fisiológicas de las porciones del intestino delgado no difieren, por ser un órgano donde las paredes están especializadas para la absorción y poseer vellosidades intestinales que favorecen el contacto de Quercetina con la mucosa. La similitud de la absorción de Quercetina entre ambos pudiera atribuirse a la considerable relativa lipofilia de Quercetina <sup>87</sup>.

La acumulación de Quercetina en el compartimento serosal fue analizada como una función de la concentración (25, 50 y 100 µg/mL). Los resultados muestran que, en las dos concentraciones menores, la acumulación de Quercetina aumenta con el incremento de concentración de incubación, indicando que no hay saturación de la concentración celular. Solo en la concentración 100 µg/mL se observa una disminución en la absorción a través de la membrana, debido que a altas concentraciones de Quercetina puede ocurrir la precipitación de la misma, por ende disminuye su concentración en el sitio donador, en este caso la concentración mucosal.<sup>88</sup>. Además, existen referencias de que puede ocurrir fijación de la Quercetina en las paredes del tejido de la mucosa intestinal <sup>89</sup>.

### 3.3.1.a Estudio de la permeabilidad intestinal de la Quercetina

Como parámetro representativo del proceso de *absorción in vitro* se ha calculado el coeficiente de permeabilidad aparente (Papp). Se estudió el transporte de Quercetina en dependencia de la concentración, a través del transporte de dirección mucosal (apical)-serosal (basolateral) en un rango de concentración de 25-100 µg/mL (fig 5). Como se puede observar, el coeficiente de permeabilidad aparente disminuyó con el aumento de la concentración de  $4,29 \times 10^{-4}$  para 25 µg/mL;  $3,48 \times 10^{-4}$  para 50 µg/mL a  $5,42 \times 10^{-5}$  para 100 µg/mL <sup>90</sup>.

Como se esperaba, la permeabilidad aparente a concentración de 100 µg/mL fue la menor, pues se conoce que a concentraciones altas de Quercetina puede ocurrir la precipitación de la molécula en el sitio donador, lo cual influye de forma negativa sobre la absorción del flavonoide.



**Figura 5: Permeabilidad aparente de Quercetina en el saco intestinal aislado.**

En la concentración de 50 µg/mL, a pesar de que la cantidad de Quercetina acumulada en el compartimento aceptor (serosal) fue mayor que para la concentración de 25 µg/mL, tal y como se muestra en la figura 4, la permeabilidad aparente resultó ser menor. Este resultado está relacionado con el hecho de que la permeabilidad aparente es inversamente proporcional a la concentración inicial, por lo que este ensayo debe realizarse en condiciones de mínima concentración, siempre y cuando la concentración de fármaco en el compartimento receptor no rebase nunca el 10% de la concentración inicial en el compartimento donador. <sup>9, 51a, 73.</sup>

### 3.3.2 Absorción de la Rutina a través de saco intestinal aislado

Según fuentes bibliográficas, la Rutina es capaz de ejercer numerosas actividades bioquímicas y farmacológicas, no obstante la información sobre su absorción y metabolismo es escasa.

En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos para la absorción intestinal de la Rutina, a través de saco intestinal aislado, a concentración de 25 µg/mL y 50 µg/mL, respectivamente.

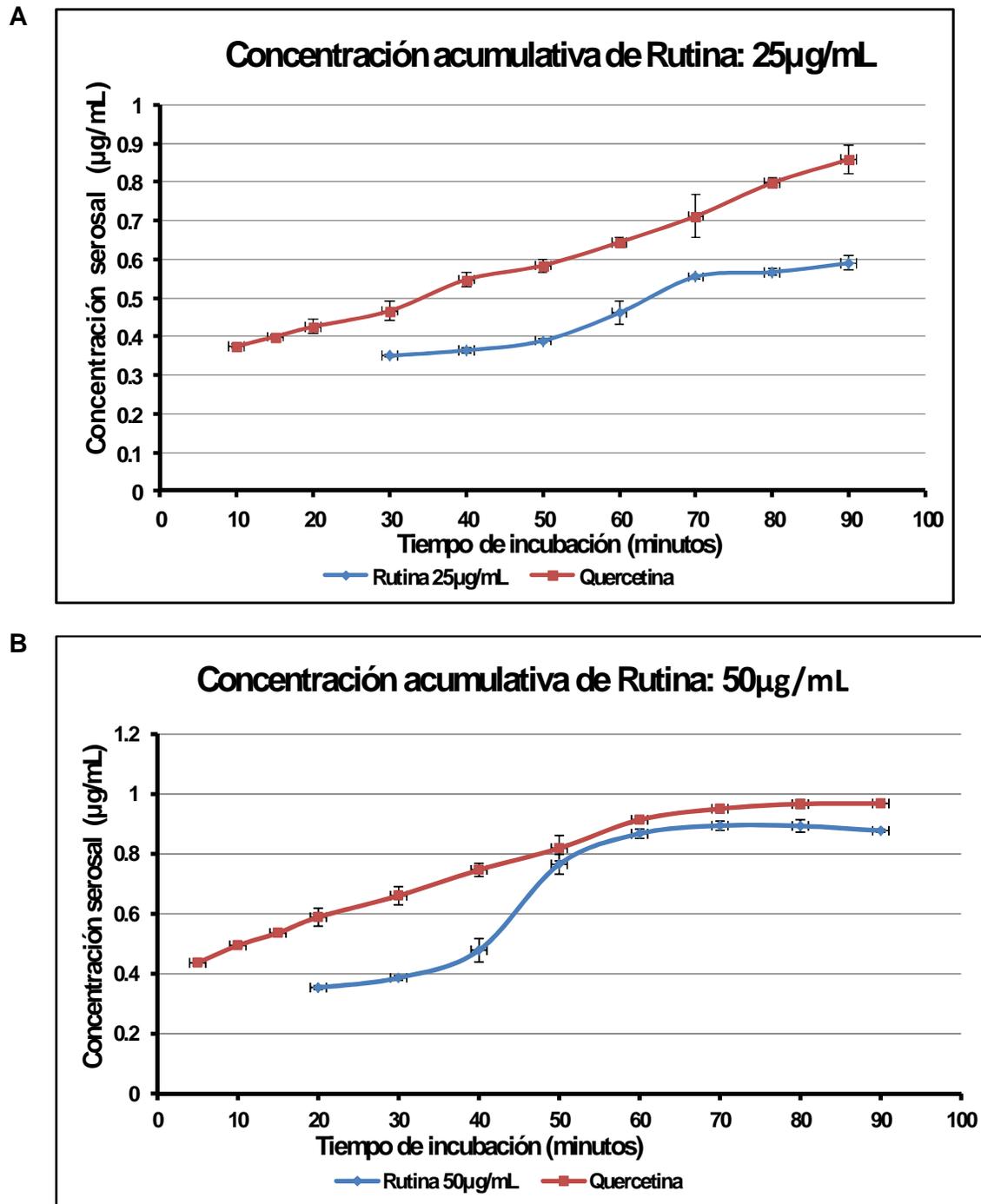


Figura 6: Absorción de Rutina en los segmentos intestinales a diferentes concentraciones: A: 25  $\mu$ g/mL y B: 50  $\mu$ g/mL

Como se puede observar, para la concentración de 25 µg/mL (Figura 6.A) hasta los 30 minutos no se observa presencia de Rutina en el compartimento serosal, mientras que la Quercetina se puede cuantificar desde los 10 min y se encuentra a una concentración mayor que la Rutina. Asimismo, para la concentración de 50 µg/mL, se observa (Figura 6.B) que a pesar de que la absorción de la Rutina comienza antes, no es evidente hasta los 20 min. Igualmente la Quercetina se absorbe más intensamente.

Estos resultados coinciden con los reportados por Wilfried y col <sup>91</sup>, donde se encontró que la Rutina no se absorbe hasta un tiempo después que se convierte en Quercetina.

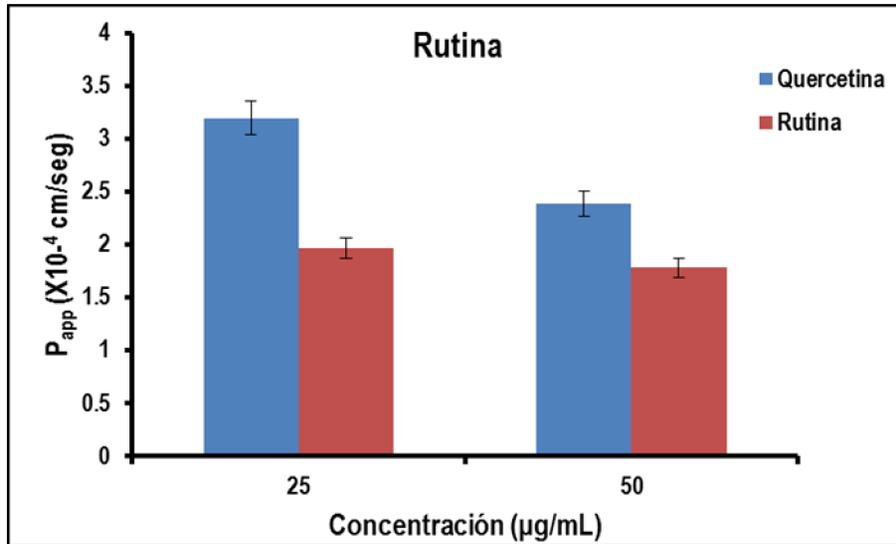
En coincidencia con lo reportado en la bibliografía consultada (bibliografía), la Rutina, forma glicosídica del flavonoide, presenta una baja absorción intestinal y es intensamente metabolizada a Quercetina, aglicón del flavonoide.

Las razones de la baja absorción de los glicósidos, como Rutina, Genistina y Apigetrina, no están claras. Posible mecanismos de transporte incluye: una difusión pasiva muy lenta, pobre sustrato de transportadores de glucosa y salida por transportadores intestinales “efflux”, como son MDRI y MRP. Baja solubilidad lipídica y presencia de múltiple grupos hidroxilos (para enlaces de hidrogeno) <sup>86a, 92</sup> son posibles razones por la baja difusión pasiva. En la ausencia de una absorción eficiente de difusión pasiva de los glicósidos (Rutina), la absorción es dependiente de la presencia de transportador de glucosa dependiente de Na<sup>+</sup> (SGLT-1) (fig. 8)

A pesar de estas afirmaciones, la absorción y el metabolismo de flavonoides glucósidos no se han examinado rigurosamente. Antes de que estos flavonoides puedan ejercer efectos sistémicos, deben ser absorbidos desde el lumen intestinal, y la mayoría de ellos se producen como - glucósidos. <sup>93</sup>. La absorción de los glucósidos de Quercetina ocurre en el intestino delgado, siendo la eficiencia de la absorción mayor que la de sus agliconas (fig 7) <sup>94</sup>.

### **3.3.2.a Estudio de la permeabilidad intestinal de la Rutina**

La permeabilidad del intestino para la Rutina, en consecuencia, es baja, como se puede observar en la figura 7, y en el presente estudio no se encontró dependencia de la concentración del flavonoide. Si se compara con la permeabilidad de una concentración equivalente de Quercetina, se observa que el intestino es más permeable para el aglicón.

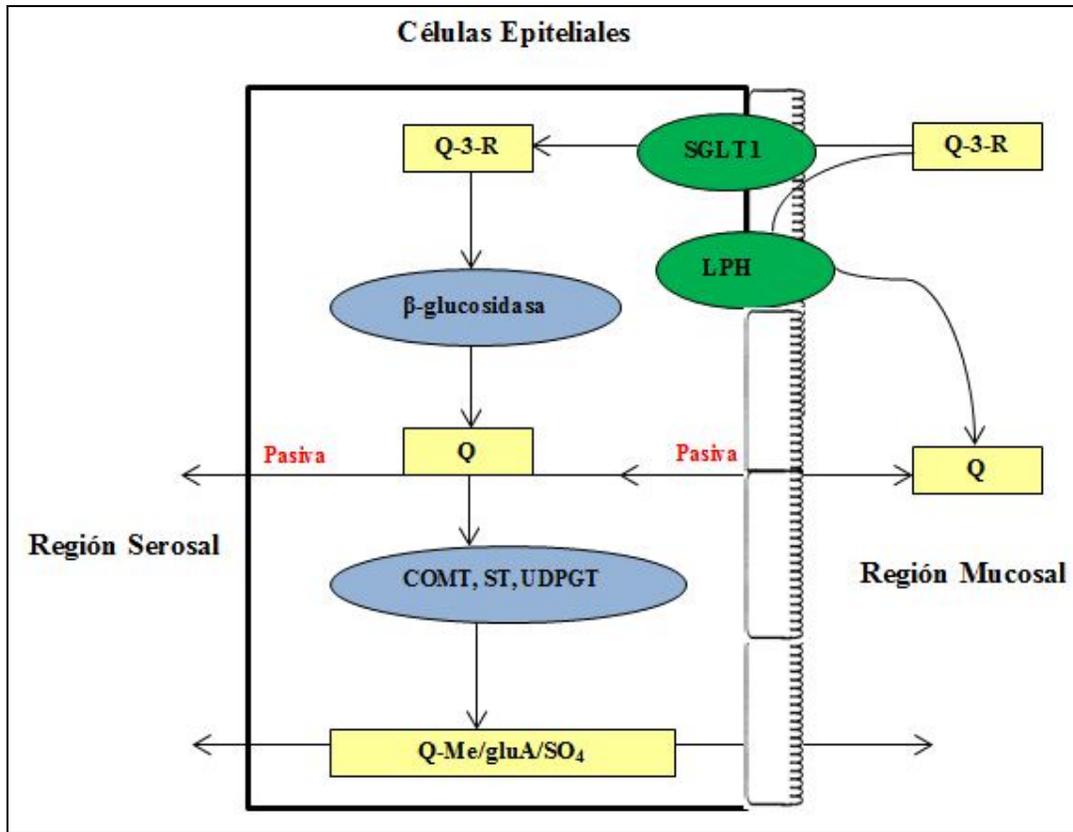


**Figura 7: Dependencia de concentración de Rutina.**

Poner en el grafico la permeabilidad de Quercetina del ensayo anterior.

El hecho de que la absorción intestinal de los flavonoides glucósidos sea bajo, no implica la falta de efectos biológicos de estos compuestos en seres humanos. Durante mucho tiempo se ha argumentado que las enzimas de la microflora del colon pueden hidrolizar los glucósidos flavonoides <sup>107</sup>.

Se ha encontrado parcialmente el mecanismo subyacente mediante el cual la glicosilación facilita la absorción de la Quercetina. Hollman et al <sup>95</sup> sugieren que los glucósidos pueden ser transportados al interior de los enterocitos a través de un transportador de glucosa sodio-dependiente (SGLT1) como se aprecia en la figura 8. Una vez dentro de los enterocitos, los glucósidos pueden ser hidrolizados por una β-glucosidasa citosólica <sup>96</sup>. Otra vía diferente a ésta implica a la lactato florizin hidrolasa, una glucosidasa situada en la membrana del “brush border” del intestino delgado que cataliza la hidrólisis extracelular de algunos glucósidos, seguida de la entrada de la aglicona a través del “brush border” mediante difusión <sup>97</sup>. Seguramente, las dos enzimas están involucradas, aunque la contribución relativa de ambas sobre los diferentes glucósidos no está aún clara <sup>98</sup>.



**Figura 8. Posible ruta de acción de las enzimas en el intestino delgado. Adaptada de Jennifer 2000, Bernardino 2005)**

Estos resultados tienden a sugerir que las glicosidasas intestinales son enzimas de borde en cepillo y LPH es probable que la enzima responsable ya que es la única glicosidasa de borde en cepillo descrito hasta la fecha, LPH se expresa por los seres humanos y ratas, con dos sitios activos, tanto identificado en la misma proteína, capaz de hidrolizar flavonoides glucósidos <sup>93</sup>.

En base a los resultados acumulados, la absorción intestinal de flavonoides dietéticos es cada vez más claramente definido (Fig. 9). El flavonoide mayoritario de la dieta, Rutina (Quercetina-3-β-rutinósido), se absorbe a través de la membrana del borde en cepillo por SGLT1. MRP2, también localizado en la membrana apical, es capaz de provocar la salida de Quercetina-3-β-rutinósido y eficazmente opuestas a la absorción y la acumulación intracelular. Sin embargo, al obtener acceso en el citosol, Quercetina-3-β-rutinósido puede someterse a metabolismo tal como hidrólisis, produciendo aglicona Quercetina. Quercetina aglicona puede entonces someterse a un metabolismo adicional o puede atravesar la membrana basolateral, lo que resulta en la absorción.

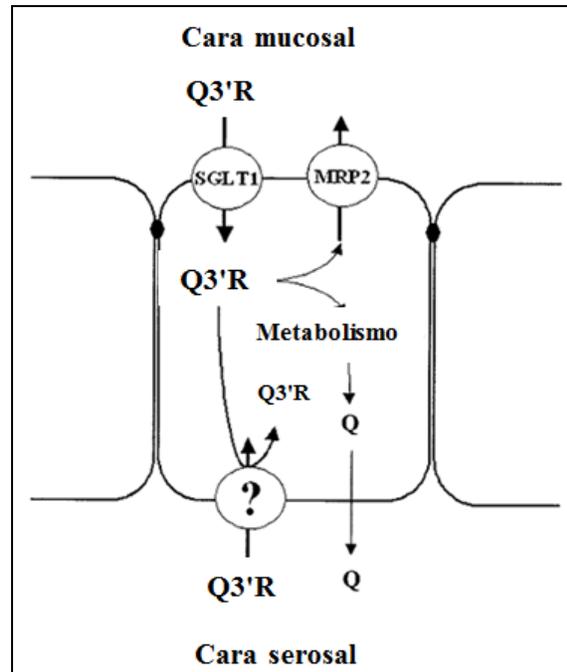


Figura 9: Mecanismo propuesto para la absorción de Rutina (Quercetina-3-β-rutinósido) <sup>99</sup>

### 3.4 Absorción de Quercetina y Rutina presentes en extracto alcohólico de la *Boldoa purpurascens* Cav

En el presente trabajo se utilizó el extracto alcohólico de las hojas de *Boldoa purpurascens* Cav. obtenido por Glez Mbsquera, . Se cuantificó cromatográficamente la concentración de flavonoides, en base a Quercetina, presentes en el extracto. Como se muestra en la figura XXX, la concentración de Quercetina es de 1,2 mg/mL.

Cromatograma de extracto alcohólico de *Boldoa*

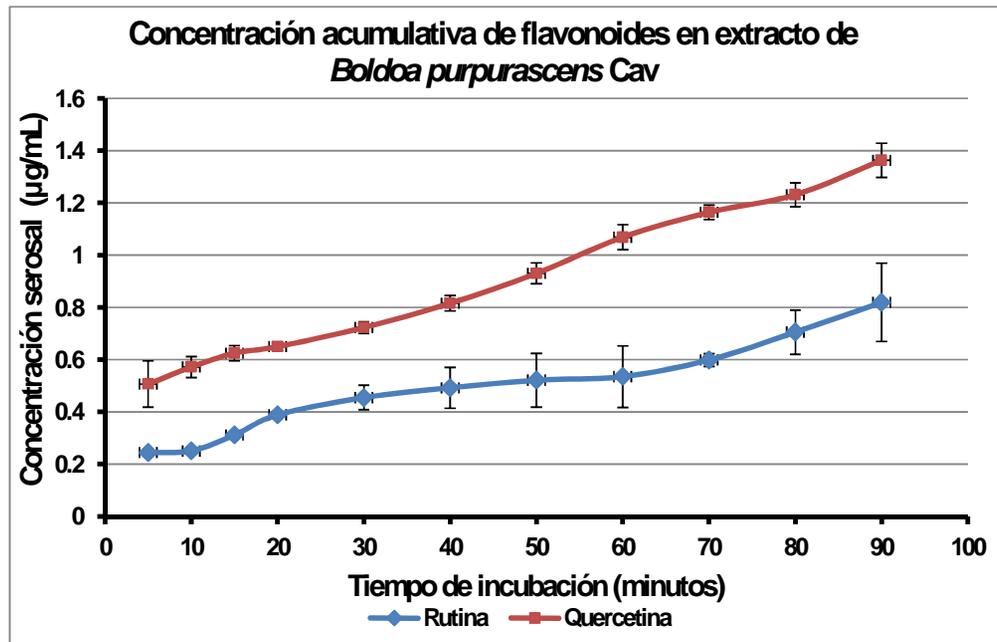
Figura XXX: Cromatograma del extracto alcohólico de hojas de *Boldoa purpurascens* Cav.

A partir de dicho extracto se obtiene la disolución de incubación a una concentración de 50 µg/mL, correspondiente a Quercetina.

Los resultados obtenidos para la incubación de la disolución de flavonoides a 50  $\mu\text{g/mL}$  en base a Quercetina, obtenidas a partir del extracto alcohólico de las hojas de *Boldoa purpurascens* Cav, se muestra en la figura 10.

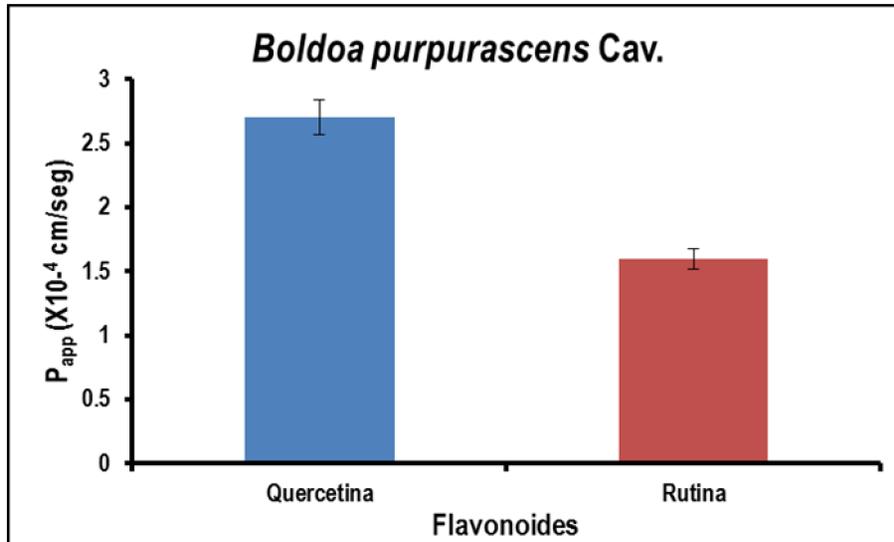
Como se puede observar, la absorción de la Quercetina fue casi el doble de la absorción de la Rutina (fig 8,9) y los resultados coinciden con lo obtenido por [nombre de bibliografía<sup>105-106</sup>](#).

En el extracto hay una mayor concentración de Quercetina que de Rutina, no obstante,



**Figura 10: Absorción de *Boldoa purpurascens* Cav. en los segmentos intestinales.**

En consecuencia, se calculó el coeficiente de permeabilidad aparente de la Quercetina y la Rutina procedentes del extracto alcohólico de *Boldoa purpurascens* Cav. observándose, como se muestra en la figura 11, que la Quercetina tiene un mejor resultado, siendo su permeabilidad mayor que la Rutina.



**Figura 11: Coeficiente de permeabilidad de la Quercetina y Rutina en la *Boldoa purpurascens***

Existen excelentes revisiones centradas en diversos aspectos de los flavonoides tales como: nutricionales, médicos e interacciones con fármacos <sup>100</sup>, aunque los procesos sobre absorción y biodisponibilidad de flavonoides, todavía no se conocen en profundidad <sup>101</sup>. La mayoría de los flavonoides se presentan en forma de glucósidos, pero su carácter hidrofóbico hace que se absorban en el tracto gastrointestinal, como agliconas <sup>102</sup>. Las agliconas son mucho menos hidrofílicas que sus correspondientes glucósidos y, por tanto, pueden difundir más fácilmente y través de las membranas biológicas (fig 10) por difusión pasiva. Los glucósidos son hidrolizados por las glucosidasas presentes en la mucosa o secretadas por la flora presente en el colon o en el hígado <sup>97, 103</sup>

Hasta ahora los estudios relacionados con la absorción de flavonoides han enfocado en el transporte de los agliconas o flavonoides totales <sup>104</sup>. Alvarez y col reportaron que en el caso de Quercetina ocurre el mismo proceso, este compuesto está presente en la cebolla como glucósido. Estos procesos no están totalmente dilucidados ya que existen trabajos que muestran que la biodisponibilidad de los glucósidos procedentes de la cebolla, fue significativamente mayor que la de sus agliconas <sup>103a</sup>, lo que sugiere que también los glucósidos son absorbidos en cierta medida. Los derivados glucósidos de la Quercetina son sustratos del transportador de glucosa dependiente de  $\text{Na}^+$  (SGLT-1) <sup>105</sup>, lo que implica la absorción de estos glucósidos mediada por SGLT-1.

A falta de absorción intestinal de los flavonoides glucósidos no implica la falta de efectos biológicos de estos compuestos en seres humanos. Durante mucho tiempo se ha argumentado que las enzimas de la microflora del colon pueden hidrolizar glucósidos flavonoides <sup>107</sup>.

Una vez que el aglicón es absorbido a través de la pared intestinal, los flavonoides son conjugados en el propio epitelio intestinal por metilación, sulfatación y/o glucuronidación <sup>108</sup>. Las reacciones de conjugación no sólo facilitan la excreción de los compuestos, sino que, además, como consecuencia de las mismas, en los tejidos humanos no van seguramente a sobrevivir compuestos con grupos *o*-dihidroxifenil, lo que afecta a su capacidad antioxidante y limita la formación de quinonas potencialmente tóxicas. Éste es un hecho muy relevante, ya que la mayor parte de los estudios sobre flavonoides se han realizado en sistemas *in vitro* utilizando compuestos intactos, cuyo destino fisiológico y actividad diferirán sustancialmente de los de los aglicones y las formas conjugadas <sup>108-109</sup>. Los flavonoides no absorbidos pasan al colon donde pueden ser metabolizados por la flora bacteriana. El colon posee un enorme potencial catalítico e hidrolítico <sup>110</sup>. Las reacciones de desconjugación tienen lugar rápidamente, liberando los aglicones de los flavonoides. Algunas bacterias son capaces también de hidrolizar los aglicones hacia compuestos fenólicos más sencillos, como ácidos fenilacéticos y fenilpropiónicos, que pueden ser absorbidos <sup>108, 111</sup>.

### 3.5 Interacción de la glicoproteína P (P-gp) con flavonoides

P-gp presenta una distribución tisular muy relacionada con la disposición de xenobióticos al estar localizada en la membrana apical de las células epiteliales de intestino, hígado, riñón y células endoteliales de la barrera hematoencefalica lo que influye notablemente en los procesos de absorción, distribución y eliminación de fármacos, ya que limita la biodisponibilidad oral y la distribución cerebral, por lo que facilita la excreción biliar y la eliminación renal de los fármacos <sup>112</sup>. Los primeros flavonoides descritos que interaccionaron con P-gp fueron los flavonoles kaempferol, galangina y Quercetina <sup>113</sup>.

Morris y Zhang (2006) en su revisión consideran que la mayoría de los flavonoides (agliconas) tienen un efecto inhibitor en el transporte mediado por P-gp. Estos flavonoides incluyen Quercetina, genisteína, biochanina A, morina, fletina, silimarina, crisina, flavona, hesperetina, naringina, 3,3,4,5,6,7,8-heptametoxyflavona, nobiletina, tangeretina y té verde; y los polifenoles epicatequina-galato, catequina-galato y epigallocatequina. Las interacciones de los flavonoides (glucósidos) tales como naringina, hesperidina y Rutina, con P-gp es menor <sup>112b</sup>

### 3.6 Interacción de MRP con flavonoides

MRP1 es un transportador de aniones orgánicos que incluyen fármacos conjugados con glutatión (GSH), glucuronatos o sulfatos. Además, participa en el transporte de aniones anfifílicos no conjugados, junto con el glutatión libre (GSH). Su expresión en los hepatocitos y en intestino es menor que la P-gp, por lo que su contribución total a la disposición de fármacos es limitada <sup>114</sup> fueron los primeros que demostraron que flavonoides como genisteína, biochanina A, apigenina y Quercetina actuaban como inhibidores del transporte mediado por MRP1.

Flavonoides como Quercetina, miricetina, apigenina y naringenina son capaces de estimular el transporte de GSH mediado por MRP1 <sup>115</sup>, por lo que se establece un posible mecanismo de control del MRP1 a través del control de la disponibilidad celular de GSH.

Las interacciones *in vivo* de los flavonoides con MRP1 no están totalmente establecidas, aunque se sabe que pueden alcanzar en el intestino  $CI_{50}$  tras la ingestión oral, su expresión es limitada y previsiblemente la inhibición sistémica puede ser de poca importancia <sup>101, 116</sup>.

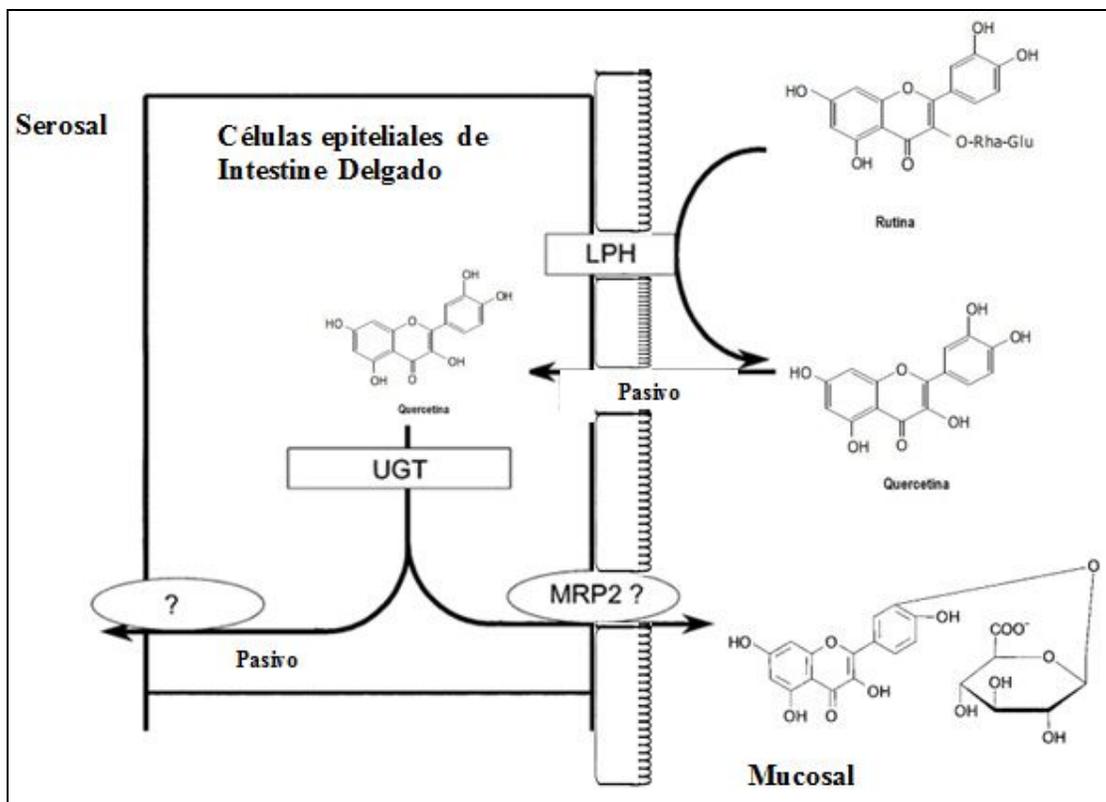


Figura 9. Mecanismo propuesto para la absorción de Quercetina <sup>117</sup>

MRP2 se localiza en la membrana apical de células epiteliales en hígado, intestino y en los túbulos proximales del riñón <sup>103a</sup>, por lo que puede alterar la biodisponibilidad oral y facilitar la excreción de sus sustratos (fig 9)

A pesar de las similitudes estructurales y de sustratos entre MRP1 y MRP2, los flavonoides pueden inhibir diferencialmente a los dos transportadores. La Quercetina que actúa como inhibidor del sustrato de MRP1 dinitrofenil glucurónico, no inhibe el citado transporte en el caso de MRP2 <sup>118</sup>; sin embargo, se ha publicado recientemente que los principales metabolitos de fase II de la Quercetina son potentes inhibidores tanto de MRP1 como de MRP2 <sup>119</sup>, así como de la interacción posicional de isómeros de la Quercetina con MRP2 <sup>120</sup>

Esto fue respaldado por estudios en saco intestinal evertido, en que la Rutina fue glucurónico y apareció en la cara serosal como Quercetina -3 y 7-glucorinados <sup>121</sup>. En otros estudios Boersma y col <sup>122</sup> reportaron Quercetina-glucurónico en cuatro posiciones, cuando incubaron la Quercetina en microsomas de intestino delgado, la posición 3' fue el sitio de más preferencia para la conjugación de glucuronizados, seguido por la posición 4'-,7 y 3. Además esto demuestra que la glucuronización de Quercetina en intestino delgado es selectiva para conjugados en el anillo B, razón por lo cual son excretado en el lumen <sup>123</sup>. El transportador MRP2 también puede transportar glucósidos aunque con menor afinidad <sup>124</sup>.

Todas las clases de flavonoides experimentan un metabolismo extenso en el yeyuno y el íleon del intestino delgado, incluso después de cocinarse, la mayoría de los glucósidos y agliconas flavonoides alcanzan el intestino delgado intactos, donde se metabolizan rápidamente a la forma metilada, glucoronizada o sulfatada de los metabolitos <sup>125</sup>.

## CONCLUSIONES

1. Desarrollar la técnica de cuantificación de flavonoides, Rutina y Quercetina, por cromatografía líquida de alta eficacia.
2. Establecer las condiciones experimentales, para el estudio de transporte de flavonoides, Rutina y Quercetina, **reactivo químico**, a través de la metodología de saco intestinal *in vitro*
3. Desarrollar la metodología de saco intestinal *in vitro* con un extracto vegetal de *Bolbo purpurascens* Cav con vistas a comprobar el transporte de flavonoides, Rutina y Quercetina, contenidos en el mismo.

**RECOMENDACIONES**

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pérez, M. M.; Monteagudo, E. E. J.; Boffil, M. C.; González, D. M. M.; Costa, L. E. D., Toxicidad aguda de un extracto acuoso de *Boldba purpurascens* Cav. en el modelo de sube y baja en ratas. *Rev Cubana Plant Med* **2008**, 13(2).
2. García-Nieto, L. P. In *Las plantas medicinales y aromáticas. Una alternativa de futuro para el desarrollo rural*, Boletín económico de ICE, España, España, 2000; pp 29-40.
3. Barquero, A. A. Plantas sanadoras: pasado, presente y futuro. *Revista Química Viva* [Online], 2007, p. 53-63. [www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)
4. WHO In *WHO traditional medicine strategy 2002-2005*, World Health Organization, Geneva, Geneva, 2002; p 74.
5. González, M.; Ramírez, D., Antecedentes y situación reguladora de la medicina herbaria en Cuba. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* **2007**, 118 - 124.
6. Rojas, N.; Matos, M.; Romeu, B., Actividad antibacteriana de *Boldba purpurascens* Cav. *Rev Cubana Plant Med* **2004**, 9(2).
7. González, D. M. Evaluación fitoquímica y farmacológica del extracto acuoso las hojas de la especie *Boldba purpurascens*, Cav. Universidad de la Habana, La Habana, 2006.
8. Castro, E. Á.; Cambeiro, F. O. Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. Universidad de Santiago, Santiago de Chile, 2003.
9. Katayoun, D.; Aidin, H.; Maryam, N., The Effects of PLGA Microparticles on Intestinal Absorption of P-gly-coprotein Substrate Using the Everted Rat Intestinal Sac Model. *Arch Pharm Res* **2011**, 34(11), 1989-1997.
10. (a) Laitinen, L. Caco-2 cell cultures in the assessment of intestinal absorption: Effects of some co-administered drugs and natural compounds in biological matrices. . Bachelors, University of Helsinki, Finland, Helsinki 2006; (b) Trapani, G.; Massimo, F.; Adriana, T.; Angela, L.; Andrea, L.; Enrico, G.; Silvia, M.; Gaetano, L. Frog Intestinal Sac: A New *In Vitro* Method for the Assessment of Intestinal Permeability *Journal of Pharmaceutical Sciences* [Online], 2004, p. 2909-2919. [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).
11. (a) Usansky, H.; Sinko, P., Estimating human drug oral absorption kinetics from Caco-2 permeability using an absorption-disposition model: Model development and evaluation and derivation of analytical solutions for ka and Fa. *J Pharmacol Exp Ther* **2005**, 314(4), 391-399; (b) Navarro-Fontestad, C.; González-Álvarez, I.; Casabó, V.; Merino, V.; Bermejo, M., Correlación entre modelos *in vitro*, *in situ* e *in vivo* en estudios de absorción. *MED. UIS* **2008**, 21(1), 17-31.
12. (a) Bock, U.; Günday, N.; Haltner, E. Comparison of MDCK cells transfected with the human MDR1 gene and the Caco-2 cell line as model of the human intestinal mucosa. 2009; (b) Sven, D.; Pieter, A.; Patrick, A., Drug Absorption Studies *In Situ*, *In Vitro* and *In Silico* Models. In *In Vitro Screening Models to Assess Intestinal Drug Absorption and Metabolism* [Online] Ehrhardt, C.; Kim, K.-J., Eds. American Association of Pharmaceutical Scientists: New York, 2008; pp. 185-205; (c) Eric, L. F.; Christophe, C.; Per, A.; David, B.; Gérard, F.; Pierre, G.; Francois, G.; Monique, R. In *In Vitro Models of the Intestinal Barrier*, The Report and Recommendations of The European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) Workshop 46., Paris, France, ATLA 26: Paris, France, 2001; pp 649-668.
13. Orlando, A. A. G.; Armando, C. C., Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar In *Revista Cubana de Plantas Medicinales* [Online] Ciudad de la Habana, 2008.
14. Pérez, M. M.; Sueiro, M. L.; Cruz, A. d. I.; Boffill, M. A.; Morón, F.; Méndez, O. R.; Cárdenas, J., Uso tradicional de plantas medicinales con acción diurética en el Municipio de Quemado de Güines, Cuba. *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol.)* **2011**, 59(4), 1859-1867.

15. Cordell, G. A.; Colvard, M. D., Some thoughts on the future of ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, (100), 5-14.
16. Gilani, A. H.; Atta-ur-Rahman, Trends in ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, 100, 43-49. .
17. Bermúdez, A.; Velásquez., D., Etnobotánica médica de una comunidad campesina del estado Trujillo, Venezuela: un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas. *Revista de la Facultad de Farmacia* **2002**, 44, 2-6.
18. Pushpam, K., Valuation of medicinal plants for pharmaceutical uses. *Curr Sci* **2004**, 86, 930-937.
19. López, I. L.; González, M. S.; Tena, J. A.; M.González, E. *Plantas Medicinales del Estado de Durango y Zonas Aledañas*; Instituto Politécnico Nacional.: México, 2004; p 209.
20. Maykel, P. M.; Mario, S. O.; Cárdenas, C. M. d. I. Á. B.; Francisco, M. R.; Evangelina, M. F., Validation of an *in vivo* method to assess the diuretic activity *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* **2011**, 30 (3), 332-344.
21. Roig, J., Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba. In *Editorial Científico -Técnica* [Online] La Habana, 1988.
22. Dequan, L., Nyctaginaceae. In *Fl. Republ* [Online] Popularis Sin, 1996.
23. Pérez, M. M.; Boffil, M. C.; González, D. M. M.; Monteagudo, E. E. J.; Méndez, R. T.; Luis E. Días Costa; Freiman Blanco Machado; Nieve Iglesias Rodríguez; Machado., B. V., Efecto de la administración oral continuada de *Boldoa purpurascens* Cav. sobre diferentes variables fisiológicas en ratas. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* **2009**, 8(3), 203-210.
24. Yannarys, H. O.; Niurka, M. D.; Mosquera, D. M. G., Estudio de la actividad hemolítica de los posibles taninos extraídos a partir de la *Boldoa purpurascens* Cav. *REDVET* **2006**, VII (10).
25. Vanadocha, B.; Guenechea, J.; Arteche, A., *Fitoterapia, Vademécum de prescripción de plantas medicinales*. . Masson: Barcelona, 2003; Vol. 4.
26. Winkel-Shirley, B., Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol* **2001**, 126, 485-93.
27. Sánchez, S. R. Flavonoides con actividad antitumoral: Identificación y estudio del mecanismo de acción. Universidad de las palmas de gran canaria, Las Palmas de Gran Canaria, 2009.
28. Pacheco, D. V. Análisis de flavonoides en plantas medicinales del sur de Chile con técnica HPLC. Universidad Austral de Chile, Valdivia Chile, 2004.
29. Gonzalo, J. C. R.; Alonso, M. G., Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante. *Alim. Nutri. Salud* **2002**, 9(2), 31- 38.
30. Martínez-Flórez, S.; González-Gallego, J.; Culebras, J. M.; Tuñón, M. J., Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr. Hosp* **2002**, XVII (6).
31. Martínez, A. Flavonoides. Universidad de Antioquia Medellín, 2005.
32. Sicaján, C. M. T. Caracterización y cuantificación de flavonoides, sapogeninas esteroidales en extractos de tres plantas mesoamericanas *Lippia Graveolens* (orégano), *Passiflora Edulis* (maracuyá) y *Smilax Domingensis* (zarzaparrilla). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, 2008.
33. Reyna, E.; Barbosa, C. Evaluación *in vivo* de la actividad anti-giardia y biotransformación *in vitro* de tres flavonoides de origen natural: Camperol, (-)-epicatequina y tilirósido. Instituto politecnico nacional, Mexico city, 2007.
34. Abrahamse, S.; Kloots, W.; Amelvoort, J., Absorption, distribution, and secretion of epicatechin and quercetin in the rat. *Nutrition Research* **2005**, 25, 305-317.
35. (a) Youdim, K.; Kaiser, M.; Begley, D.; Rice-Evans, C.; Abbott, N., Flavonoid permeability across an *in situ* model of the blood-brain barrier. *Free Radical Biology and Medicine* **2004**, 36, 592-604; (b) Andersen, Ø. M.;

- Markham, K. R., Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications. CRC, Taylor and Francis: Boca Raton, 2006.
36. Jiménez, C. I. E.; Martínez, E. Y. C.; Fonseca, J. G., Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM* **2009**, *52* (2), 73-75.
37. Rodríguez, M. E. J. Un ingrediente activo con acción antihelmíntica, a partir de las semillas de *Cucurbita moschata* Duch: Estudios analíticos y de preformulación. Universidad de la Habana, La Habana, 2006
38. ICH In *International Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures and Methodology, ICH-Q2 (R1)*. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use., Geneva, Geneva, 2005.
39. David, H., Modern Analytical Chemistry. Oberbroeckling, S. R., Ed. The McGraw-Hill Companies, Inc: Boston, 2000. [www.mhhe.com](http://www.mhhe.com).
40. CECMED. Validación de Métodos Analíticos. CECMED, La Habana, 2007.
41. Plá, D. J.; Martín, V. A., Absorción gastrointestinal. *Biofarmacia y farmacocinética* **1998**, *2*, 129-143.
42. Guyton, A.; Hall, J., Tratado de Fisiología Médica. 10 ed.; Mc Graw-Hill interamericana: Madrid (España), 2001.
43. Saladín, Anatomy & Physiology. . In *The Unity of Form and Function* [Online] The McGraw-Hill Companies: 2003.
44. Mark, E. T.; David, B., Pharmacology and Pharmacokinetics. In *Chapter 2: Pharmacokinetic Principles* [Online] Tomlin, M. E., Ed. Springer-Verlag London Limited: Southampton, UK, 2010; pp. 13-51. <http://www.springer.com/>.
45. Jackson, M., Drug transport across gastrointestinal epithelia, Physiology of the gastrointestinal tract. *New York: Raven Press* **1987**, 1597-1621.
46. Rang, H.; Dale, M.; Ritter, J.; Moore, P. *Farmacología* 2003, p. 244-247.
47. Swaan, P.; Oie, S.; Szoka, J. F., Carrier mediated oral drug delivery. *Adv. Drug Del Rev* **1996**, *20*, 1-4.
48. Stainer, R.; Ingraham, J.; Wheelis, M.; Painter, P., Entrada de nutrientes en la célula. In *Microbiología* [Online] Reverte Barcelona; pp. 211-215.
49. Balimane, P.; Chong, S., Cell culture-based models for intestinal permeability. *Drug Discov Today* **2005**, *10* (5), 335-343.
50. (a) Anders, K., Computational Pharmacokinetics. Shein-Chung Chow, P. D., Ed. Chapman & Hall/CRC: Lund, Sweden, 2008; pp. 1-156; (b) Neil, P.; Thierry, L., Oral Drug Absorption Prediction and Assessment. In *Computer Models for Predicting Drug Absorption* [Online] 2 ed.; B.Dressman, J.; Reppas, C., Eds. Marcel Dekker, Inc.: New York, 2010; pp. 338-352.
51. (a) Pankaj, D.; Dinesh, K. J.; Jacky, D. Standardization of an ex vivo method for determination of intestinal permeability of drugs using everted rat intestine apparatus *J Pharm Tox Met* [Online], 2011, p. 1-5. [www.elsevier.com/locate/jpharmtox](http://www.elsevier.com/locate/jpharmtox); (b) Miguel, A. C.; González, I.; Fernández, C.; Navarro, C.; Bermejo, M., A topological substructural approach for the prediction of P-glycoprotein substrates. *J Pharm Sci* **2006**, *95*, 589-606.
52. Perez, M.; Sanz, M.; Torres, L.; Avalos, R.; Gonzalez, M.; Diaz, H., A topological sub-structural approach for predicting human intestinal absorption of drugs. *Eur J Med Chem* **2004**, *39* (11), 905-16.
53. Annika, M.; Lasse, M.; Arto, U.; Kyösti, K., Drug permeation in biomembranes in vitro and in silico prediction and influence of physicochemical properties. *Eur J Pharm Sci* **2004**, *23*, 13-47.
54. Kerkhof, E. v. d.; Graaf, I. d.; Groothuis, G. In vitro methods to study intestinal drug metabolism. University of Groningen, The Netherlands, 2007.
55. Praveen V, B.; Saeho, C.; Richard A, M., Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *J Pharm Toxicol Met* **2000**, *44*, 301 - 312.

56. Sugano, K.; Noriyuki, T.; Minoru, M.; Kimitoshi, S.; Katsuhide, T. Prediction of passive intestinal absorption using bio-mimetic artificial membrane permeation assay and the paracellular pathway model. *International Journal of Pharmaceutics* [Online], 2002, p. 241-251. [www.elsevier.com/locate/ijpharm](http://www.elsevier.com/locate/ijpharm).
57. Manfred, K.; Frank, S.; Klaus, G., Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *American chemical society* **1998**, 41 (7), 1007-1010.
58. Fan, M.; Adeola, O.; Mcburney, M.; Chesseman, C., Kinetic analysis of L-glutamine transport into porcine jejunal enterocyte brush-border membrane vesicle. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **1998**, 121, 411-422.
59. Ronald, D. S.; Nishit, B. M., Pharmacokinetics in Drug Discovery and Development. In *Chapter 3: Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Discovery and Preclinical Development*. [Online] Schoenwald, R. D., Ed. CRC Press LLC: Boca Raton, Florida, 2002; pp. 57-69.
60. Stewart, B.; Chan, O.; Lu, R., Comparison of intestinal permeabilities determined in multiple in vitro and in situ models: relationship to absorption in humans. *Pharm Res* **1995**, 12, 693-699.
61. (a) Emoto, C.; Yamazaki, H.; Yamasaki, S.; Shimada, N.; Nakajima, M. Use of everted sacs of mouse small intestine as enzyme sources for the study of drug oxidation activities in vitro *Xenobiotica* [Online], 2000, p. 971-982 ; (b) Ballent, M.; Lifschitz, A.; Virkel, G.; Sallovitz, J.; Lanusse, C., Modulation of the P-glycoprotein-mediated intestinal secretion of ivermectin: in vitro and in vivo assessments. *Drug Metab Dispos* **2006**, 34, 457-63.
62. Audus, K.; Bartel, R.; Hidalgo, I.; Borchardt, R., The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharm Res* **1990**, 7, 435-51.
63. Karlsson, J.; Artursson, P., Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1991**, 175, 880-885.
64. Olavi, P.; Alan, R. B.; Ursula, G.-R., In vitro prediction of gastrointestinal absorption and Bioavailability. In *COST B 15*, Berlin, Germany, 2001; p 21.
65. Artursson, P., Cell cultures as models for drug absorption across the intestinal mucosa. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **1991**, 8, 305-330.
66. Hillgren, K.; Kato, A.; Borchardt, R., In vitro systems for studying intestinal drug absorption. *Med Res Rev* **1995**, 15, 83-109.
67. Braun, A.; Hämmerle, S.; Suda, K.; Rothen-Rutishauser, B.; Günthert, M.; Krämer, S.; Wunderli-Allenspach, H., Cell cultures as tools in biopharmacy. *Eur J Pharm Sci* **2000**, 11, 51-60.
68. (a) Lu, S.; Gough, A. W.; Bobrowski, W. F.; Stewart, B., Transport properties are not altered across Caco-2 cells with heightened TEER despite underlying physiological and ultrastructural changes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1996**, 85 (3), 8; (b) Gómez, G. Distribución tisular de transportadores de fármacos en tejidos normales y transformados. Papel en el sistema nervioso central. Universidad de Barcelona. , Bracelona, 2006.
69. Ballent, M.; Lifschitz, A.; Virkel, G.; Lanusse, C. Implicancias fisio-farmacológicas de la glicoproteína- P en animales domésticos *Analecta Veterinaria* [Online], 2005, p. 36-47.
70. Hunter, J.; Hirst, B., Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption. *Adv Drug Deliv Rev* **1997**, 25, 129-157.
71. Lennernas, H.; Ahrenstedt, O.; Hallgren, R.; Knutson, L.; Ryde, M.; Paalzow, L., Regional jejunal perfusion, a new in vivo approach to study oral drug absorption in man. *Pharm Res* : . **1992**, 9, 1243-1251.
72. Parvin, Z-M.; Hadí, V.; Ziba, I., Predicting Human Intestinal Permeability using Single-pass Intestinal Perfusion in rat. *J Pharm Pharmaceut Sci* **2007**, 10 (3), 368-379.

73. (a) Mohamed Ali, L.; Fathia, K.; Souad, S., Comparative Study of Two *In Vitro* Methods for Assessing Drug Absorption: Sartorius SM 16750 Apparatus Versus Everted Gut Sac. *J Pharm Pharmaceut Sci* **2011**, *14*(1), 117-127; (b) Lacombe, O.; Woodley, J.; Solleux, C.; Delbos, J. M.; Boursier-Neyret, C.; Houin, G., Localisation of drug permeability along the rat small intestine, using markers of the paracellular, transcellular and some transporter routes. *Eur. J. Pharm. Sc* **2004**, *23*, 385-391.
74. Shah, W.; Rane, N.; M.B.Kekare; Vaidya, V., Estimation of two bioactive compounds from *Azadiracta indica* A.juss. Leaves using HPLC. *J. Pharma and Bio sciences* **2010**, *1*(2), 1-7.
75. (a) Ruan, L-P.; Chen, S.; Yu, B.-Y.; Zhu, D.-N.; Cordell, G. A.; Qiu, S. X. Prediction of human absorption of natural compounds by the non-everted rat intestinal sac model 2006, p. 605-610. <http://france.elsevier.com/direct/ejmech>; (b) Chellampillai, B.; Atmaram, P. P.; Ganesh, Y. D.; Prajakt, P. J.; Karimunnisa, S. S., Novel solvent-free gelucire extract of *Plumbago zeylanica* using non-everted rat intestinal sac method for improved therapeutic efficacy of plumbagin. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **2012**, 1-8; (c) Xin-Li, L.; Zheng-Gen, L.; Jing-Yun, Z.; Guo-Wei, i. Z.; Ming, Y.; Rong-Li, Y.; Yun-Chao, C.; Jing, Z. The absorption characterization effects and mechanism of *Radix Angelicae dahuricae* extracts on baicalin in *Radix Scutellariae* using in vivo and in vitro absorption models *Journal of Ethnopharmacology* [Online], 2011, p. 52-57. [www.elsevier.com/locate/jethpharm](http://www.elsevier.com/locate/jethpharm).
76. Office, M. *Microsoft Office Excel*, 2010.
77. (a) S.Adhyapak, S., Comparison of extraction techniques for quantitative determination of rutin from *Morus alba* linn. by reverse phase high performance liquid chromatography. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* **2011**, *2*(1), 750-757; (b) Phani, C. R. S.; Vinaykumar, C.; Rao, K. U.; Sindhuja, G., Quantitative Analysis of Quercetin in Natural Sources by RP-HPLC *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences* **2010**, *1*(19-22); (c) Yongqiang, Z.; Weize, L.; Lvyi, C.; Shuwei, M.; Li, P.; Zhongjin, Y. Enhancement of intestinal absorption of akebia saponin D by borneol and probenecid *in situ* and *in vitro*. 2010, p. 229-234. [www.elsevier.com/locate/etap](http://www.elsevier.com/locate/etap).
78. (a) Varona, J.; Escribano, E.; Martín-Calderón, J., Fenobarbital: farmacocinética, toxicología y monitorización por el Laboratorio *Rev Diagn Biol* **2001**, *50*(1), 1; (b) Yasushi, H.; Manami, F.; Kenji, S.; Yasuo, H.; Toshiharu, Y., Method for Screening and Quantitative Determination of Serum Levels of Salicylic Acid, Acetaminophen, Theophylline, Phenobarbital, Bromvalerylurea, Pentobarbital, and Amobarbital Using Liquid Chromatography/Electrospray Mass Spectrometry. *Biol. Pharm. Bull* **2006**, *29*(1), 7-13; (c) Celina, M. M.; Mario, R. D.; María, d. C. S.; Mario, R. D., Phenobarbital in pharmaceutical tablets by modified Conductimetric analysis. *The Journal of the Argentine Chemical Society* **2009**, *96*(1-2), 101-110.
79. Ishii, K.; Furuta, T.; Kasuya, Y., Determination of rutin in human plasma by high-performance liquid chromatography utilizing solid-phase extraction and ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B* **2001**, *759*, 161-168.
80. Zu, Y.; Li, C.; Fu, Y.; Zhao, C., Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, *41*, 714-719.
81. Kumar, A.; Lakshman, K.; Jayaveera, K. N.; Krishna, N. V.; Manjunath, M.; Suresh, M. V., Estimation of Rutin and Quercetin in *Amaranthus viridis* Linn by HPLC. *Asian J. Exp. Sci* **2009**, *23*(1), 51-54.
82. Ming, L.; Luqin, S.; Hongping, P.; Abdullah, K. R.; Fang, Y.; Jun, Q.; Gao, L., Excipients enhance intestinal absorption of ganciclovir by P-gp inhibition: Assessed *in vitro* by everted gut sac and *in situ* by improved intestinal perfusion. *international Journal of Pharmaceutics* **2010**, *403*, 37-45.
83. Bohets, H.; Annaert, P.; Mannens, G.; Van Beijsterveldt, L.; Anciaux, K.; Verboven, P., Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Curr Top Med Chem* **2001**, (1), 367-383.
84. Shishu, M. M. Comparative bioavailability of curcumin, turmeric and Biocurcuma in traditional vehicles using non-everted rat intestinal sac model. 2010, p. 60-65. [www.elsevier.com/locate/jff](http://www.elsevier.com/locate/jff).

85. Brigitte, A. G.; Clement, A.; G, D. G.; Paul, E. M.; Chung-Yen, C.; B.Blumberg, J., Rat Gastrointestinal Tissues Metabolize Quercetin. *J.Nutr* **2006**, *136*, 39-44.
86. (a) Liu, Y.; Hu, M., Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 cell culture model and a perused rat intestinal model. *Drug metabolism and disposition* **2001**, *30* (4), 370-377; (b) Junfeng, S.; Changjiang, G.; Jingyu, W.; Jijun, Y., Study on the absorption of quercetin and rutin at different segments of intestine. *Journal of Hygiene Research* **2002**, *31* (1), 55-7; (c) Cai-fu Xue; Jian-ming Guo; Da-wei Qian, J.; in-ao Duan; Shu, Y., Absorption of flavonoids from *Abelmoschus manihot* extract by in situ intestinal perfusion. *Acta pharmaceutica Sinica* **2011**, *46*(4), 454-9.
87. Hwang, H. Quantitative structural activity relationship of flavonoids: studies of antioxidant properties and human intestinal permeability. The University of Georgia Athens, 2008.
88. Chen, Y.; Zhao, Y. H.; Jia, X. B.; Hu, M., Intestinal Absorption Mechanisms of Prenylated Flavonoids Present in the Heat-Processed *Epimedium koreanum* Nakai (*Yin Yanghuo*). *Pharm Res* **2008**, *25*(9), 2190-2199.
89. Carbonaro, M.; Grant, G., Absorption of quercetin and rutin in rat small intestine. *Ann Nutr Metab* **2005**, *49*(3), 178-82.
90. Richard A .Walgren; Karl J. Kamaky JR.; George E.Lindenmayer; Thomas Walle, Efflux of Dietary Flavonoid Quercetin 4'-Glucoside across Human Intestinal Caco-2 Cell Monolayers by Apical Multidrug Resistance-Associated Protein-2. *JPET* **2000**, *294*, 830-836.
91. Andlauer, W.; Stumpf, C.; Furst, P., Intestinal absorption of rutin in free and conjugated forms. *Biochemical Pharmacology* **2001**, *62*, 369-374.
92. Conrad, R.; Hilgers, A.; Ho, N.; Burton, P., The influence of peptide structure on transport across Caco-2 cells. *Pharm Res* **1991**, *8*, 1453-1460.
93. Chen, Y.; Wang, J.; Jia, X.; Tan, X.; Hu, M., Role of Intestinal Hydrolase in the Absorption of Prenylated Flavonoids Present in *Yinyanghuo* *Molecules* **2011**, *16*, 1336-1348.
94. (a) Morand C; Manach C; Crespy V; Remesy C, Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radic Res* **2000**, *33* (5), 667-76; (b) Bernardino García Ramírez. Absorción *in vivo* de oligómeros de epicatequina Universitat Rovira i Virgili, Barcelona, 2005.
95. Hollman PC; Hertog MG; Katan MB, Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chem* **1996**, *57*, 43-6.
96. Day AJ; DuPont MS; Ridley S; M, R.; Rhodes MJ; Morgan MR; Williamson G, Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett* **1998**, *436*(1), 71-5.
97. Day AJ; Canada FJ; Diaz JC; Kroon PA; Mclauchlan RW; Faulds CB; Plumb GW; Williamson G, Dietary Flavonoid and Isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS Lett* **2000**, *468*, 166-170.
98. Day AJ; Gee JM; DuPont MS; Johnson IT; Williamson G, Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochem Pharmacol* **2003**, *65*(7), 1199-206.
99. Walgren, R. A.; Jiann-Trzuo, L.; Kinne, R.-H.; Walle, T., Cellular Uptake of Dietary Flavonoid Quercetin 4'-Glucoside by Sodium-dependent Glucose Transporter SGLT1. *JEPT* **2000**, *294*, 837-843.
100. (a) Havsteen, B., The biochemistry and medical significance of the flavonoids *Pharmacol Ther* **2002**, *96*, 67-202; (b) Morris, M.; Zhang, S., Flavonoid-drug interactions: Effects of flavonoids on ABC transporters. *Life Sci* **2006**, *7*, 2116-2130; (c) Moon, Y.; Wang, X.; Morris, M., Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro* **2006**, *20*, 187-210
101. Hendrich, S., Bioavailability of isoflavones. *J Chromatogr B* **2002**, *777*(1-2), 203-210.

102. Robert Barrington; Gary Williamson; Richard N Bennett; Barry D Davis; Jennifer S Brodbelt; Kroon, P. A., Absorption, Conjugation and Efflux of the Flavonoids, Kaempferol and Galangin, Using the Intestinal CACO-2/TC7 Cell Model. *J Funct Foods* **2009**, 1 (1), 74-87.
103. (a) Álvarez De Felipe, A. I.; Pulido Duarte, M. M., Transportadores de tipo ABC: consecuencias de su interacción con flavonoides *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* **2008**, 7 (6), 296-311; (b) Nemeth K; Plumb GW; Berrin J; Juge N; Jacob R; Naim HY; Williamson G; Swallow DM; Kroon PA, Deglycosylation by small intestinal epithelial cell  $\alpha$ -glucosidase is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European Journal of Nutrition* **2003**, 42, 29-42.
104. Henry C; Vitrac X; Decendit A; Ennamany R; Krisa S; Merillon J, Cellular uptake and efflux of transpiceid and its aglycone trans-resveratrol on the apical membrane of human intestinal Caco-2 cells. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **2005**, 53, 798-803.
105. Reinboth M; Wolfram S; Abraham G; Ungemach FR; R., C., Oral bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides in dogs. *Br J Nutr* **2010**, 104(2), 198-203.
106. (a) Chi-Yu Yang; Su-Lan Hsiu; Kuo-Ching Wen; Shiuan-Pey Lin; Shang-Yuan Tsai; Yu-Chi Hou; Pei-Dawn Lee Chao, Bioavailability and Metabolic Pharmacokinetics of Rutin and Quercetin in Rats. *Journal of Food and Drug Analysis* **2005**, 13(3), 244-250; (b) Ao. HS; Chen XJ; Li SP; Wang YT; Zheng Y, Biotransformation and Disposition of Xenobiotics: *In vitro* studies on the intestinal absorption mechanisms of flavonoides in *Herba epimedii* using Caco-2 monolayer model. In *International Society for the study of Xenobiotics* Hinson, J. A., Ed. Shanghai, China, 2008; Vol. 40.
107. Kenneth DR Setchell; Nadine M Brown; Linda Zimmer-Nechemias; Wayne T Brashear; Brian E Wolfe; Abby S Kirschner; James E Heubi Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. <http://www.39kf.com/cooperate/qk/American-Society-for-Nutrition/027602/2008-12-28-550476.shtml> (accessed 1-10).
108. Buelga, C. S. In *Implicaciones en la salud de los polifenoles de la dieta.*, V Congreso Internacional. Alimentación, nutrición y dietética, 2008.
109. (a) Lindsay, D.; Clifford, M., Special issue devoted to critical reviews produced within the EU concerted action 'Nutricional Enhancement of Plant-based Food in European Trade'. *J. Sci. Food Agric* **2000**, 80, (b) Randi L. Edwards; Tiffany Lyon; Sheldon E. Litwin; Alexander Rabovsky; J. David Symons; Thunder Jalili, Quercetin reduces blood pressure in hypertensive subjects. *J. Nutr* **2007**, 137, 2405-2411.
110. Lu XY; Sun DL; Chen ZJ; Chen T; Li LP; Xu ZH; Jiang HD; S., Z., Relative contribution of small and large intestine to deglycosylation and absorption of flavonoids from *Chrysanthemum morifolium* extract. *J Agric Food Chem* **2010**, 58(19), 10661-7.
111. Joaquín Rodrigo García; Gaspar Ros Berruezo; María Jesús Periago Castón; Francisco Molinar Holguín; Fernando Plenge Tellechea; Valverde, I. M., La importancia nutricional de los antioxidantes vegetales: composición química, absorción, metabolismo y actividad biológica. *Biomedicina y biología experimental* **2000**, 1 (2), 37-44.
112. (a) Di-Pietro, A.; Conseil, G.; Pérez-Victoria, J.; Dayan, G.; Baubichon-Cortay, H.; Trompier, D.; Steinfels, E.; Jault, J., Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters *Cell Mol Life Sci* **2002**, 59, 307-322; (b) Zhang, S.; Morris, M., Effects of the flavonoids biochanin A, morin, phloretin and silymarin on P-glycoprotein-mediated transport. *J Exp Pharmacol Ther* **2003**, 304, 1258-1267.
113. Phang, J.; Poore, C.; Lopaczynska, J.; Yeh, G., Flavonol stimulated efflux of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene in multidrug-resistant breast cancer cells *Cancer Res* **1993**, 53, 5977-5981.

114. Versantvoort, C.; Schuurhuis, G.; Pinedo, H.; Eekman, C.; Kuiper, C.; Lankelma, J.; Broxterman, H., Genistein modulates the decreased drug accumulation in non-P-glycoprotein mediated multidrug resistant tumour cells. *Br J Cancer* **1993**, *68*, 939-946.
115. (a) Leslie, E.; Mao, Q.; Oleschuk, C.; Deeley, R. G.; Cole, S., Modulation of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) transport and ATPase activities by interaction with dietary flavonoids. *Mol Pharmacol* **2001**, *59*, 1171-1180; (b) Leslie, E.; Deeley, R.; Cole, S., Bioflavonoid stimulation of glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *Drug Metab Dispos* **2003**, *31*, 11-15.
116. Setchell, K.; Brown, N.; Desai, P.; Zimmer-Necherias, L.; Wolfe, B.; Brashear, W.; Cassidy, A.; Heubi, J., Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* **2001**, *131*, 1362-1375.
117. Petri, N.; Tannergren, C.; Holst, B.; Mellon, F. A.; Bao, Y.; W.Plumb, G.; Bacon, J., Absorption/metabolism of sulforaphane and quercetin, and regulation of phase ii enzymes, in human jejunum *in vivo* *Drug Metab Dispos* **2003**, *31* (6), 805-813.
118. vanZanden, J.; Geraets, L.; Wortelboer, H.; vanBladeren, P.; Rietjens, I.; Cnubben, N., Structural requirements for the flavonoid mediated modulation of glutathione S-transferase P1-1 and GS-X pump activity in MCF7 breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* **2004**, *67*, 1607-1617.
119. vanZanden, J.; Woude, H. v.-d.; Vaessen, J.; Usta, M.; Wortelboer, H.; Cnubben, N.; Rietjens, I., The effect of quercetin phase II metabolism on its MRP1 and MRP2 inhibiting potential. *Biochem Pharmacol* **2007**, *74*, 345-351.
120. Williamson, G.; Aeberli, I.; Miguet, L.; Zhang, Z.; Sanchez, M.; Crespy, V.; Barron, D.; Needs, P.; Kroon, P.; Glavinis, H., Interaction of positional isomers of quercetin glucuronides with the transporter ABCG2 (cMOAT, MRP2). *Drug Metab Dispos* **2007**, *35*, 1262-1268.
121. Gee JM; DuPont MS; Day AJ; Plumb GW; Williamson G; Johnson IT, Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the Hexose transport pathway. *J Nutr* **2000**, *130*, 2765-2771.
122. Boersma MG; van derWoude H; Bogaards J; Boeren S; Vervoort J; Cnubben NH; van Iersel ML; van Bladeren PJ; Rietjens IM, Regioselectivity of phase II metabolism of luteolin and quercetin by UDP-glucuronosyl transferases. *Chem Res Toxicol* **2002**, *15*, 662-670.
123. Benavente-Garcia, O.; J-Castillo, Actualización sobre los usos y propiedades anticáncer, protectoras del sistema cardiovascular y anti-inflamatorias de los flavonoides de *Citrus*. *J. Agric. Food Chem* **2008**, 1-12.
124. Vaidyanathan, J.; Walle, T., Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-) epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *J Pharmacol Exp Ther* **2003**, *307*, 745-752.
125. Fernando, P. S.; Fernández, A. C., Polifenoles de aplicación en farmacia. *Fitoterapia* **2005**, *24* (8), 85-94.
126. Díaz, I. F. C. Tubo digestivo. <http://www.monografias.com/trabajos82/tubo-digestivo/tubo-digestivo.shtml> (accessed 13-4-2012).

## ANEXO



Clasificación taxonómica de *Boldoa purpurascens* Cav

Nombre Científico: *Boldoa purpurascens*, Cav

Familia: *Myrtaginaceae*

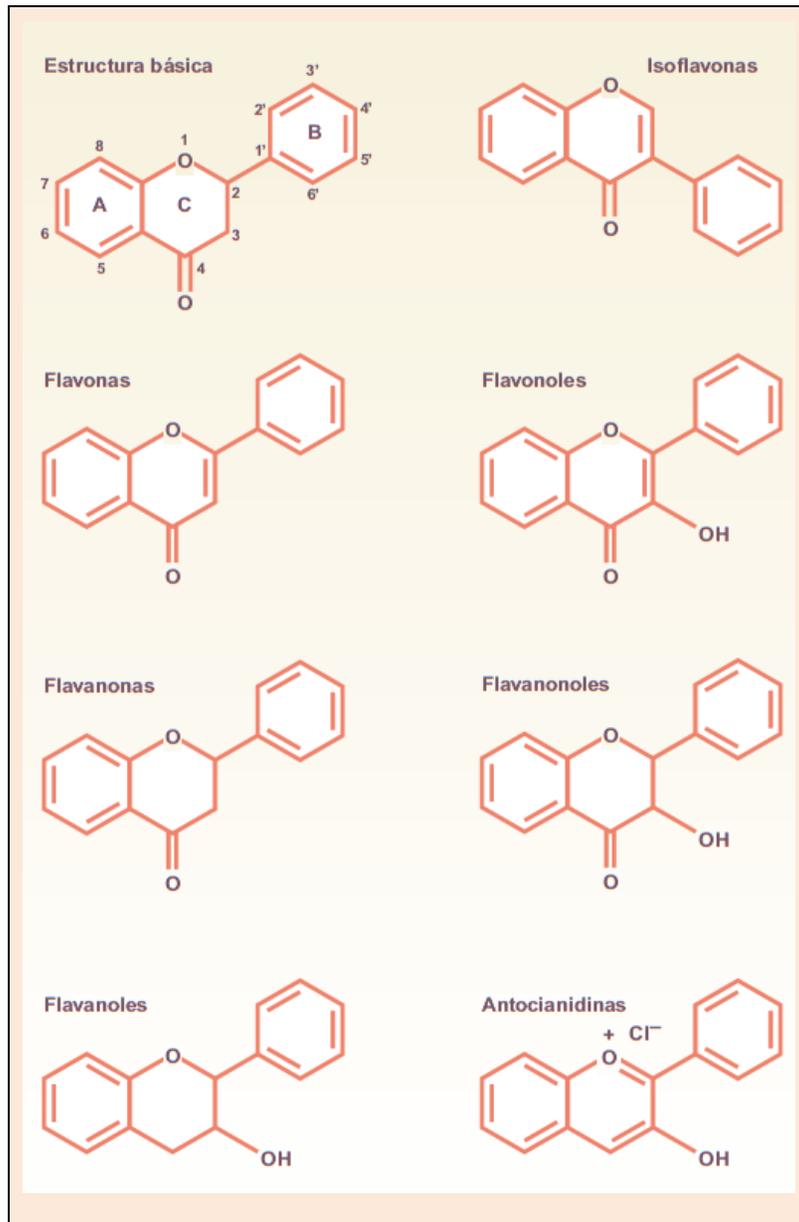
Sinonimia: *Cryptocarpus globosus* H.B.K, *Salpianthus purpurascens* Hook & Arn, *Boldoa ovatifolia* Lag,

Género: *Boldoa* Endl

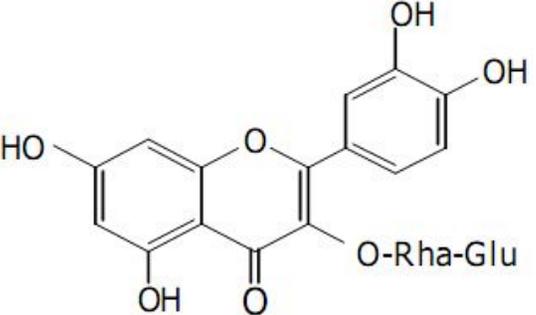
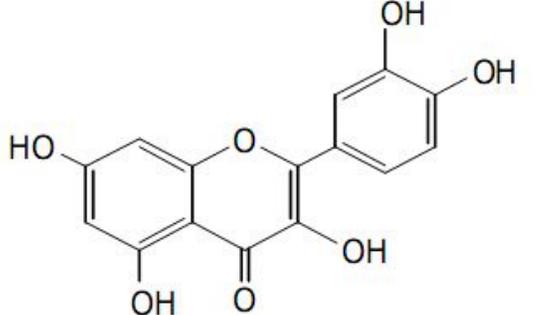
División: *Magnoliopsida* Especie: *Boldoa purpurascens*

Subclase: *Magnoliophyta*

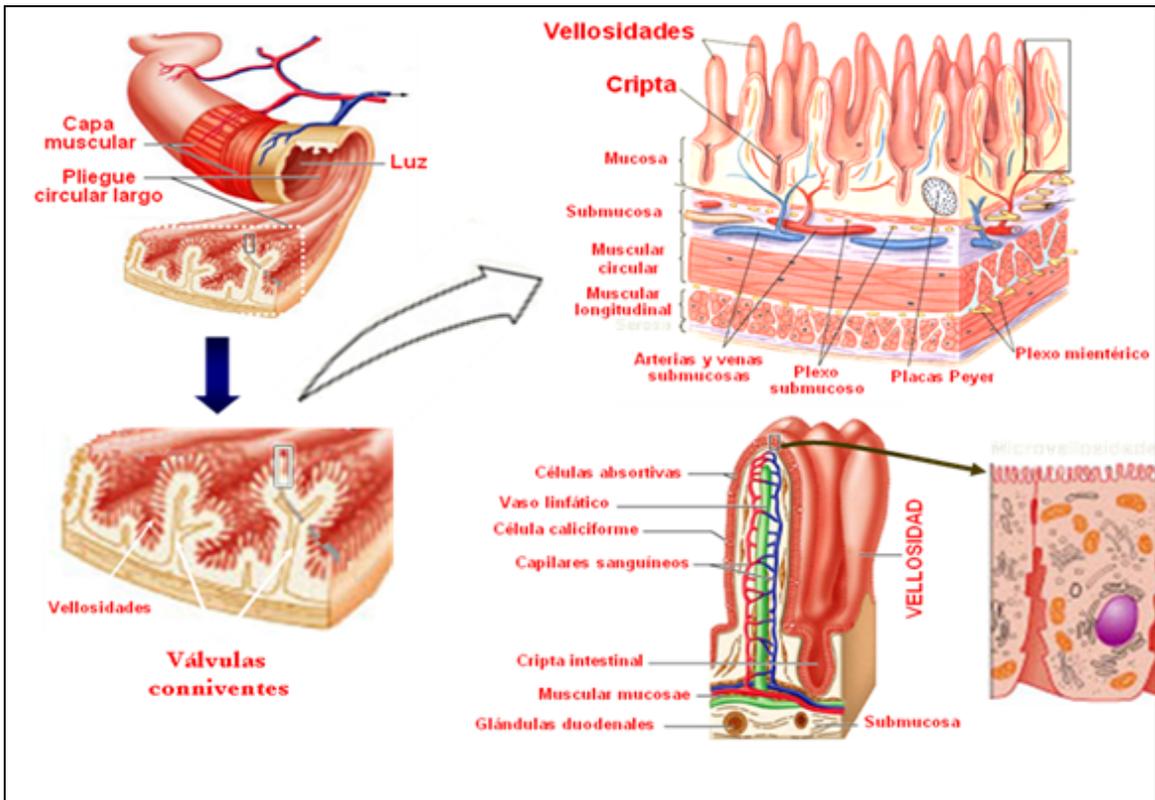
**Anexo 1:** Hojas de *Boldoa purpurascens* Cav. y clasificación taxonómica.



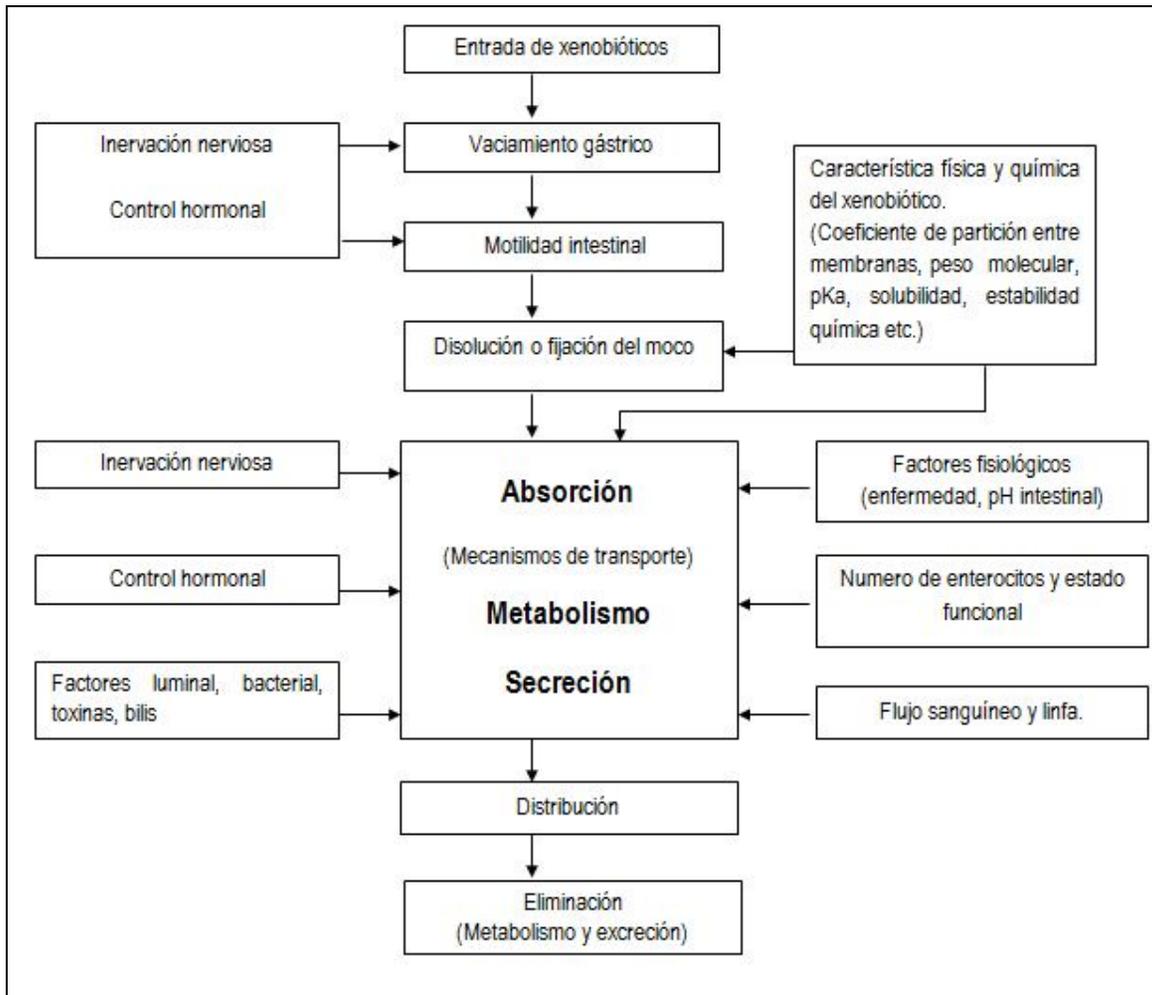
**Anexo 2:** Estructura química básica de los flavonoides y de las distintas subfamilias.

Compuesto	Estructura	Masa molecular (g/mol)	Log P	Punto de fusión
Rutina	 <p style="text-align: center;"><b>Rutina</b></p>	$C_{28}H_{10}O_{16}$ 610,57	0,68	242 °C
Nombre IUPAC: 2-(3,4-dihidroxifenil)-5,7-dihidroxi-3-(((2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroxi-6-(((2R,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroxi-6-metiloxan-2-il]oxi)metil)oxan-2-il]oxi)-4H-cromen-4-ona				
Quercetina	 <p style="text-align: center;"><b>Quercetina</b></p>	$C_{15}H_{10}O_7$ 302,25	1,75	316 °C
Nombre IUPAC: 2-(3, 4- dihidroxifenil)- 3,5,7- trihidroxi- 4H- cromen- 4-ona				

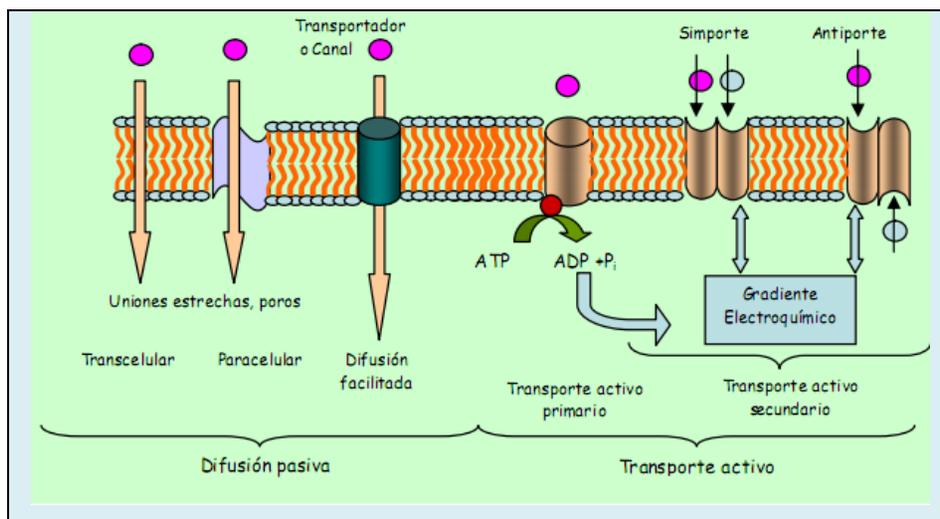
**Anexo 3:** Propiedades físicas de los patrones



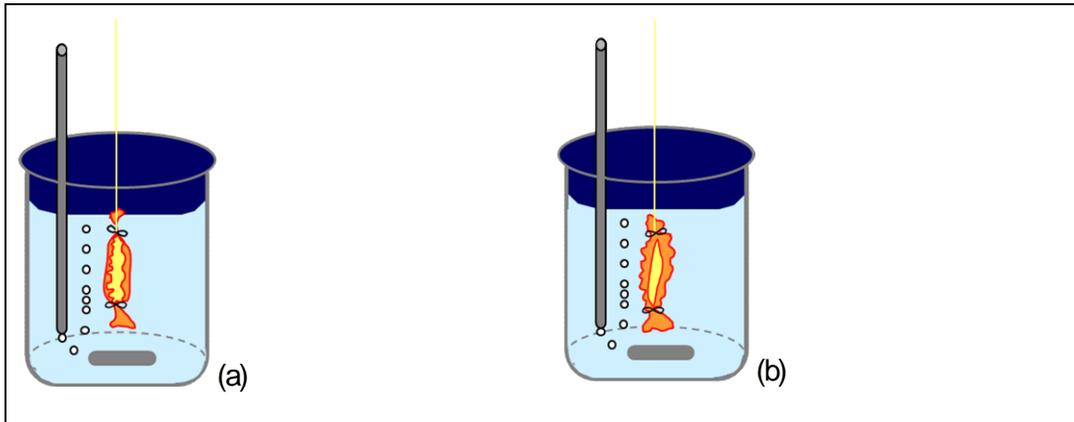
**Anexo 4:** Esquema de las distintas modificaciones existentes en el intestino



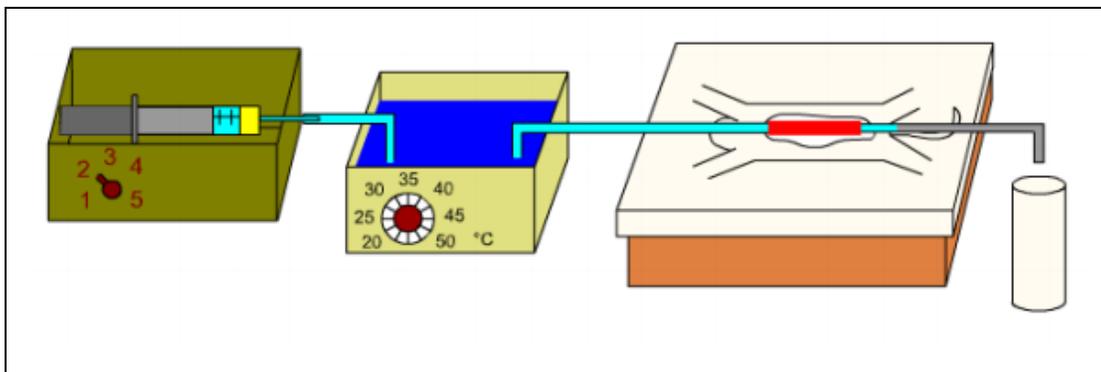
**Anexo 5:** Factores que afectan la absorción intestinal <sup>12c</sup>.



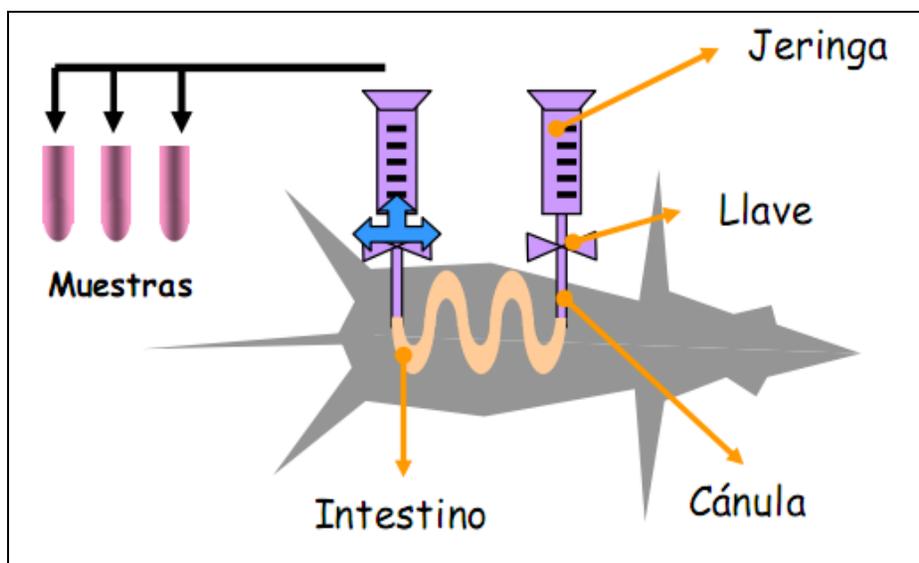
**Anexo 6:** Las rutas y mecanismos de absorción de moléculas por el epitelio intestinal.



**Anexo 7:** Método de saco intestinal *in vitro*, saco intestinal aislado (a); saco intestinal evertido (b).



**Anexo 8:** Esquema de la técnica de perfusión de paso único en rata *in situ*.



**Anexo 9:** Esquema de la técnica de perfusión sin recirculación basada en el método de Doluisio.