

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

---

---

**FACULTAD DE FARMACIA**

**Estudio de biodisponibilidad de un análogo  
tetrazol del ácido clofibrico  
(ATAC) con efecto antidiabético en un  
modelo animal**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN FARMACIA**

**PRESENTA:**

**M. en C. NANCY VARA GAMA**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. JULIO CESAR RIVERA LEYVA**

**CUERNAVACA , MORELOS, NOVIEMBRE 2018**

# OFICIO DE ASIGNACION DE JURADO



FACULTAD DE FARMACIA  
Consejo Interno de Posgrado

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., a 15 de noviembre de 2018  
Folio: FF/D/SAC/CIP/DF/109/2018

**M. C. NANCY VARA GAMA**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO**  
**PRESENTE**

Por este conducto le informo que Consejo Interno de Posgrado en la sesión del 9 de mayo de 2018, le asignó el siguiente jurado para presentar la defensa oral de la tesis titulada:

**“Estudio de biodisponibilidad de un análogo tetrazol del ácido clofibrico (ATAC)  
con efecto antidiabético en un modelo animal”**

<b>Dra. Verónica Rodríguez López</b>	<b>PRESIDENTE</b>
<b>Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez</b>	<b>SECRETARIO</b>
<b>Dr. Luis Alfonso Moreno Rocha</b>	<b>VOCAL 1</b>
<b>Dr. Antonio Monroy Noyola</b>	<b>VOCAL 2</b>
<b>Dra. Alicia Romualda Reyes Arellano</b>	<b>VOCAL 3</b>
<b>Dr. Samuel Enoch Estrada Soto</b>	<b>VOCAL 4</b>
<b>Dra. Helgi Francisca Jung Cook</b>	<b>VOCAL 5</b>

De acuerdo al Artículo 101º (Reglamento General de Posgrado). - *Será requisito previo al examen de grado, que los integrantes de la Comisión Revisora, emitan su voto y opinión favorables en términos de que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente. Lo cual no compromete el dictamen de la evaluación de examen.*

Asimismo, le recuerdo que es responsabilidad de usted enviar los respectivos ejemplares a su comité sinodal y dar seguimiento a las correspondientes revisiones para poder concluir este importante proceso.

Sin más por el momento, me despido de usted, no sin antes felicitarla por estar próxima a obtener el título de Doctora en Farmacia.

Atentamente  
**Por una humanidad culta**  
*Una universidad de excelencia*

**DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA**  
**JEFE DE POSGRADO**



C.c.p. Dra. Verónica Rodríguez López, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, Dr. Luis Alfonso Moreno Rocha, Dr. Antonio Monroy Noyola, Dra. Alicia Romualda Reyes Arellano, Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, Dra. Helgi Francisca Jung Cook.  
C.c.p. archivo

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, 1er. Piso Torre de Rectoría,  
Tel. (777) 329 701 1, 329 70, 00, Ext. 3582 / administracion@uaem.mx



*Una universidad de excelencia*

RECTORÍA  
20/11/2018

## **AGRADECIMIENTOS**

- A CONACyT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado con número de becario 211421.
- A la Dirección General de Apoyo a la Investigación y Posgrado (DAIP, o la Oficina de Apoyo General para Estudios de Investigación y Posgrado) en la Universidad de Guanajuato.
- Al Dr. Julio Cesar Rivera Leyva por llevar a cabo la dirección del proyecto de investigación, así como prestar las instalaciones del laboratorio número 4 de la Facultad de Farmacia de la UAEM donde se realizaron las actividades experimentales del proyecto.
- A todos y cada uno de los compañeros del laboratorio número 4 de la Facultad de Farmacia de la UAEM por todo el apoyo brindado durante la realización del proyecto.
- Al Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública por proporcionar los animales requeridos en el proyecto.
- A los miembros del jurado evaluador por todas las sugerencias realizadas para enriquecer el contenido esta tesis.
- A mi comité tutorial integrado por los siguientes doctores: Dra. Inés fuentes Noriega, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez y Dr. Luis Manuel Orozco Castellanos por las asesorías brindadas para la mejora y realización del proyecto.
- A mi familia y amistades cercanas que siempre han estado para apoyarme en cada proyecto de vida.

## ÍNDICE GENERAL

OFICIO DE ASIGNACION DE JURADO.....	1
AGRADECIMIENTOS .....	2
ÍNDICE GENERAL .....	3
INDICE DE ILUSTRACIONES.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	11
1.- ABSTRACT .....	12
2.- RESUMEN .....	13
3.- INTRODUCCIÓN .....	14
4.- ANTECEDENTES.....	16
4.1.- Diabetes tipo 2 (DT2).....	16
4.1.2.- Manifestaciones clínicas, diagnóstico y complicaciones de la DT2.....	16
4.1.3.-Tratamiento actual de la DT2 y complicaciones asociadas a dicha enfermedad.....	17
4.2.- Tipos de dislipidemias. ....	18
4.2.1.-Clasificación de dislipidemias.....	19
4.2.2.-Diagnóstico de la dislipidemia asociada a DT2 .....	19
4.2.3.-Tratamiento de las dislipidemias. ....	20
4.2.4.-Tratamiento no farmacológico .....	20
4.2.5.-Tratamiento farmacológico de la dislipidemia.....	20
4.3.- Fibratos.....	21
4.3.1.-Aplicación terapéutica de los fibratos .....	22
4.3.2.- Reacciones adversas de los fibratos .....	22

4.3.3.- Mecanismo de acción de los fibratos .....	22
4.3.4.- Propiedades farmacocinéticas de los fibratos .....	23
4.3.5.- Propiedades fisicoquímicas de los fibratos.....	23
4.3.6.- Actividad farmacológica y mecanismos de acción del ácido clofíbrico .....	24
4.3.7.- Fibratos y su actividad antidiabética .....	24
4.4.- Fármacos con actividad dual (hipolipemiantes y antidiabéticos) .....	25
4.4.1.- El reemplazo bioisostérico.....	25
4.4.2.-Reemplazo bioisostérico de fibratos .....	25
4.5.- Estudios farmacocinéticos y biodisponibilidad.....	26
4.5.1.- Efectos del estado diabético en la biodisponibilidad de los fármacos .....	27
4.6.- Metabolismo de fármacos.....	27
4.6.1.- Estudios de metabolismo.....	28
4.7.- Estudio de distribución tisular .....	28
4.8.- Evaluación de Diabetes Mellitus (DM) no insulino dependiente en animales. ....	29
5.- JUSTIFICACIÓN.....	29
6.- HIPÓTESIS.....	31
7.- OBJETIVO GENERAL.....	31
7.1.- OBJETIVOS PARTICULARES .....	32
8.- METODOLOGIA.....	32
8.1.- Determinación de pKa.....	32
8.1.1.- Preparación de muestras.....	32
8.2.- Determinación potenciométrica .....	33
8.3.- Determinación de Log D .....	33
8.3.1.- Análisis de las muestras.....	34
8.4.- Determinación de permeabilidad aparente (P app) .....	34

8.4.1.- Modelo de saco invertido de rata .....	34
8.4.2.- Análisis de las muestra. ....	36
8.5.- Método analítico para cuantificar ATAC en plasma.....	36
8.5.1.- Material y equipos.....	36
8.5.2.- Reactivos.....	37
8.6.- Preparación de soluciones.....	37
8.6.1.- Solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M.....	37
8.6.2.- Soluciones utilizadas en la técnica de extracción sólido-líquido.....	37
8.6.3.- Plasma de rata.....	38
8.6.4.- Preparación de las soluciones estándar, curva de calibración y puntos control para el ATAC en plasma de rata. ....	38
8.6.5.- Solución estándar del análogo tetrazol del ácido clorfibrico (ATAC) a una concentración de 1000 µg/mL. ....	38
8.6.6.- Solución estándar de Mebendazol (estándar interno) a una concentración de 1000 µg/mL. ....	38
8.6.7.- Solución estándar de Mebendazol (estándar interno) a una concentración de 200 µg/mL .....	38
8.7.- Preparación de la curva de calibración del ATAC en plasma de rata. ....	39
8.7.1.- Curva de calibración .....	40
8.7.2.- Adición del estándar interno (mebendazol) .....	40
8.7.3.- Preparación curva en solución del ATAC .....	40
8.7.4.- Preparación curva en plasma .....	41
8.8.- Preparación de los puntos control de calidad .....	41
8.8.1.- Adecuabilidad.....	41
8.9.- Procedimiento de extracción en fase sólida.....	42
8.10.- Validación del método analítico para cuantificar el ATAC por HPLC .....	43

8.11.- Estudios de biodisponibilidad .....	45
8.11.1.- Estudio de administración intravenosa y oral en rata .....	46
8.11.2.- Cirugía en arteria caudal .....	46
8.11.3.- Soluciones de administración .....	47
8.11.4.- Administración intravenosa y oral.....	47
8.11.5.- Toma de muestras .....	47
8.11.6.- Análisis estadístico del estudio de biodisponibilidad .....	47
8.12.- Modelo de diabetes no insulino dependiente en rata .....	48
8.12.1.- Evaluación del estado diabetizado y dosis de prueba para el estudio farmacocinético en animales con hiperglicemia. ....	48
8.13.- Estudio de metabolismo <i>in vitro</i> (prueba enzimática con el homogenizado de hígado de rata).....	48
8.13.1.- Actividad enzimática (hidrólisis del ATAC por el extracto enzimático) .....	49
8.14.- Estudio de distribución del ATAC en diferentes órganos .....	49
9.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
9.1.- Determinación de pKa.....	50
9.2.- Determinación de Log D .....	51
9.3.- Determinación de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ ).....	51
9.3.1.- Modelo de saco invertido de rata .....	51
9.4.- Desarrollo y validación del método analítico para cuantificar ATAC en plasma .....	53
9.5.- Validación del método analítico para cuantificar el ATAC por HPLC .....	53
9.6.- Linealidad del método.....	56
9.7.- Límite de cuantificación y detección del método .....	59
9.8.- Recobro absoluto .....	60
9.9.- Farmacocinética (estudio farmacocinético por vía oral e intravenosa del ATAC). ....	61
9.10.- Estudio farmacocinético del ATAC por vía oral en ratas diabéticas.....	68

9.11.- Parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol y triglicéridos) evaluados 8 posteriores a la administración del ATAC por vía oral.....	72
9.12.- Estudio de metabolismo <i>in vitro</i> (prueba enzimática con el homogenizado de hígado de rata).....	74
9.13.- Estudio de distribución del ATAC en órganos de alta irrigación: corazón, hígado, páncreas y riñones. ....	75
10.- CONCLUSIONES.....	77
11.- PERSPECTIVAS.....	78
12.0.- BIBLIOGRAFÍA .....	79
13.- Anexos.....	86



## INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Estructura molecular del clofibrato (etil 2-(4-clorofenoxi)-2-metilpropanoato).	24
Figura 2. Análogo tetrazol del ácido clorífbrico (ATAC).....	30
Figura 3. Modelo de intestino invertido .....	35
Figura 4. Diagrama de flujo para la preparación de la curva de calibración del análogo tetrazol del ácido clorífbrico (ATAC) en plasma de rata .....	39
Figura 5. Diagrama de flujo para la preparación de las muestras plasmáticas.....	43
Figura 6. Colocación de la cánula en la vena caudal .....	46
Figura 7. Diagrama de especiación del análogo tetrazol del ácido clorífbrico (ATAC).....	50
Figura 8. Estudio de permeabilidad del naproxeno, amoxicilina y ATAC en duodeno (A) y yeyuno (B) en modelo de intestino invertido en rata.....	52
Figura 9. Selectividad del método en plasma; (A) cromatograma de ATAC, compuesto 1 y estándar interno (Mebendazol),(B) plasma blanco de rata .....	54
Figura 10. Selectividad del método en plasma; (C) cromatograma de plasma blanco de conejo y plasma blanco de humano (D).....	55
Figura 11. ATAC vía oral e vía intravenosa, dosis 50 mg/kg para ambas vías de administración, media $\pm$ EE, (n=4).....	61
Figura 12. Compuesto 1 vía oral y vía intravenosa, media $\pm$ EE, (n=4).....	65
Figura 13. Reacción de hidrólisis del ATAC para generar el compuesto 1 .....	67
Figura 14. ATAC vía oral en ratas sanas (media $\pm$ EE n=4) y diabéticas (media $\pm$ EE n=6), dosis 50 mg/kg .....	68
Figura 15. Compuesto 1 oral ratas sanas (media $\pm$ EE n=4) y compuesto 1 ratas diabéticas (media $\pm$ EE n=6) .....	70
Figura 16. Concentración de parámetros bioquímicos: glucosa, triglicéridos y colesterol (ratas diabetizadas con STZ con estado de hiperglucémia comprobado por medio de un glucómetro) antes y después del tratamiento con ATAC (media $\pm$ EE n=6) .....	73
Figura 17. Cromatogama de tejido de corazón (A) y cromatograma de ácido clorífbrico y ATAC en solución (B) .....	76

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos combinados para el control de DT2 .....	17
Tabla 2. Fármacos para el tratamiento de dislipidemias .....	21
Tabla 3. Preparación de la curva de calibración (volumen de muestra a procesar 100 µL) .....	40
Tabla 4. Parámetros y criterios establecidos por la NOM-177-SSA1-2013.....	44
Tabla 7. Determinación de Log D para el análogo tetrazol del ácido clofíbrico (ATAC).....	51
Tabla 8. Permeabilidad aparente experimental en intestino invertido de rata.....	52
Tabla 9. Condiciones Cromatográficas para separar el ATAC y compuesto 1 (metabolito) .....	53
Tabla 10. Linealidad del método analítico para el ATAC y compuesto 1.....	56
Tabla 11. Análisis de varianza para la regresión lineal del ATAC y compuesto 1 .....	56
Tabla 12. Precisión (CV%) y exactitud (Desv.Abs. %) del método analítico .....	57
Tabla 13. Evaluación del límite de cuantificación y de detección.....	59
Tabla 14. Recobro absoluto (%) .....	60
Tabla 15. Parámetros farmacocinéticos del ATAC vía oral e intravenosa.....	62
Tabla 16. Parámetros farmacocinéticos del compuesto 1 vía oral e intravenosa .....	66
Tabla 17. Parámetros farmacocinéticos del ATAC vía oral en ratas sanas y diabéticas ...	70
Tabla 18. Parámetros farmacocinéticos del compuesto 1 vía oral ratas sanas y diabéticas .....	71
Tabla 19. Concentración de colesterol, triglicéridos y glucosa tras 8 horas de la administración vía oral del ATAC .....	73
Tabla 20. Resultados de las concentraciones del ATAC y compuesto 1 en el homogenizado de hígado de rata.....	74
Tabla 21. Estudio de distribución del compuesto 1 en diferentes órganos.....	75

## ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1 .....	33
Ecuación 2 .....	34
Ecuación 3 .....	35

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>ABC<sub>0-12h</sub></b>	Área bajo la curva de cero a 12 horas
<b>ABC<sub>0-t</sub></b>	Área bajo la curva de cero a t horas
<b>ABC<sub>0-∞</sub></b>	Área bajo la curva de cero a infinito
<b>ADME</b>	procesos farmacocinéticos de: absorción, distribución, metabolismo y eliminación
<b>ATAC</b>	Análogo tetrazol del ácido clofíbrico
<b>b</b>	Intercepto
<b>CL</b>	Depuración
<b>CLAR</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>CV%</b>	Coefficiente de variación porcentual
<b>Cp<sub>máx</sub></b>	Concentración plasmática máxima
<b>Desv.Abs.%</b>	Porcentaje de desviación absoluta
<b>DM</b>	Diabetes Mellitus
<b>DT2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>E.E.</b>	Error estándar
<b>E.I.</b>	Estándar interno
<b>HEK 293</b>	Línea celular de Human Embryonic Kidney 293
<b>ENSANUT</b>	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
<b>K<sub>a</sub></b>	Constante de absorción
<b>K<sub>e</sub></b>	Constante de eliminación
<b>K<sub>elm</sub></b>	Constante de eliminación del metabolito
<b>Linf.</b>	Límite inferior
<b>Lsup.f</b>	Límite superior
<b>Log D<sub>pH= 7.5</sub></b>	Logaritmo del coeficiente de distribución a pH de 7.5
<b>LQ</b>	Límite de cuantificación
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>m</b>	Pendiente
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NOM-177-SSA1-2013</b>	Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013
<b>O<sub>2</sub> 95%/CO<sub>2</sub> 5%</b>	oxígeno al 95% y dióxido de carbono al 5%
<b>PAMPA</b>	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
<b>P<sub>app</sub></b>	Permeabilidad aparente
<b>(PBS) pH 7.4</b>	solución amortiguadora de fosfatos pH= 7.4
<b>pKa</b>	logaritmo negativo de la constante de disociación ácida
<b>PPAR-α y PPAR-γ</b>	Receptores nucleares activados por proliferadores peroxisómicos tipo alfa y gamma
<b>r</b>	Coefficiente de correlación de Pearson
<b>STZ</b>	Streptozotocina.
<b>T<sub>1/2abs</sub></b>	Tiempo de vida media de absorción
<b>T<sub>1/2el</sub></b>	Tiempo de vida media de eliminación
<b>T<sub>1/2 elm</sub></b>	Tiempo de vida media de eliminación del metabolito
<b>T<sub>máx</sub></b>	Tiempo máximo
<b>11β-HSD1</b>	11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1

## 1.- ABSTRACT

In this study, we performed the physicochemical and biopharmaceutical characterization of a new clofibrac acid-analog compound (ATAC) with antidiabetic activity and its pharmacokinetics was evaluated in a non-insulin dependent model in Wistar rats. The compound showed affinity for the lipophilic phase in the pH interval of 1 to 5, showing indicating that its absorption could be optimal in the duodenal segment and part of the jejunum. pKa determination was performed through potentiometric titration; it was found that ATAC has two ionic species, the first one is at pH 4.43 and the second is at pH=6.08. ATAC's apparent permeability was evaluated using an *in vitro* model of inverted rat intestine. The permeability in the evaluated segments was as follows  $8.73 \times 10^{-6}$  cm/s in duodenum and  $1.62 \times 10^{-6}$  cm/s in jejunum, indicating that the compound has lower permeability in jejunum in comparison to duodenum. ATAC's pharmacokinetic evaluation was performed in both, control and diabetic Wistar rats. For control groups, after an oral administration with a dose of 50 mg/kg, pharmacokinetic parameters were determined through a non-compartmental analysis: Elimination constant was  $1.81 \pm 0.09 \text{ h}^{-1}$ , absorption constant ( $k_a$ ) was found to be  $3.05 \pm 1.07 \text{ h}^{-1}$ ,  $C_{max}$  was  $3.57 \pm 2.39 \text{ mg/ml}$  at  $0.33 \pm 0.28 \text{ h}$ , AUC was  $2.58 \pm 1.97 \text{ } \mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$  and Distribution Volume was  $419.4 \pm 148.6 \text{ mL}$ . For IV administration at the same dose, elimination constant was  $1.21 \pm 0.59 \text{ h}^{-1}$ , distribution volume  $399.6 \pm 93.9 \text{ mL}$  and AUC= $38.8 \pm 19.2 \text{ } \mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ . In diabetic rats, after an oral administration of 50 mg/kg the pharmacokinetic parameters were:  $k_a$   $2.73 \pm 0.92 \text{ h}^{-1}$ ,  $C_{max}$   $8.80 \pm 6.70 \text{ } \mu\text{g/mL}$  and AUC  $4.68 \pm 3.01 \text{ } \mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ . When the pharmacokinetic parameters between control and diabetic rats; were compared, differences were found in  $C_{max}$ , AUC and  $K_e$ . These differences are probably due to the physiological damage that the diabetic animals develop due to hyperglycemia. ATAC distribution was analyzed in four organs (heart, pancreas, kidneys and liver) 8 hours after the pharmacokinetic study; the organs were excised and ATAC's concentration was measured. The results obtained for compound 1 (metabolite) were: heart  $4.53 \text{ } \mu\text{g/g}$ , liver  $1.41 \text{ } \mu\text{g/g}$ , pancreas  $5.51 \text{ } \mu\text{g/g}$  and kidneys  $11.34 \text{ } \mu\text{g/g}$ . With respect to ATAC does not present concentrations that can be quantified reliably and is only detectable its presence in 3 organs (heart, liver and kidney).

## 2.- RESUMEN

En el presente trabajo se realizó la caracterización fisicoquímica y biofarmacéutica de un nuevo compuesto análogo al ácido clorífbrico (ATAC) con actividad antidiabética, y se evaluó la farmacocinética del mismo en un modelo de diabetes no insulino dependiente en rata Wistar. Dicho compuesto mostró afinidad por fase lipofílica en un intervalo de pH de 1 a 5, indicando con ello que podría ser absorbido en mayor proporción en el segmento duodenal y parte del yeyuno. La determinación del pKa se realizó mediante titulación potenciométrica encontrando que el ATAC tiene dos especies iónicas, la primera por encima del pH 4.43 y la segunda por encima del pH 6.08. Los valores de permeabilidad aparente obtenidos del ATAC en un modelo *in vitro* de saco invertido de intestino de rata, fueron:  $8.73 \times 10^{-6}$  cm / s en duodeno y  $1.62 \times 10^{-6}$  cm/s en yeyuno, indicando que el compuesto tiene más baja permeabilidad en yeyuno. La evaluación de la farmacocinética del ATAC se realizó tanto en ratas Wistar sanas como diabetizadas.

.Para el caso de ratas sanas, tras la administración vía oral de dosis de 50 mg/kg del compuesto (ATAC), los parámetros farmacocinéticos obtenidos por análisis no compartimental fueron: constante de eliminación:  $1.81 \pm 0.09$  h<sup>-1</sup>, constante de absorción:  $3.05$  h<sup>-1</sup>, una C<sub>máx</sub> de  $3.57 \pm 2.39$  µg/ml a las  $0.33 \pm 0.28$  h. El valor de AUC<sub>0-∞</sub> fue de  $2.58 \pm 1.97$  µg/mL\*h y el volumen de distribución fue de  $419.4 \pm 148.6$  mL. Para la administración IV a la misma dosis, la constante de eliminación (ke) fue  $1.21$  h<sup>-1</sup>, el volumen de distribución fue  $399.6 \pm 93.9$  mL y AUC<sub>0-∞</sub> fue  $38.8 \pm 19.2$  µg/mL\*h. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ambas vías de administración excepto para el AUC<sub>0-∞</sub>. La biodisponibilidad absoluta evaluada fue de 10,4%. En ratas Wistar diabetizadas, después de una administración oral de 50 mg/kg, obtuvieron los siguientes parámetros farmacocinéticos: la constante de eliminación:  $2.18 \pm 0.87$  h<sup>-1</sup>, constante de absorción fue de  $2.73 \pm 0.92$  h<sup>-1</sup>, la C<sub>máx</sub> fue de  $8.80 \pm 6.70$  µg/mL y el AUC<sub>0-∞</sub> fue de  $4,68 \pm 3.01$  µg/mL\*h. Al comparar los diferentes parámetros en ratas sanas con respecto a las ratas en estado diabetizado, se encontraron diferencias en los parámetros de C<sub>máx</sub>, AUC<sub>0-∞</sub> y ke, lo cual probablemente se deba a los daños fisiológicos que presentan los animales en estado diabetizado que pudieran alterar la absorción y eliminación del ATAC en la rata. Durante el estudio farmacocinético se detecta la presencia de un metabolito (compuesto 1), el cual se sospecha que pudiera ser ácido clorífbrico. Se evaluó la distribución del ATAC en corazón, páncreas, riñones y el hígado.

Los resultados obtenidos fueron para el compuesto 1 (metabolito): corazón (4.53 $\mu$ g/g), hígado 1.41( $\mu$ g/g), páncreas 5.51( $\mu$ g/g), y riñones 11.34( $\mu$ g/g). El ATAC sólo fue posible detectarlo, más no cuantificarlo en corazón, hígado y riñones).

### 3.- INTRODUCCIÓN

Hoy en día la Diabetes DT2 es un problema de salud mundial y en el caso específico de México (el cual ocupa el 5 lugar a nivel mundial ) se estima que alrededor de 12 millones de personas viven con esta condición de acuerdo a datos publicados por la federación Internacional de Diabetes (2017) <sup>1</sup>. Considerando que la DT2 es una enfermedad que se caracteriza por presentar una o más complicaciones conforme progresa la DT2, no existen en el mercado muchos medicamentos que puedan controlar más de una complicación asociada a la DT2, ya que en la actualidad la terapéutica empleada consiste en tratar con varios medicamentos una o más complicaciones asociadas a la DT2, se hace inminente necesidad de buscar nuevos fármacos que sean capaces de actuar en más de un blanco terapéutico y con ello contrarrestar una o más complicaciones relacionadas con la DT2. En el presente trabajo se plantea la caracterización fisicoquímica y biofarmacéutica de un nuevo compuesto análogo al ácido clofíbrico (ATAC) con actividad antidiabética probada y posible actividad hipolipemiante, ya que la dislipidemia es una de las complicaciones asociadas a la DT2. Se evaluó la farmacocinética del ATAC en ratas sanas con la finalidad de elucidar por primera vez el curso temporal de dicho compuesto y al mismo tiempo en un modelo de diabetes no insulino dependiente en rata con la finalidad de visualizar posibles cambios en algunos parámetros farmacocinéticos debido al estado de enfermedad. El ATAC mostró afinidad por fase lipofílica en un intervalo de pH de 1 a 5, indicando con ello que podría ser absorbido de mejor manera en el segmento duodenal y parte del yeyuno. La determinación del pKa se realizó mediante titulación potenciométrica y encontrando que el ATAC tiene dos especies iónicas, la primera por encima del pH 4.43 y la segunda por encima del pH 6.08. La permeabilidad aparente del ATAC se evaluó en el modelo *in vitro* de saco invertido de intestino de rata, la permeabilidad obtenida en los segmentos evaluados fue la siguiente: 8.73 X 10<sup>-6</sup> cm / s en duodeno y 1.62 X 10<sup>-6</sup> cm/s en yeyuno

indicando que el compuesto tiene una permeabilidad más baja en el segmento del yeyuno con respecto al duodeno. La evaluación de la farmacocinética del ATAC se realizó tanto en rata sana como en rata diabetizada. Para el caso de ratas sanas, tras la administración vía oral del compuesto a una dosis de 50 mg/kg se determinaron los siguientes parámetros farmacocinéticos por análisis no compartimental: la constante de eliminación después de una administración oral de 50 mg/kg en rata Wistar fue de  $1.81 \text{ h}^{-1}$ , la constante de absorción fue de  $3.05 \text{ h}^{-1}$ , la  $C_{\text{máx}}$  fue de  $3.57 \mu\text{g/ml}$  a  $0.33 \text{ h}$ , el  $\text{AUC}_{0-\infty}$  fue de  $2.58 \mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$  y el volumen de distribución fue  $419.4 \text{ mL}$ . Para la administración IV a la misma dosis, la constante de eliminación ( $k_e$ ) fue  $1.21 \text{ h}^{-1}$ , el volumen de distribución fue  $399.6 \text{ mL}$  y  $\text{AUC}_{0-\infty}$  fue  $38.8 \mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ . No se observaron diferencias estadísticamente significativas excepto para el  $\text{AUC}_{0-\infty}$  por vía oral con respecto a la vía intravenosa. La biodisponibilidad absoluta evaluada fue del 10,4%. En ratas diabetizadas se obtuvieron los siguientes parámetros farmacocinéticos: la constante de eliminación después de una administración oral de 50 mg/kg en rata Wistar fue de  $2.18 \text{ h}^{-1}$ , la constante de absorción fue de  $2.73 \text{ h}^{-1}$ , la  $C_{\text{máx}}$  fue de  $8.80 \mu\text{g/mL}$ , el  $\text{AUC}_{0-\infty}$  fue de  $4,68 \mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ . Se evaluó la distribución del ATAC en 4 órganos como: corazón, páncreas, riñones y el hígado, transcurridas 8 horas después del estudio farmacocinético, se extrajeron los órganos y se cuantificó la cantidad de ATAC distribuida en los órganos seleccionados. Los resultados obtenidos fueron los siguientes expresados en  $\mu\text{g/g}$  de tejido solo fue posible cuantificar el compuesto 1 en los 4 órganos siendo los riñones donde se encontró la mayor concentración  $11.34$ . El ATAC no fue posible cuantificarlo y sólo se detecta su presencia en los órganos evaluados, el órgano donde se detectó mayor presencia fue el riñón. Probablemente el riñón sea la ruta de mayor eliminación. El ATAC probablemente se comporte como un profarmaco debido a que sufre metabolismo, originando un compuesto 1 (metabolito) que se sospecha se trate del ácido clorhídrico. Los hallazgos de este trabajo son importantes ya que son los primeros estudios fisicoquímicos y biofarmacéuticos realizados al ATAC, ya que dichos estudios forman parte de la evaluación en la fase preclínica de nuevas moléculas que puedan ser candidatas al uso en humanos.



## **4.- ANTECEDENTES**

### **4.1.- Diabetes tipo 2 (DT2)**

La OMS (Organización Mundial de la Salud) define a la DT2 (también llamada no insulino dependiente) como una enfermedad crónica-degenerativa que se caracteriza por una deficiencia en la producción de insulina por parte de las células  $\beta$  del páncreas o cuando el organismo no es capaz de utilizar de manera eficiente la insulina que produce <sup>2</sup>.

De acuerdo a lo reportado en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, la Diabetes Mellitus se encuentra entre las primeras causas de muerte en México. Se han documentado cifras de 6.4 millones de personas han sido diagnosticadas con diabetes mellitus en México en el 2012 <sup>3</sup> y de acuerdo a datos reportados por la federación internacional de diabetes la cifra incrementó a 12 millones de diabéticos en México en el 2017 <sup>1</sup>. En cuanto a dislipidemias en México la Federación Mexicana de Diabetes mencionó que se muestra una fuerte tendencia en el aumento de sobrepeso, obesidad, así como de las dislipidemias asociadas a diabetes mellitus ([www.fmdiabetes.org](http://www.fmdiabetes.org)).

#### **4.1.2.- Manifestaciones clínicas, diagnóstico y complicaciones de la DT2**

En ocasiones los síntomas de la DT2 pueden ser imperceptibles y el diagnóstico se determina cuando ya existen varios años de evolución de la enfermedad. Dentro de las manifestaciones clínicas de la DT2 se encuentran: poliuria, polifagia, polidipsia, pérdida de peso sin razón aparente, debilidad, cansancio, hiperglicemia crónica causada por defectos en la producción de insulina o en la acción de la insulina (resistencia).

Los criterios más importantes para el diagnóstico de diabetes tipo 2 se encuentran los siguientes:

- Hemoglobina glucosilada mayor o igual a 6.5%.
- Glucemia plasmática en ayunas (8 horas de ayuno previo) mayor o igual 126 mg/dL.
- Prueba de tolerancia a la glucosa oral (transcurridas 2 horas tras ingerir una bebida dulce especial) se diagnostica diabetes cuando la glucosa en sangre es igual o mayor a 200 mg/dL

Existen complicaciones asociadas a la DT2, algunas de las más importantes son: daño capilar renal causando glomerulonefritis e insuficiencia renal en etapa avanzada de la

misma, daño en los capilares de la retina causando ceguera, neuropatía periférica, Infarto al miocardio, complicaciones cerebrovasculares y arterioesclerosis<sup>2,3,4,5</sup>.

Por lo tanto, un paciente ya diagnosticado con diabetes (en cualquier etapa de la enfermedad) debe dar inicio a su tratamiento farmacológico, así como algunos cambios en el estilo de vida para evitar que aparezcan o se desarrollen más complicaciones asociadas a la DT2.

#### **4.1.3.-Tratamiento actual de la DT2 y complicaciones asociadas a dicha enfermedad.**

El tratamiento de la DT2 se basa en tres principales pilares: dieta, ejercicio físico y medicación; éste tratamiento tiene como objetivo mantener los niveles de glucemia plasmática en un rango de 70 a 130 mg/dL (pacientes ya diagnosticados con la enfermedad), y con ello, poder minimizar el riesgo de las complicaciones asociadas a la DT2. En cuanto a la dieta, se inicia con alimentación balanceada y baja en carbohidratos. Respecto a la terapia con fármacos antidiabéticos se prescribe: monoterapia de forma inicial con biguanidas (metformina); si la monoterapia en combinación con el cambio de estilo de vida (ejercicio y dieta balanceada) no fueran suficientes para mantener controlada la hiperglicemia en sangre, entonces se recetan las biguanidas en combinación con 1 ó 2 fármacos antidiabéticos adicionales. En la tabla 1 se presentan algunos ejemplos de fármacos que pueden combinarse entre sí con las biguanidas: sulfonilureas, tiazolidindionas, inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasas, inhibidores de transportadores renales de glucosa e inhibidores de la dipeptidilpeptidasa.

**Tabla 1. Tratamientos combinados para el control de DT2**

Fármacos	Ejemplos
Biguanidas y sulfonilureas	Metformina y glibenclamida
Biguanidas, sulfonilureas, tiazolidindionas	Metformina, glicazida, Pioglitazona

Sin embargo, en algunas ocasiones cuando a pesar del tratamiento farmacológico combinado con dieta y ejercicio físico, no se llega a la meta de control glucémico esperado, al paciente se le prescribe un tratamiento adicional que consta de la inyección subcutánea de insulina<sup>2,4,5</sup>.

Existen casos de pacientes en los cuales, a pesar de que existe el control de la hiperglucemia con alguno de los tratamientos anteriormente mencionados, cierto número de pacientes llegan a presentar otras complicaciones adicionales a la diabetes, una de ellas es la dislipidemia; dicha enfermedad es causada por la alteración en las concentraciones de lipoproteínas sanguíneas.

Factores como el sobrepeso, la obesidad, sedentarismo, tabaquismo, exceso en el consumo de alcohol y padecer enfermedades como DT2 pueden contribuir al desarrollo de la dislipidemia. El diagnóstico clínico de la dislipidemia se basa en los niveles séricos de las lipoproteínas y algunos síntomas clínicos como dolor de cabeza, cansancio excesivo y calambres musculares. Sin embargo, en muchas ocasiones puede ser una enfermedad asintomática.

#### **4.2.- Tipos de dislipidemias.**

La enfermedad cardiovascular aterosclerótica es una de las principales causas de mortalidad en el mundo, México no es la excepción. Las dislipidemias como enfermedad cuando comienzan en etapas tempranas, su evolución es lenta y progresiva, existiendo múltiples factores condicionantes capaces de acelerar la aparición de sus manifestaciones clínicas<sup>6</sup>. Existen en la actualidad varios factores de riesgo que han sido identificados y que pueden ser asociados con la enfermedad cardiovascular aterosclerótica, entre los más importantes, se destacan el hábito de fumar, la hipertensión arterial, la dislipemia (alteración en las concentraciones plasmáticas de lípidos y/o lipoproteínas), la presencia de antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, la obesidad, sedentarismo, el estrés y por supuesto la DT2, la cual se considera como un riesgo alto de padecer una enfermedad coronaria<sup>7</sup>.

#### **4.2.1.-Clasificación de dislipidemias.**

Las dislipemias pueden ser clasificadas de acuerdo a los siguientes criterios.

Según el perfil lipídico

- Hipercolesterolemia aislada: aumento del colesterol total a expensas del colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (C-LDL).
- Hipertrigliceridemia aislada: aumento de los triglicéridos de origen endógeno (a expensas de las lipoproteínas de muy baja densidad, VLDL), exógeno (a expensas de quilomicrones), o ambos. •

Hiperlipemia mixta: aumento del colesterol total y los triglicéridos.

- Hipoalfalipoproteinemia: disminución del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (C-HDL).

Esta clasificación permite aproximarse al riesgo del paciente y además si se presenta el aumento de los niveles plasmáticos del colesterol total, con incremento moderado de triglicéridos y disminución de CHDL, el paciente tendrá mayor riesgo de padecer algún evento cardiovascular que otro individuo que presente hipercolesterolemia o hipertrigliceridemia aislada <sup>7,8</sup>.

#### **4.2.2.-Diagnóstico de la dislipidemia asociada a DT2**

La dislipidemia se diagnostica con ayuda de pruebas bioquímicas ya estandarizadas que pueden ser métodos enzimáticos colorimétricos donde se determinan concentraciones sanguíneas de colesterol total, triglicéridos y colesterol-HDL en muestras tomadas después de un ayuno de 9 a 12 horas. También la medición de apoproteína B es útil para el diagnóstico diferencial de hipertrigliceridemia en pacientes con DT2 <sup>9</sup>.

Por consiguiente, es importante monitorear los niveles de lípidos séricos en pacientes ya diagnosticados con DT2 para prevenir el desarrollo de complicaciones asociadas a dicha enfermedad como es la arterosclerosis e infarto al miocardio y una vez diagnosticada la dislipidemia en pacientes diabéticos, además de su tratamiento para el control de la hiperglicemia, se incluye terapia con antilipemiantes, entre los que se utilizan son

inhibidores de la enzima hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (estatinas), inhibidores de la absorción del colesterol (ezetimiba), ácidos grasos omega-3 y derivados del ácido fíbrico (benzafibratos, clofibratos y fenofibratos)<sup>6,9,10</sup>. Todo ello con la finalidad de tener controlado al paciente en cuanto a la hiperglicemia y la concentración de lipoproteínas plasmáticas.

#### **4.2.3.-Tratamiento de las dislipidemias.**

#### **4.2.4.-Tratamiento no farmacológico**

Es fundamental instruir al paciente, motivarle y a la vez transmitirle ánimo, apoyo y entendimiento a fin de optimizar el apego al programa de alimentación para nivelar las concentraciones de lipoproteínas con el cambio en el estilo de vida y plan alimentario ya que un plan nutricional apoyan en reducir la ingestión de grasas saturadas, grasas trans y colesterol. La cantidad total de grasas en la dieta diaria, no son los determinantes principales de las concentraciones séricas de colesterol o del riesgo cardiovascular; es más bien la composición de los ácidos grasos de la dieta lo que determina ambos factores. Por lo tanto se deben consumir alimentos ricos en ácidos grasos insaturados <sup>6,10</sup>.

#### **4.2.5.-Tratamiento farmacológico de la dislipidemia**

En pacientes con DT2 y con dislipidemia, las modificaciones del estilo de vida son indispensables; sin embargo, pueden resultar insuficientes para alcanzar las concentraciones deseados de lípidos de acuerdo al nivel de riesgo cardiovascular y por lo tanto, el tratamiento farmacológico es necesario. A continuación en la tabla 2 se presentan los medicamentos más utilizados en el tratamiento de la dislipidemia.

**Tabla 2. Fármacos para el tratamiento de dislipidemias**

Tratamiento lipídico	monoterapia	% LDL	% HDL	% TG	Terapia combinada	% LDL	% HDL	% TGC
	Estatinas	25-63			Estatina+ ezetimiba	46-61	16-27	
Hipercolesterolemia	Ezetimiba	18			Estatina+niacina	36-42		
LDL altas, TG normales	Niacina	6-25			Niacina +SAB	45-64 25-55	16-27 16-27	
HLD normales	SAB	15-30			Estatina+niacina +SAB			
Hiperlipidemia mixta	Estatinas	25-45	5-15	5-37	Estatina +ácido fíbrico		16-27	35
LDL altas, TG altos	Ácido fíbrico	10-28	5-35	10-50	Niacina + estatina		16-27	15-45 20-37
HDL normales o bajas	Niacina	6-25	8-38	30-50	Niacina +ácido fíbrico Niacina +SAB			
	Estatinas			5-10			16-27	
Hipertrigliceridemia	Ácido fíbrico		6-12	30-50	Niacina +ácido fíbrico			20-37
	Niacina		5-10	10-50				
	Estatinas		5-35					
HLD baja	Ácido fíbrico							
	Niacina							

Nota: secuestradores de ácidos biliares=SAB, ejemplos de fármacos son las colestiramina y colestipol

Dentro de los hipolipemiantes de primera elección para el tratamiento de la dislipidemia asociada a DT2 son los fibratos; los cuales son profármacos que se metabolizan por hidrólisis enzimática en metabolitos activos en forma de ácido carboxílicos <sup>11,12</sup>.

#### 4.3.- Fibratos

Los fibratos como los Benzafibrato, Fenofibrato y Gemfibrozil por mencionar ejemplos, son sustancias químicas derivadas del ácido fíbrico (ácido clorofenoxiisobutírico) y están indicados en el tratamiento de pacientes con dislipidemia. Los fibratos son fármacos que por lo general se prescriben para el tratamiento de pacientes con dislipidemias, se recetan como fármacos de primera elección de tratamiento y se da seguimiento con una alimentación balanceada y en caso que no funcione, entonces se prescriben antilipemiantes en pacientes que tienen concentraciones elevadas de triglicéridos y bajas de c-HDL. Las dislipidemias son uno de los principales factores de riesgo modificables que condicionan la aparición y progresión de la aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares asociadas como la DT2 <sup>12</sup>.

#### **4.3.1.-Aplicación terapéutica de los fibratos**

Los fibratos son utilizados en los trastornos del metabolismo lipídico (triglicéridos, colesterol o ambos) cuando no son suficientes las medidas dietéticas (dislipidemias tipo Ila, IIb, III, IV y V), ya que poseen un notable efecto de regulación lipídica, y que pueden reducir los triglicéridos hasta un 50% y aumentar las lipoproteínas de alta densidad hasta un 20%, son eficaces en el tratamiento de trastornos de los lípidos asociados a elevación de triglicéridos en suero y lipoproteínas de muy baja densidad en personas que padecen obesidad o trastornos metabólicos como en pacientes con DT2, que suelen tener obesidad de predominio central concentrando el exceso de grasa a nivel abdominal y visceral. El aumento de la grasa abdominal se asocia con insulinoresistencia, hiperinsulinemia y por supuesto dislipidemia aterogénica. Por ello es que los fibratos son los fármacos de primera elección para reducir los niveles de triglicéridos plasmáticos, y además incrementan los niveles de c-HDL en pacientes diabéticos<sup>12,13</sup>.

#### **4.3.2.- Reacciones adversas de los fibratos**

Las principales reacciones adversas de los fibratos son: efectos gastrointestinales como pérdida del apetito, sensación de plenitud en el estómago y náuseas. Otros efectos, informados con poca frecuencia incluyen: urticaria, pérdida de pelo, mialgias, fatiga, cefalalgia y anemia. También se han informado de incrementos menores de las transaminasas hepáticas y decremento de la fosfatasa alcalina <sup>14</sup>.

#### **4.3.3.- Mecanismo de acción de los fibratos**

Los fibratos estimulan los receptores nucleares PPAR- $\alpha$  y con ello aumenta la oxidación de ácidos grasos en el hígado y músculos, por lo tanto disminuye la secreción hepática de lipoproteínas como: lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL); también aumenta la actividad de la lipoproteilipasa muscular, de modo que se incrementa la lipólisis y, en consecuencia, la eliminación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). La oxidación de ácidos grasos se ve forzada por la activación de la enzima acil-CoA sintetasa y la inhibición de dicha enzima reduce la síntesis de triglicéridos, dando como resultado una marcada reducción en los triglicéridos en plasma y niveles de VLDL. El receptor activado por proliferadores peroxisómicos (PPAR-  $\alpha$ ) se expresa mayoritariamente en el hígado y, en menor medida, en el corazón, el riñón, el músculo esquelético y el intestino, en estos tejidos, el PPAR- $\alpha$  está directamente implicado en el control de la expresión de genes que codifican

proteínas y enzimas clave en el metabolismo energético, especialmente en el catabolismo de los ácidos grasos <sup>14,15</sup>.

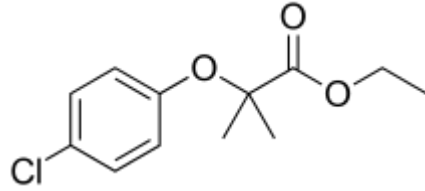
#### **4.3.4.- Propiedades farmacocinéticas de los fibratos**

Los fibratos son profármacos que tienen una buena biodisponibilidad oral, aunque calcular su biodisponibilidad absoluta es difícil porque son muy insolubles en agua. Se encuentran mayormente unidos a las proteínas (99%), en especial a la albúmina. Los niveles plasmáticos alcanzan el máximo al cabo de 6 a 8 horas y el equilibrio dentro de los 5 primeros días tras su administración. Su absorción aumenta con los alimentos, se metabolizan en el hígado por conjugación con ácido glucurónico y se eliminan por vía renal. Es importante señalar que fibratos como el gemfibrozilo compite con las estatinas por el catabolismo hepático en mayor medida que otros fibratos, lo que determina un potencial superior de interacciones farmacocinéticas con otros medicamentos. El clofibrato es uno de los fibratos que tiene bien caracterizada su farmacocinética tanto en humanos como en especies animales (rata). Entre el 95% y el 99% de una dosis oral de clofibrato se excreta en la orina como ácido clofíbrico libre y en forma de conjugado, tiene un alto grado de unión a las proteínas plasmáticas en un intervalo que va del 95-97 %, una  $C_{máx}$  50  $\mu\text{g/mL}$  y un tiempo de vida media de 10 horas con una dosis de 500 mg vía oral) en humanos<sup>16</sup>. En la rata se ha reportado que el clofibrato tiene un tiempo de vida alrededor de 6 a 8 horas y una  $C_{máx}$  = 26.51  $\mu\text{g/mL}$  con una dosis de 14 mg/kg <sup>17,18</sup>.

#### **4.3.5.- Propiedades fisicoquímicas de los fibratos**

Los fibratos son sustancias químicas derivadas del ácido fíbrico (ácido clorofenoxiisobutírico), son insolubles en agua, por lo que se administran en forma de profármacos. Su punto de fusión se encuentra entre 118 y 119 °C. Dentro de los fibratos que tienen bien caracterizada sus propiedades fisicoquímicas se encuentra el clofibrato (figura 1), el cual tiene un peso molecular de 242.7 g/mol, es prácticamente insoluble en agua, la solubilidad en metanol y DMSO es de 50 mg/mL, etanol/PBS 1:6 pH= 7.2 a 37° C (0.01mg/mL),  $\text{Log } D_{\text{pH}=7.5}$  (-1.13),  $\text{pKa}= 3.2$  y una permeabilidad aparente en membranas artificiales PAMPA  $\text{pH}=7.5$  ( $0.29 \times 10^{-6}$  cm/s)<sup>19,20,21</sup>.





**Figura 1. Estructura molecular del clofibrato (ethyl 2-(4-chlorofenoxi)-2-metilpropanoato)**

#### **4.3.6.- Actividad farmacológica y mecanismos de acción del ácido clofíbrico**

El clofibrato (el cual es un derivado de los fibratos) se prescribe para el control de la dislipidemia; su mecanismo de acción está implicado en el control de la expresión de proteínas y enzimas clave para el metabolismo de lípidos, es agonista sintético de receptores nucleares activados por proliferadores peroxisómicos tipo alfa (PPAR- $\alpha$ ). El clofibrato es un profármaco que se hidroliza en el organismo para generar su metabolito activo, el ácido clofíbrico; dicho metabolito actúa como agonista de receptores nucleares PPAR- $\alpha$ , los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo en tejidos importantes como el hepático, muscular, cardíaco, adiposo y renal. La función de los PPAR- $\alpha$  está relacionada con la regulación de la  $\beta$ -oxidación, regulación de la glucólisis y diferenciación celular <sup>22,23,24</sup>

Por lo tanto, dichos receptores nucleares (PPAR- $\alpha$ ) son blancos terapéuticos importantes para el tratamiento de la dislipidemia como una complicación asociada a la DT2.

#### **4.3.7.- Fibratos y su actividad antidiabética**

En estudios recientes en células (miocitos, células musculares), se reportó que el fenofibrato además de tener actividad farmacológica como hipolipemiente, también posee actividad inhibitoria contra la enzima 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 $\beta$ -HSD1)<sup>25</sup>. La enzima 11 $\beta$ -HSD1 se expresa principalmente en tejido muscular, hepático y adiposo, dicha enzima cataliza la conversión de la hormona inactiva cortisona a la

hormona activa cortisol (en roedores de 11-hidroxicorticosterona a corticosterona). Además existen reportes de que glucocorticoides como el cortisol se encuentran involucrados en la activación de la glucogenólisis hepática generando con ello hiperglicemia en sangre, por lo cual, el cortisol está asociado a complicaciones de DT2<sup>26,27</sup>.

Por lo tanto, es muy posible que los fibratos puedan tener una doble actividad terapéutica, por un lado sobre el control de lipoproteínas sanguíneas y por otro el control de la hiperglicemia al inhibir la vía de la glucogenólisis hepática, la cual es activada por la presencia del cortisol.

#### **4.4.- Fármacos con actividad dual (hipolipemiantes y antidiabéticos)**

Debido a que la dislipidemia es una complicación asociada a la DT2, ya existen en el mercado fármacos reportados con actividad sobre dos blancos terapéuticos, tal es el caso del Saroglitazar, de acuerdo a estudios reportados mostró una reducción significativa de lípidos y glucosa en pacientes con DT2 que presentaban complicación con dislipidemia, y el Chiglitazar, que en un modelo murino (ratones) redujo los niveles de glucosa y el peso corporal de los animales. Tanto el Saroglitazar como el Chiglitazar son agonistas de receptores activadores del proliferador del peroxisoma tipo alfa y gama (PPAR- $\alpha$  y PPAR- $\gamma$ ), los cuales se encuentran involucrados en el metabolismo de lípidos y glucosa<sup>28,29</sup>.

##### **4.4.1.- El reemplazo bioisostérico.**

Un bioisómero es una molécula que resulta del intercambio de un átomo o de un grupo de átomos con un átomo o grupo de átomos alternativos, ampliamente similares. El objetivo del reemplazo bioisostérico es crear una nueva molécula con propiedades biológicas similares al compuesto original. El reemplazo puede atenuar la toxicidad, modificar la actividad terapéutica de la molécula y / o alterar la farmacocinética o la toxicidad de la misma<sup>30,31</sup>.

##### **4.4.2.-Reemplazo bioisostérico de fibratos**

Aunque ya se tiene bien caracterizada la estructura molecular del clofibrato y su mecanismo de acción, teóricamente una molécula bien caracterizada puede ser modificada por el reemplazo de alguno de sus grupos funcionales por otro grupo funcional muy similar al grupo reemplazado, y con ello conferirle teóricamente mejores características fisicoquímicas o inclusive una mejor actividad farmacológica, de tal forma

que es posible generar una actividad dual sobre dos blancos terapéuticos, tomando como base algunos de los fundamentos del reemplazo bioisostérico.

Se han utilizado reemplazos bioisostéricos del ácido carboxílico que tiene la molécula del ácido clofíbrico por heterociclos ácidos (como grupos tetrazoles), donde dicho reemplazo por otro grupo funcional puede proporcionarle a la molécula modificada un aumento en su actividad farmacológica o posiblemente mejorar algunas características fisicoquímicas importantes como lipofilicidad y solubilidad <sup>32,33</sup>.

#### **4.5.- Estudios farmacocinéticos y biodisponibilidad**

La farmacocinética es la rama de la farmacología que estudia la velocidad a la que transcurren todos los procesos ADME que sufre el fármaco desde que entra en el organismo hasta que sale de él, de forma cuantitativa estudia la evolución temporal de los fármacos en el organismo. Algunos de los conceptos importantes en la farmacocinética es la biodisponibilidad que se define como la cantidad y la velocidad a la que un principio activo o molécula con potencial actividad terapéutica se absorbe a partir de una forma farmacéutica desde el sitio de disposición y llega a sistema circulatorio central, teniendo en cuenta que se encuentra en equilibrio entre el sitio de acción y la circulación general, por tanto, se asume que los parámetros farmacocinéticos medidos en sangre son representativos de la biodisponibilidad de dicho principio activo o molécula con potencial terapéutico <sup>34</sup>.

Por lo tanto, la biodisponibilidad de una molécula es una propiedad intrínseca de la misma y por lo tanto, la biodisponibilidad y los parámetros farmacocinéticos nos aportan la información necesaria en situaciones en las que es importante conocer la velocidad y magnitud del acceso de dicha molécula en forma inalterada a circulación sistémica. Algunas de las situaciones de vital importancia donde es necesario considerar el cambio tanto de la biodisponibilidad como de la farmacocinética son los estados de enfermedad.

#### **4.5.1.- Efectos del estado diabético en la biodisponibilidad de los fármacos**

Se ha reportado tanto en humanos con diabetes mellitus, como en roedores, el desarrollo de nefropatía a diferentes etapas como hiperfiltración, microalbuminuria, proteinuria y finalmente pérdida de la función renal, también se presenta hipoalbumemia en algunos casos y esto puede provocar cambios en la biodisponibilidad de medicamentos<sup>35,36</sup>. Dostalek M. y colaboradores han reportado que la actividad de las enzimas de la familia P450 (las cuales participan de manera importante en la biotransformación de medicamentos), se encuentran alteradas por patologías como la DM y esto posiblemente provoque cambios en la biodisponibilidad y parámetros farmacocinéticos de fármacos<sup>37</sup>. Li Y. y colaboradores reportaron cambios en la farmacocinética de glibenclamida (vía oral 10 mg/kg) en ratas diabéticas y sanas, siendo el  $ABC_{0-12h}$  de glibenclamida más baja en ratas sanas (57.752 mg min/L) y más alta en ratas diabetizadas (321.24 mg min/L). En cuanto a la depuración total en rata sana el valor es más alto (0.092 L/min/kg) con respecto a la rata diabetizada (0.019 L/min/kg)<sup>32</sup>. La información anterior nos ofrece un indicio de que la glibenclamida sufrió cambios a nivel de algunos parámetros farmacocinéticos debido al estado hiperglicemia crónica y lo mismo podría ocurrir con otras moléculas que tienen actividad antidiabética, las cuales también podrían sufrir cambios a nivel de sus parámetros farmacocinéticos debidos al estado de enfermedad.

#### **4.6.- Metabolismo de fármacos**

La actividad de un fármaco es generalmente el resultado de una serie de reacciones complejas en las que influye la sustancia administrada como sus productos de degradación (metabolitos), por ello, la comprensión de las bases de la actividad farmacológica requieren el conocimiento de las vías metabólicas. Así pues, la biotransformación, es el proceso que puede sufrir más modificaciones en un organismo debido a diversos factores, entre los que se pueden enlistar a factores genéticos, fisiológicos y ambientales. Por ello, la variabilidad inter e intraindividual a nivel del metabolismo está relacionada con el efecto farmacológico y la toxicidad de los mismos. hablando de factores genéticos, se pueden considerar, las diferencias en la expresión de las enzimas responsables del metabolismo de fármacos, lo cual está relacionado con la variabilidad genética de cada individuo; dentro de los factores fisiológicos se encuentra la

edad, pues en general la mayor parte de los sistemas enzimáticos responsables de la biotransformación de fármacos se encuentran con grandes diferencias en las edades extremas de la vida, siendo muy inmaduro en los primeros años de vida o ya muy deficiente en personas de la tercera edad. el factor ambiental involucra el curso de la evolución, el hombre y otras especies de mamíferos han ido desarrollando la capacidad de metabolizar una gran cantidad de sustancias químicas, de modo que la exposición crónica a determinados factores ambientales o medicamentos pueden influir en la actividad de diferentes enzimas que intervienen en la biotransformación de sustancias exógenas del organismo; ejemplos significativos de estos factores tenemos el consumo de tabaco, alcohol, exposición a ciertas sustancias por motivo de trabajo y la ingesta de ciertos alimentos. Las principales vías metabólicas son las reacciones de fase 1 y fase 2 (conjugación). Las reacciones de fase 1 incluyen: oxidación, reducción, hidroxilación e hidrólisis; todas estas reacciones de fase 1 tienen el objetivo de hacer una molécula más polar para que sea soluble en los fluidos fisiológicos y que sea eliminado más fácilmente del organismo. Las reacciones de fase 2 son reacciones catalizadas por un conjunto de enzimas, la mayoría de ellas localizadas en el citosol y el resultado de la conjugación es obtener xenobióticos con mayor solubilidad en medios acuosos. Las conjugaciones más importantes son las siguientes: glucuronidación, sulfatación, aminoacidación y glutatiónización.<sup>34,39</sup>

#### **4.6.1.- Estudios de metabolismo.**

Los estudios de metabolismo en xenobióticos son importantes debido a tres principales razones. En primer lugar, estos estudios se han incorporado de forma rutinaria en el descubrimiento y caracterización de nuevas moléculas. La segunda, nos permiten tener una mejor comprensión de las enzimas que podrían estar involucradas en el metabolismo de dichos compuestos y las diferencias entre especies e individuos y en tercer lugar, encontrar estrategias para la optimización de propiedades farmacocinéticas aplicado al descubrimiento de nuevos fármacos<sup>40,41</sup>. Se sabe que dichas enzimas catalizan la hidrólisis de una amplia variedad de sustratos que incluyen ésteres y amidas. El clorofibrato como profármaco, es metabolizado ampliamente por enzimas estererasas.<sup>42,43</sup>

#### **4.7.- Estudio de distribución tisular**

La distribución puede ser definida como la llegada y disposición de una molécula en diferentes tejidos en un organismo. Esta distribución está sujeta a la influencia de propiedades y fenómenos que rigen el reparto de una molécula o metabolitos generados

en el organismo, entre las que se encuentran las propiedades fisicoquímicas propias de la molécula, volumen de líquido corporal, unión a proteínas plasmáticas, flujo sanguíneo en los diferentes tejidos, capacidad de difusión a diferentes zonas corporales y la solubilidad tisular<sup>3444</sup>. Por tanto, la caracterización de la distribución tisular nos permite visualizar los tejidos que puede el compuesto o los metabolitos pueden alcanzar así como las posibles vías de eliminación.

#### **4.8.- Evaluación de Diabetes Mellitus (DM) no insulino dependiente en animales.**

En la literatura existe una amplia gama de estudios de DT2 evaluada en animales. Wu J. y colaboradores han caracterizado ampliamente un modelo murino, el cual ha permitido comprender como se lleva a cabo la glucotoxicidad sobre las células  $\beta$  por parte de la treptozotocina (ZTS) y además existen otros estudios donde se compara la farmacocinética de múltiples compuestos en animales donde se induce la diabetes mellitus con alloxan o STZ<sup>45</sup>. Sin embargo, este tipo de modelos son utilizados para evaluar diabetes tipo 1. El modelo de diabetes no insulino dependiente en ratas se genera administrando una sustancias con efectos tóxicos sobre las células  $\beta$  del páncreas, por ejemplo la estreptozotocina (STZ), con previa administración de nicotinamida; el cual funciona como protector de las células pancreáticas. La STZ produce hiperglucemia por la destrucción progresiva de las células  $\beta$  del páncreas por inducción de la muerte celular debido a la metilación del ADN. A diferencia del modelo donde solo se inyecta STZ, en el modelo de diabetes no insulino dependiente se puede evaluar la codición de hiperglucemia sin la destrucción total de las células  $\beta$  del páncreas<sup>46</sup>.

#### **5.- JUSTIFICACIÓN**

Debido que la DT2 se considera un problema de salud pública y las complicaciones concomitantes asociadas con la misma se presentan con gran frecuencia, la búsqueda de nuevos compuestos para su tratamiento, así como para las complicaciones asociadas a la DT2 se considera una prioridad en el campo de investigación farmacéutica. Entre las principales complicaciones asociadas a la DT2 se encuentra la dislipidemia y con base en ello existe un gran interés en la búsqueda de nuevas entidades farmacológicas que sean capaces de dar tratamiento a la hiperglicemia y complicaciones asociadas. Para obtener información relevante de nuevas moléculas con posible actividad terapéutica en la etapa preclínica, es importante llevar a cabo estudios farmacéuticos como: fisicoquímicos y

farmacocinéticos que permitan evaluar el proceso ADME en animales y determinar si en un futuro será posible continuar con el estudio de las nuevas moléculas y su posible evaluación futura en humanos (fase clínica). El grupo de investigación del Dr. Gabriel Navarrete Vázquez sintetizó una serie de nuevas moléculas bioactivas del tipo amida azaheterocíclicas derivadas del ácido clofíbrico, de las cuales solo una de ellas resultó tener actividad farmacológica, dicha molécula (figura 2) lleva por nombre 2-(4-clorofenoxi)-2-metil-N-(1H-tetrazol-5-il) propanamida (ATAC), la cual es un análogo tetrazol del ácido clofíbrico <sup>48</sup>. El ATAC es un agonista sintético sobre receptores nucleares proliferadores de peroxisomas tipo alfa (PPAR- $\alpha$ , así como inhibidor de la enzima 11  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (11 $\beta$ -HSD1), confirmada de en un prueba *in vitro* sobre una línea celular HEK 293 (células que derivan de riñón de embrión humano), se observó la inhibición de la enzima 11 $\beta$ -HSD1; la cual está involucrada en la activación de la glucogenólisis hepática. Comparativamente el ATAC presentó un 51.17 % de inhibición contra la enzima que el mostrado por el clofibrato el cual fue de 18.11% y el ácido clofíbrico de 19.14 %.El ATAC presentó actividad antidiabética en modelo *in vivo* de diabetes mellitus no insulino dependiente. Los resultados del estudio mostraron que el nuevo compuesto fue 77% más efectivo que la glibenclamida para disminuir la glicemia<sup>49</sup>. Por lo tanto, estos datos experimentales aportaron evidencia de que el ATAC es un compuesto que probablemente pueda ser utilizado para el tratamiento de la DT2. Con base en lo anterior, la nueva molécula (ATAC) podría tener una ventaja respecto la molécula original (clofibrato), ya que puede tener una posible actividad dual sobre dos blancos terapéuticos (efecto antidiabético y hipolipemiante)

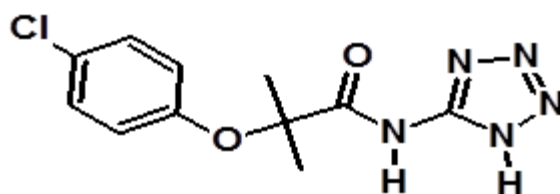


Figura 2. Análogo tetrazol del ácido clofíbrico (ATAC)

Por otra parte, el tratamiento farmacológico combinado (polifarmacia) representa un gran problema de adherencia por parte del paciente, debido a la ingesta de múltiples medicamentos. Es por eso que existe un gran interés en el estudio de nuevos fármacos que tengan blancos duales que permitan, controlar al menos dos padecimientos relacionados a la DT2, además de presentar probablemente menos efectos adversos que los medicamentos ya existentes para el tratamiento de la DT2 y sus complicaciones. El proyecto estuvo encaminado en determinar las características fisicoquímicas y biofarmacéuticas del ATAC que forman parte de la etapa de investigación preclínica por la cual deben pasar nuevas entidades farmacológicas si en un futuro se pretenden evaluar en humanos, ya que dicha molécula podría ser una alternativa terapéutica para el tratamiento de la DT2 y la dislipidemia

## **6.- HIPÓTESIS**

El ATAC mostrará parámetros farmacocinéticos favorables que podrán relacionarse con el efecto antidiabético mostrados en estudios previos en el modelo de diabetes no insulino dependiente en rata.

## **7.- OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la farmacocinética y la biodisponibilidad de un análogo tetrazol del ácido clofibrico (ATAC) con actividad antidiabética demostrada.



## 7.1.- OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el pKa, log D y la permeabilidad en el modelo de saco invertido de rata del compuesto ATAC
- Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar el compuesto ATAC.
- Realizar estudios farmacocinéticos por vía oral e intravenosa del ATAC en rata sana
- Determinar los parámetros farmacocinéticos del ATAC en rata después de la administración oral e intravenosa.
- Evaluar la biodisponibilidad del nuevo compuesto ATAC en rata.
- Evaluar la farmacocinética del ATAC en rata diabetizada después de su administración oral.
- Evaluar el metabolismo del nuevo compuesto en un modelo *in vitro*, utilizando un homogeneizado de hígado de rata.
- Evaluar la distribución tisular en órganos de alta irrigación sanguínea (corazón, riñones, hígado y páncreas) en ratas.

## 8.- METODOLOGIA

### 8.1.- Determinación de pKa

La determinación se llevó a cabo en colaboración con Martínez-Gómez Gonzala Eleonor<sup>50</sup> alumna de la licenciatura en farmacia de la facultad de farmacia de la UAEM y se describe a continuación:

#### 8.1.1.- Preparación de muestras

- Se disolvieron 0.0281g de ATAC en 10 ml de Metanol y se le agregaron 20 ml de agua con una fuerza iónica de 0.02 M para obtener un volumen final de 30 mL.
- Se preparó una solución volumétrica de hidróxido de sodio 0.01 N previamente valorada con biftalato de potasio manteniendo una relación de 0.001 equivalente con respecto al ATAC.

## 8.2.- Determinación potenciométrica

Una vez preparadas las muestras del analito, se realizaron las titulaciones con NaOH (valorado) por triplicado y los datos con ayuda de una interfase y del software Logger Pro 3.5.0 se fueron capturando los puntos de titulación dejando que en cada adición de NaOH la muestra mantuviera un valor de pH constante.

Una vez obtenido valores de cada punto (X= Volumen de NaOH; Y= pH), se calculó el  $pK_a$  mediante la ecuación de Henderson-Hasselbalch (ecuación 1):

$$pH = pKa + \log \left( \frac{[Ac^-]}{[AcH]} \right)$$

### Ecuación 1

Donde pH= es el pH de cada solución amortiguadora y  $pKa=$  es el pH al cual las concentraciones de sal conjugada y del ácido sin disociar son equimolares.

## 8.3.- Determinación de Log D

La determinación se llevó a cabo en colaboración con Lara-Cruz Erika Nayely<sup>51</sup> alumna de la licenciatura en farmacia de la facultad de farmacia de la UAEM y se describe a continuación: Una solución de 10  $\mu\text{g/mL}$  del ATAC se leyó al espectrofotómetro UV-VIS en el rango de 200 a 400 nm, los espectros obtenidos se visualizaron en la computadora con la ayuda del software UV-PROBE, donde se localizaron las lecturas con mayor absorbancia a los cuales se les llama máximos de absorción. Las muestras se sometieron a temperatura ambiente (22-25 °C) con agitación usando el método de shake-flask, n-octanol como fase orgánica y un gradiente de buffer de fosfatos de diferente pH (1, 3, 5, 7, 9, 13) para observar el comportamiento del log P en dicho intervalo. La determinación del coeficiente de partición se realizó con tres replicas (n = 3) a cada pH. Para la evaluación de Log D se utilizaron soluciones amortiguadoras de diferente pH (1, 3, 5, 7, 9, 13) y a temperatura ambiente. Para el estudio, en un tubo falcon se colocaron 4.5 mL de solución amortiguadora (S.A.) de fosfatos 0.01 M, y 2.5 mL de n-octanol. Posteriormente se adicionó una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  de ATAC. Las muestras se agitaron en vortex por 5 min. Una vez que el compuesto analizado es plenamente repartido entre los

dos solventes, se permitió la separación de las fases a partir de centrifugación y utilizando curvas de cuantificación en un intervalo de trabajo de 0.5 a 120 µg/mL se cuantificó la concentración de ATAC a cada pH en la solución acuosa. Se hicieron replicas (n=3) en cada valor de pH.

El coeficiente de distribución (log D) fue calculado de acuerdo a la ecuación 2 para cada valor de pH.

$$\log D = \frac{[\text{Compuesto ATAC}]_{\text{org}}}{[\text{Compuesto ATAC}]_{\text{aq}}}$$

### **Ecuación 2**

Donde  $[\text{Compuesto ATAC}]_{\text{org}}$  es la concentración del compuesto ATAC en la fase orgánica (determinada por balance de masa) and  $[\text{Compuesto ATAC}]_{\text{aq}}$  es la concentración del compuesto ATAC en la fase acuosa de cada solución amortiguadora a un determinado pH, el análisis se realizó por triplicado

#### **8.3.1.- Análisis de las muestras**

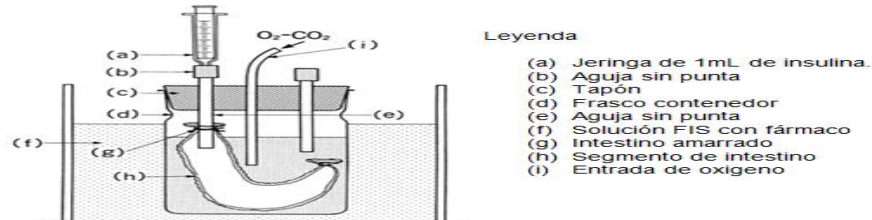
La concentración del compuesto en fase acuosa a cada pH se determinó por CLAR y la concentración en la fase orgánica se calculó por diferencia entre las lecturas por CLAR en fase acuosa.

#### **8.4.- Determinación de permeabilidad aparente (P app)**

##### **8.4.1.- Modelo de saco invertido de rata**

La determinación se llevó a cabo en colaboración con Rodríguez-Martínez Diego Omar <sup>52</sup>alumno de licenciatura en la carrera de químico farmacéutico biólogo por parte la Universidad Autónoma de Guanajuato y se describe a continuación: Para la determinación de la permeabilidad del ATAC se utilizó un modelo saco invertido de rata (cepa Wistar, machos, con un peso de 250 – 300g), las cuales fueron anestesiadas con éter etílico y después se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajeron dos fragmentos de intestino delgado de 10 cm, correspondientes al duodeno y yeyuno. Se removieron las extensiones

grasosas y mesentéricas del exterior del intestino, lavando inmediatamente con solución salina 0.9%, posteriormente se invirtió con la ayuda de un asa bacteriológica. A continuación se ató el extremo distal del saco intestinal, mientras que el extremo proximal fue amarrado a una aguja de punta roma, como se observa en la siguiente figura:



**Figura 3. Modelo de intestino invertido**

Como se muestra en la figura 3, el segmento de intestino (10 cm) se llenó con 2 mL de fluido intestinal simulado conteniendo las siguientes concentraciones de sales: NaCl (7.89 mg/mL), KCl (0.819 mg/mL, CaCl<sub>2</sub> (0.005 mg/mL). Dentro del frasco que contiene 100mL de solución fisiológica y adicionalmente el ATAC a una concentración de 50 µg/mL, se colocan los segmentos de intestino y finalmente se incubaron a una temperatura de 37 ±0.5°C con un flujo constante de oxígeno, esto para mantener el tejido viable y simular en mayor porcentaje la actividad en un intestino funcional. El experimento se llevó a cabo por duplicado para cada uno de los fragmentos de intestino utilizados, ya que el ATAC se compara contra un estándar de baja permeabilidad (amoxicilina) y otro de alta permeabilidad (naproxeno); los cuales se utilizaron como indicadores de velocidad de permeación de acuerdo a lo reportado por el sistema de clasificación biofarmacéutica de la FDA (72.73).

La permeabilidad aparente intestinal ( $P_{app}$ ) fue calculada de acuerdo a la ecuación 3:

$$P_{app} = \frac{V}{(A \cdot C_o)} \frac{dC}{dt}$$

**Ecuación 3**

Donde  $P_{app}$  = permeabilidad aparente (cm/s),  $V$  = volumen intestinal (mL),  $A$  = área superficial (cm<sup>2</sup>),  $dC/dt$  = gradiente de concentración,  $C_o$  = concentración inicial (µg/mL)

#### **8.4.2.- Análisis de las muestra.**

Las muestras colectadas a los diferentes tiempos (5, 10, 15, 30, 45, 60 y 90min) se colocaron en tubos ependorff y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 min para eliminar sólidos en suspensión, posteriormente se inyectaron en el equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución y se determinó su concentración por interpolación de los datos a una curva de calibración con un intervalo de trabajo de 1 a 50 µg/mL.

#### **8.5.- Método analítico para cuantificar ATAC en plasma**

##### **8.5.1.- Material y equipos**

- El sistema cromatográfico consistió en un HPLC de la marca Waters, detector UV de onda variable con lámpara de deuterio onda variable modelo 2487, bomba isocrática modelo 515 HPLC pump, inyector automatizado modelo 717 plus con un loop de 10 a 100 µL
- Software N2000 chromatostation
- Vórtex vertical multi-pulsos
- Comuna Zorbax CN de 5 µm, 4.6 x 250 mm (Agilent technologies)
- Repipeteador electrónico Eppendorf
- Microviales de 200µL Agilent Technologies, USA.
- Baño ultrasónico Modelo 08895. Cole-Pharmer,USA.
- Cartuchos SPE Strata-X 33 µ, polímero de fase reversa, 30 mg/3mL (Phenomenex)
- Membranas para filtración con tamaño de poro 0.45 mm tipo HVLP (Milipore, Bedford, MA, USA)
- Manifold SPE de 12 pozos (Fisher scientific)

### **8.5.2.- Reactivos**

- Análogo tetrazol del ácido clofíbrico (ATAC), proporcionado por el Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez del laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- El estándar analítico de mebendazol (estándar interno) fue adquirido en Sigma Aldrich Chem Co. (St.Louis,Mo,USA).
- Metanol, acetonitrilo grado HPLC y ácido fosfórico fueron adquiridos en J.T. Baker México.
- Agua grado HPLC fue obtenida por purificación de agua destilada en un sistema de filtración Milli-Q (Millipore, Bedford, Ma, USA).
- Fosfato monobásico de potasio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). J.T. Baker México.
- Dimetilsulfóxido. J.T. Baker México
- Nitrógeno industrial ( $\text{N}_2$ )

### **8.6.- Preparación de soluciones**

#### **8.6.1.- Solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M**

- Se pesaron 6.9 g de fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), la sal fue disuelta con aproximadamente 200 mL de agua grado HPLC, después se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de alcohol etílico y 600  $\mu\text{L}$  de ácido fosfórico y por último se aforó en un matraz volumétrico de 1L.

#### **8.6.2.- Soluciones utilizadas en la técnica de extracción sólido-líquido.**

- Se preparó una solución 50:50 metanol/acetonitrilo en una probeta (100 mL) agregando 50 mL de metanol grado HPLC y 50 mL de acetonitrilo grado HPLC.
- Se preparó una solución de ácido fosfórico al 1% en una probeta (10 ml) agregando 30 mL de agua grado HPLC y 100  $\mu\text{L}$  de ácido fosfórico para llevar a un volumen final de 10 mL.
- Se preparó una solución de metanol al 5% (agua:metanol,95:5) grado HPLC.

### **8.6.3.- Plasma de rata.**

- El plasma que se utilizó para la preparación de las curvas de calibración y los puntos control fue obtenido de ratas Wistar procedentes del Bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública (los animales fueron sanos y sin ningún tratamiento farmacológico previo).

### **8.6.4.- Preparación de las soluciones estándar, curva de calibración y puntos control para el ATAC en plasma de rata.**

#### **8.6.5.- Solución estándar del análogo tetrazol del ácido clorfíbrico (ATAC) a una concentración de 1000 µg/mL.**

Se pesó con exactitud 0.01 g del ATAC y se trasladaron a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvió con metanol grado HPLC y se llevó al aforo con el mismo disolvente para obtener la concentración de 1000 µg/mL. De esta solución se tomó una alícuota de 30 µL para la preparación de la curva de calibración en plasma de rata.

#### **8.6.6.- Solución estándar de Mebendazol (estándar interno) a una concentración de 1000 µg/mL.**

Se pesó con exactitud 0.01 g del mebendazol que se trasladaron a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvió con dimetilsulfoxido y se llevó al aforo con el mismo disolvente para obtener la concentración de 1000 µg/mL.

#### **8.6.7.- Solución estándar de Mebendazol (estándar interno) a una concentración de 200 µg/mL**

De la solución de mebendazol con una concentración de 1000 µg/mL, se tomó una alícuota de 2 mL e inmediatamente se colocaron en un matraz volumétrico de 10 mL y se llevaron al aforo con metanol grado HPLC.

### 8.7.- Preparación de la curva de calibración del ATAC en plasma de rata.

Como se presenta en la figura 4, la curva de calibración se preparó a partir de un estándar de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ATAC en un rango de concentración de 0.46 a 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

El procedimiento mediante el cual se preparó se describe en la figura 3.

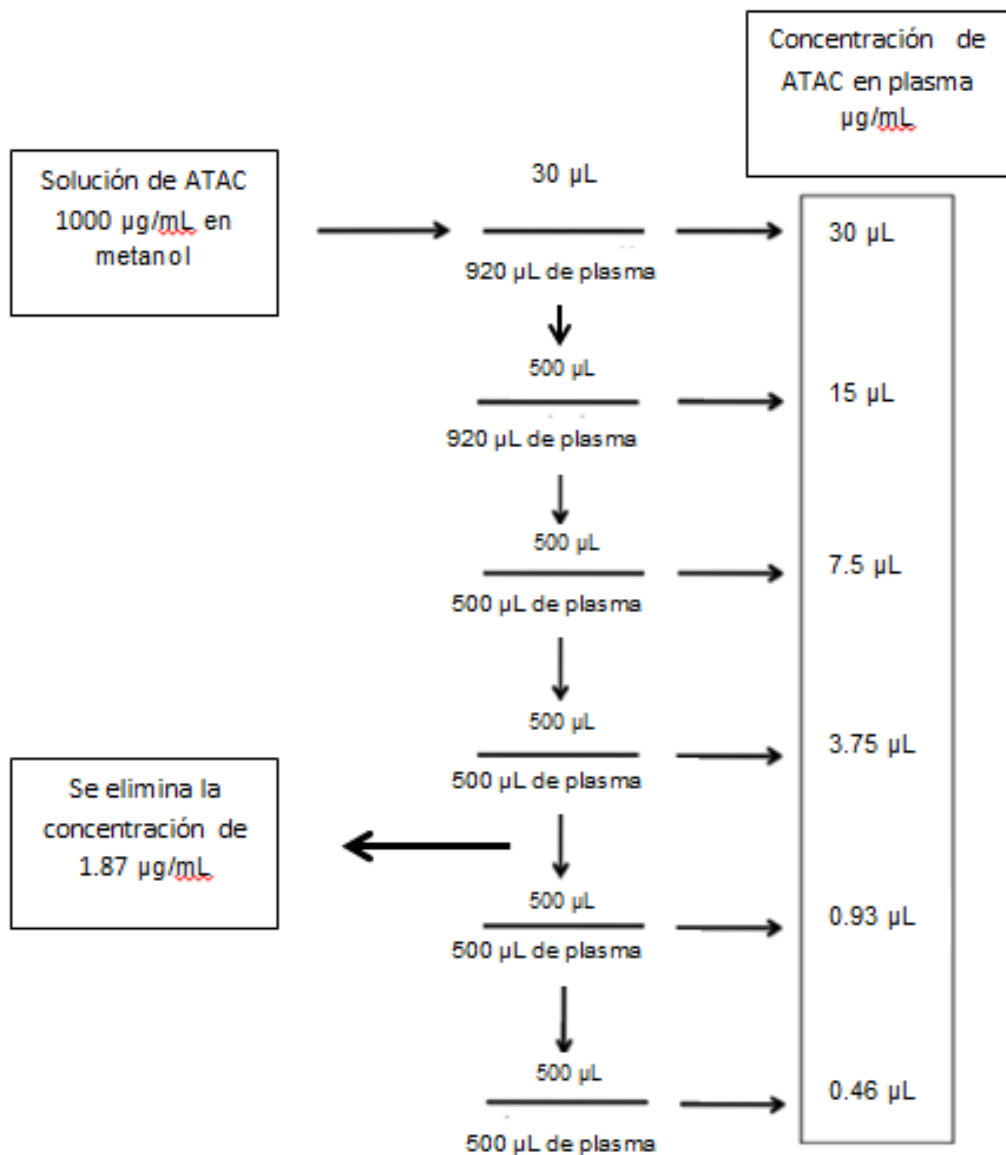


Figura 4. Diagrama de flujo para la preparación de la curva de calibración del análogo tetrazol del ácido clorfórico (ATAC) en plasma de rata



Las curvas de calibración del ATAC en solución y plasma (rata y conejo) fueron preparadas en el rango de concentración de 0.46 a 30 µg/mL como se describe en la tabla 3. Para las curvas de calibración en solución por cada nivel de concentración (alícuota de 500 µL) se le agregan 10 µL de estándar interno (400 µg/mL, mebendazol) y para las curvas de calibración en plasma a cada nivel de concentración (alícuota de 100 µL) se le agregan 10µL de estándar Interno (200 µg/mL, mebendazol).

### 8.7.1.- Curva de calibración

**Tabla 3. Preparación de la curva de calibración (volumen de muestra a procesar 100 µL)**

Puntos de la curva de calibración	Vol. solución stock de ATAC (1000 µg/mL)	Volumen de alícuota	Aforo final en plasma ó solución	Concentración (µg/mL)
P=1	30 µL	-	970 µL	30
P=2	-	P=1,500µL	500 µL	15
P=3	-	P=2,500 µL	500 µL	7.5
P=4	-	P=3,500 µL	500 µL	3.75
P=5	-	P=4,500 µL	500 µL	1.87
P=6	-	P=5,500 µL	500 µL	0.93
P=7	-	P=6,500 µL	500 µL	0.46

- Nota: el p=5 no se toma en cuenta para la curva de calibración solo es utilizado para preparar los puntos inferiores de la curva.

### 8.7.2.- Adición del estándar interno (mebendazol)

**8.7.3.- Preparación curva en solución del ATAC:** una vez preparada la curva como se indica en el diagrama anterior, a todos los puntos de la curva se les adicionó una alícuota de 10 µL de una solución de mebendazol a una concentración de 1000 µg/mL (estándar interno).

Nota: al último punto de la curva (punto # 7), es indispensable retirar 500 µL antes de agregar la alícuota de 10 µL correspondiente al estándar interno (solucion de mebendazol 1000 µg/mL).El punto # 5 sólo se utiliza para la preparación de los puntos inferiores de la curva de calibración (punto 6 y 7).

**8.7.4.- Preparación curva en plasma:** a todos los puntos (100  $\mu$ L) se les agregaron 10  $\mu$ L de la solución 200  $\mu$ g/mL de estándar interno (mebendazol).

#### **8.8.- Preparación de los puntos control de calidad**

Las muestras control de calidad (QC) a las concentraciones de 1.5 ,18.0 y 24.0  $\mu$ g/mL fueron preparadas adecuadamente en plasma de rata de la siguiente manera:

Punto control alto (24.0  $\mu$ g/mL)

Tomar una alícuota de 24  $\mu$ L de una solución Stock de 1000  $\mu$ g/mL de ATAC y aforar con 976 mL de plasma de rata para obtener la concentración de 24  $\mu$ g/mL Punto control medio (18.0  $\mu$ g/mL)

Tomar una alícuota de 18  $\mu$ L de una solución Stock de 1000  $\mu$ g/mL de ATAC y aforar con 982 mL de plasma de rata para obtener la concentración de 18  $\mu$ g/mL Punto control bajo (1.5  $\mu$ g/mL)

Solución intermedia

Tomar una alícuota de 30  $\mu$ L de una solución Stock de 1000  $\mu$ g/mL de ATAC y aforar con 970 mL de metanol para obtener la concentración de 30  $\mu$ g/mL

Tomar una alícuota de 50  $\mu$ L de la solución intermedia de 30  $\mu$ g/mL de ATAC y aforar con 950 mL de plasma de rata para obtener la concentración de 1.5  $\mu$ g/mL Nota: una vez preparados los puntos control, se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L por nivel y se agregaron 10 $\mu$ L de estándar interno (200  $\mu$ g/mL, mebendazol) para realizar la extracción en fase sólida.

#### **8.8.1.- Adecuabilidad**

Para evaluar la adecuabilidad del sistema se tomó una alícuota de 20  $\mu$ L, de la solución estándar de mebendazol a concentración 1000  $\mu$ g/mL, se adicionaron 30  $\mu$ L de la solución de ATAC concentración 1000  $\mu$ g/mL y se aforó con metanol a 1 mL (950  $\mu$ L),obteniendo una concentración final de 30  $\mu$ g/mL para el ATAC y 20  $\mu$ g/mL del estándar interno (mebendazol).

### **8.9.- Procedimiento de extracción en fase sólida**

La Extracción en fase sólida sigue siendo el procedimiento de preparación de muestras de crecimiento más rápido. Es la técnica más usual en el tratamiento y concentración de muestras biológicas antes de su análisis por HPLC, HPLC-MASAS, a continuación se presenta el proceso de extracción que se utilizó para extraer el ATAC de las muestras plasmáticas.

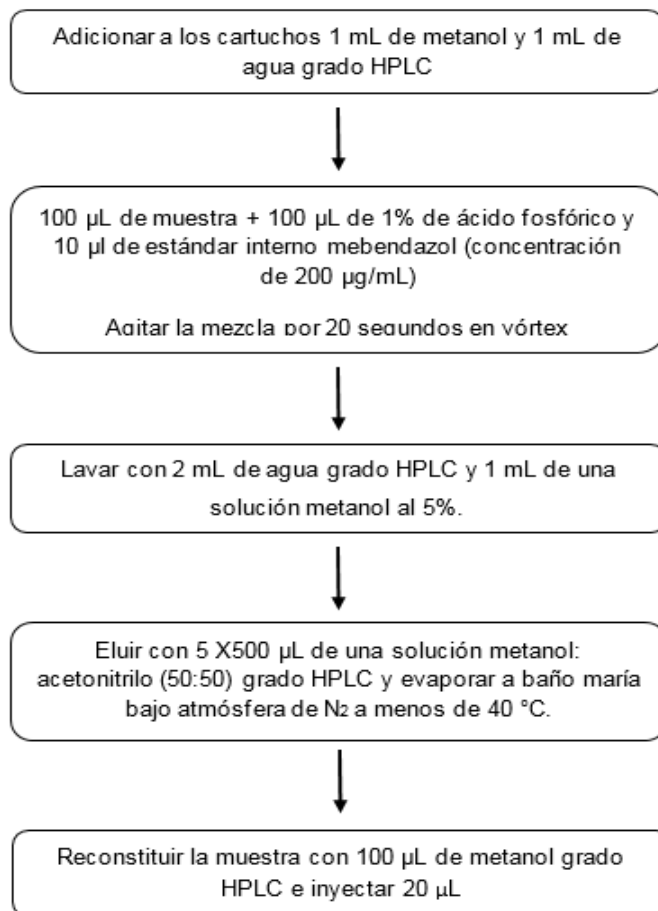
La metodología a seguir para las muestras en plasma fue la siguiente:

- 1.- Se acondicionaron los cartuchos con 1 mL de metanol y 1 mL de agua grado HPLC.
- 2.- Se realizó un pretratamiento de la muestra plasmática de la siguiente manera:

en un microtubo de 2 mL SE COLOCARON 100  $\mu$ L PLASMA, SE ADICIONARON 100  $\mu$ L de una solución al 1% de ácido fosfórico y 10  $\mu$ L de estándar interno mebendazol (concentración de 200  $\mu$ g/ml ), la mezcla se agita por 20 segundos en un vórtex y se solocó en el cartucho para su extracción.

3. Se realizó un lavado con 2 mL de agua grado HPLC y 1 mL de una solución metanol al 5%.
4. Se eluyó la muestra con 5 X500  $\mu$ L de una solución metanol:acetonitrilo (50:50) grado HPLC.
5. Se llevó a sequedad en un baño maría a una temperatura no mayor a 40 °C bajo atmósfera de nitrógeno durante 8 minutos.
6. Se reconstituyó la muestra con 100  $\mu$ L de metanol grado HPLC.
7. Se inyectaron 20  $\mu$ L de muestra al cromatógrafo.

En la figura 5 se presenta el diagrama del proceso de extracción en fase sólida utilizado para separar al ATAC de los compuestos endógenos del plasma de rata.



**Figura 5. Diagrama de flujo para la preparación de las muestras plasmáticas**

### **8.10.- Validación del método analítico para cuantificar el ATAC por HPLC**

El método analítico en plasma fue validado conforme al protocolo establecido en el laboratorio y siguiendo algunas de las recomendaciones establecidas por la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 para la selectividad, linealidad, precisión, exactitud, recobro absoluto, límite de cuantificación<sup>53</sup>, como se describe en la tabla 4.

**Tabla 4. Parámetros y criterios establecidos por la NOM-177-SSA1-2013**

PARAMETRO DE EVALUACIÓN	FORMA DE EVALUCION	CRITERIOS DE ACEPTACIÓN
Selectividad	2 curvas en plasma de rata, 2 en plasma de humano y 2 en plasma de conejo  Total: 6 curvas en plasma	No encontrar interferencias con los analitos de interés y que los compuestos endógenos próximos a el LIC tengan una respuesta menor al 20% y del 5% para el EI
Linealidad en sistema	2 curvas en solución	Coefficientes de correlación mayor a 0.99, CV% debido al error de la regresión, intervalo de confianza al 95% para pendiente y el intercepto.
Linealidad del método	4 curvas en plasma de humano	CV% menores al 15% y 20% para el LIC, exactitud $\pm 15$ del valor nominal, calcular intervalo de confianza al 95% para la pendiente y el intercepto por curva, error debido a la regresión, coeficientes de correlación mayor a 0.99
Recobro absoluto	Una vez realizado el proceso de extracción a muestras de plasma con una concentración conocida de los compuestos de interés, se calcula el recobro absoluto con la respuesta de lo siguiente:  $\frac{\text{Relación del analito/estándar interno en la matriz biológica}}{\text{Relación del analito/estándar interno en solución}}$	No necesariamente debe ser el recobro absoluto de 100% pero si debe ser reproducible y exacto en todo el rango de la curva de calibración
Límite de cuantificación	Método 1: calcular el promedio de la desviación estándar del intercepto y el promedio de la pendiente (usar 6 curvas para el promedio)  Método 2: comparar el promedio de la señal (área) del ruido (blancos) contra la concentración más baja por cuadruplicado	Método 1: aplicar la siguiente fórmula:  $LQ = 10DE/S$ DE= promedio de la desviación estándar del intercepto S=promedio de la pendiente Método 2: El promedio de la señal del ruido (altura) multiplicada por 10 debe ser similar a la altura promedio de la concentración considerada como límite de cuantificación cumpliendo una relación 10:1 Criterios a cumplir: Y cumplir con criterios CV% 20% para

		el LIC, exactitud $\pm 15$ del valor nominal
exactitud	La exactitud se calculó con los datos obtenidos de reproducibilidad y repetibilidad	En cada nivel de concentración los resultados deben estar dentro del $\pm 15$ del valor nominal real
Precisión Repetibilidad y reproducibilidad (2 días)	Puntos (CA,CB,CM y LIC) por cuadruplicado+ curva de calibración	CV% menores al 15% y 20% para el LIC, exactitud $\pm 15$ del valor nominal
Estabilidad a corto plazo 24 horas a temperatura ambiente	Puntos(CA,CB ) por duplicado 24 horas + CA,CB curva de calibración y fresca del día	CV% menores al 15%, exactitud $\pm 15$ del valor nominal
Estabilidad a largo plazo en refrigeración un mes -3°C	Puntos (CA,CB ) por duplicado a los tiempos 0, 15 días y 30 días almacenadas en refrigeración + CA,CB curva de calibración y fresca del día	CV% menores al 15%, exactitud $\pm 15$ del valor nominal
Estabilidad muestra procesada 24 horas en refrigeración -10°C	Puntos (CA,CB ) por duplicado + CA,CB curva de calibración y fresca del día	CV% menores al 15%, exactitud $\pm 15$ del valor nominal
Estabilidad de la solución en refrigeración -10°C	Puntos (CA,CB ) por triplicado a 0,15 y 30 días almacenadas en refrigeración + CA,CB curva de calibración y fresca del día	CV% menores al 3 %

**CV%=Coeficiente de Variación porcentual, C<sub>máx</sub>=Concentración máxima, LC=Límite de cuantificación.**

### 8.11.- Estudios de biodisponibilidad

El estudio de biodisponibilidad consistió en la comparación de los parámetros farmacocinéticos de la administración intravenosa y oral en rata.

Las ratas Wistar que se utilizaron para el estudio farmacocinético son del bioterio del Instituto Nacional de Salud pública .El experimento se realiza en la etapa de luz (ratas con periodos de luz-obscuridad de 12 horas) y el manejo de los animales se llevó a cabo mediante los lineamientos propuestos en la norma NOM-062-ZOO-1999 donde se describen las especificaciones de técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y la guía de lineamientos éticos para la experimentación del dolor en animales <sup>54,55</sup>.

### 8.11.1.- Estudio de administración intravenosa y oral en rata

### 8.11.2.- Cirugía en arteria caudal

Para el desarrollo de los estudios farmacocinéticos, se requiere la canulación previa de los animales por la vena caudal conforme se muestra en la figura 6, con material previamente desinfectado, se procedió a colocar un catéter de Polietileno (PE), combinación de PE-10 y PE-50 con I.D. 0.28 mm y I.D. 0.58 mm, respectivamente (Clay Adams, Parsippany, NJ), en la arteria caudal<sup>56,57</sup>. Por medio de la cánula se realiza la administración intravenosa y la toma de muestras sanguíneas.

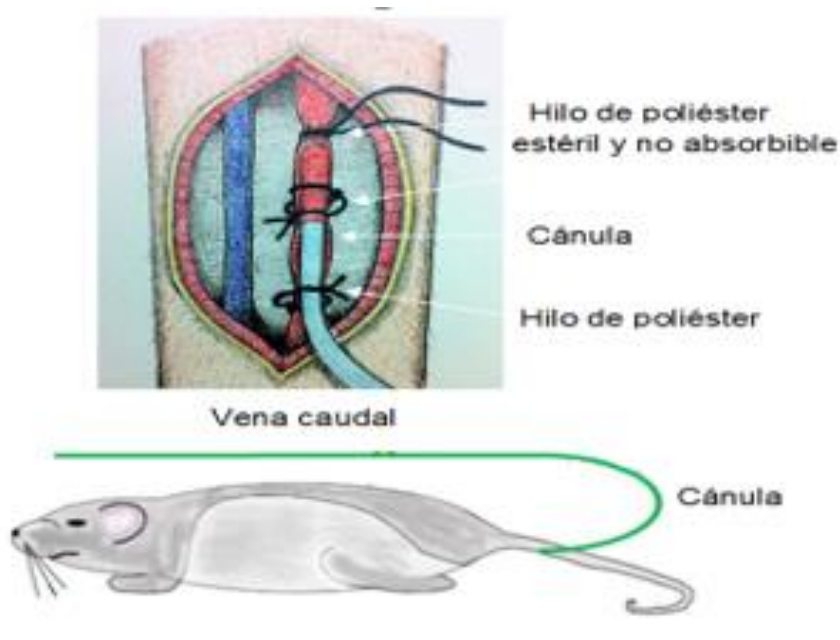


Figura 6. Colocación de la cánula en la vena caudal

### **8.11.3.- Soluciones de administración**

El ATAC se disolvió en una solución salina estéril con 10% de cremofor y fue sonicada por 10 min previo a la administración por ambas vías.

### **8.11.4.- Administración intravenosa y oral**

A ratas Wistar (240-250 g), se les administró una dosis de 50 mg/kg de peso en un volumen de vehículo de 4 mL/kg por vía oral e intravenosa con un ayuno previo de 8 horas.

### **8.11.5.- Toma de muestras**

Se tomaron muestras sanguíneas (0.200 mL). Las cuales se colocaron en tubos previamente heparinizados (colocar 100 µL de heparina que se encuentra a una concentración de 100 µg/mL y evaporar a 40 °C para obtener una concentración final de heparina de 10 UI para no diluir la muestra) a los siguientes tiempos: 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 y 600 min.

Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min para separar el plasma. Las muestras se guardaron a temperatura de congelación (-20°C aproximadamente) hasta su análisis por CLAR.

### **8.11.6.- Análisis estadístico del estudio de biodisponibilidad**

Los parámetros farmacocinéticos: concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ), tiempo hasta  $C_{max}$  ( $t_{max}$ ), área bajo la curva de tiempo 0 a infinito ( $AUC_0 - \infty$ ), área bajo la curva desde tiempo 0 a t h ( $AUC_0-t$ ), constante de eliminación ( $k_e$ ), constante de absorción ( $K_a$ ) tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), volumen de distribución ( $V_d$ ) y la depuración plasmática ( $Cl$ ), se calcularon por medio del análisis no compartimental por medio del programa WinNonlin versión 2.0. Las diferencias entre los parámetros farmacocinéticos se evaluaron mediante la prueba t de Student. Una  $p < 0.05$  fue considerada significativa.



## **8.12.- Modelo de diabetes no insulino dependiente en rata**

Se utilizaron ratas Wistar macho (240-250 g), provenientes del bioterio que es propiedad del Instituto Nacional de Salud Pública, las ratas se dividieron en 2 grupos con 5 animales cada grupo, control (C) en estado sano y grupo diabético (D). Previo 24 horas de ayuno se les tomó lectura por medio del glucómetro para corroborar la condición previa de ser normoglicémicos, después de haber comprobado niveles normales se administró estreptozotocina intraperitoneal (STZ, 55 mg/kg) disuelta en una solución amortiguadora de citrato 0.1M (pH 4.5) y 48 horas más tarde mediante un glucómetro se determinaron las concentraciones de glucosa en sangre. Se considera establecida la diabetes cuando la glucemia se encuentra en un rango de 200 a 300 mg/dL. La toma de muestras sanguíneas se realiza por canulación por arteria caudal tanto las ratas control como las diabetizadas<sup>47,58</sup>

### **8.12.1.- Evaluación del estado diabetizado y dosis de prueba para el estudio farmacocinético en animales con hiperglicemia.**

La farmacocinética en estado diabetizado solo se realizó en ratas tratadas con estreptozotocina y una vez establecido el estado de hiperglicemia, los animales se mantuvieron resguardados en el bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública durante un mes con los cuidados necesarios antes del estudio farmacocinético. Se les administró una dosis de 50 mg/kg del compuesto (ATAC) vía intra-gástrica (oral) y se procedió a la toma de muestras sanguíneas para el estudio farmacocinético con los tiempos de muestreo mencionados en el apartado de toma de muestras.

## **8.13.- Estudio de metabolismo *in vitro* (prueba enzimática con el homogenizado de hígado de rata)**

Obtención del tejido y preparación del extracto enzimático

Los animales, una vez perfundidos para eliminar la sangre del organismo fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente se extrajo el hígado, el cual se lavó con solución salina estéril para eliminar residuos de sangre. Se cortaron pequeños trozos del hígado (0.5 a 1g) y se homogenizaron con 3 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4 1x con inhibidor de proteasas (sigmafast protease inhibitor tablets). Se homogeneizó durante un minuto manteniendo en frío con hielo. Se centrifugó a 9000 g durante 30 min a 4°C y se utilizó el sobrenadante para el ensayo enzimático<sup>59,60</sup>.

### **8.13.1.- Actividad enzimática (hidrólisis del ATAC por el extracto enzimático)**

La reacción enzimática se inició mezclando 15 µl de ATAC (1 mM, 1.78mM, 3.1 mM por triplicado) con el equivalente a 10 mg de proteína total proveniente del homogeneizado, se incubaron durante 15 minutos., 30 minutos., 1 y 2 horas a 37°C bajo una atmósfera (O<sub>2</sub> 95%/CO<sub>2</sub> 5%). Para finalizar la reacción se añadieron 150 µL de ácido perclórico 0.3 N y se filtró a través de membrana de 0.22 µm, inyectar 20 µL del filtrado al cromatógrafo de líquidos para su análisis<sup>59,61</sup>.

### **8.14.- Estudio de distribución del ATAC en diferentes órganos**

Al finalizar el estudio farmacocinético, se anestesia el animal con xilacina y ketamina en proporción 1:1 por vía intraperitoneal y se perfundió el animal para eliminar la sangre circulante en los órganos con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4, después se extrajeron los órganos de interés: corazón, hígado, riñones y páncreas, se pesaron, se lavaron con solución salina estéril para eliminar los residuos de sangre y finalmente se conservaron en congelación a -20°C hasta el momento de su uso. Al momento de su análisis se homogenizaron con 3 mL de solución salina estéril, el sobrenadante se filtró por membrana de 0.22 µm y una alícuota de 100 µL se sometió a extracción en fase sólida para su posterior análisis por HPLC <sup>62,63</sup>.

## 9.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 9.1.- Determinación de pKa

En la figura 7 se muestra el diagrama de especiación propuesto para el ATAC y en la tabla 5 los valores de pKa determinados de manera experimental para el compuesto indicando dichos resultados que podría comportarse como un ácido débil.

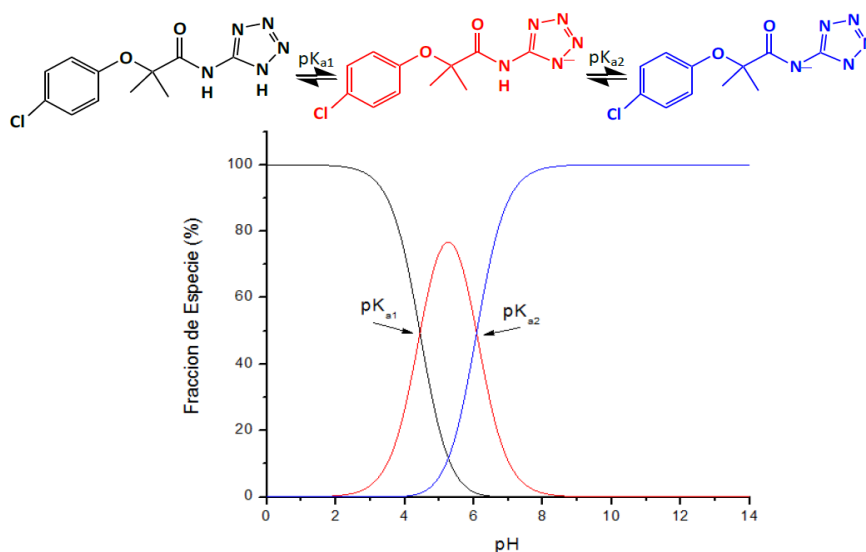


Figura 7. Diagrama de especiación del análogo tetrazol del ácido clorífbrico (ATAC)

Tabla 5. Valores de pKa del ATAC

Análogo tetrazol del ácido clorífbrico (ATAC)
pka 1= 4.43± 0.10
pKa 2= 6.08 ± 0.14

De acuerdo a los resultados obtenidos se considera que el análogo tetrazol del ácido clorífbrico sea probablemente un ácido débil que se encuentra en su forma no ionizada a pH por debajo de 4 y en su forma totalmente ionizada a pH por encima de 6.

## 9.2.- Determinación de Log D

En la tabla 7, se presentan los valores de Log D del análogo tetrazol del ácido clorífbrico.

**Tabla 5. Determinación de Log D para el análogo tetrazol del ácido clorífbrico (ATAC)**

pH	1	3	5	7	9	13
promedio	1.7949	1.738	1.1060	-0.8798	-2.2214	-2.236
CV%	1.82	1.82	1.06	0.79	1.17	0.85

En acuerdo con los resultados obtenidos, el ATAC muestra un comportamiento correspondiente a un ácido, ya que los valores de Log D mayores a 0, se encuentran en el intervalo de pH ácido (menores a pH 5) indicando que la especie neutra o no ionizada podría estar predominando en este intervalo y las especies ionizadas se encuentran en el intervalo de pH mayor a 5.

## 9.3.- Determinación de permeabilidad aparente ( $P_{app}$ )

### 9.3.1.- Modelo de saco invertido de rata

Para el ATAC se evaluó el transporte en ambos segmentos (duodeno y yeyuno), se presentan los resultados de la tasa de transporte del ATAC y su comparación contra estándares de baja (amoxicilina) y alta permeabilidad (naproxeno); los cuales fueron evaluados de forma experimental bajo las mismas condiciones que la molécula de prueba (ATAC). El naproxeno fue elegido como el estándar de alta permeabilidad y la amoxicilina como el estándar de baja permeabilidad de acuerdo con el sistema de clasificación biofarmacéutica <sup>64,65</sup>.

Como se puede observar en la figura 8, la permeabilidad aparente del ATAC tanto en duodeno (A) como en yeyuno (B) es baja, pues cuando se compara contra estándares de alta (naproxeno) y baja permeabilidad (amoxicilina), el ATAC la cantidad de masa

transportada durante el curso temporal es más parecida al perfil de amoxicilina., por lo tanto, es muy probable que el ATAC sea una molécula de velocidad de permeación baja.

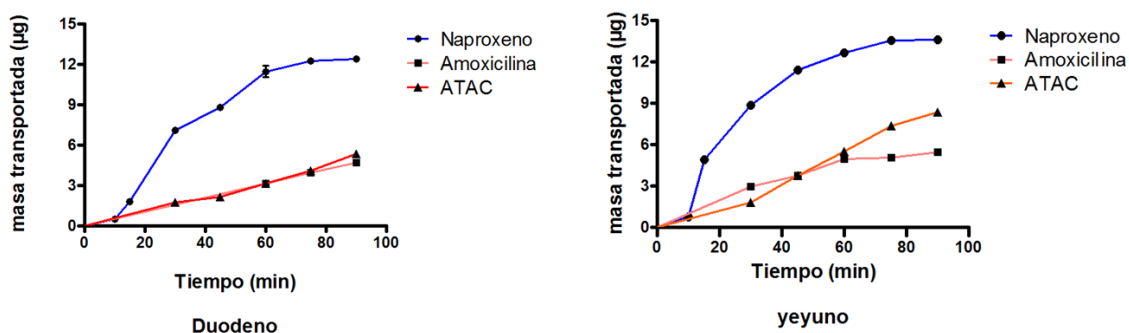


Figura 8. Estudio de permeabilidad del naproxeno, amoxicilina y ATAC en duodeno (A) y yeyuno (B) en modelo de intestino invertido en rata

Tabla 6. Permeabilidad aparente experimental en intestino invertido de rata

Molécula	<i>P<sub>app</sub></i> (cm/s)	
	Duodeno	Yeyuno
Naproxeno	$3.01 \times 10^{-5}$	$3.98 \times 10^{-5}$
Amoxicilina	$8.51 \times 10^{-6}$	$1.00 \times 10^{-6}$
ATAC	$8.73 \times 10^{-6}$	$1.62 \times 10^{-6}$

De acuerdo a la figura 8 y tabla 8, se observó que los niveles de concentración del compuesto bajo estudio son indetectables en los primeros tiempos de muestreo siendo cuantificable hasta los 90 min y a la par se observa que la tasa de transporte es ligeramente más alta en duodeno que en yeyuno, sin embargo, comparado con los estándares de control (naproxeno y amoxicilina) podría considerarse una molécula de baja permeabilidad ya que su velocidad de permeación es más similar al estándar de baja permeabilidad (amoxicilina) como se confirma en los resultados de permeabilidad mostrados en la tabla 7 .Por otro parte, el valor de permeabilidad aparente (*P<sub>app</sub>*) reportado para clofibrato es  $-0,52 \times 10^{-6}$  cm / s a pH 7,4) <sup>21</sup> y el valor de *P<sub>app</sub>* obtenido para el ATAC es más alto con respecto al valor reportado para clofibrato. Por lo

tanto, se puede deducir que el ATAC es una molécula capaz de permear de manera más rápida que el clofibrato, mejorando así su potencial de absorción.

#### 9.4.- Desarrollo y validación del método analítico para cuantificar ATAC en plasma

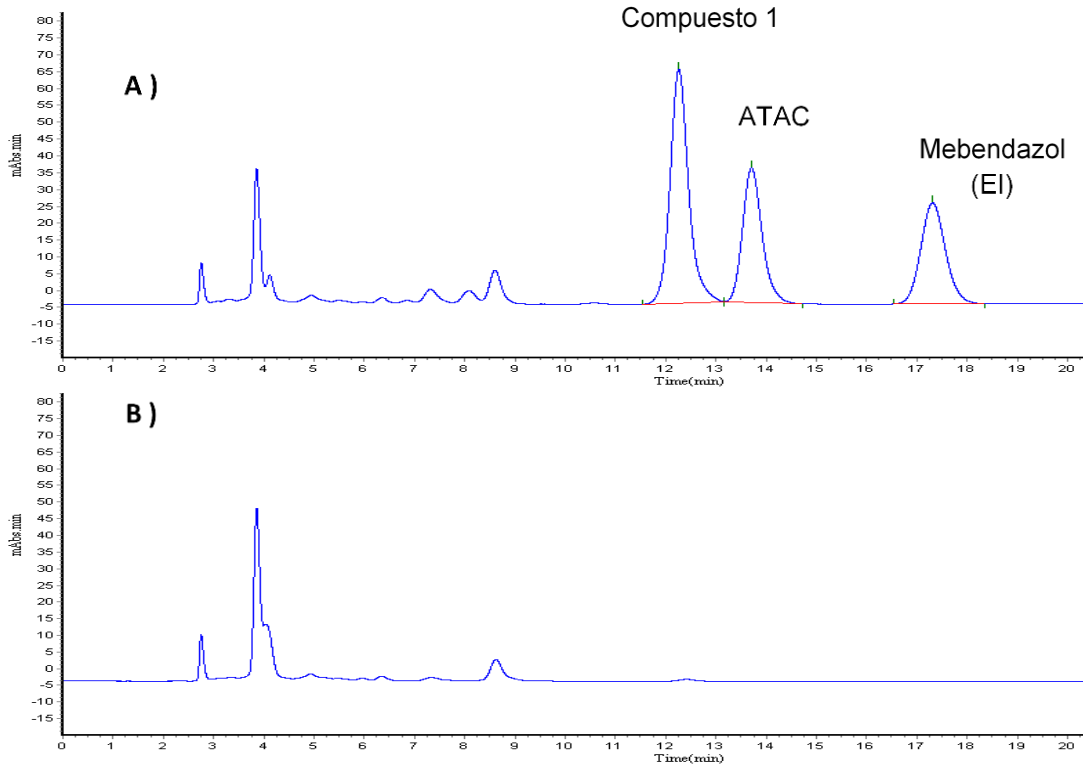
Una vez que se probaron diferentes condiciones cromatografías con la finalidad de optimizar la detección y cuantificación del ATAC en plasma de rata, en la tabla 9, se presentan las condiciones óptimas que fueron seleccionadas para el compuesto de interés (ATAC) y al mismo tiempo separar un metabolito que fue detectado durante en un perfil farmacocinético preliminar tras la administración vía oral del ATAC, ya que dicho metabolito interfería durante la detección y cuantificación del ATAC. El metabolito encontrado fue nombrado como **compuesto 1** y cabe mencionar que tiene un tiempo de retención similar al ácido clofíbrico (metabolito activo del clofibrato).

**Tabla 7. Condiciones Cromatográficas para separar el ATAC y compuesto 1 (metabolito)**

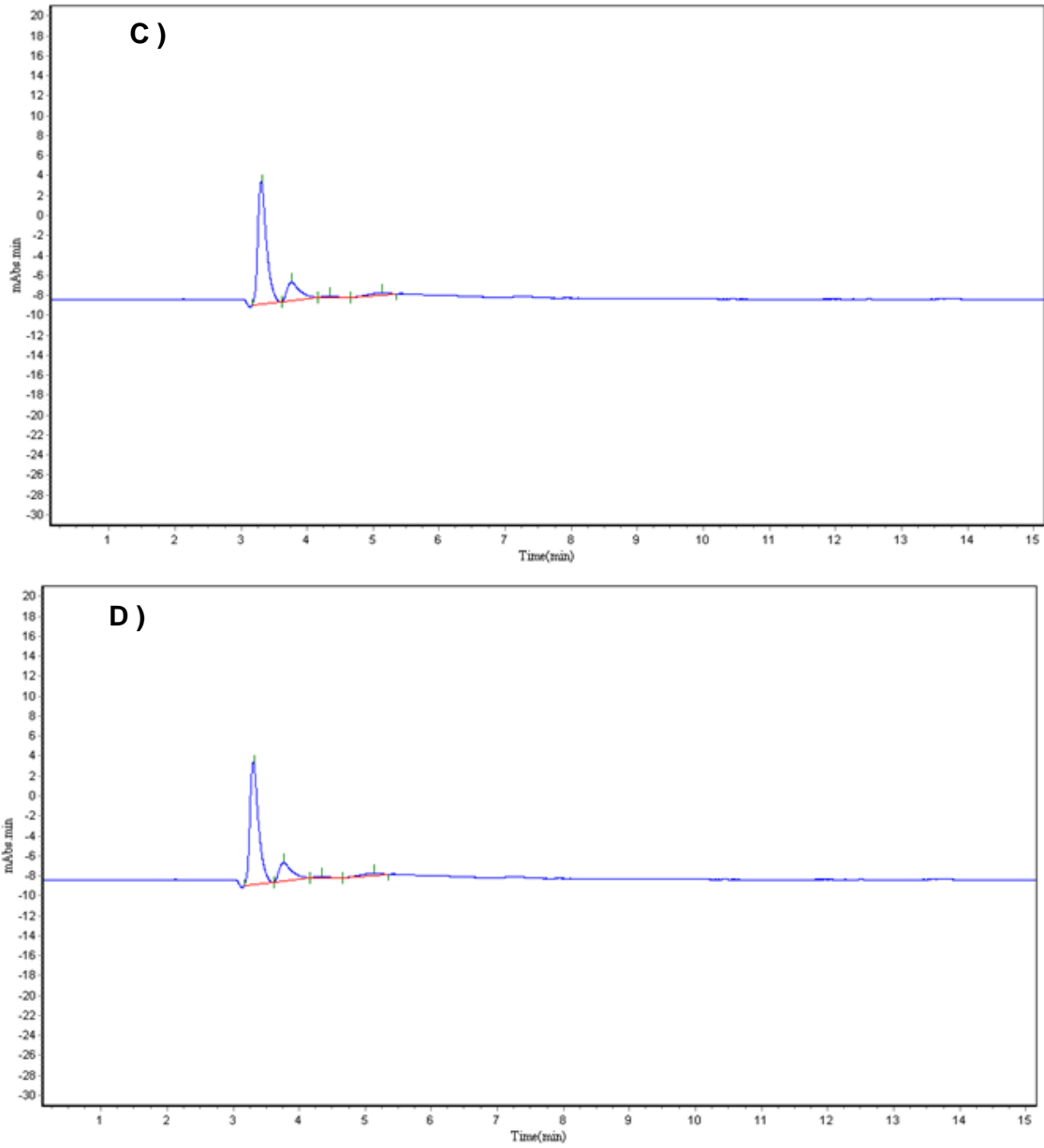
Columna	Zorbax CN de 4.6 x 250 mm
Fase móvil	solución amortiguadora 0.05 M de NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> con 0.06% de etanol pH= 3.5 /metanol (60:40)
Volumen de inyección	10 µL
Longitud de onda	223 nm
Temperatura	Ambiente
Estándar Interno	Mebendazol (20 µg/mL)
Intervalo de cuantificación	0.43-30 µg/mL

#### 9.5.- Validación del método analítico para cuantificar el ATAC por HPLC

Selectividad: En la figura 9 y 10 se presentan los cromatogramas correspondientes a las sustancias de interés ATAC, compuesto 1 (metabolito) y estándar interno (mebendazol) en matrices biológica (plasma de rata, conejo y humano).



**Figura 9. Selectividad del método en plasma; (A) cromatograma de ATAC, compuesto 1 y estándar interno (Mebendazol),(B) plasma blanco de rata**



**Figura 10. Selectividad del método en plasma; (C) cromatograma de plasma blanco de conejo y plasma blanco de humano (D)**

Como se puede observar, no existen compuestos endógenos de las diferentes matrices biológicas que se probaron (plasma de rata, conejo y humano) que interfieran de manera importante con el ATAC, el compuesto 1 y el EI (mebendazol), por lo tanto, el método analítico se consideró selectivo



### 9.6.- Linealidad del método

En la tabla 10, se presentan los resultados de linealidad del método para cuantificar el ATAC y el compuesto 1 en plasma. Se observa que el método analítico cumple con el parámetro de linealidad, ya que el coeficiente de correlación fue de 0.9997 para el ATAC y 0.9989, para el compuesto 1, para el modelo de la ecuación lineal se realizó un análisis de varianza para la regresión (tabla 11) donde se demuestra que existe relación entre la concentración y la respuesta en el rango de trabajo de 0.46- 30 µg/mL para el ATAC (valor P=1.22894E-08) y de 0.78 a 50 µg/mL para el compuesto 1 (valor P= 2.0366E-07)

**Tabla 8. Linealidad del método analítico para el ATAC y compuesto 1**

	ATAC Intervalos de confianza ( $\alpha_{0.05}$ )			Compuesto 1 Intervalos de confianza ( $\alpha_{0.05}$ )		
	Media ( $n = 4$ )	Bajo	Alto	Media ( $n = 4$ )	Bajo	Alto
m	0.044	0.04279	0.05027	0.0273	0.02450	0.02903
b	-0.0087	-0.01881	0.01626	-0.0124	-0.05143	0.05516
r	0.9997			0.9989		

**Tabla 9. Análisis de varianza para la regresión lineal del ATAC y compuesto 1**

	ATAC	Compuesto 1			
Estadísticas de la regresión					
Coefficiente de correlación	0.999	0.998			
Coefficiente de determinación R <sup>2</sup>	0.999	0.999			
Error típico	0.007	0.015			
Observaciones	6	6			
ANÁLISIS DE VARIANZA					
ATAC					
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor-P

Regresión	1	1.267	1.267	22092.507	1.22894E-08
Residuos	4	0.00	0.000		
Total	5	1.267			
<b>ANALISIS DE VARIANZA</b>					
<b>Compuesto 1</b>					
	1	1.297	1.297	5224.407	2.0366E-07
	4	0.000	0.000		
	5	1.298			

Con los resultados anteriores se demuestra que el método analítico presenta linealidad para el ATAC y compuesto 1 en plasma de rata.

En la tabla 12 se muestran los parámetros de precisión y exactitud del método analítico para cuantificar el ATAC así como del compuesto 1. Se observa que los valores de coeficiente de variación porcentual (CV%) en un mismo día de trabajo (día 1 y 2) fueron inferiores al 15%. De igual forma se encontró los resultados de reproducibilidad para la variabilidad entre días presentaron un CV% inferior al 15% en los tres niveles evaluados.

**Tabla 10. Precisión (CV%) y exactitud (Desv.Abs. %) del método analítico**

Concentración teórica (µg/mL)	ATAC	COMPUESTO 1
	Concentración experimental (µg/mL)	Concentración experimental (µg/mL)
1.5 Repetibilidad (día 1)	1.20	1.56
	1.18	1.61
	1.30	1.48
	1.27	1.73
	1.33	1.48
	1.37	1.36
CV%	<b>5.73</b>	<b>8.17</b>
1.5 Repetibilidad (día 2)	1.52	1.54
	1.20	1.39
	1.36	1.55
	1.56	1.73
	1.31	1.41

	1.11	1.51
CV%	<b>13.14</b>	<b>8.08</b>
Reproducibilidad (día 1 y 2) CV%	<b>10.21</b>	<b>7.77</b>
Exactitud (Desv.Abs.%)	<b>13.59</b>	<b>6.14</b>
18 Repetibilidad (día 1)	18.91	18.42
	14.26	17.56
	18.32	17.56
	19.06	17.17
	15.13	17.25
	18.91	17.85
CV%	<b>12.34</b>	<b>2.58</b>
18 Repetibilidad (día 2)	17.40	20.75
	17.63	21.23
	17.99	20.53
	17.65	20.68
	16.87	19.14
	17.49	20.84
CV%	<b>2.34</b>	<b>2.58</b>
Reproducibilidad (día 1 y 2) CV%	<b>8.43</b>	<b>8.48</b>
Exactitud (Desv.Abs.%)	<b>5.91</b>	<b>8.43</b>
24 Repetibilidad (día 1)	21.53	26.61
	21.31	26.33
	21.59	26.80
	23.13	25.59
	23.85	25.85
	21.10	26.35
CV%	<b>5.10</b>	<b>1.73</b>
24 Repetibilidad (día 2)	22.90	28.82
	23.84	27.37
	19.60	29.84
	24.57	25.64
	24.66	26.99
	23.09	27.94
CV%	<b>8.07</b>	<b>5.26</b>

Reproducibilidad (día 1 y 2) CV%	<b>6.92</b>	<b>4.81</b>
Exactitud (Desv.Abs.%)	<b>6.70</b>	<b>12.54</b>

Con los resultados anteriores se muestra que el método analítico cumple con los parámetros de precisión, exactitud.

### 9.7.- Límite de cuantificación y detección del método

En la tabla 13 se presentan los resultados de límite de cuantificación y de detección del método analítico. En ella se observa que para el valor de 0.49 µg/mL, el CV% y la Desv. Abs.(%) fueron menores al 15 %, por lo tanto, este es la concentración más baja que permite cuantificar con confiabilidad al ATAC en el método analítico desarrollado. El límite de detección para el ATAC y el compuesto 1, fue de 0.30 µg/mL.

**Tabla 11. Evaluación del límite de cuantificación y de detección**

Límite de cuantificación		
Replica	Concentración teórica (µg/mL)	Concentración experimental (µg/mL) ATAC
1		0.50
2		0.51
3	0.46	0.49
4		0.51
5		0.49
6		0.51
promedio		0.50
CV%		2.23
Desv.Abs.%		7.06
Límite de detección		
0.30 (µg/mL)		

### 9.8.- Recobro absoluto

En la tabla 14 se presentan los resultados de recobro absoluto del método analítico para ATAC y el Compuesto 1, la determinación del recobro se realiza añadiendo ambos compuesto (ATAC y compuesto 1) en concentraciones conocidas al plasma de rata, se somete al proceso de extracción anteriormente mencionado en la sección experimental dividiendo la respuesta del ATAC/estándar interno en plasma/ la respuesta del ATAC/estándar interna en solución

**Tabla 12. Recobro absoluto (%)**

Concentración (µg/mL)	% Recobro	
	ATAC	COMPUESTO 1
1.5	101.65	103.98
	79.83	92.59
	90.79	98.97
	103.89	115.07
	87.41	98.84
	91.18	90.71
18	97.96	102.31
	99.97	97.57
	98.07	97.57
	93.73	99.14
	99.13	104.82
	101.61	99.93
24	89.69	111.68
	88.79	106.63
	89.97	107.72
	99.39	104.50
	97.68	106.84
	97.54	112.44

El método utilizado en este estudio mostró una recuperación absoluta de más del 98.0% en los tres niveles control

De acuerdo a los resultados el recobro absoluto del método analítico en los tres puntos control (alto, medio y bajo) tiene recobros en promedio mayores al 90% y por lo tanto se cuenta con un método de extracción eficiente para extraer el ATAC y el compuesto 1 de la matriz biológica.

### 9.9.- Farmacocinética (estudio farmacocinético por vía oral e intravenosa del ATAC).

En la figura 11 presentan los resultados de concentración plasmática vs tiempo del ATAC al ser administrado a una dosis de 50 mg/kg por ambas vías (oral e intravenosa). Por vía oral presenta una  $C_{m\acute{a}x}$  de 3.57  $\mu\text{g/mL}$  y solo fue posible monitorear sus concentraciones plasmáticas hasta 1.0 h tras su administración. Por vía intravenosa, se pudo cuantificar en un periodo de 2 horas. La administración del ATAC a la misma dosis por vía intravascular y extravaacular se realizó con el objetivo de poder calcular la biodisponibilidad absoluta.

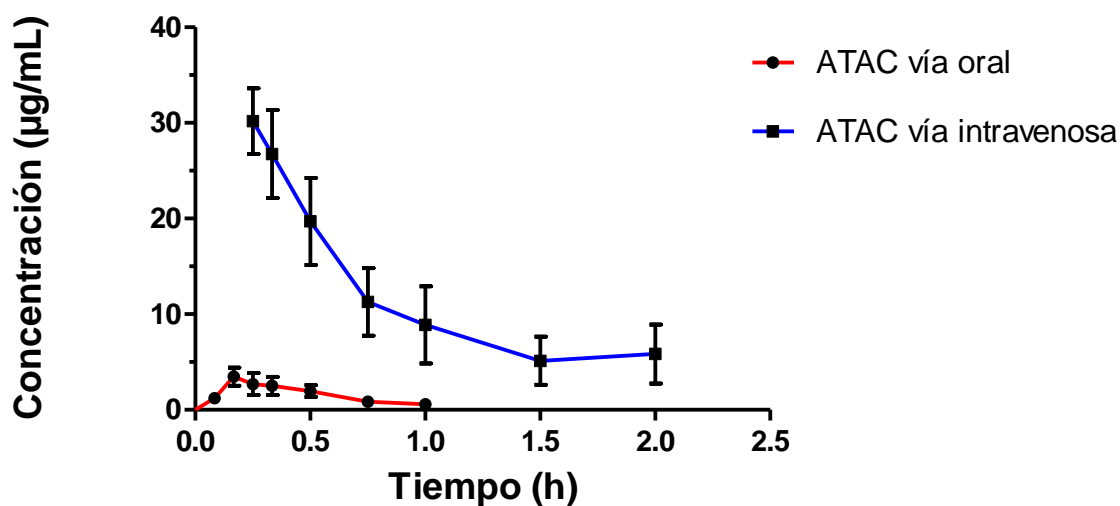


Figura 11. ATAC vía oral e vía intravenosa, dosis 50 mg/kg para ambas vías de administración, media  $\pm$ EE, (n=4)

En la tabla 15 se presentan los parámetros farmacocinéticos determinados para el ATAC tras su administración vía oral e intravenosa en ratas wistar sanas.

**Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos del ATAC vía oral e intravenosa**

	PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DEL ATAC			
	VÍA ORAL		VÍA INTRAVENOSA	
	MEDIA	DESV.ESTD.	MEDIA	DESV.ESTD.
Kel (h <sup>-1</sup> )	1.81	0.09	1.21	0.59
Ka (h <sup>-1</sup> )	3.05	1.07		
T1/2el (h)	0.38	0.02	0.71	0.38
T1/2abs (h)	0.25	0.09		
Cmáx (µg/mL)	3.57	2.39		
Tmáx (h)	0.33	0.28		
ABC0-t (µg/mL*h)	2.37	1.80	30.5	9.8
ABC0-α(µg/mL*h)	2.58	1.97	38.8	19.2
Biodisponibilidad absoluta (%)	10.4	0.04		
CL (mL/h)	751.2	242.6	484.5	282.2
Vd (mL)	419.4	148.6	399.6	93.9
Vd (L/kg)	1.43	0.61	1.30	0.18
Dosis (mg)	15.11	1.92	15.23	1.88
Peso animal (g)	302.3	38.4	304.5	37.6

Con la finalidad de obtener parámetros farmacocinéticos representativos del ATAC, mediante análisis no compartimental utilizando el software Winonlin (Ver 2.0) se calcularon los parámetros farmacocinéticos del ATAC, los cuales se presentan en la tabla 13. Para la vía oral se observa que el ATAC tiene una rápida absorción con una constante de absorción de 3.05 h<sup>-1</sup>, y presenta una Cmáx de 3.57 µg /mL a las 0.33 horas. De acuerdo a los resultados los parámetros de Cmáx y Tmáx del ATAC son menores a los reportados para fibratos como el ácido fenofíbrico en rata (26.51 µg/mL) y Tmáx (4 h) a una dosis de 14 mg/kg<sup>18</sup>, dado a que la Cmáx y Tmáx se relacionan con la cantidad y velocidad absorbida, el ATAC a una dosis de 50 mg/kg se absorbe más rápido pero las concentraciones alcanzadas en Cmáx son bajas en comparación con las reportadas en rata para el ácido fenofíbrico una molécula de la familia de fibratos, probablemente se deba factores como: 1.- tipo de formulación utilizada para administrar el ATAC por vía oral pues probablemente no se alcanzó a solubilizar de manera adecuada en el vehículo

utilizado, 2.- el metabolismo que puede sufrir este compuesto (hidrólisis de su grupo amida) por hidrolasas que se encuentran presentes en la mucosa intestinal, considerando que el grado de hidrólisis puede afectar la absorción de moléculas administradas por vía oral<sup>42</sup>; se ha reportado que el clorfibrato es un profármaco hidrolizado por esterasas y debido a que el ATAC es un derivado del clorfibrato, existe la posibilidad que el ATAC también pueda ser hidrolizado por este tipo de enzimas, ya que las esterasas como las carboxilesterasas son un grupo de enzimas que hidrolizan a xenobióticos con grupos éster (como es caso del clorfibrato) y amida (como el caso del ATAC)<sup>42</sup>. 3.- Las características fisicoquímicas propias del ATAC como su permeabilidad que es baja, lo cual es un paso limitante de su absorción por vía oral, ya que al compararse la velocidad de permeación del ATAC en el modelo *in vitro* (saco invertido de rata) con un fármaco de baja permeabilidad (amoxicilina), las velocidades de permeación son muy similares en las secciones intestinales evaluadas, 4.- El coeficiente de distribución probablemente afecte su velocidad de absorción ( $T_{máx}$ ) ya que de acuerdo a los resultados de Log D obtenidos, el ATAC muestra un comportamiento correspondiente a un ácido ya que los valores mayores de Log D (mayores a 0) se encontraron en un intervalo de pH ácido (menores a pH 5) indicando con ello que su especie neutra o no ionizada se encontraría en mayor proporción en medios ácidos como el estómago y la sección inicial del duodeno, probablemente a ello se deba que presenta una  $T_{máx}$  corta 0.33 h, lo anterior también se soporta con los resultados obtenidos en la determinación del pKa ya que al ATAC presentó dos pKa (  $pK_a 1=4.43 \pm 0.10$  y  $pK_a 2=6.08 \pm 0.14$  ) indicando con ello que la forma no ionizada puede permear más rápido en pH por debajo de 5 como es el caso del clorfibrato el cual tiene un pKa de 3.0 y permea más rápido a pH ácido como es el caso del duodeno.

La constante de eliminación del ATAC por vía oral fue de  $1.81 \text{ h}^{-1}$  y para la vía intravenosa fue de  $1.21 \text{ h}^{-1}$ , ( $p= 0.1410$ ), el tiempo de vida por vía oral fue de 0.38 h y por vía intravenosa fue de 0.71 h, los datos anteriores confirman una rápida eliminación del ATAC del organismo de la rata, debido que el tiempo de vida media es corto y la constante de eliminación es más rápida por vía oral, probablemente debido a la mayor cantidad de barreras por las que debe atravesar el ATAC, además podría degradarse más rápido sufriendo efecto de primer paso por la vía oral. La  $k_e$  de la vía intravenosa es más pequeña con respecto a la  $k_e$  de la vía oral debido a que por la vía intravenosa no se presenta efecto del primer paso.



Se ha reportado que los roedores (rata) tienen una cantidad de sangre total de 64 mL/kg. Se sabe que una rata de 200 g aproximadamente tendría 12.8 mL de sangre del total, de la cual solo se le pueden extraer no más de 20% (2.56 mL) es por ello que las tomas de muestra deben ser bien calculadas por no exceder la cantidad de sangre que se puede extraer a el animal <sup>66</sup>. El ATAC presenta una depuración (CL) de 751.2 mL/min para la vía oral y 484.5 mL/min para la vía intravenosa, lo anterior podría indicar una amplia depuración en la rata, además que por la vía oral muy probablemente se tengan involucradas una mayor cantidad de vías de eliminación del ATAC con respecto a la vía intravenosa (p=0.2018). La biodisponibilidad absoluta % del ATAC fue de 10.4 %,la cual se estimó al hacer la comparación del ABC obtenidas tras la administración intravascular y extravascular del ATAC a la misma dosis; asumiendo que la administración IV es la totalidad de la dosis que ingresa a circulación general, el ABC por vía intravascular corresponde al máximo valor que se puede obtener, por lo tanto, el resultado indica que solo una pequeña cantidad llegó a sistema circulatorio central, lo anterior también se sustenta al comparar el ABC<sub>0-t</sub> de la vía oral ( 2.37 µg\*mL/ h) con respecto a la vía intravenosa (30.5 µg\*mL/ h) y se observó que el ABC<sub>0-t</sub> de la vía oral es más pequeña cuando la comparamos con la vía intravenosa. Existen diversos factores fisiológicos y fisicoquímicos que pudieron influenciar la biodisponibilidad absoluta del ATAC entre ellas, se baja permeabilidad, lo cual afecta su absorción en el tracto gastrointestinal, en cuanto a la solubilidad, para que una molécula pueda absorberse, se requiere que esté disuelta para que pueda absorberse en el sitio de disposición ( vía oral ) y probablemente el vehículo utilizado no fue el óptimo para solubilizar por completo la dosis de ATAC administrada por vía oral. De igual forma por esta vía, puede sufrir efecto de primer paso, impactando la biodisponibilidad absoluta del ATAC

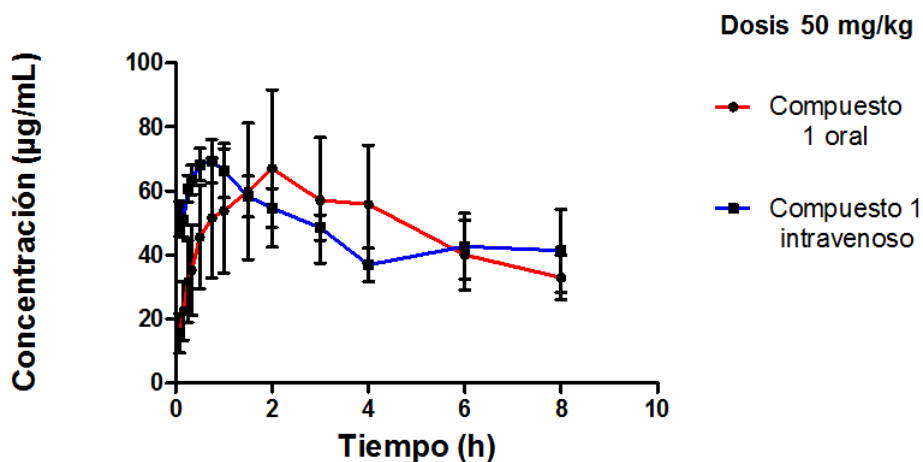


Figura 12. Compuesto 1 vía oral y vía intravenosa, media  $\pm$ EE, (n=4)

Como se puede observar en la figura 12, fue posible detectar durante el análisis del ATAC un compuesto adicional, al que se le denominó compuesto 1, el cual posiblemente se trate del ácido clorfibrico ya que presenta un tiempo de retención similar al del ácido clorfibrico en el sistema cromatográfico utilizado. Se puede apreciar que tras la administración del ATAC a una dosis de 50 mg/kg por ambas vías de administración, el área bajo la curva (ABC) del compuesto 1 es muy similar, sin embargo, se puede observar que durante el período de 0 a 8 horas, que el compuesto 1 se genera de forma más rápida por la vía intravenosa en los primeros tiempos de muestreo. El compuesto 1 por ambas vías se mantiene en concentraciones cuantificables en un lapso superior a las 8 horas. Partiendo de la idea que el compuesto generado por hidrolisis *in vivo* a partir del ATAC fuera ácido clorfibrico (figura 13), se ha reportado que a dosis oral de 14 mg/kg de fibratos, el valor de  $C_{m\acute{a}x}$  fue de 26.51  $\mu$ g/mL, un  $T_{m\acute{a}x}$  de 4 horas y un ABC 0-t de 252.25  $\mu$ g.h/mL en un lapso de 48 horas en rata<sup>18</sup> y en humanos el clorfibrato a una dosis de 500 mg por vía

oral presenta un  $C_{m\acute{a}x}$  de 35  $\mu\text{g/mL}$  y  $T_{m\acute{a}x}$  de 3 horas<sup>16</sup>. Como se puede apreciar en el curso temporal el compuesto 1 que se genera a partir de la administración oral e intravenosa de ATAC a dosis de 50 mg/kg, alcanza concentraciones máximas de alrededor de 70  $\mu\text{g/mL}$  por ambas vías de administración; por vía oral presenta el  $T_{m\acute{a}x}$  en 2 h y para el caso de la vía intravenosa presenta el  $T_{m\acute{a}x}$  en 0.75 h. Haciendo una comparación del ATAC administrado por vía oral, dicho compuesto alcanza una  $C_{m\acute{a}x}$  (3.57  $\mu\text{g/mL}$ ) más bajas que las reportadas para fibratos en rata (26.51  $\mu\text{g/mL}$ ), sin embargo la velocidad de absorción ( $T_{m\acute{a}x}$ ) del ATAC (0.33 h) es más rápida que la reportada para fibratos en rata (4 h), probablemente se deba a que el ATAC tiene mejores características biofarmacéuticas como una mejor permeabilidad aparente y esto le permita absorberse con mayor rapidez. El volumen de distribución aparente del ácido clofíbrico reportado en ratas 0.16 L/kg<sup>17</sup> y volumen de distribución aparente obtenido para el compuesto ATAC es de 1.43 L/kg con ello podemos constatar que el ATAC se distribuye de manera más amplia en el organismo de la rata que el ácido clofíbrico.

**Tabla 14. Parámetros farmacocinéticos del compuesto 1 vía oral e intravenosa**

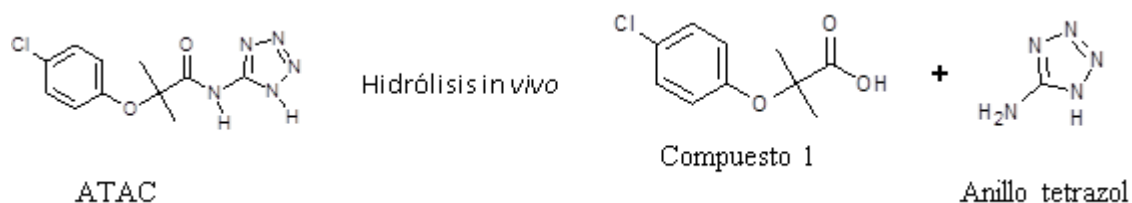
	VIA ORAL		VIA INTRAVENOSA	
	MEDIA	DESV. ESTD.	MEDIA	DESV. ESTD.
$k_{el}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0.10	0.06	0.11	0.07
$T_{1/2\text{ el}}$ (h)	9.24	5.5	9.00	5.72
$C_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	69.64	47.83	70.58	12.5
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	2	0.71	0.75	0.29
ABC0-t ( $\mu\text{mL}\cdot\text{h}$ )	340.94	135.77	386.98	243.57
ABC0- $\alpha$ ( $\mu\text{mL}\cdot\text{h}$ )	956.54	661.02	747.81	185.69

$T_{1/2\text{ elim}}$ = tiempo de vida media de eliminación del compuesto 1

$K_{elim}$ =constante de eliminación del compuesto 1

Como se puede observar en las tablas 16, la constante de eliminación del compuesto 1 ( $k_{el}$ ) por la vía oral fue de 0.10  $\text{h}^{-1}$  y para la vía intravenosa una media de 0.11  $\text{h}^{-1}$ , ( $p=0.1143$ ). La constante de eliminación del compuesto 1 ( $k_{el}$ ) por vía oral (0.10  $\text{h}^{-1}$ ) es muy semejante a la reportada para el ácido clofíbrico en rata (0.11  $\text{h}^{-1}$ )<sup>27</sup>. El tiempo de vida media por vía oral del compuesto 1 es de (9.24 h) y por vía intravenosa es de 9.0 h,

( $p=0.1590$ ). El tiempo de vida media reportado por vía oral para el ácido clofíbrico en rata se encuentra en el rango de 7 a 8 horas<sup>17,18</sup>, esto da indicios que probablemente el compuesto 1 (metabolito) sea el ácido clofíbrico, ya que el ATAC tiene un grupo amida el cual puede ser hidrolizado por esterasas que se encuentran ampliamente distribuidas en sangre y tracto gastrointestinal, además está reportado que las esterasas como carboxilesterasas son la encargadas de metabolizar profarmacos como el clofibrato para generar su metabolito activo el ácido clofíbrico<sup>67</sup> y en el caso del ATAC existe la posibilidad de que sea hidrolizado por este tipo de hidrolasas generando ácido clofíbrico como un metabolito, dicha reacción se muestra en la figura 13.



**Figura 13. Reacción de hidrólisis del ATAC para generar el compuesto 1**

EL  $ABC_{0-t}$  del compuesto 1 por vía oral fue de 340.94 ( $\mu\text{mL}^*\text{h}$ ) y para la vía intravenosa fue de 386.98 ( $\mu\text{mL}^*\text{h}$ ) ( $P=0.7317$ ). Si comparamos el  $ABC_{0-t}$  de fibratos reportado en rata 252.25  $\mu\text{g.h/mL}$  a dosis de 14 mg/kg vía oral<sup>13</sup> podemos observar que la cantidad total de compuesto 1 (metabolito) que llega a circulación central es muy similar a la reportada para fibratos en rata, sin embargo, se requiere una mayor dosis (50 mg/kg) de ATAC para alcanzar concentraciones similares a la reportada en rata para fibratos a una dosis de 14 mg/kg.

### 9.10.- Estudio farmacocinético del ATAC por vía oral en ratas diabéticas

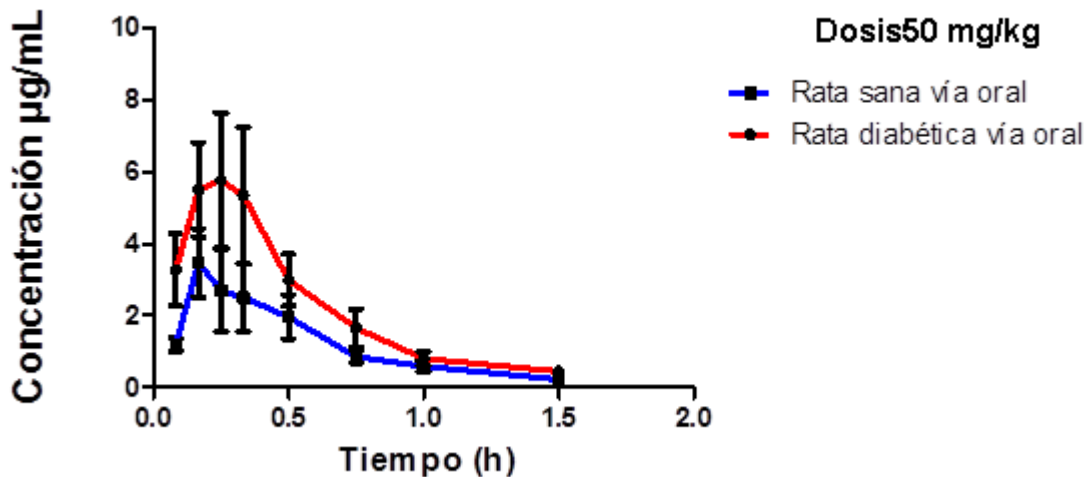


Figura 14. ATAC vía oral en ratas sanas (media  $\pm$ EE n=4) y diabéticas (media  $\pm$ EE n=6), dosis 50 mg/kg

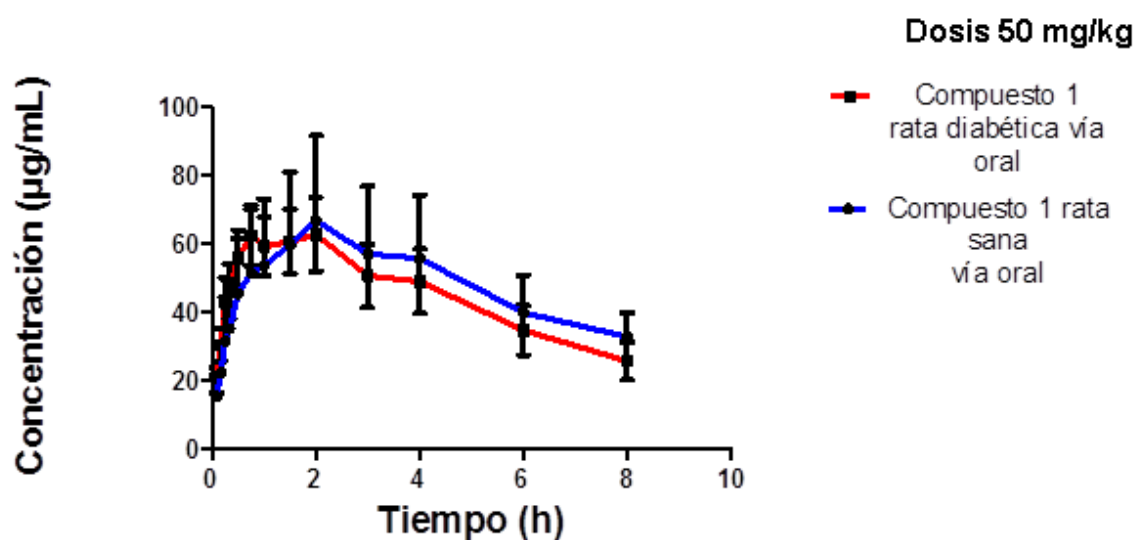
En la figura 14 se presenta el curso temporal del ATAC a una dosis de 50 mg/kg por vía oral, en ratas sanas y ratas diabéticas. Se puede observar que el  $C_{m\acute{a}x}$  en ratas sanas es de menor magnitud en comparación con ratas diabéticas ( $C_{m\acute{a}x}$ =3.57  $\mu$ g/mL rata sanas y  $C_{m\acute{a}x}$ =8.80  $\mu$ g/mL). en ambas condiciones fisiológicas sólo fue posible monitorear concentraciones de ATAC hasta 1.5 horas tras su administración por vía oral. También se observa que el  $T_{m\acute{a}x}$  en ratas sanas es más largo ( $T_{m\acute{a}x}$ = 0.33 horas) con respecto a ratas diabéticas ( $T_{m\acute{a}x}$ = 0.21 horas), lo cual indica una mayor velocidad de absorción y una  $C_{m\acute{a}x}$  mayor en ratas diabéticas con respecto a ratas sanas, lo cual probablemente se deba a la aparición de algunas de las complicaciones relacionadas con diabetes mellitus como son: cambios en la permeabilidad intestinal por daños microvasculares que a su vez alteran el tiempo de vaciado gástrico debido a que la reducción del flujo sanguíneo de la mucosa gástrica, influye en el vaciado gástrico, por lo tanto, estos cambios en la motilidad gástrica y el tiempo de tránsito gástrico, pueden tener potencial impacto en el grado de absorción de medicamentos<sup>68,69</sup> y como consecuencia, se podría alterar la velocidad de absorción.

Por medio de análisis no compartimental se calcularon los parámetros farmacocinéticos para el ATAC de ratas sanas y diabéticas, los cuales se presentan en la tabla 17. Se

observa que el ATAC tiene una absorción más rápida en ratas sanas mostrando una constante de absorción media de  $3.05 \text{ h}^{-1}$ , mientras que en ratas diabéticas muestra una constante de absorción media de  $2.73 \text{ h}^{-1}$ . Aunque los valores de la constante de absorción son similares en rata sana y rata diabética ( $p=0.1607$ ), los pequeños cambios observados en los valores obtenidos podrían explicarse debido las complicaciones que se mencionaron anteriormente, las cuales se relacionan con la diabetes mellitus. En ratas sanas se presenta una  $C_{\text{máx}}$  de  $3.57 \mu\text{g} / \text{mL}$  a las 0.33 horas y en ratas diabéticas de  $8.80 \mu\text{g} / \text{mL}$  a las 0.21 horas. La constante de eliminación media en ratas sanas fue de  $1.81 \text{ h}^{-1}$ , para ratas diabéticas fue de  $2.18 \text{ h}^{-1}$  ( $p= 0.2511$ ), la constante de eliminación total ( $k_e$ ) implica la suma total de todas las posibles vías de eliminación que tiene una molécula en el organismo, por lo tanto, si la  $k_e$  en ratas diabéticas es ligeramente mayor implica que en ratas diabéticas se encuentran involucradas mayor cantidad de vías de eliminación con respecto a las ratas sanas. Es probable que la pequeña diferencia observada se explique debido a las complicaciones micro vasculares reportadas como: daño renal por hiperglucemia que pueden presentarse tanto en ratas como en humanos <sup>32,60</sup>. Por otra parte, además de los daños, se ha reportado la alteración en la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de xenobióticos, ya que por el mismo estado de hiperglucemia algunas de las enzimas se encuentran sobreexpresadas (aumentando la eliminación de moléculas del organismo) y en otros casos inhibidas (disminuyendo la eliminación de moléculas del organismo) en órganos de donde ocurre el metabolismo como: hígado, intestino, riñones, etc. También se puede observar que el  $ABC_0-\alpha$  en ratas sanas fue de  $2.58 (\mu\text{g} \cdot \text{mL} / \text{h})$  y para ratas diabéticas fue  $4.68 (\mu\text{g} \cdot \text{mL} / \text{h})$  ( $p=0.2765$ ). Aunque estadísticamente no hubo diferencia significativa entre las constantes de eliminación total ( $k_e$ ) y  $ABC_0-\alpha$  de las ratas diabéticas con respecto a las sanas, es posible que las pequeñas diferencias se deban a algunas alteraciones que se han reportado en estados de hiperglicemia como: cambios en la absorción a nivel del tracto gastrointestinal por daños microvasculares, alterando con ello la irrigación sanguínea y la permeabilidad de la mucosa gástrica, daños por el estado de hiperglicemia en algunas de las principales vías de eliminación como son los riñones y alteración de las enzimas encargadas de metabolizar xenobióticos, por lo tanto, las alteraciones anteriormente mencionadas puedan ser la causa de algunas pequeñas diferencias observadas en los parámetros farmacocinéticos de las ratas control con respecto a las que se encuentran en estado diabetizado <sup>68,69,70</sup>.

**Tabla 15. Parámetros farmacocinéticos del ATAC vía oral en ratas sanas y diabéticas**

	RATAS DIABÉTICAS		RATAS SANAS	
	MEDIA	DESV.ESTD.	MEDIA	DESV.ESTD.
Ke (h <sup>-1</sup> )	2.18	0.87	1.81	0.09
Ka (h <sup>-1</sup> )	2.73	0.92	3.05	1.07
T <sub>1/2el</sub> (h)	0.31	0.14	0.38	0.02
T <sub>1/2abs</sub> (h)	0.28	0.10	0.25	0.09
C <sub>máx</sub> (µg/mL)	8.80	6.70	3.57	2.39
T <sub>máx</sub> (h)	0.21	0.09	0.33	0.28
ABC <sub>0-t</sub> (µg/mL*h)	4.36	3.07	2.37	1.8
ABC <sub>0-∞</sub> (µg/mL*h)	4.68	3.01	2.58	1.97
Dosis (mg)	15.17	1.83	15.11	1.92



**Figura 15. Compuesto 1 oral ratas sanas (media ±EE n=4) y compuesto 1 ratas diabéticas (media ±EE n=6)**

Como se puede observar en la figura 15 el área bajo la curva del compuesto 1 (el cual se cuantifica después de la administración de una dosis de 50 mg/kg de ATAC en ambas vías) es muy similar, tanto en rata sana como rata diabetizada, podemos observar que el

compuesto1 se genera de una forma más rápida en ratas diabéticas con respecto a las ratas sanas, la  $C_{m\acute{a}x}$  en ratas diabéticas es ligeramente mayor (80.08  $\mu\text{g/mL}$ ) que la  $C_{m\acute{a}x}$  en rata sana (69.64  $\mu\text{g/mL}$ ) ( $p= 0.1534$ ), sin embargo no se encuentra diferencia estadística significativa. Es probable que por vía oral el compuesto 1 llegue ya metabolizado, ya que tiene que librar más barreras para llegar a sistema circulatorio central y en cada barrera desde el tracto gastrointestinal hasta circulación es susceptible a metabolismo, por la vía intravenosa al depositarse el ATAC en sistema circulatorio central, distribuye inmediatamente y la fracción libre puede ser metabolizada por las hidrolasas presentes en el plasma para convertirse al compuesto 1 de forma rápida .

**Tabla 16. Parámetros farmacocinéticos del compuesto 1 vía oral ratas sanas y diabéticas**

	RATAS DIABETICAS		RATAS SANAS	
	MEDIA	DESV.ESTD.	MEDIA	DESV.ESTD.
$K_{el}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0.30	0.21	0.1	0.06
$T_{1/2el}$ (h)	4.40	4.16	9.24	5.5
$C_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	80.08	28.34	69.64	0.71
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	1.5	1.60	2	47.83
$ABC_{0-t}$ ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ )	342.11	142.37	340.94	135.77
$ABC_{0-\alpha}$ ( $\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$ )	554.56	350.10	956.54	661.02

$T_{1/2\text{ elm}}$ = tiempo de vida media de eliminación del compuesto 1.

$K_{elm}$ =constante de eliminación del compuesto 1.

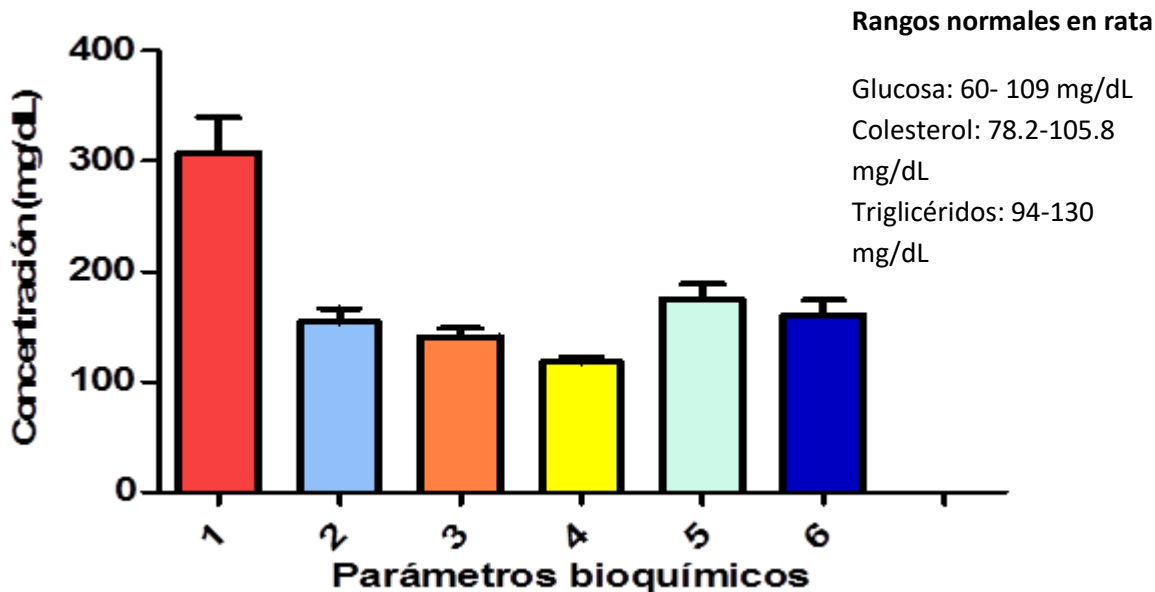
Como se puede observar en la tabla 18, la constante de eliminación del compuesto 1 ( $k_{el}$ ) en ratas sanas es de  $0.10\text{ h}^{-1}$  y para ratas diabéticas de  $0.30\text{ h}^{-1}$ , ( $p=0.1342$ ) y no hay diferencia significativa. El tiempo de vida media por vía oral del compuesto 1 en ratas diabéticas fue de (4.40 h) y para ratas sanas es de 9.24 h, ( $p=0.0350$ ). Lo anterior se puede deber a que en el estado diabetizado existen una serie de daños macro y microvasculares que afectan órganos importantes en la eliminación de moléculas como



daños microvasculares renales, lo que puede provocar la alteración en la vida media del compuesto 1.

#### **9.11.- Parámetros bioquímicos (glucosa, colesterol y triglicéridos) evaluados 8 posteriores a la administración del ATAC por vía oral.**

Como se observa en la figura 16, la administración de ATAC logró mantener en ratas diabéticas su efecto farmacológico durante 8 horas posteriores a su administración por vía oral (animales con estado de hiperglucemia comprobado por medio de un glucómetro). Las ratas diabetizadas para este experimento se mantuvieron bajo cuidados especiales en el bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública durante un mes antes del tratamiento con el ATAC. Los resultados que se observan en la figura 16, concuerdan con un estudio previo realizado al ATAC en un modelo *in vivo* de diabetes no insulino dependiente el cual fue monitoreado únicamente hasta las 4 horas <sup>49</sup>. Con base en los resultados obtenidos en este experimento actual, se observa que fue posible mantener el efecto antidiabético del ATAC hasta las 8 horas posteriores a su administración por vía oral. Sumado a los resultados obtenidos, también fue posible observar la disminución de los niveles de colesterol y triglicéridos (prueba enzimática colorimétrica) bajo las mismas condiciones de estudio y dichos resultados dieron indicios de que el ATAC disminuyó tanto la hiperglicemia como los lípidos en rata Wistar. Por lo tanto, estos resultados pueden ser el primer indicio de que el ATAC tenga una actividad dual, por una parte actividad antidiabética y por otra una posible actividad antilipemiente.



1.- Glucosa sin tratamiento 2.-Glucosa con tratamiento 3.-Colesterol sin tratamiento 4.-Colesterol con tratamiento 5.-Triglicéridos sin tratamiento 6.-Triglicéridos con tratamiento

**Figura 16. Concentración de parámetros bioquímicos: glucosa, triglicéridos y colesterol (ratas diabetizadas con STZ con estado de hiperglucemia comprobado por medio de un glucómetro) antes y después del tratamiento con ATAC (media ±EE n=6)**

**Tabla 17. Concentración de colesterol, trigliceridos y glucosa tras 8 horas de la administración vía oral del ATAC**

	MEDIA ± DESV.EST.
Glucosa sin tratamiento de ATAC mg/dL	307.5 ±78.5
Glucosa con tratamiento de ATAC mg/dL	154.3 ±30.0
Colesterol sin tratamiento de ATAC mg/dl	141.1 ±18.3
Colesterol con tratamiento de ATAC mg/dL	117.9 ±9.7
Triglicéridos sin tratamiento de ATAC mg/dL	174.7 ±35.3
Triglicéridos con tratamiento de ATAC mg/dL	160.4 ±33.9

Como se muestra en la tabla 19, al comparar por medio de una t-Student los valores de los parámetros bioquímicos, se observa la disminución de glucosa ( $p= 0.00121$ ), colesterol ( $p=0.02075$ ) y triglicéridos ( $p=0.4890$ ) en ratas diabéticas, sin embargo, solo son significativas las diferencias para la glucosa y el colesterol (antes y después del tratamiento con ATAC), en caso que a partir del ATAC se genere el compuesto 1 (metabolito) y que dicho compuesto se tratara de ácido clofíbrico, sería una de las primeras evidencias de que dicho ácido además de su actividad antilipemiente, presenta actividad antidiabética; ya que no existen estudios reportados que comprueben que el ácido clofíbrico posea efectos duales como son la disminución de glucosa y al mismo tiempo disminuir los niveles de triglicéridos en sangre por ser agonistas de receptores nucleares PPAR.

### 9.12.- Estudio de metabolismo *in vitro* (prueba enzimática con el homogenizado de hígado de rata)

El hígado es un órgano de vital importancia debido a su actividad metabólica y con la finalidad de investigar el metabolismo del ATAC se utilizó un homogenizado de hígado de rata para explorar el metabolismo de dicho compuesto de forma general.

**Tabla 18. Resultados de las concentraciones del ATAC y compuesto 1 en el homogenizado de hígado de rata**

Tiempo (h)	ATAC 1 mM		ATAC 1.78 mM		ATAC 3.1 mM	
	Media Conc.( $\mu\text{g/mL}$ )	Desv.Est	Media Conc.( $\mu\text{g/mL}$ )	Desv.Est	Media Conc.( $\mu\text{g/mL}$ )	Desv.Est
0.25	1.74	1.02	3.50	0.76	7.96	1.57
0.5	2.73	0.91	5.32	2.28	10.12	2.84
1	1.91	0.69	3.34	1.03	8.14	1.22
2	2.03	0.68	3.46	1.32	7.35	1.87
Tiempo (h)	Compuesto 1		Compuesto 1		Compuesto 1	
0.25	0.32	0.17	0.409	0.32	0.78	0.32
0.5	0.85	0.32	1.003	0.31	1.62	0.84
1	1.18	0.44	1.674	0.46	3.08	0.97
2	1.38	0.34	2.450	0.51	3.43	1.24

En la tabla 21 se observa en general que la concentración del ATAC determinada en tiempo de muestreo disminuye en las tres condiciones probadas, probablemente se deba a la formación del compuesto 1 a partir del ATAC en el organismo de la rata.

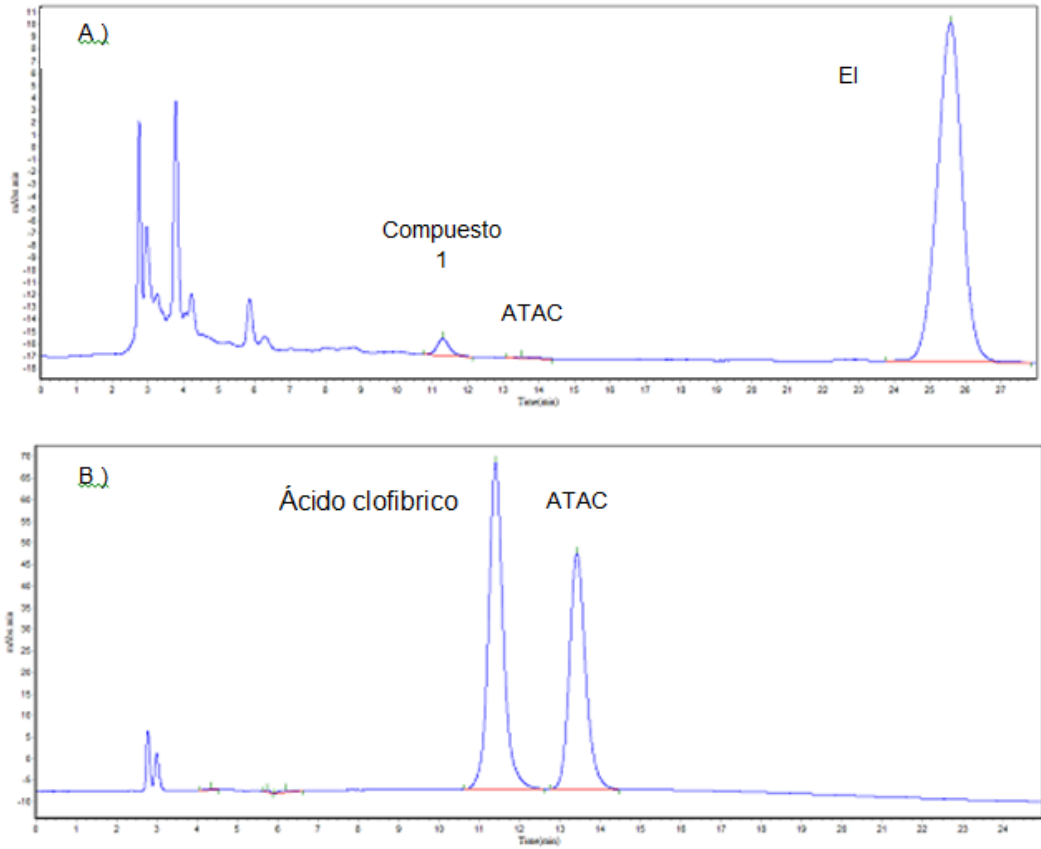
### 9.13.- Estudio de distribución del ATAC en órganos de alta irrigación: corazón, hígado, páncreas y riñones.

En la tabla 18 se muestra la detección del ATAC y la concentración del compuesto 1 en los diferentes órganos evaluados tras 8 horas de la administración del ATAC por vía oral.

**Tabla 19. Estudio de distribución del compuesto 1 en diferentes órganos**

Concentración en tejido ( $\mu\text{g/g}$ )	Compuesto 1 MEDIA $\pm$ DESV.EST.	ATAC Solo es detectable
Corazón	4.53 $\pm$ 2.16	***
Hígado	1.41 $\pm$ 0.89	ND
Páncreas	5.51 $\pm$ 2.67	**
Riñones	11.34 $\pm$ 7.36	*

Los resultados mostraron que aún cuando fue posible detectar la presencia del ATAC en corazón, hígado, páncreas y riñones, la concentración no fue cuantificable. Sólo se señala con asteriscos en que órganos se pudieron detectar mayor proporción. En su lugar fue posible cuantificar el compuesto 1 en todos los órganos (tabla 21); siendo los riñones en los que se encontró la mayor concentración (11.34  $\mu\text{g/g}$  de tejido). Este último resultado puede indicar que una de las principales vías de eliminación del ATAC y del Compuesto 1 son los riñones. Se ha reportado que el clofibrato se elimina en mayor proporción por la orina en un 99 % en forma de metabolitos conjugados con ácido glucurónico y una pequeña proporción en forma libre<sup>71</sup>. Existe la posibilidad de que el compuesto 1 al ser un metabolito del ATAC y de ser comprobada su estructura se tratara de ácido clofibrato, es probable que utilice en mayor proporción la vía de eliminación renal en el organismo de la rata.



**Figura 17. Cromatograma de tejido de corazón (A) y cromatograma de ácido clofibrico y ATAC en solución (B)**

En la figura 17 se observa dos cromatogramas: inciso A se observa el ATAC y del ácido clofibrico en solución, inciso B se observa el tejido de corazón de rata; en ambos cromatogramas se observa que el compuesto 1 presenta un tiempo de retención similar al ácido clofibrico y es por ello que se sospecha que el compuesto 1 se trate de ácido clofibrico, el cual se podría generar a partir del ATAC por la ruptura del enlace amida que presenta dicha molécula, generando dos probables metabolitos: el ácido clofibrico y el anillo tetrazol.

## 10.- CONCLUSIONES

Se caracterizaron las propiedades fisicoquímicas del ATAC como el pKa, log D y el coeficiente de permeabilidad aparente. Se realizó el desarrollo y validación de un método analítico por HPLC-UV para cuantificar el ATAC según el protocolo establecido en el laboratorio tomando en cuenta sólo algunos parámetros que se establecen en la NOM-177-SSA 1-2013 empleando una técnica de extracción en fase sólida, la cual es sencilla y rápida. Se observó que durante los estudios farmacocinéticos del ATAC tras su administración a una dosis de 50 mg/kg por ambas vías (oral e intravenosa) se genera el compuesto 1 (metabolito) el cual se detecta su presencia en el plasma de rata. Se sospecha que el compuesto 1 sea ácido cloríbrico debido a que su constante de eliminación ( $k_{el}$ ) es similar la reportada para este fármaco en rata, sin embargo, es necesario determinar la estructura molecular del compuesto 1, es probable que se pueda generar ácido cloríbrico a partir del ATAC por la posible ruptura del enlace amida que presenta el ATAC por medio de esterasas presentes en sistema circulatorio central, sin embargo, sería adecuado corroborar la estructura del compuesto 1 por medio de un análisis de identificación de estructuras moleculares como por ejemplo: un análisis por HPLC-masas de alguna muestra. Se realizaron estudios por vía oral del análogo tetrazol en rata diabética y rata sana, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros farmacocinéticos como: constante de eliminación ( $k_{el}$ ), concentración máxima ( $C_{máx}$ ),  $ABC_{0-t}$   $ABC_{0-\infty}$ , excepto el tiempo de vida media el cual fue de  $4.40 \pm 4.16$  (h) para rata diabética y  $9.24 \pm 5.5$  (h) para rata sana y probablemente se deba algunas alteraciones provocadas por el estado de hiperglicemia como son: cambios en la expresión de enzimas metabólicas y daños microvasculares en algunos órganos que se encuentran involucrados en la eliminación de xenobióticos. En el estudio de distribución del ATAC en órganos de alta irrigación, se encontró que solo fue posible detectar en mayor proporción a el ATAC en corazón, mas no fue posible cuantificarlo en los 4 órganos evaluados, sin embargo, fue posible cuantificar el compuesto 1 (metabolito) observado la más alta concentración en riñones. En el estudio de metabolismo *in vitro* por homogenizado de hígado de rata, se observa la formación del compuesto 1 (metabolito) en función del tiempo, sin embargo, se van a requerir pruebas enzimáticas más específicas para determinar cuáles enzimas podrían estar involucradas en el metabolismo del ATAC. Los estudios fisicoquímicos y biofarmacéuticos realizados a el ATAC permitieron observar

algunos de los parámetros farmacocinéticos que ayuda a visualizar por primera vez como se lleva a cabo el proceso ADME de dicho compuesto en fase preclínica.

También se publicó el artículo de investigación requisito indispensable para la obtención del grado derivado de los estudios fisicoquímicos y biofarmacéuticos realizados para caracterizar el análogo tetrazol del ácido clorfíbrico.

## **11.- PERSPETIVAS**

- Realizar la identificación de la estructura molecular del compuesto 1 (metabolito).
- Realizar pruebas *in vitro* de catálisis enzimática mediante enzimas específicas (esterasas) para visualizar si dichas enzimas se encuentran involucradas en el metabolismo del ATAC.
- Realizar nuevas formulaciones para mejorar la solubilidad del ATAC.
- Realizar estudios de toxicidad para el ATAC como parte de su evaluación preclínica y con ello evaluar si es seguro continuar estudios en humanos.

## 12.0.- BIBLIOGRAFÍA

1. Diabetes Atlas, International Diabetes Federations, edición 8, 2017, pag:1 a 150  
Programa for diabetes, Documento OMS/FID, Organización Mundial de la Salud, 2011; Vol. 27, pp 1-126.
2. Programa for diabetes, Documento OMS/FID, Organización Mundial de la Salud, 1985, Vol. 2011 (27), pp 1-126.
3. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados nacionales Primera edición, *Instituto Nacional de Salud Pública*, 2012, ISBN 978-607-511-037-0, pp. 1-200. (antes 1).
4. Secretaría de Salud Pública, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, *Boletín de diabetes tipo 2*, 2014; pp.1-17.
5. American Diabetes Association, Standards of Medical Care in Diabetes, *Journal of Diabetes Care*, 2014; Vol.37 (1), pp.14-80.
6. Guía de Tratamiento Farmacológico de Dislipidemias para el Primer Nivel de Atención, *Revista Mexicana de Cardiología*, 2013; Vol.24 (3), pp. 103 – 129.
7. Fausto Miguel González-Villagrán, Fibratos; tratamiento farmacológico, *Cardiometabólico Diabetes*, 2014; Vol. 1(3) pp. 119-124.
8. F. Brites, L. Gómez, L. Boero, T. Meroño, S. Rivera, Clasificación y diagnóstico bioquímico de las dislipemias, 2010; pp.150-167.
9. De Fronzo R.A, Eldor R. y Abdul-Ghani M., Pathophysiologic Approach to Therapy in Patients With Newly Diagnosed Type 2 Diabetes, *Diabetes Care*, 2013; Vol. 36(2), pp.127-138.
10. Gil-Velázquez L. E., Sil-Acosta M. J., Torres-Arreola L. P. y col., Guía de práctica clínica Diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2, *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. 2013; Vol. 51(1), pp. 104-19.
11. Ros E., y Laguna J. C, Tratamiento de la hipertrigliceridemia: fibratos frente a ácidos grasos omega-3, *Revista Española de Cardiología*, 2006; pp.52-61.
12. Hormigo-Pozoa A., Mancera-Romero J., Perez-Unanuac M.P. y col., Recomendaciones de buena práctica en el tratamiento de la dislipemia en la diabetes, *Semergen*, 2015; Vol. 41(2), pp. 89-98.



13. Goldfine A. B, Sanjay K., Hiatt W.R., Fibrates in the Treatment of Dyslipidemias, *The New England Journal of Medicine*,2011; Vol. 365(6),pp. 481-484.
14. Goldenberg I., Benderly M., Goldbourt U., Update on the use of fibrates: focus on bezafibrate, *Vascular Health and Risk Management*, 2008; Vol. 4(1),pp. 131–141.
15. Fruchart J.C., Duriez P, Staels B., Molecular mechanism of action of the fibrates,*Journal de la Société de Biologie*, 1999, Vol. 193(1), pp. 67-75.
16. Männistö P.T. Tuomisto J., Jounela A, and Penttilä O., Pharmacokinetics of Clofibrate and Chlorophenoxy Isobutyric Acid. I. Cross-over Studies on Human Volunteers, *Acta Pharmacologica et Toxicologica*,1975;Vol.36,pp.353-365.
17. Crouthamel W.G., Cenedella R.J., Clofibrate pharmacokinetics: effect of elevation of plasma-free fatty acids, *Pharmacology*, 1975;Vol.13 (5),pp.465-473.
18. Elmore C. L., Pharmacology/toxicology and evaluation, Department of health and human services, DNA: 22-418, 2009; Vol.1, pp:1-74.
19. Velkov T., Horne J.,Laguerre A. y col., Examination of the Role of Intestinal Fatty Acid-Binding Protein in Drug Absorption Using a Parallel Artificial Membrane Permeability Assay, *Chemistry & Biology*,2007; Vol. 14, pp. 453-465.
20. Drugbank. Drugcard of Clofibrate. Disponible en línea: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00636> .
21. Karelson M., Karelson G.,Tamm T., Tulp I., Jänes J.,Tämm K, Lomaka A., Savchenko D. and Dobchev D.,QSAR study of pharmacological permeabilities, *Arkivoc*,2009;Vol.2,pp.218-238.
22. Litherland N. B., Bionaz M., Wallace R. L., Loo J. J. y col., Effects of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  agonists clofibrate and fish oil on hepatic fatty acid metabolism in weaned dairy calves1, *Journal of Dairy Science*,2010; Vol. 93 (6), pp. 2404-2418.
23. Tachibana K., Anzai N., Ueda C., Katayama T., Kiniro T., y col., Analysis of PPAR alpha función un human kidney cell line usin siRNA, *Oxford Journal:nucleic acids symposium series*,2006 ;Vol. 50,pp.257-258.
24. Peeters A., Baes M., Role of PPAR $\alpha$  in Hepatic Carbohydrate Metabolism, *PPAR Research*,2010, pp. 1-13.

25. Kim, C. H., Ahn R., Bae J. H., Cho M. A. y col., Fenofibrate but not fenofibric acid inhibits 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in C2C12 myotubes, *Cellular Biochemistry*, 2010; Vol. 334, pp. 91-98.
26. Alberts P., Engblom L., Edling N., Forsgren M., Klingström G. y col., Selective inhibition of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 decreases blood glucose concentrations in hyperglycaemic mice, *Diabetologia*, 2002; Vol. 45, pp. 1528-1532.
27. Anderson, A.; Walker, B.R. 11 $\beta$ -HSD1 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes and cardiovascular disease, *Drugs*, 2013; Vol. 73 (13), pp.1385–1393.
28. Shetty S. R, Kumar S., Mathur R.P., Sharma K. H., Jaiswal A. D. y col., Observational study to evaluate the safety and efficacy of saroglitazar in Indian diabetic dyslipidemia patients, *Indian Heart Journal*, 2015; Vol. 67 (1), pp. 23-26.
29. He B. K., Ning Z. Q., Li Z. B. y col., In Vitro and In Vivo Characterizations of Chiglitazar, a Newly Identified PPAR Pan-Agonist, *PPAR Research*, 2012; pp.1-13.
30. Yasbir Singh, Shweta Srivastava, Rashmi Tripathi, Yashasvi Jain, A Review Report on newer advancement in bioisosteric replacement in drug design, *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 2015; Vol, 6(5), pp:939-947.
31. Samo Lešnik, Janez Konc, Dušanka Janežič, Scaffold Hopping and Bioisosteric Replacements Based on Binding Site Alignments, *Croatica Chemica Acta*, 2016 ;pp: 431–437.
32. Silverman R. B. y Holladay M. W., The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action, tercera edición, *Academic Press*, ISBN: 978-0-12-382030-3, 2008; pp. 283-287.
33. Biot C., Bauer H., Schirmer R. H., Davioud-Charvet E. y col., 5-substituted tetrazoles as bioisosteres of carboxylic acids. Bioisosterism and mechanistic studies on glutathione reductase inhibitors as antimalarials, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004; Vol. 47 (24), pp. 5972-5983.
34. Doménech Berrozpe J., Martínez Lanao J., Plá Delfina J.M., *Biofarmacia y farmacocinética*, 1998; Vol. 2 ,pp. 19 -22.
35. Hernández-Ordóñez S. O., Síndrome nefrótico, *Medicgraphia*, 2008; Vol. 3(3), pp.90-96.

36. Martínez-Castelao A., Advances in diabetes mellitus, diabetic nephropathy, metabolic syndrome and cardio-vascular-renal risk, *Nefrología*, 2008; Vol. 5, pp.79-84.
37. Dostalek M., Court M. H, Yan B. y Akhlaghi F., Significantly reduced cytochrome P450 3A4 expression and activity in liver from humans with diabetes mellitus, *British Journal of Pharmacology*,2011; Vol. 163, pp.937-947.
38. Li Y., Wei Y., Zhang F., Wang D. y col., Changes in the pharmacokinetics of glibenclamide in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus, *Acta Pharmaceutica Sinica B* ,2012; Vol. 2 (2), pp. 198–204.
39. Sheweita S. A. Drug-metabolizing enzymes: mechanisms and functions, *Current Drug Metabolism*,2000; Vol. 2 , pp 107-132.
40. Zhang D., Luo G., Ding X., Chuang L., Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development,2012; *Acta Pharmaceutica Sinica*, vol. 2(6), pp 549–561.
41. Li A.P., Preclinical in vitro screening assays for drug-like properties, *Drug Discovery Today: Technologies*,2005; Vol.2(2), pp. 179-185.
42. Laizure S.C., Herring V., Hu Z., Witbrodt K., Parker R.B., The role of human carboxylesterases in drug metabolism: have we overlooked their importance?,*Pharmacotherapy*,2013; Vol. 33 (2),pp. 210-222.
43. Reid E., Cooke G.M.W., Luzio J.P. Methodological Surveys in Biochemistry and Analysis Cells, Membranes, and Disease, Including Renal: Including Renal, 2012; Vol. 17(B),pp.61.
44. Venkata R. A., Lakshmi I. V., Vani S., Gill S., Yogeewari P., and Sriram D., Study of Pharmacokinetics and Tissue Distribution of BITS-17 in Rat Plasma and Tissue Homogenate Using a Validated LC Method, *Journal of Bioanalysis & Biomedicine*,2012,Vol. 4 (5),pp.79-84.
45. Wu J. y Yan L. J. Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic  $\beta$  cell glucotoxicity, *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*,2015; vol. 8, pp.181-188.
46. Joo H. L., Yang S. H., Jung M. O. and Myung G. L. Pharmacokinetics of drugs in rats with diabetes mellitus induced by alloxan or streptozocin: comparison with those in patients with type I diabetes mellitus, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*,2006; Vol.62, pp.1-23.

47. Masiello P., Broca C., Gross R., Roye M., Manteghetti M. y col., Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide, *Diabetes*, 1998; Vol. 47 (2), pp.224-229.
48. Alaniz-Palacios A., Tesis de licenciatura: Diseño, síntesis y caracterización mediante difracción de rayos-X de amidas azaheterocíclicas derivadas del ácido clofibríco como inhibidores de la enzima 11 $\beta$ -HSD1, Tutor de la tesis: Navarrete-Vázquez G., U.A.E.M.-Facultad de Farmacia, 2011.
49. Navarrete-Vázquez G., Alaniz-Palacios A., Hidalgo-Figueroa S., González-Acevedo C. y col., Discovery, synthesis and in combo studies of a tetrazole analogue of clofibríco acid as a potent hypoglycemic agent, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013; Vol. 23 (11), pp. 3244–3247.
50. Martínez -Gómez G.E., Tesis de licenciatura: Determinación del pka de nuevos compuestos con actividad farmacológica, Tutor de la tesis: Rivera-Leyva J. C., U.A.E.M.-Facultad de Farmacia, 2015.
51. Lara-Cruz E.N., Tesis de licenciatura: Determinación del coeficiente de partición de nuevas moléculas con potencial actividad farmacológica, Tutor de la tesis: Rivera-Leyva J. C., U.A.E.M.-Facultad de Farmacia, 2015.
52. Rodríguez-Martínez D.O., Tesis de licenciatura: Evaluación de la permeabilidad de nuevas moléculas con potencial actividad farmacológica, Tutor de la tesis: Rivera-Leyva J. C., U.A.E.M.-Facultad de Farmacia, 2015.
53. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable y un medicamento biotecnológico es biocomparable.
54. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, *Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas Para la Producción, Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio*; <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062>.
55. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals, *Pain*, 1983; Vol. 16(2), pp. 109-110.
56. López-Muñoz F.J., Vara Gama N., Soria-Arteche. O., Hurtado de la Peña M., Domínguez-Ramírez A. M. y col., HPLC Method with Solid-Phase Extraction for Determination of (R)- and (S)-Ketoprofen in Plasma without Caffeine

- Interference: Application to Pharmacokinetic Studies in Rats, *Journal of Chromatographic Science Advance Access Published*, 2013; Vol.1, pp.1-7.
57. Dávid Z. B., Saskia S., Hannes M.W., Anita M. H. ,Rolf P. y col., Monitoring the stress-level of rats with different types of anesthesia: A tail-artery cannulation protocol, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2014; Vol. 70 (1), pp.35-39.
  58. Ramírez-Espinosa J. S., Rios M. Y., López-Martínez S., López-Vallejo F. y col., Antidiabetic activity of some pentacyclic acid triterpenoids, role of PTPe1B: In vitro, in silico, and in vivo approaches, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2011; Vol. 46 (6), pp. 2243-2251.
  59. Terashiman K., Takai S., Usami Y., Adachi T., Sugimaya T. Katagiri Y. and Hirano K., Purification and partial characterizations hydrolyzing enzyme from pig liver, *Pharmaceutical Research*, 1996; Vol. 13(9), pp.1327-1335.
  60. Michael M., Kaplan and Utiger R.D. Iodothyronine Metabolism in Rat Liver Homogenates, *The Journal of Clinical Investigation*, 1978; Vol. 61 (2), pp.459-471.
  61. Crooke R. M., Mark J.G., Michael J. M., Iemonidis K. M., Wyrzy k., Cummins L.L., Metabolism of Antisense Oligonucleotides in Rat Liver Homogenates, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2000; Vol.292 (1), pp. 140-149.
  62. Longdong Qiao, Yan Liu, Xiaoyan Chen, Junbo Xie, Yanqing Zhang, Ke Yang, Hongjian Zhou, Yayun Duan, Wei Zheng, Wenlin Xie, A HPLC-MS/MS method for determination of 6-feruloylspinosin in rat plasma and tissues: Pharmacokinetics and tissue distribution study, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016; Vol. 121 pp:77–83.
  63. Ji-Xin Wang, Xin-Guang Liu, Zhi-Ying Fan, Xin Dong, Feng-Chang Lou, Ping Li\*, Hua Yang, Pharmacokinetics and tissue distribution study of ginkgolide L in rats by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 1006, 2015; pp. 30–36.
  64. <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070246>
  65. Tsume, Y.; Amidon, G.L. The biowaiver extension for BCS class III drugs: The effect of dissolution rate on the bioequivalence of BCS class III immediate-

- release drugs predicted by computer simulation. *Mol. Pharm.* 2010; Vol. 7, pp. 1235–1243.
66. Burnett J. E. Dried Blood spot sampling practical considerations and recommendations for use with preclinical studies, *Bioanalysis*, 2011; Vol. 3(10), pp.1099-1107.
67. Williams F.M., Clinical Significance of Esterases in Man, *Clinical Pharmacokinetics*, 1985; Vol. 10, (5 )pp. 392–403.
68. Horowitz M., Fraser R., Disordered gastric motor function in diabetes mellitus, *Diabetologia*, 1994, Vol. 37(6), pp: 543-551.
69. Michael T. and Fawzy E., Influence of Diabetes Mellitus on Pharmacokinetics of Drugs, *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, 2016; Vol.2 (1), pp:1-2.
70. Sunil S.Jambhekar and Philip J.B.Basic pharmacokinetics, second edition, 2012, editorial Pharmaceutical Press, pp.175-194.

## 13.- Anexos

Artículo derivado del trabajo de investigación



Article

# Biopharmaceutical Characterization and Bioavailability Study of a Tetrazole Analog of Clofibrilic Acid in Rat

Nancy Vara-Gama <sup>1</sup>, Adriana Valladares-Méndez <sup>1</sup>, Gabriel Navarrete-Vazquez <sup>1</sup>, Samuel Estrada-Soto <sup>1</sup>, Luis Manuel. Orozco-Castellanos <sup>2,\*</sup> and Julio César Rivera-Leyva <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico; nvara83@yahoo.com.mx (N.V.-G.); vameadri25@hotmail.com (A.V.-M.); gabriel\_navarrete@uaem.mx (G.N.-V.); enoch@uaem.mx (S.E.-S.)

<sup>2</sup> Departamento de Farmacia, Universidad de Guanajuato, 36050 Guanajuato, Guanajuato, Mexico

\* Correspondence: orozcoz@ugto.mx (L.M.O.-C.); julio.rivera@uaem.mx (J.C.R.-L.)

Academic Editor: Diego Muñoz-Torrero

Received: 19 December 2016; Accepted: 7 February 2017; Published: 14 February 2017

**Abstract:** In the current investigation, the physicochemical, biopharmaceutical and pharmacokinetic characterization of a new clofibrilic acid analog (Compound **1**) was evaluated. Compound **1** showed affinity by lipophilic phase in 1 to 5 pH interval, indicating that this compound would be absorbed favorably in duodenum or jejunum. Also, Compound **1** possess two ionic species, first above of pH 4.43 and, the second one is present over pH 6.08. The apparent permeability in everted sac rat intestine model was  $8.73 \times 10^{-6}$  cm/s in duodenum and  $1.62 \times 10^{-5}$  cm/s in jejunum, suggesting that Compound **1** has low permeability. Elimination constant after an oral administration of 50 µg/kg in Wistar rat was  $1.81 \text{ h}^{-1}$ , absorption constant was  $3.05 \text{ h}^{-1}$ ,  $C_{\text{max}}$  was 3.57 µg/mL at 0.33 h,  $\text{AUC}_{0-\infty}$  was 956.54 µ/mL·h and distribution volume was 419.4 mL. To IV administration at the same dose,  $k_e$  was  $1.21 \text{ h}^{-1}$ ,  $V_d$  was 399.6 mL and  $\text{AUC}_{0-\infty}$  was 747.81 µ/mL·h. No significant differences were observed between pharmacokinetic parameters at every administration route. Bioavailability evaluated was 10.4%. Compound **1** is metabolized to Compound **2** probably by enzymatic hydrolysis, and it showed a half-life of 9.24 h. With these properties, Compound **1** would be considered as a prodrug of Compound **2** with potential as an antidiabetic and anti dyslipidemic agent.

**Keywords:** diabetes; bioavailability; clofibrilic acid; 11β-HSD1; tetrazole; dyslipidemia

## 1. Introduction

### 1.1. Type 2 Diabetes (DMT2)

DMT2 is a chronic-degenerative disease characterized by a deficiency in the production of insulin by the  $\beta$  cells of the pancreas or the inability of the organism to efficiently use of insulin produces [1]. There were 6.4 million adults over the age of 20 diagnosed with diabetes in 2012 (National Health and Nutrition Survey) [2]. Due to this growing epidemiological trend, Diabetes Mellitus (DM) is considered a very significant public health problem in this country and around the world, and is one of the primary causes of death in the Mexican population.

The complications associated with DMT2 include damage to the capillaries of the kidney, (causing glomerulonephritis and renal failure in its advanced stages), damage to the capillaries of the retina (causing blindness), peripheral neuropathy, myocardial infarction, cerebrovascular complications, and arteriosclerosis [3–6]. Some cases present dyslipidemia, a condition caused by alterations to the concentrations of lipoproteins in the blood. Overweight, obesity, physical inactivity, smoking, and alcohol consumption contribute to the development of this condition [6,7]. Treatments



## 2. Materials and Methods

Dimethyl sulfoxide, *n*-octanol, mebendazole, Cremophor EL<sub>pH-range 6.0–8.0</sub>, naproxen, and amoxicillin were purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Methanol, acetonitrile, and water were HPLC grade, and the sodium hydroxide, phenolphthalein, monobasic sodium phosphate, phosphoric acid, and potassium biphthalate were obtained from J.T. Baker (J.T. Baker, Co., Center Valley, PA, USA). Clofibrac acid (Compound 2) was purchased from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany). Compound 1 was synthesized in the Medicinal Chemistry Laboratory of the Pharmacy Faculty, Autonomous University of the State of Morelos (Universidad Autónoma del Estado de Morelos, or UAEM), Mexico.

### 2.1. Physicochemical Evaluations

#### 2.1.1. pK<sub>a</sub> Determination via Potentiometric Analysis

The determination of pK<sub>a</sub> was undertaken as described by Babic A. et al. [18,20]. Compound 1 was prepared by weighing 0.001 equivalents, which were dissolved in the minimum volume of methanol, to which aqueous solution with an ionic strength of 0.02 M was added to obtain a final concentration for Compound 1 of 0.006 M. It was titrated with NaOH 0.01 N, which had been previously evaluated with an ionic strength of 0.02 M using Logger Pro 3.5.0 software (Vernier Software & Technology, Beaverton, OR, USA). The study was conducted in triplicate, determining the final points using the criteria from the first and second derivative test [21].

#### 2.1.2. Apparent Partition Coefficient

The octanol-water distribution coefficient was determined using the shake-flask method. The two phases were mutually saturated by shaking for 15 min. Phosphate buffers were used as the aqueous phase for the pH range 1.2 to 13. 5 mL portions of different buffer solutions (pH 1.2 to 13) containing 100 µg/mL of Compound 1 were mixed with 2.5 mL of *n*-Octanol. The mixture was shaken for 30 min, centrifuged at 8000× *g* for 10 min, after which the aqueous and organic phases were separated. Aqueous samples were analyzed at 222 nm using a validated spectrophotometric method (5–200 µg·mL<sup>-1</sup>) [22–24]. The distribution coefficient (log D) was calculated according to Equation (1) for each pH value:

$$\text{Log } D = \log \frac{[\text{Compound}]_{\text{org}}}{[\text{Compound}]_{\text{aq}}} \quad (1)$$

where  $[\text{Compound}]_{\text{org}}$  is the drug concentration in the organic phase (determined by mass balance) and  $[\text{Compound}]_{\text{aq}}$  is the drug concentration in the aqueous phase for each buffer solution. Every experiment was evaluated in triplicate.

#### 2.1.3. Permeability Assay

Male Wistar rats weighing 200–250 g were used in this research. Everted intestinal sacs were prepared by quickly removing the small intestine from starved rats killed under ether anesthesia. All experiments were carried out after pre-incubation at 37 ± 0.5 °C, with the duodenum and jejunum then excised, flushed-through several times with saline solution at room temperature, and placed immediately into simulated intestinal fluid (SIF). The intestine was gently everted over a steel rod and filled with fresh SIF. The sacs were preincubated in oxygenated buffer solution for 5 min and then placed in 100 mL of oxygenated SIF solution containing 0.0001 M (100 µM) of Compound 1 at 37 °C. Oxygen was bubbled with a pump to maintain viable tissue [25].

The everted intestinal sac was filled with 1.5 mL of SIF solution, while a test compound solution (0.0001 M) remained external to the everted sac. The high and low permeability markers, naproxen and amoxicillin, were prepared in the same way [26]. 300 µL samples were collected from inside the sac with a metallic cannula at 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min (apical-basolateral transport A-B), the evaluation of its bioavailability in a rat model, as well as its biopharmaceutical characterization.

after which a medium replacement was made. Both an initial and final sample of the outside solution were analyzed by HPLC.

The apparent intestinal permeability ( $P_{app}$ ) was calculated according to Equation (2):

$$P_{app} = \frac{V}{(A * C_0)} dC/dt \quad (2)$$

where  $P_{app}$  = Apparent Permeability (cm/s),  $V$  = Intestinal Volume (mL),  $A$  = Surface Area (cm<sup>2</sup>),  $dC/dt$  = Concentration Gradient, and,  $C_0$  = Initial Concentration (µg/mL).

## 2.2. Chromatographic Conditions

The samples of Compound **1** were analyzed using a Waters chromatographic system equipped with a 717 plus auto-sampler, a model 515 isocratic pump, and a model 2487 UV-Vis detector. The software used was N2000 Chromatostation. The separation was performed on a 4.6 × 250 mm Zorbax CN (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). The mobile phase consisted of phosphate buffer (0.05 M, pH 3.5) with 0.06% ethanol and methanol HPLC grade (64:36), filtered through 0.2 µm Nylon membrane (Nylaflo™) from PALL Corporation (Washington, NY, USA) and sonicated for 30 min. The flow rate was 1.0 mL/min. The column was kept at room temperature. Total run time was 25 min, with the detection carried out at 223 nm. The injection volume was 10 µL.

### 2.2.1. Calibration Curve

A methanol solution of Compound **1** and clofibrac acid (Compound **2**) was prepared to a final concentration of 100 µg/mL (working solutions). The calibration curves were prepared using appropriate volumes of Compound **1**, Compound **2**, and rat plasma to obtain the following concentrations: 0.46, 0.93, 3.75, 7.5, 15, 30 µg/mL (Compound **1**); and, 0.78, 1.56, 6.25, 12.5, 25, and 50 µg/mL (Compound **2**), simultaneously. Internal standard (mebendazole) was prepared at a concentration of 20 µg/mL (IS working solution).

### 2.2.2. Sample Preparation

100 µL of plasma containing Compounds **1** and **2** at different concentrations were transferred to Eppendorf tubes, with 10 µL of IS working solution, 100 µL 1% solution phosphoric acid then added. Samples were shaken in a vortex for 30 s. Strata-X 33 µm cartridges (Polymeric Reversed Phase, 30 mg, Phenomenex) were conditioned with 2 mL of methanol and 1 mL of water, with the sample in the cartridge then left to stand for 2 min and immediately washed with 1 mL of a 95:5 water methanol solution. Finally, the sample was eluted four times with 500 µL of a 50:50 methanol acetonitrile solution. Samples were evaporated under atmospheric nitrogen at 40 °C. The waste reconstituted in methanol and 10 µL was injected into the HPLC.

## 2.3. Analytical Method Validation

The analytical method was validated in plasma using the following parameters: selectivity, linearity, precision, accuracy, absolute recovery, and LOQ [27].

### 2.3.1. Selectivity

Blank plasma samples from different rat sources were prepared as previously described, to check for signals that might interfere with the detection of the analytes (Compound **1** and Compound **2**) or the IS. Additionally, the blank sample (a processed matrix sample without analyte and without IS) and a zero sample (a processed matrix with IS) were analyzed.

Also, specificity was demonstrated by comparing samples containing Cremophore EL and Heparine 10 UI/mL.

### 2.3.2. Linearity

The calibration curve was prepared in triplicate on two different days and the data analyzed as described above. The area ratio of Compound 1/IS peaks (AR) was calculated. The linearity was determined between the 0.46–30 µg/mL recorded for Compound 1 and the 0.78–50 µg/mL recorded for Compound 2, with the linear regression parameters as determined were the confidence intervals for slope and intercept.

### 2.3.3. Precision and Accuracy

Aliquots of blank plasma were spiked with the corresponding volume of Compound 1 working solution and metabolite to obtain quality control (QC) samples containing 1.5 µg/mL (LQC), 18 µg/mL (MQC) and 24 µg/mL (HQC). For precision, the quality control samples were prepared in quintuplicate on two different days. Repeatability and reproducibility were calculated and expressed as RSD%. The within-run and between-run RSD% values were not to exceed 15% for each QC level. For accuracy, the QC samples were analyzed against a freshly calculated calibration curve, with the obtained concentrations compared with the nominal value. The accuracy was reported as a percentage of the nominal value. The mean concentration was to be within 15% of the nominal values for the QC samples.

### 2.3.4. Extraction Efficiency

The efficiency of the extraction method was determined by comparing the plasma QC samples with aqueous QC solutions at corresponding levels for Compound 1 and Compound 2 to compare recovery, and measured in triplicate in the same analytical batch. Extraction efficiency was expressed as a percentage of the nominal concentration.

### 2.3.5. Limit of Quantification (LOQ) and Limit of Detection (LOD)

The LOQ for the proposed methods was established through the analysis of the blank samples containing the lowest concentration level on each curve for every compound, determined experimentally by analyzing six replicates with suitable precision and accuracy (RSD < 20%).

## 3. Bioavailability Study

### 3.1. Animals

Male Wistar rats weighing 250–300 g were used for pharmacokinetic evaluation. Animals were individually identified by tail markings and acclimated to the study environment for seven days prior to the administration of the dose. Animals were kept on a 12 h light/dark cycle except when this was interrupted for study procedures. Animals were kept at average room temperature, which was regulated in the range of 18 to 29 °C. The animals were fasted prior to dose administration, and had access to water ad libitum.

### 3.2. Cannulation

Rats were anesthetized with ether and cannulated via the caudal vein using polyethylene tubing with an internal diameter of 0.023 inches, and an outer diameter of 0.038 inches (Becton Dickinson Clay Adams) [28].

### 3.3. Administration

Compound 1 was prepared with Cremophore (10%) in physiologic saline solution and administered orally in a 50 mg/kg dose, and via intravenous bolus (50 mg/kg). Study was conducted in quintuplicate.

### 3.4. Sample Collection

After dosing, serial blood samples were collected (0.2 mL) 0, 0.083, 0.16, 0.25, 0.33, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 6.0, and 8 h after both oral and intravenous administration using heparinized (20 UI) tubes, and were centrifuged at  $5000 \times g$  for 10 min, with the plasma harvested and analyzed by HPLC using the previously validated method.

## 4. Pharmacokinetic Analysis

The pharmacokinetic parameters of Compound 1 were obtained via non-compartmental analysis [29,30] using PK software (PKSolver). The STATA statistical program, version 12, was used for the comparison of the following: the pharmacokinetic parameters obtained via both administration pathways ( $C_{max}$  and  $T_{max}$ ); the elimination rate constant ( $k_{el}$ ); the biological half-life; the area under the curve ( $AUC_{0-t}$ ); the area under the curve from zero to infinity ( $AUC_{0-\infty}$ ); volume of distribution (Vd); clearance (Cl); and, absolute bioavailability (F).

## 5. Bioethics Policies

This study followed the international recommendations for animal handling in biomedical research outlined in the Principles of Laboratory Animal Care (NIH publication #85-23, revised in 1985) and the current Mexican Official Standard NOM-062-ZOO-1999 on the management of laboratory animals [31,32].

## 6. Results and Discussion

### 6.1. Biopharmaceutical Properties

Compound 1 has a tetrazole ring and shows a good affinity for the lipophilic phase in the interval of pH evaluated from 1 to 5, in which the log D values obtained were positive (Figure 3). This indicates that Compound 1 could have a greater affinity in physiological intervals of pH from 1 to 5 in that non-ionized form prevails and is probably able to achieve a good rate of absorption at the stomach and duodenum section. At pH 7 Log D, the species with a higher level of ionization predominate, with the value recorded falling to below zero, indicating that Compound 1 has a greater affinity for the polar phase and a low affinity for the non-polar phase, reducing the probability of an improved absorption in the jejunum.

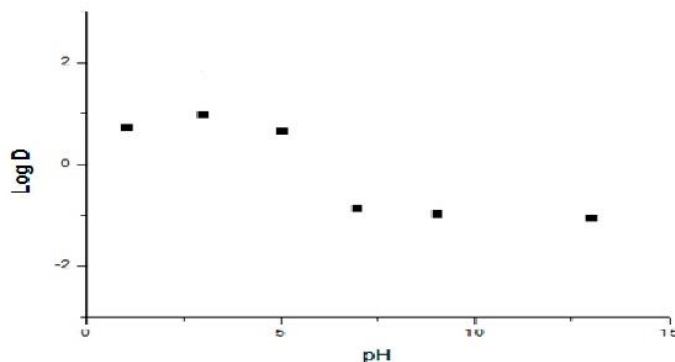
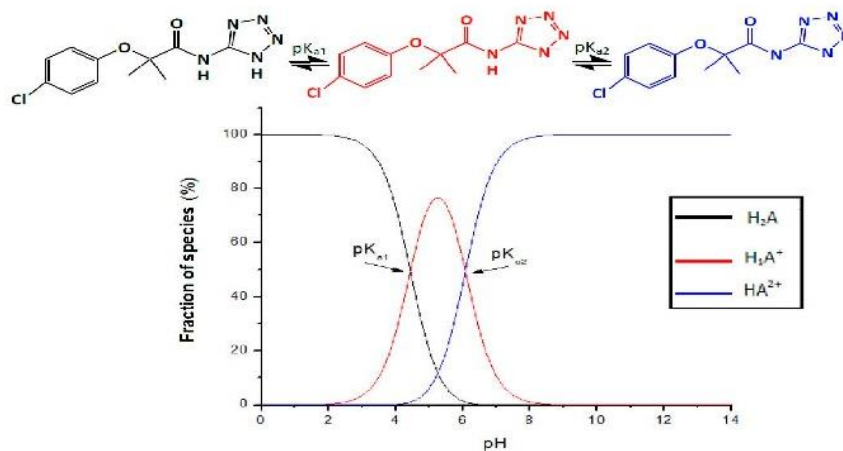


Figure 3. Log D of Compound 1 dependent on pH.

The  $pK_a$  values obtained (Table 1) suggest that the neutral form of the molecule of Compound 1 is found in the interval between pH 1 and 5, before the appearance of the first  $pK_a$  value, as observed in Figure 4.

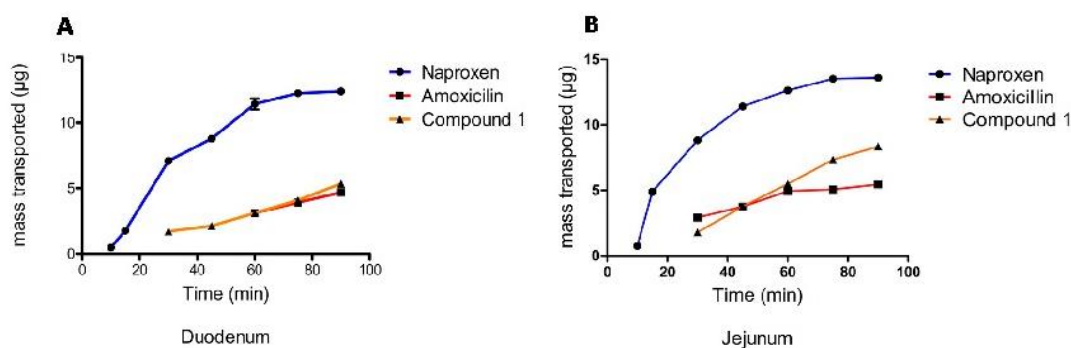
**Table 1.**  $pK_a$  observed for Compound 1.

Mean ( $\pm$ S.D.)
$pK_{a1}$ 4.43 $\pm$ 0.10
$K_{a2}$ 6.08 $\pm$ 0.14

**Figure 4.** Dissociation equilibrium and speciation diagram for Compound 1.

As Figure 4 shows, the pH in the gastrointestinal tract at intervals from 1 to 8, Compound 1 could be non-ionized. Thus at a pH below 4, it could be capable of easily passing through the biological membranes via passive transport (transcellular transport). The dissociation equilibrium shows two ionized species of Compound 1 in the interval of physiological pH.

The evaluation of apparent permeability ( $P_{app}$ ) in the rat everted gut model (Figure 5), shows that Compound 1 has a coefficient of permeability similar to amoxicillin (the standard for low permeability used here) in both the duodenum and the jejunum. The values corresponding to the permeability of Compound 1 and the standards for high and low permeability are presented in Table 2. The permeability of Compound 1 is higher in the jejunum compared to the duodenum, with the standards of permeability showing the same behavior. However, Compound 1 shows a slightly higher level of permeability than the standard of low permeability (amoxicillin), thus possibly demonstrating better absorption than amoxicillin.

**Figure 5.** Permeability of Compound 1 in the everted rat gut model in the duodenum (A) and jejunum (B).

**Table 2.** Permeability of Compound 1 in the everted rat gut model.

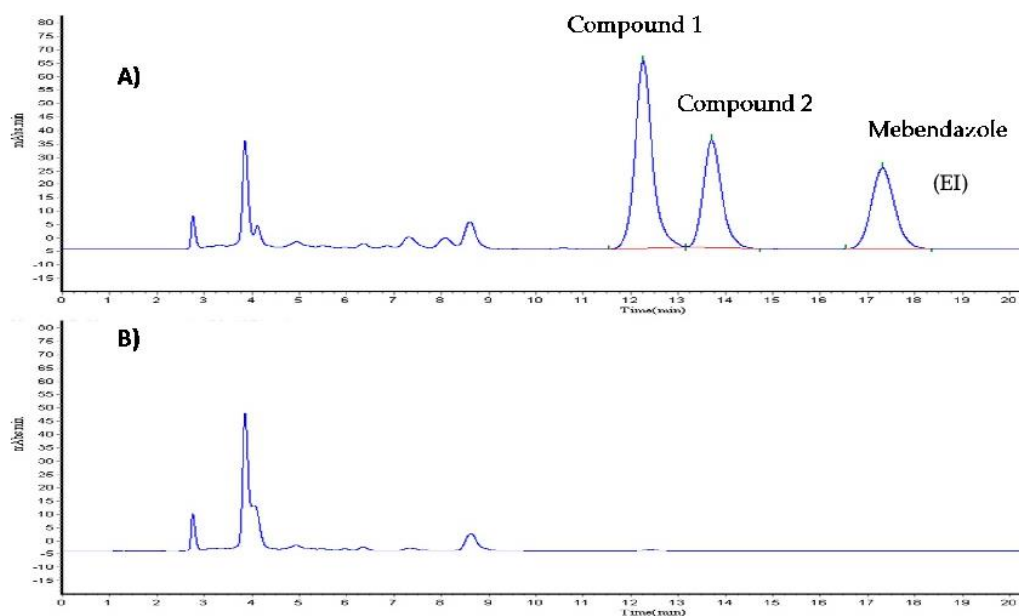
Compound	$P_{app}$ (cm/s)	
	Duodenum	Jejunum
Naproxen	$3.02 \times 10^{-5}$	$3.98 \times 10^{-5}$
Amoxicillin	$8.52 \times 10^{-6}$	$1.00 \times 10^{-5}$
ATAC	$8.73 \times 10^{-6}$	$1.62 \times 10^{-5}$

The levels of concentrations of Compound 1 were undetectable at the first few sampling times (5, 10 and 15 min), and were quantifiable between 30 and 90 min. While, at the same time, it was noted that the transport is slightly higher in the jejunum than the duodenum, compared to the standards (naproxen and amoxicillin), thus it could be considered a molecule with low permeability, as confirmed in the permeability results shown in Table 2. It should be noted that the  $P_{app}$  value for clofibrate is  $-0.52 \times 10^{-6}$  cm/s (pH 7.4) [33] and is higher than the permeability value for Compound 1 (ATAC) when compared to the value reported for clofibrate. Therefore, it can be deduced that Compound 1 is a molecule able to more easily and quickly permeate than clofibrate, thus improving its potential for absorption.

## 6.2. Validation of Analytical Method for Quantifying Compound 1

### Chromatographic Conditions

The chromatographic system for Compound 1 in rat plasma showed the following: a resolution of 3.7 ( $R_s = 3.7$ ) between Compound 1 and the internal standard (mebendazol); a resolution of 1.4 ( $R_s = 1.4$ ) between Compound 1 and the Compound 2 (clofibric acid); an asymmetry of 1.2 for Compound 1, 1.3 for the Compound 2 and 1.4 for the internal standard; and, a retention time of 13.3 min for Compound 1, 11.9 for the metabolite, and 17.8 for the internal standard. Figure 6 shows a typical chromatogram for Compound 1 in rat plasma. The method was selective, in that there was no interference caused by endogenous compounds in the plasma or the products of degradation or impurities.



**Figure 6.** Chromatograms typical of Compound 1 and Compound 2 in rat plasma (A) and blank of plasma (B).

Table 3 shows the parameters of validation obtained for the method used for quantifying Compound 1. The repeatability results for within-day-one variability present a percentage variation coefficient (RSD%) lower than 15%, while the reproducibility results for between-day variability present a RSD% lower than 15% in all the levels evaluated. The method used in this study demonstrated an absolute recuperation of over 98.0% across all levels of control, with the precision of the method ranging from 5.56% to 13.59% absolute percentage deviation.

**Table 3.** Chromatographic parameters and validation results for the quantification method used for both Compound 1 and Compound 2.

Compound	Validation Parameters					
	Compound 1			Compound 2		
Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	(1.5)	(18)	(24)	(1.5)	(18)	(24)
Within-day-one variability (RSD%)	5.73	14.72	5.06	8.16	3.26	1.52
Within-day-two variability (RSD%)	13.14	2.41	7.01	8.08	2.96	5.76
Between-day variability	10.21	10.42	6.27	7.76	7.89	4.53
Accuracy (%)	13.59	7.41	5.56	6.14	8.42	12.03
Absolute Recovery	109.4	95.01	95.23	105.3	106.5	108.9

The linearity of the method showed a correlation coefficient of over 0.99 in the interval of 0.46 to 30 mg/mL for Compound 1 and the 0.78 to 50 mg interval/mL for the Compound 2. Table 4 shows the confidence intervals for the intercept and slope for both compounds. The limit of quantification was 0.46 mg/mL both for Compound 1 and Compound 2. The limit detection was 0.30 mg/mL both Compound 1 and Compound 2.

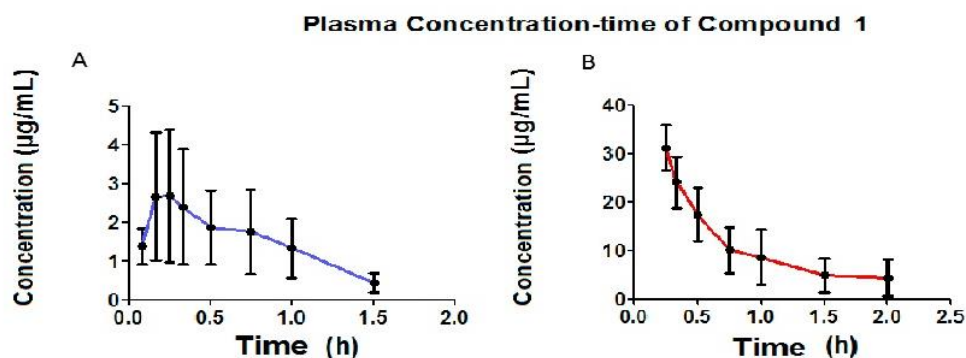
**Table 4.** Linearity of quantitation method used for Compound 1 and the Compound 2 in rat plasma and confidence intervals (CI 95%) for slope and intercept.

	Linearity					
	Compound 1 Confidence Intervals ( $\alpha_{0.05}$ )			Compound 2 Confidence Intervals ( $\alpha_{0.05}$ )		
	Mean Value ( $n = 4$ )	Lower	Upper	Mean Value ( $n = 4$ )	Lower	Upper
m	0.044	0.04279	0.05027	0.0273	0.02450	0.02903
b	-0.0087	-0.01881	0.01626	-0.0124	-0.05143	0.05516
r	0.9997			0.9989		
LOQ LOD	0.46 $\mu\text{g/mL}$	0.30 $\mu\text{g/mL}$				

## 7. Bioavailability Evaluation

Figure 7 presents the pharmacokinetic profiles of Compound 1 after the oral and intravenous administration of a single 50 mg/kg dose. The non-compartmental analysis is shown in Table 5.

Figure 7 shows that, in orally administration, Compound 1 presents a  $C_{\text{max}}$  of 3.57  $\mu\text{g/mL}$ , and that it was only possible to determine its plasmatic concentrations up to one hour after oral administration. Plasmatic concentrations were found up to two hours after intravenous administration.



**Figure 7.** The Compound 1 plasma concentration ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) time profile obtained oral administration (A) and intravenous (B) in Wistar rats, mean  $\pm$  SE ( $n = 6$ ), respectively.

**Table 5.** The mean pharmacokinetics parameters for Compound 1.

Parameter	Oral Administration		Intravenous Administration	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.
$K_{el}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	1.81	0.09	1.21	0.59
$K_a$ ( $\text{h}^{-1}$ )	3.05	1.07		
$T_{1/2el}$ (h)	0.38	0.02	0.71	0.38
$T_{1/2abs}$ (h)	0.25	0.09		
$C_{max}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	3.57	2.39		
$T_{max}$ (h)	0.33	0.28		
$ABC_{0-t}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$ )	2.37	1.80	30.5	9.8
$ABC_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{h}$ )	2.58	1.97	38.8	19.2
Bioavailability (%)	10.4	0.04		
Cl ( $\text{mL}/\text{h}$ )	751.2	242.6	484.5	282.2
Vd (mL)	419.4	148.6	399.6	93.9
Vd ( $\text{L}/\text{kg}$ )	1.43	0.61	1.30	0.18
Dose (mg)	15.11	1.92	15.23	1.88

Rapid absorption was observed for the oral administration of Compound 1, presenting a constant average absorption of  $3.05 \text{ h}^{-1}$  and an average  $C_{max}$  of  $3.57 \mu\text{g}/\text{mL}$  at  $0.33 \text{ h}$ . The average elimination rate constant for oral administration was  $1.81 \text{ h}^{-1}$ , while, for intravenous administration this was  $1.21 \text{ h}^{-1}$ , a difference which was not statistically significant using the  $t$ -test for unequal variances ( $p = 0.1410$ ). The average distribution volume for oral administration is  $419.4 \text{ mL}$ , while this was  $399.6 \text{ mL}$  for intravenous administration, with neither administration pathways presenting a statistically significant difference ( $p = 0.8296$ ). With the average distribution expressed in  $\text{L}/\text{kg}$  due to the fact that it varies along with the animal's body weight, the calculation of the relationship between distribution volume and body weight gives an average distribution volume for oral administration of  $1.43 \text{ L}/\text{kg}$  and  $1.30 \text{ L}/\text{kg}$  for intravenous administration, indicating a wide distribution of Compound 1 in the rat organism. Rodents (rat) have been reported to present a total blood volume of  $64 \text{ mL}/\text{kg}$ , giving  $3.2 \text{ mL}$  [34] of total blood in a rat weighing approximately  $200 \text{ g}$ . This data shows that Compound 1 is widely distributed in the rat organism. Moreover, distribution volume is a constant parameter for a specific molecule. Compound 1 presents an average clearance (CL) of  $751.2 \text{ mL}/\text{min}$  for oral administration and  $484.5 \text{ mL}/\text{min}$  for intravenous administration, indicating a wide clearance in the rat organism. The clearance for Compound 1 for both administration pathways did not present statistically significant differences ( $p = 0.2018$ ). The bioavailability of Compound 1 was  $10.4\%$ , which suggests that the metabolism suffers due to the effect of the first step. The average  $ABC_{0-\infty}$  for oral administration was  $2.58 (\mu\text{g}\cdot\text{mL}/\text{h})$ , which is lower than the average  $ABC_{0-\infty}$  recorded for intravenous administration,  $38.8 (\mu\text{g}\cdot\text{mL}/\text{h})$ , indicating that a lower amount of Compound 1 reaches the central



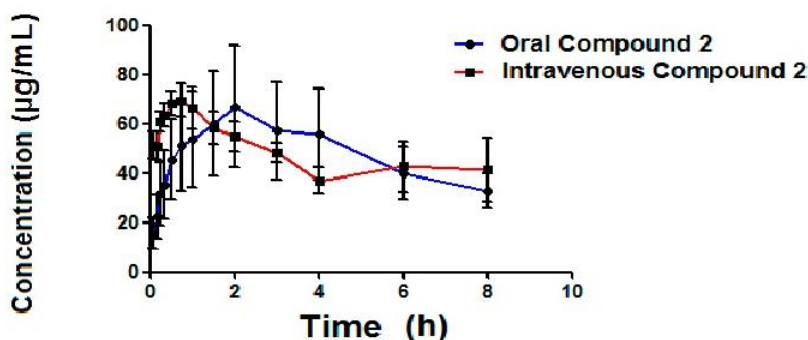
circulatory system via oral administration. Some pharmacokinetic parameters for fibrates, such as clofibrate, which generates clofibric acid (its active metabolite) with an average lifetime of 7–8 h reported in the rat [35,36] are very different to Compound 1, which presented an average lifetime of 0.71 h. It is likely that, in the future, Compound 1 could be used as a prodrug, in that it generates a metabolite with an average lifetime of 9 h, which is very similar to that reported for clofibric acid.

Table 6 presents the pharmacokinetic parameters of the Compound 2 (metabolite) (Figure 8) formed by both administration pathways (oral and intravenous). This Compound 2 is possibly associated with clofibric acid through the administration of a single 50 mg/kg dose of Compound 1, given that the metabolism of Compound 1 is thought to be principally related to enzymatic hydrolysis, as shown in Figure 9.

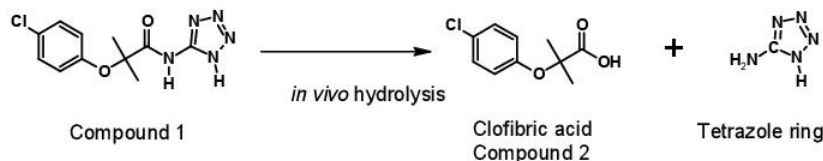
**Table 6.** The mean pharmacokinetics parameters for the Compound 2 generated both orally and intravenously.

Parameter	Oral Pathway		Intravenous Pathway	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.
$k_{elm}$ ( $h^{-1}$ )	0.10	0.06	0.11	0.07
$T_{1/2\ elm}$ (h)	9.24	5.5	9.00	5.72
$T_{max}$ (h)	2	0.71	0.75	0.29
$C_{max}$ ( $\mu g/mL$ )	69.64	47.83	70.58	12.5
$ABC_{0-t}$ ( $\mu/mL \cdot h$ )	340.94	135.77	386.98	243.57
$ABC_{0-\alpha}$ ( $\mu/mL \cdot h$ )	956.54	661.02	747.81	185.69

### Plasma Concentration-time of Compound 2



**Figure 8.** The Compound 2 plasma concentration ( $\mu g \cdot mL^{-1}$ ) time profile obtained oral and intravenous in Wistar rats, mean  $\pm$  SE ( $n = 6$ ), respectively.



**Figure 9.** Hydrolysis reaction for Compound 1.

As seen in Figure 9, it was possible to detect, simultaneous to the analysis of Compound 1, the appearance of a Compound 2, which is possibly related to clofibric acid.

Certain parameters of the metabolite were able to be detected (Table 6), such as:  $ABC_{0-t}$ ,  $ABC_{0-\alpha}$ ,  $C_{max}$ , and  $T_{max}$ . It can be seen that the area below the curve for both metabolites is very similar,

where, with intravenous administration, it can be seen that the metabolite is generated more quickly than with oral administration, indicating a higher plasmatic metabolism. The  $C_{max}$  for the metabolite obtained via intravenous administration is slightly higher (70.58  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) than the  $C_{max}$  obtained via oral administration (69.64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), reinforcing the idea that Compound 1 is metabolized by the liver. The Compound 2, as generated via both administration pathways, is capable of maintaining itself in concentrations still quantifiable after more than 8 h (Figure 8). Table 6 presents the pharmacokinetic parameters obtained for the Compound 2. The elimination of constant of the Compound 2 ( $k_{elm}$ ) generated oral pathway is  $0.10\text{ h}^{-1}$  on average, while for generated intravenous recorded an average of  $0.11\text{ h}^{-1}$ , results which do not present a statistically significant difference in the  $t$ -test ( $p = 0.1143$ ). The average elimination of constant of the Compound 2 ( $k_{elm}$ ) generated via oral pathway ( $0.10\text{ h}^{-1}$ ) is very similar to that reported for clofibric acid in the rat ( $0.11\text{ h}^{-1}$ ) [36]. The average lifetime for the Compound 2 when generated oral pathway is 9.24 h and 9.0 h for the intravenous pathway, results which do not present a statistically significant difference in the  $t$ -test (0.1590). The average lifetime reported for clofibric acid administered orally in the rat is found to be within the range of 7–8 h [36], which provides evidence that the Compound 2 originated is likely to be said compound. The average  $ABC_{0-t}$  for the Compound 2 originating from the oral pathway was 340.94 ( $\mu/\text{mL}\cdot\text{h}$ ), and 386.98 ( $\mu/\text{mL}\cdot\text{h}$ ) for the intravenous pathway, results which were not statistically different, according to the T-test ( $p = 0.7317$ ).

## 8. Conclusions

According to the results obtained, Compound 1 is a molecule of average polarity, with the non-ionized species formed having a pH lower than 5. It presents the behavior of a diacid and has a low permeability. However, its permeability is slightly higher than that shown by amoxicillin, the standard for low permeability. The average lifetime of its absorption was 3.05 h, while the elimination half-life was approximately 0.38 h, presenting a low level of bioavailability, with an average of 10.4%, generating a metabolite that is most likely to be clofibric acid. On appearing, said metabolite is responsible for the therapeutic effect, presenting an average elimination half-life of 9.24 h. This indicates that Compound 1 is a possible prodrug candidate, in that clofibrate is a liquid prodrug that is not very soluble in aqueous media and that generates its active metabolite, clofibric acid, via hydrolysis *in vivo*. This Compound 2 has a reported  $DL_{50}$  of 940 mg/kg [37] via oral administration in the rat, while, according to *in silico* predictions, Compound 1 has a  $DL_{50}$  of 2200 mg/kg [17] being a compound with a lower toxicity than clofibrate. It should also be noted that another advantage of Compound 1 is that it is a solid powder, making it easier to formulate than clofibrate. One of the disadvantages of Compound 1 is that, like clofibrate, it has little aqueous solubility, requiring it to be used in an adequate formulation in order to obtain optimal solubility for Compound 1 in aqueous media.

**Acknowledgments:** This study was taken in part from the PhD Thesis of Nancy Vara-Gama, and was supported in part by internal funds from the Pharmacy Faculties at the UAEM and Universidad de Guanajuato. Nancy Vara-Gama thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), or the National Council for Science and Technology) for the fellowship (Registration No. 228595) awarded during the realization of this study. Likewise, the support given by the Dirección General de Apoyo a la Investigación y al Posgrado (DAIP, or the General Support Office for Research and Postgraduate Studies) at the Universidad de Guanajuato for the revision of the manuscript in English is appreciated. Thanks also to the program for professional teacher development, for the higher type (PRODEP).

**Author Contributions:** Nancy Vara-Gama is the principal researcher, who designed and developed the studies as part of the doctoral project. Adriana Valladares-Méndez contributes with the work in the studies, animal handling and technical support in the different analytical methodologies. Gabriel Navarrete-Vázquez developed the synthesis of Compound 1 and performs the evaluation of physicochemical characterization. Samuel Estrada-Soto advised on the design of pharmacological studies. Luis Orozco-Castellanos supervised the development of formulations for oral and intravenous administration, coordinated the activities of physicochemical tests and general activities of the doctoral thesis project. Julio César Rivera-Leyva designed the general structure of the study, designed the pharmacokinetic studies and coordinated the general activities of the doctoral thesis project.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that no conflict of interest exists.

## References

- Mbanya, J.C. *Plan Mundial Contra la Diabetes 2011–2021*; International Diabetes Federation: Bruselas, Bélgica, 2011; pp. 1–27.
- Instituto Nacional de Salud Pública. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012. Resultados Nacionales*, 1st ed.; Secretaría de Salud: Cuernavaca, CUE, Mexico, 2012; pp. 1–200.
- Cefalu, W.T. Standards of medical care in diabetes-2016. *Am. Diabetes Assoc.* **2016**, *39*, S4–S5.
- Defronzo, R.A.; Eldor, R.; Abdul-Ghani, M. Pathophysiologic approach to therapy in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2013**, *36*, 127–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Torres-Arreola, L.; Gil-Velázquez, L.E.; Sil-Acosta, M.J.; Domínguez-Sánchez, E.R.; Parrilla-Ortiz, J.I.; Santillana-Hernández, S. Guía de practica clinica GPC diabetes mellitus tipo 2 en el primer nivel de atención evidencias y recomendaciones catalogo maestro de guias de practica clinica: IMSS-718-14 tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 en el primer nivel de atención. *Inst. Mex. del Seguro Soc.* **2014**, *1*, 1–136.
- Gil-Vazquez, L.E.; Sil-Acosta, M.J.; Dominguez-Sanchez, E.R.; del Torres-Arreola, L.; Medina-Chavez, J.H. Guía de practica clinica. Diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* **2013**, *51*, 1–16.
- Ros, E.; Laguna, J.C. Treatment of hypertriglyceridemia: Fibrates versus omega-3 fatty acids. *Rev. Española Cardiol.* **2006**, *6*, 52–61. [[CrossRef](#)]
- Hormigo-Pozo, A.; Mancera-Romero, J.; Perez-Unanua, M.P.; Alonso-Fernandez, M.; Lopez-Simarro, F.; Mediavilla-Bravo, J.J. Recomendaciones de buena practica en el tratamiento de la dislipemia en la diabetes. *Semergen* **2015**, *41*, 89–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tachibana, K.; Anzai, N.; Ueda, C.; Katayama, T.; Kirino, T.; Takahashi, R.; Yamasaki, D.; Ishimoto, K.; Tanaka, T.; Hamakubo, T.; et al. Analysis of PPAR alpha function in human kidney cell line using siRNA. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **2006**, *50*, 257–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Litherland, N.B.; Bionaz, M.; Wallace, R.L.; Loo, J.J.; Drackley, J.K. Effects of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  agonists clofibrate and fish oil on hepatic fatty acid metabolism in weaned dairy calves 1. *J. Dairy Sci.* **2010**, *93*, 2404–2418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kim, C.H.; Ramu, R.; Ahn, J.H.; Bae, M.A.; Cho, Y.S. Fenofibrate but not fenofibric acid inhibits 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 1 in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myotubes. *Mol. Cell Biochem.* **2010**, *344*, 91–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Alberts, P.I.; Engblom, L.; Edling, N.; Forsgren, M.; Klingström, G.; Larsson, C.; Rönquist-Nii, Y.; Ohman, B.; Abrahamsén, L. Selective inhibition of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 decreases blood glucose concentrations in hyperglycaemic mice. *Diabetologia* **2002**, *45*, 1528–1532. [[PubMed](#)]
- Anderson, A.; Walker, B.R. 11 $\beta$ -HSD1 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Drugs* **2013**, *73*, 1385–1393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Shetty, S.R.; Kumar, S.; Mathur, R.P.; Sharma, K.H.; Jaiswal, A.D. Observational study to evaluate the safety and efficacy of saroglitazar in Indian diabetic dyslipidemia patients. *Indian Heart J.* **2015**, *67*, 23–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- He, B.K.; Ning, Z.Q.; Li, Z.B.; Shan, S.; Pan, D.S.; Ko, B.C.; Li, P.P.; Shen, Z.F.; Dou, G.F.; Zhang, B.L.; et al. In vitro and in vivo characterizations of chiglitazar, a newly identified PPAR pan-agonist. *PPAR Res.* **2012**, *2012*, 546548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ballatore, C.; Hury, D.M.; Smith, A.B. Carboxylic Acid (Bio)Isosteres in Drug Design. *ChemMedChem* **2013**, *8*, 385–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Alaniz-Palacios, A. *Diseño, Síntesis y Caracterización Mediante Difracción de Rayos-X de amidas Azaheterocíclicas Derivadas del Acido Clofibrato Como Inhibidores de la Enzima 11 $\beta$ -HSD1*, Bachelor; Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos: Cuernavaca, Morelos, Mexico, 2011.
- Navarrete-Vázquez, G.; Alaniz-Palacios, A.; Hidalgo-Figueroa, S.; González-Acevedo, C.; Ávila-Villarreal, G.; Estrada-Soto, S.; Webster, S.P.; Medina-Franco, J.L.; López-Vallejo, F.; Guerrero-Álvarez, J.; et al. Discovery, synthesis and in vivo studies of a tetrazole analog of clofibrato acid as a potent hypoglycemic agent. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3244–3247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ramírez-Espinosa, J.J.; García-Jiménez, S.; Rios, M.Y.; Medina-Franco, J.L.; López-Vallejo, F.; Webster, S.P.; Binnie, M.; Ibarra-Barajas, M.; Ortiz-Andrade, R.; Estrada-Soto, S. Antihyperglycemic and sub-chronic antidiabetic actions of morolic and moronic acids, in vitro and in silico inhibition of 11 $\beta$ -HSD 1. *Phytomedicine* **2013**, *20*, 571–576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

20. Babić, S.; Horvat, A.J.M.; Mutavdžić Pavlović, D.; Kaštelan-Macan, M. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 1043–1061. [CrossRef]
21. Clark College. Potentiometric Titration of a Weak Acid. Chemistry. Available online: <http://web.clark.edu/nfattaleh/classes/135/Sp05/Labs/PotTitrSp05.pdf> (accessed on 9 February 2017).
22. Scott, D.C.; Clymer, C.J. Stimulation of distribution coefficients from the partition coefficient and pKa. *Pharm. Technol.* **2002**, *26*, 30–40.
23. Shawahna, R.; Rahman, N.U. Evaluation of the use of partition coefficients and molecular surface properties as predictors of drug absorption: A provisional biopharmaceutical classification of the list of national essential medicines of Pakistan. *DARU* **2011**, *19*, 83–98. [PubMed]
24. Takacs-Novak, K.; Avdeef, A. Interlaboratory study of log P determination by shake-flask and potentiometric methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, *14*, 1405–1413. [CrossRef]
25. Krimsky, M.; Dagan, A.; Aptekar, L.; Ligumsky, M.; Yedgar, S. Assessment of intestinal permeability in rats by permeation of inulin-fluorescein. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* **2000**, *11*, 143–153. [CrossRef] [PubMed]
26. Ashimura, J.K.; Agai, Y.N. Inhibitory effect of palatinose on glucose absorption in everted rat gut. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2007**, *53*, 87–89. [CrossRef]
27. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que Establece las Pruebas y Procedimientos Para Demostrar que un Medicamento es Intercambiable. Requisitos a que Deben Sujetarse los Terceros Autorizados que Realicen las Pruebas de Intercambiabilidad. Available online: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013) (accessed on 9 February 2017).
28. Balla, D.Z.; Schwarz, S.; Wiesner, H.M.; Hennige, A.M.; Pohmann, R. Monitoring the stress-level of rats with different types of anesthesia: A tail-artery cannulation protocol. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **2014**, *70*, 35–39. [CrossRef] [PubMed]
29. Rowland, M.; Tozer, T.N.; Derendorf, H.; Hochhaus, G. *Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics Concepts and Applications*, 4th ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2011; pp. 1–20.
30. Doménech, B.J.; Martínez-Lanao, J.; Plá Delfina, J.M. *Biofarmacia y Farmacocinética*, 1st ed.; Síntesis, S.A., Ed.; Universidad Autónoma de Madrid: Madrid, Spain, 2001; Volume 1, pp. 322–420.
31. Nordisk, N. Directive 2010/63/EU on Protection of Animals Used for Scientific Purposes, Caring for Animals Aiming for Better Science. *Off. J. Eur. Union.* **2010**, *1*, 1–158.
32. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones Técnicas Para la Producción, Cuidado y uso de los Animales de Laboratorio. Available online: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/bioterio.NOM-062.pdf> (accessed on 9 February 2017).
33. Karelson, M.; Karelson, G.; Tamm, T.; Tulp, I.; Jänes, J.; Tämm, K.; Lomaka, A.; Savchenko, D.; Dobchev, D. QSAR study of pharmacological permeabilities. *Arxivoc* **2009**, *2*, 218–238.
34. Diehl, K.H.; Hull, R.; Morton, D.; Pfister, R.; Rabemampianina, Y.; Smith, D.; Vidal, J.M.; van de Vorstenbosch, C.; European Federation of Pharmaceutical Industries Association and European Centre for the Validation of Alternative Methods. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J. Appl. Toxicol.* **2001**, *21*, 15–23. [CrossRef] [PubMed]
35. Elmore, C.L. Center for Drugs Evaluation and Research. In *Pharmacology/Toxicology and Evaluation*; Department of Health and Human Services Public Health Service Food and Drug Administration: Philadelphia, PA, USA, 2009; pp. 1–74.
36. Crouthamel, W.G.; Cenedella, R.J. Clofibrate pharmacokinetics: Effect of elevation of plasma-free fatty acids. *Pharmacology* **1975**, *13*, 465–473. [CrossRef] [PubMed]
37. Drugbank. Drugcard of Clofibrate. Available online: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00636> (accessed on 9 February 2017).

**Sample Availability:** Sample of the compound **1** is available from the authors.



© 2017 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).