



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Estudio farmacocinético de quercetina-3-O-rutinósido a partir de un extracto estandarizado de cálices de *Physalis peruviana* en dos modelos animales

Gina Paola Domínguez Moré

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia

2020

Estudio farmacocinético de quercetina-3-O-rutinósido a partir de un extracto estandarizado de cálices de *Physalis peruviana* en dos modelos animales

Gina Paola Domínguez Moré

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctora en Ciencias Farmacéuticas

Directora:

Ph.D., Diana Marcela Aragón Novoa

Profesora Asociada Universidad Nacional de Colombia

Codirectora:

Ph.D., Claudia Maria Oliveira Simões

Professora Titular Universidade Federal de Santa Catarina -Brasil

Línea de Investigación:

Farmacocinética y estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia

Grupo de Investigación:

Sistemas para Liberación Controlada de Moléculas Biológicamente Activas

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Área Curricular de Farmacia

Bogotá, Colombia

2020

A mis padres y mi abuela Gladys por su amor incondicional.

Declaración de obra original

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.



Nombre Gina Paola Domínguez Moré

Fecha 18/08/2020

Agradecimientos

A Dios por levantarme de cada caída y permitirme llegar hasta aquí.

A mi familia, en especial a mi esposo por su presencia y paciencia.

A mi amiga Paola Betín por su hospitalidad y compañía.

A mis compañeras Sandra, María Isabel, Paula, Ivonne y Diana por todo su apoyo en la realización de los bioensayos.

A Paula, Clarissa, Lara, Laurita y Naira del Laboratorio de Virología Aplicada de la *Universidade Federal de Santa Catarina*, por el apoyo y el calor recibido.

A mi amiga y colega Indira Pájaro por toda su comprensión y soporte emocional.

A mis estudiantes del Laboratorio de Biodisponibilidad y Bioequivalencia de la Universidad del Atlántico por toda la ayuda recibida.

A mi amiga Paola Cádernas quien hasta el último momento estuvo apoyándome.

A mi colega Pedro Castro por su ayuda en la descripción matemática de los modelos.

Al profesor Geison Modesti por la disposición del espectrómetro de masas utilizado en algunos ensayos.

A mi directora Diana Marcela Aragón Novoa que me entregó muchas lecciones académicas, pero en especial personales que me han hecho una mejor docente.

A mi codirectora Claudia Maria Oliveira por recibirme en su grupo como una más de las suyas y por sus aportes para el desarrollo de los ensayos de permeabilidad.

Al profesor Luis Fernando Ospina por sus enseñanzas y su apoyo en la realización de los bioensayos.

A la Facultad de Ciencias por el apoyo económico para la pasantía en el Laboratorio de Virología Aplicada en la *Universidade Federal de Santa Catarina*, Florianópolis (Brasil).

A la Universidad del Atlántico por la comisión de estudios otorgada y el aporte para el desarrollo del componente analítico de esta investigación.

Resumen

Physalis peruviana es una planta de la familia Solanaceae con propiedades medicinales. Un extracto hidroalcohólico de cálices de *P. peruviana* presentó actividad antiinflamatoria e hipoglicemiante. El objetivo de esta investigación fue estudiar la farmacocinética del flavonoide mayoritario del extracto, quercetina-3-O-rutinósido (rutina), en ratas y conejos, como parte del desarrollo preclínico de un fitoterapéutico. Se estudió inicialmente la permeabilidad intestinal de rutina desde el extracto, utilizando el modelo de Caco-2. El estudio farmacocinético se realizó tras la administración en los animales de dosis del extracto entre 100 y 1000 mg/kg, por vía i.v. y oral y la toma de muestras de sangre entre las 0 y las 48 h. Las muestras provenientes de los estudios de permeabilidad y farmacocinéticos se cuantificaron para rutina y sus metabolitos, utilizando técnicas HPLC y UHPLC-UV validadas. Se obtuvo también el coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) y los parámetros farmacocinéticos de rutina estándar con fines comparativos. El Papp de rutina en el extracto fue mayor que el del compuesto puro (1.53 ± 0.07 vs $0.9 \pm 0.03 \times 10^{-5}$ cm/s). En los animales, rutina administrada por vía oral, como compuesto puro o en el extracto, estuvo sujeta a metabolismo intestinal y los compuestos encontrados en el plasma fueron principalmente los conjugados glucurónido y sulfato de quercetina (Q3OG y Q3OS respectivamente). La biodisponibilidad relativa oral de Q3OG y Q3OS desde el extracto fue 11.2 (1120%) en ratas y de 12.0 (1200%) en conejos, frente al compuesto puro. Se concluyó que la matriz del extracto tiene influencia sobre la permeabilidad y biodisponibilidad de rutina y sus metabolitos.

Palabras clave: quercetina-3-O-rutinósido, biodisponibilidad, permeabilidad, extracto vegetal, farmacocinética.

Abstract

Physalis peruviana is a plant of the Solanaceae family with medicinal properties. A hydroalcoholic extract from calyces of *P. peruviana* showed anti-inflammatory and hypoglycemic activity. The aim of this research was to study the pharmacokinetics of the main flavonoid in the extract, quercetin-3-O-rutinoside (rutin), in rats and rabbits, as part of the preclinical development of a botanical drug. Intestinal permeability of rutin from the extract was initially studied using the Caco-2 model. The pharmacokinetic study was carried out by administering in the animals i.v. and oral doses of the extract among 100 and 1000 mg/kg and taking blood samples from 0 to 48 h. Samples from permeability and pharmacokinetic studies were quantified for rutin and its main metabolites, using validated HPLC and UHPLC-UV methods. Pure rutin was also assayed for permeability and pharmacokinetic for comparison purposes. The intestinal permeability of rutin in the extract was greater than that of the pure compound (1.53 ± 0.07 vs $0.9 \pm 0.03 \times 10^{-5}$ cm/s). In animals orally administered with rutin (pure or extract), the flavonoid was subject to intestinal metabolism and the compounds found in plasma were glucuronide and sulfate conjugates of quercetin (Q3OG and Q3OS respectively). The relative bioavailability of Q3OG y Q3OS in the extract *versus* the pure compound was up to 11.2 (1120%) in rats and 12.0 (1200%) in rabbits. It was concluded that the extract matrix influences the permeability and bioavailability of rutin and its metabolites.

Keywords: quercetin-3-O-rutinoside, bioavailability, permeability, plant extract, pharmacokinetics.

Contenido

	Pág.
Resumen	IX
Lista de figuras.....	XIV
Lista de tablas	XVII
Introducción	1
1. Desarrollo y validación de metodologías analíticas por cromatografía líquida de alta y ultra alta eficiencia (HPLC/UHPLC-UV) para la cuantificación de quercetina-3-O-rutinosido y quercetina desde distintas matrices biológicas y no biológicas	5
1.1 Aspectos teóricos	5
1.1.1 Características fisicoquímicas de rutina y quercetina	5
1.1.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia	7
1.1.3 Aspectos metodológicos para la cuantificación de marcadores de extractos vegetales en estudios farmacocinéticos	10
1.1.4 Migración de HPLC a UHPLC	13
1.1.5 Validación de metodologías analíticas y bioanalíticas	14
1.2 Metodología	16
1.2.1 Materiales y reactivos	17
1.2.2 Estándares de referencia	17
1.2.3 Desarrollo y validación de metodología analítica por HPLC para cuantificación de rutina y quercetina en HBSS.....	17
1.2.4 Desarrollo y validación de metodología analítica por UHPLC para cuantificación de rutina y quercetina en plasma.	21
1.3 Resultados y discusión	26
1.3.1 Desarrollo de metodología HPLC para cuantificación de rutina y quercetina en HBSS	27
1.3.2 Desarrollo de metodología UHPLC para cuantificación de rutina y quercetina en plasma	34
1.4 Conclusiones	46
2. Estudio de la permeabilidad intestinal de quercetina-3-O-rutinosido (rutina) a partir del extracto estandarizado de cálices de <i>Physalis peruviana</i>.....	47
2.1 Aspectos teóricos	47
2.1.1 Permeabilidad intestinal	47
2.1.2 Metodologías para determinación de permeabilidad intestinal de los fármacos	50
2.1.3 Permeabilidad intestinal de polifenoles.....	52

2.1.4	Extracto de cálices de <i>P. peruviana</i>	56
2.2	Metodología.....	58
2.2.1	Materiales y reactivos	58
2.2.2	Preparación del extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> y fraccionamiento.....	59
2.2.3	Cultivo de células Caco-2	59
2.2.4	Viabilidad celular frente a rutina estándar, extracto y fracción butanólica	60
2.2.5	Preparación de rutina estándar, extracto y fracción para ensayos de permeabilidad intestinal	60
2.2.6	Experimentos de permeabilidad intestinal <i>in vitro</i>	60
2.2.7	Cuantificación de rutina, quercetina y propranolol en los experimentos de permeabilidad.	62
2.2.8	Cálculos y análisis estadístico de los datos	62
2.3	Resultados y discusión	63
2.3.1	Contenido de rutina en el extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> y la fracción butanólica	63
2.3.2	Diferenciación de células Caco-2 y resultados de ensayos de viabilidad.....	64
2.3.3	Permeabilidad aparente de rutina pura en el extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> y en la fracción butanólica	66
2.4	Conclusiones	74
3.	Estudio farmacocinético de quercetina-3-O-rutinosido (rutina) y sus metabolitos principales tras la administración del extracto estandarizado de cálices de <i>Physalis peruviana</i> en ratas y conejos	75
3.1	Aspectos teóricos	75
3.1.1	Farmacocinética.....	75
3.1.2	Análisis farmacocinético no compartimental.....	76
3.1.3	Modelos compartimentales	78
3.1.4	Farmacocinética aplicada a extractos vegetales	80
3.1.5	Farmacocinética de rutina.....	83
3.2	Metodología.....	88
3.2.1	Animales de experimentación.....	88
3.2.2	Aspectos éticos.....	88
3.2.3	Preparación de rutina y extracto de <i>P. peruviana</i> para los ensayos <i>in vivo</i> ...	88
3.2.4	Dosis, administración de los tratamientos y toma de muestra.....	89
3.2.5	Cuantificación de rutina y sus metabolitos en las muestras de plasma.....	90
3.2.6	Cálculos farmacocinéticos y análisis de los datos	90
3.3	Resultados.....	93
3.3.1	Contenido de rutina en el extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> para estudios farmacocinéticos.....	93
3.3.2	Farmacocinética de rutina pura y desde el extracto de <i>P. peruviana</i> en ratas.	93
3.3.3	Farmacocinética de rutina pura y desde el extracto de <i>P. peruviana</i> en conejos.	119
3.4	Conclusiones	139
4.	Conclusiones y recomendaciones.....	141
4.1	Conclusiones	141
4.2	Recomendaciones.....	142

A. Anexo: Cromatogramas de diluyente y fases móviles descartadas durante el desarrollo del método.....	143
B. Anexo: Cromatogramas de rutina y quercetina con luteolina e isoorientina ensayados como estándares internos (IS).....	145
C. Anexo: Espectro de masas de quercetin-3-O-glucuronido, identificado en muestra de plasma de ratas 2 h post administración oral de rutina pura o extracto de cálices de <i>P. peruviana</i>.	146
Bibliografía	148

Lista de figuras

Figura 1-1:	Hidrólisis de rutina en quercetina y rutinosa.....	5
Figura 1-2:	Reacción β -glucuronidasa/arilsulfatasa	13
Figura 1-3:	Resumen metodología capítulo 1.	16
Figura 1-4:	Especificidad del método cromatográfico desarrollado para la cuantificación de rutina y quercetina en HBSS.....	29
Figura 1-5:	Resultado de la reacción con β -glucuronidasa/arilsulfatasa.....	30
Figura 1-6:	Cromatograma representativo método UHPLC.....	36
Figura 1-7:	Selectividad y especificidad del método.	38
Figura 1-8:	Selectividad del método frente a plasma de rata Wistar y conejo New Zealand.	44
Figura 1-9:	Respuesta del estándar interno a lo largo de los ensayos de validación y farmacocinéticos.	45
Figura 2-1:	Proteínas expresadas en enterocitos relevantes en el transporte de fármacos.	49
Figura 2-2:	Representación gráfica de los experimentos de transporte in vitro a través monocapas de células Caco-2 cultivadas sobre filtros en placas tipo transwell.....	52
Figura 2-3:	Marcadores de uniones estrechas en células las Caco-2 diferenciadas.	64
Figura 2-4:	Viabilidad de células Caco-2 diferenciadas	65
Figura 2-5	Cromatograma representativo de las muestras de los ensayos de permeabilidad.	66
Figura 2-6:	Papp y transporte bidireccional de rutina estándar (RU), en el extracto hidroalcohólico de cálices de <i>P. peruviana</i> (HEE) y en la fracción butanólica (BF) determinados en el modelo Caco-2.	67
Figura 2-7:	Proporción de eflujo de rutina estándar (RU), en el extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> (HEE), en la fracción butanólica (BF) y en combinación con verapamilo (RU+V).	69
Figura 2-8	Representación gráfica de la permeabilidad aparente de rutina en el modelo Caco-2, a partir del estándar (RU), del extracto hidroalcohólico de cálices de <i>P. peruviana</i> (HEE) y de la fracción butanólica (BF).	72
Figura 3-1:	Curva concentración plasmática vs tiempo.	76
Figura 3-2:	Representación esquemática de un modelo de dos compartimentos.	79
Figura 3-3:	Publicaciones sobre farmacocinética de extractos, preparaciones poliherbales y productos fitoterapéuticos de 2004 a 2019.....	81
Figura 3-4:	Estructura base flavonas	82
Figura 3-5	Cromatograma representativo de las muestras de los ensayos farmacocinéticos.	94

Figura 3-6: Curva Cp vs tiempo de rutina y quercetina tras la administración i.v. del compuesto puro en ratas y linealidad farmacocinética.	95
Figura 3-7 Curva Cp vs tiempo de rutina y quercetina tras la administración i.v. del extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en ratas.	97
Figura 3-8 Linealidad farmacocinética de rutina tras la administración i.v. de tres dosis del extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en ratas.	98
Figura 3-9 Parámetros farmacocinéticos relevantes de rutina, administrada por vía i.v. en ratas, como compuesto puro o en el extracto de cálices de <i>P. peruviana</i>	101
Figura 3-10: Curva Cp vs tiempo de quercetina tras la administración oral de rutina en ratas y linealidad farmacocinética.	102
Figura 3-11: Curva Cp vs tiempo de quercetina tras la administración oral del extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en ratas.	103
Figura 3-12: Farmacocinética no lineal de rutina tras la administración oral de tres dosis del extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en ratas.	104
Figura 3-13: Parámetros farmacocinéticos relevantes de quercetina tras la administración oral de rutina en ratas, como compuesto puro o en el extracto de cálices de <i>P. peruviana</i>	107
Figura 3-14: Modelo de dos compartimentos con eliminación de orden 1 para rutina i.v.	109
Figura 3-15 Ajuste poblacional del perfil de Cp vs tiempo de rutina por vía i.v en ratas.	110
Figura 3-16: Revisión predictiva visual del modelo desarrollado para rutina i.v en ratas.	112
Figura 3-17: Modelo de absorción en dos sitios con distribución a dos compartimentos y eliminación de orden 1 para quercetina oral, proveniente de rutina pura o del extracto de cálices de <i>P. peruviana</i>	114
Figura 3-18 Ajuste poblacional del perfil de Cp vs tiempo de quercetina tras la administración oral de rutina en ratas.	115
Figura 3-19: Revisión predictiva visual del modelo desarrollado para quercetina vía oral en ratas.	118
Figura 3-20: Curva Cp vs tiempo de rutina y quercetina tras la administración i.v. de rutina pura o del extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en conejos.	120
Figura 3-21: Parámetros farmacocinéticos relevantes de rutina, administrada por vía i.v. en conejos, como compuesto puro o extracto de cálices de <i>P. peruviana</i>	122
Figura 3-22: Curva Cp vs tiempo de rutina tras la administración oral del compuesto puro o el extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en conejos.	123
Figura 3-23: Curva Cp vs tiempo de quercetina tras la administración oral de rutina estándar o del extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en conejos.	124
Figura 3-24: Parámetros farmacocinéticos relevantes de rutina, administrada por vía oral en conejos, como compuesto puro o extracto de cálices de <i>P. peruviana</i>	126
Figura 3-25: Parámetros farmacocinéticos relevantes de quercetina, tras la administración oral de rutina en conejos, como compuesto puro o extracto de cálices de <i>P. peruviana</i>	127

Figura 3-26	Ajuste poblacional del perfil de Cp vs tiempo de rutina por vía i.v en conejos.	128
Figura 3-27:	Revisión predictiva visual del modelo desarrollado para rutina i.v en conejos.	130
Figura 3-28	Ajuste poblacional del perfil de Cp vs tiempo de quercetina tras la administración oral de rutina en conejos.	131
Figura 3-29:	Revisión predictiva visual del modelo desarrollado para quercetina vía oral en conejos.....	133
Figura 3-30	Parámetros farmacocinéticos relevantes de rutina i.v. administrada en ratas y conejos como compuesto puro y en el extracto de cálices de <i>P. peruviana</i>	135
Figura 3-31	Curva logarítmica de parámetros farmacocinéticos vs peso corporal extrapolada al peso humano estándar (70 kg).	136
Figura 3-32	Parámetros farmacocinéticos relevantes de quercetina tras la administración oral de rutina en ratas y conejos como compuesto puro y en el extracto de cálices de <i>P. peruviana</i>	139

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1: Características fisicoquímicas de rutina y quercetina.	6
Tabla 1-2: Parámetros de aptitud del sistema cromatográfico HPLC.....	8
Tabla 1-3: Condiciones de un método HPLC.	9
Tabla 1-4: Resumen de metodologías reportadas para la cuantificación de rutina y quercetina en plasma o HBSS.	11
Tabla 1-5: Metodología para establecer algunos parámetros de validación de la metodología bioanalítica.	24
Tabla 1-6: Controles a las corridas analíticas de los estudios farmacocinéticos.....	26
Tabla 1-7: Parámetros de aptitud del sistema del método HPLC desarrollado para la cuantificación de rutina y quercetina en HBSS pH 7.4.	29
Tabla 1-8: Estabilidad de rutina y quercetina en HBSS pH 7.4, bajo condiciones de reacción con β -glucuronidada/arilsulfatasa.....	31
Tabla 1-9: Resumen metodología analítica para cuantificación de rutina y quercetina en HBSS.	31
Tabla 1-10: Validación de metodología HPLC-UV para la cuantificación de rutina y quercetina en HBSS pH 7.4 y 6.5.	32
Tabla 1-11: Estabilidad de rutina y quercetina en HBSS pH 7.4 tras incubación a 37°C por 2 h.	33
Tabla 1-12: Validación de metodología HPLC-UV aplicada a la cuantificación de propranolol en HBSS pH 7.4.....	34
Tabla 1-13: Parámetros de aptitud del sistema de método UHPLC desarrollado para la cuantificación de rutina y quercetina en plasma utilizando crisina como estándar interno.	35
Tabla 1-14: Metodología para la cuantificación de rutina y quercetina en plasma.	37
Tabla 1-15: Relación de curvas de calibración	39
Tabla 1-16: Resumen exactitud y precisión del método para la cuantificación de rutina y quercetina en plasma humano, de rata Wistar y de conejo New Zealand.	40
Tabla 1-17: Resumen recuperación y factor de dilución.....	41
Tabla 1-18: Estabilidad a corto plazo.....	42
Tabla 1-19: Estabilidad a largo plazo.....	43
Tabla 2-1: Algunos modelos para el estudio de permeabilidad intestinal de fármacos <i>in silico</i> , <i>in vitro</i> , <i>in situ</i> e <i>in vivo</i>	50

Tabla 2-2	Permeabilidad de polifenoles en el modelo Caco-2	54
Tabla 2-3:	Fracción metabolizada (f_{met}) y recuperación de masa en los experimentos de transporte bidireccional de rutina a partir del estándar (RU), del extracto hidroalcohólico de cálices de <i>P. peruviana</i> (HEE) y de la fracción butanólica (BF).	70
Tabla 2-4:	Clasificación biofarmacéutica de rutina estándar (RU), en el extracto hidroalcohólico de cálices de <i>P. peruviana</i> (HEE) y en la fracción butanólica (BF).	73
Tabla 3-1:	Parámetros del análisis farmacocinético no compartimental	76
Tabla 3-2	Parámetros farmacocinéticos reportados para rutina a partir de distintas fuentes.	85
Tabla 3-3	Parámetros farmacocinéticos reportados para quercetina (libre o conjugada con sulfato y ácido glucurónido) a partir de la administración de rutina.	87
Tabla 3-4:	Dosis de extracto de <i>P. peruviana</i> y rutina administrada en ratas y conejos por vía i.v. y oral.....	89
Tabla 3-5:	Parámetros farmacocinéticos de rutina tras la administración i.v. del compuesto o del extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en ratas.....	99
Tabla 3-6:	Parámetros farmacocinéticos de quercetina tras la administración oral de rutina pura o del extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en ratas.	105
Tabla 3-7:	Parámetros poblacionales de rutina administrada por vía i.v. en forma pura o desde el extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en ratas.	111
Tabla 3-8:	Parámetros poblacionales de quercetina oral, proveniente de rutina pura o del extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en ratas.	116
Tabla 3-9:	Parámetros farmacocinéticos de rutina tras la administración i.v. del compuesto o del extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en conejos.	121
Tabla 3-10:	Parámetros farmacocinéticos de rutina y quercetina tras la administración oral de rutina pura o del extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en conejos.....	125
Tabla 3-11:	Parámetros poblacionales de rutina administrada por vía i.v. en forma pura o desde el extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en conejos.	129
Tabla 3-12:	Parámetros poblacionales de quercetina oral, proveniente de rutina pura o del extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en ratas.	132
Tabla 3-13	Aclaramiento (Cl) y volumen de distribución en estado estacionario (V_{dss}) de rutina pura y en el extracto de cálices de <i>P. peruviana</i> en humanos.	137

Introducción

Physalis peruviana es una planta de la familia Solanaceae de amplia distribución en áreas tropicales y subtropicales de Latinoamérica, conocida popularmente en Colombia y Brasil como “uchuva” y “fisalis”, respectivamente. El fruto comestible de *P. peruviana*, que en la planta se encuentra encerrado en cálices, ha sido usado tradicionalmente con fines medicinales (Lorenzi & Matus, 2008; Ramírez et al., 2010).

Investigadores de los grupos Tecnología de productos naturales (Tecprona) y Sistemas de liberación controlada de moléculas biológicamente activas (Silicomoba) de la Universidad Nacional de Colombia, estandarizaron las condiciones para la obtención de un extracto hidroalcohólico de cálices de *P. peruviana* (Maria Isabel Cardona et al., 2017; Toro et al., 2014) y demostraron su actividad antioxidante, antiinflamatoria (Toro et al., 2014) e hipoglicemiante (Echeverry et al., 2018). Como resultado de un fraccionamiento bioguiado, se identificó a quercetin-3-O-rutinosido (rutina) como el flavonoide mayoritario de este extracto (Cardona et al., 2017; Toro Arango, 2014; Toro et al., 2014).

Rutina es un flavonoide glicosilado de amplio interés terapéutico debido a la demostración de sus efectos como antidiabético, hepatoprotector, neuroprotector, cardioprotector, antiinflamatorio y antimicrobiano (Chua, 2013; Enogieru et al., 2018; Ganeshpurkar & Saluja, 2017; Ghorbani, 2017; Gullón et al., 2017); pero de baja biodisponibilidad por a su escasa solubilidad acuosa (Gullón et al., 2017) y su metabolismo a nivel intestinal en donde es convertida en quercetina (su aglicona) entre otros metabolitos (Luca et al., 2019).

La presencia de rutina, junto con otros compuestos reportados en los cálices de *P. peruviana* (Franco et al., 2014; Ramadan, 2019; Toro et al., 2014) y la actividad farmacológica demostrada, hacen de este extracto una fuente promisoría de nuevos productos fitoterapéuticos, que es además sostenible, ya que los cálices son un subproducto de la cosecha del fruto.

En la mayoría de los países, la aprobación para la comercialización de fitoterapéuticos no exige la realización de estudios preclínicos ni clínicos, sino que la evaluación de su eficacia y seguridad se hace con base en la evidencia disponible en la literatura y la dada por el propio tiempo de uso tradicional en la población. Sin embargo, cuando no existe esta evidencia, los estudios preclínicos, en al menos dos especies animales y los estudios clínicos, son obligatorios a la luz de la reglamentación nacional e internacional, esto incluye los de tipo farmacocinético (OMS, 2019).

Adicionalmente, la evidencia de la literatura indica que la mezcla compleja de compuestos en un extracto vegetal puede tener efecto sobre la farmacocinética de sus componentes individuales, por interacciones a distintos niveles (Domínguez Moré et al., 2017). En el caso concreto de rutina este efecto de la matriz ha sido confirmado en distintos extractos y formulaciones poliherbales (Guan et al., 2014; Kammalla et al., 2014; H.-B. Zhang et al., 2013).

Para aportar a la caracterización preclínica del extracto hidroalcohólico de cálices de *P. peruviana* y evaluar si la matriz tiene efecto sobre biodisponibilidad del compuesto marcador, se planteó un proyecto de investigación con la siguiente hipótesis: existe diferencia entre la farmacocinética de rutina pura, determinada en ratas y conejos, con la que presente en el extracto hidroalcohólico de cálices de *P. Peruviana*, administrado en las mismas condiciones.

A partir de esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos de investigación:

Objetivo General

Estudiar el comportamiento farmacocinético de quercetina-3-O-rutinosido, a partir de un extracto estandarizado de cálices de *Physalis peruviana* en dos modelos animales.

Objetivos Específicos

- Desarrollar y validar metodologías analíticas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-UV) para la cuantificación de quercetina-3-O-rutinosido y/o su metabolito principal desde distintas matrices biológicas y no biológicas.

- Estudiar el mecanismo de permeación intestinal de quercetina-3-O-rutinosido y/o sus metabolitos principales a partir del extracto estandarizado de cálices de *P. peruviana*.
- Determinar los parámetros farmacocinéticos que describen el curso de quercetina-3-O-rutinosido, y/o su metabolito principal tras la administración de un extracto estandarizado de cálices de *P. peruviana* en ratas y conejos.
- Determinar el efecto de los demás componentes del extracto estandarizado de cálices de *P. peruviana* sobre la farmacocinética de quercetina-3-O-rutinosido en ratas y conejos.

La investigación que llevó al cumplimiento de estos objetivos se desarrolló en tres partes, cada una correspondiente a un capítulo dentro del texto, como se ilustra en la siguiente figura:

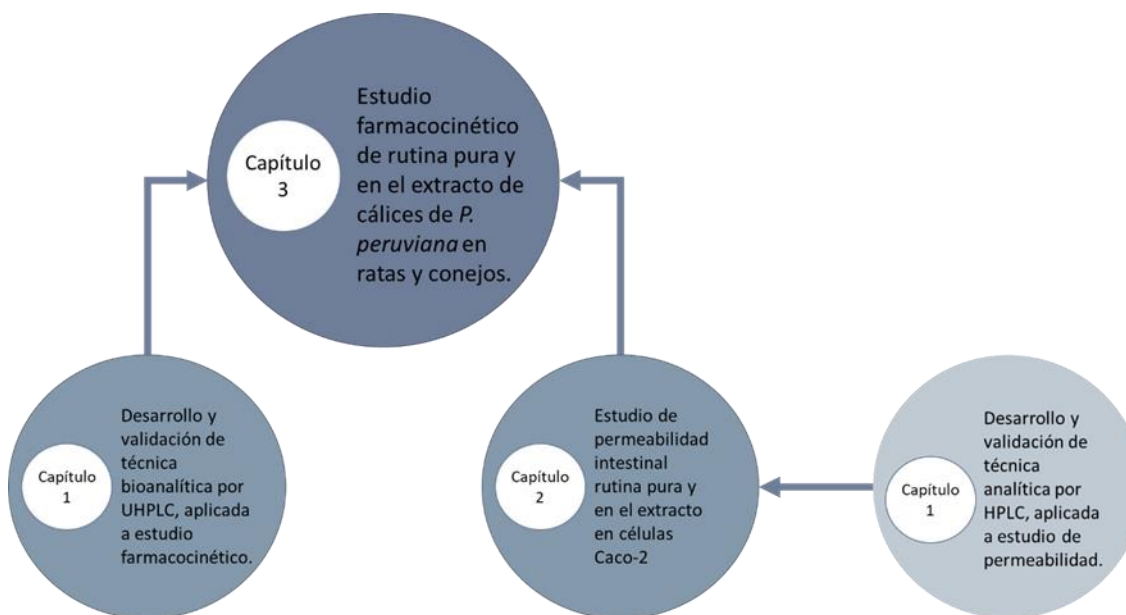


Figura I-1: Esquema de las fases de la investigación y división de capítulos en el documento.

En el capítulo 1 se describe el desarrollo y validación de las metodologías analíticas por cromatografía líquida de alto o ultra alto rendimiento (HPLC/UHPLC), con detección ultravioleta-visible, aplicadas en los estudios posteriores para la cuantificación de rutina y sus metabolitos (quercetina y conjugados glucurónido y sulfato).

En el capítulo 2 se describe la permeabilidad intestinal de rutina en el modelo de células Caco-2, a partir del compuesto puro, del extracto de cálices de *P. peruviana* y de una fracción butanólica derivada de éste; analizando el efecto de la matriz vegetal por comparación de los coeficientes de permeabilidad aparente (Papp) obtenidos en cada caso.

En el capítulo 3 se presenta el estudio farmacocinético de rutina, tras la administración por vía oral e intravenosa del extracto vegetal y el compuesto puro, en ratas y conejos y se proponen modelos poblacionales para describir el comportamiento farmacocinético del marcador desde las distintas fuentes.

Los resultados de esta investigación aportan tanto al entendimiento de los mecanismos responsables de la actividad farmacológica observada en el extracto de cálices de *P. peruviana* como al de los factores que pueden modular la biodisponibilidad de los flavonoides. Esta información resulta ser de gran utilidad a nivel preclínico para continuar el desarrollo de formulaciones a base del extracto hidroalcohólico de cálices de *P. peruviana*, con fines terapéuticos. Además, los protocolos analíticos y de experimentación animal derivados de este trabajo, servirán para continuar desarrollando investigaciones sobre la farmacocinética de extractos y productos fitoterapéuticos en el grupo Silicomoba.

1. Desarrollo y validación de metodologías analíticas por cromatografía líquida de alta y ultra alta eficiencia (HPLC/UHPLC-UV) para la cuantificación de quercetina-3-O-rutinosido y quercetina desde distintas matrices biológicas y no biológicas

1.1 Aspectos teóricos

1.1.1 Características fisicoquímicas de rutina y quercetina

Rutina (quercetina-3-O-rutinosido) es un flavonoide perteneciente a la clase de las glicosil-oxiflavonas, cuya hidrólisis lleva a la formación del flavonol quercetina y del disacárido rutinosa (Figura 1-1) (Jun Wang et al., 2011). Rutina y quercetina son ácidos débiles que presentan baja solubilidad en agua y pKa cercano a 6 (primera disociación). La Tabla 1-1 resume algunas de las características fisicoquímicas reportadas para estos compuestos.

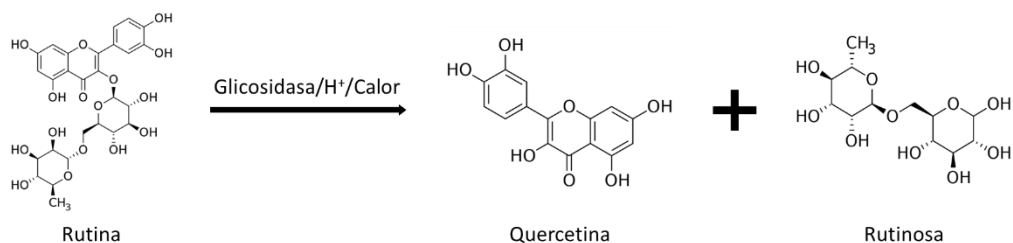


Figura 1-1: Hidrólisis de rutina en quercetina y rutinosa.

La hidrólisis puede ser catalizada por enzimas, ácidos o calor (Cardona, 2014; Jun Wang et al., 2011). Elaborado en chemicalize.com (11-10-2019).

Tabla 1-1: Características fisicoquímicas de rutina y quercetina.

Característica	Rutina	Quercetina
Masa molar (g/mol)	610.521 ¹	302.238 ⁴
pKa	6.37 ¹	6.38 ⁴
logP	-0.87 ¹	2.16 ⁴
Solubilidad (g/L)	Agua	0.13 ²
	Metanol	55 ²
	Acetonitrilo ³	0.30
	(50°C)	1.69

¹ Chemicalize rutin, (consultado 11-10-2019). ² (Gullón et al., 2017). ³ (Chebil et al., 2007). ⁴ Chemicalize quercetin, (consultado 11-10-2019). ⁵ (Srinivas et al., 2010). ⁶ (Razmara et al., 2010)

De acuerdo con información bibliográfica, rutina es térmicamente estable a temperatura de hasta 50°C. A partir de 70°C se ha reportado degradación térmica de este flavonoide, siendo identificados como subproductos, entre otros, los siguientes compuestos: quercetina, quercetina-glucosa, ácido protocatéquico y dímeros de rutina (Chaaban et al., 2017). En cuanto al efecto del pH sobre la estabilidad de rutina, Friedman & Jürgens (2000) demostraron que ésta permanece inalterada tras la exposición a pH en rango de 6.4 a 11, a temperatura ambiente y por al menos 72 horas. Experimentos del grupo Tecprona encontraron que en presencia de ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido de sodio (NaOH) 0.01 N, rutina puede degradarse hasta un 46% en 2 h, incluso a temperatura ambiente (25°C) (Cardona, 2014). Los ácidos sulfúrico (H₂SO₄, 0.5%) y fosfórico (H₃PO₄, 2.5%) también han demostrado ser catalizadores de la hidrólisis de rutina a 70°C (Jun Wang et al., 2011). A pH 5.0, rutina ha mostrado estabilidad en el tiempo (al menos 5 horas), inclusive a temperaturas superiores a los 70°C, es decir, que un medio ligeramente ácido tiene efecto protector del compuesto frente a la degradación térmica (Buchner et al., 2006).

Por su parte, quercetina es altamente sensible a la temperatura, encontrándose productos de degradación desde los 35°C, los cuales corresponden principalmente a benzofuranonas, resultado de reacciones de oxidación (Chaaban et al., 2017). Al igual que ocurre con rutina, la degradación térmica de quercetina disminuye en medio ácido (Buchner et al., 2006), mientras que en medio básico, la aglicona está sujeta a procesos de auto-oxidación, independientemente de la temperatura (Jurasekova et al., 2014; Jing Wang & Zhao, 2016); de hecho, se ha reportado que la velocidad de degradación de

quercetina a 37°C aumenta hasta 12 veces cuando se cambia el pH de 6.0 a 7.5 (Jing Wang & Zhao, 2016).

1.1.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) es una técnica de separación basada en procesos de partición, adsorción o intercambio iónico de analitos entre una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida a altas presiones. De acuerdo a la naturaleza de las fases se distingue entre HPLC normal (fase móvil apolar y fase estacionaria polar) y de fase reversa (fase móvil polar y fase estacionaria apolar). Los sistemas cromatográficos para HPLC constan de una bomba para hacer pasar la fase móvil a través del sistema a una velocidad controlada, inyector para introducir volúmenes exactos de la muestra en el sistema, horno que mantiene o permite el ajuste de la temperatura de la columna a lo largo de la corrida, detector que registra las señales de los analitos separados, las cuales usualmente están relacionadas a su concentración en el efluente; y un sistema para la recolección y transformación de datos (USP, 2019). Las condiciones en que se ajusten cada uno de estos componentes, determinarán la aptitud del sistema cromatográfico para llevar a cabo las separaciones, y por ende, las cuantificaciones deseadas.

Parámetros como los platos teóricos (N), factor de simetría (A_s) y resolución (R_s), son indicadores de la aptitud del sistema HPLC y se calculan a partir de los cromatogramas, que son la representación gráfica de la respuesta del detector. Según la FDA, para considerar un método adecuado para un análisis particular, tales parámetros deben cumplir como mínimo las recomendaciones indicadas en la Tabla 1-2 (FDA/CDER, 1994).

Tabla 1-2: Parámetros de aptitud del sistema cromatográfico HPLC.

Parámetro	Definición	Recomendación ³
Número de platos teórico (N)	Medida de la eficiencia de la columna. Los platos teóricos son las unidades hipotéticas de la columna en donde ocurre la distribución del analito entre las dos fases hasta el equilibrio ¹ .	> 2000
Repetitividad de la inyección	Desviación estándar relativa porcentual (RSD) de al menos 5 inyecciones repetidas de una solución de referencia ² .	< 1%
Resolución (R _s)	Separación de dos componentes en una mezcla ² .	> 2
Factor de retención (κ)	Medida relativa del periodo en que los componentes de una muestra permanecen en la fase estacionaria con respecto a aquellos que no se retienen ¹ .	> 2
Factor de simetría (A _s)	Descriptor de la forma de un pico cromatográfico ¹ .	≤ 2

¹ (Agilent technologies, 2016). ² (USP, 2019). ³ (FDA/CDER, 1994).

La eficiencia es el parámetro que mejor define el desempeño de un método cromatográfico y viene determinada por la naturaleza del analito y por el conjunto de condiciones operativas del sistema (USP, 2019). Teniendo en cuenta lo anterior, el desarrollo de un método por HPLC debe llevar a la definición de las variables relacionadas en la Tabla 1-3.

Tabla 1-3: Condiciones de un método HPLC.

	Variable	Efecto sobre la eficiencia y desempeño general del sistema
Fase móvil	Relación de componentes	Altera el grado de retención de los compuestos en la fase estacionaria ¹ .
	pH	Altera la velocidad de disociación de compuestos ionizables, según su pKa ¹ .
	Fase ligada	Altera la selectividad del método ² .
	Longitud de la columna	Modifica el tiempo de análisis, la sensibilidad del método y la resolución entre señales. Columnas largas favorecen la eficiencia del método, pero aumentan el tiempo de análisis y por tanto, el consumo de solventes ³ .
Fase estacionaria	Diámetro interno de la columna	Modifica la sensibilidad del método, la capacidad de carga de muestra y el consumo de solventes. Pequeños diámetros internos mejoran la sensibilidad, pero disminuyen la capacidad de carga de la columna ³ .
	Tamaño de partícula	Modifica el tiempo de análisis y la resolución entre señales. Reducir el tamaño de partícula lleva a análisis más cortos y de gran eficiencia ³ .
	Tamaño de poro	Modifica el grado de retención de los compuestos en la fase estacionaria. Pequeños poros generan mayor área superficial de las partículas del relleno y por tanto una mejor retención de los analitos ² .
	Velocidad de flujo	Modifica el tiempo de análisis y la selectividad del método ³ . Aumentos en la velocidad de flujo de la fase móvil reducen el tiempo de análisis, aunque con posibles consecuencias negativas sobre la eficiencia de la separación ³ .
	Volumen de inyección	Altera la sensibilidad del método. A mayor volumen de muestra se reciben mayores señales del detector, sin embargo, si se supera la capacidad de carga de la columna se produce deformación de los picos, lo que puede afectar la eficiencia del método ³ .
	Temperatura de la columna	Altera el tiempo de análisis, la resolución entre señales y la selectividad del método. Aumentos en la temperatura de la columna, disminuyen la viscosidad de la fase móvil y permite utilizar flujos mayores para reducir el tiempo de análisis. Sin embargo, el efecto sobre la retención de los analitos es variable ^{2,3} .
	Configuración del detector	Altera la sensibilidad del método ² .

¹ (Heinisch & Rocca, 2004). ² (Corradini, 2016). ³ (Agilent technologies, 2016)

aparente en células Caco-2). Cabe resaltar que aunque existen otros reportes en la literatura con estos criterios, se referencian en la tabla los que se refieren exclusivamente a los analitos de interés, sin la presencia de otros estándares externos.

Tabla 1-4: Resumen de metodologías reportadas para la cuantificación de rutina y quercetina en plasma o HBSS.

Matriz	Tratamiento de la muestra	Técnica analítica	Componentes de la fase móvil	Fase estacionaria/ Dimensiones/ Temperatura	Referencia
Plasma de rata	Precipitación de proteínas con acetonitrilo.	HPLC-ESI-MS/QQQ ¹ .	Metanol, acetonitrilo, agua.	RP-C18, (250 mm × 4.6 mm, 5 µm). 30°C.	(Kammalla et al., 2014).
Plasma de rata	LLE con mezcla de acetona y dietiléter en combinación con precipitación de proteínas con metanol.	HPLC-UV-Vis.	Metanol, ácido fórmico 0.1%.	RP-C18, (250 mm × 4.6 mm, 5 µm). 35°C.	(Tang et al., 2009).
Plasma de rata	LLE con acetato de etilo	HPLC-ESI-MS/QQQ ¹ .	Acetonitrilo, ácido fórmico 0.1%.	RP-C18, (150 mm × 2.1 mm, 3.5 µm). 30°C.	(He et al., 2013).
Plasma de rata	Precipitación de proteínas con acetonitrilo.	HPLC-UV-Vis.	Metanol, ácido acético 0.5%.	RP-C18, (250 mm × 4.6 mm, 5 µm). 30°C.	(Ou-yang et al., 2013).
Plasma humano	LLE con acetona.	HPLC-UV-Vis.	Metanol, acetonitrilo, ácido acético 0.1%.	RP-C18, (150 mm × 4.6 mm, 5 µm). 25°C.	(Müller-Sepúlveda et al., 2016).
Plasma de rata	LLE con acetato de etilo.	UHPLC-ESI-MS/QQQ ¹ .	Metanol, ácido fórmico 0.1%.	RP-C18, (100 mm × 2.1 mm, 1.8 µm). 30°C.	(B. Bin Wei et al., 2017).
Plasma de perros beagles	Precipitación de proteínas con acetonitrilo.	HPLC-UV-Vis.	Metanol, ácido fórmico 0.2%.	RP-C18, (250 mm × 4.6 mm, 5 µm). 35°C.	(Wu et al., 2012).
HBSS	Dilución con metanol.	HPLC-UV-Vis.	Metanol, ácido acético 1%.	RP-C18, (250 mm × 4.6 mm, 5 µm). 55°C.	(Yuya Yang et al., 2014).
HBSS	LLE con acetato de etilo.	HPLC-UV-Vis.	Metanol, ácido fórmico 0.2%.	RP-C18, (250 mm × 3 mm, 5 µm). Temperatura ambiente.	(Rastogi & Jana, 2016).

¹-ESI-MS/QQQ: detector de masas triple cuadrupolo con ionización por *electrospray*.

Para la cuantificación de analitos en muestras biológicas se utilizan estándares internos (IS, por sus siglas en inglés) que se agregan a las muestras y calibradores en una

concentración conocida, con la finalidad de normalizar las pérdidas que puedan ocurrir durante su procesamiento. En estos casos, la variable que se utiliza como respuesta del detector es la relación entre la señal del analito y la del IS. Comúnmente se emplean como IS compuestos con características fisicoquímicas semejantes a las del analito de interés (FDA/CDER, 2019) aunque expertos sugieren ponderar también otros criterios de selección, tales como la variabilidad de la respuesta del IS y su estabilidad (Global CRO Council for Bioanalysis, 2011). Algunos ejemplos de IS utilizados por otros autores para la cuantificación de rutina y quercetina en plasma son: naringina (He et al., 2013), baicalina (B. Bin Wei et al., 2017), catequina (Müller-Sepúlveda et al., 2016) y kaempferol (Kammalla et al., 2014).

Otro aspecto a considerar para el análisis de muestras biológicas derivadas de estudios farmacocinéticos de extractos vegetales, es la presencia de productos de reacciones metabólicas de fase I y/o II. Cuando sea importante para la interpretación del comportamiento farmacocinético del marcador, la metodología de análisis debe permitir la cuantificación de estos metabolitos y aun cuando no sea de interés su medición, se debe asegurar que estos no generan interferencia analítica (FDA/CDER, 2018). Dado que los estándares de estos subproductos pueden no estar disponibles, es posible cuantificarlos indirectamente a través de su transformación en los compuestos originales de donde provienen. En el caso de rutina y quercetina, los metabolitos plenamente identificados y de mayor interés, son los conjugados sulfato y glucurónido de quercetina, entre ellos: quercetin-3-O-sulfato (Q3OS) y quercetin-3-O-glucurónido (Q3OG) (Andlauer et al., 2001; Graefe et al., 2001; Ou-yang et al., 2013; C. Y. Yang et al., 2005; Xiaofang Zhang et al., 2013). Las hidrólisis de estos compuestos mediante las enzimas β -glucuronidasa y arilsulfatasa, permiten la cuantificación indirecta de los conjugados como quercetina, de acuerdo a las reacciones presentadas en la Figura 1-2 (Dwivedi et al., 2018).

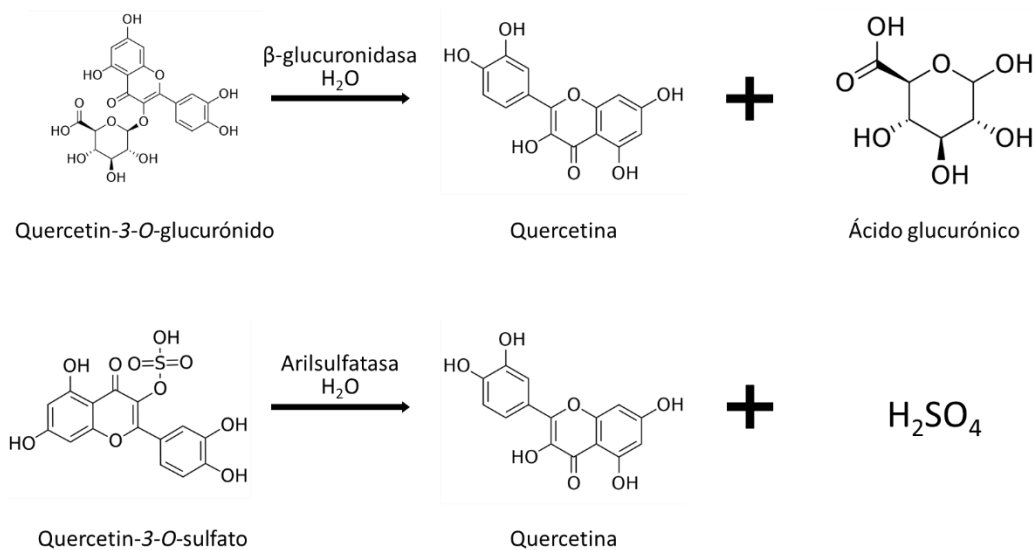


Figura 1-2: Reacción β -glucuronidasa/arilsulfatasa

1.1.4 Migración de HPLC a UHPLC

Una mejora de la tecnología HPLC es la conocida como UHPLC, se trata de aparatos para cromatografía líquida que soportan presiones máximas entre 9000 y 20000 psi, lo que ha permitido optimizar las características de las columnas cromatográficas para lograr separaciones más eficientes, en menos tiempo y con menor consumo de solventes y de muestra. Estas ventajas hacen a la técnica UHPLC especialmente útil para el análisis de muestras complejas (Dong & Zhang, 2014).

El desarrollo de un método por UHPLC debe igualmente considerar los aspectos indicados en la Tabla 1-3. Sin embargo, es usual que en esta etapa se tenga como referencia un método HPLC previamente establecido. El punto crítico en la migración de HPLC a UHPLC son las características de la columna, especialmente su geometría. En general, las columnas UHPLC tienen menor longitud, menor diámetro interno y un tamaño de partícula más pequeño que las usadas en HPLC. Estas diferencias condicionan otras variables del sistema como el flujo, el volumen de inyección y el gradiente de elución (si hubiere), las cuales deben ser ajustadas apropiadamente a UHPLC para obtener las ventajas de esta tecnología. Actualmente están disponibles distintas herramientas informáticas para la transferencia de las variables de un método de HPLC a UHPLC, el principio de esta

transferencia es mantener la relación entre cada variable y la geometría de la columna cromatográfica (Debrus et al., 2012).

1.1.5 Validación de metodologías analíticas y bioanalíticas

La validación de una metodología permite demostrar que es apta para el fin propuesto. El consejo internacional de armonización (ICH, por sus siglas en inglés) en su tópico Q2 (R1), sugiere las características que deben ser evaluadas para validar metodologías cuya finalidad sea la medición de la cantidad o concentración de un analito en una muestra dada. Estas características son:

- **Exactitud:** cercanía entre el contenido teórico del analito en una muestra y el encontrado tras la aplicación de la metodología en estudio. Se suele reportar como recuperación o porcentaje de error.
- **Precisión:** cercanía entre una serie de medidas obtenidas de la misma muestra. La ICH recomienda evaluar la precisión en dos niveles: repetitividad (también conocida como precisión intra-día) y precisión intermedia (también conocida como precisión inter-día). La primera se refiere a la evaluación de mediciones realizadas en las mismas condiciones operativas y en cortos periodos de tiempo. En contraste, la precisión intermedia se evalúa tras la aplicación de variaciones controladas de las condiciones (ejemplo: distintos días de ensayo). Se suele reportar como desviación estándar y coeficiente de variación.
- **Especificidad:** capacidad que tiene la metodología de identificar inequívocamente un analito en una muestra, en presencia de otros componentes.
- **Linealidad:** habilidad de obtener mediciones que son directamente proporcionales a la cantidad o concentración del analito en una muestra. Los indicadores de esta característica son: el coeficiente de correlación, intercepto y pendiente de la línea de regresión y la desviación entre los datos reales y la línea de regresión.
- **Rango:** intervalo de cantidad o concentración de analito para el cual se ha determinado la precisión, exactitud y linealidad. En general corresponde a los límites de la regresión lineal (ICH, 2005).

Cuando se trata de metodologías bioanalíticas, es decir las que tienen por finalidad la cuantificación de analitos presentes en una muestra biológica (sangre, plasma, tejido, etc),

los organismos de control han establecido guías específicas que adicionan otras características de validación y definen criterios de aceptación. Hasta febrero de 2020, no ha sido emitida oficialmente una guía de ICH sobre este tema, aunque un documento borrador puede ser consultado en la página oficial del comité (www.ich.org). Entretanto, una de las guías de referencia en Colombia para la validación de metodologías bioanalíticas es la propuesta por la FDA. Las características de validación incluidas en esta guía, adicionales a las ya descritas, son:

- **Selectividad:** especificidad frente a componentes endógenos de la matriz en la que se encuentra el analito y frente al IS.
- **Sensibilidad:** límite bajo de cuantificación (LLOQ, por sus siglas en inglés). Corresponde al nivel más bajo de la línea de regresión. La exactitud (% de error) y precisión (CV) de este límite deben ser del $\pm 20\%$.
- **Carryover:** arrastre de analitos entre corridas seguidas. No debe exceder el 20% del LLOQ.
- **Recuperación:** relación entre la concentración del analito en una muestra sometida a extracción y otra preparada en el sobrenadante o diluyente. La recuperación debe ser consistente y reproducible.
- **Estabilidad:** se debe demostrar la estabilidad química del analito en la matriz, bajo las condiciones de almacenamiento que se utilizarán en la operación normal del laboratorio, a corto y largo plazo. Además, se debe estudiar el efecto de ciclos de congelación y descongelación de las muestras previa a su extracción, la estabilidad de las soluciones madre de estándares analíticos y la de muestras ya extraídas almacenadas en condiciones especiales o en el automuestreador. La exactitud bajo cada condición debe ser $\pm 15\%$.
- **Dilución:** en el escenario que la concentración del analito en la muestra exceda el límite alto de la línea de regresión o límite alto de cuantificación (HLOQ, por sus siglas en inglés), es aceptable hacer diluciones con la matriz. Se debe comprobar que en estas condiciones la exactitud y precisión sean $\pm 15\%$ (FDA/CDER, 2018).

En general los parámetros de validación se determinan por análisis de muestras simuladas con concentraciones conocidas de los analitos en estudio, preparadas en un medio apropiado. En el caso de las metodologías bioanalíticas, tanto estándares y muestras simuladas (controles de calidad, QC por sus siglas en inglés) se preparan en la misma matriz que las experimentales, por ejemplo, plasma animal.

1.2 Metodología

A continuación se presentan los pasos seguidos para el desarrollo y validación de dos metodologías: 1) una metodología analítica por HPLC para la cuantificación de rutina, quercetina y propranolol en solución HBSS, con aplicación a los estudios de permeabilidad y 2) una metodología bioanalítica por UHPLC para la cuantificación de rutina y quercetina en plasma humano (usado como sustituto de plasma animal), de rata y de conejo, para los estudios farmacocinéticos. En ambos casos se definieron las condiciones para la cuantificación indirecta de conjugados glucurónico y sulfato, derivados del metabolismo biológico de rutina, a través de reacciones con las enzimas β -glucuronidasa/arilsulfatasa (Figura 1-3).

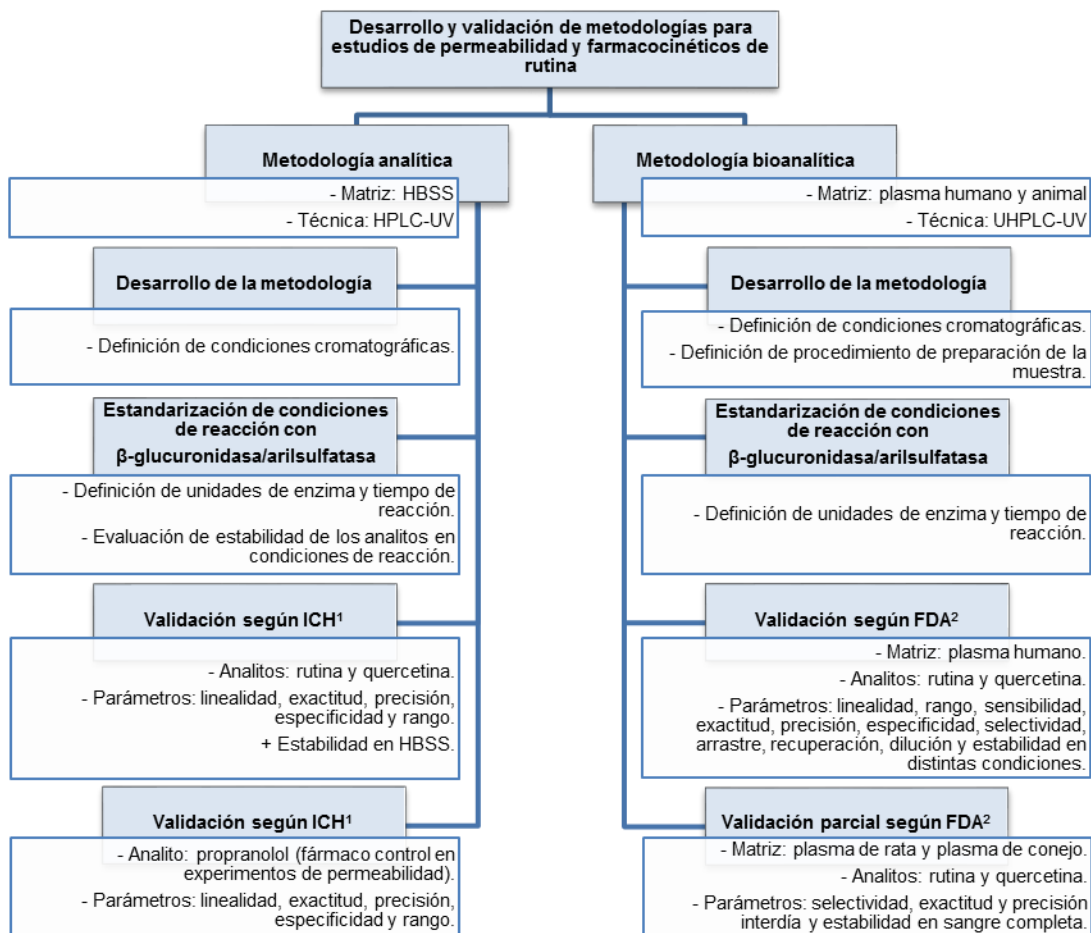


Figura 1-3: Resumen metodología capítulo 1.

¹ Guía de validación de procedimientos analíticos ICH (ICH, 2005). ² Guía de validación de métodos bioanalíticos FDA (FDA/CDER, 2018).

1.2.1 Materiales y reactivos

Los solventes acetonitrilo y metanol para HPLC y UHPLC, el ácido fórmico, el ácido acético y el dimetil sulfóxido (DMSO), fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania). Q3OG (98.1%), verapamilo (> 99%), crisina (99%) las enzimas β -glucuronidasa/arilsulfatasa y los reactivos para la preparación de la solución HBSS, fueron obtenidas de Sigma-Aldrich (Deishenhofen, Alemania). El agua fue purificada usando un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, EEUU). El plasma blanco fue obtenido de un banco de sangre (plasma humano) y de los animales de experimentación. Los demás reactivos fueron grado analítico.

1.2.2 Estándares de referencia

Los estándares analíticos de referencia utilizados fueron:

- Rutina trihidrato: lote BCBR0693V, 89.0% de rutina base y lote BCCC3902, 87.9% de rutina base (Sigma-Aldrich).
- Quercetina: lote LRAA3036, 91.6% y lote LRAB7760, 95.0% (Sigma-Aldrich).
- Propranolol: (99.9%) lote I1G348 y R031H0 (USP, Rockville, MD, EE.UU.).

1.2.3 Desarrollo y validación de metodología analítica por HPLC para cuantificación de rutina y quercetina en HBSS.

▪ Estandarización inicial de condiciones cromatográficas.

Teniendo en cuenta que uno de los objetivos de la presente investigación involucró la realización de estudios de permeabilidad aparente en el modelo Caco-2, en los cuales las muestras debían ser preparadas en HBSS; se desarrolló un método HPLC-UV para la cuantificación de rutina (componente mayoritario del extracto en estudio) y quercetina (metabolito de rutina), en este medio a pH 6.5 y 7.4. Para esto se utilizó el cromatógrafo líquido Chromaster RS® (Hitachi, Tokyo, Japan).

La química de la fase estacionaria se eligió con base en la revisión bibliográfica (Tabla 1-4) y se utilizó la siguiente columna: Luna® C18, 3 μ m, 75 x 4.6 mm, poro de 100 Å (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.).

El resto de condiciones operativas del sistema se establecieron a partir de la evaluación de los siguientes métodos de partida:

- Fase móvil método 1: Metanol – ácido fórmico 0.1%, en proporción 35:65. (Tang et al., 2009).
- Fase móvil método 2: Metanol – ácido acético 0.5%, en proporción 30:70. (Ou-yang et al., 2013).
- Fase móvil método 3: Acetonitrilo – ácido fórmico 0.1%, en proporción 15:85 (He et al., 2013).

En todos los casos, el flujo de partida fue de 1 mL/min, el volumen de inyección 10 μ L, el horno se ajustó a 30°C y el detector se programó para registrar señales en dos longitudes de onda (λ): 256 y 360 nm.

Las muestras utilizadas en la fase inicial del desarrollo del método consistieron en la mezcla de estándares de rutina y quercetina a concentración 10 μ M, preparadas en un diluyente, a partir de un stock de 2 mM en DMSO. El diluyente se estableció teniendo en cuenta las características de solubilidad de los compuestos (Tabla 1-1) y la compatibilidad de la mezcla fase móvil/muestra, entendida como la ausencia de cambios físicos como turbidez, precipitación e inmiscibilidad entre fases, tras un periodo de reposo de 24 h en las condiciones de trabajo habituales.

Con estas primeras muestras se realizaron ajustes sobre la proporción de solventes, gradiente, flujo, temperatura y longitud de onda de cada uno de los métodos de partida, para optimizar la respuesta de los parámetros de aptitud del sistema. En un paso posterior se prepararon mezclas de los estándares a concentración 0.1 μ M y se midió la relación S/R con respecto al diluyente. Se eligió para ensayos posteriores, el método ajustado para el cual, las señales de los analitos, cumplieran los requisitos de aptitud del sistema de la FDA (Tabla 1-2) con la mejor relación S/R.

▪ **Preparación de muestras en HBSS y ajustes finales de las condiciones cromatográficas.**

Los ajustes finales del método se realizaron ensayando mezclas de los estándares a concentración 0.5 y 5.0 μ M, preparadas en HBSS pH 7.4 a partir del stock de 2 mM (DMSO). Las muestras simuladas (200 μ L) fueron acidificadas inmediatamente hasta pH 4 con ácido fórmico (0.5 μ L, 85%) y diluidas con metanol en relación 1:1. Se aplicó vortex

por 2 min y centrifugación a 20.000 xg y 4°C durante 15 min (Megafuge 8R®, Thermo Scientific, Waltham, MA, EEUU). El sobrenadante fue filtrado a través de membranas PTFE de 0.22 µm e inyectado en el sistema HPLC.

El método ajustado se ensayó con muestras conteniendo rutina, quercetina, Q3OG (metabolito conjugado proveniente de rutina), verapamilo (compuesto utilizado como inhibidor de transportadores en estudios de permeabilidad) y propranolol (compuesto utilizado como control de alta permeabilidad). Las condiciones finales se establecieron teniendo en cuenta los requisitos de aptitud antes mencionados y la especificidad en la detección de los analitos de interés.

▪ **Estandarización reacción con β-glucuronidasa/arilsulfatasa.**

Debido a la no disponibilidad de estándares analíticos comerciales de los conjugados glucurónico y sulfato derivados de rutina, se utilizaron las enzimas β-glucuronidasa y arilsulfatasa, que hidrolizan estos metabolitos para cuantificarlos indirectamente en forma de sus compuestos precursores.

Para la estandarización de las condiciones de reacción, se prepararon soluciones estándar de Q3OG en HBSS pH 7.4 a concentración 10 µM, las cuales fueron sometidas a reacción con la mezcla de enzimas. De acuerdo al protocolo sugerido por el fabricante¹, se requerían 58500 unidades Fishman (en función de β-glucuronidasa) y 16 h de incubación a 37°C para hidrolizar la totalidad de los conjugados glucurónico y sulfato presentes en una muestra de 10 mL de orina. Tomando como referencia esta información, se utilizaron 1170 unidades para la reacción en un volumen de 200 µL y un tiempo de incubación inicial, en baño de maría, de 2 h. El pH de las muestras se ajustó a 5.5 con ácido acético (1%) y se utilizaron 10 µL de una solución tampón de acetato de sodio 1 M para mantenerlo. Tras la reacción, las muestras fueron tratadas con ácido fórmico hasta pH 4 y procesadas normalmente. Se realizaron varios experimentos a fin de disminuir las unidades y tiempo de incubación, haciendo seguimiento a la hidrólisis del glucurónico por observación de la señal del conjugado y de quercetina en el cromatograma.

¹ Disponible en <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/bgalaro?lang=en®ion=CO>. Consultado, 19 de septiembre de 2017.

Finalmente, se evaluó la estabilidad de los analitos bajo las condiciones de reacción definidas. Para esto se utilizaron soluciones estándar de rutina y quercetina de concentración 0.5 y 5.0 μM en HBSS pH 7.4, las cuales fueron ajustadas a pH 5.5 y mantenidas en incubación a 37°C por el tiempo de reacción estandarizado. Tras este tratamiento, se determinó la recuperación de los analitos respecto a la concentración de soluciones estándar recién preparadas.

▪ **Validación de la metodología.**

La metodología desarrollada se validó para la cuantificación de rutina y quercetina, evaluando las características sugeridas por la ICH para el fin propuesto: linealidad, exactitud, precisión, especificidad y rango (ICH, 2005).

La linealidad se determinó a partir del análisis de regresión a curvas de calibración de al menos 5 niveles de concentración, en el rango de 0.1 a 10 μM . Los distintos niveles se prepararon por dilución del stock de 2 mM (DMSO) de cada analito, en HBSS pH 6.5 y/o pH 7.4. Se estableció como rango los límites de cada línea de regresión, siendo LLOQ el menor nivel de concentración con exactitud y precisión dentro de $\pm 20\%$. El límite de detección (LOD, por sus siglas en inglés) se estimó con base en la relación S/R de 3:1 (ICH, 2005).

La exactitud y la precisión se establecieron por evaluación del porcentaje de recuperación y CV de muestras independientes a las de las curvas de calibración, preparadas a 3 concentraciones, cubriendo el rango definido individualmente para cada analito, bajo condiciones de repetitividad (3 concentraciones / 3 réplicas por concentración, un día) y de precisión intermedia (3 concentraciones / 3 réplicas por concentración, tres días) (ICH, 2005).

Adicionalmente se evaluó la estabilidad de los analitos en las condiciones del ensayo de permeabilidad, sometiendo estándares de rutina y quercetina de concentración 0.5 y 5 μM preparados con HBSS pH 7.4, a calentamiento por 2 h a 37°C, con muestreos a los 5 minutos y luego cada 30 minutos.

Finalmente, la misma metodología fue validada para la cuantificación de propranolol en HBSS pH 7.4, para esto se prepararon curvas de calibración en el rango de 0.25 a 25 μM

a partir de un stock de 100 mM (DMSO), con controles de exactitud y precisión de 0.25, 2.5 y 25 μ M. En este caso no fue necesario el tratamiento de las muestras con ácido fórmico.

1.2.4 Desarrollo y validación de metodología analítica por UHPLC para cuantificación de rutina y quercetina en plasma.

▪ Condiciones cromatográficas.

Teniendo en cuenta que el objetivo principal de la presente tesis involucra el estudio farmacocinético de rutina, mediante el seguimiento de sus concentraciones en plasma de ratas y conejos, fue necesario establecer una metodología bioanalítica para la cuantificación de este compuesto y del principal metabolito esperado (quercetina) en esta matriz.

Dadas las limitaciones en cuanto al volumen de muestra, ya que se obtendrían cerca de 100 μ L de plasma en cada toma, se decidió utilizar la técnica UHPLC con una columna Kinetex® EVO C18, 2.6 μ m, 100 x 2.1 mm (Phenomenex). Las condiciones cromatográficas iniciales ensayadas, fueron las establecidas para el caso anterior con la correspondiente transformación de HPLC a UHPLC realizada con la herramienta HPLC Method Transfer Calculator (Sigma-Aldrich) y utilizando como solución inicial de prueba una mezcla de rutina y quercetina de 5000 ng/mL preparada en el diluyente previamente seleccionado. Adicionalmente se ensayaron varios compuestos como IS: luteolina, isoorientina, crisina y propilparabeno. A partir de las condiciones iniciales se modificó la proporción de fase móvil, flujo y volumen de inyección hasta obtener la mayor sensibilidad y en general el mejor desempeño de los parámetros de aptitud evaluados.

▪ Selección de método para preparación de muestras.

Se prepararon muestras simuladas utilizando plasma humano limpio (100 μ L), adicionado con 10 μ L de solución estándar de rutina y quercetina en diluyente a concentración adecuada para producir muestras plasmáticas de 100, 1000 y 10000 ng/mL, conteniendo el IS en concentración 1000 ng/mL, una vez preparadas las muestras fueron inmediatamente acidificadas hasta pH 4 con ácido fórmico (42.5%).

Con base en la revisión bibliográfica se ensayaron por triplicado los siguientes métodos de extracción:

- a. Precipitación de proteínas con metanol en relación 1:2 (muestra:solvente), seguido de centrifugación a 12000 xg y 4°C durante 15 min.
- b. LLE con acetato de etilo en relación 1:5 (muestra:solvente), agitación en vortex por 2 min, seguido de centrifugación por 10 min a 6000 xg, 4°C, separación de fase orgánica y repetición del procedimiento en el residuo acuoso. Las dos fases orgánicas se mezclaron y se llevaron a evaporación a presión reducida hasta sequedad, sin temperatura, en un concentrador (Savan ® Speedvac SPD131, Thermo Scientific). El residuo fue resuspendido en 100 µL del diluyente previamente establecido.
- c. Combinación de los métodos a y b sucesivamente. El método b, se aplicó, una sola vez, sobre el residuo de proteínas de a. Los dos sobrenadantes se juntaron para su evaporación y resuspensión en diluyente.

Tras la extracción, las muestras fueron filtradas a través de membranas PTFE de 0.22 µm e inyectadas en el sistema UHPLC.

Para cada método se calculó el porcentaje de recuperación (%R) por comparación de las señales de los analitos en las muestras extraídas, contra las obtenidas de muestras equivalentes preparadas en diluyente (sin extracción). Se seleccionó el método que presentó la mayor recuperación en los términos expuestos.

▪ **Estandarización reacción β-glucuronidasa/arilsulfatasa para muestras plasmáticas.**

La estandarización de la reacción con β-glucuronidasa/arilsulfatasa en plasma, se realizó a partir de las siguientes condiciones:

- Concentración de Q3OG: 10000 ng/mL.
- Unidades de enzima (en función de β-glucuronidasa): 10, 50, 120 unidades Fishman.
- Tiempo: 30, 45, 60 min.
- Temperatura: 37°C.

En todos los casos, el pH de las muestras simuladas fue ajustado a 5.5 previo a la reacción, por adición de acetato de sodio 1 M. Tras la incubación se regresó el pH a 4 con ácido fórmico y se aplicó el método de extracción seleccionado.

▪ **Validación de metodología analítica por UHPLC para cuantificación de rutina y quercetina en plasma.**

Una vez desarrollada la metodología, se realizó la validación siguiendo la guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA (FDA/CDER, 2018), utilizando como matriz plasma humano donado por un banco de sangre.

En este caso, se prepararon curvas de calibración con 8 niveles en el rango de concentraciones de 100 a 10000 ng/mL de rutina y quercetina. Todas las curvas incluyeron adicionalmente, el análisis de una muestra de plasma blanco y una muestra de plasma con IS (nivel 0). Se preparó una curva de calibración por cada una de las corridas de validación y de ensayo. Éstas fueron analizadas por regresión lineal con ponderación $1/x^2$ y en cada una se verificó que la concentración calculada, de al menos 6 niveles, estuviese dentro de $\pm 15\%$ la concentración teórica o $\pm 20\%$ en el caso del límite inferior del rango.

La exactitud y la precisión se establecieron por evaluación de series de muestras de control de calidad de 4 concentraciones con 5 réplicas por concentración, ensayadas en un día (intradía) o en 3 días (interdía). Las concentraciones evaluadas para este fin fueron 100 (LLOQ), 250 (control de calidad bajo, LQC), 5000 (control de calidad medio, MQC) y 10000 ng/mL (control de calidad alto, HQC). Se utilizó una curva de calibración fresca para calcular la concentración de los controles y se determinó el error relativo (%E) y el CV de cada nivel en las series. La exactitud y precisión se consideraron satisfechas si el %E y CV estaban dentro de $\pm 15\%$ o $\pm 20\%$ para el LLOQ.

Los niveles de las curvas y los controles de calidad se prepararon por adición al plasma de soluciones estándar de rutina, quercetina e IS, de la siguiente manera: se prepararon por separado soluciones madre de rutina y quercetina de 1 mg/mL en el diluyente previamente establecido y del IS, a la misma concentración, en DMSO. A partir de las soluciones madre se prepararon soluciones intermedias de rutina y quercetina de concentraciones: 100000, 50000, 25000, 10000, 7500, 5000, 2500 y 1000 ng/mL, conteniendo cada una 11000 ng/mL de IS. Finalmente, 100 μ L de plasma fueron enriquecidos con 10 μ L de la solución intermedia apropiada para producir el nivel deseado. Tras su preparación, las muestras simuladas fueron acidificadas a pH 4 con ácido fórmico (42.5%) y separadas en volúmenes de 50 μ L para su extracción. Las muestras de control de calidad fueron preparados de manera semejante, con soluciones madre de rutina y

quercetina diferentes a las utilizadas en las curvas de calibración y a las concentraciones finales indicadas anteriormente.

Otros parámetros de validación fueron evaluados como se indica en la Tabla 1-5.

Tabla 1-5: Metodología para establecer algunos parámetros de validación de la metodología bioanalítica.

Parámetro	Metodología	Criterio de aceptación¹
Selectividad	Se analizaron muestras de plasma de al menos 6 fuentes.	Los blancos no presentan interferencia en el tiempo de retención de los analitos. La respuesta del blanco en el tiempo de retención del IS es < 5% del promedio de la respuesta del mismo en los controles de calidad.
Especificidad	Se analizaron muestras de plasma blanco enriquecido con Q3OG, IS o con adición de β -glucuronidasa/arilsulfatasa en las unidades estandarizadas para la reacción.	No hay interferencia en el tiempo de retención de los analitos ni del IS.
Efecto de arrastre	Se analizó por inyección de plasma blanco, inmediatamente después del HQC, en todas las corridas de validación.	EL arrastre, es < 20% del LLOQ.
Sensibilidad	Se determinó por análisis de la señal del LLOQ en todas las corridas de validación.	La señal del LLOQ es al menos 5 veces mayor que la señal del nivel 0 en el tiempo de retención de los analitos. La exactitud y precisión del LLOQ está dentro de \pm 20%.
Recuperación	Se comparó por triplicado la señal de los analitos y el IS en controles LQC, MQC y HQC, contra las obtenidas de muestras equivalentes preparadas en el diluyente resultante de la extracción de plasma blanco.	La recuperación debe ser reproducible. La guía no establece criterio cuantitativo.
Efecto de dilución	Se prepararon controles de calidad con rutina y quercetina a concentración de 5 y 20 veces el HQC, las muestras fueron diluidas por el mismo factor con plasma blanco y se extrajeron normalmente.	Para cada factor de dilución, la exactitud y precisión de cinco réplicas está dentro de \pm 15%.

Tabla 1-5: (Continuación)

Parámetro		Metodología	Criterio de aceptación¹
Estabilidad automuestreador ²	en	Se analizaron controles extraídos y envasados en viales, tras su permanencia en el automuestreador por 24 h a 20°C.	Exactitud de $\pm 15\%$.
Estabilidad en condiciones de trabajo ²		Se evaluaron dos condiciones: a. Almacenamiento de los controles acidificados a pH 4, durante 2 h a 4°C. b. Ajuste de pH a 5.5 y calentamiento por 30 min a 37°C con adición de β -glucuronidasa/arilsulfatasa en las unidades estandarizadas para la reacción.	
Estabilidad post-procesamiento ²	post-	Se analizaron controles extraídos y envasados en viales, tras su almacenamiento a 4°C por 30 d.	
Estabilidad a largo plazo ²		Se analizaron controles de calidad acidificados a pH 4 y almacenados a -80°C por 30 d.	Exactitud de $\pm 15\%$.
Estabilidad frente a ciclos de congelación/descongelación ²		Se analizaron controles sometidos a 3 ciclos de congelación a -80°C por al menos 12 h y descongelación a 4°C por 2 h.	
Estabilidad de las soluciones madre		Las soluciones madre de rutina, quercetina e IS fueron almacenadas a 4°C por mínimo 30 d. Tras el periodo de almacenamiento se prepararon y cuantificaron los controles de calidad.	

Q3OG: quercetina-3-O-glucurónido; IS: estándar interno; LLOQ: límite bajo de cuantificación; LQC: control de calidad bajo, 250 ng/mL; MQC: control de calidad medio, 5000 ng/mL; HQC: control de calidad alto, 10000 ng/mL. ¹ Guía de validación de métodos bioanalíticos FDA (FDA/CDER, 2018). ² Los ensayos de estabilidad en plasma bajo las diferentes condiciones se realizaron en por triplicado con controles LQC y HQC.

▪ **Validación parcial de metodología analítica para cuantificación de rutina y quercetina en plasma de rata y conejo.**

Para asegurar la aptitud de la metodología validada para ser aplicada en muestras de plasma de rata y de conejo, se realizó una validación parcial en cada matriz, evaluando la selectividad, la exactitud y precisión y la estabilidad en sangre completa, como se indica a continuación:

- Selectividad: se analizaron muestras de plasma de al menos 6 ratas y 6 conejos.

- Exactitud y precisión: se ensayó la exactitud y precisión intradía, con controles preparados en cada una de las matrices animales, siguiendo la metodología indicada anteriormente.
- Estabilidad de rutina y quercetina en sangre animal completa: se prepararon controles de calidad LQC y HQC en sangre conejo. La sangre enriquecida se almacenó a 4°C por 1 h, se separó el plasma por centrifugación a 1500 xg y 4°C durante 15 min, se ajustó el pH a 4.0 y se extrajo normalmente.

▪ **Controles adicionales durante las corridas cromatográficas.**

Se aplicaron los siguientes controles al método durante las corridas de muestras de ensayo (Tabla 1-6):

Tabla 1-6: Controles a las corridas analíticas de los estudios farmacocinéticos.

Parámetro	Metodología	Criterio de aceptación
Exactitud de los controles de calidad.	Se preparó una curva de calibración y al menos dos réplicas de controles de calidad por cada corrida analítica del estudio farmacocinético, en las matrices apropiadas.	Al menos el 67% de los controles y el 50% por cada nivel presentan exactitud de $\pm 15\%$ ¹ .
Respuesta del IS	Se hizo seguimiento de la respuesta del IS en las corridas de validación y ensayo. La variabilidad se representó gráficamente.	Ninguno ² .

IS: estándar interno. ¹ Guía de validación de métodos bioanalíticos FDA (FDA/CDER, 2018). ² Guía para la evaluación de la respuesta del estándar interno durante bioanálisis cromatográfico (FDA/CDER, 2019).

1.3 Resultados y discusión

Se desarrollaron y validaron dos metodologías analíticas, una por HPLC para la cuantificación de rutina y quercetina en HBSS, medio utilizado en los estudios de permeabilidad aparente en Caco-2; y otra por UHPLC para la cuantificación de estos compuestos en plasma sanguíneo, que fue utilizada en los ensayos farmacocinéticos.

1.3.1 Desarrollo de metodología HPLC para cuantificación de rutina y quercetina en HBSS

Para el desarrollo de la primera metodología, las combinaciones de fase móvil ensayadas preliminarmente se seleccionaron con base en la revisión bibliográfica. En la Tabla 1-4 se puede observar que los solventes débiles utilizados por otros autores fueron soluciones acuosas con ácido fórmico o ácido acético y los solventes fuertes fueron metanol y acetonitrilo. Ante la necesidad de aplicar métodos en gradiente, en todos los casos ensayados se decidió acidificar el solvente fuerte para mantener el pH de la fase móvil al menos dos unidades por debajo del pKa de rutina y quercetina durante toda la corrida. Asimismo, se tomaron medidas para mantener en pH en las muestras o estándares cercano a 4, con el fin de evitar la ionización de los compuestos y protegerlos de su rápida oxidación (Buchner et al., 2006).

Previo al ensayo de las condiciones de fase móvil, se definió el diluyente en que serían preparados los estándares. En general se prefiere usar como diluyente, mezclas semejantes a la fase móvil o más débiles, para evitar la saturación de la columna (Rasmussen, Li, Dirk, & Jimidar, 2005). Sin embargo en este caso no fue posible seguir esa recomendación debido a las limitaciones de solubilidad de los compuestos en agua; entonces, tras la verificación de compatibilidad de la mezcla fase móvil/muestra, se consideraron dos diluyentes: 1) metanol:agua 50:50 y 2) acetonitrilo:agua en la misma proporción. El uso de acetonitrilo como componente del diluyente se descartó tras los primeros ensayos cromatográficos, por la aparición de ruido en la línea base y división del pico de rutina (Anexo A). En adelante se utilizó como solvente para la preparación de estándares metanol:agua 50:50.

Dadas las características del diluyente frente a las fases móviles de los métodos de partida propuestos en la metodología, el primer volumen de inyección empleado fue 10 μ L, el cual se fue aumentando de acuerdo a los resultados de las corridas preliminares. Al mismo tiempo se realizaron, cuando fue pertinente, ajustes en cuanto a gradiente de solventes y longitud de onda de cada método. Como resultado se obtuvo que la combinación de metanol acidificado y ácido fórmico en la fase móvil generó señales de rutina con $N < 2000$, en el mayor tiempo de corrida (Anexo A), por lo cual fue descartada. Con las dos combinaciones restantes (modificaciones de los métodos de partida 2 y 3), se consiguió estandarizar condiciones cromatográficas satisfactorias para los dos analitos, según los

criterios señalados en la Tabla 1-2. Sin embargo, la fase móvil conformada por metanol y ácido acético produjo una menor relación S/R (9.7 y 9.1 *versus* 14.8 y 13.6 para rutina y quercetina 0.1 μ M respectivamente, a 260 nm). Además, al evaluar esta condición con una mezcla de estándares conteniendo Q3OG (uno de los metabolitos esperados en las muestras de los estudios de permeabilidad y farmacocinéticos), se presentó poca resolución entre este compuesto y rutina (Anexo A). Teniendo en cuenta lo anterior, el desarrollo de la metodología se continuó utilizando la fase móvil conformada por ácido fórmico 0.1% y acetonitrilo con 0.1% del ácido.

Una vez elegido un método cromatográfico de referencia, se evaluó la respuesta de soluciones estándar de rutina y quercetina 0.5 y 5.0 μ M preparadas en HBSS pH 7.4, ajustadas a pH 4.0 y diluidas en metanol en proporción 1:1. Con estas soluciones se fijó la longitud de onda de trabajo a 260 nm por presentar la mejor relación S/R (30 y 14 a 260 nm vs 28 y 5 a 360 nm para rutina y quercetina 0.5 μ M respectivamente). Además, se ajustó la temperatura de la columna a 20°C para separar una interferencia cercana al tiempo de retención de rutina.

El paso final en el desarrollo del método fue verificar que las condiciones establecidas permitían la identificación específica de los analitos frente a otros compuestos que se esperarían en las muestras de ensayo tales como Q3OG, verapamilo y propranolol. La Figura 1-4, evidencia la especificidad del método desarrollado.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, las condiciones cromatográficas finales para la cuantificación de rutina y quercetina en HBSS fueron las siguientes:

- Fase estacionaria: columna Luna® C18, 3 μ m, 75 x 4.6 mm; 20°C.
- Fase móvil: ácido fórmico 0.1% (A'), ACN con 0.1% de ácido fórmico, en gradiente de 75% A' hasta los 3 min, 65% A' hasta los 12 min y 5 min para lavado y reequilibrio; 1 mL/min.
- Detección: UV, 260 nm.
- Volumen de inyección: 30 μ L.

Bajo estas condiciones los parámetros de aptitud del sistema para una solución estándar de rutina y quercetina 10 μ M en HBSS pH 7.4 fueron los detallados en la Tabla 1-7.

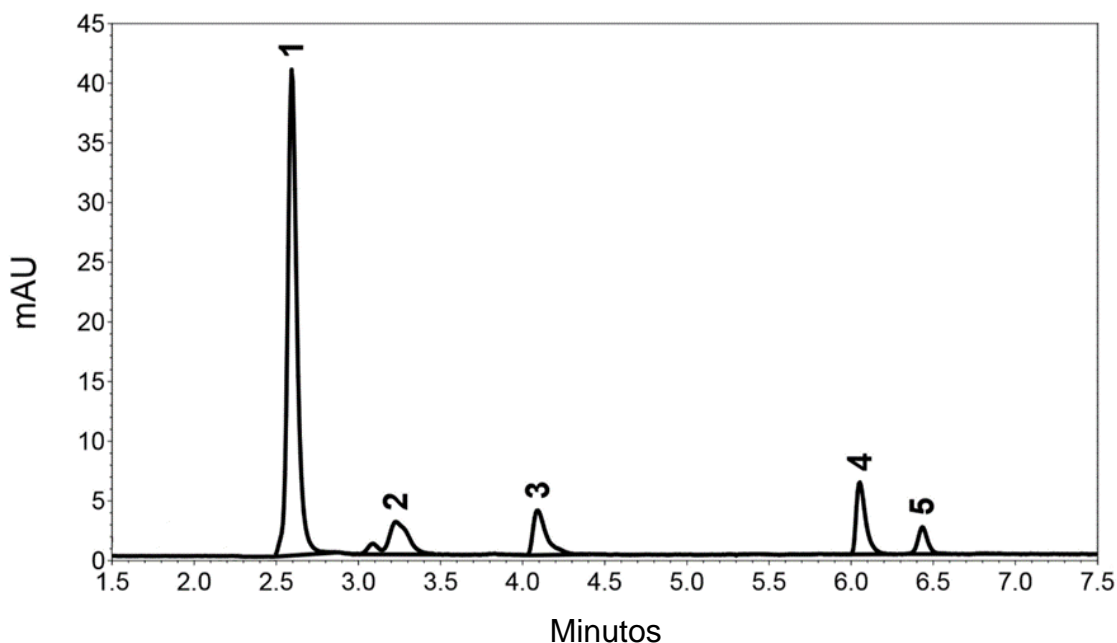


Figura 1-4: Especificidad del método cromatográfico desarrollado para la cuantificación de rutina y quercetina en HBSS.

Solución estándar (10 μL) preparada en HBSS pH 7.4 conteniendo rutina (10 μM , pico 1, 2.6 min), quercetin-3-O-glucurónico (1 μM , pico 2, 3.2 min), propranolol (25 μM , pico 3, 4.1 min), verapamilo (50 μM , pico 4, 6.1 min) y quercetina (2.5 μM , pico 5, 6.4 min). Columna Luna® C18, 3 μm , 75 x 4.6 mm a 20°C; fase móvil ácido fórmico 0.1% (A') y ACN con 0.1% de ácido fórmico, en gradiente de 75% a 65% de A', flujo 1 mL/min y 260 nm.

Tabla 1-7: Parámetros de aptitud del sistema del método HPLC desarrollado para la cuantificación de rutina y quercetina en HBSS pH 7.4.

Parámetro ¹	Rutina	Quercetina
N	≥ 8000	≥ 33000
Repetitividad de la inyección (%RSD)	≤ 0.5	≤ 0.4
R_s	n/a	≥ 22.0
κ	≥ 2.7	≥ 8.1
A_s	≤ 1.30	≤ 1.08

¹Parámetros calculados para 6 inyecciones de una solución de rutina y quercetina 10 μM en el diluyente. N: número de platos teóricos. R_s : resolución. κ : factor de retención. A_s : factor de asimetría.

▪ **Reacción β -glucuronidasa/arilsulfatasa.**

Bajo las condiciones de reacción tomadas como referencia se obtuvo la hidrólisis completa de Q3OG, evidenciada por la ausencia del conjugado y la aparición de quercetina en el cromatograma. Sin embargo, con las unidades utilizadas inicialmente (1170 unidades Fishman en función de β -glucuronidasa) se presentó una interferencia importante cercana al tiempo de retención de rutina. Las unidades de enzima lograron reducirse hasta 10 manteniendo la efectividad de la reacción tras el periodo de incubación de 2 h y eliminando la interferencia. Luego, este tiempo se redujo hasta 30 minutos con los mismos resultados (Figura 1-5).

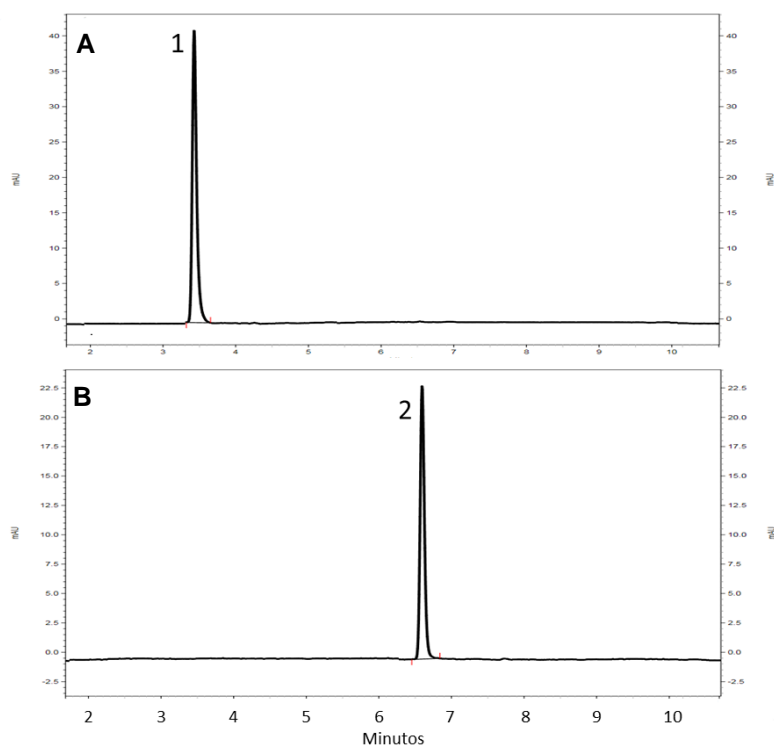


Figura 1-5: Resultado de la reacción con β -glucuronidasa/arilsulfatasa.

A: quercetin-3-O-glucurónido (Q3OG, 3.2 min) 10 μ M. **B:** Quercetina (6.4 min) resultado de reacción de Q3OG con el equivalente a 10 unidades Fishman de β -glucuronidasa, pH 5.5 e incubación a 37°C por 30 min. Nótese la ausencia de interferencia en el tiempo de retención de rutina (2.6 min). Columna Luna® C18, 3 μ m, 75 x 4.6 mm a 20°C; fase móvil ácido fórmico 0.1% (A') y ACN con 0.1% de ácido fórmico, en gradiente de 75% a 65% de A', flujo 1 mL/min y 260 nm.

Una vez establecidas las condiciones de reacción, se evaluó la estabilidad de los analitos en tales condiciones (pH 5.5 y calentamiento a 37°C por 30 min). Rutina y quercetina se

mostraron estables con porcentajes de recuperación > 95% (Tabla 1-8), lo cual es consistente con la observación de Buchner et al. (2006) sobre la protección de los flavonoides a pH ligeramente ácido.

Tabla 1-8: Estabilidad de rutina y quercetina en HBSS pH 7.4, bajo condiciones de reacción con β -glucuronidasa/arilsulfatasa.

Analito	Concentración inicial (μM)	Concentración final (μM) ¹	Recuperación (%)
Rutina	0.5	0.50 \pm 0.001	99.8
	5	4.78 \pm 0.024	95.6
Quercetina	0.5	0.49 \pm 0.014	98.6
	5	4.80 \pm 0.021	95.9

¹ Promedio \pm sd, n= 3.

▪ Validación de la metodología

El siguiente paso fue la validación de la metodología resumida en la Tabla 1-9, según los criterios de la ICH. La especificidad frente a Q3OG (metabolito endógeno) y otros compuestos utilizados en los ensayos de permeabilidad fue mostrada en la Figura 1-4, los resultados obtenidos para el resto de parámetros se presentan en la Tabla 1-10.

Tabla 1-9: Resumen metodología analítica para cuantificación de rutina y quercetina en HBSS.

Condiciones cromatográficas	
Método	HPLC-UV
Fase estacionaria	Columna Luna® C18, 3 μm , 75 x 4.6 mm; 20°C.
Fase móvil	Ácido fórmico 0.1% (A'), ACN con 0.1% de ácido fórmico, en gradiente de 75% A' hasta los 3 min, 65% A' hasta los 12 min y 5 min para lavado y reequilibrio; 1 mL/min.
Detección	UV, 260 nm.
Volumen de inyección	30 μL .
Preparación de la muestra	
Volumen 200 μL , ajuste a pH 4 con ácido fórmico (0.5 μL , 85%).	
Dilución en metanol en proporción 1:1, seguido de centrifugación a 20000 xg y 4°C durante 15 min.	
Condiciones de reacción con β-glucuronidasa/arilsulfatasa	
Ajuste a pH 5.5 con ácido acético (1%) y acetato de sodio (1M, 10 μL), 10 unidades Fishman de enzima en función de β -glucuronidasa, incubación a 37°C por 30 min.	

Tabla 1-10: Validación de metodología HPLC-UV para la cuantificación de rutina y quercetina en HBSS pH 7.4 y 6.5.

Compuesto /pH	Rango/ LLOQ/ LOD (μM)	Curva estándar /r	Concentración teórica (μM)	Precisión (%) ¹		Exactitud (%) ⁴
				Repetibilidad ²	Intermedia ³	
Rutina pH 7.4	0.1 – 10	y= 82798.3x+1767.5 0.9996	0.1	8.17	5.31	90.3
			1	2.29	2.65	104.9
			10	3.81	3.39	101.9
Rutina pH 6.5	0.004	0.9996	0.1	3.16	3.50	105.4
			1	3.76	1.88	103.9
			10	2.58	2.85	96.2
Quercetina pH 7.4	0.5 – 5	y= 18778.1x-6558.84 0.9972	0.5	3.17	2.56	107.3
			1	4.92	3.94	95.6
			5	1.36	3.99	104.9
Quercetina pH 6.5	0.25 – 10	y= 27427.5x-2752.29 0.9999	0.25	3.94	4.92	93.5
			1	4.86	3.72	95.5
			10	3.04	1.84	98.4

¹ n= 3 por cada concentración teórica. ² Coeficiente de variación (%) dentro de 1 d. ³ Coeficiente de variación (%) dentro de 3 d. ⁴ Recuperación (%) con respecto a la concentración teórica, n= 3 por concentración obtenidos en 3 d. r: coeficiente de correlación. LLOQ: límite bajo de cuantificación.

LOD: límite de detección.

De acuerdo con los resultados de la validación (Tabla 1-10), la exactitud y precisión del modelo estimado para rutina fue consistente, independientemente del pH de partida. Visto en comparación con los métodos HPLC-UV que han utilizado otros autores para un propósito similar, el LLOQ de rutina en el método desarrollado fue menor que el de Y. Yang *et al.* (2014) quienes aplicaron también dilución en metanol para el tratamiento de las muestras; y resultó comparable al del método de Rastogi & Jana (2016) que aplicaron procedimientos complejos de extracción.

Como ha sido mencionado, el pH fue un factor crítico en la precisión y exactitud del método, especialmente para quercetina que es susceptible de oxidación en medio básico (Jurasekova *et al.*, 2014; Jing Wang & Zhao, 2016). De hecho, quercetina mostró una menor respuesta analítica a pH 7.4, a pesar de la acidificación inmediata de las muestras durante su preparación; este comportamiento llevó a la necesidad de definir un modelo de regresión independiente para este compuesto en cada condición de pH. Se observó que otros autores que han realizado estudios de permeabilidad de quercetina en el modelo Caco-2, han validado el método cromatográfico a partir de estándares preparados en

solventes orgánicos sin considerar la influencia del medio o pH sobre la respuesta analítica (Rastogi & Jana, 2016; Tian et al., 2009; Yuya Yang et al., 2014).

La inestabilidad alcalina de quercetina también se evidenció bajo las condiciones de la prueba de permeabilidad (Tabla 1-11).

Tabla 1-11: Estabilidad de rutina y quercetina en HBSS pH 7.4 tras incubación a 37°C por 2 h.

		Tiempo en HBSS pH 7.4 a 37°C (min)					
		5	30	60	90	120	
RUTINA	0.5 µM	Concentración experimental µM	0.49	0.47	0.49	0.49	0.50
		SD	0.01	0.01	0.01	0.00	0.01
		Recuperación (%) ¹	98.9	94.1	97.4	98.9	99.3
	5.0 µM	Concentración experimental µM	4.97	5.08	5.00	4.97	5.29
		SD	0.12	0.15	0.15	0.11	0.13
		Recuperación (%) ¹	99.4	101.6	100.1	99.3	105.8
QUERCETINA	0.5 µM	Concentración experimental µM	0.49	n.d	n.d	n.d	n.d
		SD	0.00	-	-	-	-
		Recuperación (%) ¹	97.2	-	-	-	-
	5.0 µM	Concentración experimental µM	4.86	3.47	2.23	1.08	n.d
		SD	0.06	0.04	0.04	0.03	-
		Recuperación (%) ¹	97.1	69.4	44.7	21.7	-

¹ Recuperación respecto a la concentración teórica. n.d.: no detectado.

▪ **Validación metodología para cuantificación de propranolol en HBSS pH 7.4**

Durante el desarrollo del método, enfocado en la cuantificación de rutina y quercetina en HBSS, se comprobó su especificidad frente a propranolol (Figura 1-4), por lo cual se procedió a evaluar si el método era también apto para la cuantificación de las muestras provenientes de ensayos de permeabilidad de este fármaco, utilizado como control en los experimentos de transporte con Caco-2. De acuerdo a los resultados mostrados en la Tabla 1-12, la metodología, incluyendo la preparación de la muestra, se consideró exacta y precisa para la cuantificación de propranolol en HBSS pH 7.4. Esta sería otra ventaja frente a las metodologías reportadas en la literatura para cuantificación de rutina y

quercetina en estudios de permeabilidad en Caco-2 (Rastogi & Jana, 2016; Yuya Yang et al., 2014).

Tabla 1-12: Validación de metodología HPLC-UV aplicada a la cuantificación de propranolol en HBSS pH 7.4.

Rango (µM)	Curva estándar /r	Concentración teórica (µM)	Precisión (%) ¹		Exactitud (%) ⁴
			Repetibilidad ²	Intermedia ³	
0.25 – 25	y= 9520.81x - 737.25 0.9998	0.25	5.51	9.93	96.4
		2.5	4.93	4.47	102.9
		25	4.64	4.96	103.4

¹ n= 3 por cada concentración teórica. ² Coeficiente de variación (%) dentro de 1 d. ³ Coeficiente de variación (%) dentro de 3 d. ⁴ Recuperación (%) con respecto a la concentración teórica, n= 3 por concentración obtenidos en 3 d. r: coeficiente de correlación.

1.3.2 Desarrollo de metodología UHPLC para cuantificación de rutina y quercetina en plasma

La adaptación de la técnica desarrollada de HPLC a UHPLC, dio resultados aceptables para los analitos rutina y quercetina, aunque fue necesario realizar algunos cambios de gradiente para la inclusión del IS. Se ensayaron como IS compuestos relacionados a los analitos y uno no relacionado que había funcionado correctamente en experiencias propias y de otros autores (Šatínský et al., 2013; Sladkovský et al., 2001). Al respecto se obtuvo que luetolina no pudo ser completamente resuelto de quercetina bajo ninguno de los gradientes ensayados, la señal de isoorientina no logró estandarizarse a simetría < 2 y las respuestas de propilparabeno no representaron las pérdidas de los analitos de interés durante el procesamiento, por lo cual, en los ensayos preliminares, no se obtuvieron condiciones de exactitud y precisión dentro de los límites aceptables para bioanálisis (Anexo B). De acuerdo a lo anterior, se establecieron las siguientes condiciones cromatográficas para el uso de crisina como IS:

- Fase estacionaria: Kinetex® EVO C18, 2.6 µm, 100 x 2.1 mm; 30°C.
- Fase móvil: ácido fórmico 0.1% (A'), ACN con 0.1% de ácido fórmico, en gradiente de 85% A' hasta los 1.5 min, 75% A' hasta los 5 min, 65% A' hasta los 9.3 min y 5 minutos para lavado y reequilibrio; 0.5 mL/min.

- Detección: UV, 260 nm.
- Volumen de inyección: 6 μ L.
- Concentración final del IS: 1000 ng/mL.

Para favorecer la incorporación del IS seleccionado se definió como diluyente una mezcla metanol: agua 75:25. Los parámetros de aptitud del sistema del método desarrollado se exponen en la Tabla 1-13 y un cromatograma representativo de los estándares de interés preparados en el diluyente puede ser observado en la Figura 1-6.

Tabla 1-13: Parámetros de aptitud del sistema de método UHPLC desarrollado para la cuantificación de rutina y quercetina en plasma utilizando crisina como estándar interno.

Parámetro ¹	Rutina	Quercetina	Crisina
N	≥ 11000	≥ 30000	≥ 80000
Repetitividad de la inyección (%RSD)	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5
R _s	n/a	≥ 12.0	≥ 15.0
κ	≥ 8.0	≥ 15.0	≥ 25.0
A _s	≤ 1.2	≤ 1.4	≤ 1.2

¹Parámetros calculados para 6 inyecciones de una solución de rutina, quercetina y crisina 5000 ng/mL en el diluyente. N: número de platos teóricos. R_s: resolución. κ : factor de retención. A_s: factor de asimetría.

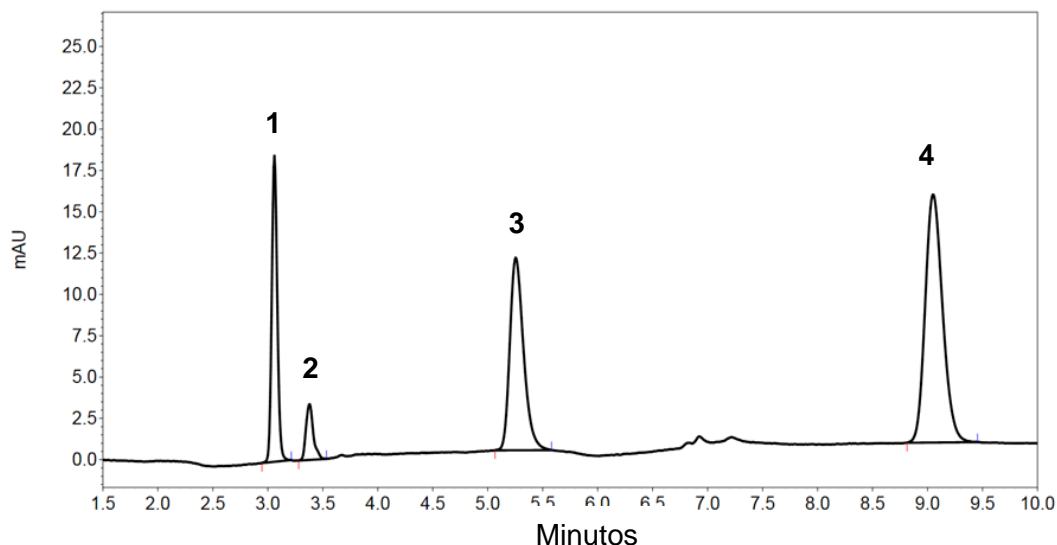


Figura 1-6: Cromatograma representativo método UHPLC. de rutina (5000 ng/mL, pico 1, 3.1 min), quercetina-3-O-glucurónido (1666 ng/mL, pico 2, 3.4 min), quercetina (5000 ng/mL, pico 3, 5.4 min) y crisina (5000 ng/mL, pico 4, 9.1) a partir de solución estándar preparada en diluyente metanol: agua 75:25. Columna Kinetex® EVO C18, 2,6 μ m, 100 x 2.1 mm a 30°C; fase móvil ácido fórmico 0.1% (A') y ACN con 0.1% de ácido fórmico, en gradiente de 85% a 65% de A', flujo 0.5 mL/min y 260 nm. Extracción con metanol 1:2.

El desarrollo de la metodología se continuó, mediante la evaluación de distintos métodos de extracción aplicados sobre muestras simuladas de concentración conocida de los analitos, preparadas en plasma humano. En todos los casos, las muestras recién preparadas fueron ajustadas a pH 4 con ácido fórmico. Los métodos de extracción que incluyeron LLE hicieron obligatoria la evaporación del solvente para resuspender la muestra en el diluyente previamente establecido, pero, aun cuando no se utilizó temperatura durante la concentración de las muestras en el *Speedvac*, la recuperación de quercetina fue $\leq 30.7\%$ y no se obtuvo señal de ninguno de los analitos a concentración 100 ng/mL. Considerando que el compuesto es susceptible de oxidación, se intentó la evaporación bajo corriente de nitrógeno como estrategia para mejorar su recuperación, pero esta práctica resultó inviable en las condiciones del laboratorio en términos de tiempo (hasta 5 h por ciclo de secado y máximo 10 muestras a la vez) y costo (hasta 3 m³ de nitrógeno por ciclo). Basado en lo anterior, el método seleccionado para la extracción de los analitos desde las muestras de plasma fue la precipitación de proteínas con metanol en proporción 1:2 (muestra: solvente), seguido de centrifugación a 12000 xg y 4°C durante

15 min. La recuperación de rutina y quercetina en estas condiciones se indica más adelante en la sección de validación.

En cuanto a las condiciones de la reacción para la hidrólisis de potenciales metabolitos glucurónidos y sulfatos en plasma, cuando se utilizaron 10 unidades Fishman de β -glucuronidasa, como había sido estandarizado para las muestras en HBSS, se observó la conversión parcial de Q3OG en quercetina (90.1%) tras 60 min de incubación a 37°C. Fueron necesarias 120 unidades de la enzima y 30 min de incubación para la hidrólisis completa del glucurónido control, en un volumen de 50 μ L de plasma adicionado con 10 μ L de acetato de sodio 1 M pH 5.5 (concentración Q3OG 10000 ng/mL), condiciones que fueron aplicadas para todos los ensayos posteriores.

▪ Validación de la metodología

Las características de la metodología que se sometió a validación se encuentran resumidas en la Tabla 1-14. Todos los resultados que se presentan a continuación corresponden a esta metodología.

Tabla 1-14: Metodología para la cuantificación de rutina y quercetina en plasma.

Condiciones cromatográficas	
Método	UHPLC-UV
Fase estacionaria	Columna Kinetex® EVO C18, 2.6 μ m, 100 x 2.1 mm; 30°C.
Fase móvil	Ácido fórmico 0.1% (A'), ACN con 0.1% de ácido fórmico, en gradiente de 85% A' hasta los 1.5 min, 75% A' hasta los 5 min, 65% A' hasta los 9.3 min y 5 minutos para lavado y reequilibrio; 0.5 mL/min.
Detección	UV, 260 nm.
Volumen de inyección	6 μ L.
Preparación de la muestra	
Volumen 100 μ L, ajuste a pH 4 con ácido fórmico (0.5 μ L, 42.5%).	
Adición de crisina (IS) a concentración final 1000 ng/mL	
Precipitación de proteínas con metanol en proporción 1:2 (muestra:solvente), seguido de centrifugación a 12000 xg y 4°C durante 15 min.	
Condiciones de reacción con β-glucuronidasa/arilsulfatasa	
120 unidades Fishman de enzima en función de β -glucuronidasa, incubación a 37°C por 30 min.	

La Figura 1-7 muestra un cromatograma representativo del plasma humano blanco (en presencia de β -glucuronidasa/arilsulfatasa), de plasma enriquecido con IS, con Q3OG y con rutina y quercetina 1000 ng/mL; se puede observar la ausencia de interferencias en el

tiempo de retención de los analitos, demostrándose la selectividad y especificidad del método. Tampoco se observó efecto de arrastre tras la inyección del HQC.

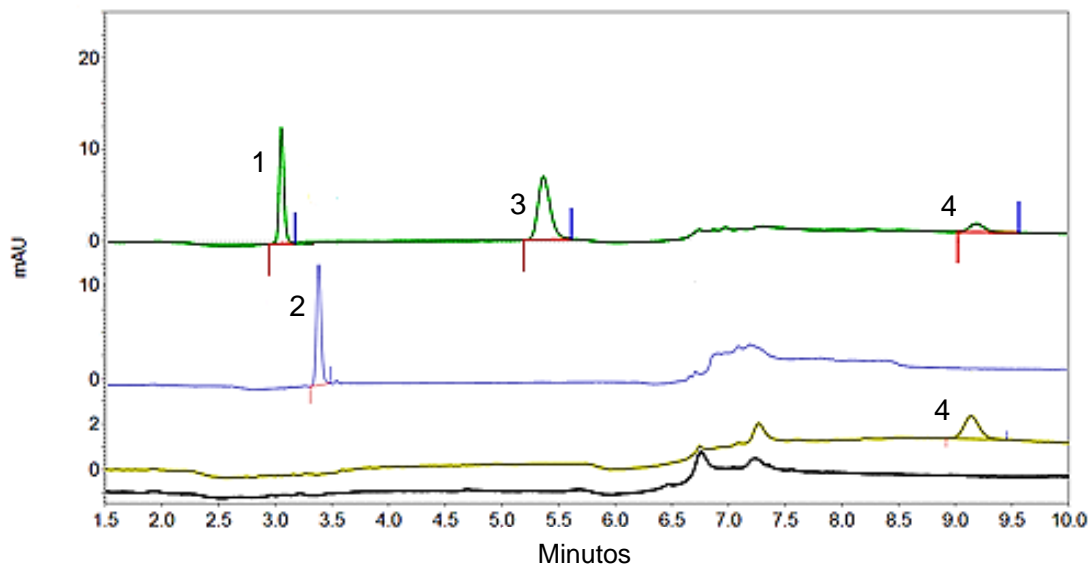


Figura 1-7: Selectividad y especificidad del método.

Cromatogramas representativos de plasma humano blanco (línea negra), plasma adicionado con crisina 1000 ng/mL (línea amarilla), plasma adicionado con quercetina-3-O-glucurónido (Q3OG) 1000 ng/mL (línea azul) y adicionado con rutina, quercetina y crisina 1000 ng/mL, línea verde). 1) Rutina, 3.1 min; 2) Q3OG, 3.4 min; 3) Quercetina, 5.4 min; 4) Crisina, 9.1 min. Columna Kinetex® EVO C18, 2,6 μ m, 100 x 2.1 mm a 30°C; fase móvil ácido fórmico 0.1% (A') y ACN con 0.1% de ácido fórmico, en gradiente de 85% a 65% de A', flujo 0.5 mL/min y 260 nm. Extracción con metanol 1:2.

El método desarrollado resultó ser lineal en el rango de concentración de 100 (LLOQ, sensibilidad) a 10000 ng/mL con $r^2 > 0.997$ y > 0.999 para rutina y quercetina respectivamente. La Tabla 1-15 resume todas las curvas de calibración obtenidas (de validación y de ensayos). En todos los casos las curvas cumplieron con el criterio indicado por la guía de la FDA con al menos 6 niveles de concentración dentro de $\pm 15\%$ el valor nominal o $\pm 20\%$ en el caso del LLOQ (FDA/CDER, 2018).

Tabla 1-15: Relación de curvas de calibración

Número	Rutina			Quercetina		
	a	b	r ²	a	b	r ²
1	0.00042	0.01671	0.99980	0.00055	-0.00170	0.99990
2	0.00043	0.01219	0.99920	0.00056	-0.01080	0.99940
3	0.00044	0.00360	0.99750	0.00059	-0.00651	0.99970
4	0.00045	0.00685	0.99970	0.00061	-0.00691	0.99990
5	0.00035	0.01549	0.99990	0.00054	0.00251	0.99960
6	0.00046	0.00664	0.99990	0.00058	-0.01159	0.99990
7	0.00038	0.00113	0.99990	0.00055	-0.01031	0.99980
8	0.00041	0.01432	0.99990	0.00051	-0.00283	0.99990
9	0.00039	0.01067	0.99990	0.00058	-0.01117	0.99990
10	0.00044	0.00689	0.99990	0.00055	-0.01482	0.99990
11	0.00043	0.00685	0.99970	0.00053	-0.00493	0.99990
12	0.00048	0.00782	0.99990	0.00064	-0.01294	0.99990

a: pendiente, b: intercepto, r²: coeficiente de determinación lineal.

También se demostró la exactitud y precisión en el rango de cuantificación, para los tres tipos de plasma utilizados (humano, de rata y de conejo), con los porcentajes de recuperación y coeficientes de variación detallados en la Tabla 1-16. De acuerdo a la literatura, el plasma humano es más rico en proteínas y lipoproteínas que el de las otras especies (Davies & Morris, 1993; Morris & Courtice, 1955), por lo cual el procedimiento aplicado para la extracción de los analitos en plasma humano, fue también eficiente en los otros casos.

Tabla 1-16: Resumen exactitud y precisión del método para la cuantificación de rutina y quercetina en plasma humano, de rata Wistar y de conejo New Zealand.

	Rutina				Quercetina			
	LLOQ	LQC	MQC	HQC	LLOQ	LQC	MQC	HQC
Concentración teórica (ng/mL)	100	250	5000	10000	100	250	5000	10000
PLASMA HUMANO INTERDÍA								
Concentración experimental promedio (ng/mL) ¹	90.1	252.8	5363.2	9608.1	99.7	247.8	5190.3	9806.6
Recuperación (%) ²	90.1	101.1	107.3	96.1	99.7	99.1	103.8	98.1
CV (%) ³	9.7	3.0	8.6	2.7	14.8	2.0	5.4	4.7
PLASMA HUMANO INTRADÍA								
Concentración experimental promedio (ng/mL) ⁴	107.2	267.9	4527.3	9959.8	109.5	248.8	4764.6	10206.5
Recuperación (%) ²	107.2	107.2	90.5	99.6	109.5	99.5	95.3	102.1
CV (%) ³	11.1	5.5	2.2	2.5	5.4	5.9	2.3	0.7
PLASMA RATA INTRADÍA								
Concentración experimental promedio (ng/mL) ⁴	85.6	244.6	4996.4	9891.3	105.7	229.0	5319.0	10698.0
Recuperación (%) ²	85.6	97.9	99.9	98.9	105.7	91.6	106.4	107.0
CV (%) ³	5.8	5.5	4.8	5.2	7.2	3.2	4.1	5.3
PLASMA CONEJO INTRADÍA								
Concentración experimental promedio (ng/mL) ⁴	119.2	268.7	5674.2	10233.4	102.2	251.7	5290.3	10307.9
Recuperación (%) ²	119.2	107.5	113.5	102.3	102.2	100.7	105.8	103.1
CV (%) ³	3.6	7.4	3.9	4.0	8.8	9.8	10.3	6.2

¹ Promedio de cinco controles por nivel de concentración, preparados en 3 d. ² Recuperación respecto a la concentración teórica. ³ Coeficiente de variación. ⁴ Promedio de cinco controles por nivel de concentración, preparados en 1 d. LLOQ: límite bajo de cuantificación. LQC: control de calidad bajo. MQC: control de calidad medio. HQC: control de calidad alto.

La recuperación de rutina, quercetina y crisina fue $\geq 71.9\%$ con coeficiente de variación $\leq 13.5\%$. Además, se comprobó que tras la dilución con plasma de muestras simuladas de concentración 5 y 20 veces el HQC, se conserva la exactitud y precisión del método (Tabla 1-17).

Tabla 1-17: Resumen recuperación y factor de dilución.

	Rutina			Quercetina			Crisina
RECUPERACIÓN							
Concentración teórica (ng/mL)	LQC	MQC	HQC	LQC	MQC	HQC	1000
	250	5000	10000	250	5000	10000	
Recuperación (%) ¹	113.1	106.3	103.2	101.8	82.7	71.9	110.0
CV (%) ²	12.5	4.4	9.5	11.8	4.9	13.5	7.5
EFFECTO DILUCIÓN							
Concentración teórica (ng/mL)	HQC			HQC			
	10000			10000			
Factor de dilución	5	20		5	20		
Concentración experimental promedio (ng/mL) ³	8626.5	9097.8		8847.7	9260.8		N.a.
Recuperación (%) ⁴	86.3	91.0		88.5	92.6		
CV (%) ²	4.4	4.4		1.6	8.8		

¹ Recuperación respecto a controles sin extracción, promedio de 3 mediciones. ² Coeficiente de variación. ³ Promedio de 5 mediciones. ⁴ Recuperación respecto a la concentración teórica tras la dilución. LQC: control de calidad bajo. MQC: control de calidad medio. HQC: control de calidad alto. N.a.: no aplica.

Las soluciones madre de estándares de rutina y quercetina fueron estables por al menos 3 meses cuando se mantuvieron almacenados a 4°C. Sin embargo, las curvas de calibración y los controles asociados a cada curva, se prepararon siempre a partir de estándares frescos. Los controles bajo y alto se mantuvieron dentro de $\pm 12.6\%$ el valor nominal a pH 5.5 y 37°C por 30 min (condiciones de reacción con β -glucuronidasa/arilsulfatasa) y a pH 4 tras ser almacenados a 4°C durante 2 h o a -80°C por 30 d y cuando se sometieron a 3 ciclos de congelación/descongelación. Los controles ya procesados y envasados en viales, fueron estables en el automuestreador por al menos 24 h a 20°C y por al menos 30 d con almacenamiento en refrigeración a 4°C (Tabla 1-18 y Tabla 1-19).

Tabla 1-18: Estabilidad a corto plazo

		Condiciones de trabajo					
		Sangre ¹	Refrigeración ₂	Reacción ₃	Congelación/ descongelación ₄	Auto-sampler ⁵	
RUTINA	LQC 250	Concentración experimental (ng/mL)	267.3	267.9	278.1	263.7	258.9
		Recuperación (%) ⁶	106.9	107.2	111.2	105.5	103.5
		CV (%) ⁷	2.2	3.7	3.5	6.9	8.4
	HQC 10000	Concentración experimental (ng/mL)	9826.0	10556.3	10649.4	10426.5	9982.6
		Recuperación (%) ⁶	98.3	105.6	106.5	104.3	99.8
		CV (%) ⁷	3.6	2.7	3.9	2.6	4.6
QUERCETINA	LQC 250	Concentración experimental (ng/mL)	271.3	219.4	259.3	242.8	241.1
		Recuperación (%) ⁶	108.5	87.8	103.7	97.1	96.5
		CV (%) ⁷	6.6	0.9	2.8	5.9	3.4
	HQC 10000	Concentración experimental (ng/mL)	10048.3	11220.1	10714.0	11256.7	9835.5
		Recuperación (%) ⁶	100.5	112.2	107.1	112.6	98.4
		CV (%) ⁷	10.2	1.8	2.9	1.8	4.6

¹ Sangre completa de conejos, 4°C, 1 h. ² Plasma pH 4, 4°C, 2 h. ³ Plasma pH 5.5, 37°C, 30 min. ⁴

Plasma pH 4, tres ciclos de -80°C, 12 h / 4°C, 2 h. ⁵ Automuestreador, plasma procesado y envasado en viales, 20°C, 24 h. ⁶ Recuperación respecto a la concentración teórica. ⁷ Coeficiente de variación. En todos los casos n = 3. LQC: control de calidad bajo. HQC: control de calidad alto.

Tabla 1-19: Estabilidad a largo plazo

		Soluciones madre ¹	Muestra procesada ²	Congelación			
				7 d ³	15 d ⁴	30 d ⁵	
RUTINA	LQC 250	Concentración experimental (ng/mL)	270.2	254.2	248.0	258.4	263.3
		Recuperación (%) ⁶	108.1	101.7	99.2	103.4	105.3
		CV (%) ⁷	3.7	4.2	12.5	1.2	1.0
	HQC 10000	Concentración experimental (ng/mL)	10933.9	10565.7	10998.6	9759.0	10247.7
		Recuperación (%) ⁶	109.3	105.7	110.0	97.6	102.5
		CV (%) ⁷	2.0	8.3	1.3	2.7	1.5
QUERCETINA	LQC 250	Concentración experimental (ng/mL)	248.4	251.0	235.9	238.4	243.5
		Recuperación (%) ⁶	99.4	100.4	94.3	95.4	97.4
		CV (%) ⁷	5.4	7.8	3.9	6.0	9.0
	HQC 10000	Concentración experimental (ng/mL)	10835.7	9784.9	10737.6	10234.1	10036.0
		Recuperación (%) ⁶	108.4	97.8	107.4	102.3	100.4
		CV (%) ⁷	2.1	5.0	7.2	6.7	1.9

¹ Diluyente metanol: agua (75:25), 4°C, 3 meses. ² Plasma procesado y envasado en viales, 4°C, 30 d. ^{3,4,5} Plasma pH 4, -80°C, 30 d. ⁶ Recuperación respecto a la concentración teórica. ⁷ Coeficiente de variación. En todos los casos n = 3. LQC: control de calidad bajo. HQC: control de calidad alto.

En cuanto a la validación parcial de la metodología, utilizando como matriz plasma de ratas Wistar y de conejo New Zealand, los resultados sobre exactitud y precisión fueron mostrados en la Tabla 1-16. En la Figura 1-8 se presenta la selectividad tras procesar plasma blanco de 6 animales de cada especie, a pesar de la existencia de señales endógenas del plasma, no hubo interferencia en los tiempos de retención de los analitos. Finalmente se demostró la estabilidad de rutina y quercetina en sangre completa de conejos tras 1h de almacenamiento a 4°C (Tabla 1-18).

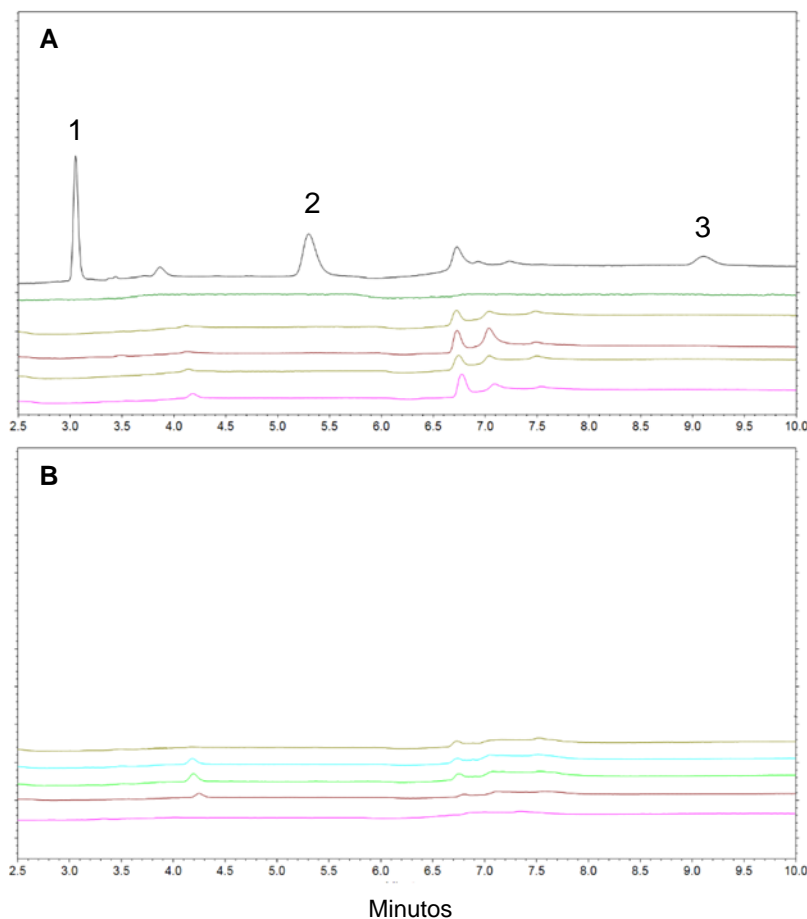


Figura 1-8: Selectividad del método frente a plasma de rata Wistar y conejo New Zealand. **A:** Plasma blanco de 6 ratas Wistar. **B:** Plasma blanco de 6 conejos New Zealand. Cada línea corresponde a un animal. La línea negra corresponde a blanco de rata adicionado con rutina (pico 1, 3.1 min), quercetina (pico 2, 5.4 min) y crisina (pico 3, 9.1 min) 1000 ng/mL. Nótese la ausencia de interferencia en el tiempo de retención de los analitos. Columna Kinetex® EVO C18, 2,6 μ m, 100 x 2.1 mm a 30°C; fase móvil ácido fórmico 0.1% (A') y ACN con 0.1% de ácido fórmico, en gradiente de 85% a 65% de A', flujo 0.5 mL/min y 260 nm. Extracción con metanol 1:2.

La señal del IS durante la validación y los ensayos se mantuvo dentro de $\pm 18\%$ (Figura 1-9), valores atípicos hacia abajo fueron asociados a errores en la inyección de la muestra, ocasionados por problemas con el acople entre la tapa y el inserto de microvolumen del vial, esto fue resuelto con el cambio de tapa y la reinyección de la muestra. Se observó un solo valor atípico hacia arriba, asociado a error humano, la muestra correspondiente fue descartada. En general, a lo largo de los ensayos se conservó la exactitud y precisión del método, demostrada por seguimiento de los controles de calidad LQC, MQC y HQC,

encontrando que entre el 75 y el 100% de los controles de cada corrida cumplieron el criterio de exactitud de $\pm 15\%$ en todos los niveles de concentración.

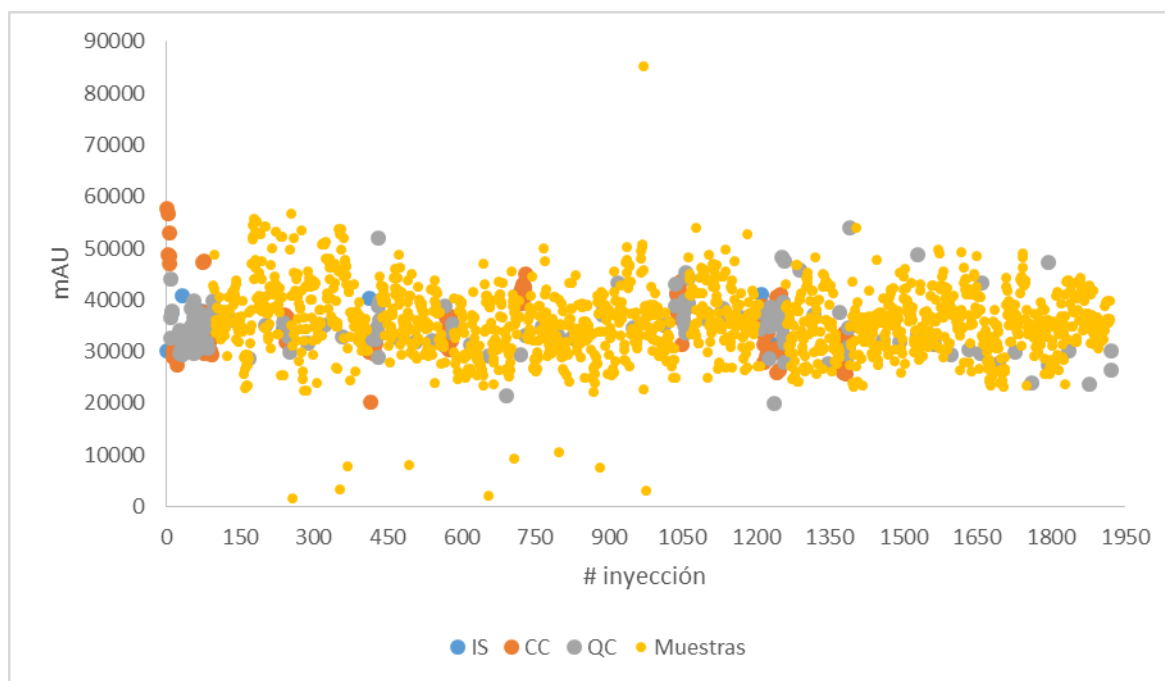


Figura 1-9: Respuesta del estándar interno a lo largo de los ensayos de validación y farmacocinéticos. Área de crisis en las inyecciones de estándar interno (IS), curva de calibración (CC), controles de calidad (QC) y muestras de ensayos farmacocinéticos (Muestras). Nótese que en la mayoría de los casos la señal del IS en las muestras es similar a la observada para CC y QC, indicando el buen desempeño del método.

Por las razones explicadas anteriormente, tanto el pH como la temperatura fueron factores críticos para la estabilidad de los analitos, especialmente de quercetina, pero estos permanecieron estables en sangre completa por al menos 1 h, cuando fueron mantenidos en refrigeración. Wang y Zhao observaron que la presencia de proteínas protege a quercetina de la degradación por efecto de la temperatura y el pH, disminuyendo la constante de velocidad de degradación entre 25 y 50% (Jing Wang & Zhao, 2016). Quercetina forma enlaces fuertes con la albúmina del suero con constantes de enlaces (k_a) del orden de 6.31×10^5 (Tan et al., 2019), lo que podría explicar su conservación, al menos temporal, al pH de la sangre.

De acuerdo a la revisión bibliográfica, otros autores han desarrollado metodologías para la cuantificación de rutina y quercetina en plasma, con sensibilidad de hasta 1 ng/mL, obtenida con detectores de masas (He et al., 2013; B. Bin Wei et al., 2017). En esta

investigación no fue posible utilizar esa tecnología, pero la metodología desarrollada resultó ligeramente más sensible que las encontrados en la literatura utilizando detección UV-Vis, cuyos LLOQ oscilan entre 150 y 5000 ng/mL (Müller-Sepúlveda et al., 2016; Ouyang et al., 2013; Wu et al., 2012). Además, la técnica de preparación de la muestra es rápida y sencilla, requiriendo únicamente el uso de centrifuga refrigerada.

La validación completa se realizó con plasma humano para reducir el número y manipulación de animales de experimentación, pero se comprobó la selectividad, exactitud y precisión en plasma de rata Wistar y conejo New Zealand. La guía de validación de métodos bioanalíticos de la FDA, utilizada como referencia, permite este tipo de validación parcial cuando ocurren cambios de especie (FDA/CDER, 2018). Por lo anterior la técnica se considera validada para las 3 matrices ensayadas.

1.4 Conclusiones

- 1) Se desarrolló y validó según criterios de ICH, una metodología analítica por HPLC para la cuantificación directa de rutina, quercetina y propranolol y la cuantificación indirecta de conjugados glucurónido y sulfato derivados del metabolismo endógeno de rutina, utilizando como medio HBSS pH 6.5 y 7.4.
- 2) Se desarrolló y validó según criterios de FDA, una metodología bioanalítica por UHPLC para la cuantificación directa de rutina y quercetina y la cuantificación indirecta de conjugados glucurónido y sulfato derivados de estos, en plasma humano, de rata y de conejos.
- 3) Se demostró que las señales endógenas del plasma humano de ratas y de conejos no interfieren con la cuantificación de rutina y quercetina y que las muestras plasmáticas son estables en pH 4 y refrigeración o congelación hasta por 30 d.

2. Estudio de la permeabilidad intestinal de quercetina-3-O-rutinosido (rutina) a partir del extracto estandarizado de cálices de *Physalis peruviana*

2.1 Aspectos teóricos

2.1.1 Permeabilidad intestinal

La biodisponibilidad se define como la velocidad y cantidad de fármaco que se absorbe desde el sitio de administración y alcanza la circulación sistémica, siendo una medida de la disposición del mismo en el sitio de acción². El intestino delgado es el principal órgano destinado para la absorción de fármacos y nutrientes de la dieta, que a su vez funciona como barrera al paso de exógenos potencialmente peligrosos. Por lo tanto, la aparición en la circulación sistémica de fármacos administrados por vía oral, una vez disueltos, depende de la capacidad de la sustancia de atravesar los elementos mecánicos de barrera intestinal (mucus y epitelio intestinal) (Bischoff et al., 2014; Dahlgren & Lennernäs, 2019), esta característica se conoce como permeabilidad y se mide a partir de la velocidad con la que fluyen las moléculas a través de la barrera (Brodin et al., 2010).

El epitelio intestinal consiste en una monocapa de células especializadas, los enterocitos, con uniones estrechas entre ellas. Fisiológicamente las uniones estrechas forman barreras que limitan el transporte paracelular y son en parte responsables de la polarización entre los lados apical y basolateral de la propia capa epitelial. Estas uniones son resultado de la interacción de las claudinas transmembranales con proteínas citoplasmáticas de

² Colombia. Ministerio de salud y protección social. Resolución 1124 (2016).

andamiaje como las *Zonula occludens-1* (ZO-1), que a su vez se unen a la F-actina del citoesqueleto (Pollard & Earnshaw, 2017).

Los mecanismos por los cuales las sustancias atraviesan el epitelio intestinal son: el transporte paracelular, el transporte transcelular pasivo y el transporte pasivo o activo (con requerimiento energético) mediado por transportadores. En un epitelio intacto, el transporte paracelular es exclusivo de agua, iones y moléculas pequeñas (Bischoff et al., 2014), mientras que se ha demostrado que la difusión transcelular pasiva es el principal mecanismo que lleva a la absorción intestinal de los fármacos, aunque un grupo no reducido de éstos está sujeto, incluso concomitantemente, a transporte mediado por proteínas hacia el interior o exterior de los enterocitos (Dahlgren & Lennernäs, 2019).

El transporte transcelular pasivo implica el paso libre de las sustancias a través de las membranas apical y basolateral de los enterocitos, por lo cual depende de las características fisiológicas de estas membranas y de las características fisicoquímicas de las moléculas, como son el tamaño molecular y el coeficiente de reparto/distribución. Este tipo de transporte ocurre en favor de un gradiente de concentración y el flujo de las sustancias del lado apical al basolateral se explica por la primera ley de Fick, que en la práctica puede simplificarse como se indica en la ecuación 2-1.

$$J = P \times C_{donador} \quad 2-1$$

Donde J corresponde al flujo, P al coeficiente de permeabilidad y $C_{donador}$ es la concentración inicial del compuesto en el lado apical de la membrana (Brodin et al., 2010).

Por otro lado, en las membranas apical y basolateral de los enterocitos se expresan varias proteínas cuyo papel en el transporte de fármacos (entrada o eflujo) ha sido demostrado (Zamek-Gliszczyński et al., 2018) (Figura 2-1). La mayoría de transportadores de entrada son miembros de la superfamilia de transportadores de solutos, SLC, los cuales son independientes de la hidrólisis de ATP (Bai et al., 2017). En cuanto a los transportadores de eflujo, estos pertenecen principalmente a la superfamilia ABC (*ATP-binding cassette transporters*), siendo la glicoproteína-P (P-gp o *multidrug resistance protein 1*, *MDR1*) la de mayor interés desde el punto de vista farmacocinético (Nigam, 2014). Como su nombre lo indica, esta familia de transportadores utiliza ATP como fuente de energía para bombear compuestos fuera de las células epiteliales, en contra del gradiente de concentración (Shugarts & Benet, 2009; Zamek-Gliszczyński et al., 2018). La interacción de las moléculas

con transportadores de entrada y/o eflujo en los enterocitos, para los cuáles son sustratos, condiciona su tasa de ingreso en la circulación sistémica. Moléculas de alta solubilidad pueden saturar rápidamente los transportadores de eflujo y superar esta barrera para llegar a la circulación sistémica, exhibiendo alta exposición y biodisponibilidad, mientras que sustancias de baja solubilidad, tienen menos posibilidad de saturar los transportadores de eflujo y por tanto resultan menos biodisponibles (Shugarts & Benet, 2009).

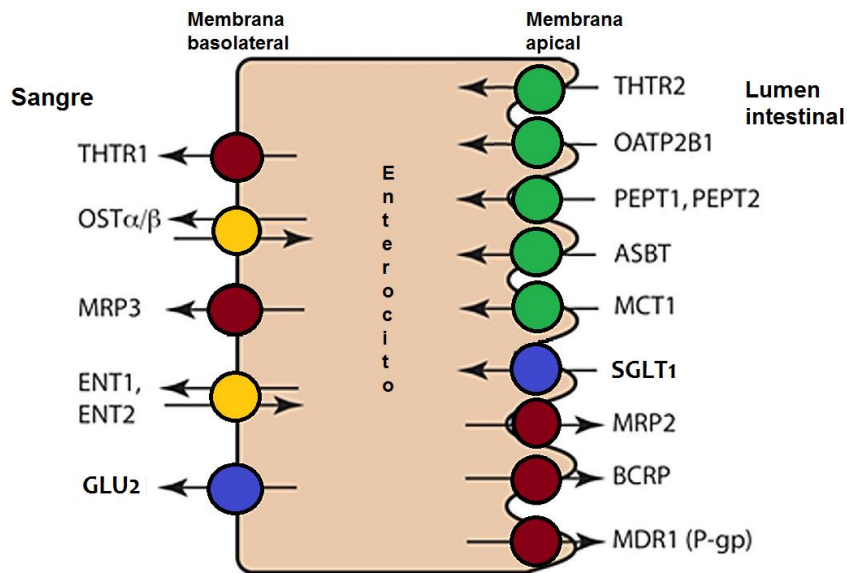


Figura 2-1: Proteínas expresadas en enterocitos relevantes en el transporte de fármacos.

● Proteínas de entrada. ● Proteínas de eflujo. ● Proteínas de transporte bidireccional.
 MDR: “multidrug resistance protein”; BCRP: “breast cancer resistance protein”; MRP: “multidrug resistance associated protein”; MCT: “monocarboxylate transporter protein”; ASBT: “apical sodium-dependent bile acid transporter”; PEPT: “peptide transport protein”; OATP: “organic anion transporting polypeptide”; THTR: “thiamine transporter”; OST: “organic solute transporter”; ENT: “equilibrative nucleoside transporter”. Además se representan los transportadores de glucosa ●
 SGLT1: “sodium/glucose cotransporter 1” y GLUT2: “Glucose transporter 2” Modificado de (Zamek-Gliszczynski et al., 2018)

Otra barrera para la absorción de fármacos desde el epitelio intestinal es el metabolismo presistémico, que puede ocurrir desde el propio intestino delgado por la acción de hidrolasas y de enzimas de fase I y II expresadas en los enterocitos. El contenido de enzimas de la familia CYP en el intestino delgado es aproximadamente el 50% de lo

expresado en el hígado, mientras que las enzimas UDP-glucuronosiltransferasas, sulfotransferasas y glutatión-S-transferasas se encuentran en niveles comparables en ambos órganos, por lo que la conjugación es el mecanismo de metabolización presistémica predominante a nivel intestinal (de Waziers et al., 1990).

2.1.2 Metodologías para determinación de permeabilidad intestinal de los fármacos

La permeabilidad intestinal es una característica medible de la barrera intestinal frente a moléculas específicas y su estudio es de interés para entender la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral. Varios modelos han sido empleados para estudiar la permeabilidad de los fármacos en la barrera intestinal, la Tabla 2-1 resume los más comunes *in silico*, *in vitro*, *in situ* e *in vivo*.

▪ Modelo Caco-2

Uno de los modelos para la evaluación *in vitro* de la permeabilidad intestinal de fármacos aceptado por la industria farmacéutica y las agencias regulatorias como la FDA (FDA/CDER, 2017), son las células de adenocarcinoma colorectal humano (Caco-2) que, bajo condiciones de cultivo apropiadas, pueden formar monocapas de células diferenciadas con fenotipo de enterocito: completamente polarizadas, con microvellosidades apicales, uniones estrechas y con expresión de la mayoría de transportadores de membrana y enzimas metabolizadoras funcionales propias de las células del intestino humano (Hubatsch et al., 2007).

Tabla 2-1: Algunos modelos para el estudio de permeabilidad intestinal de fármacos *in silico*, *in vitro*, *in situ* e *in vivo*.

Modelo	Descripción	Ventajas	Desventajas	Referencia
Modelos <i>in silico</i> de relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR, por sus siglas en inglés).	Simulaciones computarizadas a partir de descriptores que incluyen las características fisicoquímicas de los fármacos con o sin datos experimentales <i>in vitro</i> y/o <i>in vivo</i> .	Rapidez y bajo costo.	Menor capacidad de predicción que los modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .	(Lee et al., 2020)

Tabla 2-1 (Continuación)

Modelo	Descripción	Ventajas	Desventajas	Referencia
Modelo <i>in vitro</i> con células de adenocarcinoma colorectal humano (Caco-2)	Experimentos de transporte de fármacos a través de monocapas de células con fenotipo de enterocitos.	Permite evaluar el efecto de transportadores y enzimas metabolizadoras sobre la permeabilidad.	Alta variabilidad ocasionada por las características de la línea celular, el número de pase y las condiciones de cultivo.	(Hubatsch et al., 2007)
Modelo <i>in situ</i> de perfusión intestinal de un solo paso (SPIP, por sus siglas en inglés).	Se mide la desaparición del fármaco perfundido en un segmento intestinal.	Resultados más cercanos a la permeabilidad <i>in vivo</i> .	Complejidad, necesidad de uso de antiinflamatorios que pueden afectar la permeabilidad, limitaciones para el estudio de sustancias con baja permeabilidad.	(Dahlgren & Lennernäs, 2019)
Modelos <i>in vivo</i>	Estudios de biodisponibilidad y balance de masas.	Clínicamente más relevante por la implicación de procesos biofarmacéuticos y factores fisiológicos.	Alto costo y complejidad. No permite el estudio de mecanismos concretos de absorción.	(FDA/CDER, 2017)

Las monocapas de células Caco-2 cultivadas sobre filtros permeables de un área específica en placas tipo “*transwell*”, son utilizadas en experimentos de transporte de fármacos, con lo cual se puede determinar su coeficiente de permeabilidad aparente (Papp) y los mecanismos involucrados en el proceso. Esto se consigue a partir de la medición del flujo de las moléculas desde un compartimento apical hacia otro basolateral (AP-BL), lo cual implica el paso de las sustancias a través de la monocapa (Figura 2-2). Con experimentos de transporte en sentido basolateral a apical (BL-AP) se puede identificar la participación de mecanismos de eflujo que condicionen la permeabilidad, a partir de la proporción de eflujo (ER, por sus siglas en inglés), definida como la relación entre el Papp en sentido BL-AP, frente a la obtenida en el sentido de absorción. Un $ER > 2$ es indicativo del eflujo activo mediado por transportadores. La dilucidación de las

proteínas involucradas en la entrada o eflujo de los fármacos en el modelo Caco-2, puede ser posible con el uso de inhibidores o inductores específicos (Sun et al., 2008).

Este modelo también permite estudiar el metabolismo presistémico del fármaco por los enterocitos, a través del seguimiento de la aparición de metabolitos a nivel apical, basolateral o intracelular (Sun & Pang, 2008), aunque esta aplicación tiene limitaciones debido a la baja expresión de algunas isoenzimas del citocromo P450 como la CYP3A4 (Sun et al., 2008). En general, la evidencia indica que la permeabilidad aparente obtenida en el modelo Caco-2 se correlaciona bien con la absorción oral de fármacos en humanos (Artursson et al., 1991).

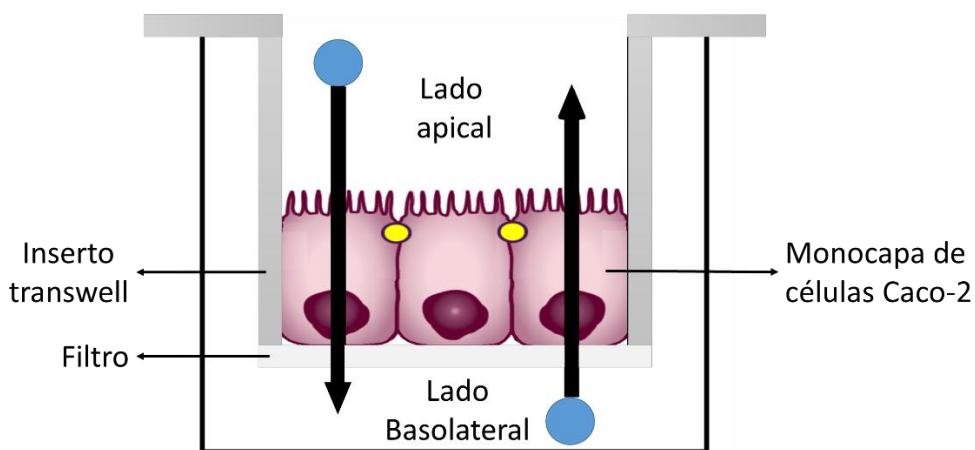


Figura 2-2: Representación gráfica de los experimentos de transporte in vitro a través monocapas de células Caco-2 cultivadas sobre filtros en placas tipo transwell.

2.1.3 Permeabilidad intestinal de polifenoles

Los polifenoles son un grupo de compuestos abundante en las plantas y la permeabilidad intestinal de varios de ellos ha sido estudiada por distintos autores, como compuestos individuales o como constituyentes de preparaciones más complejas como extractos vegetales, la evidencia indica que las propias características de la mezclas vegetales pueden influenciar la permeabilidad de los compuestos individuales en ellas (Gao et al., 2010; Rasoanaivo et al., 2011; Verjee et al., 2017; Yong Yang et al., 2014).

A nivel intestinal, los polifenoles pueden ser transportados por difusión pasiva lenta o difusión facilitada por transportadores (Luca et al., 2019; L. Wang et al., 2019), pero en general presentan baja permeabilidad (Fong et al., 2013; Pérez-Sánchez et al., 2017; Waldmann et al., 2012). Interesantemente, algunos autores han señalado la participación del transportador 1 de glucosa dependiente de sodio (SGLT1, por sus siglas en inglés) y del transportador 2 de glucosa (Glut2) en la absorción de glucósidos de quercetina y delfinidina (C. H. Chen et al., 2007; Gonzales et al., 2015; Slámová et al., 2018).

La baja permeabilidad de los polifenoles es resultado de mecanismos de eflujo y metabolización intestinal (L. Zhang et al., 2007). En el primer caso, es conocido que estos compuestos son sustratos de transportadores como “*multidrug resistance associated protein 2*” MRP2, P-gp (Manach, 2004; Scheepens et al., 2010; Williamson et al., 2018). Además se ha descrito que parte de los compuestos que son transportados de regreso al lumen intestinal, pueden ser reabsorbidos en el intestino delgado (recirculación local) o en el intestino grueso (recirculación entérica) (L. Wang et al., 2019).

En cuanto al metabolismo intestinal, los polifenoles en general son susceptibles de biotransformación por enzimas de poblaciones naturales de bacterias del tracto gastrointestinal (GI, por sus siglas en inglés), estos procesos incluyen hidrólisis de O- y C-glicósidos, de grupos metilo, hidroxilo y carboxilo; apertura de anillos heterocíclicos y reducciones. Además, enzimas localizadas en la membrana apical de los enterocitos, como la lactasa-floricin hidrolasa (LPH, por sus siglas en inglés), pueden generar agliconas a partir de flavonoides glicosilados (Braune & Blaut, 2016; Kawabata et al., 2019; Ozdal et al., 2016), siendo estos compuestos más permeables que los parentales (Y. Liu & Hu, 2002).

Los compuestos que superan la biotransformación en el lumen intestinal y aún los productos de este proceso, pueden ingresar a los enterocitos siendo objeto de otras reacciones de metabolización, principalmente de tipo II, por la acción de las enzimas UDP-glucuronosiltransferasas y las sulfotransferasas intracelulares, que generan conjugados glucurónico y sulfato respectivamente; estos metabolitos pueden ser devueltos a lumen intestinal o depositados finalmente en la sangre (Czank et al., 2013; Z. Liu & Hu, 2007; L. Wang et al., 2019; L. Zhang et al., 2007).

La Tabla 2-2, resume algunos reportes de la literatura sobre permeabilidad de polifenoles en el modelo Caco-2. Algunos autores han estudiado la permeabilidad de estos compuestos desde extractos vegetales, por ejemplo, Qiang et al., (2011) estudiaron la permeabilidad de ácido rosmarínico como compuesto puro y en un extracto de *Prunella vulgaris*, en este caso la matriz del extracto no modificó la permeabilidad del compuesto.

Tabla 2-2 Permeabilidad de polifenoles en el modelo Caco-2

Polifenol	Grupo químico	Papp x 10 ⁻⁶ cm/s	Eflujo	Metabolismo intestinal	Referencia
Epicatequina galato	Polifenol-catequina	0.32 ± 0.04 0.78 ± 0.06	P-gp MRP2	No detectado	(Vaidyanathan & Walle, 2003)
Ácido rosmarínico		0.2 ± 0.0			
Ácido rosmarínico en extracto de <i>P. vulgaris</i>	Ácido fenólico	0.2 ± 0.1	No estudiado	Glucurónidos Sulfatos	(Qiang et al., 2011)
Apigenina	Flavonoide	13.83 ± 1.21			
Crisofanol	Antraquinona	10.81 ± 2.34	P-gp	Glucurónidos	(Teng et al., 2012)
Emodina	Antraceno	9.52 ± 1.45	MRP2	Sulfatos	
Resveratrol	Estilbenoide	11.29 ± 3.45			
Hipericina	Antraquinona	Despreciable	No estudiado	No estudiado	(Verjee et al., 2017)
Rutina	Flavonoide	10.32 ± 1.25	P-gp MRP2	Glucurónidos Sulfatos	(Xiaofang Zhang et al., 2013)
Ácido cafeico	Ácido fenólico	2.12 ± 0.02			
Crisina	Flavonoide	2.60 ± 0.03			
Ácido gálico	Ácido fenólico	1.80 ± 0.16	No detectado	No estudiado	(Rastogi & Jana, 2016)
Quercetina	Flavonoide	3.80 ± 0.45			
Resveratrol	Estilbenoide	0.96 ± 0.06			
Rutina	Flavonoide	1.24 ± 0.05			
Apigenina		Despreciable			
Cirsimaritina		33.3 ± 1.17			
Diosmetina	Flavonoide	2.50 ± 0	No estudiado	No estudiado	(Pérez-Sánchez et al., 2017)
Hispidulina		9.05 ± 3.04			
Genkwanina		14.9 ± 2.47			

Tabla 2-2 (Continuación)

Polifenol	Grupo químico	Papp x 10 ⁻⁶ cm/s	Eflujo	Metabolismo intestinal	Referencia
Rutina en extracto total de <i>Actinidia deliciosa</i>		8.1 ± 0.9			
Rutina en extracto de <i>A. deliciosa</i> libre de fibra	Flavonoide	3.6 ± 1.6	No estudiado	No estudiado	(Henriques et al., 2018)
Quercitrina en extracto total de <i>A. deliciosa</i>		7.6 ± 0.7			
Quercitrina en extracto de <i>A. deliciosa</i> libre de fibra		3.4 ± 1.8			
Paeoniflorina	Flavonoide	7.22	No estudiado	No estudiado	(Li et al., 2019)
Nuciferina		21.25			
Rutina		0.90			
Hiperosido		0.93			
Ácido salvianólico B	Estilbenoide	1.07			

Adicionalmente, varios autores han descrito un complejo mecanismo de acoplamiento entre enzimas metabolizadoras y transportadores de eflujo para explicar la disposición sistémica de metabolitos conjugados provenientes de polifenoles. Según este mecanismo denominado “puerta giratoria”, la velocidad de formación de los conjugados depende de la velocidad de su salida de la célula: cuando la metabolización supera la salida, los conjugados se acumulan en los enterocitos donde pueden estar sujetos a hidrólisis, con lo cual la velocidad neta de conjugación disminuye, además los propios metabolitos acumulados pueden funcionar como inhibidores de reacciones de fase II limitando aún más su formación. Cuando el eflujo general (apical y/o basolateral) ocurre a mayor velocidad que la metabolización, los conjugados recién formados salen de la célula hacia el lumen intestinal o hacia la circulación sistémica; como ya se mencionó, los metabolitos y compuestos parentales expulsados al lumen, pueden recircular al interior de la célula en el propio intestino delgado o en el colón, lo que aumentaría su tasa de metabolización en el tiempo (Z. Liu & Hu, 2007; L. Wang et al., 2019; Y. Wei et al., 2013).

▪ Permeabilidad intestinal de rutina

Los reportes existentes en la literatura sobre permeabilidad de rutina indican que es baja, con valores de Papp en el modelo Caco-2 entre 0.9 y 10.32×10^{-6} cm/s, independientes de la concentración inicial del compuesto (Tabla 2-2).

Cuando se evaluó el efecto de las matrices de preparaciones herbales sobre la permeabilidad de rutina, la respuesta fue variable. Henriques et al. (2018), encontraron una disminución del 41% en el Papp del compuesto, tras eliminar la fibra de un extracto acuoso de *Actinidia deliciosa*; por su parte, Li et al. (2019) observaron un menor permeabilidad de rutina *in situ* desde una preparación polih herbal, en comparación con la obtenida para el compuesto puro.

Con experimentos de transporte bidireccional se ha demostrado que rutina es susceptible de eflujo en los enterocitos, algunos autores han propuesto la participación de P-gp en este mecanismo (Xiaofang Zhang et al., 2013). Adicionalmente, Gao et al. (2010) observaron que la proporción de eflujo del compuesto, definida como la relación entre el Papp en sentido basolateral a apical frente a la obtenida en el sentido de absorción, varía en diferentes productos a base de *Hypericum perforatum* L. (Hierba de San Juan) que contienen rutina, indicando que la matriz vegetal no solo afecta la permeabilidad en sentido de absorción, sino también el eflujo.

Sobre la metabolización, los antecedentes aportados por X. Zhang et al. (2013), indican que rutina es metabolizada en las células Caco-2, detectándose la presencia de conjugados glucurónidos y sulfatos y que parte del compuesto y sus metabolitos pueden acumularse en el interior de las células.

2.1.4 Extracto de cálices de *P. peruviana*

P. peruviana es una planta de la familia Solanaceae de amplia distribución en áreas tropicales y subtropicales de Latinoamérica, conocida popularmente en Colombia y Brasil como “uchuva” y “fisalis”, respectivamente. El fruto comestible de la planta se encuentra encerrado en cálices y ha sido usado tradicionalmente con fines medicinales (Lorenzi & Matus, 2008; Ramírez et al., 2010).

Basado en el uso tradicional de esta parte de la planta, investigadores de los grupos Tecnología de productos naturales (Tecprona) y Sistemas de liberación controlada de moléculas biológicamente activas (Silicomoba) de la Universidad Nacional de Colombia, han venido realizando distintas investigaciones en aras de la obtención de un producto fitoterapéutico a partir de un extracto hidroalcohólico de cálices de *P. peruviana*.

En 2013, Toro et al., demostraron el efecto hepatoprotector del extracto hidroalcohólico de cálices de *P. peruviana* en ratas Wistar con hepatotoxicidad inducida por CCl₄, atribuible a su actividad antioxidante. En estudios posteriores, Toro (2014) aplicó un fraccionamiento del extracto, bioguiado por esta actividad antioxidante, que llevó al aislamiento y elucidación de rutina y nicotiflorina (kaempferol-3-O-rutinosido), siendo rutina el flavonoide mayoritario en el extracto y las fracciones activas. La fracción butanólica resultó promisoría por su actividad antioxidante *in vitro*, frente a radical superóxido y óxido nítrico y su actividad antiinflamatoria en el modelo de edema de oreja de ratón inducido con acetato de tetradecanoilforbol (Toro et al., 2014).

Posteriormente, Cardona evaluó el efecto de distintas variables del proceso de extracción sobre el contenido de fenoles totales, rutina y actividad antioxidante *in vitro* del extracto hidroalcohólico de cálices de *P. peruviana*, definiendo las condiciones de extracción más favorables que llevaran a la obtención de un producto con uniformidad lote a lote (Cardona, 2014; Cardona et al., 2017). En ensayos complementarios se estudió la estabilidad de rutina en el extracto, en almacenamiento natural y en condiciones de estrés (hidrólisis y oxidación), concluyéndose que el extracto se conserva por al menos un mes en almacenamiento a $14 \pm 8^\circ\text{C}$ y 72% HR y confirmando que rutina es susceptible a hidrólisis ácida, alcalina y a oxidación (Cardona, 2014).

Más recientemente, Echeverry et al., (2018) demostraron la actividad hipoglicemiante del extracto de cálices de *P. peruviana* y la fracción butanólica, a través de ensayos de tolerancia a glucosa en ratones suizos ICR, esta actividad fue incluso mejorada cuando se aplicaron procesos de microencapsulación.

En adición a rutina y nicotiflorina, estudios de espectrometría de masas realizados sobre la fracción butanólica, en el grupo de investigación Tecprona, evidenciaron la presencia de los siguientes compuestos como mayoritarios: 3-*p*-ácido cumaroilquínico, 3-O-ácido feluroilquínico, 5-O-ácido cafeoilquínico, ácido felúrico hexóxido y ácido asperulosídico (no

publicado). La fracción también contiene quercetina-7-O-glucosido-3-O-rutinosido, quercetina-3-O-glucósido y trazas de whitanólidos, esto último coincide con lo reportado por otros autores para los cálices de *P. peruviana* (Ramadan, 2019).

Los cálices de *P. peruviana* han sido objeto de estudio de otros investigadores quienes también han demostrado la actividad antiinflamatoria de un extracto obtenido por percolación con éter de petróleo y de una fracción hidroalcohólica (Franco et al., 2007). Esta actividad fue confirmada posteriormente en el modelo de edema de pata de rata inducido por λ -carragenina, sobre macrófagos peritoneales activados por lipopolisacáridos y en un modelo de colitis inducido por TNBS en ratas (Castro et al., 2015; Franco et al., 2014). Franco et al., (2014) identificaron en estos productos dos ésteres de sucrosa activos, peruviosa A y B.

2.2 Metodología

2.2.1 Materiales y reactivos

Para los ensayos de permeabilidad se utilizaron células Caco-2 obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC # HTB-37, Manassas, VA, USA), con pases # 123 y 124. El medio *Dulbecco Modified Eagle's* alto en glucosa (DMEM-HG, glucosa 4.5 g/L), el suero fetal bovino (FBS), los aminoácidos no esenciales, la L-glutamina y los antibióticos penicilina y estreptomina se obtuvieron de Gibco (Grand Island, NY, USA). La sílica gel 60, el DMSO y el Tris base fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Germany). El HBSS, HEPES, ácido 2-morfolinoetanesulfónico, Lucifer Yellow CH y Hoechst 32258 fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (Deishenhofen, Germany). El anticuerpo mouse anti-ZO-1 fue obtenido de Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). El anticuerpo secundario Goat anti-mouse Alexa Fluor 448® y la rodamina-faloídina se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Los reactivos y estándares para los ensayos HPLC fueron detallados en el capítulo 1, otros reactivos fueron de grado analítico.

2.2.2 Preparación del extracto de cálices de *P. peruviana* y fraccionamiento

Los cálices de *P. peruviana* fueron recolectados en Granada (Cundinamarca, Colombia) en Junio de 2016. El material fue identificado por el taxonomista Parra C. y una muestra del espécimen fue depositada en el Herbario Nacional Colombiano (COL 512200). El extracto hidroalcohólico de cálices de *P. peruviana* (HEE) se preparó por percolación con etanol 70% (1:15 m/v) durante 72 h según lo descrito por Cardona et al. (2017). Como se mencionó anteriormente, en trabajos previos de nuestro grupo de investigación se realizó un fraccionamiento bioguiado del extracto, llevando a la identificación de rutina como el flavonoide mayoritario, por RMN y espectroscopia de masas (Toro Arango, 2014; Toro et al., 2014). El contenido de rutina en el extracto preparado para esta investigación fue confirmado por un método HPLC-UV previamente validado para este fin (Cardona et al., 2017). En la experiencia de este trabajo el contenido del marcador en extractos de distintos lotes varía entre 10.6 y 15.5 µg/mg de extracto seco.

Con el objetivo de profundizar sobre el efecto de la matriz del extracto en la permeabilidad de rutina, se preparó la fracción butanólica que también fue evaluada en el modelo Caco-2. La fracción se obtuvo a partir del extracto por cromatografía en columna de silica gel 60 utilizando como solventes, secuencialmente, diclorometano, acetato de etilo y butanol. La fracción butanólica fue concentrada a sequedad en vacío a 40°C (Echeverry et al., 2018).

2.2.3 Cultivo de células Caco-2

Los ensayos de transporte bidireccional en células Caco-2 fueron realizados en el laboratorio de virología aplicada (LVA) de la *Universidad Federal de Santa Catarina*. Inicialmente las células Caco-2 fueron sembradas en frascos de cultivo utilizando medio DMEM-HG suplementado con 10% (v/v) de FBS, 1% (v/v) de L-glutamina, 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, 100 U/mL de penicilina and 100 µg/mL de estreptomina. Las células fueron mantenidas en ambiente humidificado, a 37°C con 5% de CO₂. El medio fue reemplazado cada 2-3 d y se realizaron pases de las células por tripsinización, al alcanzar cerca del 80% de confluencia. El cultivo fue sometido rutinariamente a protocolos de control para descartar la contaminación por bacterias, hongos, levaduras y micoplasma.

2.2.4 Viabilidad celular frente a rutina estándar, extracto y fracción butanólica

Para definir la concentración inicial (C_0) de rutina que sería utilizada en los ensayos de permeabilidad, se realizaron experimentos de viabilidad celular con el compuesto puro, el extracto y la fracción, por el método de tinción con sulforodamina B (Vichai & Kirtikara, 2006). Para esto, las células Caco-2 fueron sembradas en placas de 96 pozos a densidad de 2.5×10^4 células/pozo y mantenidas en las condiciones mencionadas anteriormente por 21-23 días. Las células diferenciadas fueron incubadas por 6 h con medio suplementado conteniendo los tratamientos en un rango de concentraciones de 0 al equivalente a $30 \mu\text{M}$ de rutina, a partir de soluciones madre de 10 mM preparadas en DMSO. Tras las 6 h de exposición, las células fueron fijadas con ácido tricloroacético (10%), incubadas por 30 min con sulforodamina B (0.057% w/v) y lavadas con ácido acético (1% v/v). La sulforodamina B enlazada a las proteínas de las células viables, fue disuelta en solución Tris base 10 mM (pH 10.5) y se midió la densidad óptica (DO) a 510 nm de la solución coloreada en cada pozo, utilizando un lector de microplatos (SoftMax® Pro, Molecular Devices, CA, USA). La viabilidad celular fue calculada como %DO en relación con un control (medio de cultivo con DMSO 0.5% v/v).

2.2.5 Preparación de rutina estándar, extracto y fracción para ensayos de permeabilidad intestinal

Las muestras de ensayo fueron preparadas a concentración equivalente a rutina $10 \mu\text{M}$ para el compuesto puro y el extracto (0.42 mg/mL del extracto) y $5 \mu\text{M}$ para la fracción butanólica (0.14 mg/mL de fracción), por dilución en HBSS de soluciones madre en DMSO. Para experimentos en dirección apical a basolateral (AP-BL) se utilizó en la preparación de las muestras HBSS de pH 6.5 y para los experimentos en dirección de basolateral a apical (BL-AP), HBSS de pH 7.4. La concentración final de DMSO en las muestras fue $\leq 0.5\%$ v/v.

2.2.6 Experimentos de permeabilidad intestinal *in vitro*

Los experimentos de transporte bidireccional de rutina a través de monocapas de células Caco-2, fueron realizados siguiendo un protocolo previamente estandarizado en el LVA (Kratz et al., 2011). Las células fueron sembradas a una densidad de 1.87×10^5

células/pozo, sobre placas de 12 pozos con insertos Transwell® (Corning, NY, USA; diámetro 12 mm, área 1.12 cm², con membrana de policarbonato y tamaño de poro de 0.4 μm) y sometidas a diferenciación por 23 d utilizando 500 μL de medio suplementado en el lado apical y 1500 μL en el lado basolateral, con recambio cada 2-3 d.

En el día del experimento, el medio de cultivo fue reemplazado con HBSS pH 7.4 y se verificó la resistencia eléctrica transepitelial (TEER) de la monocapa de cada inserto utilizando un voltímetro Millicell® ERS (Millipore, MA, USA) conectado a una cámara Endohm® (World Precision Instrument, FL, USA). Los insertos con monocapas que presentaron TEER > 200 Ωcm² se utilizaron en los experimentos de transporte que consistieron en la aplicación de la muestra de ensayo en un compartimento donador y muestreos seriados en un compartimento receptor, con medición de la sustancia transportada. Para los experimentos en sentido de absorción (AP-BL), el compartimento donador fue el inserto, mientras que en los experimentos en sentido de eflujo (BL-AP), el compartimento donador fue el fondo del pozo (Figura 2-2).

El HBSS utilizado para la medición de la TEER fue removido y reemplazado por las muestras de rutina estándar, extracto o fracción butanólica, en volumen de 400 μL (cuando se aplicaron en el lado apical) o de 1200 μL (cuando se aplicaron en el lado basolateral). En el lado receptor se agregó HBSS de pH 7.4 o 6.4 según correspondiera. Las placas fueron incubadas a 37°C con agitación orbital (150 rpm) y se retiraron volúmenes del compartimento receptor (apical 200 μL, basolateral 600 μL) a los tiempos 0, 30, 60, 90 y 120 min; el volumen retirado fue reemplazado con medio HBSS limpio previamente calentado a 37°C. Tras la toma de la última muestra, el volumen remanente en el compartimento donador fue completamente removido para el cálculo de recuperación.

Para verificar la conservación de la integridad de las monocapas, se realizó una nueva medición de la TEER al final de cada experimento y se determinó el Papp en dirección AP-BL, de una solución de Lucifer Yellow 100 μg/mL preparada en HBSS pH 7.4. El colorante permeado se cuantificó por fluorometría en el lector de microplatos (excitación λ 485 nm, emisión λ 535 nm). Se consideraron válidos únicamente los experimentos realizados en monocapas con TEER final > 200 Ωcm² y Papp de Lucifer Yellow < 1.0 x 10⁻⁶ cm/s.

Se realizaron experimentos adicionales con rutina estándar (10 μM) en presencia de verapamilo (100 μM), un reconocido inhibidor de P-gp (Krishna & Mayer, 2000), con el fin

de estudiar la potencial participación de esta proteína en el transporte del flavonoide. Además, el Papp de propranolol (25 µM) fue obtenido experimentalmente y utilizado como control de alta permeabilidad del modelo.

2.2.7 Cuantificación de rutina, quercetina y propranolol en los experimentos de permeabilidad.

Las muestras de los experimentos de permeabilidad fueron analizadas para rutina (el componente mayoritario del extracto) y quercetina (metabolito de rutina), libres o conjugados con ácido glucurónico y sulfato, utilizando el método HPLC-UV desarrollado y validado según se describió en la sección de resultados del capítulo 1 (Tabla 1-9). El mismo método fue utilizado para la cuantificación de propranolol en los ensayos de control del modelo.

2.2.8 Cálculos y análisis estadístico de los datos

Los valores de Papp (cm/s) fueron calculados con la ecuación 2-2 (Hubatsch et al., 2007):

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{C_0 \times A} \quad 2-2$$

Donde dQ/dt es la velocidad de permeación (flujo en estado estacionario, µmol/s), C_0 es la concentración inicial (tiempo 0) de la sustancia evaluada en el compartimento donador (µM) y A es el área superficial del filtro del inserto (cm²).

El porcentaje de rutina transportada a través de la membrana al final del experimento fue calculada con la ecuación 2-3 (Brodin et al., 2010):

$$\frac{Masa_{total\ transportada}}{Masa_{total\ adicionada}} \times 100 = \frac{V_s(\sum_{n=1}^n C_n - 1) + C_n \times V_r}{Dosis} \times 100 \quad 2-3$$

Donde C_n corresponde a la concentración de rutina en el compartimento receptor al último punto de muestreo, $\sum_{n=1}^n C_n - 1$ es la sumatoria de las concentraciones de rutina encontradas en el receptor en los puntos de muestreo anteriores a C_n y V_s y V_r son los volúmenes de muestra y del compartimento receptor respectivamente.

La proporción de eflujo (ER, por sus siglas en inglés) fue calculada como la relación entre el Papp en dirección BL-AP (Papp BL-AP) y el Papp en dirección AP-BL (Papp AP-BL) (Hubatsch et al., 2007):

$$ER = \frac{P_{app}^{BL-AP}}{P_{app}^{AP-BL}} \quad 2-4$$

La fracción metabolizada f_{met} se calculó como la relación entre la cantidad total de metabolitos (quercetina y/o conjugados sulfato y glucurónido transformados a la masa de rutina, Met_{total}) y la masa total del marcador adicionada en el compartimento donador al inicio del experimento (Dosis) (Sun & Pang, 2008):

$$f_{met} = \frac{Met_{total}}{Dosis} \quad 2-5$$

Los resultados fueron reportados como el promedio \pm la desviación estándar (SD) de 3 experimentos independientes. La comparación de los datos se realizó por ANOVA simple de un factor, seguido por la prueba de rango de Tukey (HSD, por sus siglas en inglés). La distribución normal de los datos fue verificada por la prueba de Shapiro-Wilk y la homoscedasticidad por la prueba de Levene. Para todas las pruebas estadísticas se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI v.16.1.02. La significancia estadística se consideró a partir de $\alpha = 0.05$.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Contenido de rutina en el extracto de cálices de *P. peruviana* y la fracción butanólica

El contenido de rutina en el extracto y la fracción butanólica utilizados para los experimentos de permeabilidad fue 14.54 ± 0.08 y 22.00 ± 0.01 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto seco, respectivamente.

2.3.2 Diferenciación de células Caco-2 y resultados de ensayos de viabilidad

El protocolo utilizado para mantener y diferenciar las células Caco-2 permitió la formación de monocapas confluyentes con uniones estrechas. Como se mencionó anteriormente, las uniones estrechas se forman de la interacción entre claudinas, ZO-1 y F-actina (Pollard & Earnshaw, 2017), la Figura 2-3 muestra la localización de las proteínas ZO-1 y F-actina en la circunferencia del modelo de células Caco-2 utilizado en los experimentos de permeabilidad, demostrando la correcta formación de las uniones estrechas.

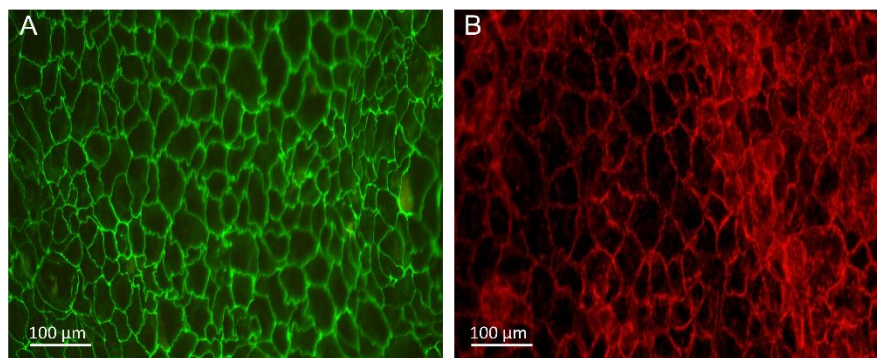


Figura 2-3: Marcadores de uniones estrechas en células las Caco-2 diferenciadas.

A: Imagen de microscopia de fluorescencia (Olympus IX71®, Tokyo, Japan), se evidencia la proteína ZO-1 (verde) en la circunferencia de las células, detectada por inmunofluorescencia con el anticuerpo mouse anti-ZO-1 y el anticuerpo secundario goat anti-mouse. **B:** F-actina del citoesqueleto (rojo) identificada con tinción con rodamina-faloidina (1: 200). Células diferenciadas por 23 d en las condiciones mencionadas en la metodología.

Con el objetivo de determinar la concentración inicial que sería utilizada en los ensayos de permeabilidad, se evaluó la viabilidad de células Caco-2 diferenciadas por 23 d, tratadas con rutina estándar, extracto o fracción butanólica, en concentraciones de 0 a 30 µM (equivalente de rutina). El extracto y la fracción mostraron un efecto inhibitorio significativo sobre la viabilidad celular en concentraciones de 20 y 30 µM. En contraste, las células sometidas a tratamiento con el compuesto puro, mantuvieron su viabilidad en niveles cercanos al control (células no tratadas) en todo el rango de concentraciones evaluadas, indicando que el efecto citotóxico observado en las muestras de origen vegetal, fue

probablemente debido a componentes diferentes a rutina o a la interacción entre ellos (Figura 2-4).

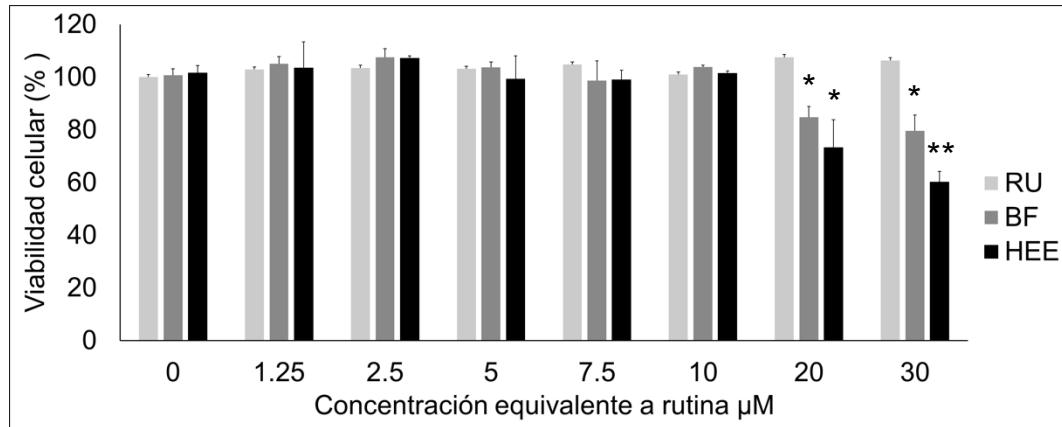


Figura 2-4: Viabilidad de células Caco-2 diferenciadas
Las células fueron tratadas con rutina estándar (RU), extracto hidroalcohólico de cálices de *P. peruviana* (HEE) y fracción butanólica (BF). Densidad óptica frente al grupo control (células no tratadas). Las barras representan el promedio \pm SD de tres experimentos independientes. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ en relación al grupo control (ANOVA y HSD).

Con base en los resultados de viabilidad celular, se realizaron experimentos preliminares de permeabilidad en Caco-2, utilizando concentraciones equivalentes a rutina de 10 μM para el compuesto puro, el extracto y la fracción. En estos experimentos se evidenció que la fracción butanólica ocasionaba una disminución de 50% en la TEER de las monocapas, tal efecto es un indicador de la disrupción de las uniones estrechas (Srinivasan et al., 2016) atribuible a componentes exclusivos de la fracción. Teniendo en cuenta lo anterior, se seleccionó como concentración inicial para los experimentos de permeabilidad el equivalente a 10 μM de rutina para el compuesto puro y el extracto y el equivalente a 5 μM para la fracción. Reportes de la literatura indican que la Papp de rutina en Caco-2 es independiente de la concentración inicial (Gao & Hu, 2010; Li et al., 2019; Rastogi & Jana, 2016).

2.3.3 Permeabilidad aparente de rutina pura en el extracto de cálices de *P. peruviana* y en la fracción butanólica

La Figura 2-5 muestra un cromatograma representativo de las muestras obtenidas en los ensayos de permeabilidad, donde se evidencia la presencia de rutina y otras señales con tiempo de retención entre 3 y 3.5 min y la aparición de quercetina después de la reacción con las enzimas β -glucuronidasa/arilsulfatasa.

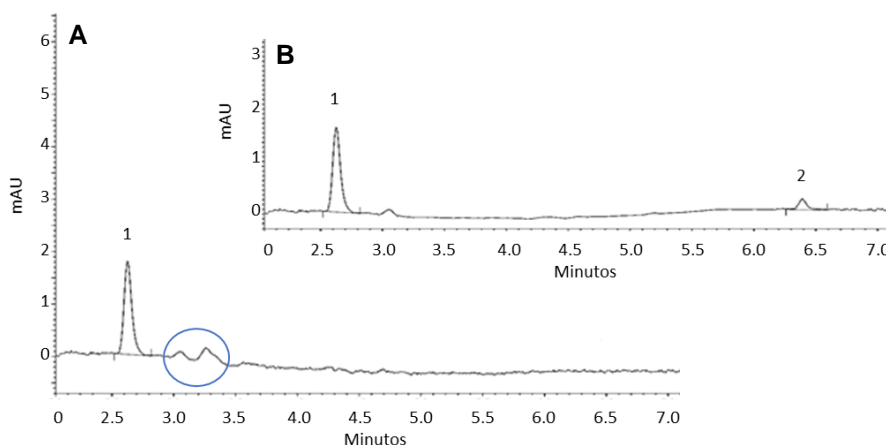


Figura 2-5 Cromatograma representativo de las muestras de los ensayos de permeabilidad. **A:** muestra sin reacción. **B:** muestra sometida a reacción con β -glucuronidasa/arilsulfatasa. 1) Rutina, 2.6 min. 2) Quercetina, 6.4 min. La señal al tiempo de retención de quercetina-3-O-glucurónido (3.2 min) desaparece tras la reacción. Columna Luna® C18, 3 μ m, 75 x 4.6 mm a 20°C; fase móvil ácido fórmico 0.1% (A') y ACN con 0.1% de ácido fórmico, en gradiente de 75% a 65% de A', flujo 1 mL/min y 260 nm.

Los Papp de rutina obtenidos para el estándar, el extracto de cálices de *P. peruviana* y la fracción butanólica, en sentido AP-BL y BL-AP, se resumen en la Figura 2-6 A. El transporte acumulado del marcador en función del tiempo para cada tratamiento se presenta en las Figuras 2-6 B y 2-6 C.

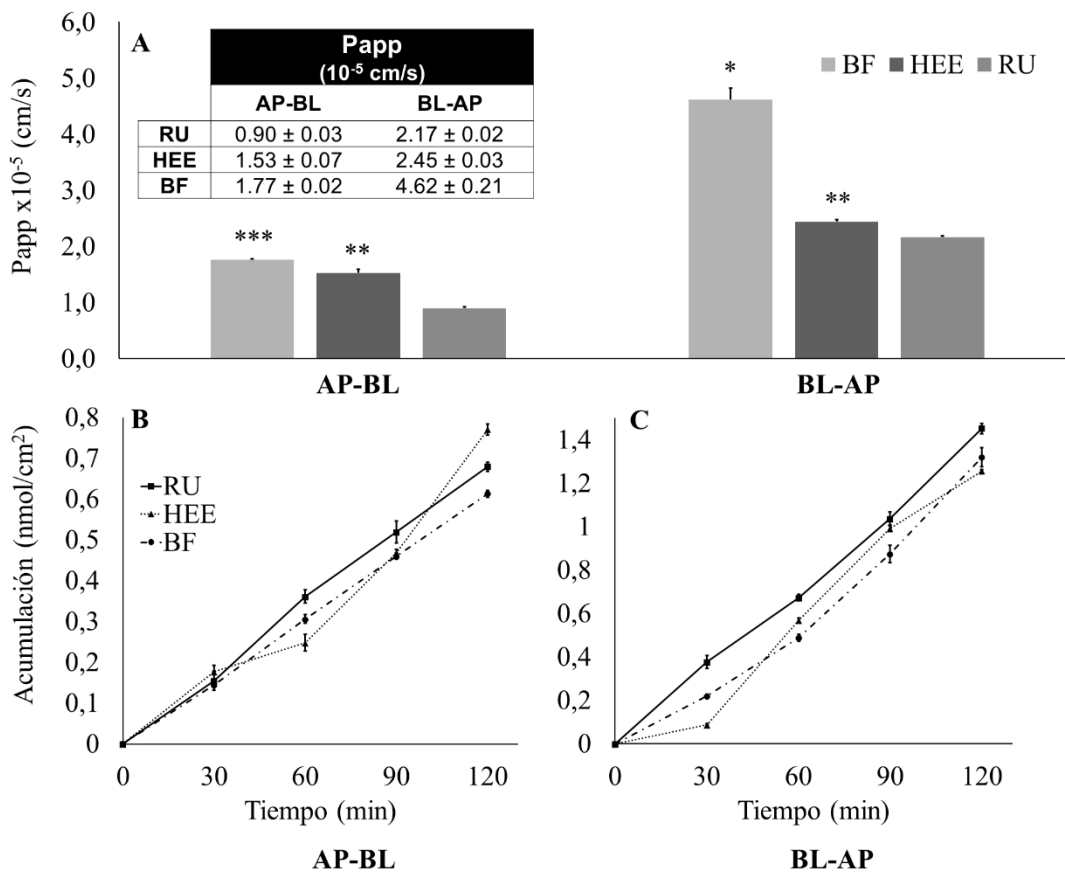


Figura 2-6: Papp y transporte bidireccional de rutina estándar (RU), en el extracto hidroalcohólico de cálices de *P. peruviana* (HEE) y en la fracción butanólica (BF) determinados en el modelo Caco-2.

A: Papp en dirección de apical a basolateral (AP-BL) y de basolateral a apical (BL-AP). **B:** cantidad acumulada de rutina transportada en 1 cm² de la monocapa de células Caco-2 en función del tiempo, en dirección AP-BL. **C:** igual a B en dirección BL-AP. Los datos se representan como promedio ± SD de tres experimentos independientes. *p < 0.01, **p < 0.001, ***p < 0.0001 en relación a RU en cada dirección (ANOVA y HSD).

Los Papp de rutina en el sentido de absorción (AP-BL) bajo diferencial de pH (apical pH 6.5 y basolateral pH 7.4) fueron 0.9 ± 0.03 , 1.53 ± 0.07 y $1.77 \pm 0.02 \times 10^{-5}$ cm/s para rutina estándar, extracto y fracción butanólica respectivamente, siendo significativamente mayor la permeabilidad desde las preparaciones herbales (Figura 2-6 A, Tabla 2-3). Estudios recientes han mostrado evidencia de la participación de los transportadores de glucosa SGLT1 y Glut 2 en la entrada y transporte de rutina en las células Caco-2 (H. Zhang et al., 2020). Consecuentemente con los Papp, los porcentajes de rutina transportada a través de la membrana al final de los experimentos (ecuación 2-3) fueron, en el mismo orden, 17.4 ± 0.3 , 20.3 ± 0.4 y $31.3 \pm 0.4\%$; es decir, que desde el extracto y la fracción se

transportó 17 y 80% más rutina que desde el estándar ($p < 0.001$ y $p < 0.00001$ respectivamente). Visto separadamente, estos resultados sugieren un efecto positivo de la matriz vegetal sobre la permeabilidad de rutina, como ha sido observado por otros autores para distintos flavonoides (Boyer et al., 2004; Henriques et al., 2018; Verjee et al., 2017).

A pesar de lo anterior, si se observan los datos de Papp obtenidos, en comparación con el control de alta permeabilidad, propranolol, que mostró un Papp de $2.44 \pm 0.01 \times 10^{-5}$ cm/s (recuperación $89.8 \pm 0.9\%$), se concluye que la permeabilidad de rutina, incluso desde la fracción, es baja. Para tener una idea de los mecanismos que participan en esta baja permeabilidad, se estudiaron otros factores como el eflujo y el metabolismo, cuyos resultados serán discutidos a continuación.

Tras los experimentos de transporte en sentido BL-AP, se encontraron los Papp de rutina 2.17 ± 0.02 , 2.45 ± 0.03 y $4.62 \pm 0.21 \times 10^{-5}$ cm/s (Figura 2-6 A, Tabla 2-3), esta vez con porcentajes de fármaco transportado de 12.1 ± 0.2 , 10.2 ± 0.1 y $22.0 \pm 0.7\%$ para rutina estándar, extracto y fracción, respectivamente ($p < 0.0001$ frente al compuesto). Sobre estos resultados se pueden resaltar dos aspectos: 1) que en todos los casos, la permeabilidad aparente de rutina en sentido BL-AP fue mayor que la observada de AP a BL y 2) nuevamente se observó la mayor permeabilidad de rutina desde la fracción.

De lo anterior se obtuvo que el ER de rutina en el estándar y en la fracción fue > 2 (2.4 ± 0.08 y 2.6 ± 0.11 , respectivamente), lo que sugiere que, en estos casos, el compuesto fue transportado activamente fuera de las células, corroborando reportes previos de la literatura (Yang et al., 2014; Zhang et al., 2013). La observación más interesante fue que cuando se evaluó el extracto, el ER disminuyó significativamente a 1.6 ± 0.05 ($p < 0.0001$ con respecto al compuesto puro), es decir que componentes del extracto, que no están presentes en la fracción, podrían tener una función inhibitoria sobre los transportadores de eflujo involucrados en el transporte de rutina, o llegarían a saturar a tales proteínas; esta posible saturación podría estar relacionada con la mayor cantidad de compuestos presentes en los extractos crudos, que estarían disponibles para interactuar con el transportador.

Dado que varios autores han señalado el papel de P-gp en el eflujo de rutina (Zhang et al., 2013), se determinó el ER del estándar en presencia de verapamilo (un inhibidor de P-gp). Como resultado se obtuvo que el alto ER observado para la rutina pura se reversó

completamente hasta valores de 0.52 ± 0.02 ($p < 0.00001$, Figura 2-7), con un aumento importante en el Papp AP-BL (0.9 ± 0.03 vs $3.06 \pm 0.07 \times 10^{-5}$, $p < 0.00001$). Este resultado confirma la participación de P-gp en el eflujo del flavonoide; entonces, el menor ER de rutina desde el extracto podría ser una consecuencia de la saturación o inhibición concretamente de P-gp. La influencia de los componentes de preparaciones herbales sobre el eflujo de rutina fue previamente estudiada por Gao et al., (2010) quienes encontraron valores de ER entre 1 y 3.64 para distintas formulaciones con Hierba de San Juan, aunque en este caso los extractos presentaron mayor ER que el compuesto puro (Gao et al., 2010).

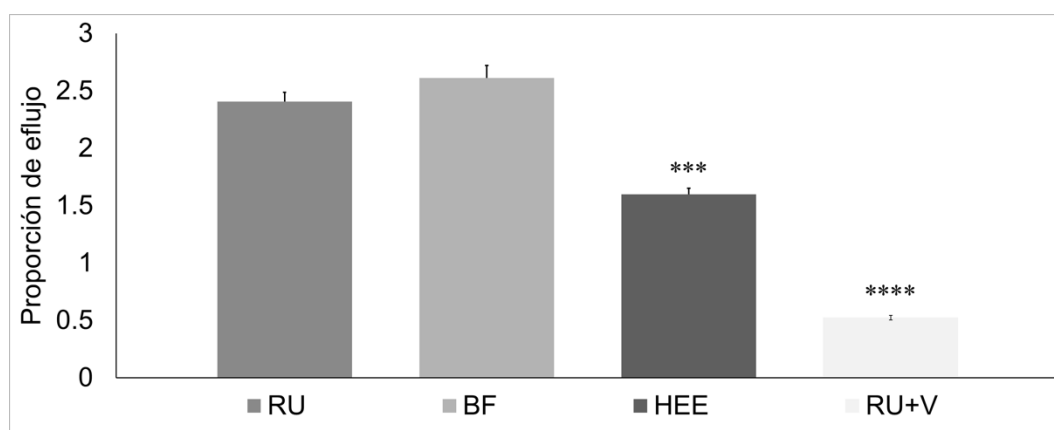


Figura 2-7: Proporción de eflujo de rutina estándar (RU), en el extracto de cálices de *P. peruviana* (HEE), en la fracción butanólica (BF) y en combinación con verapamilo (RU+V). ER fue calculado como Papp BL-AP/Papp AP-BL. V: 100 μ M, aplicado en los compartimentos apical y basolateral. Las barras representan el promedio de tres experimentos independientes \pm SD. *** $p < 0.0001$, **** $p < 0.00001$ en relación a RU (ANOVA y HSD).

Según la literatura, otro aspecto que condiciona la permeabilidad de los polifenoles, es el metabolismo intestinal (Braune & Blaut, 2016; Kawabata et al., 2019; Ozdal et al., 2016). En el caso de rutina, su hidrólisis en quercetina y la conjugación con ácido glucurónico y sulfato son procesos ya conocidos (Andlauer et al., 2001; Xiaofang Zhang et al., 2013) que ocurren, entre otros, debido a la acción de enzimas del citocromo P450, glicosilasas, UDP-glucuronosiltransferasas y sulfotransferasas que se expresan en las células Caco-2 (Meinl et al., 2008; Xiaofang Zhang et al., 2013). En esta investigación, se evaluó la formación de potenciales conjugados glucurónico y sulfato de rutina y quercetina, por tratamiento de las muestras con las enzimas β -glucuronidasa/arilsulfatasa, según el protocolo descrito en los

resultados del capítulo 1 (Tabla 1-9). La f_{met} de rutina (ecuación 2-5) encontrada en los ensayos de transporte bidireccional con el estándar, el extracto y la fracción, se presenta en la Tabla 2-3. Los resultados indican que en dirección AP-BL el metabolismo de rutina fue mayor a partir del extracto, mientras que en la dirección opuesta, no se detectaron metabolitos desde el extracto y la f_{met} de la fracción fue mayor que la del estándar. La mayor metabolización de rutina desde el extracto en el sentido de absorción coincide con su menor ER, sugiriendo que más cantidad del compuesto pudo permanecer en la célula para su metabolización. Lo opuesto era esperado para el estándar y la fracción, que presentaron menor permeabilidad y/o mayor ER, lo que al final reduciría la entrada de rutina o quercetina a las células.

Tabla 2-3: Fracción metabolizada (f_{met}) y recuperación de masa en los experimentos de transporte bidireccional de rutina a partir del estándar (RU), del extracto hidroalcohólico de cálices de *P. peruviana* (HEE) y de la fracción butanólica (BF).

	Dirección	f_{met} (% \pm SD) ¹	Recuperación (%) ²
RU	AP-BL	3.9 \pm 0.8	79.0 \pm 1.27
	BL-AP	4.5 \pm 0.1	85.8 \pm 5.9
HEE	AP-BL	12.4 \pm 1.9*	85.9 \pm 1.36
	BL-AP	n.d.	72.2 \pm 0.63
BF	AP-BL	1.6 \pm 0.3*	96.7 \pm 3.65
	BL-AP	10.6 \pm 0.5**	85.4 \pm 1.08

¹ f_{met} fue calculado como metabolitos totales/dosis y expresado en %. Los datos se representan como promedio \pm SD de tres experimentos independientes. n.d: no detectado. ² Recuperación (balance de masas) considerando f_{met} . * $p < 0.01$, en relación a RU en dirección AP-BL. ** $p < 0.001$ en relación a RU en dirección BL-AP (ANOVA y HSD).

En los ensayos de permeabilidad aparente en Caco-2, es recomendable la medición de la recuperación, entendida como la sumatoria del fármaco (o sus derivados) recuperado del compartimento receptor y del remanente encontrado en el donador al final del experimento y expresada en porcentaje de la cantidad inicial aplicada. En general, cuando la recuperación es $< 80\%$, pueden estar ocurriendo la adhesión del compuesto al plástico de las placas de ensayo, la degradación química del analito o su retención en el interior de las células (Hubatsch et al., 2007).

En los ensayos presentados aquí, se observó un porcentaje de recuperación < 80% en los experimentos con el extracto en dirección BL-AP (Tabla 2-3), en este caso, la adhesión de rutina al plástico se considera poco probable debido a que para los otros experimentos se consiguió una recuperación aceptable. Por otro lado, la estabilidad de rutina en las condiciones de los ensayos de permeabilidad fue demostrada durante la validación del método analítico (Tabla 1-11), quercetina en cambio, resultó susceptible de degradación en HBSS pH 7.4 y 37°C, lo que podría implicar que parte del metabolito que se pudo haber formado durante los experimentos de transporte, no pudo ser cuantificado, de hecho, no se detectó quercetina libre en ninguna de las muestras. Sin embargo, los antecedentes revisados hasta ahora en la literatura coinciden en que los principales metabolitos de glicósidos de quercetina en enterocitos, son los conjugados glucurónido y sulfato y no la propia aglicona (Andlauer et al., 2001; Z. Liu & Hu, 2007; L. Wang et al., 2019; Xiaofang Zhang et al., 2013).

Del análisis anterior queda como hipótesis para explicar la menor recuperación de rutina en los ensayos de permeabilidad BL-AP con el extracto, la acumulación intracelular del marcador o sus metabolitos, lo cual explicaría también que no se hayan detectado conjugados en este caso particular (Tabla 2-3). De la literatura se sabe que, dada su polaridad, los conjugados requieren de transportadores para salir de la célula, es posible que el mecanismo por el cual el extracto disminuiría la proporción de eflujo lleve también a la acumulación intracelular de los conjugados (Z. Liu & Hu, 2007; L. Wang et al., 2019).

El conjunto de los resultados obtenidos muestran que rutina a partir del extracto de cálices de *P. peruviana* presenta mayor Papp que el compuesto, acompañado de un menor eflujo y una mayor metabolización (Figura 2-8); interesantemente este comportamiento fue diferente al observado para la fracción butanólica derivada del extracto, lo cual soporta las observaciones de otros autores sobre la influencia de la matriz de compuestos presentes en extractos de plantas, sobre la absorción intestinal de los componentes individuales, como resultado de interacciones a distintos niveles (Boyer et al., 2004; Gao et al., 2010; Henriques et al., 2018; Li et al., 2019; Verjee et al., 2017). La evidencia en la literatura también indica que la aplicación de mecanismos destinados a proteger a rutina de la degradación biológica y el eflujo, mejoran la biodisponibilidad del compuesto (Ahmad, Ahmad, Naqvi, Alam, Ashafaq, et al., 2016; Ahmad, Ahmad, Naqvi, Alam, Samim, et al., 2016). Como se ha venido resaltando, rutina a partir del extracto de cálices de *P. peruviana* mostró el menor eflujo pero también la mayor metabolización, para entender las

implicaciones de estas dos características en la biodisponibilidad, es necesario estudiar el desempeño farmacocinético *in vivo* del extracto.

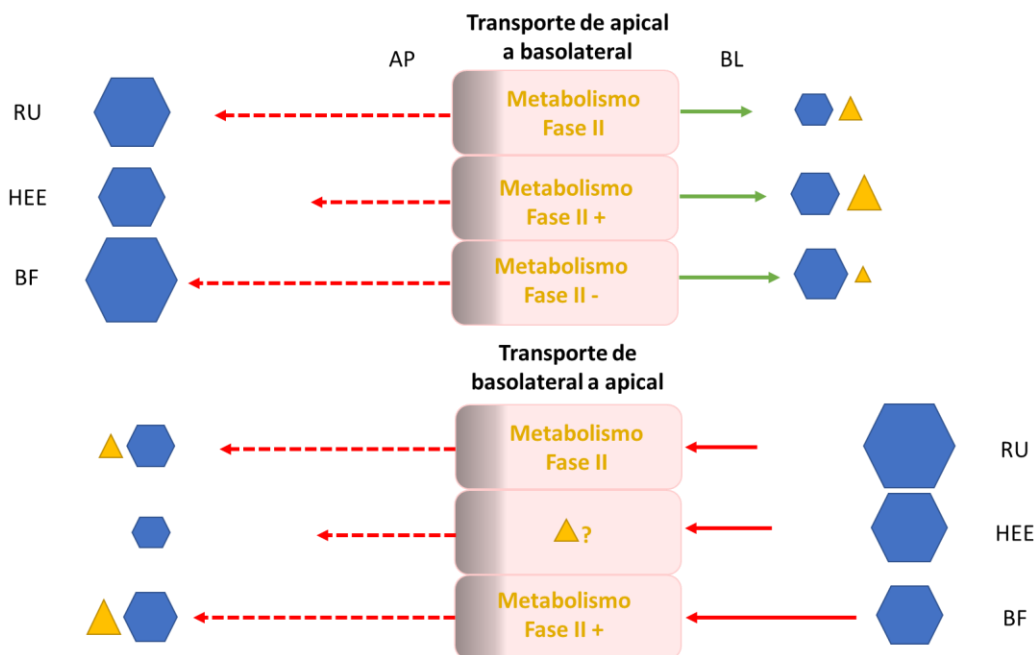


Figura 2-8 Representación gráfica de la permeabilidad aparente de rutina en el modelo Caco-2, a partir del estándar (RU), del extracto hidroalcohólico de cálices de *P. peruviana* (HEE) y de la fracción butanólica (BF).

: enterocitos. : rutina. : metabolitos conjugados derivados de rutina. → : coeficientes de permeabilidad aparente (Papp) en sentido apical (AP) a basolateral (BL). → : Papp en sentido BL-AP. - - - → : proporciones de eflujo (ER). En sentido AP-BL, rutina en BF y HEE fue más permeable que en RU, HEE mostró mayor metabolismo que RU y BF. ER de rutina fue menor desde HEE. Se propone que hubo acumulación intracelular de conjugados desde HEE en sentido BL-AP, por bloqueo de eflujo, se requerirían experimentos adicionales para confirmar este aspecto.

Adicionalmente, en trabajos independientes del grupo de investigación Silicomoba, se determinó la solubilidad de rutina pura y en el extracto de cálices de *P. peruviana* y la fracción butanólica a distintos pH, obteniendo la menor solubilidad a pH 7.4 con valores de 0.205 ± 0.002 , 2.988 ± 0.07 y 0.189 ± 0.005 mg/ml, respectivamente ($p < 0.001$ entre el extracto y los otros tratamientos en ANOVA y HSD). De acuerdo a los criterios del sistema de clasificación biofarmacéutica (BSC, por sus siglas en inglés), rutina desde el extracto fue categorizada como de alta solubilidad, mientras que en el compuesto puro y la fracción presentó baja solubilidad (Domínguez Moré et al., 2020).

Según el mismo BSC, los resultados observados en esta investigación, donde el Papp de rutina en las distintas fuentes fue menor que el del control de alta permeabilidad (propranolol), llevan a la categorización de rutina dentro del grupo de fármacos con baja permeabilidad.

A partir de lo anterior, se pudo establecer una clasificación biofarmacéutica para rutina pura, en el extracto y en la fracción butanólica (Tabla 2-4). Se observó que el extracto de cálices de *P. peruviana*, mejora las características biofarmacéuticas de rutina, por incremento de su solubilidad. Otros investigadores han observado este hecho para distintos compuestos marcadores en otros extractos vegetales, relacionándolo con la presencia de polifenoles y saponinas que no necesariamente tienen actividad farmacológica (Wagner, 2009; Rasoanaivo et al., 2011).

Tabla 2-4: Clasificación biofarmacéutica de rutina estándar (RU), en el extracto hidroalcohólico de cálices de *P. peruviana* (HEE) y en la fracción butanólica (BF).

	Clasificación según solubilidad	Clasificación según permeabilidad	Clasificación según el BSC¹
RU	Baja	Baja	IV
HEE	Alta	Baja	III
BF	Baja	Baja	IV

La solubilidad se refiere a pH 7.4, la permeabilidad se clasificó en el modelo Caco-2. BSC: sistema de clasificación biofarmacéutica. ¹ (FDA/CDER, 2017).

Este último aporte se suma a los esfuerzos que vienen realizando varios autores para establecer cómo aplicar el BCS a procesos de investigación y desarrollo de nuevos productos fitoterapéuticos y para el propósito de evaluar la bioequivalencia entre ellos (X. Cao et al., 2020; Fong et al., 2013; Li et al., 2019; Pérez-Sánchez et al., 2017; Waldmann et al., 2012). Se requieren más investigaciones en este sentido para superar los retos que implican la complejidad de esta clase de productos y la variabilidad lote a lote.

En el siguiente capítulo se estudiará si la mejora observada en términos biofarmacéuticos desde el extracto, se manifiesta en una mejor biodisponibilidad de rutina.

2.4 Conclusiones

- 1) En el modelo Caco-2, rutina está sujeta a metabolización con formación de conjugados glucurónido y sulfato y a eflujo con participación de P-gp.
- 2) La matriz vegetal donde se encuentre el flavonoide rutina tiene efecto sobre su permeabilidad en el modelo Caco-2.
- 3) Rutina en el extracto de cálices de *P. peruviana* presentó mayor permeabilidad, menor eflujo y mayor tasa de metabolización que el compuesto puro.

3. Estudio farmacocinético de quercetina-3-O-rutinosido (rutina) y sus metabolitos principales tras la administración del extracto estandarizado de cálices de *Physalis peruviana* en ratas y conejos

3.1 Aspectos teóricos

3.1.1 Farmacocinética

La farmacocinética estudia el curso temporal de las concentraciones/cantidades de los fármacos (y en ocasiones de sus metabolitos) en el cuerpo y construye modelos adecuados para la descripción de su absorción, distribución, metabolismo y excreción, procesos que en conjunto definen la exposición sistémica de las moléculas activas, la cual está relacionada, generalmente, con la respuesta farmacológica (Shargel & Yu, 2015).

La biodisponibilidad (F), se refiere a la extensión y velocidad con la que el fármaco llega a la circulación sistémica y por extensión a su sitio de acción, tras ser administrado en un individuo. Su estimación permite, entre otros aspectos, tener información sobre la fracción de fármaco absorbida, la proporcionalidad de su dosis y el efecto de sustancias administradas concomitantemente sobre su exposición sistémica (El-Kattan & Varma, 2012).

La información farmacocinética se obtiene del análisis de curvas que representan la relación concentración plasmática (Cp) del fármaco vs tiempo, obtenidas experimentalmente (Figura 3-1). A partir de estas curvas se pueden hacer análisis independientes o dependientes de modelos, estos últimos permitirán hacer predicciones de datos de interés clínico.

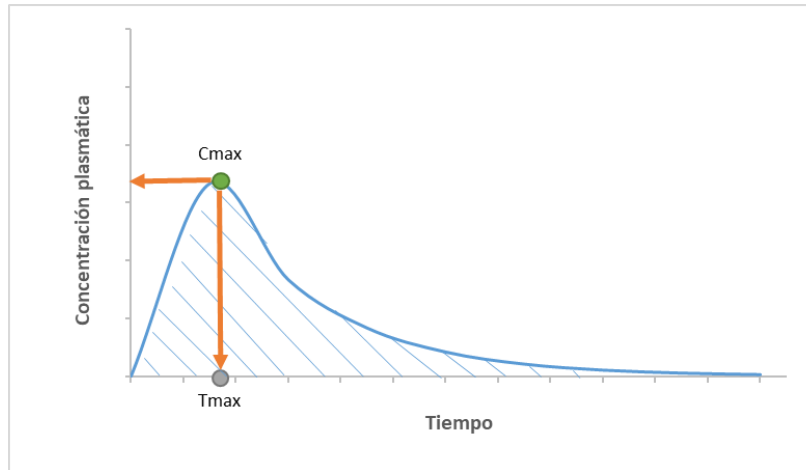



Figura 3-1: Curva concentración plasmática vs tiempo.

La gráfica representa algunos parámetros farmacocinéticos no compartimentales. ● Cmax: concentración máxima; ● Tmax: tiempo para la concentración máxima;  área bajo la curva (AUC).

3.1.2 Análisis farmacocinético no compartimental

El análisis farmacocinético no compartimental considera la curva Cp vs tiempo como una curva de distribución estadística a partir de la cual se pueden determinar los siguientes parámetros (Tabla 3-1):

Tabla 3-1: Parámetros del análisis farmacocinético no compartimental

Parámetro	Descripción	Ecuación
Constante de velocidad de la fase terminal (λ_z o k_e)	Constante de velocidad de primer orden. Está relacionada con la fracción de fármaco eliminado del cuerpo en una unidad de tiempo, en la fase terminal (Shargel & Yu, 2015).	Regresión lineal de la fase terminal de la curva Cp vs tiempo, en su forma logarítmica.
Área bajo la curva (AUC, por sus siglas en inglés)	Integral de la curva Cp vs tiempo, está relacionada con la cantidad de fármaco que alcanza la circulación sistémica (Figura 3-1) (Aguilar Ros et al., 2014).	$AUC_0^\infty = \left[\sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} \cdot (C_i + C_{i+1}) \right] + \left[\frac{C_n}{\lambda_z} \right]$ <p>Donde, AUC_0^∞ es el área bajo la curva extrapolada al infinito; C_i, t_i y C_{i+1}, t_{i+1}, son dos parejas de datos Cp-tiempo sucesivas; C_n es la última concentración experimental.</p>

Tabla 3-1: (Continuación)

Parámetro	Descripción	Ecuación
Área bajo el primer momento de la curva (<i>AUMC</i> , por sus siglas en inglés)	Integral de la curva Cp-t vs tiempo, se utiliza para calcular el tiempo medio de residencia (Aguilar Ros et al., 2014).	$AUMC_0^\infty = \left[\sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} \cdot (C_i \cdot t_i + C_{i+1} \cdot t_{i+1}) \right] + \left[\frac{t_n C_n}{\lambda_z} + \frac{C_n}{\lambda_z^2} \right]$ <p>Donde, $AUMC_0^\infty$ es el área bajo el primer momento de la curva extrapolada al infinito; t_n es el tiempo de la última concentración experimental.</p>
Tiempo medio de residencia (<i>MRT</i> , por sus siglas en inglés)	Representa el tiempo promedio que una molécula de fármaco permanece en el cuerpo (Aguilar Ros et al., 2014).	$MRT_0^\infty = \frac{AUMC_0^\infty}{AUC_0^\infty}$ <p>Donde, MRT_0^∞ es el tiempo de residencia medio extrapolado al infinito.</p>
Aclaramiento (<i>Cl</i> , por sus siglas en inglés)	Volumen de fluido que es depurado de fármaco en una unidad de tiempo (Shargel & Yu, 2015).	$Cl = \frac{D_{i.v.}}{AUC_0^\infty i.v.}$ <p>Donde D_{iv}, se refiere a la dosis administrada por vía i.v.</p>
Volumen de distribución en estado estacionario (<i>Vdss</i>)	Volumen de sangre (plasma) hipotético, en el cual se asume que el fármaco ha sido depositado tras su administración por vía i.v., para explicar la Cp observada (Yates & Arundel, 2008).	$Vd_{ss} = Cl \cdot MRT_0^\infty i.v.$
Volumen de distribución en el pseudo equilibrio (<i>Vdz</i>)	Volumen de distribución asociado a la fase terminal (Gobburu & Holford, 2001).	$Vdz = \frac{Cl}{\lambda_z}$
Concentración máxima (<i>Cmax</i>)	Máxima Cp obtenida tras la administración extravascular de un fármaco (Figura 3-1).	Generalmente se obtiene directamente de la curva Cp vs tiempo.
Tiempo máximo (<i>Tmax</i>)	Tiempo para alcanzar la Cmax (Figura 3-1).	Generalmente se obtiene directamente de la curva Cp vs tiempo.
Vida media terminal ($t_{1/2}$)	Tiempo requerido para disminuir en 50% la concentración plasmática del fármaco en la fase terminal (Shargel & Yu, 2015).	$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{\lambda_z}$
Biodisponibilidad (<i>F</i>)	Extensión y velocidad a la cual un fármaco alcanza la circulación sistémica y llega estar disponible en el sitio de acción (Aguilar Ros et al., 2014).	$F = \frac{AUC_0^\infty p.o.}{AUC_0^\infty i.v.} \cdot \frac{D_{i.v.}}{D_{p.o.}}$ <p>Donde D, se refiere a la dosis; p.o. se refiere a la administración por vía oral (u otra vía que implique absorción) e i.v. a la administración por vía intravenosa.</p>

De los parámetros descritos, Cl y Vd son los considerados parámetros farmacocinéticos primarios, porque dependen directamente de las características fisicoquímicas de los fármacos y de las condiciones fisiológicas del organismo donde es administrado, siendo independientes de otros parámetros farmacocinéticos. Para fármacos administrados por vías enterales se considera también un parámetro primario independiente la F, en ésta influyen, además de las características mencionadas, aspectos relacionados con las formulaciones. El resto de parámetros enlistados, son derivados de los primarios (L Z Benet, 1984; Helms & Quan, 2006).

Aunque por definición el análisis no compartimental es independiente de modelos, la teoría de momentos estadísticos en la cual se basa, es aplicable sólo bajo el supuesto que la eliminación del compuesto ocurre exclusivamente desde el fluido que se está midiendo, generalmente el plasma (Yates & Arundel, 2008).

Cuando la farmacocinética es lineal, la velocidad de desaparición del fármaco del plasma depende únicamente de la concentración remanente y la $t_{1/2}$ es constante, bajo estas condiciones el AUC es proporcional a la dosis, es decir que un aumento de 50% en la dosis, generará un aumento de 50% en el AUC (Shargel & Yu, 2015).

3.1.3 Modelos compartimentales

Existen varios enfoques para el modelamiento de datos de estudios farmacocinéticos, entre estos, los modelos compartimentales mamilares son ampliamente usados por su practicidad y la capacidad de describir aceptablemente datos experimentales de Cp vs tiempo con funciones matemáticas, aun cuando no guardan correspondencia exacta con conceptos fisiológicos.

Desde el punto de vista más simple, un compartimento es un espacio hipotético dentro del cuerpo donde se distribuye el fármaco, esta distribución involucra movimiento en una dirección y a una velocidad característica. Cada compartimento hipotético agrupa órganos y tejidos que comparten características de distribución, partiendo de la concepción de un compartimento central, que representa el plasma y los tejidos más irrigados, y otros periféricos que agrupan tejidos menos irrigados y que, en conjunto, llegarán a estar en equilibrio con el central. Los órganos destinados a la eliminación del fármaco, como hígado (metabolismo) y riñones (excreción urinaria), en general se consideran dentro del

compartimento central y en todo el sistema se conserva el balance de masa, a partir de la dosis de fármaco administrada.

La Figura 3-2 describe la disposición sistémica de un fármaco administrado por vía oral o por vía intravenosa en forma de bolus (i.v.). El ejemplo corresponde a un modelo de dos compartimentos: un compartimento central a donde llega el fármaco una vez es absorbido o introducido directamente en bolus y desde donde se distribuye a un compartimento periférico (tejidos y órganos menos irrigados *P.ej.*: músculo, hueso, tejido adiposo), con el que eventualmente entrará en equilibrio.

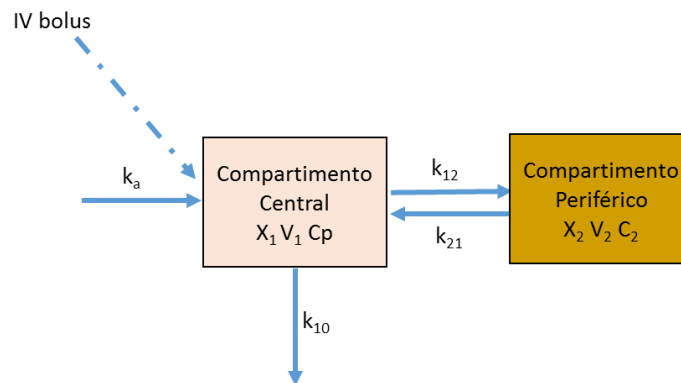


Figura 3-2: Representación esquemática de un modelo de dos compartimentos.

X : cantidad de fármaco en cada compartimento. V : volumen de cada compartimento. C_p : concentración plasmática (compartimento central). C_2 : concentración en compartimento periférico. k : constantes de velocidad de orden 1 asociadas a los procesos de absorción (k_a), distribución (k_{12} , k_{21}) y eliminación (k_{10}).

En los modelos compartimentales como el del esquema, las constantes de velocidad (k) son usadas para representar la tasa general de los procesos de entrada y salida del fármaco de los compartimentos, los cuales, junto con el volumen asociado a ellos, gobiernan la concentración del fármaco en el tiempo (Shargel & Yu, 2015). Es así que los términos k_a , k_{12} , k_{21} y k_{10} (usualmente abreviado como k_e), representan la fracción de fármaco por unidad de tiempo que es absorbido y alcanza el compartimento central (k_a), la que se distribuye hacia el compartimento periférico (k_{12}), la que regresa al compartimento central desde el periférico (k_{21}) y la que se elimina irreversiblemente desde el compartimento central (k_e).

La aplicación de modelos matemáticos a datos de C_p vs tiempo tras la administración del fármaco en un modelo animal o en humanos, permite calcular los parámetros Cl , V_d y las distintas constantes de velocidad de eliminación, previa aceptación de algunos supuestos como son: que la C_p refleja la concentración global del fármaco dentro del cuerpo, que todos los compartimentos son homogéneos en su interior y que la tasa de eliminación o de transferencia de un compartimento a otro es proporcional a la cantidad de sustancia en el compartimento original (velocidad de primer orden) (Rescigno, 2010).

El modelamiento farmacocinético puede ser utilizado para:

- Predecir los niveles de fármaco en plasma, tejidos y orina con cualquier régimen de dosificación.
- Calcular la dosis óptima de un fármaco.
- Estimar la posible acumulación de fármacos y sus metabolitos.
- Correlacionar concentraciones plasmáticas con actividad farmacológica o toxicológica.
- Evaluar diferencias en la biodisponibilidad entre formulaciones.
- Describir el efecto de cambios fisiológicos o enfermedades sobre la farmacocinética de una molécula.
- Explicar interacciones entre fármacos (Shargel & Yu, 2015).

En el caso de la farmacocinética a nivel preclínico, la información generada puede ser utilizada para predecir parámetros que describan la absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos en humanos, identificar la formación de metabolitos potencialmente tóxicos, diseñar estudios toxicológicos específicos, diseñar estudios clínicos y como insumo para definir la dosis inicial máxima recomendada para los primeros ensayos clínicos en humanos (European Medicines Agency, 2013; FDA/CDER, 2005, 2006, 2020).

3.1.4 Farmacocinética aplicada a extractos vegetales

Dado que los extractos vegetales, preparaciones poliherbales y productos fitoterapéuticos contienen mezclas de compuestos conocidos y desconocidos, el estudio de su farmacocinética se basa en el seguimiento de la concentración plasmática en el tiempo de compuestos seleccionados como marcadores. Este tema de estudio ha venido

despertando el interés de investigadores a nivel mundial. Una búsqueda sistemática de artículos científicos originales en idioma inglés, que aportaron valores de parámetros farmacocinéticos de compuestos marcadores tras la administración de preparaciones a base de plantas, en animales o humanos sanos, arrojó 128 investigaciones publicadas entre 2004 y 2014 (Domínguez Moré et al., 2017); mientras que, entre 2015 y 2019, fueron encontradas 305 publicaciones con los criterios de búsqueda mencionados (Figura 3-3). La mayoría de todas estas investigaciones fueron realizadas por autores de origen Chino.

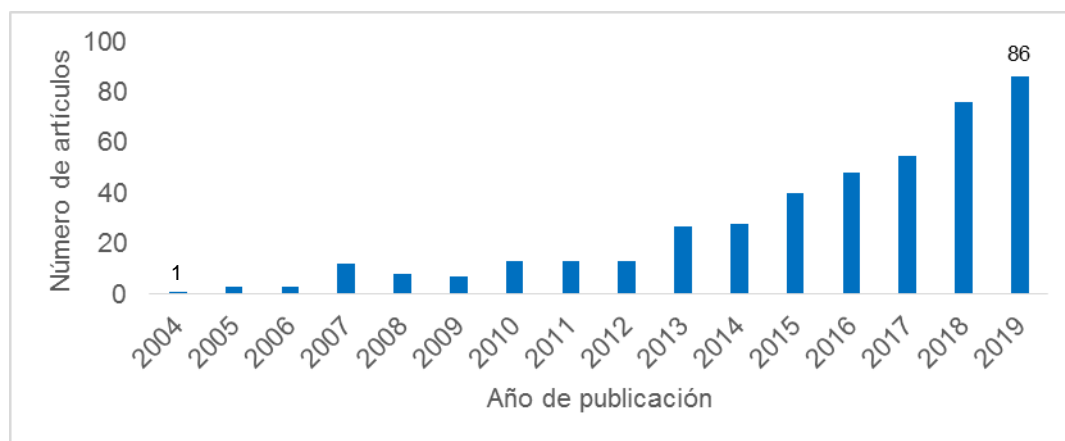


Figura 3-3: Publicaciones sobre farmacocinética de extractos, preparaciones poliherbales y productos fitoterapéuticos de 2004 a 2019.

Resultado de búsqueda en las bases de datos Science Direct, SciELO, Scopus, LILACS, SpringerLink, Taylor & Francis y PubMed; con las palabras clave "*pharmacokinetics*" AND "*plant*" OR "*natural product*". Artículos que reportan parámetros farmacocinéticos obtenidos tras la administración de extractos, preparaciones poliherbales o productos fitoterapéuticos, en animales o humanos sanos. Actualizado de (Domínguez Moré et al., 2017).

Estudios farmacocinéticos en plantas medicinales a nivel preclínico, han sido realizados principalmente en especies roedoras, siendo las ratas Sprague-Dawley y Wistar los modelos más utilizados. Especies no roedoras empleadas para este fin han sido perros Beagle, conejos New Zealand, cerdos Yorkshire y pollos. En todos los casos, la vía de administración de preferencia es la oral, con administración en dosis única, aunque diferentes dosis por grupos o periodos suelen ser administradas con el fin de evaluar la linealidad farmacocinética de los marcadores, que corresponden principalmente a polifenoles (Domínguez Moré et al., 2017).

La baja biodisponibilidad de los compuestos activos es el principal reto en el desarrollo de nuevos fitoterapéuticos y en la propia ejecución de sus estudios farmacocinéticos, que requieren técnicas de cuantificación de alta sensibilidad, o la aplicación de métodos indirectos para la cuantificación de metabolitos. Esta biodisponibilidad está condicionada por las características fisicoquímicas de los compuestos y por mecanismos relacionados con su permeabilidad intestinal como son: la metabolización presistémica por bacterias de la flora o por los enterocitos y el eflujo al lumen intestinal. En el caso particular de los polifenoles, se ha descrito que pueden ser conjugados en los enterocitos con ácido glucurónico, grupos sulfato o metilos. Los metabolitos conjugados pueden ser transportados fuera de los enterocitos y desconjugados por la acción de β -glucuronidasas, presentes principalmente en el intestino grueso, pasando a ser reabsorbidos en ese órgano (recirculación entérica), lo que lleva a un aumento de la vida media de los polifenoles independientemente de su CI intrínseco (Z. Liu & Hu, 2007; L. Wang et al., 2019).

Una vez en la circulación sistémica, la unión a proteínas plasmáticas de los polifenoles es variable dependiendo de su estructura química, se ha encontrado, por ejemplo, que los flavonoles como quercetina presentan mayor afinidad por la albúmina humana que las flavonas, como consecuencia de la hidroxilación en la posición 3 (anillo C, Figura 3-4). Asimismo, la hidroxilación en la posición 3' (anillo B) de los flavonoles, aumenta la afinidad por la albúmina humana y bovina, mientras que la glicosilación (especialmente en la posición 3) disminuye esta afinidad. Como es sabido, la unión a proteínas plasmáticas aumenta el tiempo de residencia de los fármacos en el organismo (H. Cao et al., 2019; Xiao & Kai, 2012).

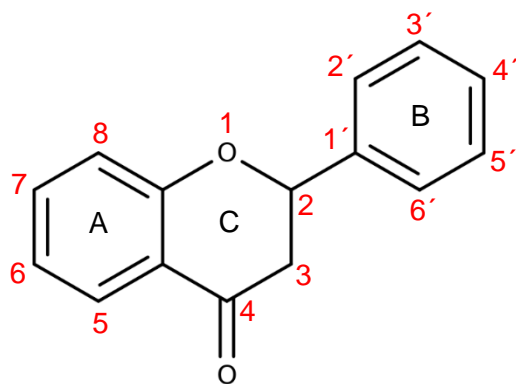


Figura 3-4: Estructura base flavonas

En cuanto al metabolismo hepático, al igual que ocurre a nivel intestinal, la mayoría de polifenoles están sujetos principalmente a conjugación con ácido glucurónico y sulfato. Sin embargo, también pueden ocurrir reacciones de oxidación por isoenzimas del citocromo P450 (CYPs) y conjugaciones con metilo (Z. Liu & Hu, 2007; Scheepens et al., 2010). Algunos de los polifenoles o sus derivados metabólicos que pasan a la bilis, pueden ser depositados en el lumen intestinal y allí hidrolizados y reabsorbidos (circulación enterohepática) (L. Wang et al., 2019).

Finalmente, los polifenoles y sus derivados son eliminados a través de la bilis (heces) u orina (Z. Liu & Hu, 2007; Scheepens et al., 2010). Todos estos aspectos en conjunto definen su exposición sistémica.

3.1.5 Farmacocinética de rutina

Rutina, el glicósido (rutinosa) de quercetina, es un flavonoide muy común en la naturaleza y de amplio interés terapéutico, por lo cual existen varios estudios dirigidos a entender su farmacocinética, en un intento por explicar su actividad farmacológica como antidiabético, anti-inflamatorio, antimicrobiano y protector hepático, renal, cardiaco y neuronal (Chua, 2013; Enogieru et al., 2018; Ganeshpurkar & Saluja, 2017; Ghorbani, 2017; Gullón et al., 2017).

La farmacocinética de rutina ha sido investigada en ratas Sprague-Dawley, ratas Wistar, perros Beagles, vacas y humanos, bien sea a partir del compuesto puro, o tras la administración de extractos, fracciones o formulaciones polihierbales que contienen el flavonoide. En general la absorción de rutina intacta es baja y la mayor parte del compuesto termina siendo convertido a quercetina, por la acción de enzimas en el tracto digestivo, principalmente β -glucosidasa y α -rhamnosidasa de bacterias presentes en el colon. Como ha sido mencionado antes, la aglicona que ingresa al enterocito suele ser conjugada con ácido glucurónico y sulfatos antes de pasar a la sangre, por lo cual Q3OG y Q3OS son las especies que se encuentran en mayor abundancia en el plasma tras la administración de rutina. Quercetina-3'-O-metilo (isorhamnetina) y sus conjugados, también han sido reportados como metabolitos de rutina, circulantes en plasma de especies animales (Berger et al., 2012; Ou-yang et al., 2013; Reinboth et al., 2010). Otros metabolitos como kaempferol y tamarixetin han sido identificados, aunque con menos frecuencia (Berger et al., 2012; Reinboth et al., 2010; Shimoi et al., 2003).

En cuanto a los parámetros farmacocinéticos, la mayoría de autores ha aplicado análisis no compartimental para describir la cinética de rutina o sus metabolitos. Cuando se aplicó el modelo compartimental, la distribución de rutina ha sido descrita como de dos o tres compartimentos (Ou-yang et al., 2013; S.-Y. Wang et al., 2010). El detalle de los parámetros reportados para rutina y/o sus metabolitos en distintas especies, se encuentra en las Tablas 3-2 y 3-3. En resumen, sólo ha sido reportado un valor de Cl de 0.3 L/h/kg tras la administración i.v. de rutina a partir de un extracto de *Crataegus pinnatifida*; en el mismo estudio se reportó el único valor de V_{dss} de 0.1 L/kg y una $t_{1/2}$ de 1 h (S.-Y. Wang et al., 2010). En cuanto a la vía oral, el T_{max} reportado para rutina desde distintas fuentes oscila entre 0.26 y 10 h, el MRT entre 1 y 27 h y la $t_{1/2}$ entre 0.8 y 13 h. De acuerdo a la revisión realizada, los únicos valores de k_a y Cl_{oral} reportados para rutina en ratas son 0.2 h⁻¹ (Kammalla et al., 2014) y 6 L/h/kg (B. Bin Wei et al., 2017) respectivamente, ambos obtenidos tras la administración de extractos de plantas. Para quercetina libre y sus conjugados, como metabolitos de rutina, administrada oralmente en ratas, se ha reportado $MRT > 9$ h y $Cl > 9.86$ L/h/kg (Zhao et al., 2011); no se encontraron reportes de estudios farmacocinéticos de rutina en conejos.

Tabla 3-2 Parámetros farmacocinéticos reportados para rutina a partir de distintas fuentes.

Especie	Sustancia administrada	Dosis rutina	Vía de administración	Tipo de análisis	Rutina								Referencia	
					Tmax	Cmax	AUC _{0-∞}	MRT	Vd	Cl	t _{1/2}	ka		ke
Ratas Wistar	Rutina + Quercetina	2.5 mg/kg	v.o.	NC	4.17 ± 1.19 h	61.1 ± 29.3 ng/mL	456.67 ± 29.80 ng·h/mL	11.9 ± 1.5 h	-	-	-	0.242 ± 0.04 h ⁻¹	-	(Kammalla et al., 2014)
	Formulación polihierbal				4.43 ± 0.85 h	121.7 ± 19.2 ng/mL	731.40 ± 31.15 ng·h/mL	7.4 ± 1.1 h	-	-	-	0.2753 ± 0.01 h ⁻¹	-	
	Extracto de <i>Crataegus pinnatifida</i>	1.76 mg/kg	i.v.	3C	-	-	-	-	0.0814 ± 0.025 L/kg	0.370 ± 0.075 L/h/kg	0.936 ± 0.022 h	-	-	(S.-Y. Wang et al., 2010)
		3.52 mg/kg			-	-	-	-	0.123 ± 0.031 L/kg	0.323 ± 0.013 L/h/kg	1.07 ± 0.39 h	-	-	
	Fración flavonoide de hojas de <i>Morus alba</i> L.	29.7 mg/kg	v.o.	NC	0.26 ± 0.16 h	51.65 ± 32.28 ng/mL	85.85 ± 28.81 ng·h/L	1.19 ± 0.62 h	-	-	-	-	0.77 ± 0.45 h ⁻¹	(He et al., 2013)
Ratas Sprague-Dawley	Fración flavonoide de hojas de <i>M. alba</i> L.	34.86 mg/kg	v.o.	2C	1 h	1.546 ± 0.188 mg/L	9.947 ± 2.705 mg·h/L	-	-	-	α: 0.619 ± 0.127 h β: 10.355 ± 7.339 h	-	-	(Ou-yang et al., 2013)
	Fración flavonoide de <i>Abelmoschi Corolla</i> (FFA)	4.39 mg/kg	v.o.	NC	0.36 ± 0.051 H	2.03 ± 0.54 H	6.82 ± 7.55 ng·h/mL	-	-	-	8.27 ± 1.59 h	-	-	(Lu et al., 2013)
	FFA + fracción rica en moléculas pequeñas				0.45 ± 0.042 H	10.70 ± 5.46 H	24.37 ± 5.85 ng·h/mL	-	-	-	13.35 ± 0.83 h	-	-	

Tabla 3-2 (Continuación)

Especie	Sustancia administrada	Dosis rutina	Vía de administración	Tipo de análisis	Rutina								Referencia	
					Tmax	Cmax	AUC _{0-∞}	MRT	Vd	Cl	t _{1/2}	Ka		Ke
Ratas Sprague-Dawley	Fracción flavonoides totales de extracto de <i>G. biloba</i>				0.88 ± 0.14 h	390.42 ± 124.22 ng/mL	-	-	-	-	2.39 ± 1.25 h	-	-	
	Fracción flavonoides totales + fracción terpen-lactona + fracción libre de flavonoides y terpenos de extracto de <i>G. biloba</i>	151.47 mg/kg	v.o.	NC	1.67 ± 0.29 h	1323.08 ± 801.38 ng/mL	-	-	-	-	2.54 ± 1.14 h	-	-	(Guan et al., 2014)
	"Fructus Forsythiae" (maduros)	24.7 mg/kg	v.o.	NC	0.33 ± 0.24 h	264 ± 246 h	1280 ± 1204 µg·h/L	27.98 ± 38.36 h	-	-	6.54 ± 8.73 h	-	-	(Bai et al., 2015)
	"Fructus Forsythiae" (verde)	47.4 mg/kg	v.o.	NC	0.44 ± 0.34 µg/L	693 ± 346 µg/L	1689 ± 896 µg·h/L	8.68 ± 6.40 h	-	-	1.59 ± 0.92 h	-	-	
	Formulación polihierbal	7.35mg/kg	v.o.	NC	0.44 ± 0.18 h	12.54 ± 1.23 ng/mL	28.52 ± 4.78 ng·h/L	-	-	-	0.76 ± 0.20 h	-	-	(Tao et al., 2017)
	Extracto de <i>Maydis stigma</i>	17.2 mg/kg	v.o.	NC	1.08 ± 0.20 h	419.5 ± 99.16 µg/L	2944 ± 540.7 µg·h/L	6.45 ± 0.53 h	-	6.013 ± 1.136 L/h/kg	8.45 ± 1.06 h	-	-	(Wei et al., 2017)
	Extracto de <i>Semen Cuscutae</i>	53.3 µg/Kg	v.o.	NC	10.00 ± 0.03 h	157.68 ± 84.08 ng/mL	4793.86 ± 2243.02 ng·h/mL	-	-	-	7.70 ± 0.90 h	-	-	(Shen et al., 2019)

NC: análisis no compartimental. 2C: modelo bicompartimental. 3C: modelo tricompartmental. Tmax: tiempo máximo. Cmax: concentración máxima. AUC_{0-∞}: área bajo la curva extrapolada al infinito. MRT: tiempo de residencia medio. Vd: Volumen de distribución. Cl: Aclaramiento. t_{1/2}: vida media. ka: constante de velocidad de absorción. ke: constante de velocidad de eliminación.

Tabla 3-3 Parámetros farmacocinéticos reportados para quercetina (libre o conjugada con sulfato y ácido glucurónico) a partir de la administración de rutina.

Especie	Sustancia administrada	Dosis rutina	Vía de administración	Tipo de análisis	Quercetina (libre y/o conjugados)					Referencia	
					Tmax	Cmax	AUC _{0-∞}	MRT	Vd		Cl
Ratas Sprague-Dawley	Rutina	50 μmol/kg	v.o.	NC	8 h	1.30 ± 0.33 nmol/mL	-	-	-	-	(Shimoi et al., 2003)
		11.71 mg/kg					5.44 ± 1.28 μg·h/mL	11.18 ± 1.12 h	-	11.51 ± 2.50 L/h/kg	
Ratas Wistar	Extracto de <i>Fagopyrum tataricum</i>	23.41 mg/kg	v.o.	NC	-	-	10.49 ± 5.17 μg·h/mL	9.02 ± 2.13 h	-	14.02 ± 8.02 L/h/kg	(Zhao et al., 2011)
		46.82 mg/kg					24.03 ± 3.33 μg·h/mL	13.22 ± 1.72 h	-	9.86 ± 1.67 L/h/kg	
Perros Beagle	Rutina	30 μmol/kg	v.o.	NC	11.1 ± 2.4 h	113.7 ± 18.1 nmol/L	131.2 ± 20.0 μmol·min/L	18.0 ± 1.0 h	-	-	(Reinboth et al., 2010)
Vacas	Rutina	100 mg/kg	Ruminal	NC	42 min	1.0 ± 0.10 μmol/L	83.96 ± 9.35 μmol·h/L	-	-	-	(Berger et al., 2012)
	Rutina	331 μmol	v.o.	NC	9.3 ± 1.8 h	90 ± 93 ng/mL	-	-	-	-	(Hollman et al., 1997)
Humanos	Rutina	16 mg	v.o.	NC	6.5 ± 1.8 h	23.5 (IC ₉₅ : 17.7 – 31.5) μg/L	-	-	-	-	(Erlund et al., 2000)
		40 mg			7.4 ± 2.2 h	47.6 (IC ₉₅ : 34.4 – 65.8) μg/L	-	-	-	-	
		100 mg			7.5 ± 2.2 h	89.9 (IC ₉₅ : 53.2 – 152.1) μg/L	-	-	-	-	
	Rutina	200 mg	v.o.	NC	6.98 ± 2.94 h	0.32 ± 0.34 μgmL	-	-	2905 ± 3745 L	159 ± 184 L/h	(Graefe et al., 2001)

NC: análisis no compartimental. Tmax: tiempo máximo. Cmax: concentración máxima. AUC_{0-∞}: área bajo la curva extrapolada al infinito. MRT: tiempo de residencia medio. Vd: Volumen de distribución. Cl: Aclaramiento.

3.2 Metodología

3.2.1 Animales de experimentación

La farmacocinética de rutina, desde el extracto de cálices de *P. peruviana* o como compuesto puro, se estudió en dos modelos animales: ratas Wistar y conejos New Zealand. Las ratas fueron obtenidas del bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y los conejos de una granja que certificó su origen y trazabilidad (Sentagro E.A.T).

Se utilizaron en total 50 ratas Wistar macho (7-11 semanas y 250 – 300 g) y 20 conejos New Zealand machos (9 – 10 semanas y 1.8 – 2.2 kg). Los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y ciclos de luz/oscuridad de 12 h, con agua y alimentación *ab libitum*. En el caso de los conejos, se llevaron al bioterio al menos 5 días antes de los experimentos para su adaptación al ambiente. Doce horas previas a la administración de los tratamientos, los animales fueron sometidos a ayuno con libre acceso a agua.

3.2.2 Aspectos éticos

Para el manejo animal y de los residuos biológicos, se siguieron los protocolos propios del bioterio y las recomendaciones de la Resolución 8430 (1993), conservando los principios de reducción y mínimo sufrimiento. La investigación fue aprobada por el comité de ética de la Facultad de Ciencias en acta 06-2015, del 22 de Junio de 2015.

3.2.3 Preparación de rutina y extracto de *P. peruviana* para los ensayos in vivo

El extracto de cálices de *P. peruviana* se preparó como se indicó en el capítulo 2, incluyendo la confirmación del contenido de rutina (Capítulo 2, ítem 2.2.2).

Para los experimentos por vía oral, una cantidad exactamente pesada del extracto o de rutina se suspendió en agua, justo antes de la administración en los animales, aplicando 3-4 ciclos de vórtex y ultrasonido durante 15 min.

Para la administración i.v., el extracto fue preparado en solución salina (0.9%) y sometido a ciclos de vórtex y ultrasonido como se mencionó anteriormente. Rutina fue disuelta primero en DMSO y luego diluida en solución salina, la solución final contenía < 0.1% de DMSO.

3.2.4 Dosis, administración de los tratamientos y toma de muestra

Los animales fueron asignados aleatoriamente a grupos de 5 individuos ($n = 5$), para recibir las dosis indicadas en la Tabla 3-4. La administración i.v. se realizó por la vena lateral de la cola de las ratas o en la vena marginal de la oreja de los conejos. Para la vía oral los tratamientos fueron administrados a través de sondas de acuerdo al tamaño del animal de experimentación (Diehl et al., 2001).

Tabla 3-4: Dosis de extracto de *P. peruviana* y rutina administrada en ratas y conejos por vía i.v. y oral

Modelo animal	Dosis mg/kg			
	Vía i.v.		Vía oral	
	Rutina	Extracto (equivalente en rutina) ²	Rutina	Extracto (equivalente en rutina) ²
Rata	1.45	250 (3.7)	75	500 (7.4)
	2.9 ¹	500 (7.4)	100	750 (11.1)
		1000 (14.8)		1000 (14.8)
Conejo	0.37 ¹	100 (1.48)	100	500 (7.4)

¹Máxima dosis soluble en el volumen administrado a los animales (1 mL/250 g de peso corporal en ratas y 0.5 mL/Kg de peso corporal en conejos). ²Se indica entre paréntesis la dosis de extracto expresada en equivalentes de rutina. n por cada dosis = 5.

Tras la administración de la dosis, se tomaron muestras de sangre (aproximadamente 250 μ L) en los distintos tiempos, por punción en la vena lateral de la cola de las ratas o en la vena marginal de la oreja de los conejos. Los tiempos de muestreos fueron:

- Vía i.v.: 0, 3, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480 y 720 minutos. En los conejos la primera muestra postdosis se tomó a los 5 minutos y se incluyó una muestra adicional a los 1440 minutos.
- Vía oral: 0, 5, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240, 360, 480, 600, 720, 1440 minutos. En los conejos se reemplazó la muestra de 600 minutos por una a los 2880 minutos.

Las muestras de sangre extraídas fueron depositadas en tubos heparinizados y llevadas inmediatamente a centrifugación a 3200 xg durante 15 min a 4°C, el plasma se separó en un nuevo tubo y fue inmediatamente acidificado con 0.5 µL de ácido fórmico (42.5%) hasta pH 4 y congelado a -80°C hasta su análisis.

3.2.5 Cuantificación de rutina y sus metabolitos en las muestras de plasma

Para el análisis, las muestras de plasma se descongelaron en refrigeración a 4°C y se analizaron según lo indicado en la sección de resultados del capítulo 1 (Tabla 1-14). Cada muestra se analizó con y sin reacción de desconjugación con las enzimas β-glucuronidasa/arilsulfatasa, para la cuantificación indirecta de metabolitos de rutina y/o quercetina conjugados con glucurónido y sulfato.

Con el objetivo de confirmar la presencia de Q3OG y Q3OS en el plasma analizado, muestras representativas de animales que recibieron las dosis más altas de rutina o extracto por vía oral e intravenosa, fueron analizadas por espectrometría de masas. Para esto se utilizó un equipo UHPLC acoplado a detector de masas Q-TOF con ionización por *electrospray* (Nexera LCMS 9030 Shimadzu Scientific instruments®, Maryland, EE. UU.). Se utilizaron las condiciones cromatográficas previamente validadas y el espectrómetro de masas se operó en modo negativo con rango de escaneo entre 80 y 1000 m/z. El voltaje del capilar fue 3 kV, el voltaje del cono de muestra 33 kV, la temperatura de secado fue 250°C, el gas de nebulización fue nitrógeno a 350 L/h, el gas de colisión fue argón a 50L/h y la energía de colisión fue 2.5 eV.

3.2.6 Cálculos farmacocinéticos y análisis de los datos

Se utilizó análisis no compartimental para la determinación de los parámetros farmacocinéticos de la rutina, que fueron calculados de forma independiente para cada modelo animal, tratamiento y vía de administración, utilizando el programa Pkanalix 2019R1 (Lixoft®), configurado en el modo de integración trapezoidal lineal. Los parámetros de interés extraídos del programa fueron: Cl, Cl/F, Vdss, Vdz/F, AUC_0^∞ , ke, $t_{1/2}$, MRT, Tmax, Cmax y concentración inicial (Cp^0). Además se calculó F a partir de las AUC_0^∞ para la vía oral e i.v. Las definiciones y fórmulas para el cálculo de los parámetros fueron detalladas en la Tabla 3-1.

La biodisponibilidad relativa (F_{rel}) de las señales provenientes de rutina por vía oral, entre el compuesto puro y el extracto fue calculada con la ecuación 3-1:

$$F_{rel} = \frac{AUC_0^{\infty} \text{ extracto} \cdot D_{rutina}}{AUC_0^{\infty} \text{ rutina} \cdot D_{extracto}} \quad 3-1$$

Donde AUC_0^{∞} es el área bajo la curva de las señales obtenidas tras la administración oral del compuesto puro ($AUC_0^{\infty} \text{ rutina}$) o del extracto ($AUC_0^{\infty} \text{ extracto}$) y D son las dosis administradas de cada tratamiento expresadas en función de rutina.

La fracción metabolizada (f_{met}) fue calculada con la ecuación 3-2:

$$F_{met} = \frac{AUC_0^{\infty} \text{ metabolitos}}{AUC_0^{\infty} \text{ rutina}} \quad 3-2$$

Donde $AUC_0^{\infty} \text{ metabolitos}$ es el área bajo la curva de los metabolitos, expresada como equivalentes de rutina, y $AUC_0^{\infty} \text{ rutina}$ es el área bajo la curva de la rutina parental, para una misma dosis y vía de administración.

Se utilizó la ecuación de alometría simple para la extrapolación de los parámetros farmacocinéticos a humanos:

$$Y = a \times W^b \quad 3-3$$

Donde Y es el parámetro farmacocinético, W es el peso corporal humano promedio y a y b son el coeficiente alométrico y el exponente, ambos derivados de curvas de los parámetros vs el peso corporal de las ratas y conejos (Huang & Riviere, 2014).

▪ **Análisis estadístico**

Las concentraciones en las curvas Cp vs t se representaron como el promedio \pm SEM (n = 5). Los parámetros fueron reportados como el promedio \pm SD (n = 5). La comparación de los datos se realizó por ANOVA simple de un factor, seguido por la prueba de rango de Tukey (HSD). La distribución normal de los datos fue verificada por la prueba de Shapiro-Wilk y la homoscedasticidad por la prueba de Levene. Cuando no se cumplieron los supuestos de normalidad y homoscedasticidad entre pares, se reemplazó la prueba HSD por la de Mann-Whitney. La comparación de parámetros farmacocinéticos cuando sólo había dos grupos de datos se realizó mediante prueba t de student o su equivalente no paramétrico (Wilcoxon). Para el análisis de linealidad farmacocinética se aplicó regresión

simple con el método de mínimos cuadrados. En el caso del compuesto puro, donde sólo estuvieron disponibles datos provenientes de dos dosis, se evaluó la linealidad por comparación de AUC y Cmax corregidas por la dosis con pruebas t de student para muestras independientes (Hazra & Gogtay, 2016). Todas las pruebas estadísticas se realizaron en el software Statgraphics Centurion XVI v.16.1.02. La significancia se consideró a partir de $\alpha = 0.05$.

▪ **Modelamiento farmacocinético poblacional**

Como complemento al estudio farmacocinético planteado en los objetivos de investigación, se estableció un modelo poblacional para explicar la farmacocinética de rutina (vía i.v.) y quercetina (vía oral) en las ratas, utilizando el programa Monolix 2019R1 (Lixoft®). Para la vía intravenosa se evaluaron modelos estructurales de uno o dos compartimentos con eliminación de orden 1. Para la vía oral se aplicó un modelo estructural de doble absorción con eliminación de orden 1 y se evaluó la distribución en uno o dos compartimentos. La selección del modelo estructural final en cada caso, se realizó con base en la observación del ajuste individual de los datos, en los valores obtenidos para el criterio de información de Akaike (AIC, por sus siglas en inglés) y en la distribución de los residuales, eligiéndose el modelo que presentó ajuste individual con el menor AIC y una distribución normal y simétrica de los residuales. Una vez fijado el modelo estructural, se agregaron las covariables categóricas (dosis, rutina o extracto) y las correlaciones entre efectos aleatorios que resultaron significativas en los test de Walt, con aproximación estocástica, o en las pruebas t, realizadas por el propio software. Los modelos fueron validados internamente por la revisión predictiva visual.

El mismo procedimiento se aplicó en los conejos, esta vez la única covariable categórica evaluada fue la fuente de rutina (compuesto o extracto).

3.3 Resultados

3.3.1 Contenido de rutina en el extracto de cálices de *P. peruviana* para estudios farmacocinéticos.

El contenido de rutina en el extracto utilizado para los estudios farmacocinéticos fue $14.80 \pm 0.3 \mu\text{g}/\text{mg}$.

3.3.2 Farmacocinética de rutina pura y desde el extracto de *P. peruviana* en ratas.

- **Vía i.v. en ratas**

En las muestras de plasma analizadas después de la administración i.v. de los tratamientos, se pudo identificar la presencia de rutina y 3 picos adicionales que fueron identificados por espectrometría de masas como los metabolitos conjugados Q3OS (2.8 min) y Q3OG (3.4 y 3.6 min) (Anexo C); estas señales desaparecieron tras el tratamiento de las muestras con las enzimas β -glucuronidasa/arilsulfatasa, generándose como producto quercetina (Figura 3-5).

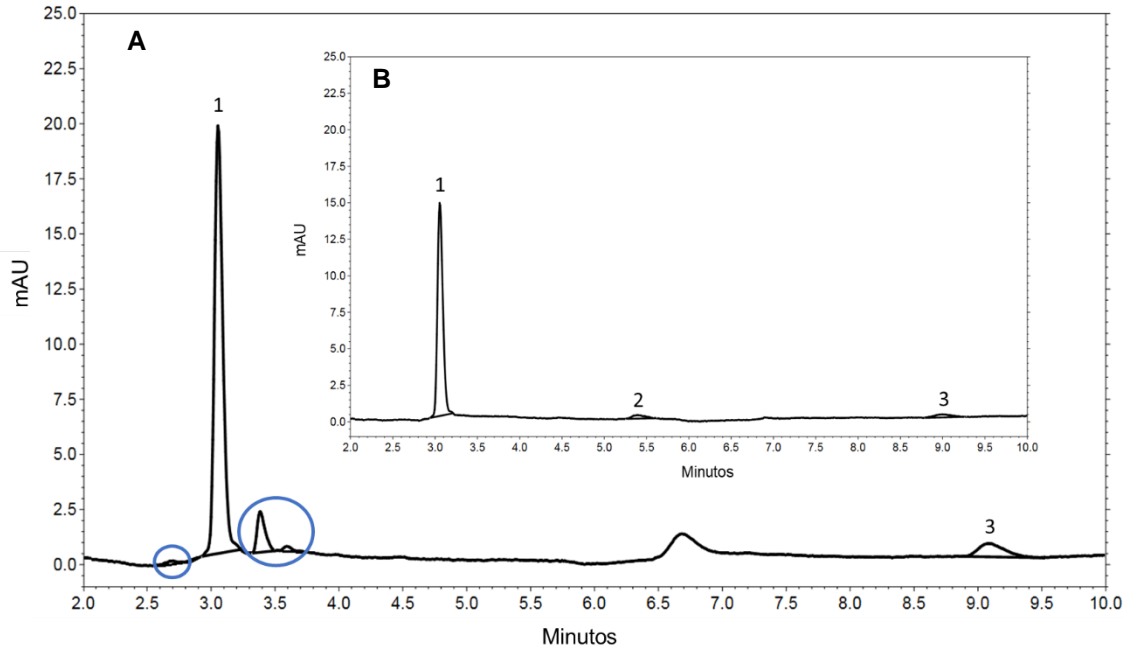


Figura 3-5 Cromatograma representativo de las muestras de los ensayos farmacocinéticos. **A:** muestra sin reacción. **B:** muestra sometida a reacción con β -glucuronidasa/arylsulfatasa. 1) Rutina, 3.1 min. 2) Quercetina, 5.4 min. 3) Crisina, 9.1 min. Las señales a los tiempos de retención 2.8, 3.4 y 3.6 min desaparecen después de la reacción y fueron identificadas como quercetina-3-O-sulfato (2.8 min) y quercetina-3-O-glucurónido (3.4 y 3.6 min). La señal entre 6.5 y 7 min min es endógena del plasma. Columna Kinetex® EVO C18, 2,6 μ m, 100 x 2.1 mm a 30°C; fase móvil ácido fórmico 0.1% (A') y ACN con 0.1% de ácido fórmico, en gradiente de 85% a 65% de A', flujo 0.5 mL/min y 260 nm. Extracción con metanol 1:2.

El perfil de C_p vs tiempo de rutina, tras la administración i.v. de dosis de 1.45 y 2.9 mg/kg del estándar puro, se presenta en la Figura 3-6 A. Se observa en la figura que el compuesto se eliminó rápidamente del plasma ($t_{1/2} < 1$ h) y no fue detectado después de las 4 h de muestreo. Por limitaciones de solubilidad y sensibilidad analítica, no fue posible administrar una tercera dosis de rutina pura por vía i.v., por lo cual, el análisis sobre la linealidad farmacocinética se basó en la comparación entre las dosis, de los valores de $AUC_0^\infty/\text{dosis}$ y C_p^0/dosis , los cuales no mostraron diferencias significativas (Figura 3-6 B y C). Lo anterior indica que la exposición sistémica de rutina es proporcional a la dosis, comportamiento característico de la linealidad farmacocinética (Shargel & Yu, 2015).

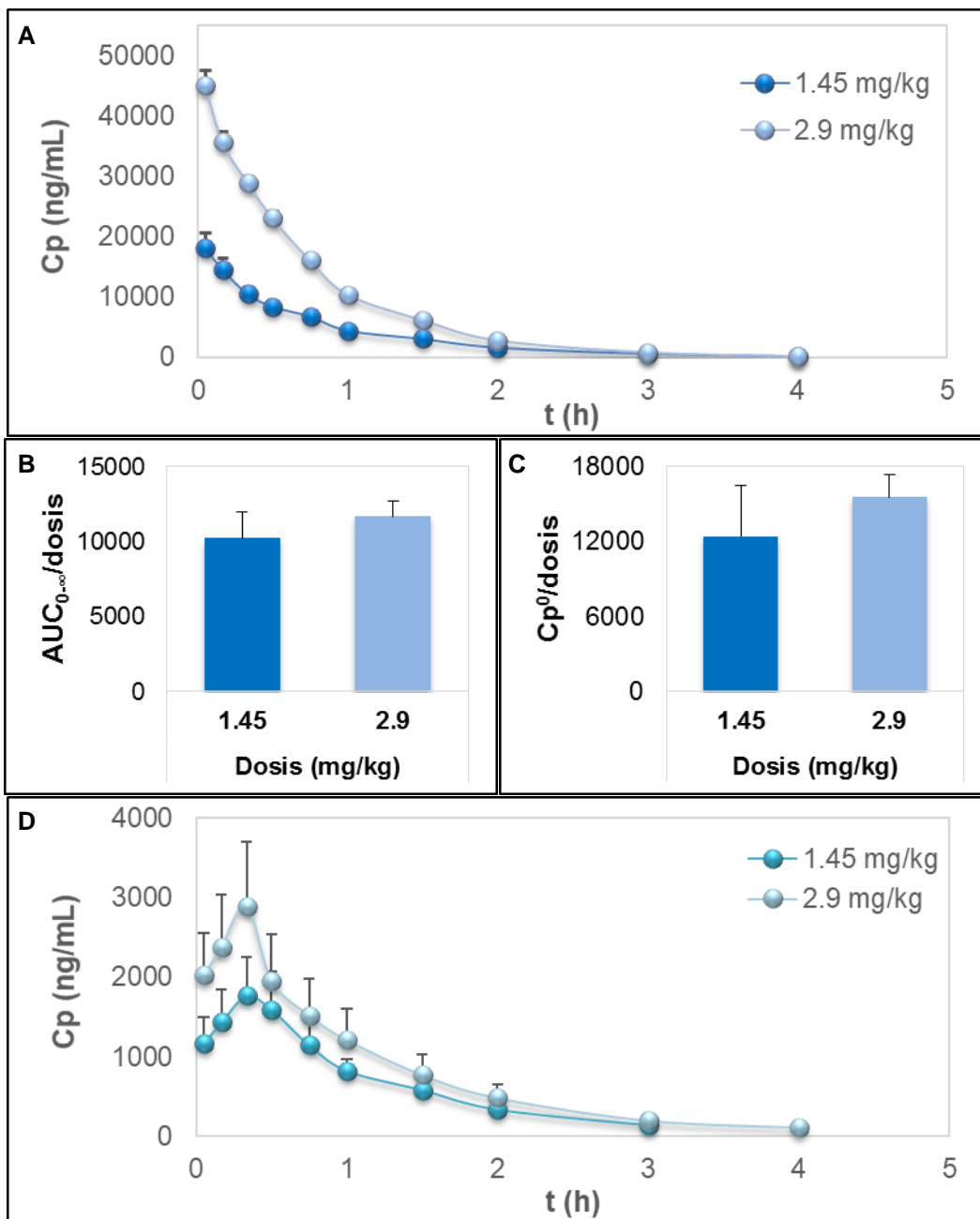


Figura 3-6: Curva Cp vs tiempo de rutina y quercetina tras la administración i.v. del compuesto puro en ratas y linealidad farmacocinética.

A: Cp vs t de rutina i.v. a dosis de 1.45 y 2.9 mg/kg (promedio ± SEM, n = 5), no hubo niveles detectables de rutina después de las 4 h. **B:** área bajo la curva extrapolada al infinito corregida por la dosis (AUC_{0-∞}/dosis, h/L × 10⁻³, promedio ± SD). **C:** concentración inicial corregida por la dosis (Cp⁰/dosis, 1/L × 10⁻³, promedio ± SD). B y C no mostraron diferencias significativas entre las dosis (prueba t de student). **D:** quercetina tras reacción con β-glucuronidasa/arilsulfatasa (promedio ± SEM).

El análisis no compartimental de los datos de las curvas Cp vs t de rutina estándar por vía i.v., arrojó valores promedio de Vd, Cl y t_{1/2} de 0.090 ± 0.03 L/kg, 0.093 ± 0.015 L/h/kg y

0.60 ± 0.114 h respectivamente, sin diferencias significativas entre las dosis evaluadas (Tabla 3-5). Esta observación, en conjunto con la proporcionalidad a la dosis de AUC y Cp^0 , confirman que la farmacocinética de rutina pura es lineal. De la revisión de la literatura se encontró que la linealidad farmacocinética ha sido evaluada para polifenoles como ácido gálico, orientina, protopina, isorhamnetina, baicaleina, germacrona y berberina. Con excepción de orientina y berberina, la farmacocinética de todos estos compuestos fue lineal, como se observó aquí para rutina (Domínguez Moré et al., 2017). No se encontraron otros estudios farmacocinéticos de este compuesto desde la vía i.v., que sirvan para fines comparativos.

Como se mencionó anteriormente, tras el tratamiento de las muestras plasmáticas con las enzimas β -glucuronidasa/arilsulfatasa, se detectó la presencia de conjugados glucurónido y sulfato de quercetina. En el caso del compuesto puro administrado por vía i.v., los metabolitos aparecieron desde el primer punto de muestreo (3 min, Figura 3-6 D), lo cual coincide con la rápida eliminación de rutina, que disminuye su concentración a la mitad dentro de los primeros 45 minutos. El pico máximo de los metabolitos en las dos dosis administradas ocurrió a los 20 min y al igual que rutina, fueron rápidamente eliminados aunque con un MRT mayor (2.15 ± 0.485 vs 0.948 ± 0.188 h). La fracción de rutina metabolizada, calculada con la ecuación 3-2, presentó alta variabilidad entre los individuos y no se evidenciaron diferencias entre la dosis (Tabla 3-5).

Según los valores de F_{met} , (Tabla 3-5) hasta el 38% de rutina en las ratas fue desglucosilada y conjugada con ácido glucurónido y sulfato, estas reacciones comúnmente tienen lugar en el hígado donde, al igual que en el intestino delgado, hay presencia de las enzimas UDP-glucuronosiltransferasas y sulfotransferasas (de Waziers et al., 1990). Aunque no se encontraron en la literatura estudios sobre el metabolismo de rutina desde la vía i.v., Choudhury et al. (1999) reportaron que por esta vía de administración, solo un 9.2% de rutina se eliminó de forma intacta en la orina de ratas Wistar que recibieron una dosis de 50 mg/kg del flavonoide, indicando su amplia metabolización. Además, estudios farmacocinéticos tras la administración de quercetina por vía i.v. en ratas, reportan que hasta el 93.8% de la aglicona de rutina se encuentra en plasma en forma de Q3OS y Q3OG (Jones et al., 2004; C. Y. Yang et al., 2005).

De manera similar, cuando se administró el extracto de cálices de *P. peruviana* por vía i.v. en dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg, equivalentes a 3.7, 7.4 y 14.8 mg/kg de rutina pura respectivamente, se observó una rápida eliminación del flavonoide con niveles apenas detectables a las 4 h y aparición temprana de conjugados glucurónido y/o sulfato con T_{max} promedio de 28 ± 12 min (Figura 3-7). En este caso los parámetros AUC_{0-∞}/dosis y Cp⁰/dosis fueron más bajos que los que se observaron para el compuesto puro, pero tampoco se encontraron diferencias significativas entre las dosis; además, el crecimiento de AUC_{0-∞} y Cp⁰ se ajustó estadísticamente a una regresión lineal (Figura 3-8).

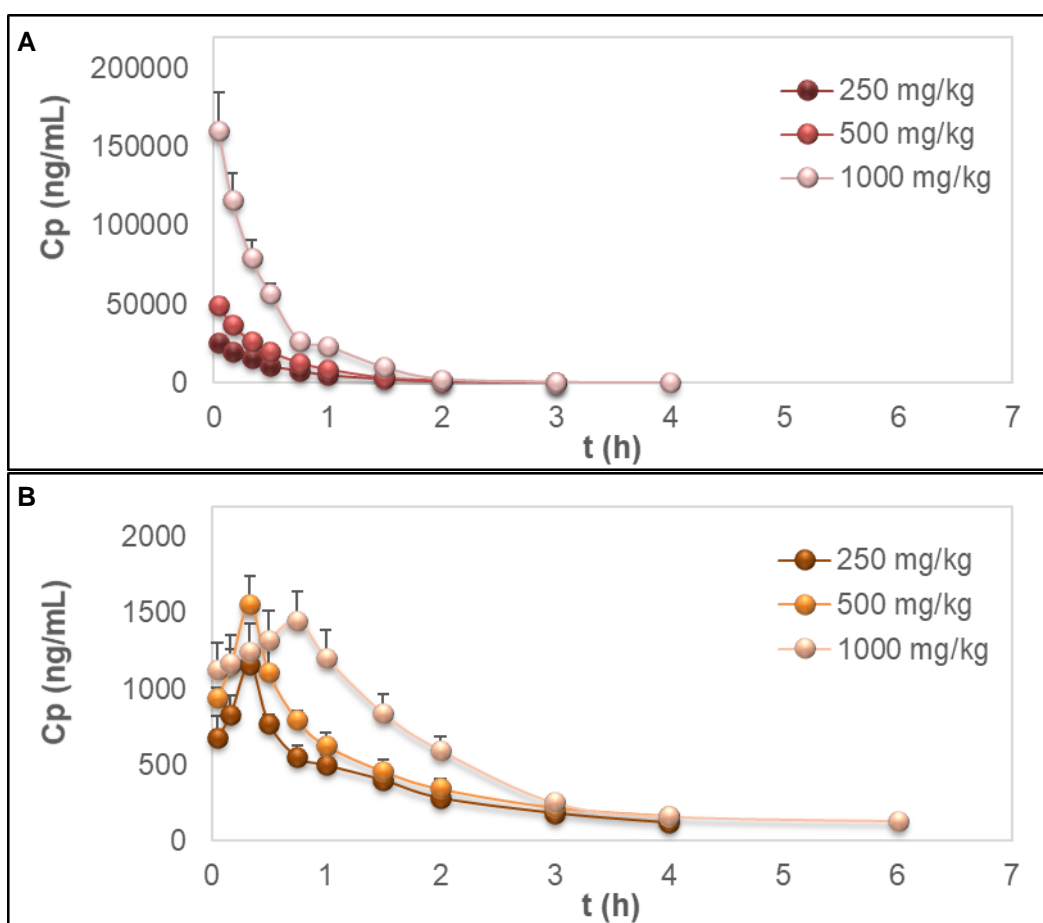


Figura 3-7 Curva Cp vs tiempo de rutina y quercetina tras la administración i.v. del extracto de cálices de *P. peruviana* en ratas.

A: Cp vs t de rutina i.v. a dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg del extracto hidroalcohólico de cálices de *P. peruviana*, equivalentes a 3.7, 7.4 y 14.8 mg/kg de rutina pura. No hubo niveles detectables de rutina después de las 4 h. **B:** quercetina tras reacción con β -glucuronidasa/arilsulfatasa. En todos los casos datos expresados como promedio \pm SEM (n =5).

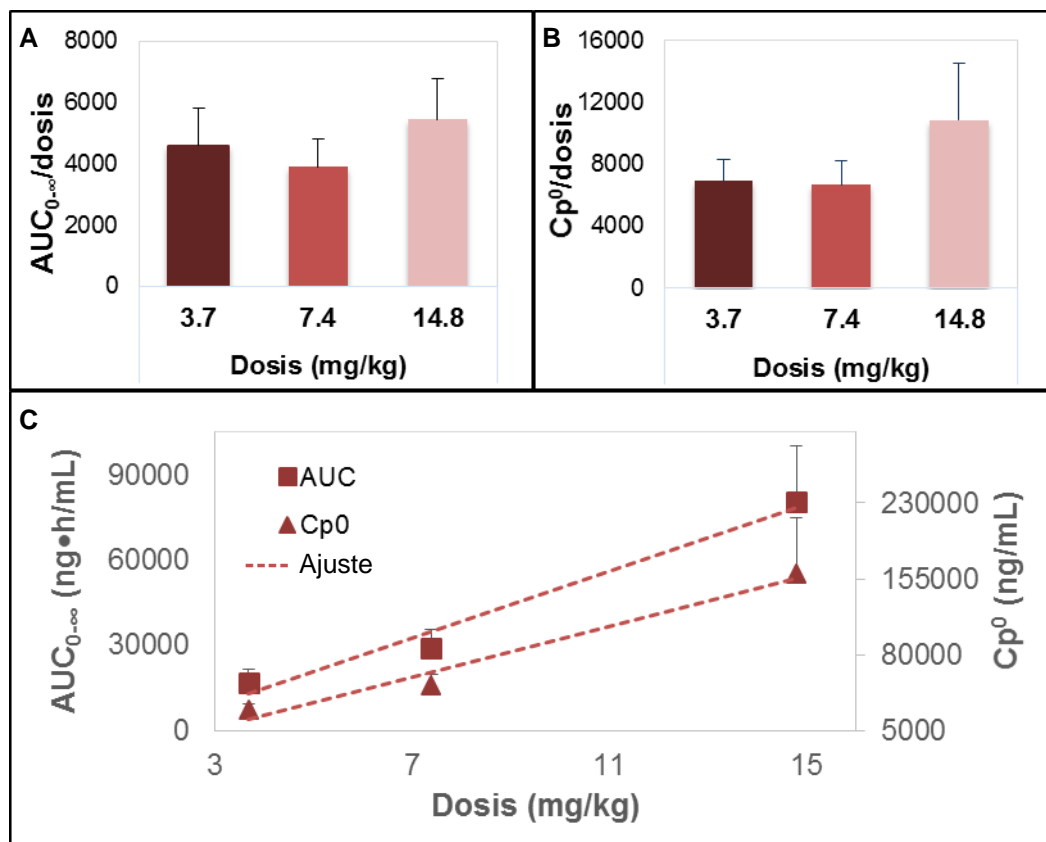


Figura 3-8 Linealidad farmacocinética de rutina tras la administración i.v. de tres dosis del extracto de cálices de *P. peruviana* en ratas.

Dosis del extracto: 250, 500 y 1000 mg/kg, equivalentes a 3.7, 7.4 y 14.8 mg/kg de rutina pura, datos expresados como promedio \pm SD ($n = 5$). **A:** área bajo la curva extrapolada al infinito corregida por la dosis ($AUC_{0-\infty}/dosis$, $h/L \times 10^{-3}$). **B:** concentración inicial corregida por la dosis ($Cp^0/dosis$, $1/L \times 10^{-3}$). A y B no mostraron diferencias significativas entre las dosis (ANOVA y HSD). **C:** relación lineal de $AUC_{0-\infty}$ y Cp^0 con la dosis de rutina. r^2 de $AUC_{0-\infty}$ 83.4%, r^2 de Cp^0 78.4%. En ambos casos, prueba de carencia de ajuste con $p < 0.00005$ y cumplimiento de la aleatorización de residuos, indicando linealidad.

En relación al CI, V_{ss} y $t_{1/2}$ de rutina desde el extracto i.v., presentaron valores promedio de 0.231 ± 0.0647 L/h/kg, 0.156 ± 0.0585 L/kg y 0.391 ± 0.051 h. Para estos parámetros tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dosis (Tabla 3-5).

Curiosamente, el único reporte identificado en la literatura donde se realizó administración i.v. de alguna fuente de rutina fue el de S.-Y. Wang et al., (2010), quienes administraron en ratas un extracto de *C. pinnatifida* equivalente a 1.76 y 3.52 mg/kg del flavonoide glicosilado. En este estudio los autores encontraron una respuesta no lineal del AUC que

relacionaron con el desplazamiento de rutina de las proteínas plasmáticas. Los valores promedio reportados para Vd, Cl y $t_{1/2}$ fueron 0.1 L/kg, 0.35 L/h/kg y 1 h respectivamente, estos se obtuvieron tras la aplicación de un modelo de tres compartimentos, por lo cual no son necesariamente comparables con los reportados aquí. En cualquier caso se puede observar que el Vd (central) indicado por los autores es semejante al Vss obtenido en este estudio para el compuesto puro, mientras que el Cl y la $t_{1/2}$ están por encima de los reportados aquí (S.-Y. Wang et al., 2010).

Tabla 3-5: Parámetros farmacocinéticos de rutina tras la administración i.v. del compuesto o del extracto de cálices de *P. peruviana* en ratas.

Parámetro	RUTINA		EXTRACTO		
	Dosis mg/kg				
	1.45	2.9	250 (3.7 ¹)	500 (7.4 ¹)	1000 (14.8 ¹)
AUC₀[∞] (ng*h/mL)	14853.11 ± 2528.037	33933.58 ± 2878.316	16932.91 ± 4568.149	28821.05 ± 6633.516	80696.50 ± 19536.208
Cp⁰ (ng/mL)	18031.70 ± 5874.730	45074.48 ± 5304.935	25633.15 ± 5201.191	49437.66 ± 11475.311	160660.39 ± 54403.631
Vss (L/kg)	0.11 ± 0.0306	0.07 ± 0.009	0.18 ± 0.056#	0.18 ± 0.052#	0.11 ± 0.040
Cl (L/h/kg)	0.10 ± 0.017	0.09 ± 0.008	0.23 ± 0.065*#	0.27 ± 0.067*#	0.19 ± 0.049*#
ke (h⁻¹)	1.08 ± 0.195	1.29 ± 0.159	1.67 ± 0.312*	1.77 ± 0.05*#	1.96 ± 0.175*#
t_{1/2} (h)	0.66 ± 0.130	0.54 ± 0.062	0.43 ± 0.070*	0.39 ± 0.011*#	0.36 ± 0.031*##
MRT (h)	1.08 ± 0.176	0.81 ± 0.053*	0.78 ± 0.089*	0.66 ± 0.027*	0.54 ± 0.078*# ¥
Fmet	0.38 ± 0.237	0.21 ± 0.122	0.24 ± 0.081	0.17 ± 0.050	0.09 ± 0.031*# ¥
Vdz (L/kg)	0.096 ± 0.027	0.068 ± 0.012	0.14 ± 0.039#	0.15 ± 0.043#	0.099 ± 0.029
AUC/dosis x 10⁻³ (h/L)	10243.52 ± 1743.478	11701.24 ± 992.522	4576.46 ± 1234.634*#	3894.74 ± 896.421*#	5452.47 ± 1320.012*#
Cp⁰/dosis x 10⁻³ (L⁻¹)	12435.65 ± 4051.536	15542.93 ± 1829.289	6927.88 ± 1405.729*#	6680.76 ± 1550.716*#	10855.43 ± 3675.921

AUC₀[∞]: área bajo la curva extrapolada al infinito; Cp⁰: concentración inicial; Vss: volumen de distribución en estado estacionario; Cl: aclaramiento; ke: constante de velocidad de eliminación; t_{1/2}: vida media terminal; MRT: tiempo medio de residencia; Fmet: fracción metabolizada; AUC/dosis: área bajo la curva corregida por la dosis; Cp⁰/dosis: concentración inicial corregida por la dosis. Datos expresados como promedio ± SD (n =5). ¹Dosis equivalente a rutina. * p < 0.05 con respecto a la dosis de 1.45 mg/kg de compuesto puro. # p < 0.05 con respecto a la dosis de 2.9 mg/kg de compuesto puro. ## p < 0.01 con respecto a la dosis de 2.9 mg/kg de compuesto puro. ¥ p < 0.05 con respecto a la dosis de 250 mg/kg del extracto (ANOVA y HSD/ Mann-Whitney).

Considerando el conjunto de las dosis, el Vss y Cl de rutina a partir del extracto mostraron un aumento de 1.7 y 2.5 veces respectivamente, frente a lo observado para rutina pura, lo que a su vez produjo una disminución de la t_{1/2} y del MRT de hasta 50% (Tabla 3-5, Figura

3-9). El aumento en el volumen de distribución, que fue especialmente evidente cuando se usó como referencia la dosis mayor del compuesto puro, puede deberse a la saturación de las proteínas plasmáticas, lo que aumentaría la fracción de fármaco libre en plasma, que se sabe está directamente relacionada con este parámetro primario. El mismo evento podría explicar el aumento del CI del flavonoide, ya que la fracción libre producida quedaría susceptible a excretarse por mecanismos no saturables, como la filtración glomerular (Leslie Z. Benet & Hoener, 2002; Stern et al., 2016).

La literatura indica que rutina se une a la albúmina sérica humana y bovina, aunque con menor afinidad que otros polifenoles, por ejemplo que aquellos no glicosilados (H. Cao et al., 2019; Liua et al., 2014; Sengupta et al., 2018; Xiao & Kai, 2012); según esto, el desplazamiento de rutina de las proteínas plasmáticas de las ratas por efecto de otros componentes del extracto con mayor afinidad, parece viable. El aumento en el volumen de distribución por efecto de la matriz del extracto ha sido reportado para otro tipo de polifenoles como el ostol (Shi et al., 2013).

En cuanto a la metabolización de rutina desde el extracto, entre el 9 y el 24% del flavonoide fue convertido en Q3OS y/o Q3OG. En este caso, el MRT de los conjugados fue semejante entre las dosis, comparable al que exhibieron las ratas que recibieron el compuesto puro e igualmente resultó mayor que el del compuesto parental (2.69 ± 0.39 vs, 0.661 ± 0.12 h).

Interesantemente, F_{met} para la dosis de 1000 mg/kg de extracto fue significativamente menor que para cualquier otra dosis o tratamiento (Figura 3-9, Tabla 3-5). En concordancia con lo anterior, se observó que el t_{max} de quercetina después de la reacción de desconjugación en las dosis de 250 y 500 mg/kg, fue igual al observado para el compuesto puro (20 min), pero se extendió hasta 45 min cuando se usó la dosis mayor de extracto (Figura 3-7 B). Esta diferencia podría deberse a la inhibición de transportadores de ingreso de rutina o quercetina en el hepatocito, ejercida por algún componente del extracto. Un efecto semejante fue demostrado *in vitro* para flavonoides presentes en el jugo de pomelo, especialmente naringenina, que resultó ser un inhibidor competitivo del transportador OATP1B3 expresado en la membrana basolateral de células HEK293 (Mandery et al., 2012). Sin embargo, esta potencial interacción podría no tener relevancia clínica teniendo en cuenta que no tuvo efecto sobre el MRT de los conjugados entre las distintas dosis de extracto.

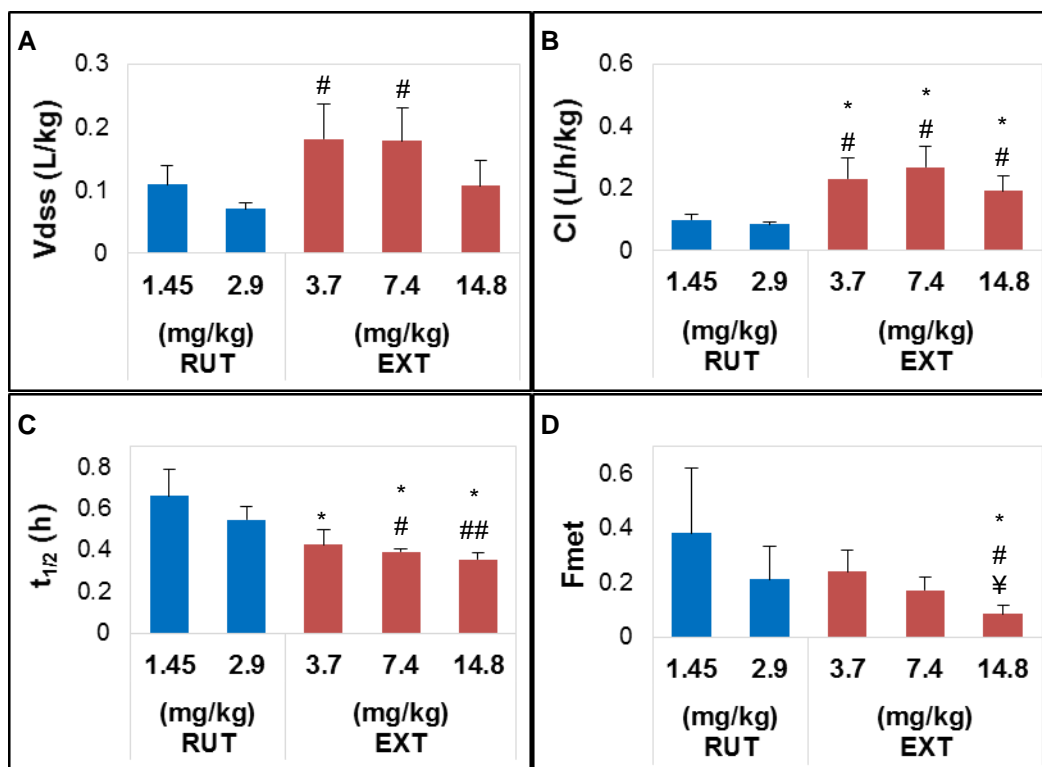


Figura 3-9 Parámetros farmacocinéticos relevantes de rutina, administrada por vía i.v. en ratas, como compuesto puro o en el extracto de cálices de *P. peruviana*.

A: volumen de distribución en estado estacionario (Vdss). **B:** aclaramiento (Cl). **C:** vida media terminal ($t_{1/2}$). **D:** fracción metabolizada (Fmet). RUT: rutina pura. EXT: extracto de cálices de *P. peruviana*. Dosis expresadas en equivalente a rutina. Los datos corresponden al promedio \pm SD (n = 5). * p < 0.05 con respecto a la dosis de 1.45 mg/kg de compuesto puro. # p < 0.05 con respecto a la dosis de 2.9 mg/kg de compuesto puro. ## p < 0.01 con respecto a la dosis de 2.9 mg/kg de compuesto puro. ¥ p < 0.05 con respecto a la dosis de 250 mg/kg del extracto equivalente a 3.7 mg/kg de rutina pura (ANOVA y HSD/ Mann-Whitney).

▪ Vía oral en ratas

Tras la administración de rutina pura o desde el extracto de cálices de *P. peruviana* por vía oral, no se detectaron niveles plasmáticos de rutina; sólo después de someter las muestras a reacción con las enzimas β -glucuronidasa/arilsulfatasa fue posible la cuantificación de quercetina, es decir, que los compuestos circulantes fueron principalmente los conjugados glucurónico y/o sulfato de quercetina, indicando una alta metabolización presistémica de rutina, como ha sido ampliamente reportado en la literatura (Berger et al., 2012; Erlund et al., 2000; Graefe et al., 2001; Hollman et al., 1997; Reinboth et al., 2010; Shimoi et al., 2003; Zhao et al., 2011). La presencia de Q3OG y Q3OS en plasma de las ratas que

recibieron el compuesto puro o el extracto por vía oral fue verificada también por espectrometría de masas (Anexo C).

La Figura 3-10 A, muestra el perfil de Cp vs tiempo de quercetina (después de reacción con β -glucuronidasa/arilsulfatasa) tras la administración de dosis de 75 y 100 mg/kg de rutina pura. En el perfil es evidente la presencia de dos picos a las 2 y 6 h, siendo el segundo pico mayor. La comparación de $AUC_{0-\infty}$ y C_{max} corregidos por la dosis muestran una respuesta lineal de estos parámetros, como se observó en la vía i.v (Figura 3-10 B y C). El V_dz/F y Cl/F tampoco presentaron modificaciones significativas con la dosis (Tabla 3-6).

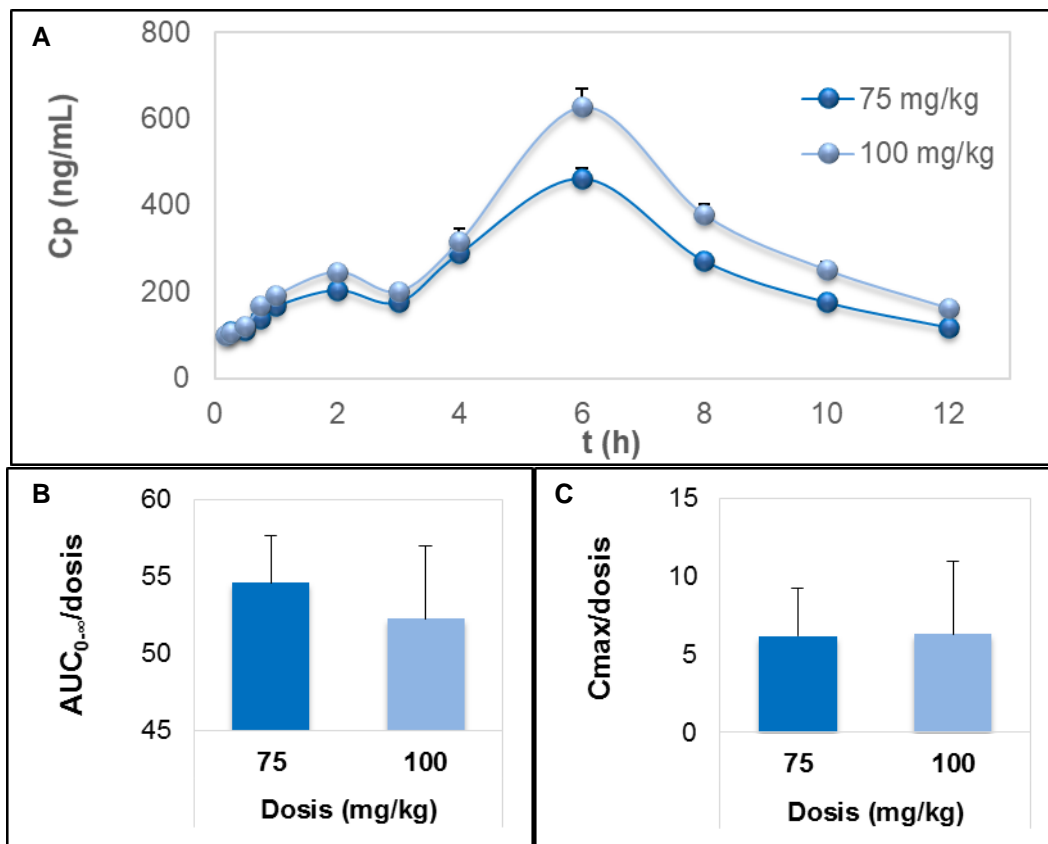


Figura 3-10: Curva Cp vs tiempo de quercetina tras la administración oral de rutina en ratas y linealidad farmacocinética.

A: Cp vs t de quercetina tras la administración oral de 75 y 100 mg/kg de rutina pura (promedio \pm SEM, $n = 5$), las muestras fueron sometidas a reacción con β -glucuronidasa/arilsulfatasa, no hubo niveles detectables de quercetina después de las 12 h. **B:** área bajo la curva extrapolada al infinito corregida por la dosis ($AUC_{0-\infty}/dosis$, $h/L \times 10^{-3}$, promedio \pm SD). **C:** concentración inicial corregida por la dosis ($C_p^0/dosis$, $1/L \times 10^{-3}$, promedio \pm SD). B y C no mostraron diferencias significativas entre las dosis (prueba t de student).

Cuando se administró el extracto de cálices de *P. peruviana* oralmente, se observó también el fenómeno de doble pico de quercetina, pero en este caso con concentraciones plasmáticas semejantes y tiempos máximos dependientes de la dosis (Figura 3-11). Para la dosis de 500 mg/kg (equivalente a 7.4 mg/kg de rutina), el primer y segundo pico de quercetina aparecieron cerca de las 2 y las 6 h respectivamente, como se observó para el compuesto puro; mientras que a las dosis superiores, los picos máximos ocurrieron alrededor de 0.75 y 2-3 h, respectivamente. Consecuentemente, el AUC_0^∞ y C_{max} entre las dosis presentaron desviación de la linealidad (Figura 3-12).

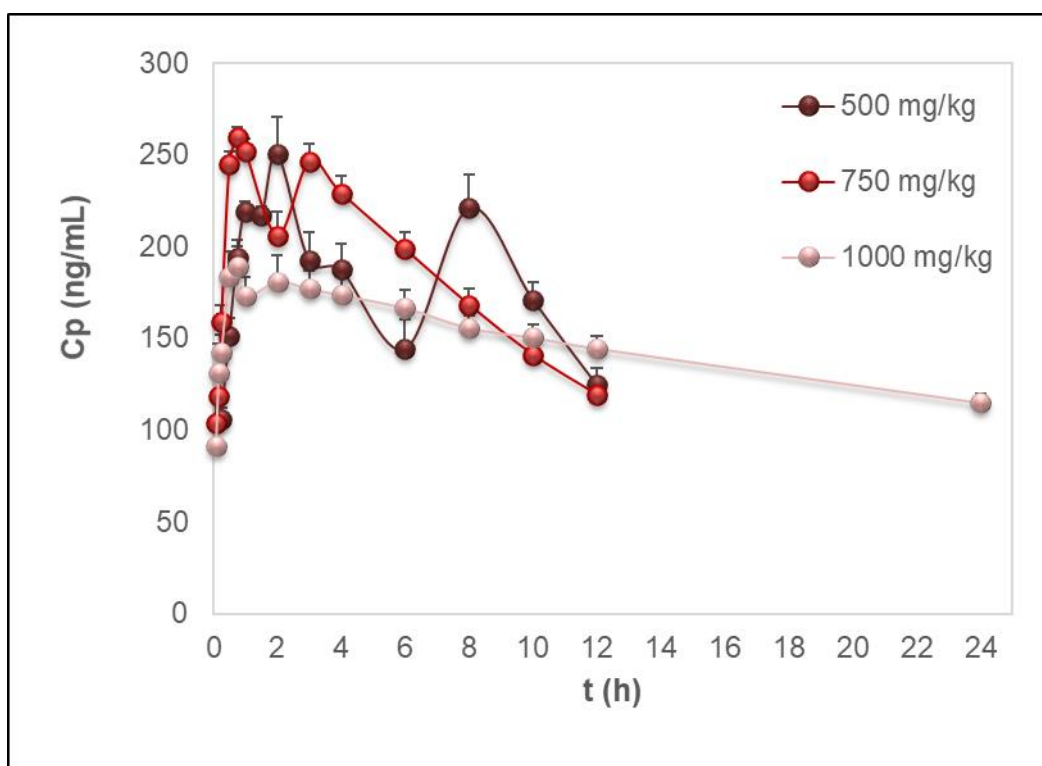


Figura 3-11: Curva Cp vs tiempo de quercetina tras la administración oral del extracto de cálices de *P. peruviana* en ratas.

Cp vs t de quercetina tras la administración oral de 500, 750 y 1000 mg/kg del extracto de cálices de *P. peruviana*, equivalentes a 7.4, 11.1 y 14.8 mg/kg de rutina (promedio \pm SEM, n = 5). Las muestras fueron sometidas a reacción con β -glucuronidasa/arilsulfatasa. No hubo niveles detectables de quercetina después de las 12 h para las dosis de 500 y 750 mg/kg.

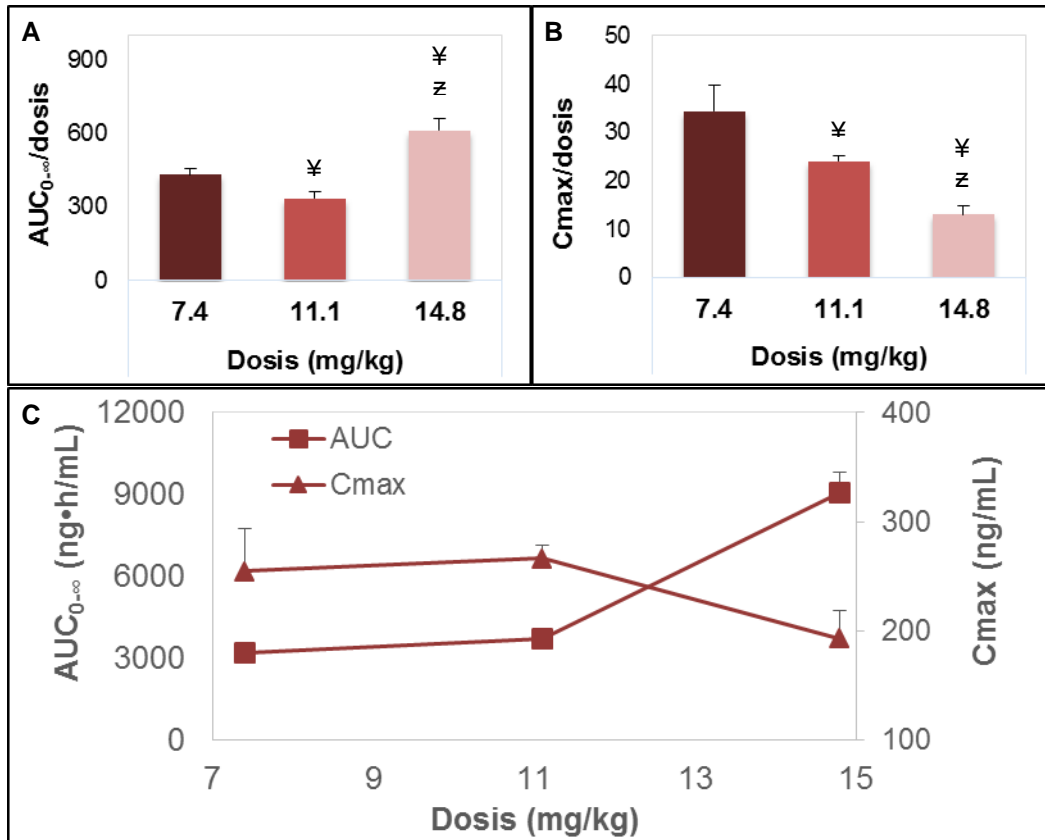


Figura 3-12: Farmacocinética no lineal de rutina tras la administración oral de tres dosis del extracto de cálices de *P. peruviana* en ratas.

Dosis del extracto: 500, 750 y 1000 mg/kg, equivalentes a 7.4, 11.1 y 14.8 mg/kg de rutina pura, datos expresados como promedio \pm SD ($n=5$). **A:** área bajo la curva extrapolada al infinito corregida por la dosis ($AUC_{0-\infty}/dosis$, $h/L \times 10^{-3}$). **B:** concentración máxima corregida por la dosis ($C_{max}/dosis$, $1/L \times 10^{-3}$). $\neq p < 0.05$ con respecto a la dosis equivalente a 7.4 mg/kg de rutina. $z p < 0.05$ con respecto a la dosis equivalente a 11.1 mg/kg (ANOVA y HSD/ Mann-Whitney). **C:** relación no lineal de $AUC_{0-\infty}$ y C_{max} con la dosis de rutina.

La disminución del T_{max} es un indicador de que el extracto aumenta la velocidad de absorción de los conjugados de quercetina generados en el intestino, de forma dependiente de la dosis. Tal resultado es consecuente con lo observado en los experimentos de permeabilidad intestinal en el modelo Caco-2, donde el extracto mostró la mayor metabolización (más formación de conjugados) y el menor eflujo apical (favorecimiento de la absorción de los conjugados formados). Adicionalmente, rutina en el extracto resultó más soluble que el propio compuesto puro (Domínguez Moré et al., 2020), de manera que a partir del extracto oral, la rutina solubilizada estaría disponible más

rápidamente a nivel intestinal para ser metabolizada por enzimas de los enterocitos o por la flora bacteriana, de donde resultarían los conjugados que se observan en el plasma.

Además de la disminución en el Tmax, el AUC_0^∞ y Cmax de quercetina desde el extracto, corregidos por la dosis, presentaron un aumento de hasta 11 y 6 veces respectivamente comparado con lo observado para el compuesto puro, este aumento también fue dependiente de la dosis (Tabla 3-6).

Tabla 3-6: Parámetros farmacocinéticos de quercetina tras la administración oral de rutina pura o del extracto de cálices de *P. peruviana* en ratas.

Parámetro	RUTINA		EXTRACTO		
	Dosis mg/kg				
	75	100	500 (7.4 ¹)	750 (11.1 ¹)	1000 (14.8 ¹)
AUC_0^∞ (ng*h/mL)	4095.34 ± 227.038	5227.34 ± 469.187	3197.85 ± 198.808	3724.53 ± 274.346	9074.85 ± 737.580
Cmax (ng/mL)	462.78 ± 49.310	627.51 ± 96.807	254.55 ± 39.385	266.72 ± 11.914	193.41 ± 25.174
Tmax (h)	6	6	1.80 ± 0.274*#	1.60 ± 1.282*#	0.137*# ¥
Vdz/F (L/kg)	86.08 ± 12.200	87.12 ± 13.980	26.40 ± 3.714*#	35.76 ± 4.681*#	79.98 ± 10.112*# ¥ z
Cl/F (L/h/kg)	18.36 ± 0.963	19.26 ± 1.699	2.32 ± 0.144*#	2.99 ± 0.214*#	1.64 ± 0.125*#
ke (h ⁻¹)	0.22 ± 0.034	0.22 ± 0.033	0.09 ± 0.010*#	0.08 ± 0.005*#	0.02 ± 0.002 ¥ z
t _{1/2} (h)	3.25 ± 0.446	3.13 ± 0.391	7.87 ± 0.907*#	8.26 ± 0.545*#	33.82 ± 3.412 ¥ z
MRT (h)	9.29 ± 0.323	8.98 ± 0.316	12.38 ± 1.211	12.11 ± 0.633	49.06 ± 4.864*# ¥ z
AUC/dosis x 10 ⁻³ (h/L)	54.61 ± 3.026	52.27 ± 4.691	432.14 ± 26.864*#	335.54 ± 24.714*# ¥	613.16 ± 49.838*# ¥ z
Cmax/dosis x 10 ⁻³ (L ⁻¹)	6.17 ± 0.656	6.27 ± 0.967	34.40 ± 5.326*#	24.03 ± 1.074*# ¥	13.07 ± 1.702*# ¥ z
Frel	1.0	1.0	7.9	6.1	11.2

Los datos corresponden a quercetina tras la reacción con β -glucuronidasa/arilsulfatasa. AUC_0^∞ : área bajo la curva extrapolada al infinito; Cmax: concentración máxima; Tmax: tiempo máximo; Vdz/F: volumen de distribución en el pseudo equilibrio en función de la biodisponibilidad; Cl/F: aclaramiento en función de la biodisponibilidad; ke: constante de velocidad de eliminación; t_{1/2}: vida media terminal; MRT: tiempo medio de residencia; AUC/dosis: área bajo la curva extrapolada al infinito y corregida por la dosis; Cmax/dosis: concentración máxima corregida por la dosis; Frel: biodisponibilidad relativa en función de la dosis de 75 mg/kg de rutina estándar. Datos expresados como promedio ± SD (n = 5). ¹Dosis equivalente a rutina. * p < 0.05 con respecto a la dosis de 75 mg/kg de compuesto puro. # p < 0.05 con respecto a la dosis de 100 mg/kg de compuesto puro. ¥ p < 0.05 con respecto a la dosis de 500 mg/kg del extracto. z p < 0.05 con respecto a la dosis de 750 mg/kg del extracto (ANOVA y HSD/ Mann-Whitney).

En resumen, los parámetros que explicarían la mayor exposición sistémica de los conjugados de quercetina por efecto del extracto son: el T_{max} (como indicador de la velocidad de absorción) que fue discutido anteriormente, el Cl/F y el V_d/F.

Como se evidencia en la Figura 3-13, el extracto produce una disminución importante del Cl/F que se manifiesta en un aumento de hasta 5 y 10 veces en el MRT y la t_{1/2}, respectivamente. La disminución de Cl/F puede ser una consecuencia obvia de la mayor biodisponibilidad de los conjugados, ocasionada por ejemplo por la mayor solubilidad de rutina y la disminución del eflujo intestinal, asuntos previamente discutidos; y/o puede estar asociado a la saturación del metabolismo o de la secreción renal de estos compuestos. Según la literatura, los conjugados de quercetina pueden seguir siendo metabolizados en los hepatocitos o excretados por acción de varios transportadores (O'Leary et al., 2003; Williamson et al., 2018). El metabolismo hepático adicional consistiría en la metilación o en la desconjugación y posterior sulfatación de los glucurónidos de quercetina (O'Leary et al., 2003). Por otro lado, es conocido que transportadores como P-pg participan en la excreción a la orina y bilis de ciertas moléculas (Yin & Wang, 2016), por tanto, una inhibición de estos transportadores, como la que se ha sugerido ocasiona el extracto a nivel intestinal, pudiera conducir a la disminución del aclaramiento de sus componentes.

El V_d/F de quercetina también disminuye en el extracto administrado por vía oral frente al compuesto puro, pero este efecto comúnmente es consecuencia de otros aspectos como la mejora de la biodisponibilidad (Stern et al., 2016). Sobre este parámetro es importante señalar lo ocurrido para la dosis de 1000 mg/kg, donde se observa su aumento significativo, lo cual se refleja en menores C_p de quercetina. Es posible que en esta dosis empiece a ocurrir saturación de las proteínas plasmáticas como fue discutido anteriormente, este aumento en el V_d/F junto con la disminución del Cl/F, produce en esta dosis valores de MRT y t_{1/2} muy por encima de los observados en las dosis menores de extracto (Tabla 3-6).

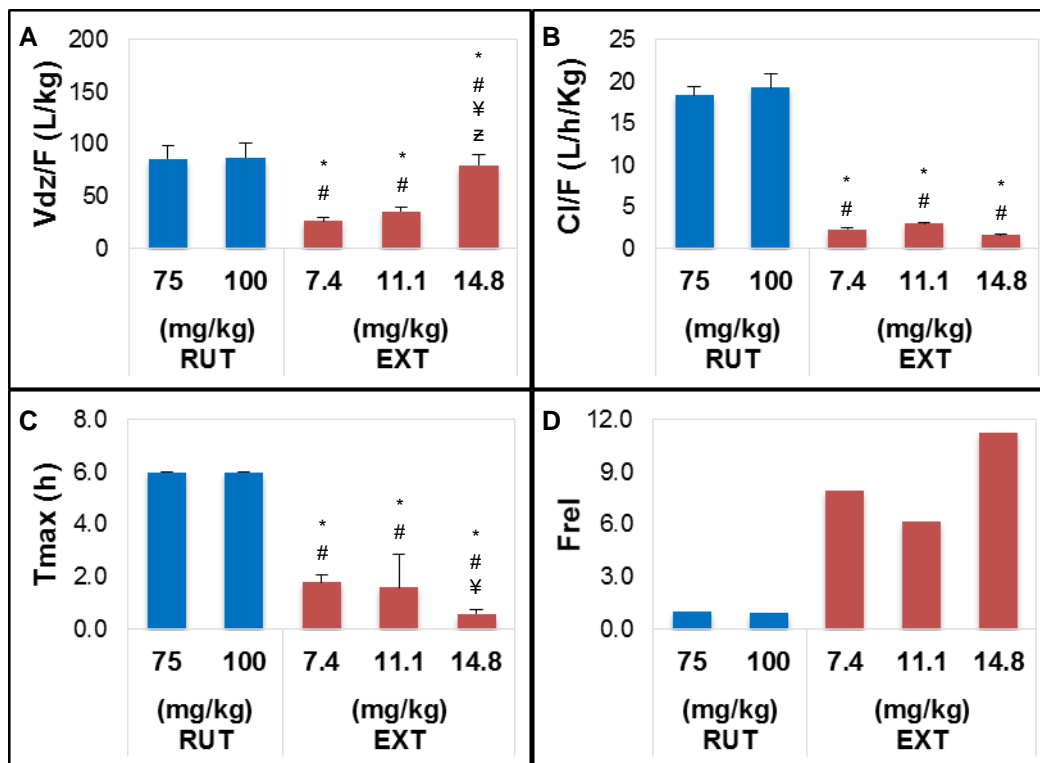


Figura 3-13: Parámetros farmacocinéticos relevantes de quercetina tras la administración oral de rutina en ratas, como compuesto puro o en el extracto de cálices de *P. peruviana*. Los datos corresponden a quercetina tras la reacción con β -glucuronidasa/arilsulfatasa. **A:** volumen de distribución en el pseudo equilibrio en función de la biodisponibilidad (V_{dz}/F). **B:** aclaramiento en función de la biodisponibilidad (Cl/F). **C:** tiempo máximo (T_{max}). **D:** biodisponibilidad relativa en función de la dosis de 75 mg/kg de rutina estándar (F_{rel}). RUT: rutina pura. EXT: extracto de cálices de *P. peruviana*. Dosis expresadas en equivalente a rutina. Los datos corresponden al promedio \pm SD ($n = 5$). * $p < 0.05$ con respecto a la dosis de 75 mg/kg de compuesto puro. # $p < 0.05$ con respecto a la dosis de 100 mg/kg de compuesto puro. ¥ $p < 0.05$ con respecto a la dosis de 500 mg/kg del extracto, equivalente a 7.4 mg/kg de rutina. z $p < 0.05$ con respecto a la dosis de 750 mg/kg del extracto, equivalente a 7.4 mg/kg de rutina. (ANOVA y HSD/ Mann-Whitney).

En la literatura existen múltiples reportes de aumento de la exposición sistémica de flavonoides cuando se administran como extractos vegetales o preparaciones poliherbales, en el caso concreto de rutina, el trabajo de Lu et al., (2013) sugiere que la presencia de componentes no flavonoides en los extractos, sería determinante para la mejor biodisponibilidad de este grupo de compuestos. Por su parte, Tamura et al., (2007) demostraron que la administración de rutina en conjunto con pectina, aumenta la biodisponibilidad de conjugados de quercetina, por alteración de la función intestinal y de la actividad metabólica de la flora en ratones. El fruto de *P. peruviana* es rico en pectina

(Reyes-Beltrán et al., 2016) y es de esperar que los cálices también lo sean, futuras investigaciones podrían dirigirse a investigar este punto.

Aunque en el presente trabajo no se observó un aumento en la biodisponibilidad de rutina intacta en ninguna de las condiciones ensayadas, sí se encontró que el extracto de cálices de *P. peruviana* puede ser una buena fuente de glucurónidos de quercetina, para los cuales también hay reportes de actividad biológica (El-Saber Batiha et al., 2020; Smolarz et al., 2008; Yoshino et al., 2011).

Los resultados demuestran que la matriz del extracto tiene efecto sobre la biodisponibilidad de conjugados de quercetina a partir de rutina, produciendo un aumento de hasta 11 veces en este parámetro. Lo anterior sugiere que son estos conjugados los responsables de los efectos farmacológicos observados en el extracto de cálices de *P. peruviana* (Echeverry, Valderrama, Costa, Ospina-Giraldo, & Aragón, 2018; Toro Arango, Aragón & Ospina). El efecto del extracto sobre la biodisponibilidad de conjugados de quercetina, debe ser considerado en el diseño racional de un producto fitoterapéutico a partir de esta fuente.

▪ **Modelo farmacocinético poblacional en ratas**

Con el objetivo de describir mejor el modelo de distribución de los compuestos seguidos en el plasma de las ratas y entender la variabilidad en los parámetros farmacocinéticos incluyendo la influencia de los tratamientos y las dosis estudiadas sobre ellos, se realizó un análisis farmacocinético poblacional a partir de los datos recolectados experimentalmente.

Inicialmente se determinó por separado el modelo estructural que mejor describía el perfil de Cp de rutina i.v. y quercetina oral para cada tratamiento, encontrándose en todos los casos que a pesar de las diferencias en los parámetros farmacocinéticos, las Cp seguían el mismo modelo estructural, es decir que la matriz del extracto sería una fuente de variabilidad pero no modificaría el modelo farmacocinético de base de los compuestos.

Tras la comprobación mencionada, se desarrollaron dos modelos farmacocinéticos poblacionales: uno para describir las concentraciones plasmáticas de rutina tras la administración i.v. del compuesto puro o del extracto de cálices de *P. peruviana* y otro para describir las concentraciones de quercetina después de la administración oral de los tratamientos y de reacción con β -glucuronidasa/arilsulfatasa.

En el caso de la vía i.v., los datos se ajustaron mejor a un modelo de dos compartimentos como el del esquema (Figura 3-14, AIC 4168). Las ecuaciones diferenciales que describen el cambio en la cantidad de rutina en el tiempo, en los compartimentos central y periférico, se expresan en las ecuaciones 3-4 y 3-5.

$$\frac{dX_1}{dt} = k_{21}X_2 - (k_{12} + k_{10})X_1 \quad 3-4$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_{12}X_1 - k_{21}X_2 \quad 3-5$$

Donde X_1 y X_2 es la cantidad de rutina en los compartimentos central y periférico respectivamente, k_{10} es la constante de velocidad de eliminación, equivalente a k_e ; k_{12} es la constante de velocidad de distribución del compartimento 1 al 2 y k_{21} es la constante de velocidad de distribución del compartimento 2 al 1.

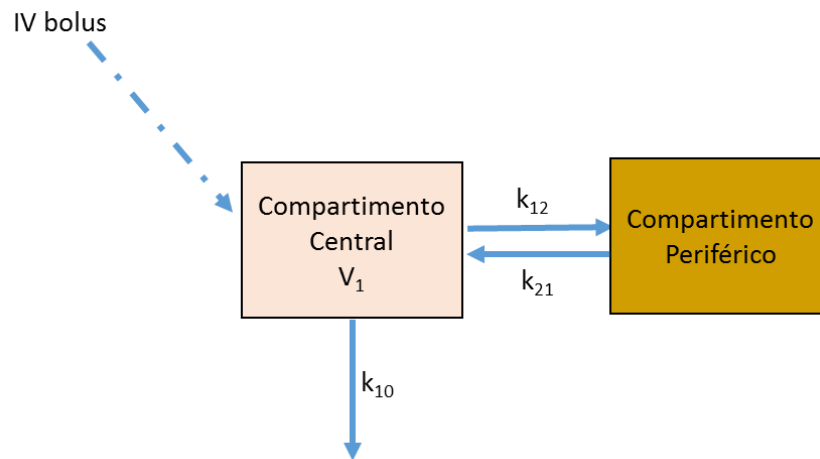


Figura 3-14: Modelo de dos compartimentos con eliminación de orden 1 para rutina i.v.

V_1 : volumen del compartimento central, equivalente a V , k_{10} : constante de velocidad de eliminación, equivalente a k_e , k_{12} : constante de velocidad de distribución del compartimento 1 al 2, k_{21} : constante de velocidad de distribución del compartimento 2 al 1.

Una vez establecido el modelo estructural, se construyó el modelo de covariables para definir la relación entre los parámetros farmacocinéticos y las posibles fuentes de variabilidad interindividual (covariables), esta clase de análisis mejora la precisión de las estimaciones de los modelos poblacionales y ayudan a su interpretación (Verotta, 2012). Las covariables consideradas en este caso fueron: los tratamientos (rutina pura y extracto) y las diferentes dosis. Como resultado se obtuvo que la dosis equivalente de rutina no fue

una fuente significativa de variabilidad, lo cual nuevamente muestra la linealidad farmacocinética de rutina pura y en el extracto que ya había observada en el análisis no compartimental. En cambio, el tratamiento sí fue una covariable significativa que tuvo influencia sobre el volumen del compartimento central (V) y la k_e . Además, se encontró correlación lineal entre la desviación debida a efectos aleatorios de ambos parámetros, es decir que en los individuos k_e fue dependiente de V . Todos estos aspectos fueron incluidos en el modelo y tuvieron un impacto positivo sobre el ajuste poblacional (Figura 3-15) y sobre el AIC que se redujo a 4121.

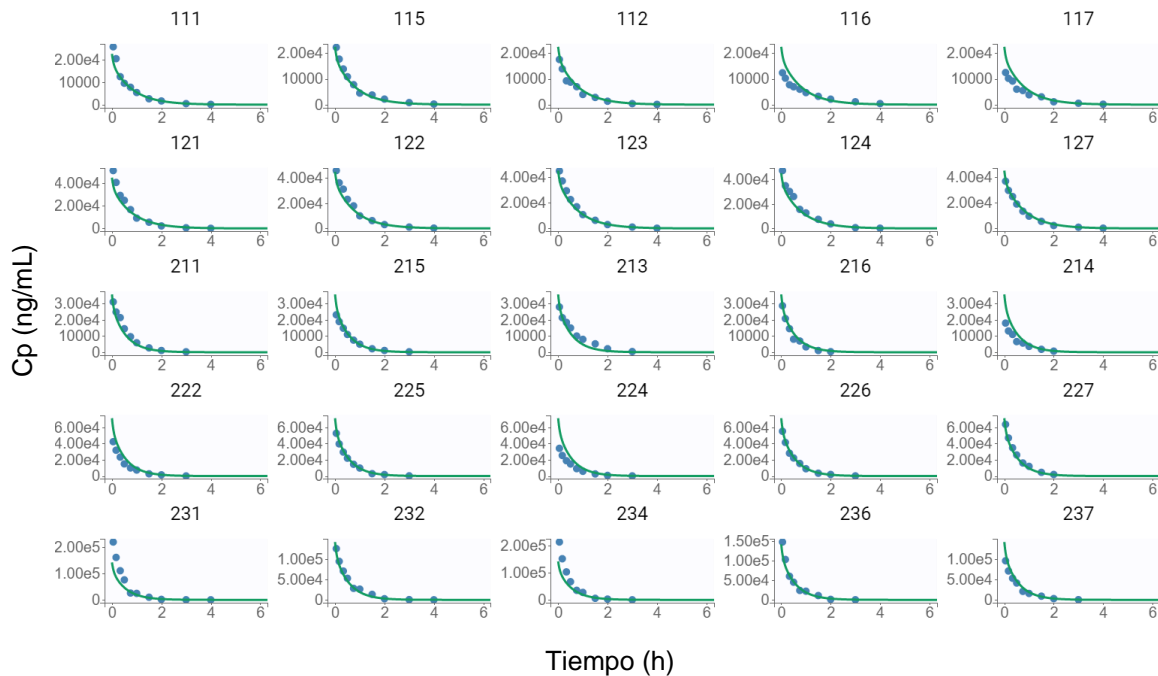


Figura 3-15 Ajuste poblacional del perfil de C_p vs tiempo de rutina por vía i.v en ratas. Los puntos corresponden a los datos experimentales y la línea sólida al ajuste poblacional. Los números 111 a 237 son los códigos asignados a cada individuo, los iniciados en 1 pertenecen al grupo de rutina estándar y los iniciados en 2 al grupo de extracto de cálices de *P. peruviana*.

Los parámetros poblacionales que arrojó el modelo final están detallados en la Tabla 3-7, estos fueron estimados usando como referencia los datos del grupo de rutina estándar. Se puede observar que los valores de V y k_e son semejantes a V_{dz} y k_{e12} de la dosis más alta del compuesto puro, obtenidos por análisis no compartimental (Tabla 3-3). El valor de k_{12}

$< k_{21}$ (proporción 1/5) indica que la fase de distribución es muy corta y rutina alcanza rápidamente el equilibrio entre los dos compartimentos (Shargel & Yu, 2015).

Tabla 3-7: Parámetros poblacionales de rutina administrada por vía i.v. en forma pura o desde el extracto de cálices de *P. peruviana* en ratas.

	Valor	Aproximación estocástica	
		S.E.	R.S.E. (%)
Efectos fijos			
V_{pop} (L/kg x 10 ⁻³)	6.46 x 10 ⁻⁵	6.62 x 10 ⁻⁶	10.2
$\beta_V GEXT$	0.478	0.128	26.8
ke_{pop} (h ⁻¹)	1.47	0.0812	5.54
$\beta_{ke} GEXT$	0.395	0.0622	15.8
k_{12_pop} (h ⁻¹)	2.6	1.1	42.3
k_{21_pop} (h ⁻¹)	13.6	4.37	32.2
Desviación estándar de efectos aleatorios			
ΩV	0.306	0.0469	15.3
Ωke	0.147	0.0231	15.8
Correlaciones			
$ke V$	-0.701	0.111	15.8
Parámetros del modelo de error			
a	38.9	6.47	16.6
b	0.128	0.00801	6.28

V: volumen del compartimento central. ke: constante de velocidad de eliminación. k_{12} : constante de velocidad de distribución del compartimento 1 al 2. k_{21} : constante de velocidad de distribución del compartimento 2 al 1. Pop: valor en la población. S.E.: error estándar. R.S.E: error estándar relativo. β : coeficiente que expresa la variabilidad debida a la covariable tratamiento = extracto (GEXT). Ω : variabilidad aleatoria. a y b: componentes del error residual (diferencia entre las Cp experimentales y predichas).

Las ecuaciones para describir los parámetros individuales teniendo en cuenta la covariable tratamiento, fueron las siguientes:

$$\log(V/(1 - V)) = \log(V_{pop}/(1 - V_{pop})) + \beta_V GEXT + \eta_V \quad 3-6$$

$$\log(ke) = \log(ke_{pop}) + \beta_{ke} GEXT + \eta_{ke} \quad 3-7$$

$$\log(k_{12}) = \log(k_{12_pop}) \quad 3-8$$

$$\log(k_{21}) = \log(k_{21_pop}) \quad 3-9$$

En las ecuaciones 3-6 a 3-9, ρ se refiere al parámetro poblacional, β es un coeficiente que expresa la variabilidad debida a la covariable tratamiento y aplica cuando ésta es igual a extracto (GEXT) y η la desviación individual en relación al parámetro poblacional.

Una forma de evaluar los modelos poblacionales es a través de la revisión predictiva visual (VPC, por sus siglas en inglés), un gráfico que muestra los datos de C_p observados, junto con intervalos de predicción obtenidos de simulaciones hechas con el modelo definido y resalta los datos atípicos que se encuentran por fuera del intervalo de predicción. Como es de esperarse, un modelo con buen ajuste, presentará pocos datos atípicos (Mould & Upton, 2013). El gráfico VPC del modelo poblacional para rutina i.v. en ratas se muestra en la Figura 3-16.

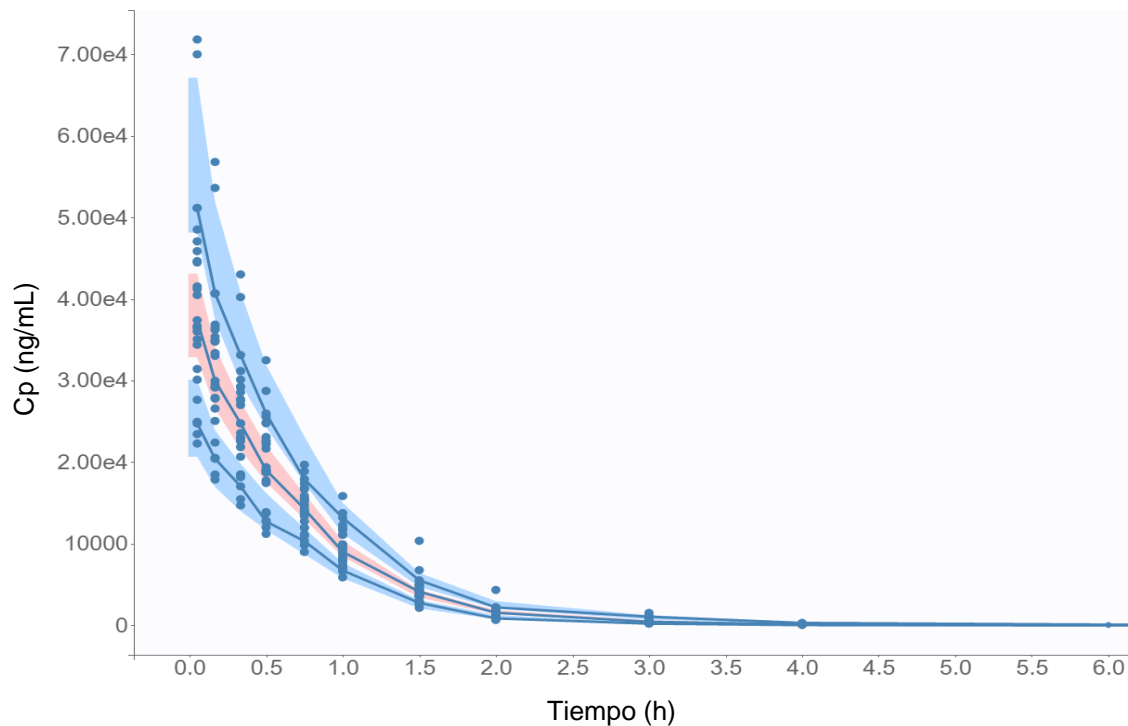


Figura 3-16: Revisión predictiva visual del modelo desarrollado para rutina i.v. en ratas. Área azul y rosada: intervalos de predicción al 90%, obtenidos a partir de 500 simulaciones. Líneas sólidas azules: percentiles empíricos. Puntos: datos observados. No se observaron puntos atípicos.

Para la vía oral, se seleccionó un modelo estructural que pudiese describir el doble pico observado para quercetina, este fenómeno, común en los flavonoides, puede ser explicado de varias formas: 1) La segunda señal puede deberse a la circulación enterohepática de los compuestos, que tras ser excretados en la bilis pueden ser depositados en el lumen intestinal y reabsorbidos, en un proceso que requiere la participación de varios transportadores de entrada y eflujo en las membranas apical y basolateral de los enterocitos y los hepatocitos (Z. Liu & Hu, 2007; L. Wang et al., 2019) y 2) Puede deberse a la recirculación entérica, en este caso, conjugados glucurónido de los flavonoides que hayan sufrido eflujo desde los enterocitos en el intestino delgado o en la región proximal del colon, tienen una nueva oportunidad de absorberse tras librarse del conjugado por la acción de glucuronidasas de la flora bacteriana, abundante en ese órgano; es decir que existirían dos sitios de absorción (Z. Liu & Hu, 2007; L. Wang et al., 2019; L. Zhang et al., 2007). En el caso de los flavonoides glicosilados como rutina, la absorción a nivel del colón se vería también favorecida por la abundancia de glicosidasas de la flora que liberarían las agliconas, siendo éstas en general más permeables que sus glicósidos (Braune & Blaut, 2016).

Un trabajo anterior realizado por X. Chen et al., (2005) descartó el modelo de circulación enterohepática de quercetina utilizando un modelo experimental *in vivo* de ratas ligadas. Este experimento consistió en conectar el ducto biliar de un animal donante (el que recibió la dosis de quercetina) al intestino delgado de un receptor, en el cual no detectaron niveles plasmáticos de la aglicona o sus conjugados. Teniendo en cuenta este reporte y los resultados en cuanto a la falta de doble pico en los perfiles de C_p vs tiempo por vía i.v. (Figuras 3-6A y 3-7A), se consideró el fenómeno de absorción en dos sitios para el desarrollo del modelo farmacocinético cuya estructura se presenta en la Figura 3-17.

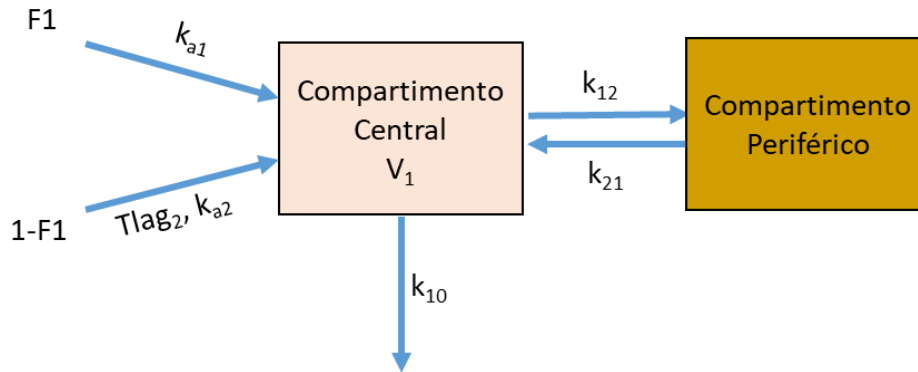


Figura 3-17: Modelo de absorción en dos sitios con distribución a dos compartimentos y eliminación de orden 1 para quercetina oral, proveniente de rutina pura o del extracto de cálices de *P. peruviana*.

F_1 : fracción absorbida en el sitio 1. $1-F_1$: fracción absorbida en el sitio 2. k_{a1} : constante de velocidad de absorción desde el sitio 1. k_{a2} : constante de velocidad de absorción desde el sitio 2. $Tlag_2$: retraso de la segunda absorción, por ejemplo por tránsito intestinal. V_1 : volumen del compartimento central, equivalente a V , k_{10} : constante de velocidad de eliminación, equivalente a k_e , k_{12} : constante de velocidad de distribución del compartimento 1 al 2, k_{21} : constante de velocidad de distribución del compartimento 2 al 1.

Las ecuaciones diferenciales que describen el cambio en la cantidad de quercetina en el tiempo, en los compartimentos central y periférico, se expresan en las ecuaciones 3-10 y 3-11.

$$\frac{dX_1}{dt} = k_{a1}F_1 + \delta_{tTlag_2}k_{a2}(1 - F_1) + k_{21}X_2 - (k_{12} + k_{10})X_1 \quad 3-10$$

$$\frac{dX_2}{dt} = k_{12}X_1 - k_{21}X_2 \quad 3-11$$

Donde X_1 y X_2 es la cantidad de quercetina en los compartimentos central y periférico respectivamente, k_{a1} es la constante de velocidad de absorción desde el sitio 1, F_1 es la fracción de quercetina absorbida en el sitio 1, k_{a2} es la constante de velocidad de absorción desde el sitio 2, $(1-F_1)$ es la fracción de quercetina absorbida en el sitio 2, k_{10} es la constante de velocidad de eliminación, equivalente a k_e ; k_{12} es la constante de velocidad de distribución del compartimento 1 al 2 y k_{21} es la constante de velocidad de distribución del compartimento 2 al 1. Dado que conceptualmente la segunda absorción ocurre con un retraso igual a $Tlag_2$, es decir, no inicia al mismo tiempo que la primera absorción, se incluye en la ecuación la función δ_{tTlag_2} que toma valor de 0 cuando el tiempo es menor a

$Tlag_2$ y de 1 cuando el tiempo es mayor o igual que $Tlag_2$ ($\delta_{iTlag_2} = 0$, si $t < Tlag_2$ y $\delta_{iTlag_2} = 1$, si $t \geq Tlag_2$).

En cuanto al modelo de covariables, dada la falta de linealidad farmacocinética de quercetina desde el extracto (Figura 3-12), el tratamiento (rutina o extracto) no tuvo en sí influencia sobre la variabilidad de los parámetros y fue la dosis la covariable significativa del modelo. Los parámetros influenciados por la dosis fueron: ka_1 , $Tlag_2$, V y ke . En este caso no hubo dependencia entre ninguno de los parámetros.

Los parámetros poblacionales, tomando como referencia la dosis de 100 mg/kg de rutina, están detallados en la Tabla 3-8. El AIC del modelo final fue 2648 y el ajuste poblacional se presenta en la Figura 3-18.

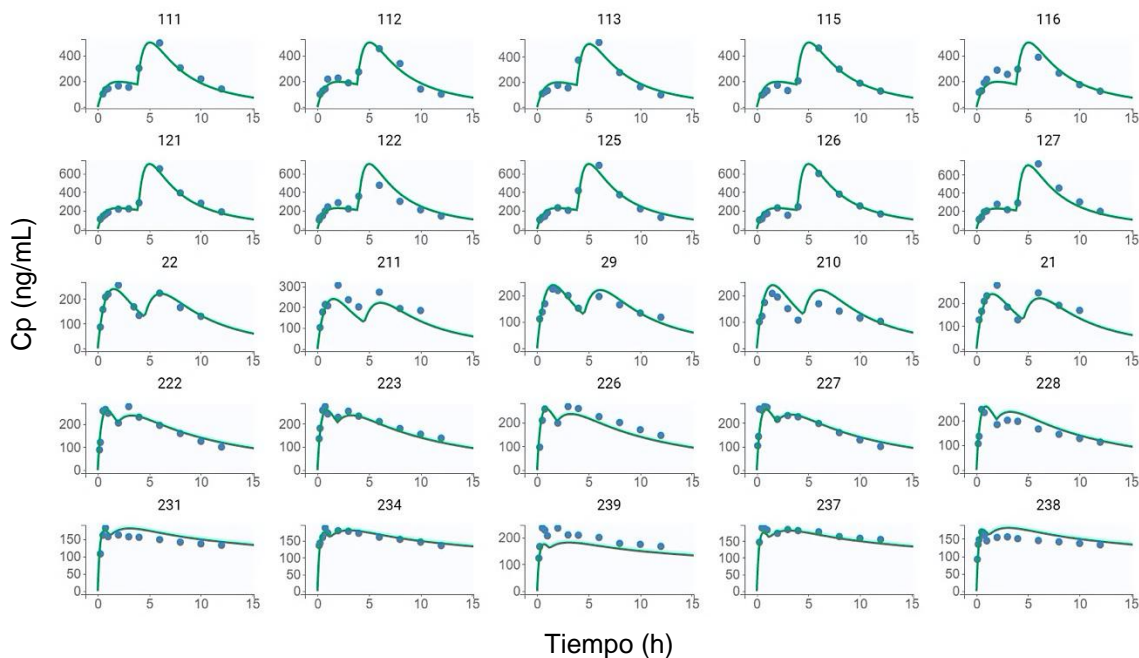


Figura 3-18 Ajuste poblacional del perfil de Cp vs tiempo de quercetina tras la administración oral de rutina en ratas.

Los puntos corresponden a los datos experimentales y la línea sólida al ajuste poblacional. Los números 111 a 238 son los códigos asignados a cada individuo, los iniciados en 1 pertenecen al grupo de rutina estándar y los iniciados en 2 al grupo de extracto de cálices de *P. peruviana*.

Tabla 3-8: Parámetros poblacionales de quercetina oral, proveniente de rutina pura o del extracto de cálices de *P. peruviana* en ratas.

	Valor	Aproximación estocástica	
		S.E.	R.S.E.(%)
Efectos fijos			
ka_{1_pop} (h^{-1})	0.104	0.0129	12.5
β_{ka1D75}	0.281	0.167	59.6
$\beta_{ka1D500}$	1.94	0.166	8.54
$\beta_{ka1D750}$	3.15	0.176	5.59
$\beta_{ka1D1000}$	3.77	0.175	4.64
ka_{2_pop} (h^{-1})	0.411	0.0686	16.7
F_{1_pop}	0.565	0.0275	4.87
$Tlag_{2_pop}$ (h)	3.91	0.021	0.538
$\beta_{Tlag2D75}$	-0.0177	0.00556	31.3
$\beta_{Tlag2D500}$	0.149	0.0936	63
$\beta_{Tlag2D750}$	-0.695	0.0595	8.56
$\beta_{Tlag2D1000}$	-1.17	0.254	21.7
V_{pop} ($L/kg \times 10^{-3}$)	0.0132	0.00114	8.68
$\beta_V D75$	0.251	0.0951	37.8
$\beta_V D500$	-0.645	0.105	16.4
$\beta_V D750$	0.245	0.118	48.2
$\beta_V D1000$	1.09	0.101	9.25
ke_{pop} (h^{-1})	1.42	0.119	8.35
β_{keD75}	-0.225	0.0824	36.6
β_{keD500}	-1.3	0.144	11.2
β_{keD750}	-2.13	0.181	8.49
$\beta_{keD1000}$	-3.57	0.231	6.47
k_{12_pop} (h^{-1})	0.279	0.0802	28.8
k_{21_pop} (h^{-1})	0.268	0.107	39.9
Desviación estándar de efectos aleatorios			
Ω_{ka1}	0.189	0.0429	22.7
Ω_{ka2}	0.236	0.0559	23.8
Ω_{F1}	0.214	0.0769	36
Ω_V	0.0819	0.0148	18.1
Parámetros del modelo de error			
a	8.87	2.49	28.1
b	0.0457	0.0143	31.3

ka_1 : constante de velocidad de absorción desde el sitio 1. ka_2 : constante de velocidad de absorción desde el sitio 2. F_1 : fracción absorbida en el sitio 1. $Tlag_2$: retraso de la segunda absorción. V : volumen del compartimento central. ke : constante de velocidad de eliminación. k_{12} : constante de velocidad de distribución del compartimento 1 al 2. k_{21} : constante de velocidad de distribución del compartimento 2 al 1. Pop : valor en la población. $S.E.$: error estándar. $R.S.E.$: error estándar relativo. β : coeficiente que expresa la variabilidad debida a la covariable dosis = D75, D500, D750, D1000 mg/kg. Ω : variabilidad aleatoria. a y b : componentes del error residual (diferencia entre las C_p experimentales y predichas).

Las ecuaciones para describir los parámetros individuales teniendo en cuenta la covariable dosis, fueron las siguientes:

$$\log(ka_1) = \log(ka_{1_{pop}}) + \beta_{ka1}D75 + \beta_{ka1}D500 + \beta_{ka1}D750 + \beta_{ka1}D1000 + \eta_{ka1} \quad 3-12$$

$$\log(ka_2) = \log(Ka_{2_{pop}}) + \eta_{ka2} \quad 3-13$$

$$\log(F_1/(1 - F_1)) = \log(F_{1_{pop}}/(1 - F_{1_{pop}})) + \eta_{F1} \quad 3-14$$

$$\log(Tlag_2) = \log(Tlag_{2_{pop}}) + \beta_{Tlag2}D75 + \beta_{Tlag2}D500 + \beta_{Tlag2}D750 + \beta_{Tlag2}D1000 + \eta_{Tlag2} \quad 3-15$$

$$\log(V) = \log(V_{pop}) + \beta_V D75 + \beta_V D500 + \beta_V D750 + \beta_V D1000 + \eta_V \quad 3-16$$

$$\log(ke) = \log(ke_{pop}) + \beta_{ke}D75 + \beta_{ke}D500 + \beta_{ke}D750 + \beta_{ke}D1000 + \eta_{ke} \quad 3-17$$

$$\log(k_{12}) = \log(k_{12_{pop}}) \quad 3-18$$

$$\log(k_{21}) = \log(k_{21_{pop}}) \quad 3-19$$

En las ecuaciones 3-12 a 3-19, pop se refiere al parámetro poblacional, η a la desviación individual en relación al parámetro poblacional y β es un coeficiente que expresa la variabilidad debida a la covariable dosis. $\beta_x D75$, $\beta_x D500$, $\beta_x D750$ y $\beta_x D1000$ aplican cuando la dosis es igual a 75 mg/kg de rutina pura, 500, 750 o 1000 mg/kg de extracto, respectivamente.

El gráfico VPC del modelo poblacional, se presenta en la Figura 3-19.

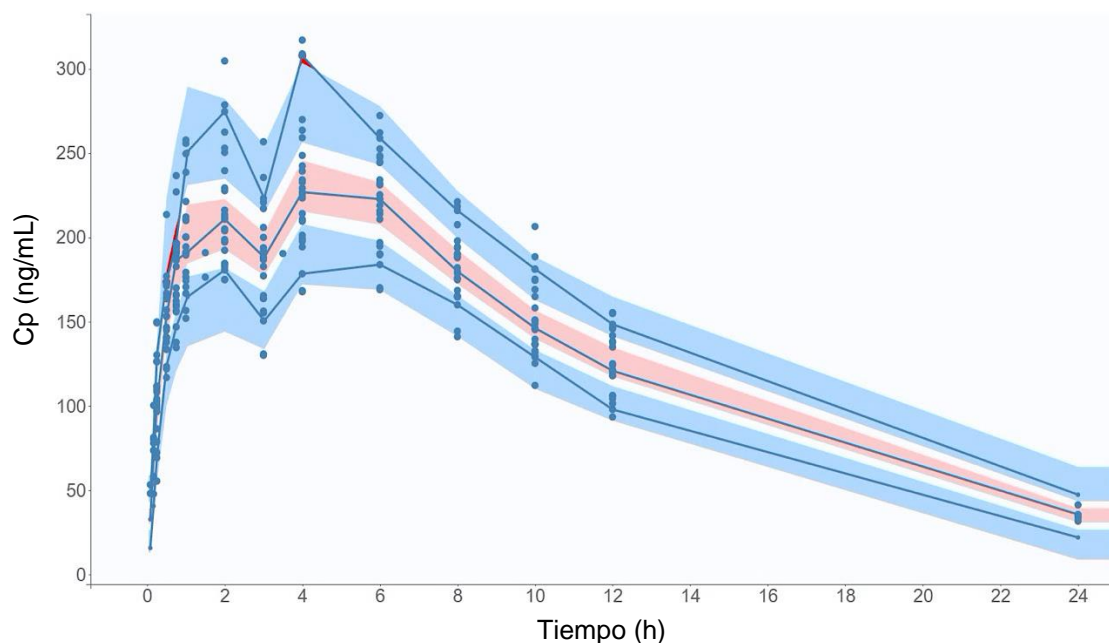


Figura 3-19: Revisión predictiva visual del modelo desarrollado para quercetina vía oral en ratas.

Área azul y rosada: intervalos de predicción al 90%, obtenidos a partir de 500 simulaciones. Líneas sólidas azules: percentiles empíricos. Puntos: datos observados. Área roja: puntos atípicos.

Los modelos desarrollados captaron las diferencias en los parámetros farmacocinéticos de rutina y quercetina observadas en el análisis no compartimental en las distintas condiciones de ensayo. Para rutina por vía i.v. estos cambios fueron: el aumento en el volumen de distribución y k_e por efecto del extracto, descritos por los parámetros β_{vGEXT} y β_{keGEXT} respectivamente (Tabla 3-7). Para quercetina oral, se evidenciaron los cambios dependientes de las dosis en el volumen de distribución, en los parámetros asociados a la velocidad de absorción y en la k_e , tales cambios están descritos por los parámetros β_v , β_{ka1} , β_{Tlag2} y β_{ke} de las distintas dosis (Tabla 3-8). El modelo desarrollado servirá de base para realizar otros análisis y predicciones, por ejemplo, por inclusión de datos sobre eficacia y seguridad.

3.3.3 Farmacocinética de rutina pura y desde el extracto de *P. peruviana* en conejos.

Considerando que los estudios preclínicos para los nuevos productos deben involucrar al menos dos especies animales, una roedora y una no roedora (European Medicines Agency, 2013), se estudió la farmacocinética de rutina, sola y desde el extracto de cálices de *P. peruviana*, en conejos New Zealand (familia *Leporidae*).

Los conejos son de las especies animales más grandes dentro del grupo de los mamíferos pequeños y comparten algunas características con los humanos como el pH del tracto gastrointestinal entre 1 y 7.4 y la regulación de la motilidad intestinal por la hormona motilina (Bormans & Peeters, 1986). Varios investigadores han usado este modelo animal para estudiar la farmacocinética de marcadores en extractos vegetales (Fan et al., 2006; Hsiu et al., 2002; Nan et al., 2010; Yan Yang et al., 2008; You et al., 2005; X. Zhang et al., 2007).

▪ Vía i.v. en conejos

Al igual que en las ratas, en el plasma de los conejos que recibieron rutina pura o extracto de cálices de *P. peruviana* por vía i.v., se detectaron señales de rutina y quercetina, esta última tras el tratamiento de las muestras con las enzimas β -glucuronidasa/arilsulfatasa,

La Figura 3-20 presenta el perfil de Cp vs tiempo de rutina y quercetina en conejos, tras la administración de dosis de 0.37 y 100 mg/kg del compuesto puro o del extracto, respectivamente. Se evidencia en las gráficas que las señales de rutina desaparecen más rápidamente desde el extracto, siendo indetectables a partir de las 2 h. Por su parte, las señales promedio de quercetina (desconjugada) aparecen desde el primer punto de muestreo en ambos tratamientos, con algunas diferencias que serán discutidas más adelante.

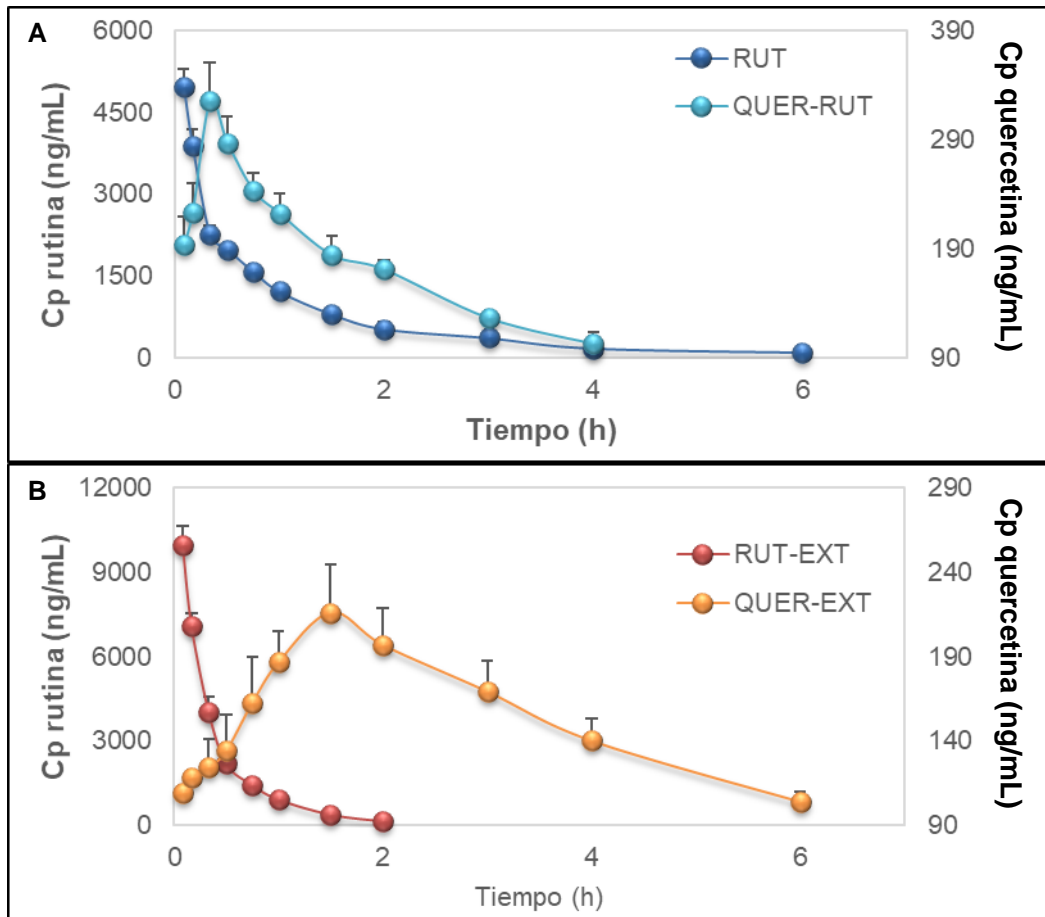


Figura 3-20: Curva Cp vs tiempo de rutina y quercetina tras la administración i.v. de rutina pura o del extracto de cálices de *P. peruviana* en conejos.

A: RUT: rutina pura, dosis 0.37 mg/kg. QUER-RUT: quercetina generada tras la administración de rutina pura. **B:** RUT-EXT: rutina desde el extracto de cálices de *P. peruviana*, dosis 100 mg/kg, equivalentes a 1.48 mg/kg de rutina. QUER-EXT: quercetina generada tras la administración del extracto. En todos los casos las concentraciones plasmáticas de quercetina se obtuvieron tras reacción con β -glucuronidasa/arilsulfatasa. En todos los casos datos expresados como promedio \pm SEM (n =5). No hubo niveles detectables de ninguno de los compuestos después de las 6 h.

En cuanto a los parámetros farmacocinéticos, en el grupo que recibió rutina pura el V_{dss} , el Cl y la $t_{1/2}$ fueron 0.29 ± 0.053 L/kg, 0.079 ± 0.013 L/h/kg y 0,79 h respectivamente. Cuando se administró el extracto, V_{dss} y Cl aumentaron cerca de 3 veces respecto a rutina pura. Como resultado de lo anterior, la exposición sistémica de rutina corregida por la dosis (AUC/dosis) en el grupo del extracto se redujo casi 4 veces, la $t_{1/2}$ disminuyó prácticamente a la mitad, aunque sin diferencias estadísticas debido a la alta variabilidad de k_e y consecuentemente, el MRT presentó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de 20% (Tabla 3-9, Figura 3-21). El aumento en el V_{ss} y Cl de rutina por efecto de la

matriz del extracto ya había sido observado en los experimentos con ratas y las razones que explicarían estos cambios fueron discutidas en la sección 3.3.2.

Tabla 3-9: Parámetros farmacocinéticos de rutina tras la administración i.v. del compuesto o del extracto de cálices de *P. peruviana* en conejos.

Parámetro	RUTINA	EXTRACTO
	Dosis mg/kg	
	0.37	100 (1.48 ¹)
AUC_0^∞ (ng*h/mL)	4740.94 ± 813.80	5108.77 ± 1119.320
Cp^0 (ng/mL)	4960.02 ± 760.23	9939.91 ± 1531.17
Vss (L/kg)	0.29 ± 0.053	0.907 ± 0.320*
CL (L/kg*h)	0.079 ± 0.013	0.3002 ± 0.060*
ke (h ⁻¹)	1.06 ± 0.464	1.79 ± 0.302
t _{1/2} (h)	0.79 ± 0.381	0.398 ± 0.070
MRT (h)	3.63 ± 0.163	2.94 ± 0.515*
Fmet	0.35 ± 0.046	0.40 ± 0.085
Vdz (L/kg)	0.084 ± 0.028	0.175 ± 0.055*
AUC/dosis x10 ⁻³ (h/L)	12895.36 ± 2213.540	3451.87 ± 756.300*
Cp ⁰ /dosis x10 ⁻³ (L ⁻¹)	13491.25 ± 2067.840	6716.16 ± 1034.580*

AUC_0^∞ : área bajo la curva extrapolada al infinito; Cp^0 : concentración inicial; Vss: volumen de distribución en estado estacionario; Cl: aclaramiento; ke: constante de velocidad eliminación; t_{1/2}: vida media terminal; MRT: tiempo medio de residencia; Fmet: fracción metabolizada; Vdz: volumen de distribución en el pseudo equilibrio; AUC/dosis: área bajo la curva corregida por la dosis; Cp^0 /dosis: concentración inicial corregida por la dosis. Datos expresados como promedio ± SD (n = 5). ¹Dosis equivalente a rutina. *p < 0.05 con respecto al compuesto puro (Prueba t/Wilcoxon).

Sobre la metabolización de rutina en Q3OS y Q3OG, la Fmet de los individuos osciló entre 0.3 y 0.5 sin diferencias significativas entre los grupos de rutina pura y extracto. Sin embargo, cabe resaltar que en el grupo que recibió el compuesto puro se detectaron niveles plasmáticos de quercetina, tras el tratamiento de las muestras con las enzimas β-glucuronidasa/arilsulfatasa, desde el primer muestreo y el pico de los metabolitos se observó a los 20 min; en cambio, algunos individuos del grupo que recibió el extracto, empezaron a exhibir niveles de quercetina (desconjugada) con retraso (30-45 min) y en este caso el máximo ocurrió a las 1.5 h (Figura 3-20). En ambos grupos el MRT de los conjugados fue mayor que el del compuesto parental como ocurrió en las ratas, aunque en esta ocasión la diferencia fue mucho más marcada (10.02 ± 0.578 vs 3.63 ± 0.163 y 11.35 ± 1.2 vs 2.94 ± 0.515 h para los grupos rutina pura y extracto, respectivamente).

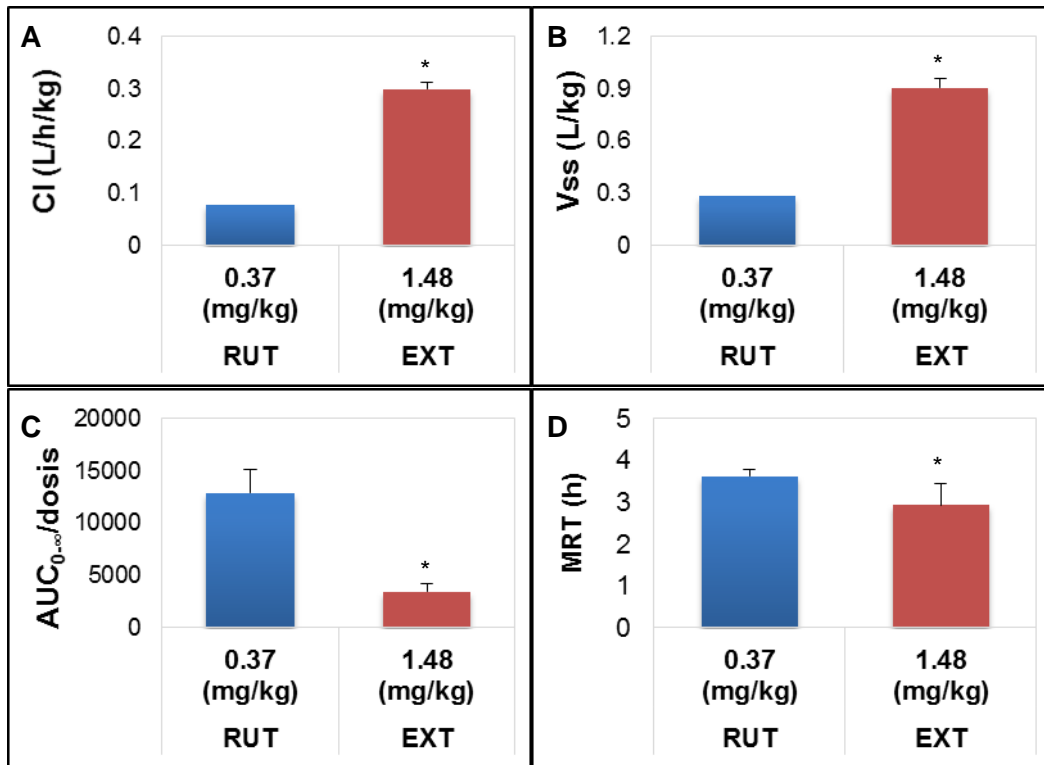


Figura 3-21: Parámetros farmacocinéticos relevantes de rutina, administrada por vía i.v. en conejos, como compuesto puro o extracto de cálices de *P. peruviana*.

A: aclaramiento (Cl). **B:** volumen de distribución en estado estacionario (Vdss). **C:** área bajo la curva extrapolada al infinito/dosis (AUC_{0-∞}/dosis, h/L x 10⁻³). **D:** tiempo medio de residencia (MRT). RUT: rutina pura. EXT: extracto de cálices de *P. peruviana*. Dosis expresadas en equivalente a rutina. Los datos corresponden al promedio ± SD (n = 5). * p < 0.05 con respecto al compuesto puro (Prueba t/Wilcoxon).

▪ Vía oral en conejos

En el plasma de los conejos que recibieron rutina pura o extracto de cálices de *P. peruviana* por vía oral, se detectaron señales de quercetina tras la reacción con β-glucuronidasa/arilsulfatasa, pero a diferencia de las ratas, rutina intacta también fue biodisponible (Figura 3-22), esto puede deberse a la mayor superficie intestinal de esta especie y a su especialidad en la absorción de nutrientes de origen vegetal (Hatton et al., 2015).

Rutina en los conejos exhibió 2 picos de Cp con Tmax iguales, pero con una diferenciación, en el caso del compuesto puro el pico de mayor concentración de rutina ocurrió a los 45 min, mientras que para el extracto, el pico retrasado (4 h) resultó ser el mayor (Figura 3-

22). Teniendo en cuenta el modelo de doble sitio de absorción, esto indicaría que la rutina intacta proveniente del extracto se absorbe mejor en el colón de los conejos.

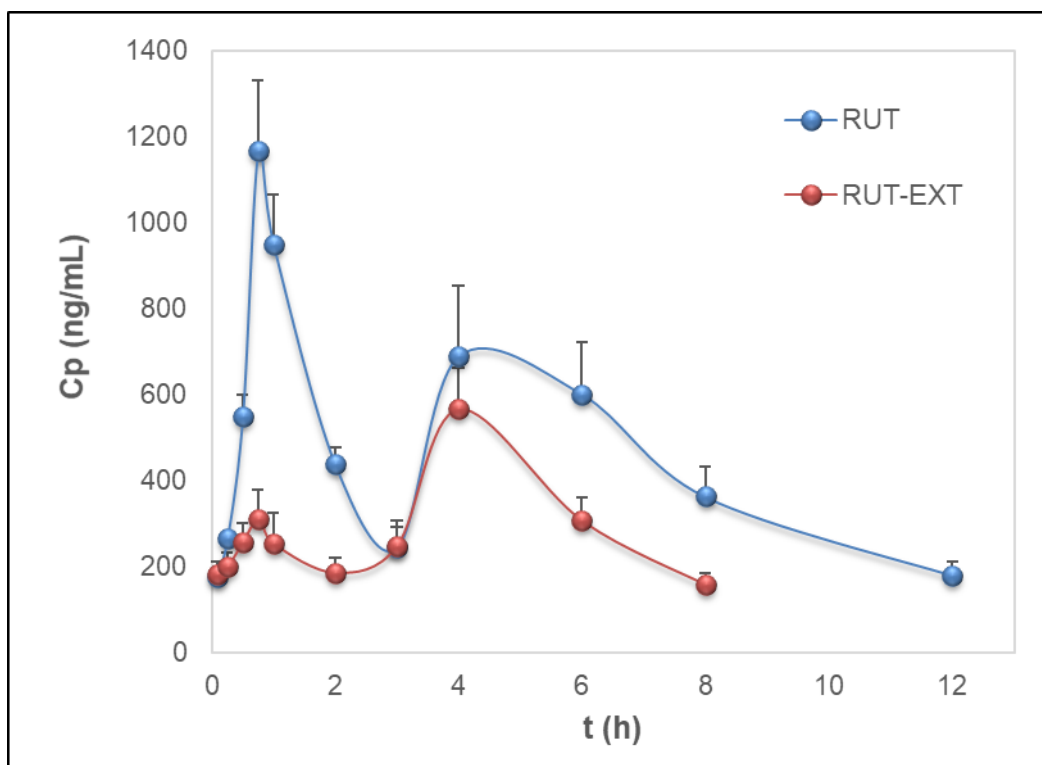


Figura 3-22: Curva Cp vs tiempo de rutina tras la administración oral del compuesto puro o el extracto de cálices de *P. peruviana* en conejos.

RUT: compuesto puro 100 mg/kg. RUT-EXT: extracto de cálices de *P. peruviana* 500 mg/kg, equivalentes a 7.4 mg/kg de rutina. En todos los casos datos expresados como promedio \pm SEM (n = 5). No hubo niveles detectables de rutina después de las 12 h.

A pesar de la presencia de rutina en el plasma, Q3OG y/o Q3OS cuantificados como quercetina, presentaron una mayor exposición sistémica, con valores de Fmet de 2.4 y 3.8 para rutina estándar y extracto respectivamente. La mayor Fmet de rutina desde el extracto coincide con los resultados de los experimentos de permeabilidad en el modelo Caco-2. Como era esperado, quercetina exhibió también dos picos de Cp, siendo el primero el mayoritario en el caso del compuesto, mientras que en el grupo que recibió el extracto, el segundo pico fue mayor (Figura 3-23). Esto coincide con lo observado para rutina en esta misma especie, indicando que tanto la absorción de rutina como su metabolización intestinal se retrasan por efecto de la mezcla de componentes del extracto.

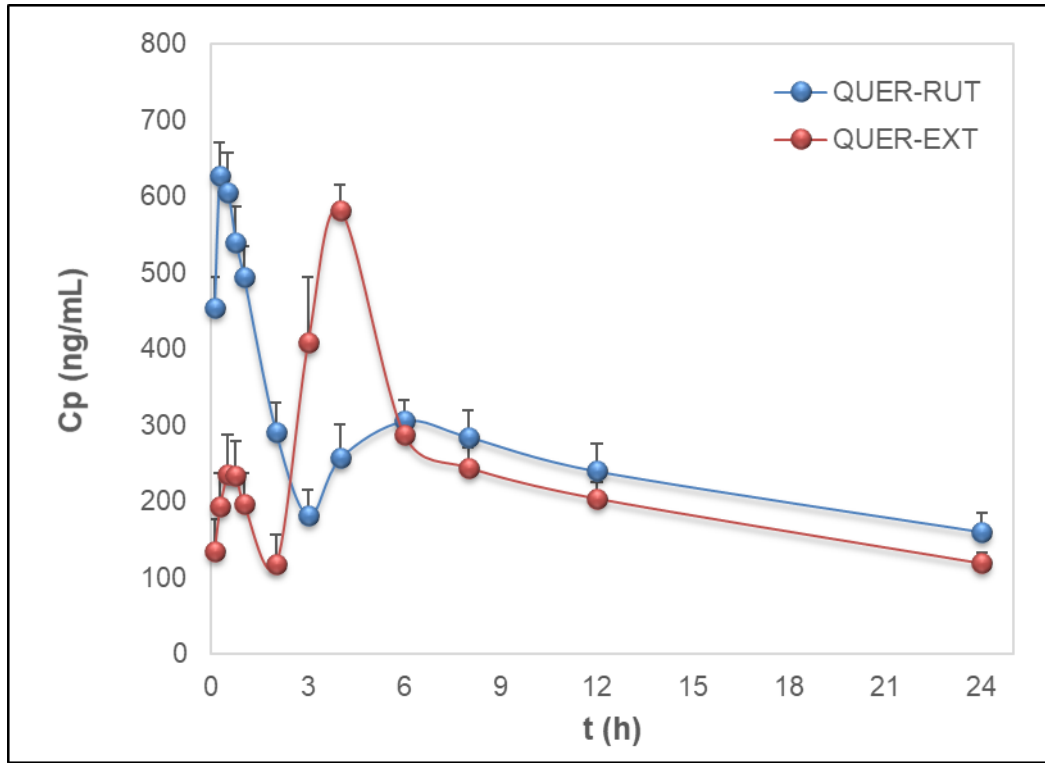


Figura 3-23: Curva Cp vs tiempo de quercetina tras la administración oral de rutina estándar o del extracto de cálices de *P. peruviana* en conejos.

QUER-RUT: quercetina generada tras la administración de rutina pura 100 mg/kg. QUER-EXT: quercetina generada tras la administración del extracto 500 mg/kg, equivalentes a 7.4 mg/kg de rutina. En todos los casos datos expresados como promedio \pm SEM ($n = 5$), las concentraciones plasmáticas de quercetina se obtuvieron tras reacción con β -glucuronidasa/arilsulfatasa. No hubo niveles detectables de quercetina después de las 24 h.

La Tabla 3-10 resume los parámetros farmacocinéticos de rutina y quercetina (desconjugada), tras la administración oral del compuesto puro o del extracto de cálices de *P. peruviana* en conejos. La biodisponibilidad absoluta de rutina desde el extracto fue 28 veces mayor que para el compuesto puro y la biodisponibilidad relativa de quercetina fue 12.

Tabla 3-10: Parámetros farmacocinéticos de rutina y quercetina tras la administración oral de rutina pura o del extracto de cálices de *P. peruviana* en conejos.

Parámetro	RUTINA		EXTRACTO	
	Dosis mg/kg			
	100		500 (7.4 ¹)	
	RUT	QUER	RUT	QUER
AUC_0^∞ (ng*h/mL)	7792.96 ± 2109.620	9278.77 ± 3275.282	4483.97 ± 755.30	8273.24 ± 1065.429
Cmax (ng/mL)	1166.2 ± 370.570	640.88 ± 102.922	599.43 ± 197.640	613.95 ± 81.396
Tmax (h)	0.75	0.35 ± 0.137	3.35 ± 1.450	3.9 ± 0.224**
Vdz/F (L/kg)	59.08 ± 11.416	226.6 ± 53.826	5.2 ± 1.470*	21.44 ± 5.282*
CL/F (L/h/kg)	13.59 ± 3.564	11.98 ± 4.405	1.686 ± 0.267*	0.9066 ± 0.113*
ke (h ⁻¹)	0.234 ± 0.066	0.0543 ± 0.022	0.334 ± 0.047*	0.0434 ± 0.006
t _{1/2} (h)	3.14 ± 0.832	14.24 ± 4.763	2.11 ± 0.318*	16.2 ± 2.170
MRT (h)	11.76 ± 0.916	21.70 ± 4.513	14.89 ± 1.690*	22.12 ± 1.915
AUC/dosis x10 ⁻³ (h/L)	77.93 ± 21.1	92.79 ± 32.755	605.94 ± 102.070*	1118.01 ± 143.977*
Cmax/dosis x10 ⁻³ (L ⁻¹)	11.66 ± 3.71	6.41 ± 1.032	81 ± 26.710*	82.97 ± 10.998*
Fmet	2.38 ± 0.411		3.80 ± 0.749*	
Frel			7.8	12.0
F	0.006		0.17	

RUT: rutina, QUER: quercetina tras la reacción con β-glucuronidasa/arilsulfatasa. AUC_0^∞ : área bajo la curva extrapolada al infinito; Cmax: concentración máxima; Tmax: tiempo máximo; Vdz/F: volumen de distribución en el pseudo equilibrio en función de la biodisponibilidad; CL/F: aclaramiento en función de la biodisponibilidad; ke: constante de velocidad de eliminación; t_{1/2}: vida media terminal; MRT: tiempo medio de residencia; AUC/dosis: área bajo la curva extrapolada al infinito y corregida por la dosis; Cmax/dosis: concentración máxima corregida por la dosis; Frel: biodisponibilidad relativa en función de rutina estándar; F: biodisponibilidad absoluta. Datos expresados como promedio ± SD (n = 5). ¹Dosis equivalente a rutina. *p < 0.05, **p < 0.01 con respecto al grupo de compuesto puro (ANOVA y HSD/ Mann-Whitney).

Tal y como se observó en las ratas, el extracto oral produjo una supuesta disminución de Cl/F y de Vdz/F de los compuestos marcadores, pero en este caso, no hubo cambios o inclusive se observó disminución de la t_{1/2} y el MRT (Figuras 3-24 y 3-25). Esto indica que los cambios observados en Cl/F y Vdz/F son resultado de la mayor biodisponibilidad de rutina y quercetina (desconjugada) desde el extracto y no a cambios intrínsecos de estos parámetros.

En resumen, en los conejos el extracto de cálices de *P. peruviana* aumenta la biodisponibilidad de rutina y de conjugados de quercetina en comparación con el

compuesto puro, pero este aumento no lleva a ampliar el tiempo de permanencia del fármaco en el organismo.

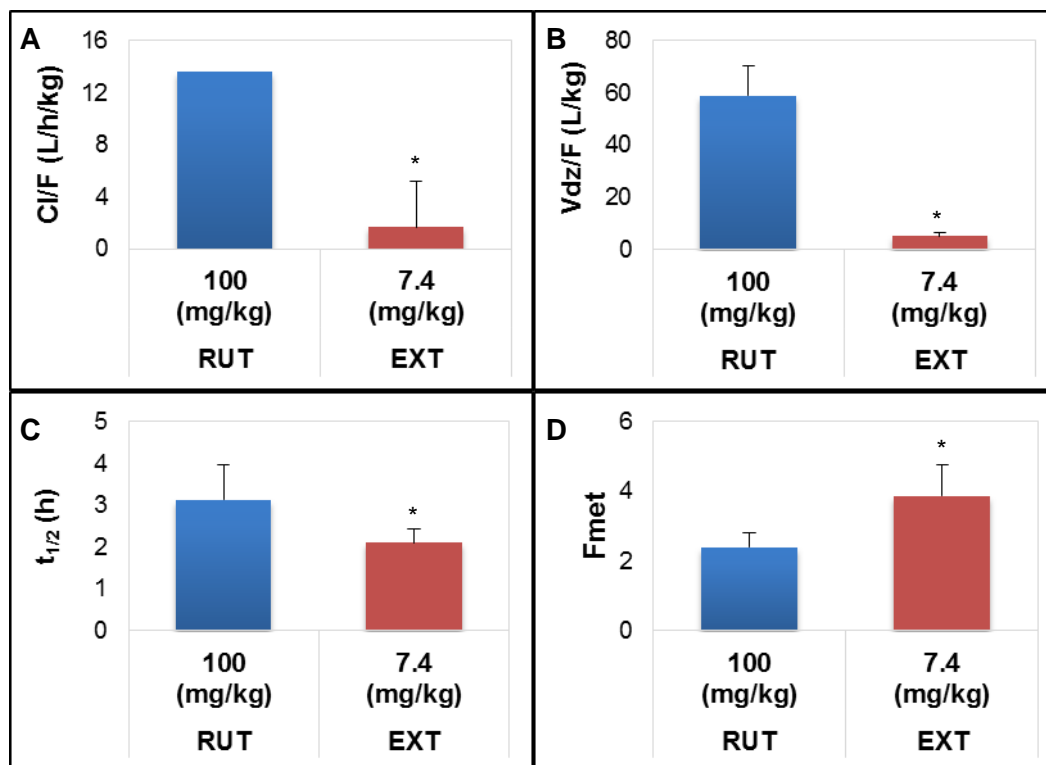


Figura 3-24: Parámetros farmacocinéticos relevantes de rutina, administrada por vía oral en conejos, como compuesto puro o extracto de cálices de *P. peruviana*.

A: aclaramiento normalizado por la biodisponibilidad (CI/F). **B:** volumen de distribución en el pseudo equilibrio normalizado por la biodisponibilidad (Vdz/F). **C:** vida media terminal ($t_{1/2}$). **D:** biodisponibilidad absoluta (F). RUT: rutina pura. EXT: extracto de cálices de *P. peruviana*. Dosis expresadas en equivalente a rutina. Los datos corresponden al promedio \pm SD (n =5). * p < 0.05 (ANOVA y HSD/ Mann-Whitney).

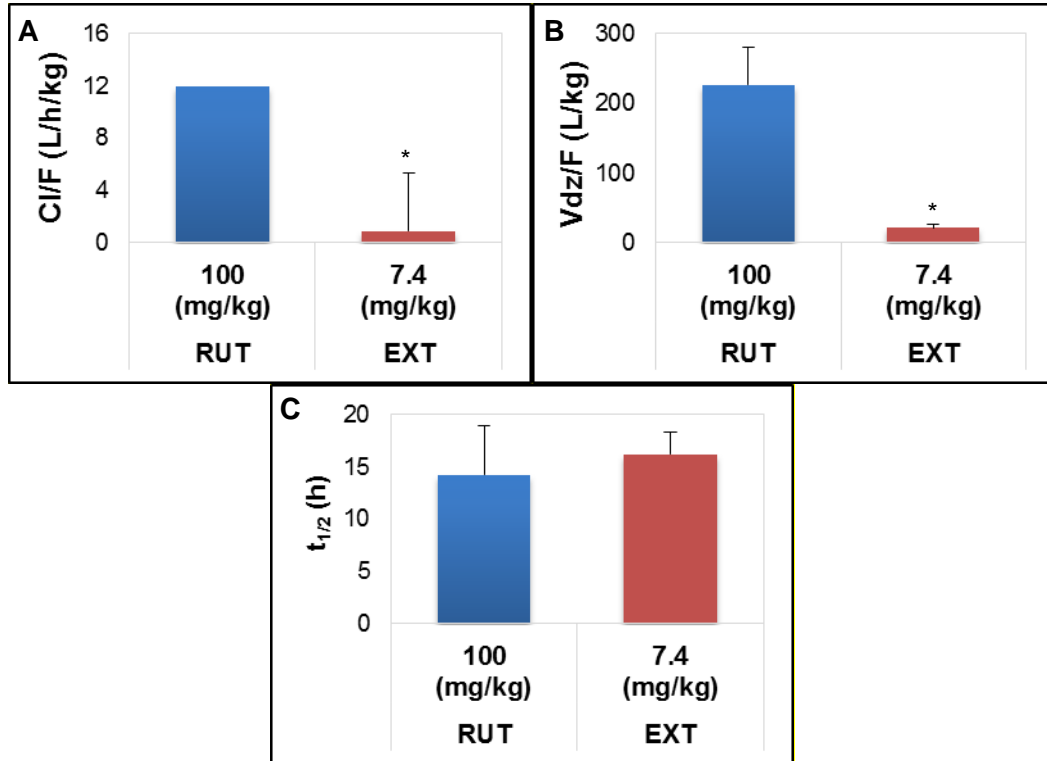


Figura 3-25: Parámetros farmacocinéticos relevantes de quercetina, tras la administración oral de rutina en conejos, como compuesto puro o extracto de cálices de *P. peruviana*. Las muestras fueron sometidas a reacción con β -glucuronidasa/arilsulfatasa. **A:** aclaramiento normalizado por la biodisponibilidad (Cl/F). **B:** volumen de distribución en el pseudo equilibrio normalizado por la biodisponibilidad (Vdz/F). **C:** vida media terminal ($t_{1/2}$). RUT: rutina pura. EXT: extracto de cálices de *P. peruviana*. Dosis expresadas en equivalente a rutina. Los datos corresponden al promedio \pm SD (n =5). * p < 0.05 (ANOVA y HSD/ Mann-Whitney).

▪ Modelo farmacocinético poblacional en conejos

Se desarrollaron también modelos farmacocinéticos poblacionales de rutina i.v. y de quercetina generada tras la administración oral de rutina en conejos. Las bases del desarrollo de los modelos fueron las mismas aplicadas en las ratas y al igual que éstas, se encontró que los datos se ajustaban a un modelo de distribución de dos compartimentos con eliminación de orden 1 y, en la vía oral, con absorción en dos sitios (Figuras 3-14 y 3-17).

Los parámetros poblacionales que arrojó el modelo que describe la farmacocinética de rutina i.v. en conejos, se encuentran en la Tabla 3-11, estos fueron calculados tomando como referencia rutina estándar. Dada la alta variabilidad que presentaron Vdz y k_e en el

análisis no compartimental, los parámetros V y k_e del modelo se separan un poco de aquellos. Sobre la distribución de rutina, se observó que los conejos presentaron una fase de distribución más pronunciada que las ratas, con proporción k_{12}/k_{21} cercano a 1. La matriz del extracto resultó ser una fuente de variabilidad para V , k_e y k_{12} y no se detectó correlación entre parámetros. El AIC del modelo final fue 1159 y el ajuste poblacional se presenta en la Figura 3-26.

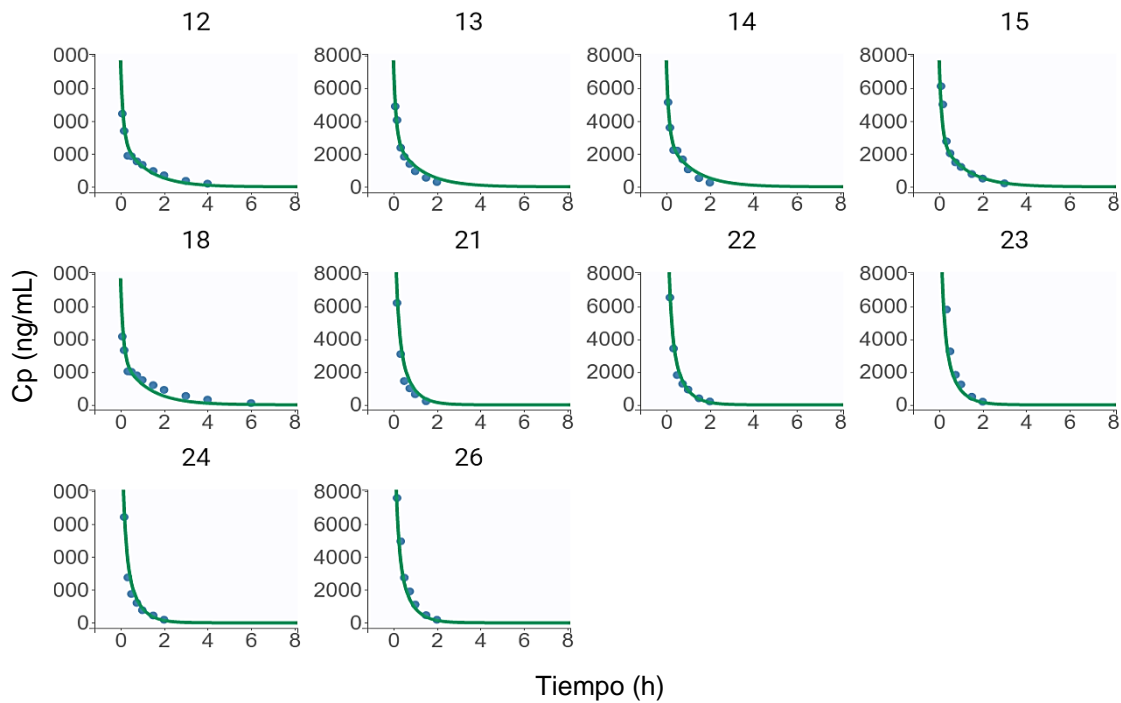


Figura 3-26 Ajuste poblacional del perfil de Cp vs tiempo de rutina por vía i.v. en conejos. Los puntos corresponden a los datos experimentales y la línea sólida al ajuste poblacional. Los números 12 al 26 son los códigos asignados a cada individuo, los iniciados en 1 pertenecen al grupo de rutina estándar y los iniciados en 2 al grupo de extracto de cálices de *P. peruviana*.

Tabla 3-11: Parámetros poblacionales de rutina administrada por vía i.v. en forma pura o desde el extracto de cálices de *P. peruviana* en conejos.

	Valor	Aproximación estocástica	
		S.E.	R.S.E. (%)
Efectos fijos			
V_{pop} (L/kg x 10⁻³)	4.8 x 10 ⁻⁵	2.49 x 10 ⁻⁶	5.19
β_VGEXT	0.678	0.0651	9.6
ke_{pop} (h⁻¹)	1.92	0.174	9.06
β_{ke}GEXT	0.625	0.123	19.7
k₁₂_pop (h⁻¹)	3.67	0.709	19.3
β_{k12}GEXT	-0.634	0.276	43.6
k₂₁_pop (h⁻¹)	3.78	0.366	9.69
Desviación estándar de efectos aleatorios (Ω)			
Ω ke	0.173	0.0398	23
Ω k₁₂	0.362	0.0958	26.4
Ω k₂₁	0.266	0.0728	27.3
Parámetros del modelo de error			
b	0.0755	0.00738	9.77

V: volumen del compartimento central. ke: constante de velocidad de eliminación. k₁₂: constante de velocidad de distribución del compartimento 1 al 2. k₂₁: constante de velocidad de distribución del compartimento 2 al 1. Pop: valor en la población. S.E.: error estándar. R.S.E: error estándar relativo. β: coeficiente que expresa la variabilidad debida a la covariable tratamiento = extracto (GEXT). Ω: variabilidad aleatoria. b: error residual (diferencia entre las Cp experimentales y predichas).

A continuación se presentan las ecuaciones para los parámetros individuales, teniendo en cuenta la covariable tratamiento:

$$\log(V/(1 - V)) = \log(V_{pop}/(1 - V_{pop})) + \beta_V GEXT \quad 3-20$$

$$\log(ke) = \log(ke_{pop}) + \beta_{ke} GEXT + \eta_{ke} \quad 3-21$$

$$\log(k_{12}) = \log(k_{12pop}) + \beta_{k12} GEXT + \eta_{k12} \quad 3-22$$

$$\log(k_{21}) = \log(k_{21pop}) + \eta_{k21} \quad 3-23$$

En las ecuaciones 3-20 a 3-23, pop se refiere al parámetro poblacional, β es un coeficiente que expresa la variabilidad debida a la covariable tratamiento y aplica cuando ésta es igual a extracto (GEXT) y η la desviación individual en relación al parámetro poblacional. En el caso de ke la ecuación resultó igual a la definida para rutina i.v. en ratas (ecuación 3-7).

El gráfico VPC del modelo se muestra en la Figura 3-27.

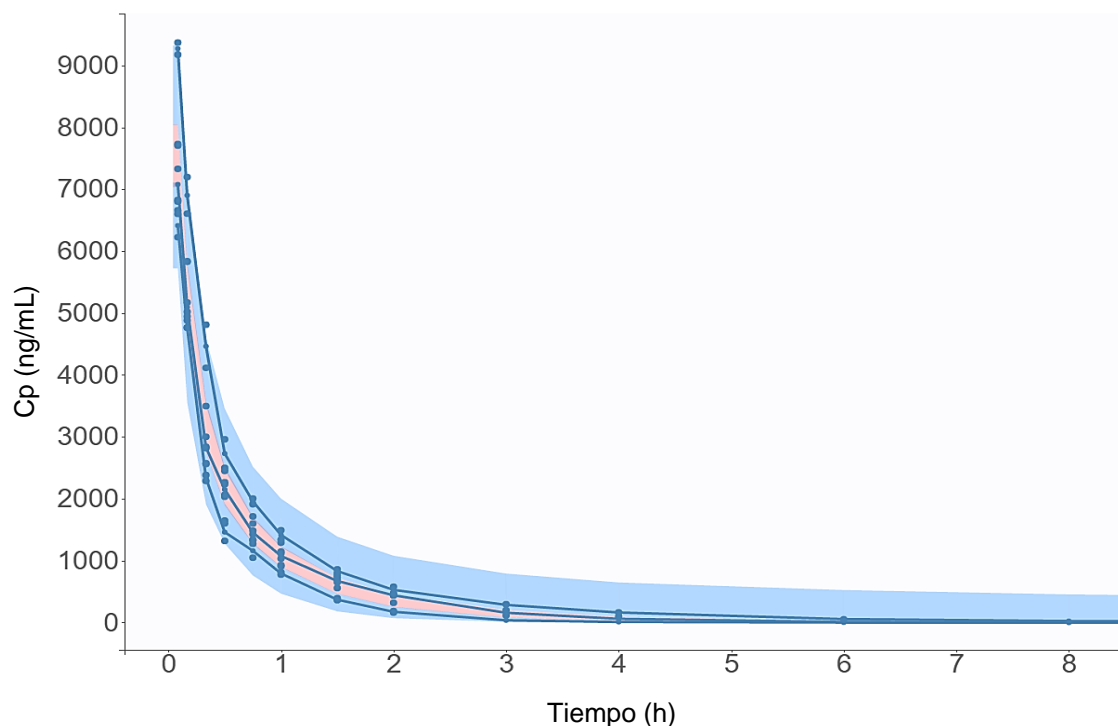


Figura 3-27: Revisión predictiva visual del modelo desarrollado para rutina i.v en conejos.

Área azul y rosada: intervalos de predicción al 90%, obtenidos a partir de 500 simulaciones.

Líneas sólidas azules: percentiles empíricos. Puntos: datos observados. No se observaron puntos atípicos.

En la vía oral se encontró que la matriz del extracto aportó a la variabilidad en parámetros asociados a la absorción y a la distribución de quercetina, estos fueron: ka_1 , ka_2 , V , k_{12} y k_{21} . Los parámetros del modelo se encuentran en la Tabla 3-12 y las Figuras 3-28 y 3-29 muestran el ajuste poblacional y el gráfico VPC, respectivamente (AIC 1244).

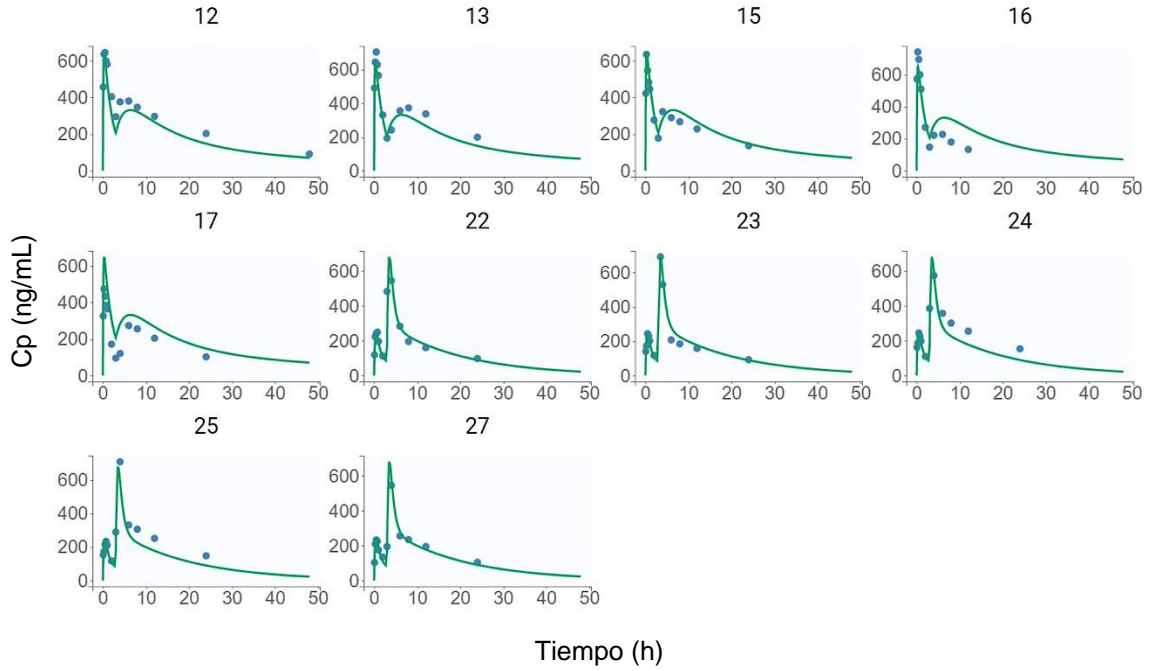


Figura 3-28 Ajuste poblacional del perfil de Cp vs tiempo de quercetina tras la administración oral de rutina en conejos.

Los puntos corresponden a los datos experimentales y la línea sólida al ajuste poblacional. Los números 12 a 27 son los códigos asignados a cada individuo, los iniciados en 1 pertenecen al grupo de rutina estándar y los iniciados en 2 al grupo de extracto de cálices de *P. peruviana*.

Las ecuaciones para describir los parámetros individuales teniendo en cuenta el efecto de la matriz del extracto como covariable, fueron las siguientes:

$$\log(ka_1) = \log(ka_{1_{pop}}) + \beta_{ka1}GEXT \quad 3-24$$

$$\log(ka_2) = \log(ka_{2_{pop}}) + \beta_{ka2}GEXT \quad 3-25$$

$$\log(F_1/(1 - F_1)) = \log(F_{1_{pop}}/(1 - F_{1_{pop}})) + \eta_{F1} \quad 3-26$$

$$\log(Tlag_2) = \log(Tlag_{2_{pop}}) + \eta_{Tlag2} \quad 3-27$$

$$\log(V) = \log(V_{pop}) + \beta_V GEXT \quad 3-28$$

$$\log(ke) = \log(ke_{pop}) + \eta_{ke} \quad 3-29$$

$$\log(k_{12}) = \log(k_{12_{pop}}) + \beta_{k12}GEXT \quad 3-30$$

$$\log(k_{21}) = \log(k_{21_{pop}}) + \beta_{k21}GEXT \quad 3-31$$

Como se ha venido mencionando, en las ecuaciones 3-24 a 3-31, pop se refiere al parámetro poblacional, β expresa la variabilidad debida al extracto y η la desviación individual en relación al parámetro poblacional.

Tabla 3-12: Parámetros poblacionales de quercetina oral, proveniente de rutina pura o del extracto de cálices de *P. peruviana* en conejos.

	Valor	Aproximación estocástica	
		S.E.	R.S.E.(%)
Efectos fijos			
ka₁_pop (h⁻¹)	11.1	0.7	6.28
β_{ka1}GEXT	-0.949	0.172	18.1
ka₂_pop (h⁻¹)	0.0942	0.0198	21
β_{ka2}GEXT	3.53	0.236	6.68
F₁_pop	0.27	0.0255	9.44
Tlag₂_pop (h)	2.97	0.0831	2.8
V_{pop} (L/kg x 10⁻³)	0.0362	0.00536	14.8
β_vGEXT	-1.91	0.152	7.95
ke_{pop} (h⁻¹)	0.221	0.0457	20.6
k₁₂_pop (h⁻¹)	0.251	0.071	28.3
β_{k12}GEXT	1.08	0.36	33.5
k₂₁_pop (h⁻¹)	0.0395	0.0128	32.4
β_{k21}GEXT	2.07	0.332	16
Desviación estándar de efectos aleatorios			
Ω F₁	0.16	0.0382	23.9
Ω Tlag₂	0.0767	0.0255	33.3
Ω ke	0.389	0.0929	23.9
Parámetros del modelo de error			
a	20.7	3.18	15.4
b	0.0437	0.0141	32.4

ka₁: constante de velocidad de absorción desde el sitio 1. ka₂: constante de velocidad de absorción desde el sitio 2. F₁: fracción absorbida en el sitio 1. Tlag₂: retraso de la segunda absorción. V: volumen del compartimento central. ke: constante de velocidad de eliminación. k₁₂: constante de velocidad de distribución del compartimento 1 al 2. k₂₁: constante de velocidad de distribución del compartimento 2 al 1. Pop: valor en la población. S.E.: error estándar. R.S.E: error estándar relativo. β: coeficiente que expresa la variabilidad debida a la covariable tratamiento = extracto (GEXT). Ω: variabilidad aleatoria. a y b: componentes del error residual (diferencia entre las Cp experimentales y predichas).

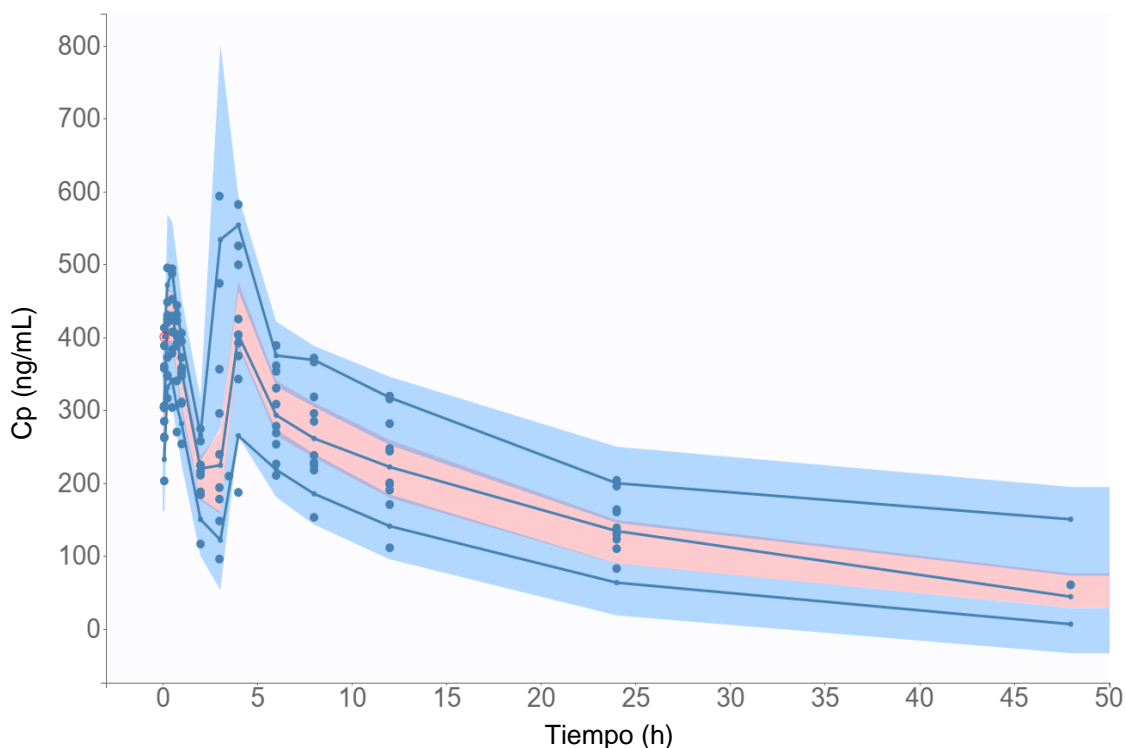


Figura 3-29: Revisión predictiva visual del modelo desarrollado para quercetina vía oral en conejos.

Área azul y rosada: intervalos de predicción al 90%, obtenidos a partir de 500 simulaciones.
 Líneas sólidas azules: percentiles empíricos. Puntos: datos observados. Área roja: puntos atípicos.

En conclusión sobre este aspecto, los modelos poblacionales desarrollados para los conejos fueron capaces de describir el efecto de la matriz del extracto sobre los parámetros farmacocinéticos de rutina y quercetina. El extracto aumenta el V_d y la k_e de rutina en los conejos, tal y como fue observado para las ratas. El aumento de k_e , que era esperado a la luz del resto de los resultados, no había sido soportado estadísticamente en el análisis no compartimental por la variabilidad entre los individuos.

Con respecto a quercetina, el modelo describió la diferencia observada en el T_{max} entre el compuesto y el extracto (0.35 ± 0.137 h, primer pico vs 3.9 ± 0.224 h, segundo pico) a través de los parámetros β_{ka1} y β_{ka2} . Además, se confirma la disminución en el V_d por efecto del extracto, que también ocurrió en las ratas. En los conejos, este efecto estuvo acompañado de una disminución en la proporción k_{12}/k_{21} , es decir que rutina en el extracto

presentaría una fase de distribución menor, aunque el efecto de doble pico dificulta la interpretación de estas microconstantes.

En conjunto, los resultados de ambas especies indican que los principales procesos farmacocinéticos que son afectados por la matriz del extracto son la distribución y la absorción, en forma de conjugados de quercetina. Rutina se distribuye más ampliamente desde el extracto y los conjugados de quercetina se absorben en mayor proporción desde esta fuente.

▪ **Diferencias entre especies y alometría**

Para entender las diferencias en la farmacocinética de rutina en ratas y conejos desde las distintas fuentes, se compararon los parámetros farmacocinéticos primarios y otros relevantes entre las especies, utilizando como referencia para las ratas la menor dosis de los tratamientos por cada vía de administración.

En la vía i.v., que es a partir de la cual se obtienen la información más verídica sobre los parámetros farmacocinéticos, se encontró que no hay diferencias significativas en el Cl de rutina entre las especies, mientras que el Vdss fue 2.6 y 5 veces mayor en los conejos, para rutina pura y en el extracto de cálices de *P. peruviana*, respectivamente. Este aumento se manifestó también en el MRT, pero no en la $t_{1/2}$. Los resultados indican que la diferencia entre las especies ocurre en la fase de distribución y puede deberse a diferencias respecto a la unión de rutina a proteínas plasmáticas en los animales, aspecto que se puede estudiar a profundidad a través de estudios *in vitro* de fijación a proteínas plasmáticas. Dado que no hubo cambios en el Cl, la exposición sistémica de rutina corregida por la dosis fue semejante en ambas especies para cada tratamiento (Figura 3-30).

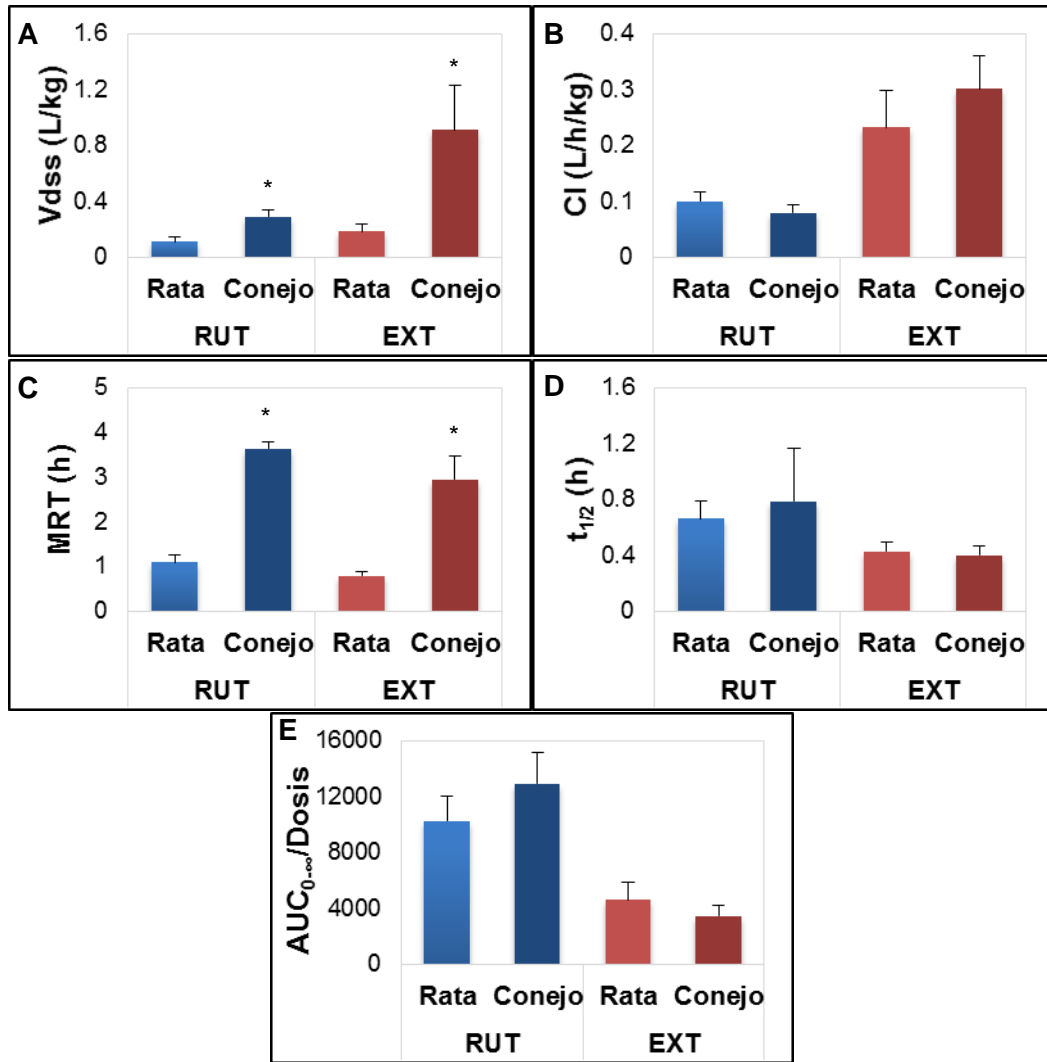


Figura 3-30 Parámetros farmacocinéticos relevantes de rutina i.v. administrada en ratas y conejos como compuesto puro y en el extracto de cálices de *P. peruviana*.

Dosis en ratas: equivalente a 1.45 y 3.7 mg/kg de rutina estándar o en el extracto respectivamente. Dosis en conejos: equivalente a 0.37 y 1.48 mg/kg de rutina estándar o en el extracto respectivamente. **A:** volumen de distribución en estado estacionario (V_{dss}). **B:** aclaramiento (Cl). **C:** tiempo medio de residencia (MRT). **D:** vida media terminal ($t_{1/2}$). **E:** área bajo la curva extrapolada al infinito/dosis ($AUC_{0-\infty}/dosis$, $h/L \times 10^{-3}$). RUT: rutina pura. EXT: extracto de cálices de *P. peruviana*. Los datos corresponden al promedio \pm SD ($n = 5$). * $p < 0.05$ con respecto a las ratas dentro de cada tratamiento. (prueba t/ Wilcoxon).

En términos alométricos, se encontró que existe una relación alométrica isométrica entre ratas y conejos para el Cl de rutina, es decir, que el Cl aumenta proporcionalmente con el peso corporal. En cuanto a V_{dss} , la relación alométrica entre las especies es positiva, ya que este parámetro aumentó en mayor proporción que el peso de los animales (Huang & Riviere, 2014).

En complemento a la anterior observación, se realizaron curvas logarítmicas de CI y Vd de rutina en función del peso corporal de los animales (Figura 3-31) para obtener los valores de la constante a y el exponente b de la ecuación de alometría simple (ecuación 3-3). A partir de esta ecuación se escalaron los parámetros a humanos, con los resultados indicados en la Tabla 3-13.

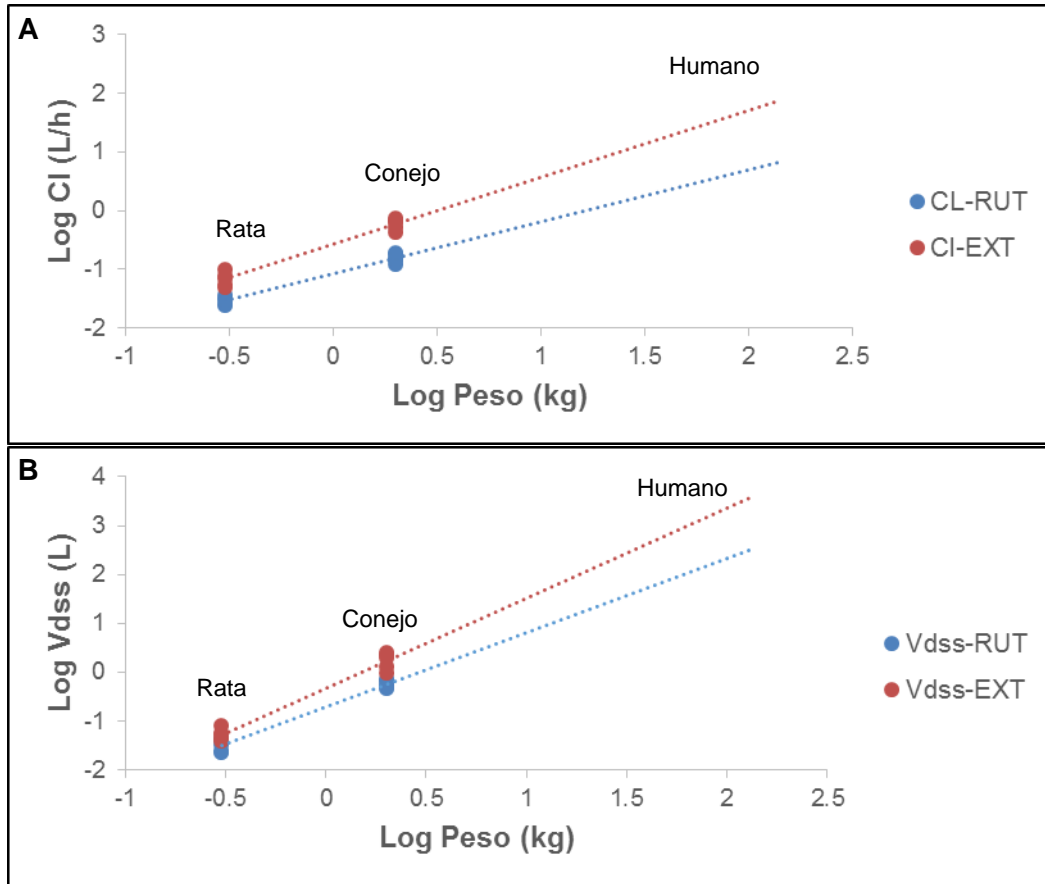


Figura 3-31 Curva logarítmica de parámetros farmacocinéticos vs peso corporal extrapolada al peso humano estándar (70 kg).

A: curva aclaramiento (CI), CL-RUT: CI de rutina estándar, CL-EXT: CI de rutina en el extracto de *P. peruviana*. **B:** curva volumen de distribución en estado estacionario (Vdss), Vdss-RUT: Vdss de rutina estándar, Vdss-EXT: Vdss de rutina en el extracto de *P. peruviana*.

Tabla 3-13 Aclaramiento (Cl) y volumen de distribución en estado estacionario (Vdss) de rutina pura y en el extracto de cálices de *P. peruviana* en humanos.

Parámetro	Coefficiente a	Exponente b	r ²	Parámetro escalado al peso estándar humano (70kg)	Escalamiento a humano con b teórico ¹
Cl-RUT (L/h)	0.085	0.879	0.968	3.57	2.06
Cl-EXT (L/h)	0.267	1.142	0.960	34.28	6.47
Vdss-RUT (L)	0.198	1.521	0.978	126.36	13.86
Vdss-EXT (L)	0.479	1.837	0.969	1174.25	33.54

CL-RUT: Cl de rutina estándar, CL-EXT: Cl de rutina en el extracto de *P. peruviana*. Vdss-RUT: Vdss de rutina estándar, Vdss-EXT: Vdss de rutina en el extracto de *P. peruviana*. a y b son el coeficiente y exponente de la ecuación de alometría simple. ¹ Escalamiento utilizando b = 0.75 y 1.0 para Cl y Vdss, respectivamente.

En gran parte de la literatura es asumido que los exponentes *b* para el escalamiento del Cl y Vd son 0.75 y 1.0 respectivamente, pero la evidencia ha venido confirmando que este supuesto no aplica para todos los fármacos, ni todas las especies (Mahmood, 2018). En todo caso los datos de Cl y Vdss en humanos presentados aquí, son apenas una primera aproximación y deben ser afinados por la adición de al menos otra especie. Además, la considerable diferencia entre el exponente teórico y el experimental para Vdss y en consecuencia el alto valor que se obtuvo para este parámetro en los humanos, hace suponer que hay una estimación poco exacta y que se deben agregar otros aspectos al escalamiento como datos sobre unión a proteínas plasmáticas y fracción libre en las distintas especies (Kang & Lee, 2011). Para efectos ilustrativos, los parámetros humanos fueron también calculados utilizando los exponentes teóricos (Tabla 3-13).

En cuanto al metabolismo entre especies, la Fmet de los conejos fue semejante a la de las ratas, con excepción de lo observado para los murinos con la dosis de 1000 mg/kg de extracto, en la que Fmet fue significativamente menor a la de cualquier otra dosis, tratamiento o especie (Tabla 3-5). No es posible descartar que a dosis mayores se observe también la disminución de Fmet en los conejos, aunque hay antecedentes de estudios *in*

vitro en microsomas hepáticos, que muestran que la actividad microsomal de las ratas es susceptible de inactivación por diferentes factores, mientras que los microsomas de conejos mostraron metabolismo lineal por largos periodos, sin inactivación y sobre un amplio grupo de fármacos (Gram & Fouts, 1966).

Por otro lado, la principal diferencia entre las especies cuando se hizo administración por vía oral es que rutina en el extracto presentó una biodisponibilidad de 17% en los conejos y no fue biodisponible en las ratas. De modo semejante, la exposición sistémica de quercetina (desconjugada) fue mayor en los conejos que en las ratas en ambos tratamientos (Figura 3-32). Como se mencionó anteriormente, esta diferencia puede deberse a la mayor superficie intestinal de los conejos y a su especialidad en la absorción de nutrientes de origen vegetal (Hatton et al., 2015).

Adicionalmente, la Frel de quercetina en el extracto, frente al compuesto puro, fue 1.5 veces mayor en los conejos. Sin embargo, llama la atención que el T_{max} de quercetina en esta especie fue menor cuando se administró el compuesto puro, lo cual es contrario a lo observado en las ratas (Figuras 3-32C). Este comportamiento podría explicarse en posibles diferencias en la población y actividad de bacterias de la flora de cada especie, que juegan un papel importante en la desglicosilación de rutina, paso necesario para la formación de los conjugados de quercetina (Braune & Blaut, 2016; Kawabata et al., 2019).

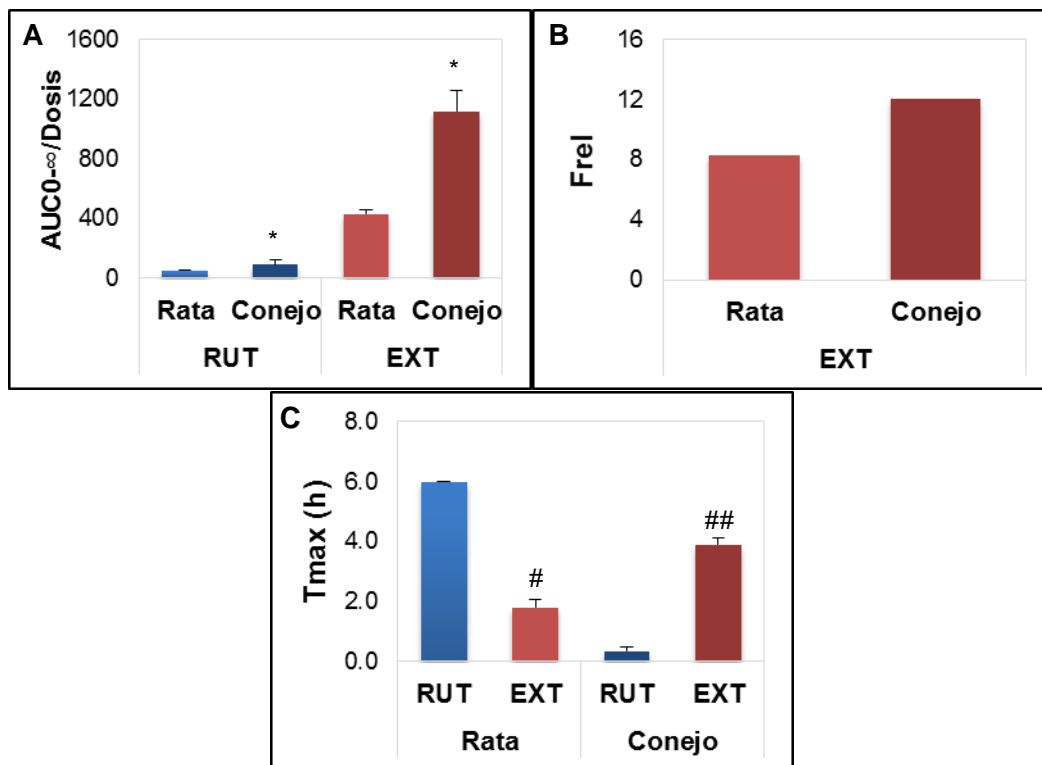


Figura 3-32 Parámetros farmacocinéticos relevantes de quercetina tras la administración oral de rutina en ratas y conejos como compuesto puro y en el extracto de cálices de *P. peruviana*. Dosis rutina estándar: 100 mg/kg. Dosis extracto 500 mg/kg (equivalentes a 7.4 mg/kg de rutina) **A:** área bajo la curva extrapolada al infinito/dosis ($AUC_{0-\infty}/dosis$, h/L x 10⁻³). **B:** biodisponibilidad relativa (Frel). **C:** tiempo máximo (Tmax). RUT: rutina pura. EXT: extracto de cálices de *P. peruviana*. Los datos corresponden al promedio \pm SD (n = 5). * p < 0.05 con respecto a las ratas dentro de cada tratamiento, # p < 0.05 y ## p < 0.01, ambos con respecto a rutina estándar dentro de cada especie. (prueba t/ Wilcoxon).

3.4 Conclusiones

- 1) La farmacocinética de rutina por vía i.v. es lineal, pero la matriz del extracto produce aumento del Cl y el Vd, lo cual lleva a una menor exposición sistémica del flavonoide desde esta fuente.
- 2) Rutina administrada por vía oral es susceptible de metabolización presistémica y los conjugados glucurónico y/o sulfato de quercetina derivados de ésta, son más biodisponibles.

- 3) La matriz del extracto aumenta 8 veces la biodisponibilidad de rutina en conejos y hasta 12 veces la de quercetina (conjugados) en ambas especies. En las ratas se demostró que este efecto es dependiente de la dosis de extracto.
- 4) El CI de rutina aumenta proporcionalmente con el peso corporal de las especies estudiadas, mientras que el Vdss aumenta por encima de esta proporcionalidad.
- 5) Se desarrollaron cuatro modelos poblacionales que describen el efecto de la matriz del extracto y de las dosis sobre los parámetros farmacocinéticos de rutina y quercetina en ratas y conejos.

4. Conclusiones y recomendaciones

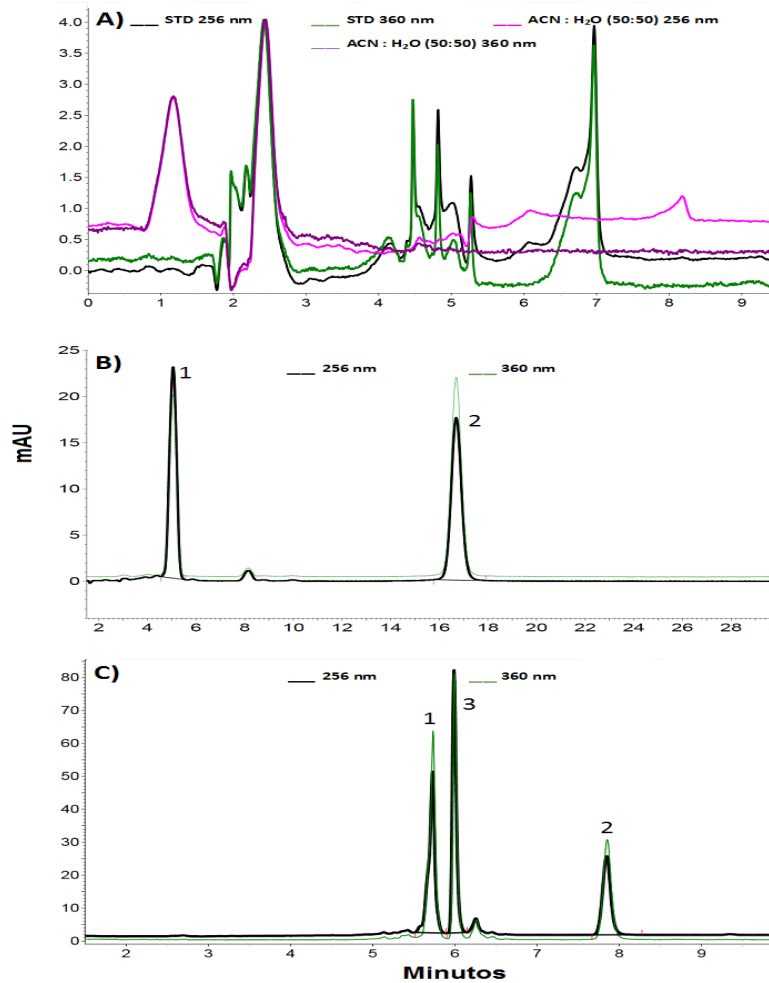
4.1 Conclusiones

- 1) Se desarrolló y validó una metodología por HPLC-UV para la cuantificación directa de rutina y quercetina e indirecta de conjugados glucurónido y sulfato de estos compuestos, aplicable a estudios de permeabilidad intestinal sobre extractos o fracciones que contengan rutina y/o quercetina.
- 2) Se desarrolló y validó una metodología UHPLC-UV para la cuantificación de rutina y quercetina en plasma humano, de rata y de conejos, incluyendo la cuantificación indirecta de conjugados glucurónido y sulfato de estos compuestos. La técnica es aplicable a estudios farmacocinéticos sobre extractos que contengan rutina y/o quercetina.
- 3) Se describió un efecto matriz del extracto de cálices de *P. peruviana* sobre la permeabilidad de rutina en el modelo Caco-2, caracterizado por el aumento en el Papp y la disminución de la proporción de eflujo.
- 4) Se describió la farmacocinética de rutina pura y en el extracto de cálices de *P. peruviana* en ratas y conejos utilizando análisis no compartimental y se desarrollaron modelos poblacionales para cada especie y vía de administración, que satisfacen las diferencias observadas entre el extracto y el compuesto puro en cada caso.
- 5) Se demostró que el extracto de cálices de *P. peruviana* mejora la biodisponibilidad oral de conjugados glucurónido y/o sulfato de quercetina provenientes de la metabolización presistémica de rutina en ratas y conejos.

4.2 Recomendaciones

- 1) Identificar los compuestos presentes en el extracto, responsables de los resultados observados en esta investigación en cuanto a permeabilidad, biodisponibilidad y volumen de distribución de rutina.
- 2) Desarrollar un modelo farmacocinético poblacional para rutina en el extracto de cálices de *P. peruviana* que integre las distintas especies junto con resultados sobre eficacia y seguridad, para definir una dosis segura en humanos.
- 3) Estudiar posibles interacciones farmacocinéticas entre el extracto de cálices de *P. peruviana* y fármacos convencionales con afinidad a proteínas plasmáticas limitada.
- 4) Desarrollar formulaciones para la administración oral del extracto de cálices de *P. peruviana* en humanos.
- 5) Confirmar el papel de los conjugados de quercetina observados en el plasma de los animales, en la actividad hipoglicemiante exhibida por el extracto de cálices de *P. peruviana* y estudiar si el extracto representa ventaja sobre la administración directa de estos conjugados.

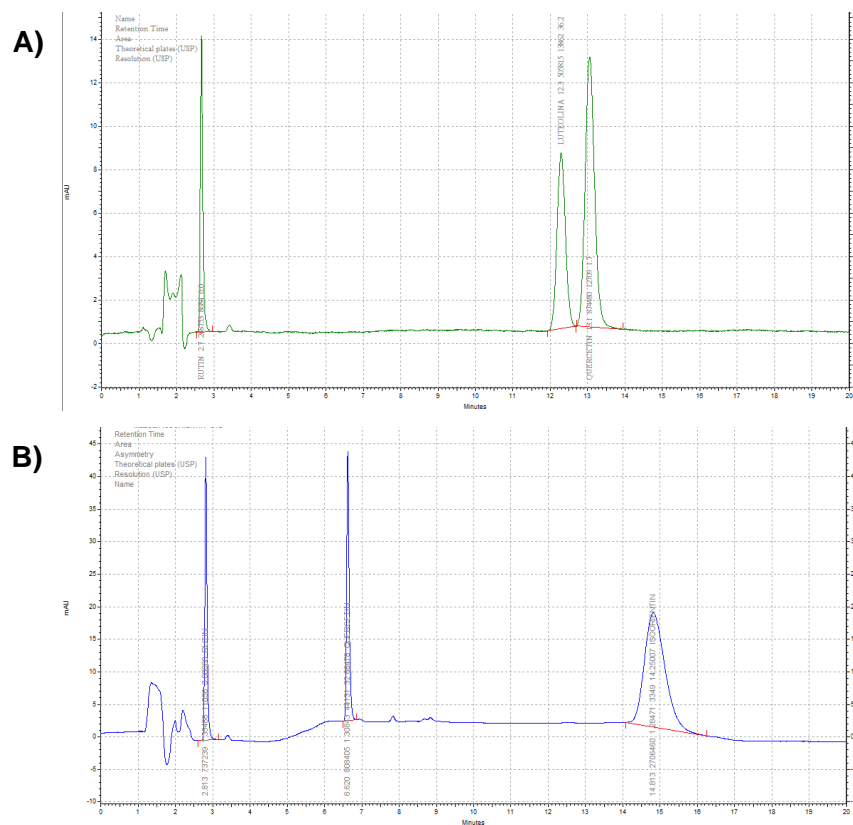
A. Anexo: Cromatogramas de diluyente y fases móviles descartadas durante el desarrollo del método



1: rutina, 2: quercetina, 3: quercetina-3-O-glucurónico.

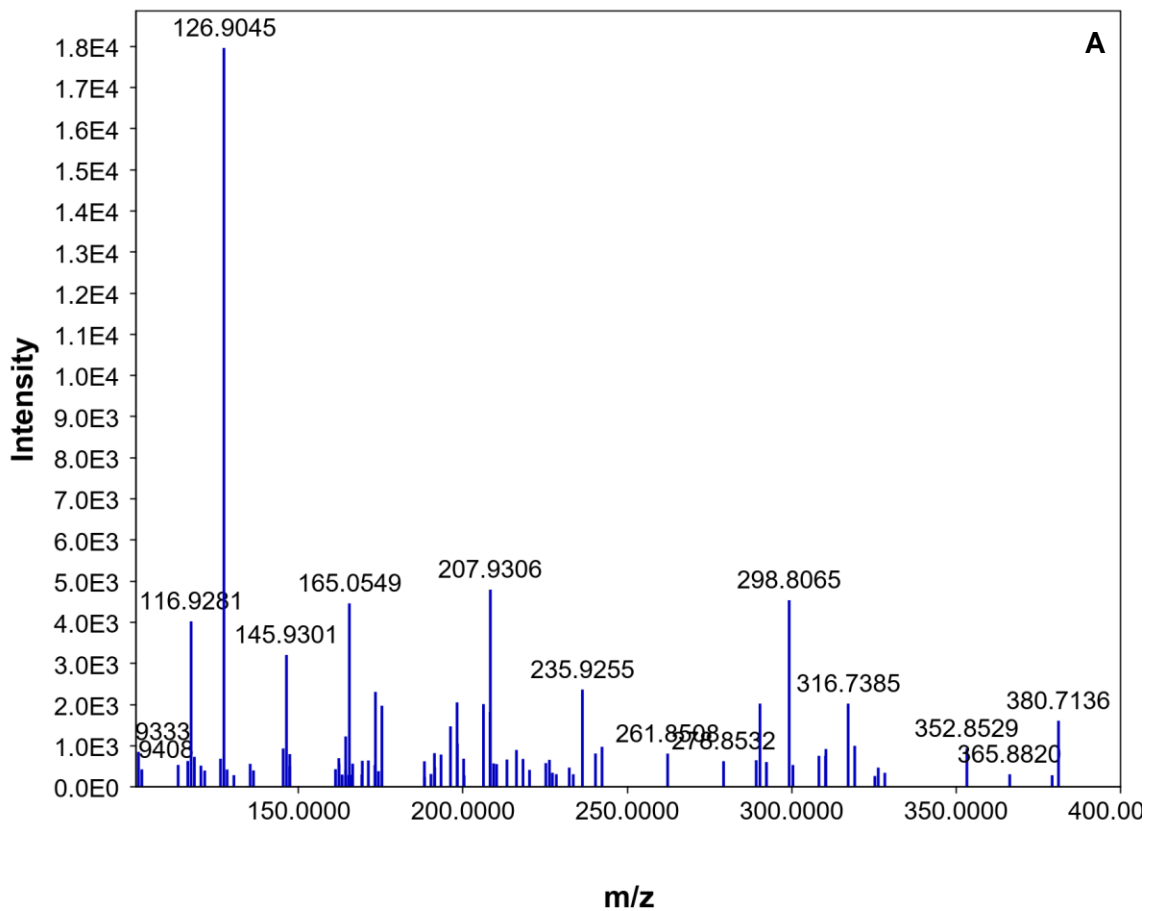
La Figura muestra en A) un cromatograma de estándares (STD) preparados en diluyente conformado por acetonitrilo:agua 50:50. En este caso la fase móvil fue ácido fórmico 0,1% (A'), ACN con 0.1% de ácido fórmico, en gradiente de 90 a 65% de A'; volumen de inyección 10 μ L y longitud de onda (λ) 256 y 360 nm. Nótese pico dividido de rutina entre 4-5 min y señal de quercetina con hombro a los 7 min. En B) se presenta un cromatograma de STD en diluyente metanol: agua 50:50, obtenido con el método 1 señalado en la metodología. La fase móvil fue ácido fórmico 0.1% y metanol con 0.1% de ácido fórmico (65:35), volumen de inyección 10 μ L y λ 256 y 360 nm. En C) se presenta un cromatograma de STD en diluyente metanol: agua 50:50, obtenido con el método 2 tras ajustes, en este caso la fase móvil fue ácido acético 0.5% y metanol con 0.5% de ácido acético (B'), en gradiente de 10 a 80% de B', volumen de inyección 30 μ L y λ 260 y 360 nm. En todos los casos se ensayó una solución estándar de rutina y quercetina 10 μ M, columna Luna® C18, 3 μ m, 75 x 4.6 mm; flujo de 1 mL/min y horno a 30°C.

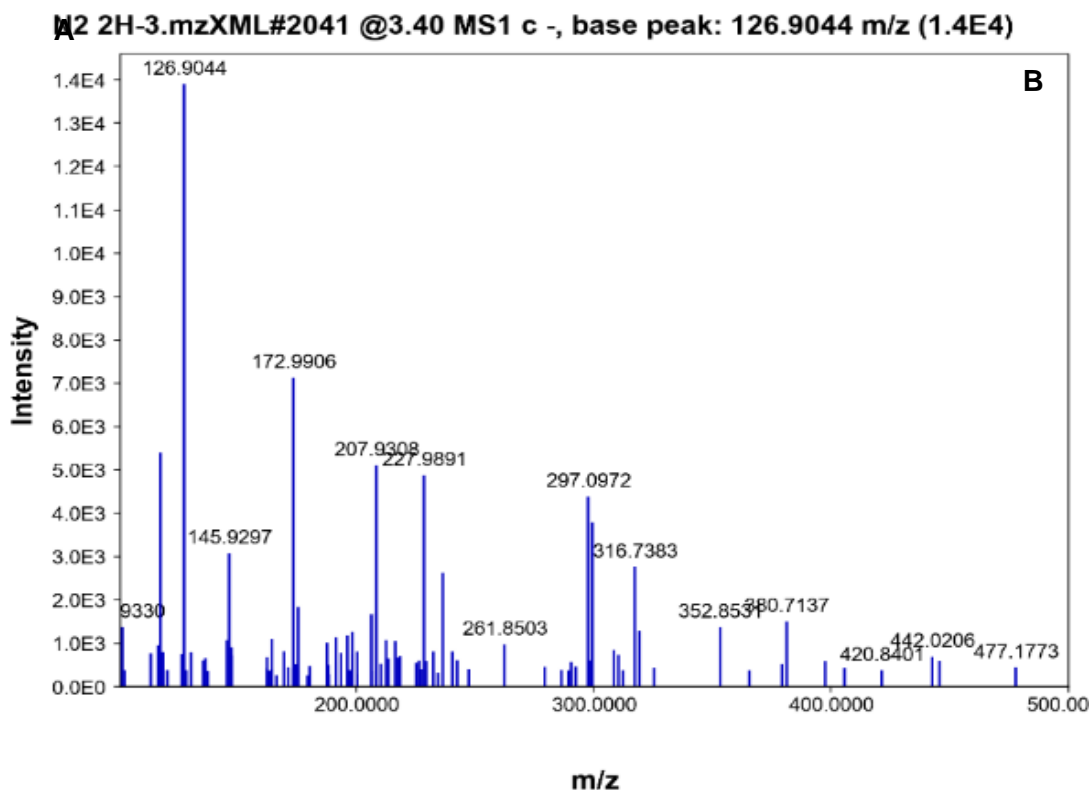
B. Anexo: Cromatogramas de rutina y quercetina con luteolina e isoorientina ensayados como estándares internos (IS).



A) IS luteolina. Fase móvil ácido fórmico 0.1% (A'), ACN con 0.1% de ácido fórmico, en gradiente de 75 a 72% de A'. Temperatura columna 25°C. Rutina 2.7 min, quercetina 13.1 min, luteolina 12.3 min. B) IS isoorientina. Fase móvil ácido fórmico 0.1% (A'), ACN con 0.1% de ácido fórmico, en gradiente de 75 a 65% de A'. Temperatura columna 40°C. Rutina 2.8 min, quercetina 6.6 min, isoorientina 14.8 min. En todos los casos se ensayó una solución estándar de rutina y quercetina a 10000 ng/mL y estándar interno a 1000 ng/mL, preparados en diluyente metanol: agua 75:25, volumen de inyección 6 μ L; columna Kinetex® EVO C18, 2,6 μ m, 100 x 2.1 mm; 0.5 mL/min.

C. Anexo: Espectro de masas de quercetina-3-O-sulfato y quercetina-3-O-glucurónido encontrados en las muestras de estudios farmacocinéticos.





Muestra 2 h post dosis oral de 100 mg/kg de rutina pura. **A**: quercetina-3-O-sulfato, 2.77 min, m/z 380.7. **B**: quercetina-3-O-glucurónido, 3.4 min, m/z 477.18. Las mismas señales se encontraron en las muestras de rutina i.v. y de extracto de cálices de *P. peruviana* oral e i.v. UHPLC, columna Kinetex® EVO C18 (2,6 μ m, 100 x 2.1 mm) a 30°C. Fase móvil: ácido fórmico 0.1% (A'), ACN con 0.1% de ácido fórmico, en gradiente de 85% A' hasta los 1.5 min, 75% A' hasta los 5 min, 65% A' hasta los 9.3 min, a flujo 0.5 mL/min. Detector de masas Q-TOF con ionización por electrospray en modo negativo, voltaje del capilar 3 kV, voltaje del cono de muestra 33 kV, temperatura de secado 250°C, gas de nebulización nitrógeno a 350 L/h, gas de colisión argón a 50L/h y energía de colisión fue 2.5 eV.

Bibliografía

Agilent technologies. (2016). *The LC Handbook*.

Aguilar Ros, A., Camaño Somoza, M., Martin Martin, F. R., & Montejo Rubio, M. C. (2014). *Biofarmacia y farmacocinética: ejercicios y problemas resueltos* (2nd ed.). Elsevier. https://books.google.com.co/books?id=5NN_oAECAAJ

Ahmad, N., Ahmad, R., Naqvi, A. A., Alam, M. A., Ashafaq, M., Samim, M., Iqbal, Z., & Ahmad, F. J. (2016). Rutin-encapsulated chitosan nanoparticles targeted to the brain in the treatment of Cerebral Ischemia. *International Journal of Biological Macromolecules*, *91*, 640–655. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.001>

Ahmad, N., Ahmad, R., Naqvi, A. A., Alam, M. A., Samim, M., Iqbal, Z., & Ahmad, F. J. (2016). Quantification of rutin in rat's brain by UHPLC/ESI-Q-TOF-MS/MS after intranasal administration of rutin loaded chitosan nanoparticles. *EXCLI Journal*, *15*, 518–531. <https://doi.org/10.17179/excli2016-361>

Andlauer, W., Stumpf, C., & Fürst, P. (2001). Intestinal absorption of rutin in free and conjugated forms. *Biochemical Pharmacology*, *62*(3), 369–374. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(01\)00638-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(01)00638-4)

Artursson, P., Karlsson, J., & Karlsson, J. (1991). Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (CaCO-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *175*(3), 880–885.

Bai, X., Moraes, T. F., & Reithmeier, R. A. F. (2017). Structural biology of solute carrier (SLC) membrane transport proteins. *Molecular Membrane Biology*, *34*(1–2), 1–32. <https://doi.org/10.1080/09687688.2018.1448123>

Benet, L. Z. (1984). Pharmacokinetic parameters: which are necessary to define a drug substance? *European Journal of Respiratory Diseases. Supplement*, *134*, 45–61. <http://europepmc.org/abstract/MED/6586486>

Benet, Leslie Z., & Hoener, B. A. (2002). Changes in plasma protein binding have little clinical relevance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *71*(3), 115–121. <https://doi.org/10.1067/mcp.2002.121829>

Berger, L. M., Wein, S., Blank, R., Metges, C. C., & Wolfram, S. (2012). Bioavailability of the flavonol quercetin in cows after intraruminal application of quercetin aglycone and rutin. *Journal of Dairy Science*, *95*(9), 5047–5055. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5439>

Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J. D., Serino, M.,

- Tilg, H., Watson, A., & Wells, J. M. (2014). Intestinal permeability - a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*, *14*(1), 1–25. <https://doi.org/10.1186/s12876-014-0189-7>
- Bormans, V., & Peeters, T. L. (1986). *Motilin receptors in rabbit stomach and small intestine* *. *15*(October 1984), 143–153.
- Boyer, J. E. B., Rown, D. A. N. B., & lu, R. U. I. H. A. I. L. (2004). Uptake of Quercetin and Quercetin 3-Glucoside from Whole Onion and Apple Peel Extracts by Caco-2 Cell Monolayers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*, 7172–7179. <https://doi.org/10.1021/jf030733d>
- Braune, A., & Blaut, M. (2016). Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes*, *7*(3), 216–234. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1158395>
- Brodin, B., Steffansen, B., & Nielsen, C. U. (2010). Passive diffusion of drug substances: the concepts of flux and permeability. In *Molecular Biopharmaceutics* (pp. 135–151). <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.10.116>
- Buchner, N., Krumbein, A., Rohn, S., & Kroh, L. W. (2006). Effect of thermal processing on the flavonols rutin and quercetin. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *20*, 3229–3235. <https://doi.org/10.1002/rcm>
- Cao, H., Liu, X., Ulrih, N. P., Sengupta, P. K., & Xiao, J. (2019). Plasma protein binding of dietary polyphenols to human serum albumin: A high performance affinity chromatography approach. *Food Chemistry*, *270*(March 2018), 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.111>
- Cao, X., Li, H., Wang, M., Ren, X., & Deng, Y. (2020). Analysis of five active ingredients of Er-Zhi-Wan, a traditional Chinese medicine water-honeyed pill, using the biopharmaceutics classification system. *Biomedical Chromatography*, *34*(2), e4757. <https://doi.org/10.1002/bmc.4757>
- Cardona, María Isabel. (2014). *Aporte a la estandarización de un extracto de cálices de Physalis peruviana*. Universidad Nacional de Colombia.
- Cardona, Maria Isabel, Toro, R. M., Costa, G. M., Ospina, L. F., Castellanos, L., Ramos, F. A., & Aragón, D. M. (2017). Influence of extraction process on antioxidant activity and rutin content in *Physalis peruviana* calyces extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *7*(6), 164–168. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2017.70623>
- Castro, J., Ocampo, Y., & Franco, L. (2015). Cape gooseberry [*Physalis peruviana* L.] calyces ameliorate TNBS acid-induced colitis in rats. *Journal of Crohn's and Colitis*, *9*(11), 1004–1015. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv132>
- Center for drug evaluation and research (CDER). (1994). *Reviewer Guidance ' Validation of Chromatographic Methods*. November.
- Chaaban, H., Ioannou, I., Chebil, L., Slimane, M., Gérardin, C., Paris, C., Charbonnel, C., Chekir, L., & Ghoul, M. (2017). Effect of heat processing on thermal stability and

- antioxidant activity of six flavonoids. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(5), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13203>
- Chebil, L., Humeau, C., Anthony, J., Dehez, F., Engasser, J. M., & Ghoul, M. (2007). Solubility of flavonoids in organic solvents. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 52(5), 1552–1556. <https://doi.org/10.1021/je7001094>
- Chen, C. H., Hsu, H. J., Huang, Y. J., & Lin, C. J. (2007). Interaction of flavonoids and intestinal facilitated glucose transporters. *Planta Medica*, 73(4), 348–354. <https://doi.org/10.1055/s-2007-967172>
- Chen, X., Yin, O. Q. P., Zuo, Z., & Chow, M. S. S. (2005). Pharmacokinetics and modeling of quercetin and metabolites. *Pharmaceutical Research*, 22(6), 892–901. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-4584-1>
- Choudhury, R., Srail, S. K., Debnam, E., & Rice-Evans, C. A. (1999). Urinary excretion of hydroxycinnamates and flavonoids after oral and intravenous administration. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(3–4), 278–286. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00054-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00054-4)
- Chua, L. S. (2013). A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), 805–817. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.036>
- Corradini, D. (2016). *Handbook of HPLC* (2nd ed.). CRC Press. <https://books.google.com.co/books?id=8rd1kucmJ4QC>
- Czank, C., Cassidy, A., Zhang, Q., Morrison, D. J., Preston, T., Kroon, P. A., Botting, N. P., & Kay, C. D. (2013). Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3-glucoside: A ¹³C-tracer study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 97(5), 995–1003. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.049247>
- Dahlgren, D., & Lennernäs, H. (2019). Intestinal permeability and drug absorption: predictive experimental, computational and in vivo approaches. *Pharmaceutics*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080411>
- Davies, B., & Morris, T. (1993). Physiological parameters in laboratory animals and humans. In *Pharmaceutical Research* (Vol. 10, Issue 7, pp. 1093–1095). <https://doi.org/10.1023/A:1018943613122>
- de Waziers, I., Cugnenc, P. H., Yang, C. S., Leroux, J. P., & Beaune, P. H. (1990). Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 253(1), 387 LP – 394. <http://jpet.aspetjournals.org/content/253/1/387.abstract>
- Debrus, B., Rozet, E., Hubert, P., Veuthey, J. L., Rudaz, S., & Guillarme, D. (2012). Method transfer between conventional HPLC and UHPLC. In *RSC Chromatography Monographs* (Vols. 2012-Janua, Issue 16). <https://doi.org/10.1039/9781849735490-00067>

- Diehl, K., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J., & Vorstenbosch, C. Van De. (2001). A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. *JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY*, 21, 15–23.
- Domínguez Moré, G. P., Cardenas, P. A., Costa, G. M., Simoes, C. M. O., & Aragon, D. M. (2017). Pharmacokinetics of Botanical Drugs and Plant Extracts. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 17(17), 1646–1664. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170510112508>
- Domínguez Moré, G. P., Feltrin, C., Brambila, P. F., Cardona, M. I., Echeverry, S. M., Simões, C. M. O., & Aragón, D. M. (2020). Matrix effects of the hydroethanolic extract and the butanol fraction of calyces from *Physalis peruviana* L. on the biopharmaceutics classification of rutin. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72(5), 738–747. <https://doi.org/10.1111/jphp.13248>
- Dong, M. W., & Zhang, K. (2014). Ultra-high-pressure liquid chromatography (UHPLC) in method development. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 63, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.06.019>
- Dwivedi, P., Zhou, X., Powell, T. G., Calafat, A. M., & Ye, X. (2018). Impact of enzymatic hydrolysis on the quantification of total urinary concentrations of chemical biomarkers. *Chemosphere*, 199, 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.177>
- Echeverry, S. M., Valderrama, I. H., Costa, G. M., Ospina-Giraldo, L. F., & Aragón, D. M. (2018). Development and optimization of microparticles containing a hypoglycemic fraction of calyces from *Physalis peruviana*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(5), 10–18. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2018.8502>
- El-Kattan, A., & Varma, M. (2012). Oral Absorption, Intestinal Metabolism and Human Oral Bioavailability. In J. Paxton (Ed.), *Topics on Drug Metabolism*. InTech. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353>
- El-Saber Batiha, G., Beshbishy, A. M., Ikram, M., Mulla, Z. S., Abd El-Hack, M. E., Taha, A. E., Algammal, A. M., & Ali Elewa, Y. H. (2020). The pharmacological activity, biochemical properties, and pharmacokinetics of the major natural polyphenolic flavonoid: Quercetin. *Foods*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/foods9030374>
- EMA. (2008). *REFLECTION PAPER ON MARKERS USED FOR QUANTITATIVE AND QUALITATIVE ANALYSIS OF HERBAL MEDICINAL PRODUCTS AND TRADITIONAL HERBAL MEDICINAL PRODUCTS* (Issue July). <https://doi.org/10.32388/yokp53>
- Enogieru, A. B., Haylett, W., Hiss, D. C., Bardien, S., & Ekpo, O. E. (2018). Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018, 1–17. <https://doi.org/10.1155/2018/6241017>
- Erlund, I., Kosonen, T., Alfthan, G., Mäenpää, J., Perttunen, K., Kenraali, J., Parantainen, J., & Aro, a. (2000). Pharmacokinetics of quercetin from quercetin aglycone and rutin in healthy volunteers. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 56, 545–553.

<https://doi.org/10.1007/s002280000197>

- European Medicines Agency. (2013). ICH M3 (R2) - Non-clinical Safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorisation for pharmaceuticals. *European Medicines Agency*, 3(R2), 31.
<http://www.ich.org/products/guidelines/multidisciplinary/article/multidisciplinary-guidelines.html>
- Fan, Z.-C., Xie, C.-J., & Zhang, Z.-Q. (2006). Simultaneous Quantitation of Tetrahydropalmatine and Protopine in Rabbit Plasma by HPLC–PAD, and Application to Pharmacokinetic Studies. *Chromatographia*, 64(9), 577–581.
<https://doi.org/10.1365/s10337-006-0080-y>
- FDA/CDER. (2005). *Guidance for Industry: Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers*.
<https://doi.org/10.1089/blr.2006.25.697>
- FDA/CDER. (2006). Exploratory IND Studies. *Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers, January*, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplia>.
<https://doi.org/10.1089/blr.2006.25.167>
- FDA/CDER. (2017). *Guidance for Industry, Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on a biopharmaceutics classification system. December*.
<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm%0AU.S>.
- FDA/CDER. (2018). *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation (Issue May)*.
<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>
- FDA/CDER. (2019). *Evaluation of Internal Standard Responses During Chromatographic Bioanalysis : Questions and Answers Guidance for Industry Evaluation of Internal Standard Responses During Chromatographic Bioanalysis : Questions and Answers Guidance for Industry (Issue September)*.
- FDA/CDER. (2020). *Safety Testing of Drug Metabolites Guidance for Industry. March*.
<https://www.fda.gov/drugs/guidance-compliance-regulatory-information/guidances-drugs>
- Fong, S. Y. K., Liu, M., Wei, H., Löbenberg, R., Kanfer, I., Lee, V. H. L., Amidon, G. L., & Zuo, Z. (2013). Establishing the pharmaceutical quality of Chinese herbal medicine: A provisional BCS classification. *Molecular Pharmaceutics*, 10(5), 1623–1643.
<https://doi.org/10.1021/mp300502m>
- Franco, L. A., Matiz, G. E., Calle, J., Pinzón, R., & Ospina, L. F. (2007). Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 110–115.
<http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?pid=S0120->

41572007000100010&script=sci_arttext&tlng=en

- Franco, L. A., Ocampo, Y. C., Gómez, H. A., De La Puerta, R., Espartero, J. L., & Ospina, L. F. (2014). Sucrose esters from *Physalis peruviana* calyces with anti-inflammatory activity. *Planta Medica*, *80*(17), 1605–1614. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1383192>
- Friedman, M., & Jürgens, H. S. (2000). Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(6), 2101–2110. <https://doi.org/10.1021/jf990489j>
- Ganeshpurkar, A., & Saluja, A. K. (2017). The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *25*(2), 149–164. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.025>
- Gao, S., & Hu, M. (2010). Bioavailability challenges associated with development of anti-cancer phenolics. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *10*(6), 550–567. <https://doi.org/10.2174/138955710791384081>
- Gao, S., Jiang, W., Yin, T., & Ming, H. (2010). Highly Variable Contents of Phenolics in St John's Wort Products Impact Their Transport in the Human Intestinal Caco-2 Cell Model: Pharmaceutical and Biopharmaceutical Rationale for Product Standardization. *J Agric Food Chem*, *58*(11), 6650–6659. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf904459u>
- Ghorbani, A. (2017). Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, *96*(October), 305–312. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.10.001>
- Global CRO Council for Bioanalysis. (2011). Recommendations on : internal standard criteria , stability , incurred sample reanalysis and recent 483s by the Global CRO Council for Bioanalysis. *Bioanalysis*, *3*, 1323–1332. <https://doi.org/8>
- Gobburu, J. V. S., & Holford, N. H. G. (2001). Vz, THE TERMINAL PHASE VOLUME: TIME FOR ITS TERMINAL PHASE? * . *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, *11*(4), 373–375. <https://doi.org/10.1081/bip-120008854>
- Gonzales, G. B., Van Camp, J., Vissenaekens, H., Raes, K., Smagghe, G., & Grootaert, C. (2015). Review on the Use of Cell Cultures to Study Metabolism, Transport, and Accumulation of Flavonoids: From Mono-Cultures to Co-Culture Systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *14*(6), 741–754. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12158>
- Graefe, E., Witting, J., Mueller, S., Riethling, A.-K., Uehleke, B., Drewelow, B., Pforte, H., Jacobash, G., & Derendorf, H. (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *Journal OfClinical Pharmacology*, *41*, 492–499.
- Gram, T. E., & Fouts, J. R. (1966). TIME COURSE DIFFERENCES IN THE METABOLISM OF DRUGS BY HEPATIC MICROSOMES FROM RATS, RABBITS AND MICE. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *152*(3), 363 LP – 371. <http://jpet.aspetjournals.org/content/152/3/363.abstract>
- Guan, H., Qian, D., Ren, H., Zhang, W., Nie, H., Shang, E., & Duan, J. (2014).

- Interactions of pharmacokinetic profile of different parts from Ginkgo biloba extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1), 758–768.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.022>
- Gullón, B., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Lema, J. M., & Eibes, G. (2017). Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 220–235. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.008>
- H. Wagner, G. U.-M. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Review (Part 1). *Phytomedicine*, 16(2), 97–110.
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>
- Hatton, G. B., Yadav, V., Basit, A. W., & Merchant, H. A. (2015). Animal Farm: Considerations in Animal Gastrointestinal Physiology and Relevance to Drug Delivery in Humans. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(9), 2747–2776.
<https://doi.org/10.1002/jps.24365>
- Hazra, A., & Gogtay, N. (2016). Biostatistics Series Module 3: Comparing Groups: Numerical Variables. *Indian Journal of Dermatology*, 61(3), 251–260.
<https://doi.org/10.4103/0019-5154.182416>
- He, J., Feng, Y., Ouyang, H.-Z., Yu, B., Chang, Y.-X., Pan, G.-X., Dong, G.-Y., Wang, T., & Gao, X.-M. (2013). A sensitive LC-MS/MS method for simultaneous determination of six flavonoids in rat plasma: application to a pharmacokinetic study of total flavonoids from mulberry leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 84, 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.06.019>
- Heinisch, S., & Rocca, J. L. (2004). Effect of mobile phase composition, pH and buffer type on the retention of ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography: Application to method development. *Journal of Chromatography A*, 1048(2), 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.022>
- Helms, R. A., & Quan, D. J. (2006). *Textbook of Therapeutics: Drug and Disease Management*. Lippincott Williams & Wilkins.
<https://books.google.com.co/books?id=aVmRWrknaWgC>
- Henriques, J., Falé, P. L., Pacheco, R., Florêncio, M. H., & Serralheiro, M. L. (2018). Phenolic compounds from *Actinidia deliciosa* leaves: Caco-2 permeability, enzyme inhibitory activity and cell protein profile studies. *Journal of King Saud University - Science*, 30(4), 513–518. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.07.007>
- Hollman, P. C. H., Van Trijp, J. M. P., Buysman, M. N. C. P., Martijn, M. S., Mengelers, M. J. B., De Vries, J. H. M., & Katan, M. B. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters*, 418(1–2), 152–156. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01367-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01367-7)
- Hsiu, S., Huang, T., & Hou, Y. (2002). Comparison of metabolic pharmacokinetics of naringin and naringenin in rabbits. *Life Sciences*, 70, 1481–1489.

- Huang, Q., & Riviere, J. E. (2014). The application of allometric scaling principles to predict pharmacokinetic parameters across species. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *10*(9), 1241–1253.
- Hubatsch, I., Ragnarsson, E. G. E., & Artursson, P. (2007). Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Protocol*, *2*(9), 2111–2119. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.303>
- Ich. (2005). ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. *International Conference on Harmonization, 1994*(November 1996), 17. https://doi.org/http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf
- Jones, D. J. L., Lamb, J. H., Verschoyle, R. D., Howells, L. M., Butterworth, M., Lim, C. K., Ferry, D., Farmer, P. B., & Gescher, A. J. (2004). Characterisation of metabolites of the putative cancer chemopreventive agent quercetin and their effect on cyclo-oxygenase activity. *British Journal of Cancer*, *91*(6), 1213–1219. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602091>
- Jurasekova, Z., Domingo, C., Garcia-Ramos, J. V., & Sanchez-Cortes, S. (2014). Effect of pH on the chemical modification of quercetin and structurally related flavonoids characterized by optical (UV-visible and Raman) spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics*, *16*(25), 12802–12811. <https://doi.org/10.1039/c4cp00864b>
- Kammalla, A. K., Ramasamy, M. K., Chintala, J., Dubey, G. P., Agrawal, A., & Kaliappan, I. (2014). Comparative pharmacokinetic interactions of Quercetin and Rutin in rats after oral administration of European patented formulation containing Hippophae rhamnoides and Co-administration of Quercetin and Rutin. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, *40*(3), 277–284. <https://doi.org/10.1007/s13318-014-0206-9>
- Kang, H. E., & Lee, M. G. (2011). Approaches for predicting human pharmacokinetics using interspecies pharmacokinetic scaling. *Archives of Pharmacal Research*, *34*(11), 1779–1788. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-1101-4>
- Kawabata, K., Yoshioka, Y., & Terao, J. (2019). Role of intestinal microbiota in the bioavailability and physiological functions of dietary polyphenols. *Molecules*, *24*(2). <https://doi.org/10.3390/molecules24020370>
- Kratz, J. M., Teixeira, M. R., Koester, L. S., & Simões, C. M. O. (2011). An HPLC-UV method for the measurement of permeability of marker drugs in the Caco-2 cell assay. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, *44*(6), 531–537. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2011007500060>
- Krishna, R., & Mayer, L. D. (2000). Multidrug resistance (MDR) in cancer Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *11*(4), 265–283. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00114-7)
- Lee, M., Ta, G. H., Weng, C., & Leong, M. K. (2020). In Silico Prediction of Intestinal

- Permeability by Hierarchical Support Vector Regression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21. <https://doi.org/doi:10.3390/ijms21103582>
- Li, H., Cao, X., Liu, Y., Liu, T., Wang, M., & Ren, X. (2019). Establishment of modified biopharmaceutics classification system absorption model for oral Traditional Chinese Medicine (Sanye Tablet). *Journal of Ethnopharmacology*, 244(January), 112148. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112148>
- Liu, Y., & Hu, M. (2002). Absorption and metabolism of flavonoids in the Caco-2 cell culture model and a perfused rat intestinal model. *Drug Metabolism and Disposition*, 30(4), 370–377. <https://doi.org/10.1124/dmd.30.4.370>
- Liu, Z., & Hu, M. (2007). Natural polyphenol disposition via coupled metabolic pathways. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 3(3), 389–406. <https://doi.org/10.1517/17425255.3.3.389>
- Liua, S., Guo, C., Guo, Y., Yu, H., Greenaway, F., & Sun, M.-Z. (2014). Comparative Binding Affinities of Flavonoid Phytochemicals with Bovine Serum Albumin. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 13(3), 1019–1028.
- Lorenzi, H., & Matus, F. J. A. (2008). *Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas*. <https://doi.org/10.1123/tsp.5.1.15>
- Lu, L., Qian, D., Guo, J., Qian, Y., Xu, B., Sha, M., & Duan, J. (2013). Abelmoschi Corolla non-flavonoid components altered the pharmacokinetic profile of its flavonoids in rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 804–811. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.05.009>
- Luca, S. V., Macovei, I., Bujor, A., Miron, A., Skalicka-Woźniak, K., Aprotosoai, A. C., & Trifan, A. (2019). Bioactivity of dietary polyphenols: The role of metabolites. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–34. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1546669>
- Mahmood, I. (2018). Misconceptions and issues regarding allometric scaling during the drug development process. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 14(8), 843–854. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1499725>
- Manach, C. (2004). Polyphenols : food sources and bioavailability . *Am J Clin Nutr. American Journal of Clinical Nutrition*, 79(October 2015), 727–747.
- Mandery, K., Balk, B., Bujok, K., Schmidt, I., Fromm, M. F., & Glaeser, H. (2012). Inhibition of hepatic uptake transporters by flavonoids. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(1–2), 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2012.02.014>
- Meinl, W., Ebert, B., Glatt, H., & Lampen, A. (2008). Sulfotransferase forms expressed in human intestinal Caco-2 and TC7 cells at varying stages of differentiation and role in benzo[a]pyrene metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(2), 276–283. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.018036>
- RESOLUCION NUMERO 8430 DE 1993, 19 (1993).

- <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i4.1526>
- Morris, B., & Courtice, F. C. (1955). THE PROTEIN AND LIPID COMPOSITION OF THE PLASMA OF DIFFERENT ANIMAL SPECIES DETERMINED BY ZONE ELECTROPHORESIS AND CHEMICAL ANALYSIS. *Experimental Physiology*, 40(2), 127–137.
- Mould, D. R., & Upton, R. N. (2013). Basic concepts in population modeling, simulation, and model-based drug development - Part 2: Introduction to pharmacokinetic modeling methods. *CPT: Pharmacometrics and Systems Pharmacology*, 2(4). <https://doi.org/10.1038/psp.2013.14>
- Müller-Sepúlveda, A., Letelier, M. E., San Martín, B., & Saavedra-Saavedra, I. (2016). Simultaneous determination of different flavonoids in human plasma by a simple HPLC assay. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 61(4), 3164–3169. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072016000400003>
- Nan, Y., Zhao, X., Wei, L., Wang, H., Xiao, C., & Zheng, X. (2010). Determination of Jasminoidin in Rabbit Plasma for the Pharmacokinetic Investigation after Single Dose Oral Administration of Gardenia jasminoides Ellis and Gardenia jasminoides Ellis Coupling Coptis chinensis Franch Extracts. *Chromatographia*, 71(11–12), 1031–1037. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1572-3>
- Nigam, S. K. (2014). What do drug transporters really do? *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(1), 29–44. <https://doi.org/10.1038/nrd4461>
- O'Leary, K. A., Day, A. J., Needs, P. W., Mellon, F. A., O'Brien, N. M., & Williamson, G. (2003). Metabolism of quercetin-7- and quercetin-3-glucuronides by an in vitro hepatic model: The role of human β -glucuronidase, sulfotransferase, catechol-O-methyltransferase and multi-resistant protein 2 (MRP2) in flavonoid metabolism. *Biochemical Pharmacology*, 65(3), 479–491. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01510-1](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01510-1)
- OMS. (2019). Informe mundial de la OMS sobre medicina tradicional y complementaria 2019. In *Organización Mundial de la Salud*. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312342/9789241515436-eng.pdf?ua=1>
- Ou-yang, Z., Cao, X., Wei, Y., Zhang, W.-W.-Q., Zhao, M., & Duan, J. (2013). Pharmacokinetic study of rutin and quercetin in rats after oral administration of total flavones of mulberry leaf extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(5), 776–782. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000500009>
- Ozidal, T., Sela, D. A., Xiao, J., Boyacioglu, D., Chen, F., & Capanoglu, E. (2016). The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. *Nutrients*, 8(2), 1–36. <https://doi.org/10.3390/nu8020078>
- Pérez-Sánchez, A., Borrás-Linares, I., Barrajón-Catalán, E., Arráez-Román, D., González-Álvarez, I., Ibáñez, E., Segura-Carretero, A., Bermejo, M., & Micol, V. (2017). Evaluation of the intestinal permeability of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract polyphenols and terpenoids in Caco-2 cell monolayers. *PLoS ONE*, 12(2),

1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172063>

Pollard, T., & Earnshaw, W. (2017). *Cell biology*.

Qiang, Z., Zhong, Y., Hauck, C., Murphy, P. A., McCoy, J.-A., Widrlechner, M. P., Reddy, M. B., & Hendrich, S. (2011). Permeability of Rosmarinic acid in *Prunella vulgaris* and Ursolic acid in *Salvia officinalis* Extracts across Caco-2 Cell Monolayers. *J Ethnopharmacol.*, 137(3), 1107–1112. <https://doi.org/110.110.1016/j.jep.2011.07.037>

Ramadan, M. F. (2019). Bioactive Phytochemicals of Cape Gooseberry (*Physalis peruviana* L.). In H. Murthy & V. Bapat (Eds.), *Bioactive Compounds in Underutilized Fruits and Nuts. Reference Series in Phytochemistry*. (pp. 1–16). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-06120-3_3-1

Ramírez, L. P. M., Dallos, M. P., & Perea, A. T. (2010). *Biotecnología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutas tropicales*. http://books.google.com.co/books/about/Biotecnología_aplicada_al_mejoramiento.html?id=axOXMwEACAAJ&pgis=1

Rasmussen, H. T., Li, W., Dirk, R., & Jimidar, M. I. (2005). Hplc method development. In S. Ahuja & M. W. Dong (Eds.), *Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC* (1st ed., p. 658). Elsevier.

Rasoanaivo, P., Wright, C. W., Willcox, M. L., & Gilbert, B. (2011). Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions. *Malaria Journal*, 10(Suppl 1), S4. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-10-S1-S4>

Rastogi, H., & Jana, S. (2016). Evaluation of physicochemical properties and intestinal permeability of six dietary polyphenols in human intestinal colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 41(1), 33–43. <https://doi.org/10.1007/s13318-014-0234-5>

Razmara, R. S., Daneshfar, A., & Sahraei, R. (2010). Solubility of quercetin in water + methanol and water + ethanol from (292.8 to 333.8) K. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 55(9), 3934–3936. <https://doi.org/10.1021/je9010757>

Reinboth, M., Wolffram, S., Abraham, G., Ungemach, F. R., & Cermak, R. (2010). Oral bioavailability of quercetin from different quercetin glycosides in dogs. *British Journal of Nutrition*, 104, 198–203. <https://doi.org/10.1017/S000711451000053X>

Rescigno, A. (2010). The two faces of pharmacokinetics. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 13(1), 38–42. <https://doi.org/10.18433/J3V013>

Reyes-Beltrán, M. E. D., Guanilo-Reyes, C. K., Ibáñez-Cárdenas, M. W., García-Collao, C. E., Idrogo-Alfaro, J. J., & Huamán-Saavedra, J. J. (2016). Efecto del consumo de *Physalis peruviana* L. (aguaymanto) sobre el perfil lipídico de pacientes con hipercolesterolemia. *Acta Medica Peruana*, 32(4), 195. <https://doi.org/10.35663/amp.2015.324.2>

- Šatínský, D., Jägerová, K., Havlíková, L., & Solich, P. (2013). A New and Fast HPLC Method for Determination of Rutin, Troxerutin, Diosmin and Hesperidin in Food Supplements Using Fused-Core Column Technology. *Food Analytical Methods*, 6(5), 1353–1360. <https://doi.org/10.1007/s12161-012-9551-y>
- Scheepens, A., Tan, K., & Paxton, J. W. (2010). Improving the oral bioavailability of beneficial polyphenols through designed synergies. *Genes and Nutrition*, 5(1), 75–87. <https://doi.org/10.1007/s12263-009-0148-z>
- Sengupta, P., Sardar, P. S., Roy, P., Dasgupta, S., & Bose, A. (2018). Investigation on the interaction of Rutin with serum albumins: Insights from spectroscopic and molecular docking techniques. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 183, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.04.019>
- Shargel, L., & Yu, A. B. C. (Eds.). (2015). *Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics, Seventh Edition* (7th ed.). McGraw-Hill Education. <https://books.google.com.co/books?id=yMhbcGAAQBAJ>
- Shi, J., Fu, Q., Chen, W., Yang, H. P., Liu, J., Wang, X. M., & He, X. (2013). Comparative study of pharmacokinetics and tissue distribution of osthole in rats after oral administration of pure osthole and Libanotis buchtormensis supercritical extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(1), 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.028>
- Shimoi, K., Yoshizumi, K., Kido, T., Usui, Y., & Yumoto, T. (2003). Absorption and Urinary Excretion of Quercetin, Rutin, and r G-Rutin, a Water Soluble Flavonoid, in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2785–2789.
- Shugarts, S., & Benet, L. Z. (2009). The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharmaceutical Research*, 26(9), 2039–2054. <https://doi.org/10.1007/s11095-009-9924-0>
- Sladkovský, R., Solich, P., & Opletal, L. (2001). Simultaneous determination of quercetin, kaempferol and (E)-cinnamic acid in vegetative organs of Schisandra chinensis Baill. by HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(5–6), 1049–1054. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00539-2](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00539-2)
- Slámová, K., Kapešov, J., & Valentová, K. (2018). “ Sweet Flavonoids ”: Glycosidase-Catalyzed Modifications. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2126), 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms19072126>
- Smolarz, H. D., Budzianowski, J., Bogucka-Kocka, A., Kocki, J., & Mendyk, E. (2008). Flavonoid glucuronides with anti-leukaemic activity from Polygonum amphibium L. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 506–513. <https://doi.org/10.1002/pca.1076>
- Srinivas, K., King, J. W., Howard, L. R., & Monrad, J. K. (2010). Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dihydrate in subcritical water. *Journal of Food Engineering*, 100(2), 208–218. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.04.001>
- Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L., Hickman, J.,

- Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L., & Hickman, J. J. (2016). TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. In *Journal of laboratory automation* (Vol. 20, Issue 2).
<https://doi.org/10.1177/2211068214561025>.TEER
- Stern, S. T., Martinez, M. N., & Stevens, D. M. (2016). When is it important to measure unbound drug in evaluating nanomedicine pharmacokinetics? *Drug Metabolism and Disposition*, *44*(12), 1934–1939. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.073148>
- Sun, H., Chow, E. C., Liu, S., Du, Y., & Pang, K. S. (2008). The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *4*(4), 395–411. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.4.395>
- Sun, H., & Pang, K. S. (2008). PAPER 1 Permeability, Transport, and Metabolism of Solutes in Caco-2 Cell Monolayers A Theoretical Study. *Drug Metabolism and Disposition*, *36*(1), 102–123. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.015321>.with
- Tamura, M., Nakagawa, H., Tsushida, T., Hirayama, K., & Itoh, K. (2007). Effect of pectin enhancement on plasma quercetin and fecal flora in rutin-supplemented mice. *Journal of Food Science*, *72*(9), 648–651. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00557.x>
- Tan, H., Chen, L., Ma, L., Liu, S., Zhou, H., Zhang, Y., Guo, T., Liu, W., Dai, H., & Yu, Y. (2019). Fluorescence spectroscopic investigation of competitive interactions between quercetin and aflatoxin B1 for binding to human serum albumin. *Toxins*, *11*(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/toxins11040214>
- Tang, D., Yin, X., Zhang, Z., Gao, Y., Wei, Y., Chen, Y., & Han, L. (2009). Gradient HPLC-DAD for the Simultaneous Determination of Five Flavonoids in Plasma After Intravenously Administrated Ginkgo biloba Extract and its Application in the Study of Pharmacokinetics in Rats. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, *32*(February 2015), 2065–2079.
<https://doi.org/10.1080/10826070903126948>
- Teng, Z., Yuan, C., Zhang, F., Huan, M., Cao, W., Li, K., Yang, J., Cao, D., Zhou, S., & Mei, Q. (2012). Intestinal absorption and first-pass metabolism of polyphenol compounds in rat and their transport dynamics in caco-2 cells. *PLoS ONE*, *7*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029647>
- Tian, X. J., Yang, X. W., Yang, X., & Wang, K. (2009). Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model. *International Journal of Pharmaceutics*, *367*(1–2), 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.09.023>
- Toro Arango, R. M. (2014). *Propuesta de un marcador analítico como herramienta en la microencapsulación de un extracto con actividad antioxidante de cálices de Physalis peruviana*. Universidad Nacional de Colombia.
- Toro Arango, R. M., Aragón N., D. M., & Ospina G., L. F. (2013). Hepatoprotective effect of calyces extract of *Physalis peruviana* in hepatotoxicity induced by CCl₄ in Wistar rats. *Vitae*, *20*(45), 125–132.

- <http://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/vitae/article/viewArticle/12560%5Cnhttp://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v20n2/v20n2a6.pdf>
- Toro, R. M., Aragón, D. M., Ospina, L. F., Ramos, F. A., & Castellanos, L. (2014). Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activity of calyces from *Physalis peruviana*. *Natural Product Communications*, 9(11), 1–3. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25532284>
- USP (Ed.). (2019). Capítulo 621 Cromatografía. In *USP 42* (pp. 6896–6908).
- Vaidyanathan, J. B., & Walle, T. (2003). Cellular uptake and efflux of the tea flavonoid (-)epicatechin-3-gallate in the human intestinal cell line Caco-2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(2), 745–752. <https://doi.org/10.1124/jpet.103.054296.genesis>
- Verjee, S., Kelber, O., Kolb, C., Abdel-Aziz, H., & Butterweck, V. (2017). Permeation characteristics of hypericin across Caco-2 monolayers in the presence of single flavonoids, defined flavonoid mixtures or Hypericum extract matrix. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/jphp.12717>
- Verotta, D. (2012). Covariate Modeling in Population PK/PD Models: an Open Problem. *Advances in Pharmacoepidemiology & Drug Safety*, 01(S1), 1–5. <https://doi.org/10.4172/2167-1052.s1-006>
- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1, 1112–1116. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
- Waldmann, S., Almukainzi, M., Bou-Chacra, N. A., Amidon, G. L., Lee, B. J., Feng, J., Kanfer, I., Zuo, J. Z., Wei, H., Bolger, M. B., & Löbenberg, R. (2012). Provisional biopharmaceutical classification of some common herbs used in western medicine. *Molecular Pharmaceutics*, 9(4), 815–822. <https://doi.org/10.1021/mp200162b>
- Wang, Jing, & Zhao, Xi. H. (2016). Degradation kinetics of fisetin and quercetin in solutions affected by medium pH, temperature and co-existing proteins. *Journal of the Serbian Chemical Society*, 81(3), 243–253. <https://doi.org/10.2298/JSC150706092W>
- Wang, Jun, Zhao, L., Sun, G., Liang, Y., Wu, F., Chen, Z., & Cui, S. (2011). A comparison of acidic and enzymatic hydrolysis of rutin. *Journal of Biotechnology*, 10(February 2011), 1460–1466. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2077>
- Wang, L., Sun, R., Zhang, Q., Luo, Q., Zeng, S., Li, X., Gong, X., Li, Y., Lu, L., Hu, M., & Liu, Z. (2019). An update on polyphenol disposition via coupled metabolic pathways. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 15(2), 151–165. <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1559815>
- Wang, S.-Y., Chai, J.-Y., Zhang, W.-J., Liu, X., Du, Y., Cheng, Z.-Z., Ying, X.-X., & Kang, T.-G. (2010). HPLC determination of five polyphenols in rat plasma after intravenous administration of hawthorn leaves extract and its application to pharmacokinetic study. *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 130(11), 1603–1613.

- Wei, B. Bin, Chen, Z. X., Liu, M. Y., & Wei, M. J. (2017). Development of a UPLC-MS/MS method for simultaneous determination of six flavonoids in rat plasma after administration of Maydis stigma extract and its application to a comparative pharmacokinetic study in normal and diabetic rats. *Molecules*, *22*(8). <https://doi.org/10.3390/molecules22081267>
- Wei, Y., Wu, B., Jiang, W., Yin, T., Jia, X., Basu, S., Yang, G., & Hu, M. (2013). Revolving door action of breast cancer resistance protein (BCRP) facilitates or controls the efflux of flavone glucuronides from UGT1A9-overexpressing hela cells. *Molecular Pharmaceutics*, *10*(5), 1736–1750. <https://doi.org/10.1021/mp300562q>
- Williamson, G., Kay, C. D., & Crozier, A. (2018). The Bioavailability, Transport, and Bioactivity of Dietary Flavonoids: A Review from a Historical Perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *17*(5), 1054–1112. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12351>
- Wu, J., Xing, H., Tang, D., Gao, Y., Yin, X., Du, Q., Jiang, X., & Yang, D. (2012). Simultaneous determination of nine flavonoids in beagle dog by HPLC with DAD and application of Ginkgo biloba extracts on the pharmacokinetic. *Acta Chromatographica*, *24*(4), 627–642. <https://doi.org/10.1556/AChrom.24.2012.4.9>
- Xiao, J., & Kai, G. (2012). A review of dietary polyphenol-plasma protein interactions: Characterization, influence on the bioactivity, and structure-affinity relationship. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *52*(1), 85–101. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.499017>
- Yang, C. Y., Hsiu, S. L., Wen, K. C., Lin, S. P., Tsai, S. Y., Hou, Y. C., & Chao, P. D. L. (2005). Bioavailability and metabolic pharmacokinetics of rutin and quercetin in rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, *13*(3), 244–250.
- Yang, Yan, Yang, R., Wei, Y., & Zheng, X. (2008). MEKC Determination and Pharmacokinetic Study of Danshensu in Rabbits after Intragastric Administration of the Aqueous Extract from Danshen. *Chromatographia*, *67*(5–6), 477–481. <https://doi.org/10.1365/s10337-008-0540-7>
- Yang, Yong, Zhang, Z., Li, S., Ye, X., Li, X., & He, K. (2014). Synergy effects of herb extracts: Pharmacokinetics and pharmacodynamic basis. *Fitoterapia*, *92*, 133–147. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.10.010>
- Yang, Yuya, Bai, L., Li, X., Xiong, J., Xu, P., Guo, C., & Xue, M. (2014). Transport of active flavonoids, based on cytotoxicity and lipophilicity: An evaluation using the blood-brain barrier cell and Caco-2 cell models. *Toxicology in Vitro*, *28*(3), 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.12.002>
- Yates, J. W. T., & Arundel, P. A. (2008). On the volume of distribution at steady state and its relationship with two-compartmental models. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *97*(1), 111–122. <https://doi.org/10.1002/jps.21089>
- Yin, J., & Wang, J. (2016). Renal drug transporters and their significance in drug-drug interactions. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *6*(5), 363–373.

- <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.07.013>
- Yoshino, S., Hara, A., Sakakibara, H., Kawabata, K., Tokumura, A., Ishisaka, A., Kawai, Y., & Terao, J. (2011). Effect of quercetin and glucuronide metabolites on the monoamine oxidase-A reaction in mouse brain mitochondria. *Nutrition*, *27*(7–8), 847–852. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2010.09.002>
- You, J., Cui, F. De, Li, Q. P., Yong-Sheng, W., Han, X., & Yu, Y. W. (2005). A HPLC method for the analysis of germacrone in rabbit plasma and its application to a pharmacokinetic study of germacrone after administration of zedoary turmeric oil. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *823*(2), 172–176. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.06.032>
- Zamek-Gliszczynski, M. J., Taub, M. E., Chothe, P. P., Chu, X., Giacomini, K. M., Kim, R. B., Ray, A. S., Stocker, S. L., Unadkat, J. D., Wittwer, M. B., Xia, C., Yee, S. W., Zhang, L., & Zhang, Y. (2018). Transporters in Drug Development: 2018 ITC Recommendations for Transporters of Emerging Clinical Importance. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, *104*(5), 890–899. <https://doi.org/10.1002/cpt.1112>
- Zhang, H.-B., Lu, P., Guo, Q.-Y., Zhang, Z.-H., & Meng, X.-Y. (2013). Baicalein induces apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells through modulation of the PI3K/Akt pathway. *Oncology Letters*, *5*(2), 722–728. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.1069>
- Zhang, H., Hassan, Y. I., Liu, R., Mats, L., Yang, C., Liu, C., & Tsao, R. (2020). Molecular Mechanisms Underlying the Absorption of Aglycone and Glycosidic Flavonoids in a Caco-2 BBe1 Cell Model. *ACS Omega*, *5*(19), 10782–10793. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00379>
- Zhang, L., Zuo, Z., & Lin, G. (2007). Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids. *Molecular Pharmaceutics*, *4*(6), 833–845. <https://doi.org/10.1021/mp700077z>
- Zhang, X., Sun, Y. G., Cheng, M. C., Wang, Y. Q., Xiao, H. B., & Liang, X. M. (2007). Simultaneous quantification of three isoflavonoid glycosides in rabbit plasma after oral administration of Astragalus mongholicus extract by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, *602*(2), 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.09.033>
- Zhang, Xiaofang, Song, J., Shi, X., Miao, S., Li, Y., & Wen, A. (2013). Absorption and metabolism characteristics of rutin in caco-2 cells. *The Scientific World Journal*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/382350>
- Zhao, G., Zou, L., Wang, Z., Hu, H., Hu, Y., & Peng, L. (2011). Pharmacokinetic Profile of Total Quercetin after Single Oral Dose of Tartary Buckwheat Extracts in Rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 4435–4441.