

Elaboración de píldoras audiovisuales de apoyo a las clases prácticas en el laboratorio de biofarmacia y farmacocinética (ID2019/095)

Jonás Samuel Pérez Blanco

INVESTIGADOR COORDINADOR

INVESTIGADORES COLABORADORES: Dolores Santos Buelga, M^a José García Sánchez

Memoria Final

Proyectos de innovación docente
Centro de Formación Permanente
Universidad de Salamanca



INTRODUCCIÓN

Los estudios farmacocinéticos tienen una base matemático-estadística importante en los que se sustenta la mayor carga docente de la asignatura Biofarmacia y Farmacocinética I del Grado en Farmacia de la Universidad de Salamanca. Toda la base cinética necesita de la información de concentración-tiempo de los fármacos administrados a los seres vivos, con especial atención a los humanos.

El objetivo principal del proyecto fue la elaboración de material audiovisual (videos) complementario e introductorio a las sesiones prácticas de la asignatura Biofarmacia y Farmacocinética I, así como facilitar al alumno información previa a la realización de las sesiones prácticas para mejorar su aprovechamiento, mediante la visualización del material que explica los dispositivos y herramientas que debe utilizar en su ejecución con el fin de optimizar su rendimiento. Adicionalmente y debido a la situación de emergencia sanitaria ocasionada por la pandemia mundial COVID-19, se rediseñaron los videos para que sirvieran de soporte docente en la realización de dos de las prácticas de la asignatura Biofarmacia y Farmacocinética de manera síncrona no presencial

METODOLOGÍA

La metodología seguida en el diseño y desarrollo de los videos fue la siguiente:

1. Elaboración de un guion para cada uno de los videos a realizar
2. Grabación y edición de los videos y subida a la plataforma YouTube en acceso privado
3. Alojamiento de los videos en la plataforma studium
4. Evaluación por parte del profesorado de la mejora en la realización de los grupos de prácticas
5. Elaboración memoria final del proyecto

Las profesoras María José García Sánchez y Dolores Santos Buelga fueron responsables de los puntos 1 y 4. El coordinador del proyecto, Jonás Samuel Pérez Blanco, junto con dos colaboradores incorporados tras la resolución de concesión del mismo, Hinojal Zazo Gómez y Paulo Roberto Teixeira fueron los responsables de los puntos 2 y 3; siendo responsabilidad del coordinador la elaboración de la memoria final del proyecto.

RESULTADOS

Los guiones de las 4 prácticas se incluyen como anexos de este proyecto. Para la grabación de los videos se dispuso de medios de grabación específicos (focos, estabilizador de cámara, soportes, etc.) facilitados por la profesora del departamento Carmen Gutiérrez Millán. Además, la Facultad de Farmacia cedió sus instalaciones para la grabación en condiciones óptimas (Figura 1).



Figura 1. Grabación de la práctica 1 (absorción de fármacos por vía oral).

A continuación, se incluyen los enlaces a los videos generados junto con la diapositiva inicial (título de la práctica) y una imagen representativa de la práctica.

1. Práctica 1: https://www.youtube.com/watch?v=wDX24f_dVC4

Biofarmacia y Farmacocinética I

PRÁCTICA 1 SIMULACIÓN DE LA CINÉTICA DE UN FÁRMACO TRAS SU ADMINISTRACIÓN POR VÍA ORAL

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Compartimento 1 Compartimento 2 Compartimento 3

00:02:17,004

2. Práctica 2: <https://www.youtube.com/watch?v=GZSmlwqAcTA&t=1s>

Biofarmacia y Farmacocinética I

PRÁCTICA 2

SIMULACIÓN DE LA CINÉTICA DE UN FÁRMACO ADMINISTRADO EN RÉGIMEN DE DOSIS MÚLTIPLE POR VÍA ENDOVENOSA

Universidad de Salamanca
Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

FUNDAMENTO

Los tratamientos farmacológicos **BUSCAN** un efecto mantenido en el tiempo

Régimen posológico de dosis múltiple

- Magnitud de la dosis
- Frecuencia de administración

3. Práctica 3: <https://www.youtube.com/watch?v=GaV9oRp5IAo&t=1s>

Biofarmacia y Farmacocinética I

PRÁCTICA 3

SIMULACIÓN DE LA CINÉTICA DE UN FÁRMACO TRAS LA ADMINISTRACIÓN POR PERFUSIÓN ENDOVENOSA

Universidad de Salamanca
Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

Durante la perfusión

FIN PERFUSIÓN

Tras la perfusión

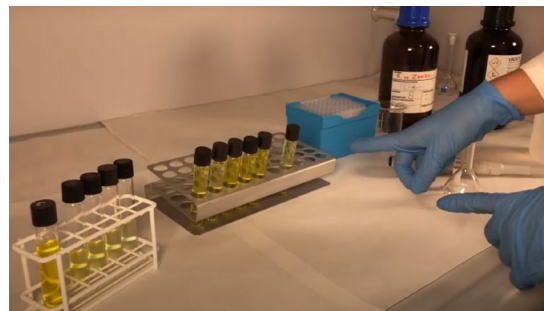
4. Práctica 4: https://www.youtube.com/watch?v=wOsE8B_Cqlc

Biofarmacia y Farmacocinética I

PRÁCTICA 4

CINETICA DE EXCRECIÓN URINARIA DE NITRITOS

Universidad de Salamanca
Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Área de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



CONCLUSIONES

El proyecto inicial de innovación decente planteado se ha llevado a cabo satisfactoriamente ampliando el número de videos inicialmente propuesto debido a la pandemia COVID-19. Los videos han resultado de gran utilidad en el desarrollo de las prácticas de la asignatura de Biofarmacia y Farmacocinética I del Grado en Farmacia de la Universidad de Salamanca durante el curso 2020-2021 y se espera que se utilicen en cursos posteriores como material de apoyo en el desarrollo habitual de las prácticas de dicha asignatura.

AGRADECIMIENTOS

Este equipo docente queremos agradecer explícitamente a la Facultad de Farmacia por la cesión de espacios, a la Dr. Carmen Gutiérrez Millán el equipo audiovisual facilitado, así como al Dr. Paulo Roberto Teixeira Leite Lourenço Da Silva y la Dra. Hinojal Zazo Gómez por su inestimable ayuda en la elaboración y edición de los videos.

ANEXO I - GUIÓN PRACTICA 1

SIMULACIÓN DE LA CINÉTICA DE UN FÁRMACO TRAS SU ADMINISTRACIÓN POR VÍA ORAL

OBJETIVO

Estimar los parámetros farmacocinéticos de un fármaco hipotético a partir de los datos obtenidos en un dispositivo que simula los procesos de absorción y eliminación que experimenta un fármaco tras su administración por vía oral en un modelo monocompartmental.

FUNDAMENTO:

Para la realización de esta práctica vamos a disponer de un dispositivo con 3 compartimentos. El **compartimento superior (1)** corresponde al lugar de absorción del fármaco (por Ej. el duodeno), en el cual vamos a depositar la dosis de fármaco administrada. El **intermedio (2)** corresponde al compartimento central o zona del organismo a la que tiene acceso el fármaco (por Ej. la sangre y los fluidos a los que accede el fármaco), donde se distribuye de forma instantánea y homogénea. El **inferior (3)**, donde se recoge la cantidad de fármaco eliminado, representa el compartimento de excreción (por Ej. la orina).

En la práctica se van a considerar una serie de asunciones:

- Los volúmenes medidos en el dispositivo se corresponden con cantidades: 1 mL equivale a 1 mg.
- Se manejan cantidades en cada uno de los compartimentos, en lugar de concentraciones.
- La absorción de la dosis administrada de fármaco es completa y no existe efecto de primer paso por lo que la fracción biodisponible (F) es igual a la unidad.
- El fármaco se ajusta a un modelo monocompartmental.
- La eliminación del fármaco se produce exclusivamente por excreción renal por lo que el compartimento inferior representa la orina, en consecuencia, la fracción excretada por vía renal (fr) es igual a la unidad.
- Los procesos cinéticos de absorción y eliminación se ajustan a cinéticas de orden uno.
- La constante de velocidad de absorción K_a , es mayor que la constante de velocidad de eliminación K_e .

El dispositivo es un sistema hidráulico constituido por 3 cilindros graduados, conectados en serie a través de tubos capilares de diámetro definido. El diámetro del capilar que conecta el compartimento 1 y 2, que simula el proceso de absorción, es mayor que el que conecta los compartimentos 2 y 3, que simula el proceso de eliminación. De esta forma conseguimos que el valor de la constante de velocidad de absorción, K_a , sea mayor que la de eliminación, K_e y por tanto no se produzca el fenómeno conocido como "flip-flop". Estas constantes cinéticas serán de primer orden ya que el paso de un compartimento a otro se produce por goteo a través de los orificios del capilar de diámetro constante y su velocidad estará determinada por el diámetro del capilar (que vendrían a reflejar las constantes K_a o K_e) y por la fuerza de la gravedad, la cual será tanto más elevada cuando el volumen en el compartimento de salida es mayor y se irá reduciendo a medida que ese volumen disminuye. De esta forma tan simple estamos consiguiendo simular un proceso cinético de orden uno, en el cual la velocidad de paso viene determinada por la constante de velocidad K_a o K_e (determinados por el diámetro del capilar) y el peso del volumen o cantidad de fármaco que presenta el compartimento de salida.

En la toma de datos, hay que despreciar los correspondientes a los últimos tiempos de muestreo ya que, como consecuencia de un efecto de la tensión superficial, que supera la fuerza de la gravedad, se pierde el comportamiento cinético de primer orden que se pretende simular cuando el volumen restante en el compartimento es inferior a 10 mL aproximadamente.

En el **compartimento 1** o de absorción en el que se administra la dosis, solo se produce el proceso de salida del fármaco administrado hacia el compartimento 2. La representación gráfica en escala lineal de los datos de cantidad remanente en este compartimento frente al tiempo será una curva exponencial

descendente. La representación en escala semilogarítmica lineariza la función de desaparición de fármaco del compartimento 1 originando una línea recta descendente, es decir de pendiente negativa, a partir de la cual se puede estimar por un método directo la K_a a partir de la estimación gráfica de la semivida de absorción. Es por esto, que se deben representar los datos en escala semilogarítmica y representar la semivida de absorción y el cálculo de K_a a partir de la misma.

En el **compartimento 2** se van a producir simultáneamente al principio 2 procesos, uno de entrada desde el compartimento 1 o compartimento de absorción y otro de salida hacia el compartimento 3 o compartimento de eliminación. Por tanto, en este compartimento intermedio se producen procesos de absorción y eliminación. En los primeros tiempos tras la administración de la dosis en el compartimento de absorción la velocidad de entrada al compartimento 2 (organismo) será mayor que la de salida al compartimento 3, ya que la cantidad de fármaco en el compartimento de absorción es mucho mayor que la del compartimento 2 donde inicialmente no hay fármaco. Ello da lugar a un aumento progresivo de la cantidad de fármaco en el compartimento 2, en el cual se va acumulando fármaco y en consecuencia está aumentando la velocidad de salida. Llega un momento en que la velocidad de entrada y la de salida en este compartimento se igualan, momento definido como t_{max} , en el que se alcanza la concentración máxima (C_{max}). A partir de ese momento la velocidad de salida del compartimento 2 empieza a superar a la velocidad de entrada y la cantidad de fármaco en ese compartimento empieza a descender. Una vez que toda la dosis se ha absorbido o incorporado al compartimento 2 y por tanto no quede nada de fármaco en el compartimento 1, solo existirán procesos de eliminación y la fase descendente estará condicionada solo por el proceso de eliminación, a diferencia del periodo de tiempo anterior en el que coexisten simultáneamente procesos de absorción y eliminación.

En el **compartimento 3**, que simula la orina, se produce la acumulación del fármaco hasta su total eliminación, momento en el cual aparecerá en este compartimento toda la dosis administrada, 100 mg, ya que toda la dosis es absorbida y eliminada a través del riñón. En este compartimento solo existe un proceso de entrada, cuya velocidad estará controlada por la K_e y la cantidad de fármaco existente en cada momento en el compartimento 2. En este caso concreto como todo el fármaco se excreta por el riñón, la constante de velocidad de excreción urinaria (K_r) coincide con el valor de la K_e .

TOMA DE DATOS

Para la realización de la práctica vamos a utilizar una disolución acuosa de tartracina, con el fin de poder visualizar adecuadamente los volúmenes en cada uno de los 3 compartimentos.

Se llena el compartimento superior con un volumen de 100 mL de la disolución (equivalencia :1 ml= 1 mg) por tanto la dosis administrada de fármaco es 100 mg. En ese momento se inicia la experiencia. Anotar en vuestro **cuaderno de prácticas**, a los tiempos indicados en la tabla, el volumen de la disolución en cada uno de los 3 compartimentos

PROCEDIMIENTO

Cinética en el compartimento superior (1): lugar de absorción

Con los pares de datos de cantidad de fármaco en el lugar de absorción y los tiempos se construye en papel semilogarítmico la gráfica de desaparición del fármaco del lugar de absorción. Y se calcula la constante de absorción (K_a) por el método directo, es decir, a partir de la estimación gráfica de la semivida de absorción que es el tiempo que tarda una concentración en disminuirse a la mitad.

En el manual de prácticas tenéis recogida la ecuación exponencial a la que, previa linearización, debéis ajustar los datos en la calculadora por regresión lineal con mínimos cuadrados para obtener el valor de K_a por este método. Considerando los tiempos como la variable independiente X y los logaritmos neperianos de concentración plasmática la variable dependiente Y. La calculadora nos proporciona los valores del coeficiente de correlación que refleja la bondad del ajuste, la pendiente, que corresponde directamente a la K_a , y la ordenada en el origen, que se corresponde con la cantidad inicial de fármaco administrado.

$$Q_A = Q_0 \cdot e^{-Ka.t}$$

$$\ln Q_A = \ln Q_0 - K_a t$$

Cinética en el compartimento intermedio (2): organismo

Con los pares de datos de cantidad de fármaco en el compartimento intermedio (2) se construye la gráfica que refleja la evolución de las cantidades de fármaco en el organismo de acuerdo a un modelo monocompartimental, la cual se ajusta a una curva biexponencial según la ecuación de Bateman:

$$Q = Q_{0,ext} \cdot (e^{-Ke.t} - e^{-Ka.t})$$

Esta ecuación en la fase post-absorción, es decir, a tiempos superiores a la finalización del proceso de absorción (cuando no queda nada en el compartimento 1) se simplifica a una ecuación monoexponencial controlada únicamente por K_e y cuya transformación logarítmica permite linearizarla para poder calcular la K_e por regresión lineal mediante mínimos cuadrados:

$$Q = Q_{0,ext} \cdot e^{-Ke.t} \Rightarrow \ln Q = \ln Q_{0,ext} - Ke.t$$

Para el cálculo de la K_e se empieza por el último dato muestreado y se utilizan 3-4 puntos para obtener una recta. Nunca se deben seleccionar los datos a partir del punto más alto pues no podemos estar seguros si el proceso de absorción ha finalizado o no.

A continuación, hay que aplicar el **método de residuales** explicado en clase, para poder estimar el valor de K_a mediante un método indirecto. Para ello es aconsejable que lo hagáis primero de forma gráfica y posteriormente de manera analítica (con la calculadora), para entenderlo mejor.

Gráficamente:

1. Representar los datos cantidad frente a tiempo en escala semilogarítmica
2. Trazar con una regla la línea recta de la fase terminal de la curva en la que solo existen procesos de eliminación (línea naranja) y estimar gráficamente la semivida de eliminación: anotar cuanto tiempo transcurre desde que una determinada cantidad de fármaco se reduce a la mitad, el cual corresponde con la semivida de eliminación ($t_{1/2}$). Se obtiene K_e dividiendo $\ln 2$ o 0,693 entre $t_{1/2}$
3. Extrapolar la línea de eliminación o naranja hasta tiempo cero
4. Restar a las cantidades de la línea de eliminación extrapolada, las cantidades observadas en el compartimento 2 a cada uno de los tiempos en los que existe absorción.
5. Representar gráficamente los valores obtenidos de la resta realizada frente a sus correspondientes tiempos y se obtiene una línea recta (la línea roja) de cuya pendiente se puede estimar la semivida de absorción: anotar cuanto tiempo transcurre desde que una determinada cantidad de fármaco se reduce a la mitad, el cual corresponde con la semivida de absorción ($t_{1/2a}$). Se obtiene K_a dividiendo $\ln 2$ ó 0,693 entre $t_{1/2a}$

Analítica o matemáticamente:

Para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos por el método de residuales es aconsejable que rellenes la tabla del manual de prácticas de la página 8 (práctica 1) y realizar los siguientes pasos:

1. Los datos de Ln Q vs. tiempo en la fase de postabsorción se ajustan por regresión lineal, obtenéis el valor de Ke a partir de la pendiente de la recta. Como hemos dicho anteriormente, empezar por el último punto y utilizar 3 ó 4 que sean exclusivamente de la fase de eliminación.
2. Obtenéis a partir de la recta ajustada en el paso anterior, los valores correspondientes a LnQ extrapolados a los tiempos de muestreo iniciales en los que coexisten procesos de absorción y eliminación (fase ascendente de la curva).
3. Transformáis los LnQ extrapolados obtenidos en el paso anterior a cantidad calculando sus correspondientes antilogaritmos.
4. A los datos de cantidad extrapolados obtenidos en el paso anterior, le restáis los valores observados de cantidades de fármaco en el compartimento 2 a los tiempos en los que ha sido calculado cada cantidad de fármaco para obtener los valores conocidos como “residuales” que dan nombre al método.
5. Transformar los datos de cantidad residual obtenidos en el paso anterior a sus correspondientes logaritmos neperianos. Ajustar por regresión lineal estos Ln de la diferencia de la concentración extrapolada y observada frente a sus correspondientes tiempos. La pendiente de la línea ajustada nos proporciona el valor de la Ka obtenida por un método indirecto como es el de residuales.

Cinética en el compartimento inferior (3): orina

Con los pares de datos de cantidad de fármaco en el compartimento 3 (orina) y tiempo se construye la gráfica de cantidades acumuladas de fármaco y de la cantidad de fármaco que queda por excretar ($U^\infty - U_t$) frente al tiempo, para obtener los datos de ésta última se resta a la cantidad total excretada en orina (100 mg), las cantidades excretadas a cada tiempo. La ecuación que refleja la evolución de las cantidades de fármaco que quedan por excretar es la siguiente:

$$(U^\infty - U) = U^\infty \cdot e^{-k_e \cdot t}$$

Su representación gráfica en escala semilogarítmica será una línea recta, de donde se puede calcular la semivida de eliminación y a partir de esta la Ke de forma análoga a los cálculos anteriores. La transformación logarítmica de la cantidad remanente ($U^\infty - U_t$) linealiza esta función exponencial, y permite el ajuste de los datos que se han obtenido en la práctica por regresión lineal con mínimos cuadrados. Los resultados de la pendiente y la ordenada en el origen permiten calcular la Ke y la constante de excreción renal (Kr) que en este caso debe coincidir con Ke ya que todo el fármaco se excreta a través del riñón.

$$(U^\infty - U) = U^\infty \cdot e^{-K_e \cdot t} \Rightarrow \ln(U^\infty - U) = \ln U^\infty - K_e \cdot t$$

$$U^\infty = F \cdot \text{Dosis} \cdot f_r$$

siendo f_r la fracción de fármaco excretada por orina, la cual es igual a la relación K_r/K_e .

Como en esta simulación todo el fármaco se excreta por la orina, $K_e = K_r$ y como la biodisponibilidad F es completa, la fracción de dosis excretada, f_r , es igual a la unidad y la cantidad total excretada por la orina es igual a la dosis.

Recordar que debéis preparar los datos de esta práctica junto con los de todas las demás en un Excel para la realización de la práctica 5 el último día de las prácticas siguiendo las instrucciones que se muestran en la pantalla.

Para obtener los parámetros farmacocinéticos a partir de los datos generados en los 3 compartimentos evaluados, seguir las instrucciones del apartado “análisis de datos” de la práctica 1 del manual de prácticas

y rellenar las tablas y las representaciones gráficas indicadas.

Con los datos correspondientes al compartimento central (tiempo y cantidad) debe construirse una **hoja Excel** que se guardará en un *pendrive* u otro sistema de almacenamiento, ya que deberá estar disponible para realizar el ajuste de los mismos mediante regresión no lineal (sin transformar los datos), actividad que se realizará en la **práctica nº 5**.

En la hoja Excel incluir únicamente 2 columnas con los tiempos y cantidades obtenidas en el compartimento 2. Para ello se utilizará el programa informático WinNonlin® v. 8.4; los resultados obtenidos con el ajuste por regresión no lineal deberán registrarse en la tabla que recoge para este compartimento 2 los parámetros obtenidos gráficamente y por regresión lineal, con objeto de comparar los resultados obtenidos por los tres métodos empleados

Al final de las prácticas, el manual completado se entregará escaneado en la tarea habilitada a tal efecto en studium.

ANEXO II - GUIÓN PRACTICA 2

SIMULACIÓN DE LA CINÉTICA DE UN FÁRMACO ADMINISTRADO EN RÉGIMEN DE DOSIS MÚLTIPLE POR VÍA ENDOVENOSA

OBJETIVO

El **objetivo** de esta práctica 2 es revisar y aplicar las ecuaciones que se han estudiado en el tema 8, las cuales reflejan la evolución de las concentraciones en sangre alcanzadas tras la instauración de un régimen posológico de dosis múltiples de un fármaco hipotético administrado por vía intravenosa tipo bolus y caracterizar los parámetros farmacocinéticos más relevantes:

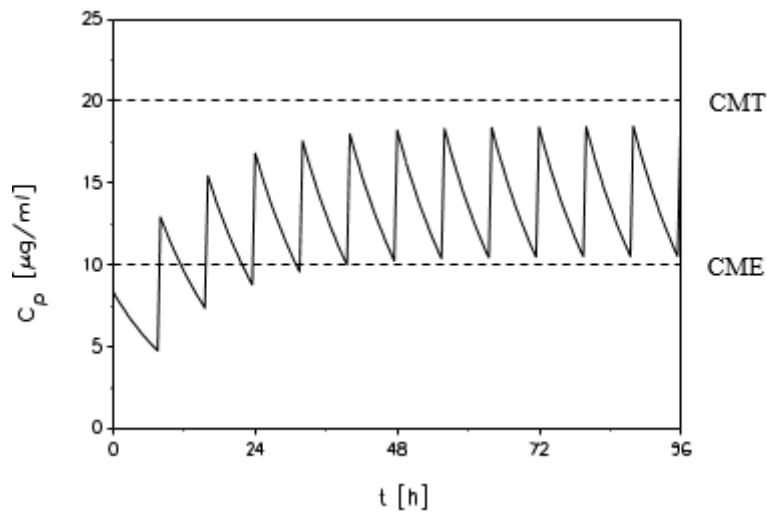
- El factor de acumulación (R)
- La concentración máxima (C_{max}^{ss}), en situación de equilibrio,
- La concentración mínima (C_{min}^{ss}) en situación de equilibrio,
- La fracción de equilibrio (fss) alcanzada para la última dosis administrada.

FUNDAMENTO

Generalmente, los tratamientos farmacológicos son crónicos o se administran durante periodos temporales más o menos largos, dependiendo de la patología a tratar y pretenden conseguir un efecto mantenido a lo largo del tiempo. Ello exige la administración del fármaco en un **régimen posológico** de dosis múltiples, caracterizado por la **magnitud de la dosis** que debe administrarse (dosis de mantenimiento, D_m) y su **frecuencia** de administración, es decir el intervalo posológico (τ). En consecuencia se está administrando el fármaco a una **velocidad constante** e igual a la dosis/intervalo, por ejemplo 100mg/8h o lo que es lo mismo 12,5 mg/h. La administración del fármaco en un régimen de dosis múltiples cuando el intervalo posológico utilizado es inferior a 5 veces la semivida de eliminación del fármaco, va a producir un incremento progresivo de sus concentraciones en el organismo, con la consiguiente acumulación. Tener en cuenta que si se utiliza un intervalo posológico superior a 5 semividas, da tiempo a que se elimine prácticamente la totalidad de cada una de las dosis administradas durante ese intervalo y, en consecuencia, no se produciría ninguna acumulación de manera que la evolución de las concentraciones plasmáticas se correspondería con la que presentasen una serie sucesiva de dosis únicas. (se puede incluir figura)

En esta práctica vamos a utilizar un intervalo posológico mucho menor que 5 semividas de eliminación del fármaco hipotético analizado y a considerar que el proceso de eliminación del fármaco sigue una cinética de primer orden. De acuerdo a este tipo de cinética, a medida que las concentraciones de fármaco aumentan como consecuencia de su acumulación al administrarse dosis sucesivas, la velocidad de eliminación, regida por la constante de velocidad de eliminación de orden uno, K_e , también se va a incrementar progresivamente, hasta que llega un momento en que la velocidad de eliminación se hace igual a la velocidad de administración (que se ha mantenido constante) y en ese momento consideramos que se ha alcanzado el estado de equilibrio. Una vez alcanzada esta situación, la evolución de las concentraciones frente al tiempo dentro de cada intervalo de dosificación se mantiene constante,

y éstas fluctúan entre un valor máximo ($C_{ss_{max}}$) y un valor mínimo ($C_{ss_{min}}$).



En esta práctica vamos a administrar 4 dosis consecutivas de un fármaco a intervalos de 30 minutos. Como fármaco hipotético utilizamos el colorante tartracina que permite realizar de manera sencilla el seguimiento de sus concentraciones por espectrometría en el espectro visible. Obviamente en clínica los intervalos posológicos nunca presentan estos valores tan bajos ya que habitualmente son de 8, 12 o 24 h. Pero para poder realizar en un espacio de tiempo adaptado a la duración de la práctica hemos seleccionado 30 minutos como intervalo.

El **Dispositivo** utilizado para realizar la práctica está formado por un sencillo sistema hidráulico que permite simular la administración del fármaco por vía intravenosa tipo bolus, asumiendo un modelo monocompartmental.

El dispositivo incluye un recipiente (matraz quitasato) que representa el compartimento corporal en el que directamente vamos a administrar la dosis y en el que el fármaco tiene capacidad de distribuirse. Este compartimento está conectado con un catéter a un depósito lleno de agua situado en la parte superior del sistema el cual, a través de una llave de paso, permite la caída de agua a una velocidad de goteo regulada y constante durante todo el proceso.

AQUÍ HAY QUE MOSTRAR EL DISPOSITIVO PARA QUE LO PUEDAN ENTENDER.

El quitasato es un matraz de base ancha y cuello estrecho que presenta un vástago lateral y cuando el volumen de agua vertido desde el depósito superior sobrepasa el nivel del vástago el exceso de agua se eliminará hacia un recipiente externo, situado sobre la mesa. Cuando el sistema está estabilizado, la velocidad de entrada de agua que va cayendo por efecto de la gravedad desde el depósito superior y la de salida del agua desde el quitasato es la misma y con ello se trata de simular la circulación del torrente sanguíneo de los sistemas "in vivo".

Una vez comprobada la estabilidad del sistema se incluye en el quitasato un agitador magnético para conseguir que una vez administrada la dosis de tartracina, ésta se distribuya de manera instantánea y homogénea. En ese momento se puede iniciar la experiencia y proceder a la administración de las 4 dosis consecutivas a intervalos de 30 minutos.

Tras la administración en bolus de la primera dosis consistente en 2 mL de una disolución de tartracina al 1%, se observará una coloración amarilla, cuya intensidad va disminuyendo con el

tiempo, como consecuencia de la eliminación de esta disolución intensamente coloreada, a través del orificio de salida del quitasato que representa el compartimento corporal. El volumen eliminado se va reponiendo constantemente con el agua procedente del depósito de agua superior, lo que da lugar a ese descenso en la intensidad del color que puede observarse a simple vista y que es consecuencia del proceso cinético de eliminación de primer orden ya que la cantidad de tartracina eliminada es directamente proporcional a la intensidad del color de la disolución presente en el quitasato. Es decir, a mayor intensidad de la disolución del compartimento corporal mayor es la velocidad de eliminación de la tartracina (las gotas que salen por el orificio presentan una concentración alta relacionada con la intensidad del color de la disolución) y por el contrario a medida que la disolución está más diluida la velocidad de eliminación es menor. En definitiva, se cumple que el proceso se ajusta a una cinética de orden uno: a mayor concentración de fármaco en el compartimento central mayor es la velocidad de eliminación y viceversa.

Una vez administrada la primera dosis de tartracina se toman muestras de 3 mL con ayuda de una pipeta del interior del compartimento corporal (quitasato) a los 2, 10, 20 y 29 minutos de la administración como se indica en la Tabla 1 y este proceso se repite con otras 3 dosis sucesivas administradas a intervalos regulares de 30 minutos, es decir a los 30, 60 y 90 minutos del inicio de la experiencia, respectivamente. La concentración de tartracina en las muestras se determina colorimétricamente a 425 nm, siendo su extinción específica 390.

Con los datos de concentración-tiempo obtenidos durante los 30 minutos que transcurren desde la administración de la primera dosis se construye en escala semilogarítmica una gráfica que representa la evolución de las concentraciones de tartracina tras esta primera dosis administrada. De forma gráfica es posible estimar los parámetros: K_e y V_d . Analíticamente la ecuación que refleja la evolución de las concentraciones en esta primera dosis será:

$$C = \frac{Dosis}{V_d} \cdot e^{-K_e \cdot t} \Rightarrow \ln C = \ln \frac{Dosis}{V_d} - K_e \cdot t$$

Por regresión lineal de la ecuación linearizada por transformación logarítmica de las concentraciones de tartracina se estiman de forma más precisa los parámetros farmacocinéticos K_e , V_d . Con estos valores y el intervalo de dosificación es posible conocer las concentraciones que previsiblemente se alcanzarán tras la administración de la segunda, tercera y cuarta dosis. Las ecuaciones para estimar las concentraciones máxima y mínima tras la administración una dosis n-ésima serían las siguientes:

$$C_{max}^n = C_0 \frac{1 - e^{-n \cdot K_e \cdot \tau}}{1 - e^{-K_e \cdot \tau}}$$

$$C_{min}^n = C_0 \frac{1 - e^{-n \cdot K_e \cdot \tau}}{1 - e^{-K_e \cdot \tau}} \cdot e^{-K_e \cdot \tau}$$

También es posible estimar las concentraciones una vez que se alcance la situación de equilibrio, es decir cuando la velocidad de eliminación se haga igual a la de administración. Para estimar las concentraciones máxima y mínima en estado de equilibrio hay que aplicar las siguientes ecuaciones:

$$C_{\max}^{ss} = C_0 \frac{1}{1 - e^{-K_e \tau}}$$

$$C_{\min}^{ss} = C_0 \frac{e^{-K_e \tau}}{1 - e^{-K_e \tau}}$$

Dónde C_0 es la concentración a tiempo 0 tras la administración de la primera dosis que equivale al cociente D/V_d (D : Dosis, V_d : volumen de distribución); τ es el intervalo posológico y K_e , la constante de eliminación.

En un régimen de dosis múltiples es esencial estimar el factor de acumulación del régimen instaurado, el cual también puede estimarse con los parámetros estimados, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$R = \frac{1}{1 - e^{-K_e \tau}}$$

Este factor de acumulación del fármaco representa el cociente entre la concentración alcanzada en el equilibrio y la concentración obtenida tras la primera dosis, al mismo tiempo dentro del intervalo posológico, es decir (C_{tss}/C_{t1}). Es por tanto un índice que representa la acumulación del fármaco en un régimen de dosis múltiples y su magnitud está condicionada por la constante de eliminación del fármaco y el intervalo posológico utilizado.

En un régimen de dosis múltiple interesa conocer el tiempo necesario para alcanzar una determinada fracción del estado de equilibrio ($t_{ss} = n \cdot \tau$) o bien el número de dosis (n) que deben administrarse para alcanzarlo. Ambos datos pueden obtenerse a partir de la siguiente relación:

$$f_{ss} = \frac{C_{\min}^n}{C_{\min}^{ss}} = \frac{C_{\max}^n}{C_{\max}^{ss}} = 1 - e^{-n K_e \tau}$$

Siendo f_{ss} la fracción o porcentaje del estado de equilibrio que se alcanza y C_{\min}^n y C_{\max}^n los niveles mínimo y máximo, respectivamente, obtenidos tras la administración de una dosis cualquiera (n).

En definitiva, con los datos obtenidos en la 1ª dosis se pueden determinar los siguientes parámetros:

- Ke gráfica y matemáticamente
- El volumen de distribución (V_d)
- El factor de acumulación (R)
- El tiempo necesario para alcanzar el 95% del estado de equilibrio

Los resultados de las absorbancias obtenidos en cada una de las muestras analizadas por espectrometría (se proporcionarán al final del video, ya que a cada grupo se le darán resultados diferentes):

1ª dosis, tiempo de administración: 0 min.

T post dosis (min)	Absorbancia _{425nm}	Concentración (mg/L)	LnC
2	1.52		
10	1.25		
20	0.97		
29	0.82		

2ª dosis, tiempo de administración 30 min

T post dosis (min)	Absorbancia _{425nm}	Concentración (mg/L)	LnC
2	2.27		
10	1.88		
20	1.45		
29	1.22		

3ª dosis; tiempo de administración 60 min

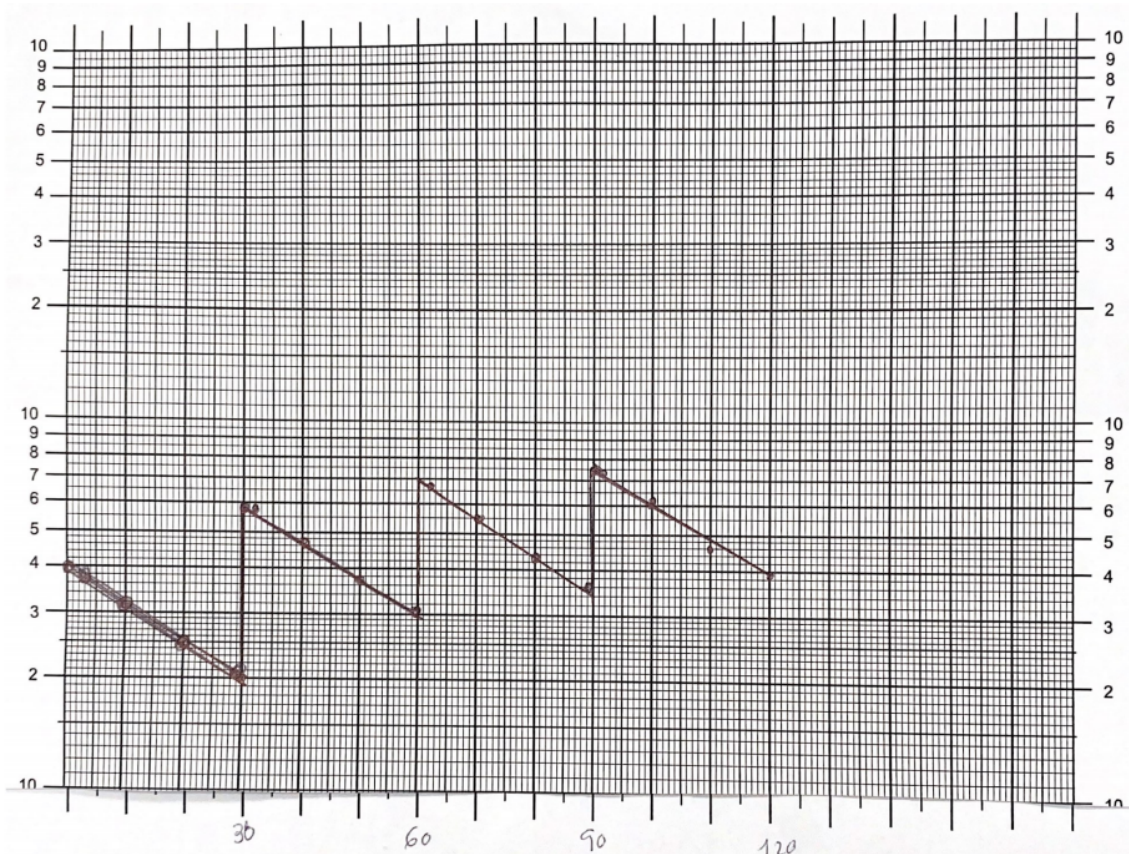
T post dosis (min)	Absorbancia _{425nm}	Concentración (mg/L)	LnC
2	2.64		
10	2.17		
20	1.70		
29	1.42		

4ª dosis; tiempo de administración 90 min

T post dosis (min)	Absorbancia $_{425nm}$	Concentración (mg/L)	LnC
2	2.84		
10	2.33		
20	1.82		
29	1.53		

Tenéis que determinar las concentraciones de tartracina a partir de esas absorbancias y representarlas gráficamente en escala semilogarítmica frente al tiempo para las 4 dosis administradas.

AQUÍ SE PUEDE MOSTRAR UNA REPRESENTACION GRAFICA



Esta representación pone de manifiesto el paralelismo de las fases descendentes en las 4 dosis las cuales están condicionadas por la K_e , que obviamente es la misma en todas las dosis administradas. Los datos también se ajustarán por regresión lineal, previa transformación logarítmica, con la calculadora de mano, utilizando por separado los datos de cada una de las dosis administradas. El valor de la pendiente, es decir de K_e , debe ser similar para las 4 dosis ajustadas por separado

Los datos también se ajustaran por regresión no lineal, con esta metodología se ajustan conjuntamente **todos los datos** generados para las 4 dosis analizadas (16) para ello deben incluirse en una hoja Excel que se guardará en un *pendrive* u otro sistema de almacenamiento, ya que deberá estar disponible para realizar el ajuste de los mismos mediante regresión no lineal (sin transformar los datos), actividad que se realizará en la **práctica nº 5.**

Incluir en la hoja Excel únicamente 2 columnas una para el tiempo real y otra para la concentración observada. Para ello se utilizará el programa informático WinNonlin® (Phoenix 64); los resultados deberán registrarse en la tabla de resultados incluida en el manual de prácticas, con objeto de comparar los resultados obtenidos por los tres métodos empleados (gráfico, regresión lineal y regresión no lineal).

ANEXO III - GUIÓN PRACTICA 3

SIMULACIÓN DE LA CINÉTICA DE UN FÁRMACO TRAS LA ADMINISTRACIÓN POR PERFUSIÓN ENDOVENOSA

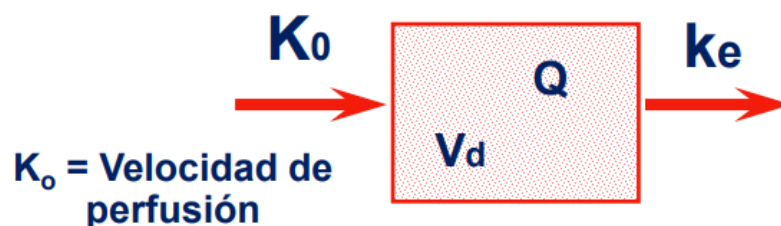
OBJETIVO

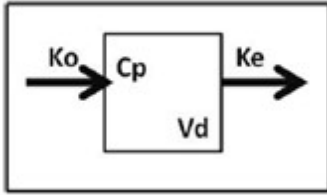
Analizar la evolución de la concentración de fármaco tras su administración por perfusión endovenosa sabiendo que se ajusta a un modelo monocompartimental, utilizando un dispositivo de simulación que incluye una bomba de perfusión. Y los parámetros farmacocinéticos del fármaco se estimarán a partir de los datos generados en la práctica.

FUNDAMENTO

La perfusión o infusión intravenosa de un fármaco consiste en su incorporación a la circulación general o sistémica a velocidad constante, utilizando una bomba de infusión o un gotero con una válvula regulable, que permite administrar a velocidad constante (masa/tiempo por ejemplo mg/h o mg/min) un volumen de la disolución del fármaco de concentración conocida. Es un modo de administración muy usado en el medio hospitalario porque asegura concentraciones constantes una vez alcanzado el equilibrio, es decir cuando la velocidad de administración se hace igual a la velocidad de eliminación, y por tanto no existen fluctuaciones en los mismos. En ocasiones se utilizan infusiones intermitentes, en cuyo caso se repiten las infusiones cada determinado intervalo de tiempo o intervalo posológico. En esta situación no se alcanza el equilibrio dentro del intervalo utilizado para la perfusión (T), pero se evitan las concentraciones iniciales elevadas que produce la administración endovenosa tipo bolus y que, para algunos fármacos, pueden provocar efectos tóxicos.

La ecuación diferencial que expresa la variación de la cantidad de fármaco en el organismo en función del tiempo, para una infusión a velocidad constante (K_0) es:





$$\frac{dQ}{dt} = K_o - K_e \cdot Q$$

La integración de esta ecuación diferencial establecida a partir del balance de masas permite obtener la siguiente forma integrada:

$$Q = \frac{K_o}{K_e} (1 - e^{-k_e \cdot t}) \Rightarrow C = \frac{K_o}{V_d \cdot K_e} (1 - e^{-k_e \cdot t})$$

Pero esta ecuación sólo es válida mientras dura la perfusión. Si la perfusión se mantiene durante un intervalo largo de tiempo, se llega a alcanzar la concentración de equilibrio, la cual se mantiene constante mientras dura la perfusión. De hecho, de esta ecuación se puede deducir el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio en una perfusión constante, es decir cuando la velocidad de entrada y eliminación del fármaco se igualan, que a efectos prácticos se considera cuando se alcanza el 95% del equilibrio:

$$C = \frac{K_o}{V_d \cdot K_e} (1 - e^{-K_e \cdot t}) \Rightarrow 0.95 C^{ss} = C^{ss} (1 - e^{-K_e \cdot t_{ss}^{95\%}}) \Rightarrow t_{ss}^{95\%} = \frac{\ln 0.05}{-K_e} \Rightarrow t_{ss}^{95\%} = 4.3 \cdot t_{1/2}$$

En base a esta ecuación se deduce que el **tiempo necesario para alcanzar este equilibrio** depende exclusivamente de la K_e o $t_{1/2}$, y a efectos prácticos se alcanza cuando transcurren aproximadamente 5 semividas de eliminación ($5 \cdot t_{1/2}$). En esta situación la ecuación que refleja la evolución de las concentraciones durante la perfusión queda simplificada en la siguiente:

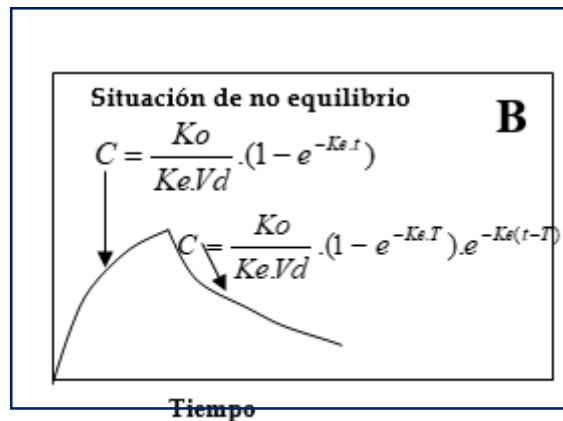
$$C^{ss} = \frac{K_o}{V_d \cdot K_e} \Rightarrow C^{ss} = \frac{K_o}{Cl}$$

Una vez finalizada la perfusión, independientemente de si se ha alcanzado o no la situación de equilibrio, las concentraciones de fármaco disminuyen exponencialmente, siempre

dependiendo del valor de K_e , ya que en esta fase solo existe eliminación. Si la infusión finaliza antes de alcanzarse el equilibrio, la ecuación que refleja la evolución de las concentraciones en la post-perfusión será la siguiente:

$$C = \frac{K_0}{V_d \cdot K_e} (1 - e^{-K_e \cdot T}) \cdot e^{-K_e \cdot (t-T)} \Rightarrow C = \frac{K_0}{C_l} (1 - e^{-K_e \cdot T}) \cdot e^{-K_e \cdot (t-T)}$$

La concentración al final del periodo de perfusión corresponde a la concentración máxima alcanzada durante el tratamiento.



La semivida de eliminación se estima gráficamente a partir de la pendiente obtenida en la fase postperfusión, es decir una vez finalizada la perfusión, de modo similar a la administración I.V. tipo bolus. Como conocemos la concentración al final de la perfusión, la K_e previamente estimada gráficamente, la velocidad de infusión (K_0) y el tiempo de la infusión, (T), se puede estimar el volumen de distribución, despejando de la ecuación:

$$C_{\max} = \frac{K_0}{V_d \cdot K_e} (1 - e^{-K_e \cdot T}) \Rightarrow V_d = \frac{K_0}{C_{\max} \cdot K_e} (1 - e^{-K_e \cdot T})$$

Los parámetros farmacocinéticos, K_e y V_d , también deben ser estimados analíticamente utilizando las ecuaciones anteriormente expuestas que reflejan la evolución de las concentraciones plasmáticas durante y después de finalizar la perfusión. Para poder aplicar la regresión lineal hay que linearizar la ecuación exponencial integrada, tomando logaritmos neperianos:

$$\ln C = \ln \left[\frac{K_0}{V_d \cdot K_e} (1 - e^{-K_e \cdot T}) \right] - K_e \cdot (t - T)$$

Únicamente podremos utilizar los datos correspondientes a la fase de post perfusión para estimar K_e a partir de la pendiente. La ordenada en el origen de la ecuación de la recta generada en la regresión lineal corresponderá al logaritmo neperiano de la concentración observada al

final de la perfusión (C_{max}). Ten en cuenta que para realizar el ajuste de los datos por regresión lineal con los datos de postperfusión debes incluir en los datos correspondientes al tiempo, el real, restándole el tiempo de perfusión. El V_d lo estimas también a partir del valor de C_{max} , en la ecuación comentada anteriormente.

Cuando se realice la estimación de K_e y V_d por regresión no lineal en el ajuste que se llevara a cabo en la práctica 5, se podrán utilizar simultáneamente todos los datos generados durante y después de finalizar la perfusión

PROCEDIMIENTO:

Dispositivo utilizado

El dispositivo para la simulación está constituido por un matraz quitasato que representa el compartimento corporal en el que el fármaco se distribuye de forma instantánea y homogénea debido a la incorporación en el mismo de un agitador magnético que se mantiene en movimiento giratorio gracias a un campo magnético generado en la plataforma sobre la que se sitúa el matraz. El quitasato recibe una entrada de agua, que permite la simulación con un volumen constante de fluido, goteo a velocidad constante, desde un recipiente situado en la parte superior y otra entrada de fluido (agua o disolución del fármaco) a través de una bomba de perfusión. El quitasato tiene además una salida al exterior a través del vástago lateral, que simula la eliminación del fármaco, con un flujo constante que será igual a la suma de los 2 flujos de entrada (bomba de perfusión y depósito de la parte superior). Una vez estabilizado el sistema y se garantice por tanto que los flujos de entrada y salida son constantes e iguales para simular adecuadamente el comportamiento del sistema circulatorio, se procede a iniciar la experiencia.

Se ha seleccionado como fármaco el colorante tartracina, sustancia inocua y fácil de cuantificar por espectrometría. A partir de una disolución madre al 2,5%, se calcula el volumen a disolver de fármaco en una bolsa de 500 ml de suero para la administración de una disolución de tartracina al 0,01%. Esta disolución preparada se administra a una velocidad constante (K_0), durante 30 minutos utilizando para ello una bomba de perfusión continua con un gotero similar a los utilizados en la práctica clínica, que garanticen la incorporación del fármaco de acuerdo a una cinética de orden cero. Para asegurar la correcta evolución de la simulación se debe comprobar la entrada constante de agua desde el otro recipiente, así como la salida a través del vástago.

Se toman muestras de aproximadamente 3 mL del compartimento central, es decir del quitasato, a los tiempos establecidos en la tabla, para su posterior determinación analítica.

Al finalizar el tiempo de perfusión, se sustituye la disolución del fármaco que accede desde la bomba de perfusión por agua destilada, con objeto de mantener el mismo flujo durante toda la experiencia. Y se continua la toma de muestras durante la fase de post-perfusión. En función de la velocidad de la bomba administraremos diferente volumen de fármaco. Para conocer el volumen exacto que ha sido administrado se resta a los 500 mL iniciales el volumen

de la disolución de tartracina restante. El producto del volumen gastado por la concentración nos permite obtener la dosis o cantidad de fármaco (tartracina) administrado, la cual dividida por la duración de la perfusión nos proporciona la velocidad de infusión que denotamos con el símbolo de K_0 .

DETERMINACIÓN ANALÍTICA

La concentración de tartracina en las muestras se determina colorimétricamente a 425 nm, sabiendo que su extinción específica es de 390. Para la medición primeramente se debe hacer el blanco con agua destilada. Y como solo se utiliza una cubeta para todas las mediciones, se debe limpiar bien entre cada una de las muestras.

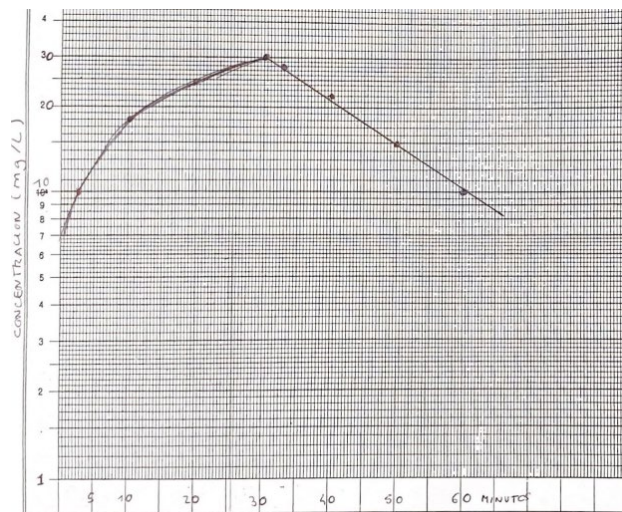
PRESENTACIÓN DE RESULTADOS:

Como la disolución es al 0.01% si gastamos 250 mL, la dosis administrada es de 0,025 g es decir 25 mg, y K_0 sería igual a 50mg/h o si expresan el tiempo en minutos 0.83 mg/min (esto es para que lo hagan ellos no hay que decirlo en el video).

Los resultados de la cantidad de volumen administrado y las absorbancias de cada una de las muestras serán dados por el profesor a través de la plataforma.

ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO

Una vez calculados, a partir de las absorbancias observadas, los valores de concentración de tartracina en cada una de las muestras obtenidas a los tiempos especificados en la tabla, se representan gráficamente en escala semilogarítmica, frente al tiempo y se estiman gráfica y matemáticamente los parámetros farmacocinéticos.



Para ello, se representan gráficamente en escala semilogarítmica, las concentraciones frente al tiempo.

Por regresión lineal solo se podrá ajustar los datos de concentración correspondientes a la fase de postperfusión donde solo existen procesos de eliminación ya que durante la fase de

perfusión existen simultáneamente 2 procesos cinéticos el de entrada de la disolución perfundida de orden cero y la eliminación de orden uno y la regresión lineal no permite ajustar esta zona de la curva donde coexisten 2 procesos cinéticos.

Una vez que tenemos los resultados estimados a partir de la representación gráfica, se deben comparar con los obtenidos matemáticamente.

Y con esta información responder a las siguientes cuestiones:

- a) Cuál es la constante de velocidad de eliminación (K_e) a partir de la fase terminal de la curva es decir una vez finalizada la perfusión
- b) Cuál es el aclaramiento plasmático (CL_p) obtenido a partir del valor obtenido para la máxima concentración alcanzada (C_{max}) justo al final de la perfusión
- a) Cuál es el valor del volumen de distribución (V_d)
- b) Cuál es el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio (t^{ss}) e indica si se ha alcanzado la situación de equilibrio en los 30 minutos que ha durado la perfusión.
- c) Cuál sería la concentración en situación de equilibrio (C^{ss}) que se hubiera alcanzado si la duración de la perfusión hubiera sido superior a 5 veces la semivida de eliminación del fármaco

Por último, guarda los resultados obtenidos de concentración tiempo de las fases de perfusión y postperfusión, para ajustarlos conjuntamente por regresión no lineal utilizando el programa WinNonlin® (Phoenix 64) en la práctica nº 5. Una ventaja importante de este tipo de estimación es poder usar toda la información observada en la práctica, incluida aquella que esta generada por distintos procesos cinéticos simultáneos, como es la fase de perfusión (entrada de orden cero y salida de orden uno). Para ello utiliza una hoja del **archivo Excel** en el que debes incluir los datos obtenidos en las otras 3 prácticas. En esta hoja se debe incluir solo 2 columnas con el **tiempo** y las **concentraciones** de fármaco obtenidas en la práctica

t (min)	C (mg/l)
5	4.2
10	8.9
15	12.77
20	16.67
25	19.51
30	21.41
35	20.3
40	17.74
45	14.59
50	12.64
55	10.97
60	9.46

Compara los parámetros obtenidos con esta metodología con los obtenidos anteriormente matemática y gráficamente y rellena la tabla de tu cuaderno con todos los resultados.

Al finalizar las prácticas, en el documento de resultados de las prácticas escaneado se deberá entregar en la tarea habilitada a tal efecto en studium.

ANEXO IV - GUIÓN PRACTICA 4

OBJETIVO:

Estimación de los parámetros farmacocinéticos del nitrito sódico a partir de los datos de excreción urinaria obtenidos tras la administración de una única dosis de un fármaco administrado por vía intravenosa tipo bolus cuya eliminación es mayoritariamente por vía renal.

FUNDAMENTO

Las curvas de excreción urinaria permiten seguir el tránsito del fármaco en el organismo, bien por medida de éste o de sus metabolitos en la orina y constituyen la base para la estimación de importantes parámetros farmacocinéticos, fundamentalmente los implicados más directamente en la excreción renal del fármaco.

La obtención de datos se hace mediante una técnica no invasiva y muy asequible en la práctica ya que la toma de muestra es fácil y no crea molestias al individuo, pudiéndose recoger con relativa frecuencia. Por otra parte, la determinación analítica suele ser más sencilla que en plasma, al ser un fluido biológico de composición menos compleja.

Con objeto de que los datos de excreción urinaria obtenidos tras la administración de una única dosis sean válidos para la caracterización cinética del fármaco, es preciso tener en cuenta que:

1. Una fracción significativa del fármaco inalterado debe excretarse por orina (>70%).
2. La técnica analítica debe ser específica del fármaco, sin que interfieran los metabolitos.
3. Se requiere una alta frecuencia de muestreo para obtener curvas de excreción urinaria adecuadas para caracterizar los procesos cinéticos de eliminación de forma correcta.
4. Las muestras de orina deben ser recogidas hasta que el fármaco sea casi totalmente excretado. En la práctica se requiere aproximadamente un tiempo igual a 7 veces su semivida de eliminación para asegurar que el 99% de la dosis administrada se haya excretado.
5. Los individuos deben ser instruidos cuidadosamente sobre la necesidad de obtener las muestras de orina tras un vaciado completo de la vejiga.

Los nitritos orgánicos e inorgánicos son utilizados terapéuticamente como antihipertensivos y antianginosos (nitrito de amilo), así como antídoto para el envenenamiento con cianuro. El Nitrito Sódico es también utilizado comercialmente para favorecer el curado de la carne (embutidos). Aunque el ion nitrito desaparece rápidamente del plasma, las concentraciones urinarias de nitrito pueden utilizarse para evaluar la exposición del organismo a este agente.

PROCEDIMIENTO:

Se pone a disposición del alumno unas muestras de orina obtenidas en un individuo de 40 años y 70 kg, que recibió una dosis por vía endovenosa tipo bolus de **300 mg**. Los tiempos a los cuáles fueron recogidos las muestras de orina junto con el volumen de orina se recogen en la siguiente tabla:

Muestra (nº)	1	2	3	4	5	6
Tiempo (h)	0,25	0,50	1,00	2,00	4,00	6,00
Volumen de micción (ml)	160	175	285	333	470	230

En una gradilla se recogen 6 tubos de ensayo con alícuotas de cada una de las muestras recogidas con el fin de que el alumno determine la concentración en cada una de ellas. Para ello se debe construir previamente una recta patrón a partir de cuatro muestras de concentración conocida (200, 150, 100 y 50 mg/L), preparándose 5 mL de cada una de ellas por diluciones sucesivas con orina partiendo de una disolución madre de concentración conocida (1 mg/mL de nitrito sódico).

La valoración de los nitritos en las 4 disoluciones patrón, un blanco de orina y las 6 muestras proporcionadas (11 tubos en total) se realiza de forma simultánea, operando, en la campana de extracción, del siguiente modo:

1. Transferir 1 mL de la disolución a valorar a un matraz de 50 mL.
2. Añadir 2 mL de reactivo de Zambelli.
3. Mezclar y dejar en reposo 10 minutos.
4. Añadir 5 mL de hidróxido amónico concentrado, enrasar a 50 mL con agua destilada. Mezclar y dejar reposar 20 min.
5. Leer en el espectrómetro a 425 nm, utilizando para ajustar el cero de absorbancia un blanco preparado igual que las disoluciones anteriores, pero empleando orina sin nitrito sódico.

Para construir la recta de calibrado se representa gráficamente, en escala lineal, las densidades ópticas (eje de abscisas) obtenidas para cada una de las disoluciones patrón frente a la concentración de las mismas (eje de ordenadas). Esta representación permite observar la correlación entre ambas variables, que de acuerdo a la ley de Lambert –Beer debe ser en ese margen de concentraciones de tipo lineal.

Para establecer la relación entre la densidad óptica (variable independiente: X) y la concentración de nitrito (variable dependiente: Y) se ajustan los datos por regresión lineal con mínimos cuadrados. Se anotan el coeficiente de correlación (nos da idea de la bondad del ajuste), la ordenada en el origen (0,0) y la pendiente de la línea recta generada. Se obtiene por tanto la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración} = 0,0 - \text{pendiente} * \text{Densidad } _ \text{óptica}$$

Sustituyendo en esta ecuación los valores de densidad óptica obtenidos para las 6 muestras se calcula la concentración (mg/L) de nitritos en cada una de ellas. Los valores de estas concentraciones de las muestras deben multiplicarse por el volumen de orina (expresado en litros) obtenido en cada uno de los 6 muestreos, y así conocer exactamente la cantidad de nitritos excretados en cada uno de los intervalos existentes entre las muestras.

ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO: Curvas directas de velocidad

La velocidad de excreción urinaria del fármaco (dU/dt) no puede ser determinada en un instante dado. En la práctica, la orina se recoge a intervalos determinados de tiempo y el fármaco se analiza en una alícuota del volumen recogido, aproximándose la velocidad de excreción urinaria para cada intervalo de tiempo mediante la siguiente expresión:

$$\frac{dU}{dt} \approx \frac{\text{Cantidad de fármaco en orina}}{\text{Intervalo de recogida}} = \frac{\Delta U}{\Delta t}$$

En el manual de prácticas tenéis recogidas las expresiones a partir de las cuales se llega a establecer la ecuación final que relaciona la velocidad de excreción urinaria con los parámetros farmacocinéticos constante de velocidad de eliminación, (K_e) y constante de velocidad de excreción urinaria (K_r), la cual se presenta a continuación en su forma exponencial y linearizada por transformación logarítmica de la velocidad de excreción urinaria.

$$\frac{\Delta U}{\Delta t} = K_r Q_0 e^{-K_e t}$$

$$\text{Ln} \frac{\Delta U}{\Delta t} = \text{Ln} K_r Q_0 - K_e t$$

Linearizada a

Siendo Q_0 la cantidad inicial que corresponde a la dosis administrada.

En la ecuación linearizada se relaciona el logaritmo neperiano de la velocidad de excreción urinaria frente al tiempo medio. Es importante tener en cuenta que, como variable independiente, se debe incluir el tiempo correspondiente al **punto medio** del intervalo de recogida de la orina ya que se mide la velocidad de un intervalo de tiempo. De manera que si incluimos el tiempo al que se obtiene la muestra estamos infravalorando la velocidad real, y si introducimos el tiempo del inicio del intervalo estaríamos sobrevalorando la velocidad en ese intervalo ya que la velocidad desciende exponencialmente.

A partir de la ecuación de la recta, obtenida por regresión lineal, a la que se ajustan los datos calculamos los valores de los parámetros farmacocinéticos, ya que la pendiente se corresponde

con la K_e y la ordenada en el origen con el $\ln(K_r Q_0)$. Y una vez conocidas K_e y K_r , la constante de excreción extrarrenal o no renal (K_{nr}) puede obtenerse por la diferencia entre ellas, ya que:

$$K_e = K_r + K_{nr}$$

Conociendo estas 2 constantes de velocidad se calcula la cantidad total excretada en la orina mediante la siguiente ecuación

$$U_{\infty} = \frac{K_r Q_0}{K_e}$$

La fracción de dosis excretada en la orina es la relación entre la cantidad de fármaco total excretado en orina (U_{∞}) y la cantidad de fármaco administrado (Q_0), que al ser por vía endovenosa coincide con la dosis. Por tanto, a partir de la ecuación anterior:

$$\frac{U_{\infty}}{Q_0} = \frac{K_r}{K_e} = f_r$$

Seguir las instrucciones del manual para realizar todas las representaciones gráficas de la recta patrón y la curva de velocidad de excreción urinaria y realizar los cálculos de manera gráfica y matemática.

El ajuste de los datos de la curva de excreción urinaria de los nitritos se realizará también por regresión no lineal utilizando el programa WinNonlin. Para ello se introducen los datos de esta práctica en la hoja Excel de la práctica nº 5. Es importante que tengáis en cuenta como introducir los datos, en el manual tienes recogido un ejemplo. Se debe incluir solo 4 columnas, correspondientes a los tiempos de muestreo, las concentraciones de fármaco en la orina, el volumen de orina, y el tiempo del inicio de cada intervalo de recogida de muestra (ej. si la muestra se obtuvo a las 2 horas y el intervalo de recogida es de una hora, el tiempo inferior sería 1 h).

Durante el periodo de realización de la práctica a través de *Blackboard* tendrás a tu disposición un profesor para plantear las dudas que tengas.