

## FUNCIONES TERMODINÁMICAS RELATIVAS A LA TRANSFERENCIA DEL KETOPROFÉN DESDE EL AGUA HASTA ALGUNOS SISTEMAS ORGÁNICOS

Hernán R. Lozano y Fleming Martínez\*

Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490, Bogotá - Colombia

Recebido em 4/5/05; aceito em 16/9/05; publicado na web em 31/3/06

**THERMODYNAMIC FUNCTIONS RELATIVE TO THE TRANSFER OF KETOPROFEN FROM WATER TO SOME ORGANIC SYSTEMS.** The thermodynamics of molal partitioning of ketoprofen (KTP) was studied in cyclohexane/buffer (CH/W), octanol/buffer (ROH/W), and dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC), dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC), and egg lecithin (EGG/W) liposome systems. In all cases the partition coefficients ( $K_{o/w}^m$ ) were greater than unity; therefore the standard free energies of transfer were negative indicating affinity of KTP for organic media. The  $K_{o/w}^m$  values were approximately seventy-fold higher in the ROH/W system compared with the CH/W system. On the other hand, the  $K_{o/w}^m$  values were approximately ten or fifty-fold higher in the liposomes compared with the ROH/W system. In all cases, the standard enthalpies and entropies of transfer of KTP were positive indicating some degree of participation of the hydrophobic hydration on partitioning processes.

Keywords: ketoprofen; partition coefficient; liposomes.

### INTRODUCCIÓN

El ketoprofén (KTP) es un antiinflamatorio no esterooidal (AINE) con especial indicación en el tratamiento de eventos inflamatorios reumatoideos y en el manejo del dolor agudo. Este fármaco es un inhibidor de la ciclooxigenasa y de la lipooxigenasa, actuando en el primer caso principalmente sobre las isoformas 1 y 2, si bien posee cierto grado de selectividad por la ciclooxigenasa 2. Debido a esto, inhibe la síntesis de prostaglandinas por lo que provee un potente efecto analgésico y antiinflamatorio. Sin embargo, también se sabe que este fármaco posee otros efectos a nivel celular y tisular, tales como la inhibición de la bradiquinina y la estabilización de las membranas lisosomales, entre otros<sup>1</sup>.

De otro lado, en química medicinal es muy conocida la relación existente entre la actividad farmacológica y la lipofilia de los principios activos, representada esta última propiedad, por el coeficiente molal de reparto entre algunos solventes orgánicos (el octanol en particular) y medios acuosos. Estos estudios se remontan a los trabajos originales de Hansch *et al.*<sup>2</sup> durante los años 60. Sin embargo, en épocas más recientes se ha ampliado el número de solventes orgánicos disponibles para incluir otros con diferentes capacidades para interactuar por enlaces de hidrógeno con los fármacos. Así mismo se han utilizado las vesículas liposomales como simuladores del ambiente celular para estimar la absorción de compuestos y por lo tanto la potencia de éstos. Por lo tanto, el coeficiente de reparto es uno de los descriptores empíricos más utilizados en el planteamiento de correlaciones cuantitativas entre la actividad biológica y la estructura molecular de los fármacos, esto es, en estudios QSAR ("quantitative structure-activity relationships")<sup>3</sup>.

Con el fin de contribuir a la generación y sistematización de información fisicoquímica relativa a las propiedades de transferencia de fármacos, en este trabajo se presenta el comportamiento de reparto del KTP en función de la temperatura, entre los sistemas orgánicos: ciclohexano (CH), octanol (ROH), liposomas de dimiristoil fosfatidilcolina (DMPC), liposomas de dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) y finalmente, liposomas de lecitina de huevo

(EGG), frente al agua, a fuerza iónica  $\mu$  0,15 mol L<sup>-1</sup>. Además, con el fin de hacer una interpretación molecular en términos de interacciones soluto-solvente, a partir de los valores de reparto se realizó el estudio termodinámico de transferencia de este fármaco desde el agua hasta los diferentes medios orgánicos considerados.

### ASPECTOS TEÓRICOS

El coeficiente de reparto molal verdadero ( $K_{o/w}^m$ ) de un soluto entre una fase orgánica (líquida o liposomal) y una fase acuosa, cuando no se presentan fenómenos de asociación o disociación en ninguna de las fases, se calcula mediante la expresión

$$K_{o/w}^m = W_w \frac{C_1 - C_2}{C_2 W_o} \quad (1)$$

en la cual,  $W_w$  y  $W_o$  son las masas (g) de las fases acuosa y orgánica, respectivamente, y  $C_1$  y  $C_2$  son las concentraciones acuosas del soluto ( $\mu\text{g/mL}$ ), antes y después de la transferencia desde la fase acuosa hasta la orgánica, respectivamente<sup>4,5</sup>.

El cambio estándar de energía libre de transferencia del soluto desde la fase acuosa hasta la orgánica ( $\Delta G_{w \rightarrow o}^0$ ) se calcula mediante la expresión

$$\Delta G_{w \rightarrow o}^0 = -RT \ln K_{o/w}^m \quad (2)$$

en la cual,  $R$  es la constante universal de los gases (8,314 J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>) y  $T$  es la temperatura absoluta en Kelvin. El valor de  $\Delta G_{w \rightarrow o}^0$  es un indicativo de la espontaneidad del proceso de transferencia del soluto desde el agua hasta el medio orgánico.

De otra parte, el cambio entálpico para el proceso de transferencia se puede determinar directamente mediante calorimetría de titulación termométrica, o en el caso de sistemas líquido/líquido, indirectamente como la diferencia de los calores de disolución del soluto en cada una de las fases consideradas, obtenidos por calorimetría de solución<sup>6</sup>. Un método muy utilizado en el estudio de compuestos de interés farmacéutico, en particular de fármacos,

\*e-mail: fmartinezr@unal.edu.co

es el análisis de la variación del coeficiente de reparto en función de la temperatura, mediante el método de van't Hoff, el cual permite obtener el cambio entálpico estándar ( $\Delta H_{w \rightarrow o}^0$ ) a partir de la ecuación

$$\left( \frac{\partial \ln K_{o/w}^m}{\partial T^{-1}} \right)_P = - \frac{\Delta H_{w \rightarrow o}^0}{R} \quad (3)$$

con lo cual,  $\Delta H_{w \rightarrow o}^0$  se determina a partir de la pendiente de una gráfica lineal ponderada de  $\ln K_{o/w}^m$  en función de  $T^{-1}$ . Finalmente, el cambio entrópico estándar de transferencia ( $\Delta S_{w \rightarrow o}^0$ ) se calcula directamente a partir de los correspondientes valores de energía libre y entalpía, con base en la relación

$$\Delta S_{w \rightarrow o}^0 = \frac{\Delta H_{w \rightarrow o}^0 - \Delta G_{w \rightarrow o}^0}{T} \quad (4)$$

los términos  $\Delta H_{w \rightarrow o}^0$  y  $\Delta S_{w \rightarrow o}^0$  en este caso tienen el significado físico de los cambios estándar en la entalpía y la entropía, cuando una mol de soluto es transferida desde el agua hasta el medio orgánico, expresados en la escala de molalidad<sup>7</sup>.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reactivos

Ketoprofén USP<sup>8</sup>; octanol extrapuro y ciclohexano P.A. obtenidos de Merck; DMPC, DPPC y lecitina de huevo, obtenidos de Sigma Chemical Co.; cloroformo P.A., obtenido de Mallinckrodt; cloruro de potasio R.A., fosfatos mono y disódico, obtenidos de Merck; agua destilada, conductividad < 2  $\mu$ S.

### Determinación de los coeficientes de reparto solvente orgánico/agua

Se prepararon soluciones de KTP de concentración 150  $\mu$ g/mL en medios acuosos regulados (pH 7,4 y fuerza iónica,  $\mu$  0,15 mol L<sup>-1</sup>; valores fisiológicos<sup>9</sup>), saturados en un caso de octanol y en el otro de ciclohexano. Para el reparto octanol/agua, en frascos ámbar de 30 mL se adicionaron 20 mL de solución acuosa de fármaco y 10 mL de octanol saturado de agua, mientras que para el reparto ciclohexano/agua, se adicionaron 10 mL de solución acuosa de fármaco y 20 mL de ciclohexano saturado de agua. Todas las alícuotas fueron pesadas en balanza analítica digital (Mettler AE 160, sensibilidad  $\pm$  0,1 mg). Los frascos fueron adecuadamente tapados para evitar pérdidas por evaporación, agitados mecánicamente (Wrist Action Burrell Model 75) durante 1 h y colocados en termostatos (Magni Whirl Blue M. Electric Company) a las diferentes temperaturas de trabajo durante al menos 48 h realizando agitación manual varias veces durante las primeras 24 h. Cumplido este tiempo se permitió la separación de las fases líquidas, extrayendo las fases acuosas y realizando las correspondientes diluciones gravimétricas para determinar la concentración final de KTP por espectrofotometría UV (Unicam UV2-100). Los coeficientes de reparto molales aparentes ( $K_{o/w}^{m/app}$ ) a pH 7,4 se calcularon mediante una expresión análoga a la Ec. 1. A este valor de pH el KTP en el medio acuoso se encuentra preferentemente en forma disociada, por lo que es necesario corregir los valores obtenidos para expresarlos en términos del reparto de la especie molecular, la cual a su vez, es mucho más afín por la fase orgánica. Los coeficientes de reparto verdaderos ( $K_{o/w}^m$ ) se calcularon a partir de los valores de  $K_{o/w}^{m/app}$  mediante la expresión<sup>3</sup>

$$K_{o/w}^m = K_{o/w}^{m/app} (1 + 10^{pH - pK_a}) \quad (5)$$

en la cual, el término en paréntesis de la derecha, en este caso es igual a 1231,27, puesto que el pH es 7,4 y el pK<sub>a</sub> del KTP corregido a fuerza iónica 0,15 mol L<sup>-1</sup> es 4,31 (Tabla 1).

### Determinación de los coeficientes de reparto liposoma/agua

Se prepararon soluciones de KTF de concentración 250  $\mu$ g/mL en medios acuosos regulados (pH 7,4 y  $\mu$  0,15 mol L<sup>-1</sup>). De otra parte, en balones de cuello esmerilado se colocaron 5 mL de solución clorofórmica de concentración 8 mg/mL, de cada una de las tres lecitinas (DMPC, DPPC y EGG). Posteriormente los balones fueron sometidos a evaporación rotatoria (Buchler Instr.) a 40 °C y 120 rpm hasta formar películas delgadas de lípido en las paredes, y colocadas en estufa a 40 °C durante 2 h para eliminar totalmente el cloroformo.

Para formar los liposomas, se adicionaron 4 mL de la solución acuosa de fármaco, agitando manualmente y por vórtice (Mistral<sup>®</sup> Mixer, Model 1192, Lab-Line Instr.) hasta obtener dispersiones homogéneas, calentando por encima de 25 °C para DMPC y por encima de 45 °C para DPPC. Este procedimiento permitió la formación de liposomas multilaminares grandes. Posteriormente se transfirieron volúmenes de 1,3 mL de las dispersiones a tubos de polipropileno para centrifuga de 2 mL con tapa rosca, los cuales a su vez se agitaron manualmente y se colocaron en termostatos a las diferentes temperaturas de trabajo durante al menos 48 h con agitación manual periódica.

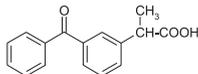
Transcurrido este tiempo se separaron los liposomas por centrifugación (Biofuge 15R Heraeus Instr.) a 15000 rpm durante 1 h a la misma temperatura de termostato. Posteriormente se extrajeron los sobrenadantes acuosos, se realizaron las correspondientes diluciones gravimétricas, y se determinó la concentración final de KTP por espectrofotometría UV (Unicam UV2-100). Los coeficientes de reparto aparentes y reales se calcularon de forma similar a los sistemas líquido/líquido (mediante las ecuaciones 1 y 5, respectivamente). Todos los procedimientos fueron realizados como mínimo por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estructura molecular del KTP, la masa molar y los valores de pK<sub>a</sub>, a fuerzas iónicas 0 y 0,15 mol L<sup>-1</sup>, se presentan en la Tabla 1. El valor de pK<sub>a</sub> fue tomado de Fini *et al.*<sup>10</sup> y recalculado a  $\mu$  0,15 mol L<sup>-1</sup> mediante la ecuación de Debye-Hückel ampliada<sup>11</sup>. La longitud de onda de máxima absorción a pH 7,4 es coincidente con la reportada en la literatura<sup>12</sup> para medios ácidos, y ligeramente diferente a la reportada para medios alcalinos (262 nm).

Como se indicó anteriormente, el reparto se estudió a pH 7,4 y  $\mu$  0,15 mol L<sup>-1</sup> que son los valores fisiológicos de la sangre<sup>9</sup>. Sin embargo para los fines del análisis termodinámico de los respectivos procesos de transferencia, los valores aparentes de reparto

**Tabla 1.** Propiedades físicas y químicas del KTP<sup>13</sup>

Estructura molecular	M/g mol <sup>-1</sup>	pK <sub>a</sub>	$\lambda_{\max}$ /nm
	254.28	4.45 (a) 4.31 (b)	260 (c)

(a) Reportado por Fini *et al.*<sup>10</sup> a  $\mu$  0 mol L<sup>-1</sup>; (b) corregido a  $\mu$  0,15 mol L<sup>-1</sup> mediante la ecuación de Debye-Hückel<sup>11</sup>; (c) en agua a pH 7,4 y  $\mu$  0,15 mol L<sup>-1</sup>

( $K_{o/w}^{m/app}$ ) se transformaron a valores reales ( $K_{o/w}^m$ ), o sea sin disociación del KTP, mediante la Ec. 5 para dar cumplimiento a la ley de Nernst. En esta ley se considera exclusivamente el reparto de la especie molecular, esto es, sin fenómenos de asociación o disociación en ninguna de las fases consideradas<sup>2,14</sup>. En la Tabla 2 se presentan los coeficientes de reparto corregidos por efecto del pH en todos los sistemas estudiados, en función de la temperatura.

Puede observarse que en todos los sistemas estudiados el coeficiente de reparto es mayor que la unidad, lo que indica que este fármaco tiene una mayor preferencia por los medios orgánicos frente a los acuosos, en particular con aquellos con los que puede interactuar por enlaces de hidrógeno. Además, esta propiedad aumenta con el incremento de la temperatura, lo cual indica procesos de naturaleza endotérmica. De otro lado, comparando los valores obtenidos en los diferentes sistemas, se tiene a 25 °C que el reparto aumenta en el orden CH/W < ROH/W < DPPC/W < DMPC/W < EGG/G, lo cual es coincidente con lo encontrado en el estudio de otros fármacos<sup>5,15</sup>.

Para el comportamiento de reparto molar de este fármaco solo se dispone en la literatura de los datos de Betageri *et al.*<sup>16</sup> en los sistemas ROH/W y DMPC/W a pH 7,0. Sin embargo, nuestros resultados no son coincidentes con los presentados por estos investigadores, en particular para el reparto en liposomas DMPC, ya que ellos reportan una disminución de los valores de  $K_{o/w}^m$  con el aumento de la temperatura, lo cual es contrario a lo encontrado en la presente investigación. Además, de acuerdo a los resultados gráficos presentados en ese mismo artículo, se interpretaría que el reparto molar del KTP es similar en los dos sistemas a 40 °C, mientras que según la Tabla 2, el reparto en liposomas de DMPC es cerca de cuarenta veces mayor que en el octanol.

Comparando entre sí los resultados de la Tabla 2, en el caso de los dos solventes orgánicos se encuentra que la preferencia es mucho más alta por el octanol, el cual como se ha descrito en la literatura<sup>2</sup>, posee una estructura microheterogénea cuando está saturado de agua, por lo que además de interactuar con el KTP por enlaces de hidrógeno a través de los grupos carbonilo y carboxilo presentes en el fármaco, puede hacerlo también por interacciones débiles de dispersión inmovilizándolo cerca de las cadenas alquílicas.

Como se indicó previamente, las vesículas fosfolípídicas se han investigado como posibles modelos para el estudio de distribución de solutos en membranas, puesto que los liposomas se asemejan a las estructuras ordenadas características de las membranas biológicas. Como se observa en la Tabla 2 el reparto del KTP es mucho más alto en estos sistemas, comparado con el que se obtiene con el octanol, lo que demuestra la gran contribución debida a la inmovilización del fármaco en el interior de las bicapas fosfolípídicas o por interacciones electrostáticas con la cabeza polar de los fosfolípidos, como ha sido planteado en la literatura<sup>17</sup>.

Comparando ahora los resultados de reparto en los liposomas, puede observarse que en el intervalo de temperatura de 25 a 40 °C, el reparto es más alto en liposomas de lecitina de huevo y menor en liposomas de DPPC, lo cual podría explicarse en términos de la composición de los liposomas y de la estructura o estado de agregación de las vesículas en función de la temperatura. Por debajo de la temperatura de transición  $T_c$ , los liposomas se encuentran en estado de gel (rígido o pseudosólido) y por encima de esta temperatura en estado de cristal líquido (fluido o pseudolíquido), este último estado es el que más favorece, en la mayoría de los casos, el reparto de solutos, puesto que las membranas son mucho más flexibles<sup>18,19</sup>. A las temperaturas estudiadas los liposomas de lecitina de huevo (20 a 45 °C), y de DMPC (25 a 45 °C) se encuentran en estado fluido (cristal líquido), mientras que los liposomas de DPPC se encuentran en estado pseudosólido o de gel, salvo a 45 °C ( $T_c$ : 41,3 °C), por lo que el coeficiente de reparto del KTP es mayor en liposomas de lecitina de huevo y de DMPC que en liposomas de DPPC.

Comparando los resultados obtenidos con lecitina de huevo y DMPC, se tiene que el reparto es mayor en la primera clase de liposomas, lo que puede atribuirse a que los liposomas de lecitina de huevo presentan un valor de  $T_c$  muy inferior al correspondiente a los liposomas de DMPC, esto es, -10 frente a 23,6 °C, respectivamente<sup>19</sup>. Por esta razón la fluidez de las bicapas fosfolípídicas formadas por lecitina de huevo es mayor que la correspondiente a las bicapas de DMPC, y por lo tanto, también lo es la permeabilidad de las vesículas. Además de la temperatura de transición, es probable que la composición de los liposomas de lecitina de huevo influya también sobre el mayor grado de reparto del KTP, ya que la lecitina de huevo, aparte de los fosfolípidos presenta otros constituyentes tales como triglicéridos y colesterol que pueden ayudar a estabilizar las membranas formadas<sup>20</sup>.

Si se considera que el coeficiente de reparto es un indicativo de afinidad, en el caso de los liposomas se tiene que ésta disminuye en el orden EGG > DPPC > DMPC cuando se comparan los liposomas en estado fluido (reparto a 45 °C). Mientras que al comparar el comportamiento de DPPC y DMPC en estado rígido (20 °C), nuevamente el reparto es mayor para DPPC. Esto a su vez puede considerarse como una prueba adicional de la gran lipofiliidad de este fármaco, ya que DPPC posee dos grupos metileno adicionales en cada cadena hidrocarbonada. Debe sin embargo aclararse que el KTP no es propiamente hidrofóbico ya que el reparto CH/W es relativamente bajo, comparado con los sistemas orgánicos semipolares.

Seiler<sup>21</sup> planteó en 1974 la Ec. 6 que compara los coeficientes de reparto en los sistemas ROH/W y CH/W, con el objetivo básico de obtener información relacionada con la contribución por enlaces de hidrógeno al reparto de solutos. En un tratamiento más

**Tabla 2.** Coeficiente de reparto molar del KTP en los diferentes sistemas en función de la temperatura

	Sistema de reparto					
	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C
CH/W	13,5 (1,0)	17,7 (1,0)	20,4 (1,7)	30,7 (1,7)	37,8 (1,7)	64,2 (4,9)
ROH/W	1,25×10 <sup>3</sup> (0,01×10 <sup>3</sup> )	1,29×10 <sup>3</sup> (0,01×10 <sup>3</sup> )	1,34×10 <sup>3</sup> (0,01×10 <sup>3</sup> )	1,41×10 <sup>3</sup> (0,01×10 <sup>3</sup> )	1,52×10 <sup>3</sup> (0,01×10 <sup>3</sup> )	1,76×10 <sup>3</sup> (0,01×10 <sup>3</sup> )
DMPC/W	7,74×10 <sup>3</sup> (0,46×10 <sup>3</sup> )	2,79×10 <sup>4</sup> (0,11×10 <sup>4</sup> )	3,76×10 <sup>4</sup> (0,11×10 <sup>4</sup> )	4,93×10 <sup>4</sup> (0,03×10 <sup>4</sup> )	6,61×10 <sup>4</sup> (0,14×10 <sup>4</sup> )	9,11×10 <sup>4</sup> (0,30×10 <sup>4</sup> )
DPPC/W	9,45×10 <sup>3</sup> (0,56×10 <sup>3</sup> )	1,34×10 <sup>4</sup> (0,05×10 <sup>4</sup> )	1,86×10 <sup>4</sup> (0,06×10 <sup>4</sup> )	2,69×10 <sup>4</sup> (0,05×10 <sup>4</sup> )	4,19×10 <sup>4</sup> (0,03×10 <sup>4</sup> )	1,45×10 <sup>5</sup> (0,02×10 <sup>5</sup> )
EGG/W	3,36×10 <sup>4</sup> (0,07×10 <sup>4</sup> )	5,78×10 <sup>4</sup> (0,11×10 <sup>4</sup> )	8,10×10 <sup>4</sup> (0,26×10 <sup>4</sup> )	1,13×10 <sup>5</sup> (0,01×10 <sup>5</sup> )	1,82×10 <sup>5</sup> (0,01×10 <sup>5</sup> )	2,68×10 <sup>5</sup> (0,01×10 <sup>5</sup> )

detallado y completo, también deben considerarse otros aspectos tales como la geometría molecular y los parámetros estéricos de los solutos y los solventes, entre otros. Sin embargo, en una primera aproximación la Ec. 6 es un buen intento para identificar el principal tipo de interacción que afecta la transferencia de fármacos.

$$\Delta \log K_{ROH/W}^m = \log K_{ROH/W}^m - \log K_{CH/W}^m \quad (6)$$

Esta ecuación también se puede escribir en forma de cociente como  $\Delta \log K_{ROH/W}^m = \log (K_{ROH/W}^m / K_{CH/W}^m)$  mostrando el carácter de interacción por enlace de hidrógeno entre el fármaco y el octanol, comparado con el ciclohexano. Si  $\Delta \log K_{ROH/W}^m > 0$  entonces se demuestra alguna contribución por enlaces de hidrógeno al reparto. En otros términos, la Ec. 6 representa el reparto hipotético del KTP entre el octanol y el ciclohexano ( $K_{ROH/W}^m$ ).

El ciclohexano es un solvente aprótico sin capacidad de formar enlaces de hidrógeno como donador ni como aceptor y por lo tanto interactúa con los fármacos únicamente por interacciones no específicas (fuerzas de London). Sin embargo el octanol, gracias a su grupo hidroxilo puede ser donador o aceptor de hidrógeno, además que como se indicó previamente, gracias a su cadena alquílica, este permite la inmovilización estructural de los solutos debido a la microestructura tetraédrica adoptada en saturación, a diferencia del ciclohexano. Por lo tanto  $\Delta \log K_{ROH/W}^m$  incluye contribuciones por enlace de hidrógeno y por inmovilización al proceso de reparto (en este análisis se considera que las interacciones no específicas son similares para los dos solventes y el fármaco).

Más recientemente<sup>5</sup>, se ha planteado la Ec. 7, con el objetivo básico de obtener información relacionada con la mayor contribución, por inmovilización en el interior de las bicapas fosfolipídicas de los liposomas, al reparto de solutos, comparado con el octanol. Naturalmente, otras interacciones más específicas, de tipo electrostático, tales como las que se pueden presentar entre la cabeza polar de los fosfolípidos y los fármacos, también son consideradas en la Ec. 7.

$$\Delta \log K_{DMPC/W}^m = \log K_{DMPC/W}^m - \log K_{ROH/W}^m \quad (7)$$

De forma similar al parámetro de Seiler, en este caso la Ec. 7 representa el reparto hipotético del KTP entre los liposomas y el octanol ( $K_{DMPC/ROH}^m$ ). En la Tabla 3 se presentan los valores del parámetro de Seiler y de otros parámetros análogos para el KTP a 25 °C, calculados a partir de los valores molales de reparto

presentados en la Tabla 2. Puede observarse que las contribuciones por interacciones específicas y por inmovilización, al reparto de este fármaco en octanol, son relativamente altas (1,86), sin embargo son menores a las encontradas en el estudio de otros fármacos tales como la benzocaína<sup>5</sup> y la fenacetina<sup>22</sup>. Mientras que en el caso de los liposomas, las contribuciones específicas por inmovilización en las bicapas y por efectos electrostáticos, respecto al octanol, también son altos, puesto que los parámetros correspondientes son mayores que 1,0. Esto último se observó ya en los valores de reparto, los cuales son diez veces mayores en las vesículas fosfolipídicas, respecto al octanol.

En la Tabla 4 se presenta el cambio de energía libre estándar expresado en molalidad para la transferencia del KTP desde el agua hasta los diferentes medios orgánicos. Esta función termodinámica se calculó mediante la Ec. 2, a partir de los datos de reparto de la Tabla 2, utilizando métodos de propagación de errores<sup>23</sup>. En todos los casos el valor es negativo, lo que indica nuevamente, la preferencia del fármaco por los medios orgánicos. Los datos presentados por Betageri *et al.*<sup>16</sup> para este fármaco en los sistemas ROH/W y DMPC/W a pH 7,0 para esta función termodinámica a 37 °C son -14,3 y -16,1 kJ mol<sup>-1</sup>, respectivamente. Sin embargo, esos valores no pueden ser comparados directamente con los de la Tabla 4, ya que como se indicó en el caso de los valores de  $K_{o/w}^m$ , se presentan discrepancias muy grandes en las dos investigaciones.

En las Figuras 1 y 2 se presentan los gráficos de van't Hoff del coeficiente de reparto del KTP en los sistemas CH/W y ROH/W, respectivamente. En el sistema CH/W se planteó un modelo de regresión lineal en el intervalo de temperatura desde 20 hasta 40 °C, sin considerar el valor obtenido a 45 °C, ya que este se desvía de la tendencia presentada por las otras cinco temperaturas. El coeficiente de determinación obtenido en la regresión fue 0,979. En el sistema ROH/W se planteó un modelo de regresión parabólico en el intervalo desde 20 hasta 40 °C, sin considerar tampoco el valor a 45 °C, ya que de forma análoga a lo sucedido con el sistema CH/W, éste también se desvía de la tendencia presentada por las otras cinco temperaturas. El coeficiente de determinación obtenido en la regresión parabólica fue 0,993<sup>23</sup>.

En la Figura 3 se presenta el gráfico de van't Hoff del coeficiente de reparto del KTP en los diferentes liposomas. En todos los casos, las tendencias fueron ajustadas a modelos lineales de regresión, considerando los intervalos de temperatura para los cuales se tienen los liposomas en el mismo estado de agregación, obteniendo coeficientes de determinación de 0,995; 0,995 y 0,991 para EGG, DMPC y

**Tabla 3.** Parámetro de Seiler y otros parámetros análogos para el KTP a 25,0 °C

Parámetro	Sistema 1	Sistema 2	$\log K_{o/w}^m$ (1)	$\log K_{o/w}^m$ (2)	$\Delta \log K_{o/w}^m$
$\Delta \log K_{ROH/W}^m$	ROH/W	CH/W	3,11	1,25	1,86
$\Delta \log K_{DMPC/W}^m$	DMPC/W	ROH/W	4,45	3,11	1,34
$\Delta \log K_{DPPC/W}^m$	DPPC/W	ROH/W	4,13	3,11	1,02
$\Delta \log K_{EGG/W}^m$	EGG/W	ROH/W	4,76	3,11	1,65

**Tabla 4.** Energía libre estándar de transferencia del KTP desde el agua hasta los diferentes sistemas orgánicos en función de la temperatura

Sistema de reparto	$\Delta G_{w \rightarrow o}^0 / \text{kJ mol}^{-1}$					
	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C	40 °C	45 °C
CH/W	-6,26(0,18)	-7,13(0,14)	-7,84(0,19)	-8,77(0,14)	-9,46(0,12)	-11,01(0,20)
ROH/W	-17,37(0,02)	-17,76(0,01)	-18,15(0,01)	-18,58(0,02)	-19,07(0,02)	-19,76(0,02)
DMPC/W	-21,82(0,15)	-25,37(0,10)	-26,55(0,07)	-27,69(0,02)	-28,90(0,06)	-30,21(0,09)
DPPC/W	-22,31(0,14)	-23,55(0,09)	-24,78(0,08)	-26,13(0,05)	-27,71(0,02)	-31,44(0,04)
EGG/W	-25,40(0,05)	-27,18(0,05)	-28,49(0,08)	-29,80(0,01)	-31,53(0,02)	-33,07(0,01)

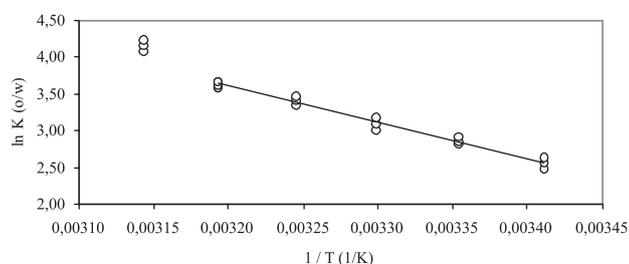


Figura 1. Gráfico de van't Hoff del coeficiente de reparto del KTP en el sistema CH/W

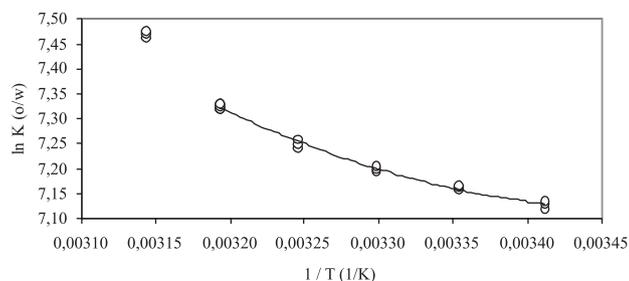


Figura 2. Gráfico de van't Hoff del coeficiente de reparto del KTP en el sistema ROH/W

DPPC, respectivamente<sup>23</sup>. Como se indicó previamente, las temperaturas de transición de los liposomas son,  $-10$ ;  $23,6$  y  $41,3$  °C, para EGG, DMPC y DPPC, respectivamente, por lo cual los intervalos considerados fueron, desde  $20$  hasta  $45$  °C para el sistema EGG/W (estado fluido), desde  $25$  hasta  $45$  °C para el sistema DMPC/W (estado fluido) y finalmente, desde  $20$  hasta  $40$  °C para el sistema DPPC/W (estado rígido), respectivamente.

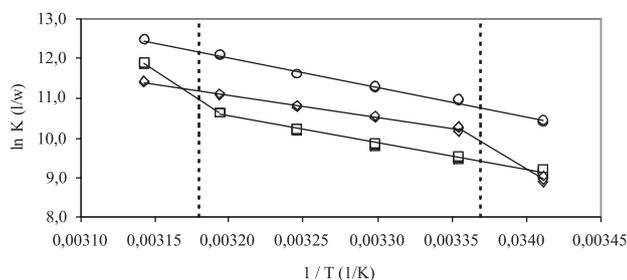


Figura 3. Gráfico de van't Hoff del coeficiente de reparto del KTP en los sistemas liposomales DMPC/W (rombos), DPPC/W (cuadrados) y EGG/W (círculos). Las líneas verticales discontinuas indican los valores  $T_c$  de DMPC y DPPC, esto es,  $23,6$  y  $41,3$  °C, respectivamente

A partir de las pendientes obtenidas en los modelos de regresión lineales para los sistemas CH/W, DMPC/W, DPPC/W y EGG/W, se calcularon los respectivos cambios entálpicos estándar de transferencia, mediante la Ec. 3, utilizando métodos de propagación de errores<sup>23</sup>. En el caso del sistema ROH/W, donde se obtuvo un modelo parabólico de regresión, este fue derivado y resuelto a  $25$  °C para hallar la pendiente a esa temperatura específica. La entalpía fue entonces calculada como el producto de la pendiente por  $-R$ . Los valores obtenidos de esta función termodinámica a  $25$  °C para todos los sistemas se presentan en la Tabla 5.

De otro lado, a partir de los valores de  $\Delta G_{w \rightarrow o}^0$  y  $\Delta H_{w \rightarrow o}^0$  presentados en las Tablas 4 y 5, mediante la Ec. 4 se calcularon los valores para los cambios entrópicos estándar en la escala de molalidad ( $\Delta S_{w \rightarrow o}^0$ ), los cuales se presentan también en la Tabla 5 a  $25$  °C. Los valores de  $\Delta H_{w \rightarrow o}^0$  y  $\Delta S_{w \rightarrow o}^0$  presentados por Betageri *et*

*al.*<sup>16</sup> en el sistema ROH/W a pH 7,0 y  $37$  °C para el KTP son  $24,6$  kJ mol<sup>-1</sup> y  $125,1$  J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>, respectivamente; sin embargo, como se indicó previamente, los resultados obtenidos en las dos investigaciones no son comparables. De otro lado, los resultados de estas mismas funciones termodinámicas para la transferencia desde el agua hasta los liposomas de DMPC ( $-79,1$  kJ mol<sup>-1</sup> y  $-202,6$  J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>, para entalpía y entropía, respectivamente<sup>16</sup>), no solo son diferentes en magnitud, sino que también lo son en el signo de las funciones. En el caso de la entalpía negativa presentada por ellos, es consecuencia, como se indicó previamente, de que el reparto disminuye con el aumento de la temperatura, lo cual es contrario a lo encontrado en la presente investigación. Por lo tanto, los resultados encontrados en las dos investigaciones, definitivamente no son comparables.

Tabla 5. Entalpía y entropía estándar de transferencia del KTP desde el agua hasta los diferentes sistemas orgánicos a  $25$  °C

Sistema de reparto	$\Delta H_{w \rightarrow o}^0$ / kJ mol <sup>-1</sup>	$\Delta S_{w \rightarrow o}^0$ / J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup>
CH/W	40,9 (1,7)	161 (7)
ROH/W	5,18 (0,29)	77 (4)
DMPC/W	46,3 (0,9)	240 (5)
DPPC/W	56,2 (1,5)	267 (1)
EGG/W	62,8 (1,1)	302 (6)

Los cambios entálpico y entrópico, involucran de una parte, los requerimientos energéticos y de otra, la aleatoriedad o desorden molecular, implicados en el proceso global de la transferencia del fármaco desde el agua hasta los diferentes sistemas orgánicos. En términos generales deben considerarse independientemente los fenómenos presentados en cada una de las fases, antes y después del reparto.

Puesto que inicialmente el soluto únicamente está presente en el agua, entonces, en el medio orgánico debe crearse una cavidad del tamaño del soluto, para alojarlo, lo cual es un proceso endotérmico, ya que se necesita suministrar energía para separar a las moléculas de este solvente. Una vez que se acomodan las moléculas del soluto en la fase orgánica se libera energía gracias a las interacciones soluto-solvente orgánico generadas. Esto conllevaría a un aumento parcial en la entropía en este medio debido al respectivo proceso de mezcla entre el soluto y el solvente, lo cual a su vez, en el caso del octanol saturado de agua, podría compensarse con la reducción de la movilidad molecular del soluto gracias a posibles interacciones específicas del tipo enlace hidrógeno.

De otra parte, en el agua, después de que una determinada cantidad de moléculas han migrado hacia el solvente orgánico, las cavidades originales en el medio acuoso han sido ocupadas por moléculas de agua, lo que en principio podría liberar energía debido a las fuertes interacciones agua-agua que se presentan. Sin embargo, dependiendo del soluto, también se debe tener muy en cuenta la posible desestructuración del agua que originalmente hidratava hidrofóticamente a los grupos alquílicos o aromáticos no polares del fármaco. Este proceso en particular implica un consumo de energía y además, un aumento en la entropía local por la separación de algunas moléculas de agua que se encontraban asociadas entre sí<sup>24</sup>.

De la Tabla 5 se tiene que en todos los casos estudiados, el proceso de transferencia hacia los medios orgánicos es endotérmico, implicando a su vez grandes incrementos en la entropía total de los sistemas. En un principio podría decirse en el caso del sistema CH/W, que los altos valores de entalpía y de entropía, son debidos principalmente a la desestructuración de los témpanos de agua existentes alrededor de los grupos hidrocarbonados del fármaco (dos

anillos aromáticos y un grupo metilo), y además a la creación de la cavidad en el ciclohexano para alojar al fármaco. Estos dos eventos, como se indicó previamente, implican consumo energético y además aumentan el desorden a nivel molecular.

En el caso del sistema ROH/W, la entalpía y entropía, relativamente bajas, podrían explicarse en términos de una posible estructuración en el octanol saturado de agua por reemplazo de una molécula de octanol por una de fármaco en algunos de los centros conformados por dos moléculas de agua y cuatro de octanol dentro de la estructura microheterogénea que asume este solvente saturado de agua<sup>2</sup>. Lo anterior liberaría algo de energía y a su vez disminuiría ligeramente el desorden molecular ocasionado por el proceso de mezcla fármaco-solvente orgánico.

De otro lado, en el caso de los liposomas, aparte de lo descrito para el medio acuoso en el sistema CH/W (que también es válido para el sistema ROH/W), debido a la estructura altamente organizada de la bicapa fosfolipídica, el requerimiento energético para separarla, implica una entalpía relativamente alta y esto a su vez, conduce necesariamente a un gran incremento en la entropía por el desorden generado.

Comparando los valores de estas dos funciones termodinámicas, en las lecitinas puras, esto es DMPC y DPPC, se encuentra que éstas son más altas para los liposomas en estado rígido de gel (DPPC). Esto se explicaría en términos de la menor flexibilidad de los liposomas de DPPC respecto a los de DMPC, lo cual ya se había visto al analizar los resultados de reparto. De otro lado, comparando los liposomas en estado fluido o de cristal líquido, DMPC y EGG, se tiene que las funciones termodinámicas son más altas para los liposomas de lecitina de huevo, lo cual en principio no es fácilmente explicable, si se considera que el reparto del KTP es también más alto en estos últimos liposomas, lo que conduce a pensar que son más flexibles y permeables.

Este comportamiento es análogo al encontrado en el reparto de algunas sulfonamidas<sup>15</sup>. Al comparar el comportamiento obtenido en los sistemas DPPC y EGG que presentan los valores extremos en el reparto en liposomas (esto es, menor y mayor, respectivamente), se tiene que las mismas funciones, de nuevo son mayores para los liposomas EGG respecto a los DPPC. Este resultado es aún más difícil de explicar puesto que se esperaría un mayor desorden al separar las bicapas más compactadas de los liposomas DPPC en estado rígido, que las de sus contrapartes menos compactadas en el estado fluido de los liposomas de lecitina de huevo. En este caso el comportamiento es contrario al encontrado el estudio de las sulfonamidas, en el cual el reparto fue mayor en liposomas EGG que en liposomas DPPC, pero en cambio, las respectivas funciones termodinámicas, entalpía y entropía, fueron menores<sup>15</sup>.

## CONCLUSIONES

De todo lo expuesto previamente, de manera general se puede concluir que el ketoprofén es un fármaco de naturaleza predominantemente lipofílica si bien no propiamente hidrofóbica. De otro lado con base en los resultados de reparto obtenidos, se ha demostrado también que este fármaco presenta una mayor afinidad por los liposomas que por los solventes orgánicos. Este comportamiento es análogo al encontrado en el estudio de otros fármacos, lo cual a su vez refuerza la idea original del mayor poder

de discriminación de las vesículas fosfolipídicas, como sistemas de reparto en estudios QSAR.

## AGRADECIMIENTOS

Muy formalmente agradecemos al Laboratorio farmacéutico GENFAR de Colombia por la donación del ketoprofén, a la Fundación para la Promoción de la Investigación y la Tecnología del Banco de la República y a la DIB-DINAIN de la Universidad Nacional de Colombia (UNC) por el apoyo financiero, y así mismo, al Departamento de Farmacia de la UNC por facilitar los equipos e instalaciones requeridos para el desarrollo de esta investigación.

## REFERENCIAS

- Hanson, G. R. En *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*; 20<sup>th</sup> ed.; Gennaro, A. R., ed.; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, 2000, p. 1456-60.
- Sangster, J.; *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*, John Wiley & Sons: Chichester, England, 1997, p. 1-55.
- Martínez, F.; Tello, M.; Gómez, A.; *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* **2001**, *30*, 16.
- Betageri, G. V.; Rogers, J. A.; *Int. J. Pharm.* **1987**, *36*, 165
- Ávila, C. M.; Martínez, F.; *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, *51*, 237.
- Baena, Y.; Pinzón, J.; Barbosa, H.; Martínez, F.; *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2004**, *40*, 413.
- Diamond, J. M.; Katz, Y.; *J. Membr. Biol.* **1974**, *17*, 121.
- US Pharmacopeia*, 28<sup>th</sup> revision; United States Pharmacopeial Convention, Inc.: Rockville, MD, 2004, p. 1099-100.
- Cevc, G. En *Liposomes Technology*; Gregoriadis, G., ed.; CRC Press: BocaRaton, 1993, p. 1-36.
- Fini, A.; DeMaria, P.; Guarnieri, A.; Varoli, L.; *J. Pharm. Sci.* **1987**, *76*, 48.
- Martin A.; Bustamante, P.; Chun, A. H. C.; *Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences*, 4<sup>th</sup> ed.; Lea & Febiger: Philadelphia, 1993, p. 160-3.
- Moffat, A. C.; Jackson, J. V.; Moss, M. S.; Widdop, B.; *Clarke's Isolation and Identification of Drugs, in Pharmaceuticals, Body fluids, and Post-mortem Material*, 2<sup>nd</sup> ed.; The Pharmaceutical Press: London, 1986.
- Budavari, S.; O'Neil, M. J.; Smith, A.; Heckelman, P. E.; Obenchain Jr., J. R.; Gallipeau, J. A. R.; D'Areca, M. A.; *The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 13<sup>th</sup> ed.; Merck & Co., Inc.: Whitehouse Station, NJ, 2001.
- Klotz, I. M.; Rosenberg, R. M.; *Chemical Thermodynamics: Basic Theory and Methods*, 6<sup>th</sup> ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2000, p. 343; Connors, K. A.; *Thermodynamics of Pharmaceutical Systems: An Introduction for Students of Pharmacy*, Wiley-Interscience: Hoboken NJ, 2002, p. 83.
- Martínez, F.; Gómez, A.; *J. Phys. Org. Chem.* **2002**, *15*, 874; Ávila, C. M.; Gómez, A.; Martínez, F.; *Acta Farm. Bonaerense* **2003**, *22*, 119.
- Betageri, G. V.; Nayernama, A.; Habib, M. J.; *Int. J. Pharm. Adv.* **1996**, *1*, 310.
- Ahmed, M.; Burton, J. S.; Hadgraft, J.; Kellaway, I. W.; *J. Membr. Biol.* **1981**, *58*, 181; Ahmed, A. M. S.; Farah, F. H.; Kellaway, I. W.; *Pharm. Res.* **1985**, *3*, 119.
- Koynova, R.; Caffrey, M.; *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1376*, 91.
- <http://www.lipidat.chemistry.ohio-state.edu>, accesada en Junio 2001.
- Darnell, J.; Lodish, H.; Baltimore, D.; *Biología Celular y Molecular*, Ed. Labor, S.A.: Barcelona, 1988, p. 90-3; Belitz, H.D.; Grosch, W.; *Química de los Alimentos*, Ed. Acribia S.A.: Zaragoza, 1985, p. 151-4, 441.
- Seiler, P.; *Eur. J. Med. Chem. -Chim. Therap.* **1974**, *9*, 473.
- Baena, Y.; Pinzón, J.; Barbosa, H.; Martínez, F.; *Acta Pharm.* **2005**, *55*, 195.
- Bevington, P. R.; *Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences*, McGraw-Hill Book, Co.: New York, 1969, p. 56-65.
- Tanford, C.; *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, John Wiley & Sons: New York, 1973.