

Estudio de Biodisponibilidad de una Prodroga de Furosemida en Humanos *

Carolina PRANDI ^{1,2} y Pietro FAGIOLINO ²

¹ Cátedra de Química Orgánica y ² Cátedra de Farmacodinamia, Facultad de Química, Gral. Flores 2124, C.C. 1157, 11800 Montevideo, Uruguay

RESUMEN. Se realizó un estudio preliminar de biodisponibilidad de furosemida vs. una prodroga de furosemida: 4-cloro-N-furfuril-5-sulfamoilantranilato de acetiloximetilo, en seis voluntarios sanos, a través de un diseño aleatorio, cruzado y compensado. Se monitoreó por un lapso de 24 horas, los niveles de Furosemida en orina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Se calculó el porcentaje acumulado de la dosis de furosemida recuperada en orina al cabo de las 24 hs. (%E24), las constantes cinéticas de eliminación (β) y de absorción (K_a), y el tiempo para la velocidad máxima de excreción de furosemida (T_{max}). Se analizó estadísticamente cada parámetro mediante el test t-Student para series apareadas, previa verificación de normalidad en la distribución de cada serie y homogeneidad de varianzas.

SUMMARY : "A Bioavailability Study of a Furosemide Prodrug in Humans". A preliminary bioavailability study of furosemide vs. a furosemide prodrug: acethyloxymethyl-4-chloro-N-furfuryl-5-sulfamoyl anthranilate was carried out using a randomized two-way crossover and balanced design. Furosemide levels in urine were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The urine was collected up to 24 hours. The accumulated percentage of urinary recovery of furosemide within 24 hours (%E24), elimination rate constants (β) and absorption rate constants (K_a) and the time to reach the maximum rate of excretion of furosemide (T_{max}), were calculated. A statistical analysis was performed using a Student's t-Test for paired series after verifying normal distribution and homogeneity of variances of the parameter sets.

INTRODUCCION

Han sido sintetizadas previamente una serie de prodrogas de furosemida del tipo aciloximetilesteres de furosemida ¹, a partir de las cuales fueron evaluados los siguientes parámetros *in vitro*: cinéticas de hidrólisis en fluidos gástrico e intestinal simulados, homogeneizado de intestino de rata y plasma humano. En base a estos estudios, se seleccionaron dos prodrogas de dicha serie: P1 (4-cloro-N-furfuril-5-sulfamoilantranilato de acetiloximetilo) y P4 (4-cloro-N-furfuril-5-

PALABRAS CLAVE: Furosemida, Prodroga, Biodisponibilidad en Humanos.

KEY WORDS: Furosemide, Prodrug, Bioavailability in Humans.

* Trabajo presentado en el Primer Congreso de la Federación Farmacéutica Sudamericana y II Congreso de Ciencias Farmacéuticas del Cono Sur, Montevideo, Uruguay, 4-7 de noviembre de 1993.

sulfamoilantranilato de pivaloiloximetilo), las cuales fueron evaluadas *in vivo* utilizando ratas Wistar machos ², resultando que ambas prodrogas mostraron mayor biodisponibilidad que la Furosemida (F), pero similar entre ellas.

La elección de la prodroga a ensayar en humanos, se basó en las propiedades fisicoquímicas de P1 y P4 ¹, seleccionando aquélla de menor lipofilia, para así disminuir los problemas de solubilidad.

En el presente trabajo se realiza un estudio preliminar de biodisponibilidad relativa de la prodroga P1, con referencia a furosemida.

PARTE EXPERIMENTAL

Protocolo del estudio

Se trabajó sobre un grupo de seis voluntarios sanos, verificando su condición de tales a través de exámenes bioquímicos y evaluación médica. Los voluntarios no tomaban ninguna otra medicación. Luego de un ayuno de 12 horas, se les administró la sustancia correspondiente y fueron mantenidos en ayuno por 4 horas más. A ese tiempo ingirieron un almuerzo estándar, a las 4 horas siguientes una merienda liviana y a las 4 horas una cena estándar.

El seguimiento de los voluntarios se realizó durante 24 horas, período durante el cual se fueron recogiendo alícuotas de orina correspondientes a cada micción espontánea. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta el momento de dosificar los niveles de furosemida por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). A los voluntarios se les permitió tomar agua *ad-libitum*, dejando constancia en el protocolo de trabajo. El estudio fue diseñado en forma aleatoria, cruzada y compensada dejando una semana entre cada administración, sea furosemida o prodroga.

Se administró una dosis de 20 mg de furosemida y su equivalente en prodroga, bajo la forma de solución, las cuales se prepararon en el momento de la administración. Para furosemida se disolvieron 100 mg en 500 µl de acetona y 500 µl de etanol absoluto. De allí se tomaron 200 µl (una dosis, 20 mg) que se colocaron en una cápsula de gelatina, que es lo que el voluntario ingiere. Para la administración de Prodroga se preparó una solución en idénticas condiciones pero considerando el equivalente en peso en P1.

Procesamiento de muestras

A 500 µl de orina, se agregan 50 µl de una solución de estándar interno (176 µg/ml de xipamida), 500 µl de ácido fosfórico al 1% en agua y finalmente 5 ml de acetato de etilo. Se agita en vortex durante un minuto, luego se centrifuga por 5 minutos a 3000 rpm y se retoma la fase orgánica que se evapora a sequedad bajo corriente de aire a 50 °C. El residuo se retoma con 200 µl de metanol y se inyectan 20 µl en el cromatógrafo.

Para cada serie de muestras correspondientes a una administración se prepararon dos patrones de furosemida de concentración final en orina (orina basal del voluntario) de 5 y 10 µg/ml, agregando 25 µl y 50 µl de una solución madre de furosemida, respectivamente, procediendo luego como con las muestras problemáticas.

Condiciones cromatográficas

Cromatógrafo Shimadzu, Bomba LC-6A, Detector SPD-6A, System Controller SCL-6A Hitachi, Recorder 561. Fase estacionaria: columna C18, 5 micras, 100 Å de tamaño de poro, Shim-pack CLC-ODS de 15 cm x 6 mm ID.; Fase móvil: ácido acético 1% - acetonitrilo (62:38); flujo de 3 ml/min; temperatura ambiente; detección a 274 nm, sensibilidad de 0,02 - 0,04 aufs.; presión de trabajo de 230 Kg/cm²; velocidad de registro de 0,5 cm/min.

En estas condiciones, los tiempos de retención para furosemida y xipamida (estándar interno) fueron de 3,8 y 8,5 minutos respectivamente.

Tratamiento de datos

Las concentraciones de furosemida obtenidas se multiplicaron por el volumen de orina emitido para obtener en forma acumulativa la cantidad excretada del principio activo a lo largo del tiempo. Estas cantidades fueron normalizadas por la dosis administrada expresada en furosemida para cada administración, a los efectos de obtener el porcentaje de la dosis recuperada en orina a los diferentes tiempos. La figura 1 ilustra, para cada sujeto, el porcentaje acumulado de recuperación de furosemida *vs.* tiempo para ambas administraciones.

Se calculó la velocidad de excreción de furosemida para cada intervalo de recolección adjudicando dicho valor al punto medio del intervalo de tiempo. Dicha velocidad se determinó dividiendo la cantidad excretada en el intervalo por el tiempo transcurrido en ese lapso.

Un gráfico de la velocidad de excreción en función del tiempo origina una curva similar a un perfil de niveles plasmáticos. La figura 2 muestra dichos niveles para cada sujeto y para cada administración. A partir de dichas curvas se determinaron el tiempo en obtener la máxima velocidad (T_{\max}) y las constantes cinéticas de eliminación (β) y de absorción (K_a) de furosemida.

Para la estimación de estos dos últimos parámetros farmacocinéticos se ajustaron las curvas a los valores experimentales mediante análisis de regresión lineal por el método de las residuales. De esta forma se originaron dos series de valores correspondientes a cada administración (P1 y F), para cada uno de los siguientes parámetros: T_{\max} , β , K_a y el porcentaje de la dosis de furosemida recuperada en orina al cabo de las 24 horas (%E24). Se analizó estadísticamente cada parámetro, comparando las dos series de datos mediante un Test t-Student para series apareadas, previa verificación de normalidad en la distribución de cada una de ellas y homogeneidad de varianzas.

RESULTADOS Y DISCUSION

En la Tabla 1 se muestra el resumen de los datos obtenidos para cada parámetro evaluado. Estadísticamente, no puede informarse que existan diferencias significativas para el nivel de significación del 5% entre los valores de cada parámetro.

Estos resultados permiten informar una vida media de eliminación para la Furosemida de 5,8 horas ($\beta = 0,12 \text{ h}^{-1}$). Esto verifica nuestros resultados previos ^{1,2} en cuanto a que la prodroga P1, una vez absorbida, sufre una inmediata transforma-

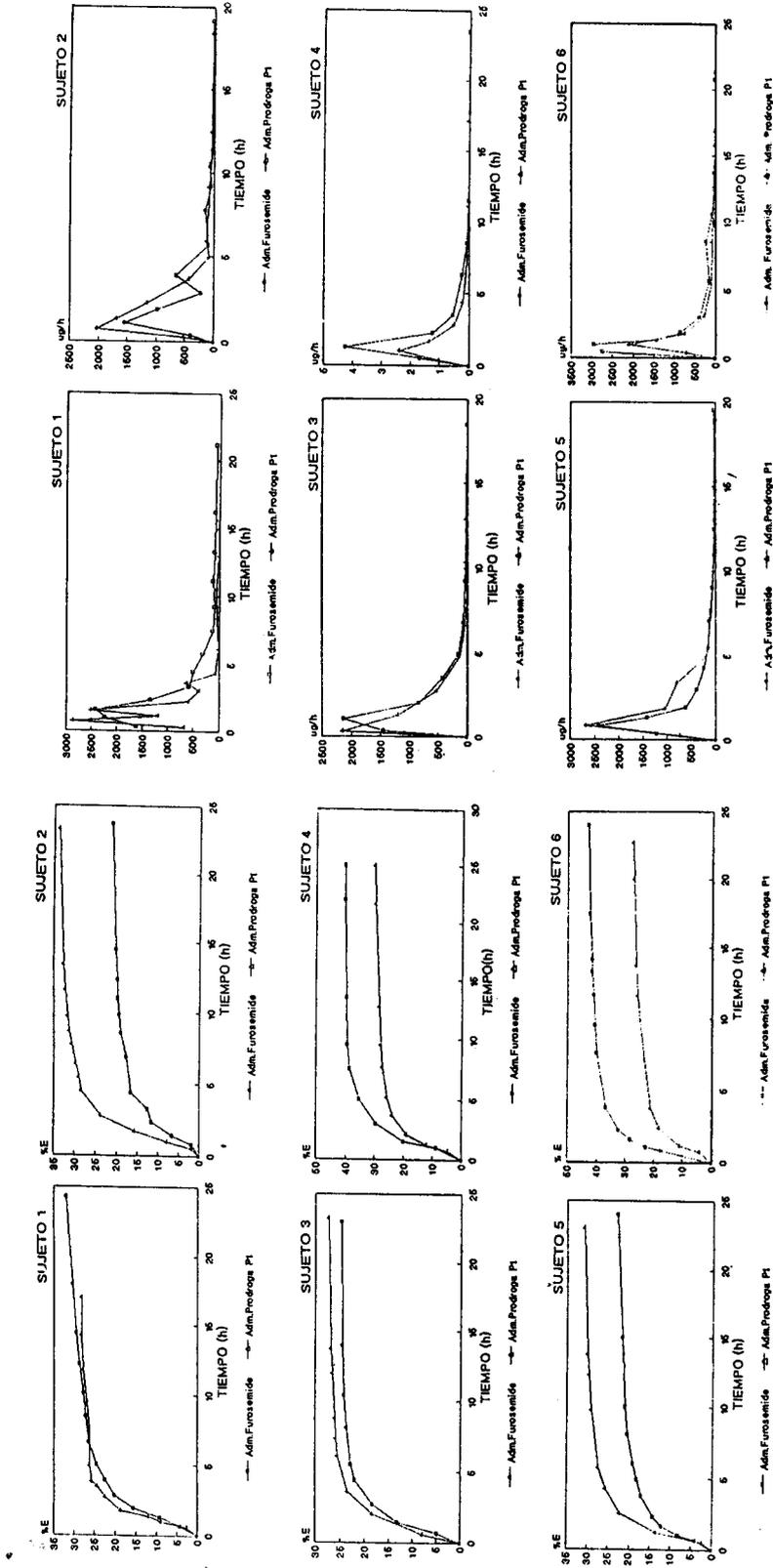


Figura 1. Porcentaje de recuperación de furosemida (acumulado) en función del tiempo.

Figura 2. Velocidad de excreción de furosemida en función del tiempo.

Tabla 1. Resumen de datos correspondientes a los parámetros evaluados en el estudio de biodisponibilidad de furosemida (F) vs. una prodroga de furosemida (P1).

Voluntario	β (h ⁻¹)		%E24		T _{máx} (h)		K _a (h ⁻¹)		Período	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	0.049	0.11	31.9	28.2	1.58	0.75	2.23	6.54	2	1
2	0.097	0.15	21.1	33.8	1.10	0.75	1.72	2.26	1	2
3	0.21	0.10	24.7	27.2	1.05	0.29	2.92	6.93	1	2
4	0.12	0.068	40.3	30.1	1.25	1.0	1.63	1.78	2	1
5	0.11	0.11	23.0	30.9	0.84	0.83	2.73	2.16	1	2
6	0.19	0.13	43.0	19.3	0.97	0.96	3.16	1.81	2	1
\bar{X}	0.13	0.11	30.7	28.2	1.13	0.76	2.40	3.58		
s	0.060	0.028	9.29	4.95	0.26	0.25	0.64	2.45		

A: administración de furosemida; B: administración de Prodroga P1; β : constante de velocidad de eliminación de primer orden; %E24: porcentaje acumulado de la dosis de furosemida recuperada en orina de 24 hs.; K_a: constante de velocidad de absorción de primer orden; T_{máx}: tiempo experimental de máxima velocidad de excreción de furosemida; *Período*: semana en que se administró cada sustancia; \bar{X} : valor medio. s: desviación estándar.

ción en furosemida. La vida media de absorción para furosemida, ya sea administrada como tal o como profármaco, puede decirse que insume aproximadamente 14 minutos (K_a = 3 h⁻¹).

En cuanto a la biodisponibilidad de la furosemida luego de administrarla como prodroga P1, (parámetro que era de interés evaluar en humanos), no puede concluirse una mejoría, en vista del porcentaje de la dosis recuperada en orina en las 24 horas del estudio. Aunque no contribuye en la decisión de que existan o no diferencias en la biodisponibilidad, resulta interesante observar que aquellas administraciones que se realizaron en la segunda semana del estudio produjeron, en general, mayor recuperación de la dosis en orina. Un test t-Student para series apareadas muestra diferencias significativas entre las administraciones dadas en las diferentes semanas (p = 0,05). La explicación aún no es clara, pero ameritaría investigar más este fenómeno.

Nuestro objetivo, en el desarrollo de una prodroga de absorción de furosemida, era aumentar la biodisponibilidad de esta sustancia, al evitarse (por bloqueo de la función carboxílica) la ionización que ésta irremediablemente sufre en el intestino, (pK_a=3,9) ¹. A pesar que este hecho fue corroborado en ratas, observándose un aumento en la biodisponibilidad cuando se administró esta prodroga P1 respecto a furosemida ^{1,2}, en el hombre no es posible, a partir de este estudio, concluir lo mismo.

Como posibles causas o explicaciones a esta observación en humanos, podemos plantear dos factores principales. Por un lado, lo que sería más dramático, que la prodroga P1 se hidrolizara en el tracto digestivo en forma importante antes de absorberse, y/o por otro lado, que la misma al llegar al estómago y/o intestino precipite, dada su baja solubilidad en agua, dificultando así su absorción. Si esta última fuera la causa, el agregado de mejoradores de la solubilidad, corregiría el problema.

A los efectos de investigar qué comportamiento sigue la prodroga P1 luego de administrarla junto a una comida que pudiera estimular la secreción biliar y con ello favorecer la disolución y por ende la absorción, es que se viene ensayando un estudio similar al presentado, pero administrando una vez la prodroga en ayuno y la otra semana la prodroga conjuntamente con un desayuno rico en lípidos. Por el momento resulta aventurado emitir un juicio definitivo sobre este punto.

Agradecimientos. Este trabajo se realizó con el aporte financiero del PEDECIBA (Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas), Proyecto URU/84/002.

Deseamos hacer llegar nuestra gratitud a las siguientes personas, por su colaboración: Dra. S. Parrillo, H. Payssé, A. Sierra, L. Domínguez, E. Savio, M. Vázquez, A. Gil, V. López, G. Cavalli y L. Chá.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. C. Prandi, P. Fagiolino, E. Manta, L. Domínguez Llera, J.M. Aíache, J. Couquelet (1992) *Il Farmaco*, **47**: 249-63
2. Prandi, C., P. Fagiolino, E. Manta Y L. Domínguez Llera (1992) *Il Farmaco*, **47**: 1225-30