

005241  
12



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

VALIDACION DE UN METODO ANALITICO POR  
CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION  
PARA LA CUANTIFICACION DE PIROXICAM EN PLASMA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

**P R E S E N T A :**

**CYNTHIA ELENA BARRAGAN JIMENEZ**



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2003

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# **PAGINACION DISCONTINUA**

## **JURADO ASIGNADO:**

<b>Presidente</b>	<b>Dra. Helgi Jung Cook</b>
<b>Vocal</b>	<b>M. en C. José Manuel Morales Hernández</b>
<b>Secretario</b>	<b>M. en C. María de Lourdes B. Mayet Cruz</b>
<b>Primer suplente</b>	<b>M. en C. Luis Jesús García Aguirre</b>
<b>Segundo suplente</b>	<b>M. en C. Liz Jannet Medina Reyes</b>

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE BIOFARMACIA, CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE  
QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA**

**ASESOR:**

**M. en C. María de Lourdes B. Mayet Cruz**

**SUSTENTANTE:**

**Cynthia Elena Barragán Jiménez**

B

## DEDICATORIAS.

A mis padres:

Nunca existirá una forma de agradecer una vida llena de amor, dedicación, comprensión, esfuerzo y sacrificio.

Por el privilegio de tener unos padres como ustedes, este trabajo está dedicado a una gran mujer y a un gran hombre, como una muestra de amor y agradecimiento hacia quienes me han dado todo.

A mis hermanos:

Por todos los momentos felices y tristes que hemos compartido, aunque no estamos juntos, siempre estaremos unidos.

C

Porque no existe una palabra que permita expresar mi agradecimiento hacia quien me ha enseñado mucho.

Por sus conocimientos, paciencia, dedicación, pero sobre todo, por su amistad, este trabajo de tesis está dedicado con respeto y cariño a mi asesora M. en C. María de Lourdes Mayer Cruz.

Muchas Gracias.

D

## AGRADECIMIENTOS.

**A la Dra. Helgi Jung Cook:**

Por sus sabios consejos, por alentarme a seguir adelante, por ser una gran persona, una excelente profesora y una mujer ejemplar.  
Muchas gracias.

**Al M. en C. José Manuel Morales Hernández:**

Por sus valiosas enseñanzas, su paciencia, dedicación y amistad.  
Gracias

**A la M. en C. Inés Fuentes Noriega:**

Por sus consejos, apoyo y amistad ofrecidos durante el desarrollo de este trabajo de tesis.  
Gracias.

E



# ÍNDICE GENERAL








## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	vii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b>	1
<b>II. GENERALIDADES</b>	5
<b>2.1. Evaluación de la biodisponibilidad de los medicamentos</b>	6
<b>2.2. Definiciones</b>	8
2.2.1. Equivalente químico	8
2.2.2. Equivalentes farmacéuticos	8
2.2.3. Alternativas farmacéutica	8
2.2.4. Equivalentes terapéuticos	8
2.2.5. Producto innovador	8
2.2.6. Producto genérico	9
2.2.7. Biodisponibilidad	9
2.2.8. Biodisponibilidad absoluta	9
2.2.9. Biodisponibilidad relativa	10
2.2.10. Bioequivalencia	10



<b>2.3. Estudios de bioequivalencia</b>	11
<b>2.4. Piroxicam</b>	18
2.4.1. Propiedades fisicoquímicas	18
2.4.2. Farmacocinética	19
2.4.2.1. Absorción	19
2.4.2.2. Distribución	20
2.4.2.3. Metabolismo	21
2.4.2.4. Excreción	21
2.4.3. Farmacodinamia	22
2.4.3.1. Acción analgésica	22
2.4.3.2. Acción antiinflamatoria	22
2.4.3.3. Acción antipirética	23
2.4.3.4. Mecanismo de acción	23
2.4.3.5. Toxicidad	24
2.4.4. Contraindicaciones	24
2.4.5. Reacciones secundarias y adversas	25
2.4.6. Interacciones medicamentosas y de otro género	25
2.4.7. Precauciones	26
<b>2.5. Métodos analíticos para la cuantificación de piroxicam en fluidos biológicos</b>	27

<b>2.6. Validación de métodos analíticos</b>	<b>30</b>
2.6.1. Linealidad	31
2.6.2. Precisión	31
2.6.3. Exactitud	32
2.6.4. Recuperación absoluta	33
2.6.5. Límite de detección	33
2.6.6. Límite de cuantificación	33
2.6.7. Estabilidad de la muestra	33
2.6.8. Selectividad	34
2.6.9. Tolerancia	34
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>35</b>
<b>3.1. Método analítico para la cuantificación de piroxicam en plasma</b>	<b>36</b>
3.1.1. Estándares	36
3.1.2. Reactivos	36
3.1.3. Equipo	37
3.1.4. Preparación de soluciones	38
3.1.4.1. Solución estándar de piroxicam	38
3.1.4.2. Solución de tenoxicam	38
3.1.4.3. Solución amortiguadora de fosfatos	39
3.1.4.4. Fase móvil	39
3.1.5. Curva de calibración de piroxicam en metanol y plasma	40



<b>3.2. Optimización del método analítico para la cuantificación de piroxicam en plasma</b>	41
3.2.1. Selección de la Longitud de Onda Máxima de Absorción	41
3.2.2. Elección del tipo de columna cromatográfica	41
3.2.3. Optimización de la fase móvil	43
3.2.4. optimización del método de extracción	44
<b>3.3. Validación del sistema</b>	46
3.3.1. Linealidad y Precisión del sistema	46
<b>3.4. Validación del método analítico para cuantificar piroxicam en plasma</b>	48
3.4.1. Linealidad	48
3.4.2. Precisión	49
3.4.3. Exactitud	50
3.4.4. Recuperación absoluta	51
3.4.5. Límite de cuantificación	51
3.4.6. Límite de detección	52
3.4.7. Estabilidad de la muestra analítica	52
3.4.7.1. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente	53
3.4.7.2. Estabilidad de la muestra procesada	53
3.4.7.3. Estabilidad de la muestra en congelación a -20° C	54
3.4.8. Selectividad	55



<b>IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	56
<b>4.1. Optimización del método analítico para la cuantificación de piroxicam en plasma</b>	57
<b>4.2. Validación del sistema</b>	62
4.2.1. Linealidad y Precisión	62
<b>4.3. Validación del método analítico para la cuantificación de piroxicam en plasma</b>	65
4.3.1. Linealidad	65
4.3.2. Precisión	68
4.3.3. Exactitud	72
4.3.4. Recuperación absoluta	74
4.3.5. Límite de cuantificación	76
4.3.6. Límite de detección	78
4.3.7. Estabilidad de la muestra analítica	78
4.3.7.1. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente	78
4.3.7.2. Estabilidad de la muestra procesada	80
4.3.7.3. Estabilidad de la muestra en congelación a -20 ° C	82
4.3.8. Selectividad	84
<b>V. CONCLUSIONES</b>	85
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA</b>	88



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos analíticos publicados para la cuantificación de piroxicam en fluidos biológicos	28
Tabla 2. Curva de calibración de piroxicam en metanol y plasma	40
Tabla 3. Composición de las fases móviles evaluadas	43
Tabla 4. Linealidad y precisión del sistema	63
Tabla 5. Linealidad del método analítico para la cuantificación de piroxicam en plasma	66
Tabla 6. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de piroxicam en plasma	69
Tabla 7. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de piroxicam en plasma	71
Tabla 8. Exactitud del método analítico para la cuantificación de piroxicam en plasma	73
Tabla 9. Porcentaje de recobro de piroxicam	75
Tabla 10. Límite de cuantificación del método analítico para la cuantificación de piroxicam en plasma	77
Tabla 11. Estabilidad de la muestra a temperatura ambiente	79
Tabla 12. Estabilidad de la muestra procesada	81
Tabla 13. Estabilidad de las muestras mantenidas en congelación a $-20^{\circ}\text{C}$	83
Tabla 14. Selectividad del método analítico para la cuantificación de piroxicam en plasma	84





## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de piroxicam	18
Figura 2. Diagrama del proceso de extracción de piroxicam del plasma	45
Figura 3. Solución metanólica conteniendo Piroxicam y Estándar Interno.	60
Figura 4. Blanco de plasma	60
Figura 5. Plasma adicionado con Piroxicam y Estándar Interno	61
Figura 6. Plasma adicionado con ácido salicílico, paracetamol, cafeína, Piroxicam y Estándar Interno.	61
Figura 7. Linealidad del sistema	64
Figura 8. Linealidad promedio del método analítico para cuantificar piroxicam en plasma	67

I  
INTRODUCCIÓN  
Y  
OBJETIVOS





## **I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.**

En México a partir de 1998, se instauró el programa de los medicamentos genéricos intercambiables, el objetivo de este programa fue poner al alcance de la población medicamentos seguros y eficaces a precios accesibles.

Para que los genéricos sean intercambiables, deben cumplir con pruebas de perfil de disolución o bioequivalencia que se rigen por normas establecidas por la Secretaría de Salud. Así, en 1998 se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998 que establece los criterios y requisitos que se deben observar en la realización de las pruebas para demostrar la intercambiabilidad de los medicamentos genéricos.

Para la realización de un estudio de bioequivalencia, se deben cubrir algunos requisitos generales básicos que permitan obtener resultados confiables y así asegurar la confiabilidad de la interpretación que se haga de ellos, estos requisitos son:

- a. Tener un conocimiento lo más completo posible de la farmacocinética del principio activo.
- b. Disponer de un método analítico sensible y específico para seguir el curso temporal del fármaco y diferenciarlo de sus metabolitos.
- c. Aplicar un protocolo experimental estrictamente definido que permita describir el fenómeno en forma precisa y completa.

Dado el gran auge que han tenido los medicamentos genéricos intercambiables en el mercado mexicano, se hace necesario desarrollar metodología analítica sensible y específica con el fin de evaluar la bioequivalencia de estos productos.

El piroxicam, es un fármaco antiinflamatorio no esteroide, indicado en el tratamiento de la artritis reumatoide, la osteoartritis y otras enfermedades músculoesqueléticas en las que se requiere de terapia antiinflamatoria y analgésica. Está incluido en el Cuadro de Básico de medicamentos y en el Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables. Dado a que debe demostrar su intercambiabilidad a través de un estudio de bioequivalencia, está clasificado como un fármaco de tipo C.

Considerando lo mencionado anteriormente, se realizó el presente trabajo cuyos objetivos fueron los siguientes:

- Contar con un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución confiable, rápido y sencillo para la cuantificación de piroxicam en plasma.
  
- Validar el método analítico, de acuerdo a las especificaciones establecidas en la NOM-177-SSA1-1998.

## II

# GENERALIDADES



## **II. GENERALIDADES.**

### **2.1. EVALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE LOS MEDICAMENTOS.**

La noción de la biodisponibilidad del principio activo de un medicamento, nació de la observación de la inequivalencia terapéutica entre dos formulaciones, hasta ese momento consideradas como intercambiables, en razón, de un principio activo común, de una dosis de administración idéntica y de una presentación farmacéutica similar. Diversos incidentes (ineficacia o toxicidad) fueron la causa de esta observación.

La dificultad, y a veces, la imposibilidad de realizar una comparación rigurosa de los resultados terapéuticos de los medicamentos considerados como equivalentes, ha conducido a remarcar el interés, de determinar su biodisponibilidad antes de admitir que son equivalentes o intercambiables<sup>(1)</sup>.

La eficacia de una forma farmacéutica para liberar el principio activo en condiciones adecuadas está relacionada con su capacidad para lograr concentraciones apropiadas en el sitio de acción.

La concentración de fármaco en este sitio de acción no es fácil de medir , ya que muchas veces es inaccesible para tomar muestras que permitan la cuantificación del mismo.

Sin embargo, en los últimos años ha quedado establecido que existe una relación directa entre la concentración de un fármaco en el sitio de acción y la concentración en sangre o plasma<sup>[2]</sup>.

Cuando un medicamento se administra por vía intravenosa, la concentración plasmática alcanzada depende de su distribución y eliminación. Asumiendo que existe una relación directa entre el efecto farmacológico y la concentración plasmática para obtener un efecto óptimo, la dosis del fármaco administrado por vía intravenosa se ajustará teniendo en cuenta estos dos procesos. Por otro lado, si el medicamento es administrado por vía oral, la dosis deberá ajustarse teniendo en cuenta su distribución, eliminación y absorción. Es decir, que por su comparación con la vía intravenosa, la administración de un medicamento por vía oral añade dos variantes: la cantidad de medicamento que alcanza la circulación general y la velocidad con que esto sucede.

**2.2. DEFINICIONES <sup>PI</sup>.**

**2.2.1. Equivalente químico:** son aquellos productos que contienen la misma molécula química.

**2.2.2. Equivalentes farmacéuticos:** son aquellas formas farmacéuticas que contienen la misma cantidad de idéntico ingrediente activo en la misma dosis y en la misma forma farmacéutica, pero no necesariamente los mismos excipientes, las cuales cumplen con los estándares de control de calidad.

**2.2.3. Alternativas farmacéuticas:** son aquellos productos que contienen la misma molécula terapéutica, pero en diferente dosis, diferente forma farmacéutica o diferente sal, las cuales cumplen con los estándares de control de calidad.

**2.2.4. Equivalentes terapéuticos:** productos que presentan la misma eficacia que el producto innovador.

**2.2.5. Producto innovador:** es aquel producto farmacéutico que tiene la patente en el ámbito mundial y fue registrado con la documentación de su eficacia, seguridad y calidad.



**2.2.6. Producto genérico:** producto cuya patente ha vencido y que se comercializa con un nombre genérico o con una marca.

**2.2.7. Biodisponibilidad:** es la medida de la cantidad relativa de fármaco que llega a la circulación general como de la velocidad a la cual ocurre esto.

La biodisponibilidad de un fármaco se define tomando en cuenta los siguientes parámetros<sup>[2]</sup>:

- 1) Concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ).
- 2) Tiempo al cual se alcanza la concentración máxima ( $t_{max}$ ).
- 3) Área bajo la curva de la concentración sanguínea o plasmática en función del tiempo (ABC).

Existen dos tipos de estudios de biodisponibilidad:

**2.2.8. Biodisponibilidad absoluta,** es la comparación de una administración intravenosa vs. una administración extravascular (generalmente en solución). Se lleva a cabo para determinar el efecto de primer paso.



**2.2.9. Biodisponibilidad relativa,** donde se comparan dos productos administrados por vía extravascular.

El problema de biodisponibilidad se plantea cuando los medicamentos se administran por vía extravascular (oral, rectal e intramuscular) ya que requieren de una etapa de absorción. En estas circunstancias, los fármacos de acción sistémica deberán ingresar a la circulación para ser distribuidos al resto del organismo y al sitio de acción, considerando que sólo la introducción directa al sistema vascular puede asegurar la completa disponibilidad fisiológica.

**2.2.10. Bioequivalencia:** se establece cuando dos equivalentes farmacéuticos presentan biodisponibilidad comparable.

Un estudio de bioequivalencia asume que el efecto terapéutico de un fármaco está directamente relacionado con la concentración en plasma del principio activo y con su biodisponibilidad.

Un producto podrá ser registrado como genérico intercambiable, si demuestra ser bioequivalente a aquel que contiene la misma dosis del ingrediente activo, en la misma forma farmacéutica, el cual ha sido previamente aprobado como innovador y se encuentra en el mercado.



### **2.3. ESTUDIOS DE BIOEQUIVALENCIA.**



Durante los últimos años, los estudios de bioequivalencia han empezado a cobrar importancia en México, por esta razón se emitió el Acuerdo por el que se relacionan las especialidades farmacéuticas susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables y se determinan las pruebas que deberán aplicárseles<sup>[3]</sup>, el 19 de marzo de 1998, el cual fue complementado posteriormente por la Convocatoria a las personas interesadas en operar como terceros autorizados para realizar pruebas de intercambiabilidad de medicamentos<sup>[4]</sup>, emitida el 26 de marzo del mismo año.

En el Acuerdo emitido el 19 de marzo de 1998<sup>[3]</sup>, se especifican las pruebas que deberán aplicárseles a los medicamentos susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos intercambiables para acreditar su intercambiabilidad, siendo éstas las de perfil de disolución o de bioequivalencia. Para determinar el tipo de prueba que corresponde a cada medicamento se tomó en cuenta su naturaleza, forma farmacéutica, uso terapéutico y farmacocinética.



Los criterios a tomar en cuenta para determinar el tipo de prueba que deberá aplicarse para considerar a un medicamento como genérico intercambiable, son los siguientes:

- I. Las formas farmacéuticas que no requieren someterse a pruebas de disolución o bioequivalencia son:
  - a. Las soluciones acuosas para uso parenteral en las que se mantengan las condiciones del medicamento innovador.
  - b. Las soluciones orales exentas de excipientes conocidos que modifiquen los parámetros farmacocinéticos.
  - c. Los gases.
  - d. Los productos tópicos de uso no-sistémico, cuya absorción no implique riesgo.
  - e. Los productos para inhalación en solución acuosa.
  - f. Los productos para inhalación en suspensión, que demuestren que el tamaño de la partícula es equivalente con el innovador.
  
- II. Todos los medicamentos sólidos orales, con excepción de los que se encuentren en alguno o más de los supuestos señalados en la siguiente fracción, deberán someterse a pruebas de perfil de disolución.

- 
- III. Los medicamentos que deberán someterse a pruebas de bioequivalencia, son:
- a. Los medicamentos sólidos orales, con fármacos que requieran para su efecto terapéutico de una concentración estable y precisa, por tener un margen terapéutico estrecho.
  - b. Los medicamentos empleados para enfermedades graves.
  - c. Los medicamentos de los cuales se tenga conocimiento, por reportes previos, que tienen problemas de biodisponibilidad, como es el caso cuando presentan una pobre absorción, un efecto de primer paso acentuado, metabolismo hepático mayor del 70%, eliminación presistémica, ventana de absorción y cinética no lineal.
  - d. Los medicamentos que presenten propiedades fisicoquímicas adversas, como baja solubilidad, inestabilidad y otras similares.
  - e. Los medicamentos que tengan una forma farmacéutica de liberación modificada.
  - f. Los medicamentos que presenten una proporción elevada de excipientes respecto del principio activo.
- 

- g. Los medicamentos que sean de administración tópica para efecto sistémico, como supositorios, parches transdérmicos, geles de aplicación en mucosa y otros similares.
- h. Las combinaciones fijas de principios activos para acción sistémica.
- i. Los medicamentos que sean de administración tópica de efecto no sistémico, cuya absorción sea riesgosa, los cuales deberán demostrar mediante un estudio de biodisponibilidad su no-absorción.

Este acuerdo clasifica a los medicamentos susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables de acuerdo a las pruebas que deben cumplir para demostrar su intercambiabilidad como A, B o C.

- A. Corresponde a cumplir lo indicado en el artículo 75 del Reglamento de Insumos para la Salud, con excepción de lo señalado en la fracción III.
- B. Corresponde a cumplir lo indicado en el artículo 75 del Reglamento de Insumos para la Salud, y para efectos de la prueba señalada en la fracción III deberá aplicarse la de perfil de disolución.
- C. Corresponde a cumplir lo indicado en el artículo 75 del Reglamento de Insumos para la Salud, y para efectos de la prueba señalada en la fracción III deberá aplicarse la de bioequivalencia.



El artículo 75 del Reglamento de Insumos para la Salud<sup>(5)</sup>, menciona que se incorporarán al Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables únicamente las especialidades farmacéuticas que reúnan los siguientes requisitos:

- I. Que cuenten con registro sanitario vigente;
- II. Que respecto del medicamento innovador o producto de referencia, tengan la misma sustancia activa y forma farmacéutica, con igual concentración o potencia, utilicen la misma vía de administración y con especificaciones farmacopeicas iguales o comparables;
- III. Que cumplan con las pruebas determinadas por el Consejo de Salubridad General y la Secretaría;
- IV. Que comprueben que sus perfiles de disolución o su biodisponibilidad u otros parámetros, según sea el caso, son equivalentes a los del medicamento innovador o producto de referencia, y
- V. Que estén incluidos en el Cuadro Básico de Insumos para el primer nivel y en el Catálogo de Insumos para el segundo y tercer nivel.



El piroxicam es un fármaco tipo C<sup>[3]</sup>, el cual para ser incorporado al Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables, debe demostrar su intercambiabilidad a través de un estudio de bioequivalencia.

Dado que el piroxicam se encuentra incluido en el Cuadro Básico y en el Catálogo de medicamentos publicado por el Consejo de Salubridad General<sup>[6]</sup>, se considera para el primer nivel de atención médica.





## 2.4. PIROXICAM.

### 2.4.1. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.

**Nombre químico:** 1, 1 - dióxido de 4-hidroxi - 2 - metil - N - 2 - piridinil - 2H - 1,2 - benzotiazina - 3 - carboxamida <sup>[7]</sup>

**Nombre genérico DCI (Denominación Común Internacional):** Piroxicam.

**Nombres comerciales:** Androxicam, Artinor, Citoken, Dixonal, Dolzycam, Facicam, Feldene, Osteral, Oxicanol, Piroxan, Rogal<sup>®</sup>

**Fórmula estructural:**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

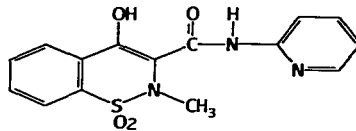


Figura 1. Estructura del piroxicam



**Fórmula condensada:**  $C_{15}H_{13}N_3O_4S$ .

**Peso molecular:** 331.35 g/mol.

**Solubilidad:** poco soluble en agua, ácidos diluidos y en la mayoría de los solventes orgánicos. Ligeramente soluble en alcohol y en soluciones acuosas alcalinas [9]

**pKa :** 1.8 y 5.1

**Punto de fusión:** 198 – 200 ° C [7]

## **2.4.2. FARMACOCINÉTICA** [8, 10, 11, 12]

### **2.4.2.1. Absorción.**

El piroxicam se absorbe bien después de una administración oral o rectal, y en término de 2 a 4 horas se alcanza la concentración máxima en plasma. La administración oral del compuesto junto con alimento produce un ligero retraso en la velocidad de absorción, pero no influye sobre la magnitud de la misma. Hay recirculación enterohepática del fármaco y su vida media en plasma es de aproximadamente 50 horas.



Después de la administración cada 24 horas, se mantienen concentraciones plasmáticas estables durante todo el día.

Las concentraciones plasmáticas del fármaco son proporcionales con las dosis de 10 y 20 mg.

Una dosis de 20 mg produce, por lo general, concentraciones plasmáticas máximas de 1.5 a 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ <sup>(13)</sup>, mientras que las concentraciones plasmáticas máximas después de la ingestión repetida de 20 mg por día se estabilizan habitualmente entre 3.0 y 8.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La mayoría de los pacientes alcanzan niveles plasmáticos en el estado estacionario entre los 7 y 12 días.

#### **2.4.2.2. Distribución.**

Después de absorbido, el piroxicam se une en un 99 % a proteínas plasmáticas.

El volumen de distribución es de alrededor de 0.12 a 0.14 L/kg; en estado de equilibrio dinámico (después de 7 a 12 horas) son aproximadamente iguales las concentraciones del fármaco en plasma y en líquido sinovial.





#### **2.4.2.3. Metabolismo.**

El piroxicam se metaboliza extensamente en el organismo por hidroxilación, hidrólisis del enlace amida, descarboxilación, ciclohídratación, contracción del anillo y N-desmetilación.

La principal vía de biotransformación en seres humanos es la hidroxilación del anillo piridil, mediada por citocromo P450 (predominantemente por la isoenzima de la subfamilia CYP2C); el metabolito formado se conjuga con el ácido glucurónico.

El metabolito hidroxilado (5'-hidroxipiroxicam), el principal producto de biotransformación, posee aproximadamente 1 % de la actividad de piroxicam.

#### **2.4.2.4. Excreción.**

El metabolito hidroxilado y su conjugado glucurónico, constituyen el 60 % del fármaco que se excreta principalmente por orina y heces, no más del 5 % de la dosis se excreta como piroxicam inalterado.

La cinética de eliminación del fármaco se ajusta a un modelo abierto de un compartimiento.



### 2.4.3. FARMACODINAMIA.

El piroxicam es un agente antiinflamatorio no esteroide que posee propiedades analgésicas y antipiréticas <sup>[8]</sup>.

**2.4.3.1. Acción analgésica.** En el humano, en pacientes afectados de dolor somático, como en los casos de fracturas, esguinces, dolor postoperatorio, posparto, se obtiene una disminución evidente de la intensidad del mismo; también produce una analgesia satisfactoria en las afecciones reumáticas, como la artritis reumatoide, artrosis, espondilitis anquilosante y fibrositis.

**2.4.3.2. Acción antiinflamatoria.** La acción antiinflamatoria se observa, principalmente, en las afecciones reumáticas crónicas del tipo inflamatorio, como la artritis reumatoide del adulto y juvenil -acción antirreumática-, en cuyo caso, no solamente disminuye el dolor espontáneo y por compresión articular, sino también la tumefacción, la rigidez y la limitación de los movimientos articulares. También cede el proceso inflamatorio en el ataque agudo de gota, con alivio del dolor, tumefacción y restricción del movimiento.



**2.4.3.3. Acción antipirética.** Esta acción es similar a la de los salicilatos, con disminución de la temperatura corporal en los casos de fiebre, como puede observarse en animales de laboratorio y en el hombre. En los primeros, se comprueba en la fiebre producida por inyección de sustancias pirogénicas, en este caso, el piroxicam es 5 veces menos potente que el ácido acetilsalicílico y esta baja potencia excluye su uso como antipirético en el hombre<sup>(11)</sup>.

**2.4.3.4. Mecanismo de acción.**

El piroxicam es un inhibidor competitivo reversible de las actividades de la ciclooxigenasa-1 (COX-1; constitutiva que aparece en vasos sanguíneos, estómago y riñones) y ciclooxigenasa-2 (COX-2; inducida en el sitio de la inflamación por citocinas y mediadores inflamatorios.), y con ello la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos<sup>(14)</sup>.

El piroxicam inhibe de manera no selectiva a la COX-1 y COX-2, pero posee pequeña selectividad por la ciclooxigenasa constitutiva COX-1. Se piensa que la inhibición de COX-2 media (cuando menos parcialmente) las acciones antipirética, analgésica y antiinflamatoria, pero la inhibición simultánea de COX-1 ocasiona efectos colaterales no deseados, como úlceras gástricas que son consecuencia de la disminución en la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos<sup>(10)</sup>.



#### **2.4.3.5. Toxicidad<sup>(6)</sup>.**

Se han llevado a cabo estudios de toxicidad subaguda y crónica en ratas, ratones, perros y monos utilizando dosis que han variado de 0.3 mg/kg/día hasta 25 mg/kg/día. Esta última dosis sobrepasa aproximadamente en 90 veces la recomendada en humanos. Los únicos cambios patológicos observados han sido aquellos que característicamente se asocian en el animal con la toxicología de los agentes antiinflamatorios no esteroides, es decir, necrosis papilar renal y lesiones gastrointestinales.

#### **2.4.4. CONTRAINDICACIONES<sup>(6)</sup>.**

1. Úlcera péptica activa.
2. No debe administrarse piroxicam a pacientes con hipersensibilidad al fármaco. Existe una potencial sensibilidad cruzada con el ácido acetilsalicílico y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). No debe administrarse piroxicam a pacientes en quienes el ácido acetilsalicílico y otros AINEs hayan inducido síntomas de asma, pólipos nasales, angioedema o urticaria.
3. No deben aplicarse supositorios en aquellos pacientes con lesiones inflamatorias ano-rectales, ni en pacientes que hayan sufrido de sangrado rectal o anal reciente.



#### **2.4.5. REACCIONES SECUNDARIAS Y ADVERSAS<sup>[8,13]</sup>.**

El piroxicam por lo general es bien tolerado. Los síntomas gastrointestinales son los efectos secundarios más comúnmente encontrados, pero en la mayoría de los casos no interfieren en la continuación del tratamiento. Estas reacciones adversas incluyen: estomatitis, anorexia, malestar abdominal, flatulencia, diarrea, dolor abdominal e indigestión. Se ha informado de sangrado gastrointestinal, perforación y ulceración.

En raras ocasiones se ha informado de reacciones de hipersensibilidad como anafilaxia, broncoespasmo, urticaria, angioedema, vasculitis así como alteraciones metabólicas como: hipoglucemia, aumento o disminución del peso corporal.

#### **2.4.6. INTERACCIONES MEDICAMENTOSAS Y DE OTRO GÉNERO<sup>[8]</sup>.**

Los AINEs pueden causar retención de sodio, potasio y agua. Pueden interferir con la acción natriurética de los diuréticos, por lo tanto, estos fármacos pueden agravar a pacientes con insuficiencia cardíaca o hipertensión.







## **2.5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PIROXICAM EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.**

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), es una de las técnicas de mayor aplicación en el área clínica y farmacéutica, empleada<sup>7</sup> para el análisis rutinario de fármacos y sus metabolitos en fluidos biológicos <sup>115)</sup>, debido a su sensibilidad y especificidad.

Para la cuantificación de piroxicam en fluidos biológicos, los métodos más usados son los que emplean la cromatografía de líquidos de alta resolución de fase reversa.

En la tabla 1 se muestran los métodos analíticos por CLAR publicados hasta la fecha para el análisis cualitativo y cuantitativo de este fármaco en diferentes fluidos biológicos.

**Tabla 1. MÉTODOS ANALÍTICOS PUBLICADOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PIROXICAM EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.**

Referencia	Año	Columna	Fluido biológico	Volumen de muestra (mL)	Estándar Interno ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
Twomey y cols. <sup>[116]</sup>	1980	$\mu\text{Bondapak CN}$	Plasma	0.1	Isoxicam (10)
Dixon y cols. <sup>[117]</sup>	1984	LiChrosorb RP-8	Plasma	1.0	Tenoxicam (100)
Richardson y cols. <sup>[118]</sup>	1986	$\mu\text{Bondapak CN}$ para plasma $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ para orina	Plasma y orina	0.5 (plasma) 1.0 (orina)	Isoxicam (10)
Macek y Vacha <sup>[119]</sup>	1987	Separon Six CN	Plasma	0.2	
Ibrahim y Boudinot <sup>[120]</sup>	1988	Econosphere	Plasma	1.0	6-metilpiroxicam (500)
Gillian y cols. <sup>[121]</sup>	1989	Spherisorb $\text{C}_{18}$	plasma	0.5	Naproxeno (10)
Saedd y Becher <sup>[122]</sup>	1991	Supelcosil $\text{LC}_{18}\text{DB}$	Plasma	0.02	
Milligan <sup>[123]</sup>	1992	Techsil $\text{C}_{10}\text{CN}$	Plasma, orina y bilis	0.5 (plasma) 0.5 (orina) 0.5 (bilis)	Isoxicam (100)
Cerretani y cols. <sup>[124]</sup>	1993	Novapak $\text{C}_{18}$	Plasma, músculo y piel	1.0 de plasma o tejido	Isoxicam (100)
Avgerinos y cols. <sup>[125]</sup>	1995	Spherisorb $\text{C}_{18}$	Plasma y orina	0.5 (plasma) 1.0 (orina)	Naproxeno (15)
Amanlou y cols. <sup>[126]</sup>	1997	$\mu\text{Bondapak ODS C}_{18}$	Plasma	1.0	Tenoxicam (40)
Hirai y cols. <sup>[127]</sup>	1997	Inertsil ODS-2	Orina	1.0	Indometacina (20)
Yritia y cols. <sup>[128]</sup>	1999	Kromasil $\text{C}_{18}$	Plasma	0.2	Tenoxicam (30 ng/ $\mu\text{L}$ )



Continuación . . .

Solvente de extracción	Volumen de inyección (µL)	Detección	Recobro (%)	Rango lineal (µg/mL)
Éter dietílico	100	UV (365 nm)	E. I., 74 Piroxicam, 77	0.5 - 20
Diclorometano	20	UV (361 nm)	E. I., 81 Piroxicam, 81	0.2 - 20
Éter dietílico	50	UV (365 nm) Plasma  Orina	E. I., 90 Piroxicam, 85 5-hidroxi- piroxi- cam, 90 Piroxicam, 86 5-hidroxi- piroxi- cam, 84	0.05 - 5  0.1 - 5
– (precipitación)	50	UV (360 nm)		0.27 - 10.8
Cloruro de metileno	5 - 200	UV (360 nm)	Piroxicam, 91	0.002 - 50
Éter dietílico	100	UV (360 nm)	Piroxicam, 100	0.25 - 5
Bond Elut C <sub>2</sub> (fase sólida)	–	UV (331 nm)	Piroxicam, 95 - 97	1 - 25
Éter dietílico	50	UV (365 nm) Plasma Orina Bilis	E. I., 91 Piroxicam: 93 99 91	0.05 - 20 0.05 - 20 0.05 - 20
– (precipitación)	20	UV (313 nm) Plasma Músculo Piel	Piroxicam: 88 90 93	0.1 - 60 0.1 - 40 0.1 - 250
– (precipitación)	100	UV (330 nm) Plasma Orina	–	0.05 - 20 0.05 - 10
Éter dietílico	40	UV (361 nm)	Piroxicam, 82±6	0.2 - 20
Sep-Pak Silica (fase sólida)	10 - 30	UV (320 nm)	Piroxicam, 88	0.24 - 6
Bond Elut C <sub>18</sub>	50	UV (360 nm)	E. I., 78.5±9.06 piroxicam, 90	0.05 - 2.5



## 2.6. VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

El método analítico empleado para la determinación cuantitativa de un fármaco y /o sus metabolitos en muestras biológicas, tiene un papel muy importante en la evaluación e interpretación de los datos en un estudio de biodisponibilidad, bioequivalencia o farmacocinética.

Es de gran importancia que el método analítico esté validado con el fin de garantizar la veracidad y confiabilidad de los resultados derivados de dichos estudios<sup>[15, 29, 30]</sup>.

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por medio de estudios de laboratorio, que las características de comportamiento del método, cumple con el propósito para el que fue diseñado, estas características se expresan en términos de parámetros de validación<sup>[31]</sup>.

Los parámetros analíticos que se incluyen como mínimo en la validación de un método son los siguientes: linealidad, precisión (evaluada como repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, recuperación absoluta, límite de detección, límite de cuantificación, estabilidad de la muestra analítica, selectividad, tolerancia.



A continuación se presenta la definición de cada uno de los parámetros de validación mencionados<sup>(32)</sup>.

#### **2.6.1. Linealidad.**

La linealidad es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.

La relación matemática entre concentración y respuesta, debe ser continua y reproducible en el intervalo de concentraciones de trabajo.

#### **2.6.2. Precisión.**

La precisión es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

**A. Repetibilidad,** es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.



**B. Reproducibilidad intralaboratorio**, es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas.

### 2.6.3. Exactitud.

La exactitud de un método analítico, es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

Se evalúa a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, determinando la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones de cada nivel de concentración, con respecto a la concentración nominal de la muestra.

Se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{Desv. Absoluta} = \left| \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración promedio experimental}}{\text{Concentración nominal}} \right| \times 100$$



#### **2.6.4. Recuperación absoluta.**

La recuperación absoluta, es la eficiencia que presenta un método analítico para cuantificar un compuesto, en relación con la proporción de éste que puede ser extraída a partir de una matriz biológica

#### **2.6.5. Límite de detección.**

El límite de detección, es la mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.

#### **2.6.6. Límite de cuantificación.**

El límite de cuantificación de un método analítico, es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

#### **2.6.7. Estabilidad de la muestra.**

La estabilidad de la muestra analítica, es la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.





#### **2.6.8. Selectividad.**

La selectividad es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

#### **2.6.9. Tolerancia.**

La tolerancia es la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.



# III

# PARTE

# EXPERIMENTAL



### **III. PARTE EXPERIMENTAL.**

#### **3.1. MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PIROXICAM EN PLASMA.**

##### **3.1.1. ESTÁNDARES.**

- ◆ Piroxicam. Sigma - Aldrich, lote 126H0820.
- ◆ Tenoxicam (Estándar Interno). Sigma – Aldrich, lote 50K0767.

##### **3.1.2. REACTIVOS.**

- ◆ Fosfato de sodio monobásico monohidratado, J.T. Baker.
- ◆ Alcohol metílico R.A., Mallinckrodt.
- ◆ Alcohol metílico grado HPLC, Mallinckrodt.
- ◆ Acetonitrilo grado HPLC, Mallinckrodt.
- ◆ Agua desionizada, grado HPLC.
- ◆ Ácido fosfórico concentrado, pureza 85%, Mallinckrodt.
- ◆ Diclorometano R.A., Mallinckrodt.



### 3.1.3. EQUIPO

- ◆ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu equipado con:
  - Sistema controlador, modelo LC - 10 AT.
  - Detector de longitud de onda variable UV-VIS, modelo SPD-10 AV.
  - Autoinyector, modelo SIL - 10 A.
  - Bomba isocrática, modelo LC - 10 AT.
- ◆ Columna Hypersil ThermoQuest ODS  $C_{18}$ , 200 x 4.6 mm D. I., 5  $\mu$ m.
- ◆ Balanza Analítica Sartorius.
- ◆ Baño de agua Imperial IV, Lab - Line, modelo 18000.
- ◆ Potenciómetro Orion Research, modelo 301.
- ◆ Ultrasonido Sonicor, modelo SC - 311TH.
- ◆ Milli - Q Water System Millipore.
- ◆ Micropipeta Eppendorf de 500 a 5 000  $\mu$ L.
- ◆ Micropipeta Eppendorf de 100 a 1 000  $\mu$ L.
- ◆ Micropipeta Eppendorf de 50 a 250  $\mu$ L.
- ◆ Centrifuga Eppendorf, modelo 5120.
- ◆ Agitador horizontal Lab - Line, modelo 3520.
- ◆ Agitador Vortex Thermolyne Maxi Mix II, modelo M37615.
- ◆ Sistema de filtración de líquidos Millipore.

◆ Membranas Millipore:

- HVLP 04700 para solventes acuosos y metanol de 0.45  $\mu\text{m}$ .
- GVHP 04700 para solventes orgánicos de 0.22  $\mu\text{m}$ .

**3.1.4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.**

**3.1.4.1. Solución estándar de piroxicam.**

Pesar con exactitud 10 mg de piroxicam; transferir la pesada cuidadosamente a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con metanol R.A. y aforar con el mismo disolvente.

Esta solución tiene una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$ .

**3.1.4.2. Solución de tenoxicam (estándar interno).**

Pesar exactamente 1 mg de tenoxicam; transferir la pesada cuidadosamente a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con metanol R.A. y aforar con el mismo disolvente.

La concentración de esta solución es de 10  $\mu\text{g/mL}$ .



#### **3.1.4.3. Solución amortiguadora de fosfatos 0.1M, pH 2.5.**

Pesar con exactitud 13.8 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), transferir la pesada cuidadosamente a un matraz volumétrico de 1 000 mL, disolver y aforar con agua desionizada grado HPLC. Ajustar el pH de la solución a 2.5 con ácido fosfórico concentrado.

#### **3.1.4.4. Fase móvil.**

La fase móvil consiste de una mezcla de metanol – acetonitrilo – solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 2.5 ( 20 : 25 : 55 v/v).

Medir en una probeta de 1 000 mL, 200 mL de metanol grado HPLC, 250 mL de acetonitrilo grado HPLC y 550 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 2.5. Filtrar cada uno de los componentes de la fase móvil en el sistema de filtración de líquidos Millipore. Mezclar y degasificar la fase empleando un equipo de ultrasonido durante 30 minutos.



### 3.1.5. CURVA DE CALIBRACIÓN DE PIROXICAM EN METANOL Y PLASMA.

En la tabla 2 se muestra la preparación de la curva de calibración de piroxicam en metanol y en plasma.

El intervalo de concentraciones para la curva, es de 0.10 a 5.0  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 2. CURVA DE CALIBRACIÓN DE PIROXICAM EN METANOL Y EN PLASMA.**

SOLUCIÓN	ALÍCUOTA ( $\mu\text{L}$ ) DE LA SOL. ESTÁNDAR DE PIROXICAM 100 $\mu\text{g/mL}$	AFORO CON METANOL R. O PLASMA (mL)	CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	500	10	5.0
2	$\varphi^1$ 5000	10	2.50
3	$\varphi^2$ 2000	10	1.00
4	$\varphi^3$ 5000	10	0.50
5	$\varphi^4$ 5000	10	0.25
6	$\varphi^5$ 4000	10	0.10

$\varphi^1$  Tomar 5 mL de la solución de 5.0  $\mu\text{g/mL}$ .

$\varphi^2$  Tomar 2 mL de la solución de 5.0  $\mu\text{g/mL}$ .

$\varphi^3$  Tomar 5 mL de la solución de 1.0  $\mu\text{g/mL}$ .

$\varphi^4$  Tomar 5 mL de la solución de 0.50  $\mu\text{g/mL}$ .

$\varphi^5$  Tomar 4 mL de la solución de 0.25  $\mu\text{g/mL}$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### **3.2. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PIROXICAM EN PLASMA.**

El método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar piroxicam en plasma empleado, se basó en los métodos descritos por Dixon, J., Lowe, J., Galloway, D. <sup>[17]</sup> y Amanlou, M., Dehpour, A. <sup>[26]</sup>.

#### **3.2.1. Selección de la longitud de onda máxima de absorción.**

Para identificar la longitud de onda más adecuada para la cuantificación de piroxicam, se realizó un barrido espectrofotométrico en la región de 280 a 400 nm del UV.

#### **3.2.2. Elección del tipo de columna cromatográfica.**

Se realizaron pruebas con las siguientes columnas cromatográficas:

- Spherisorb ODS 2 C<sub>18</sub>, 250 x 4.6 mm D. I., 5 μm, Waters.
- Hypersil ODS C<sub>18</sub>, 200 x 4.6 mm D. I., 5 μm, ThermoQuest.

La diferencia entre ambas columnas radica principalmente en la pureza de la sílica y en la longitud de éstas.







Para la elección de la columna, se consideraron los siguientes parámetros de respuesta:

**1. Tiempo de retención ( $T_r$ ) de piroxicam:**

- Obtener una respuesta cromatográfica del fármaco, libre de señales de compuestos endógenos.
- Análisis de la muestra analítica en tiempos cortos, debido a que un estudio de bioequivalencia requiere de un método analítico que permita el análisis confiable y rápido de numerosas muestras.

**2. Simetría  $< 2$**  <sup>[31]</sup>, para determinar la deformación y el coleado del pico, ya que la obtención de picos muy anchos y mal definidos se traduce en una integración errónea de los mismos, y por lo tanto, en una cuantificación inadecuada del fármaco.

**3. Factor de capacidad  $2 < K' < 6$**  <sup>[31]</sup>, como un indicador del grado de retención de piroxicam entre la fase estacionaria y la fase móvil.



### 3.2.3. Optimización de la fase móvil.

Se evaluaron siete fases móviles diferentes; la composición de cada una de ellas se muestra en la siguiente tabla.

**Tabla 3 . COMPOSICIÓN DE LAS FASES MÓVILES EVALUADAS**

<b>FASE MÓVIL</b>	<b>COMPOSICIÓN</b>	<b>PROPORCIÓN (v / v)</b>
1	Metanol: Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, pH 2.0	50 : 50
2	Metanol: Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 2.0	50 : 50
3	Ácido 1-heptansulfónico 5 mM en Metanol: Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 2.0	45 : 55
4	Metanol: solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M, pH 2.0	45 : 55
5	Metanol: Solución amortiguadora de fosfatos 0.5 M, pH 2.0	40 : 60
6	Acetonitrilo: Metanol: Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 2.5	10 : 35 : 55
7	Acetonitrilo: Metanol: Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 2.5	25 : 20 : 45

El criterio empleado para la elección de la fase móvil, se basó en aquella que proporcionara mejores tiempos de retención, mayor definición y resolución a los picos, con el fin de poder cuantificar el fármaco adecuadamente, contar con una buena separación de los picos y un análisis rápido de la muestra plasmática.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



#### 3.2.4. Optimización del método de extracción.

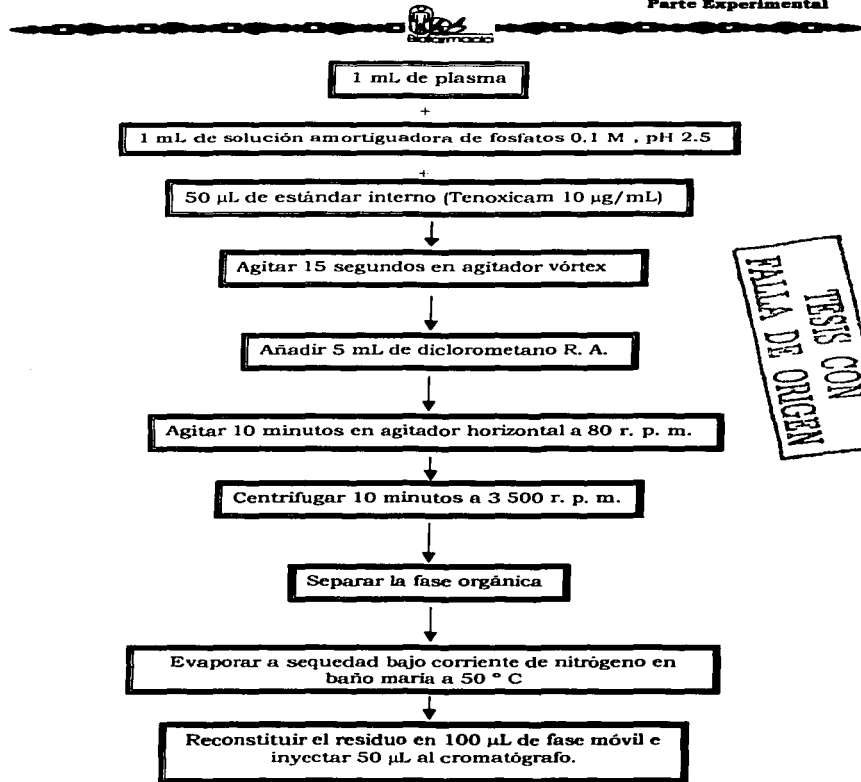
Tomando como base los métodos de extracción empleados por Dixon, J. y cols. <sup>[17]</sup> y M. Amanlou y cols. <sup>[26]</sup>, se estableció la siguiente técnica de extracción para piroxicam del plasma, utilizando 1 mL de plasma para realizar el análisis:

En un tubo de ensayo de 10 mL con tapón de rosca, colocar 1 mL de plasma, 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 2.5 y 50  $\mu$ L de la solución de estándar interno (Tenoxicam 10  $\mu$ g/mL), agitar la muestra durante 15 segundos en agitador vórtex y añadir 5 mL de diclorometano R.A. Agitar durante 10 minutos a 80 r.p.m. en agitador horizontal y centrifugar a 3 500 r.p.m., durante 10 minutos.

Transferir la fase orgánica a un tubo de ensayo de 10 mL, empleando para ello, una pipeta Pasteur de punta larga. Evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno en baño maría a 50 ° C.

El residuo se reconstituye en 100  $\mu$ L de fase móvil y se inyectan 50  $\mu$ L al cromatógrafo.

En la figura 2 se muestra el diagrama del método analítico empleado para la extracción del piroxicam.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 2. Diagrama del proceso de extracción de proxicam en plasma



### **3.3. VALIDACIÓN DEL SISTEMA.**

Con el propósito de contar con un método analítico confiable, se procedió a su validación, iniciando con la validación del sistema, para lo cual, se evaluaron los parámetros de linealidad y precisión.

#### **3.3.1. LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA.**

Para evaluar la linealidad del sistema, se prepararon, a partir de pesadas independientes, tres curvas de calibración de piroxicam en metanol de seis concentraciones diferentes, en el intervalo de 0.10 a 5.0 µg/mL.

De cada solución, se tomó 1 mL y se colocó en un tubo de ensayo de 10 mL, se adicionaron 50 µL de E.I. y se agitó durante 10 segundos en agitador vórtex; las muestras se evaporaron a sequedad en baño maría a 50 ° C, bajo corriente de nitrógeno; el residuo se reconstituyó en 100 µL de fase móvil y se inyectaron 50 µL al cromatógrafo.



Para cada curva de calibración, se determinó la relación de alturas de los picos (altura piroxicam /altura estándar interno) y se graficó el cociente con respecto a la concentración de piroxicam. Por medio de un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, se determinó la ordenada al origen (b), la pendiente (m), coeficiente de correlación (r) y el error relativo debido a la regresión lineal.

Se considera que el sistema es lineal, si el coeficiente de correlación (r) es mayor o igual a 0.99 y el error relativo debido a la regresión lineal menor o igual al 2 %.

Para evaluar la precisión del sistema, se emplearon los datos de linealidad, para los cuales el coeficiente de variación del factor de respuesta debe ser igual o menor al 2 %



### **3.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR PIROXICAM EN PLASMA.**

Para comprobar que el método analítico es confiable para la cuantificación de piroxicam, éste se validó siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM - 177 - SSA1 - 1998<sup>[32]</sup>, en el apartado que se refiere a la validación de métodos analíticos para realizar estudios de bioequivalencia. Los parámetros evaluados fueron los que se describen a continuación:

#### **3.4.1. LINEALIDAD DEL MÉTODO.**

La linealidad del método se evaluó preparando a partir de pesadas independientes, tres curvas de calibración de piroxicam en plasma, en el intervalo de concentraciones de 0.10 a 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las muestras se procesaron de acuerdo al método descrito en la sección 3.2-D. Para cada curva de calibración, se graficó la relación de alturas (altura de piroxicam / altura E. I. ) con respecto a la concentración de piroxicam y por medio de un ajuste de mínimos cuadrados, se determinó: ordenada al origen (b), pendiente (m), y coeficiente de correlación (r).

El método se consideró lineal, si el coeficiente de correlación (r) fue mayor o igual a 0.99.





### 3.4.2. PRECISIÓN DEL MÉTODO.

La precisión del método se evaluó con los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio, analizando tres concentraciones conocidas de piroxicam en plasma: alta, media y baja (4.0, 1.5 y 0.15  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), las cuales eran diferentes a las de la curva de calibración pero se encontraban dentro del intervalo de concentraciones.

#### A. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.

La repetibilidad del método se evaluó analizando en un mismo día por quintuplicado, tres concentraciones conocidas de piroxicam (0.15, 1.5 y 4.0  $\mu\text{g/mL}$ ), bajo las mismas condiciones de equipo, laboratorio y analista. Las muestras se procesaron de acuerdo al procedimiento mencionado en la sección 3.2-D.

Para cada nivel de concentración, se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

El método es repetible, si el coeficiente de variación no es mayor al 15 %.





## **B. REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.**

Para determinar la reproducibilidad del método, las tres concentraciones conocidas de piroxicam en plasma 0.15, 1.5 y 4.0  $\mu\text{g/mL}$ , se analizaron por duplicado durante tres días, bajo las mismas condiciones de equipo, laboratorio y analista.

Para cada nivel de concentración, se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Se consideró que el método era reproducible, si el coeficiente de variación no era mayor al 15 %.

### **3.4.3. EXACTITUD DEL MÉTODO.**

La exactitud del método se evaluó a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, al determinar la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones de cada nivel de concentración, con respecto a la concentración nominal de la muestra.

El método se consideró exacto, si el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad se encontraban dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración.



#### **3.4.4. RECUPERACIÓN ABSOLUTA.**

Se determinó preparando por triplicado en metanol y en plasma, tres concentraciones conocidas de piroxicam: 4.0, 1.5 y 0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (alta, media y baja, respectivamente) . Las muestras en metanol se procesaron como se menciona en la sección 3.3.1 y en el caso de las muestras plasmáticas se utilizó el método de extracción ya mencionado.

Para determinar el porcentaje de piroxicam recuperado, se comparó la altura del pico obtenida en plasma con respecto a la altura obtenida en metanol (considerando ésta como el 100 por ciento en cada caso), para cada nivel de concentración.

#### **3.4.5. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.**

Para evaluar este parámetro, se preparó por quintuplicado la concentración más baja de piroxicam en plasma (0.10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y de los resultados obtenidos, se determinó el coeficiente de variación y la desviación absoluta.

Se consideró que es el límite de cuantificación, si el valor promedio de las cinco repeticiones se encontraba dentro del  $\pm 20 \%$  del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que el 20 % y la señal era 5 veces mayor a la del ruido.



#### **3.4.6. LÍMITE DE DETECCIÓN.**

Para evaluar el límite de detección del método, se realizaron diluciones de la solución de piroxicam 0.10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en plasma para obtener las concentraciones 0.025 y 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se estableció como límite de detección, la concentración de piroxicam cuya señal fue tres veces mayor a la del ruido.

#### **3.4.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA.**

Para evaluar la estabilidad de piroxicam, se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo en las que éste permaneció estable en plasma durante su manejo, almacenamiento y procesamiento; se evaluó la respuesta de muestras preparadas por duplicado a tres niveles de concentración: alto, medio y bajo dentro del intervalo de trabajo, en las siguientes condiciones:



#### **3.4.7.1. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A TEMPERATURA AMBIENTE.**

Para evaluar la estabilidad de las muestras a temperatura ambiente, se prepararon por duplicado muestras de piroxicam en plasma con concentraciones de 4.0, 1.5 y 0.15  $\mu\text{g/mL}$ , las cuales se procesaron e inyectaron inmediatamente después de su preparación. El volumen restante de las muestras plasmáticas, se mantuvo a temperatura ambiente para ser procesadas e inyectadas nuevamente a las 12 y 24 horas posteriores a su preparación.

#### **3.4.7.2. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA.**

Este parámetro se evaluó preparando por duplicado, muestras de piroxicam en plasma con concentraciones de 4.0, 1.5 y 0.15  $\mu\text{g/mL}$ , las cuales fueron procesadas y el residuo reconstituido en fase móvil, se conservó a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron al tiempo cero, 24 y 48 horas posteriores a su preparación.



### **3.4.7.3. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DURANTE 3 CICLOS DE CONGELACIÓN - DESCONGELACIÓN.**

Se prepararon por duplicado, muestras de piroxicam con concentraciones de 4.0, 1.5 y 0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en plasma, las cuales se mantuvieron en congelación a  $-20^\circ\text{C}$ . El análisis de las muestras se realizó al tiempo cero, a los 15, 30 y 60 días posteriores a su preparación.

De acuerdo a las especificaciones, el piroxicam es estable en plasma en las condiciones de temperatura y tiempo evaluadas durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, si los resultados obtenidos se encuentran dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración y el coeficiente de variación no es mayor al  $15\%$ .



#### **3.4.8. SELECTIVIDAD DEL MÉTODO.**

Para establecer la selectividad del método analítico, se analizó una muestra blanco de plasma y muestras de plasma a las cuales se les adicionó ácido salicílico, paracetamol y cafeína, a una concentración de 100 µg/mL; las muestras se procesaron de acuerdo al método de extracción mencionado en la sección 3.2 - D.

Para que el método se considere selectivo, no deben existir interferencias en la cuantificación de piroxicam.



**IV**

**RESULTADOS**

**Y**

**ANÁLISIS DE**

**RESULTADOS**



## **IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.**

### **4.1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PIROXICAM EN PLASMA.**

Los resultados obtenidos de la optimización del método analítico fueron los siguientes:

- El espectro de absorción de piroxicam en metanol, mostró respuestas aceptables a 325 y 360 nm; se decidió analizar las muestras a 360 nm debido a que a esta longitud de onda se registra menor interferencia con las señales de ruido.







- ☐ Se seleccionó la columna Hypersil ThermoQuest ODS  $C_{18}$ , 200 x 4.6 mm de diámetro interno y 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, debido a que presentó una mejor resolución en la respuesta cromatográfica para piroxicam en relación a la obtenida con la columna Spherisorb ODS2, aunque esta última presentaba mayor número de platos teóricos y una sílice de mayor pureza.
- ☐ Después de haber seleccionado la columna cromatográfica, se optimizó la fase móvil seleccionando la siguiente mezcla:  
Metanol : Acetonitrilo: Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 2.5 en la siguiente proporción: 20:25:55 v/v, respectivamente en base a los siguientes resultados: tiempos de retención de 4.07 minutos para el estándar interno y 9.63 minutos para piroxicam; la simetría para ambos picos fue de 1 y la resolución entre los picos fue de 3.
- ☐ Se eligió al tenoxicam como estándar interno, ya que su absorción al UV es cercana a 360 nm y su estructura química es muy similar a la del piroxicam.



- ▣ Con el método de extracción propuesto se obtuvo un alto porcentaje de recuperación del fármaco, la presencia prácticamente nula de impurezas en el cromatograma y una buena repetibilidad de los resultados.

Por lo tanto, las condiciones cromatográficas para el análisis de las muestras fueron las siguientes:

**CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS:**

Columna Hypersil, ThermoQuest ODS C<sub>18</sub>, 200 x 4.6 mm de diámetro interno y 5 µm tamaño de partícula.

Fase móvil: Metanol : Acetonitrilo : Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 2.5 (20 : 25 : 55 v/v).

Longitud de onda: 360 nm.

Velocidad de flujo: 1 mL/min.

Tiempo de corrida: 12 minutos.

Volumen de inyección: 50 µL.



En las figuras 3 - 6, se muestran los cromatogramas típicos de:

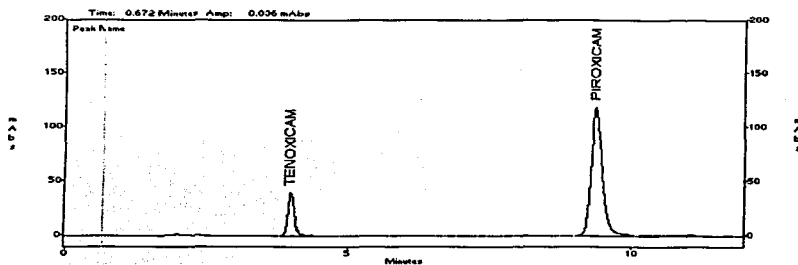


Figura 3. Solución metanólica conteniendo Piroxicam y Estándar Interno.

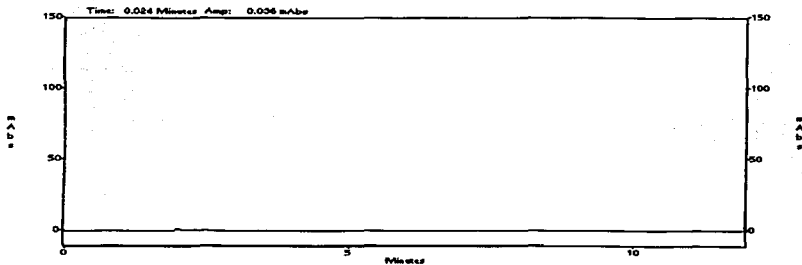


Figura 4. Blanco de plasma.

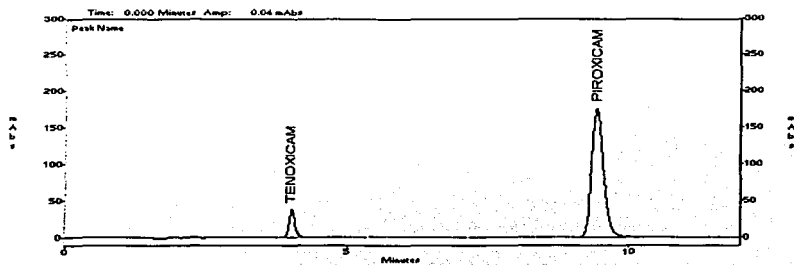


Figura 5. Plasma adicionado con Piroxicam y Estándar interno.

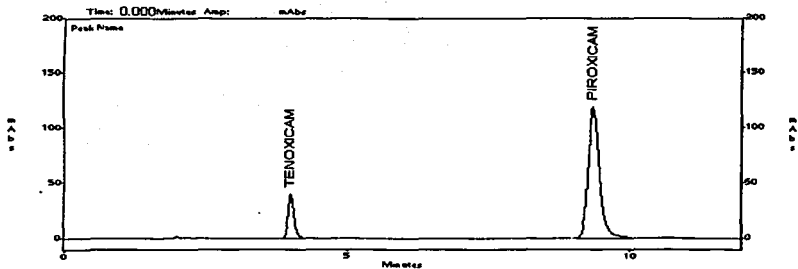


Figura 6. Plasma adicionado con ácido acetilsalicílico, acetaminofén, piroxicam y estándar interno.



#### **4.2. VALIDACIÓN DEL SISTEMA.**

Para determinar la concentración de piroxicam en las muestras plasmáticas , se eligió la relación de alturas en lugar de la relación de áreas bajo la curva de los picos, dado la variación en los resultados fue menor.

##### **4.2.1. LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA.**

En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la linealidad del sistema. Los resultados muestran que los coeficientes de variación se encuentran entre el 0.55 % y el 1.8 %; el valor promedio del coeficiente de regresión lineal ( $r$ ) es de 0.9993 y el valor del error relativo debido a la regresión lineal promedio es de 0.0519; por lo que de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos, que indican que los coeficientes de variación no deben ser mayores al 2%, que el coeficiente de regresión lineal debe ser mayor a 0.99 y que el error relativo debido a la regresión lineal no mayor al 2 %, se concluye que la relación matemática entre concentración y respuesta es continua y reproducible en el intervalo de concentraciones de 0.10 a 5.0  $\mu\text{g/mL}$ .



Por lo tanto, se demuestra que el sistema es lineal y preciso en el intervalo de concentraciones de trabajo.

**Tabla 4. LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA.**

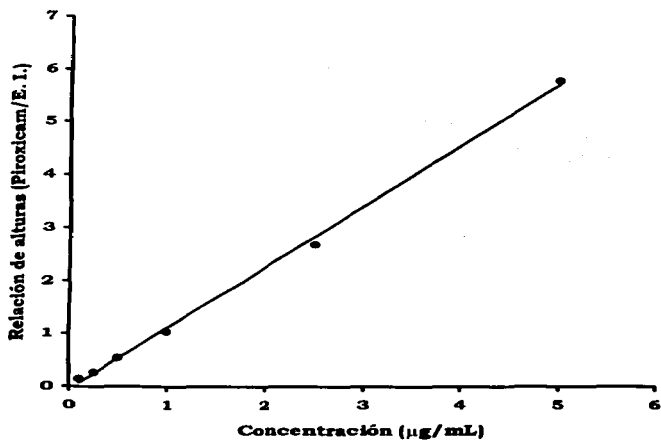
CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	RELACION DE ALTURAS			PROMEDIO	D. E.	C. V. (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
0.10	0.1380	0.1396	0.1369	0.1381	0.0013	0.98
0.25	0.2757	0.2758	0.2788	0.2767	0.0017	0.64
0.50	0.5302	0.5469	0.5477	0.5416	0.0098	1.8
1.00	1.0451	1.0373	1.0670	1.0498	0.0153	1.5
2.50	2.6844	2.6585	2.7411	2.6946	0.0422	1.6
5.00	5.7439	5.7892	5.8050	5.7793	0.0317	0.55
b	-0.0461	-0.0511	-0.0395	-0.0456		
m	1.1437	1.1501	1.1565	1.1501		
r	0.9993	0.9990	0.9995	0.9993		
<b>Error relativo debido a la regresión lineal</b>	0.0503	0.0623	0.0432	0.0519		



$b = -0.0456$

$m = 1.1501$

$r = 0.9993$



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 7. Linealidad del sistema.





#### **4.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PIROXICAM EN PLASMA.**

##### **4.3.1. LINEALIDAD DEL MÉTODO.**

En la tabla 5 se presentan los resultados de la evaluación de la linealidad del método analítico para cuantificar piroxicam en plasma. En ella se muestran los datos de la relación de alturas de los picos (altura piroxicam/ altura E. I.) de las tres curvas de calibración preparadas en plasma, así como los valores de ordenada al origen (b), pendiente (m) y coeficiente de correlación lineal (r), en donde se puede observar que éste último valor es mayor a 0.99 en todos los casos.

Por otra parte, el coeficiente de variación se encontró entre el 2.6 % y el 11.7 %, por lo que de acuerdo a los criterios establecidos que indican que los coeficientes de variación no deben ser mayores al 15 %, se demuestra que la relación matemática entre concentración y respuesta es reproducible en el intervalo de concentraciones de 0.10 a 5.0  $\mu\text{g/mL}$ .





De acuerdo a lo anteriormente expuesto y a los criterios establecidos, el método analítico para la cuantificación de piroxicam en plasma fue lineal en el intervalo de concentraciones de 0.10 a 5.0  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 5. LINEALIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PIROXICAM EN PLASMA.**

CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g/mL}$ )	RELACION DE ALTURAS			PROMEDIO	D. E.	C. V. (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
0.10	0.1096	0.0942	0.1258	0.1098	0.0129	11.7
0.25	0.2364	0.2913	0.2913	0.2730	0.0258	9.4
0.50	0.4767	0.5180	0.4610	0.4852	0.0240	4.9
1.00	0.9629	1.0264	0.9889	0.99927	0.0260	2.6
2.50	2.3095	2.6848	2.7064	2.5669	0.1822	7.1
5.00	5.0761	4.9898	5.3545	5.1401	0.1556	3.0
b	-0.0411	0.0372	-0.022	-0.0087		
m	1.0073	1.0033	1.0761	1.0289		
r	0.9989	0.9992	0.9997	0.9993		



En la figura 8 se presenta la gráfica de la linealidad promedio del método analítico, en el intervalo de concentraciones de trabajo, con un valor de coeficiente de correlación lineal promedio de 0.9993, lo cual indica que la relación entre concentración y respuesta es continua en el intervalo de concentraciones de trabajo.

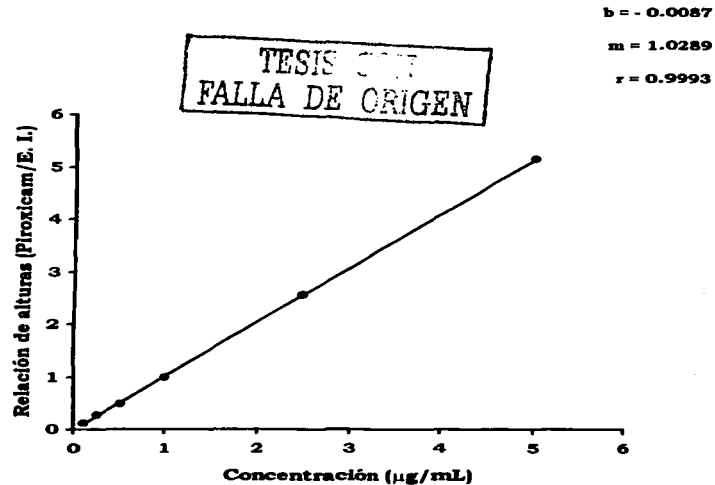


Figura 8. Linealidad promedio del método analítico para cuantificar piroxicam en plasma.



#### **4.3.2. PRECISIÓN DEL MÉTODO.**

##### **A. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO.**

En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la repetibilidad del método analítico al analizar en un mismo día, por quintuplicado, tres concentraciones conocidas de piroxicam en plasma, bajo las mismas condiciones de equipo, laboratorio y analista.

Se puede observar que el coeficiente de variación en los tres niveles de concentración, varió entre el 3.1 % y 5.8 %, sin rebasar el límite máximo establecido del 15 %, por lo cual, el método analítico para cuantificar piroxicam en plasma, se considera repetible en el intervalo de concentraciones de 0.10 a 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Tabla 6. REPETIBILIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PIROXICAM EN PLASMA.**

CONCENTRACIÓN NOMINAL ( $\mu\text{g/mL}$ )	4.0	1.5	0.15
RÉPLICA	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL ( $\mu\text{g/mL}$ )		
1	3.86	1.61	0.1404
2	3.50	1.58	0.1638
3	3.77	1.48	0.1405
4	3.45	1.50	0.1517
5	3.81	1.55	0.1508
<b>PROMEDIO</b>	3.68	1.54	0.1494
<b>D. E.</b>	0.1888	0.0541	0.0096
<b>C. V. (%)</b>	5.1	3.5	6.5



## **B. REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO.**

Los resultados obtenidos de la evaluación de la reproducibilidad del método analítico se presentan en la tabla 7.

Los coeficientes de variación obtenidos para las concentraciones evaluadas, 0.15, 1.5 y 4.0  $\mu\text{g/mL}$  durante los tres días de análisis fueron: 5.4 %, 2.8 % y 3.7 %, respectivamente. Es evidente que en la cuantificación de la concentración menor de piroxicam (0.15  $\mu\text{g/mL}$ ), se presentó mayor variación en los resultados.

Considerando que el criterio de aceptación establecido, indica que los coeficientes de variación no deben ser mayores al 15 %, los resultados obtenidos demuestran que el método analítico es reproducible bajo las condiciones de análisis establecidas en diferentes días de trabajo.

Los resultados de repetibilidad y reproducibilidad, demuestran que el método analítico para cuantificar piroxicam en plasma es preciso, ya que cumple con los criterios establecidos que indican que los coeficientes de variación no deben ser mayores al 15 %, lo cual fue demostrado con ambos parámetros de validación.



**Tabla 7. REPRODUCIBILIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PIROXICAM EN PLASMA.**

<b>CONCENTRACIÓN NOMINAL</b> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<b>0.15</b>	<b>1.5</b>	<b>4.0</b>
<b>DÍA - RÉPLICA</b>	<b>CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>		
1 - 1	0.1404	1.61	3.86
1 - 2	0.1508	1.55	3.81
2 - 1	0.1505	1.50	4.20
2 - 2	0.1395	1.59	3.80
3 - 1	0.1518	1.58	3.92
3 - 2	0.1421	1.55	4.06
<b>PROMEDIO</b>	0.1458	1.56	3.94
<b>D. E.</b>	0.0057	0.0388	0.1582
<b>C. V. (%)</b>	3.9	2.5	4.0



#### 4.3.3. EXACTITUD DEL MÉTODO.

En la tabla 8 se presentan los datos de la concentración experimental en los niveles de concentración evaluados (0.15, 1.5 y 4.0  $\mu\text{g/mL}$ ) a partir de la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad del método analítico, así como el promedio de estas concentraciones para apreciar la variación de dicha respuesta con respecto a la concentración nominal expresado como porcentaje de desviación absoluta.

De los datos presentados en la tabla, se deduce que el valor máximo encontrado para el porcentaje de desviación absoluta fue del 4.8 %, sin rebasar el límite establecido del 15 %.

Por lo anteriormente mencionado, el método analítico es exacto para cuantificar piroxicam en plasma ya que cumple con la especificación establecida que indica que el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del  $\pm 15$  % del valor nominal de concentración.



**Tabla 8. EXACTITUD DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR PIROXICAM EN PLASMA.**

CONC. NOMINAL ( $\mu\text{g/mL}$ )	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL ( $\mu\text{g/mL}$ )		CONC. EXPERIMEN. PROMEDIO ( $\mu\text{g/mL}$ )	% DESV. ABSOLUTA
	REPETIBILIDAD	REPRODUCIBILIDAD		
0.15	0.1494	0.1458	0.1476	1.6
1.5	1.54	1.56	1.55	3.3
4.0	3.68	3.94	3.81	4.8

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





#### 4.3.4. RECUPERACIÓN ABSOLUTA.

En la tabla 9 se muestra el porcentaje de recobro para piroxicam en plasma a las concentraciones de 0.15, 1.5 y 4.0  $\mu\text{g/mL}$  evaluadas por triplicado. En dicha tabla se observa que el porcentaje de recobro se encuentra dentro del intervalo de 91.5 % y 91.9 %.

De acuerdo con el criterio de aceptación establecido, que indica que el porcentaje de recobro no necesariamente debe ser del 100 %, pero si reproducible en cada nivel de concentración, el método de extracción empleado se considera adecuado para este fin, al cumplir satisfactoriamente con el criterio de aceptación.



Tabla 9. PORCENTAJE DE RECOBRO DE PIROXICAM EN PLASMA.

CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.15	1.5	4.0	0.15	1.5	4.0
REPÚBLICA	ALTURA DE PIROXICAM EN:					
	MUESTRAS METANÓLICAS			MUESTRAS PLASMÁTICAS		
1	5174	51525	134611	4999	45533	117267
2	5136	49551	132073	4501	46631	125901
3	5157	51193	129207	4712	47741	119078
<b>PROMEDIO</b>	5155.66	50756.33	131963.67	4737.33	46635	120748.67
<b>% D E R E C O B R O</b>				91.9	91.9	91.5

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



#### 4.3.5. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

En la tabla 10 se presentan los resultados de la evaluación del límite de cuantificación del método analítico.

Al analizar por quintuplicado la concentración más pequeña del intervalo de concentraciones de trabajo ( $0.10 \mu\text{g/mL}$ ), se obtuvo un coeficiente de variación del 5.0 % el cual cumple con el criterio de aceptación que establece que éste debe ser menor al 20 %. Así mismo, se observa que la desviación absoluta fue del 5.2 %, la cual cumple con las especificaciones establecidas que indican que la concentración cuantificada promedio debe caer dentro del  $\pm 20 \%$  de la concentración nominal.

Por lo anterior, la concentración de  $0.10 \mu\text{g/mL}$  se considera como el límite de cuantificación del método analítico para cuantificar piroxicam en plasma, ya que ésta puede ser cuantificada con exactitud y precisión bajo las condiciones de análisis establecidas.



**Tabla 10. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO  
PARA CUANTIFICAR PIROXICAM EN PLASMA.**

<b>CONCENTRACIÓN NOMINAL (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>0.10</b>
<b>RÉPLICA</b>	<b>CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>
1	0.0868
2	0.0931
3	0.0980
4	0.1006
5	0.0957
<b>PROMEDIO</b>	0.0948
<b>D. E.</b>	0.0052
<b>% C. V.</b>	5.6
<b>% DESV. ABSOLUTA</b>	5.2



#### **4.3.6. LÍMITE DE DETECCIÓN.**

El límite de detección del método analítico corresponde a la concentración de 0.05 µg/mL de piroxicam en plasma, señal tres veces mayor a la del ruido que puede ser detectada pero no cuantificada.

#### **4.3.7. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA.**

##### **4.3.7.1. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A TEMPERATURA AMBIENTE.**

En la tabla 11 se presentan los resultados para evaluar la estabilidad de muestras plasmáticas de piroxicam mantenidas a temperatura ambiente durante 24 horas, de acuerdo a lo descrito en la sección 3.2 - D.

En la tabla se puede observar que tanto el coeficiente de variación así como el porcentaje de desviación absoluta de las réplicas con respecto a la concentración inicial en los tres niveles de concentración, no varió más del 15 %.



Por lo tanto, se concluye que el piroxicam es estable cuando las muestras plasmáticas se mantienen a temperatura ambiente durante 24 horas después de su preparación.

**Tabla 11. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A TEMPERATURA AMBIENTE.**

CONCENTRACIÓN NOMINAL ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.15	1.5	4.0
HORA - RÉPLICA	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL ( $\mu\text{g/mL}$ )		
0 - 1	0.1548	1.50	4.06
0 - 2	0.1421	1.40	3.92
12 - 1	0.1512	1.51	3.88
12 - 2	0.1395	1.46	3.83
24 - 1	0.1423	1.46	3.82
24 - 2	0.1328	1.39	3.78
<b>PROMEDIO</b>	0.1414	1.455	3.8275
<b>D. E.</b>	0.0076	0.0493	0.0411
<b>% C. V.</b>	5.4	3.4	1.1
<b>% DESVIACIÓN ABSOLUTA</b>	5.7	3.0	4.3



#### **4.3.7.2. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA.**

En la siguiente tabla se presentan los resultados del análisis de muestras plasmáticas conteniendo piroxicam las cuales fueron procesadas y el residuo reconstituido en fase móvil, se mantuvo a temperatura ambiente. El análisis de las muestras se llevó a cabo al tiempo cero, a las 24 y 48 horas después de su preparación.

Como se puede observar, el coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta de las réplicas en cada nivel de concentración, no rebasan el 15 % con respecto a la concentración inicial, lo que indica que el piroxicam es estable en muestras plasmáticas procesadas, reconstituidas en fase móvil y mantenidas a temperatura ambiente durante 48 horas después de su preparación.



Tabla 12. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA.

CONCENTRACIÓN NOMINAL ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0.15	1.5	4.0
HORA - RÉPLICA	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		
0 - 1	0.1594	1.52	4.12
0 - 2	0.1572	1.48	4.2
24 - 1	0.1486	1.45	3.90
24 - 2	0.1353	1.47	3.96
48 - 1	0.1372	1.39	3.82
48 - 2	0.1315	1.41	3.88
<b>PROMEDIO</b>	0.1381	1.43	3.89
<b>D. E.</b>	0.0073	0.0365	0.0577
<b>% C. V.</b>	5.3	2.5	1.5
<b>% DESVIACIÓN ABSOLUTA</b>	8.0	4.7	2.7

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





#### **4.3.7.3. ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DURANTE TRES CICLOS DE CONGELACIÓN - DESCONGELACIÓN.**

En la tabla 13 se muestran los resultados correspondientes a la estabilidad de piroxicam en plasma mantenido a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El análisis se realizó al tiempo cero, a los 15, 30 y 60 días después de su preparación. En ella se observa, que el coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta de las réplicas con respecto a la concentración inicial en cada nivel de concentración, son inferiores al 15 %.

Por lo anterior se concluye, que el piroxicam es estable en plasma mantenido a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 60 días y después de tres ciclos de congelación - descongelación.



**Tabla 13. ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS MANTENIDAS EN  
CONGELACIÓN A - 20 ° C.**

<b>CONCENTRACIÓN NOMINAL (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>	<b>0.15</b>	<b>1.5</b>	<b>4.0</b>
<b>DÍA - RÉPLICA</b>	<b>CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL (<math>\mu\text{g}/\text{mL}</math>)</b>		
0 - 1	0.1529	1.51	3.95
0 - 2	0.1581	1.49	4.12
15 - 1	0.1476	1.50	3.64
15 - 2	0.1362	1.47	3.84
30 - 1	0.1477	1.51	3.65
30 - 2	0.1325	1.40	3.78
60 - 1	0.1349	1.45	3.74
60 - 2	0.1307	1.48	3.80
<b>PROMEDIO</b>	0.1425	1.4762	3.815
<b>D. E.</b>	0.0102	0.0370	0.1589
<b>% C. V.</b>	7.3	2.5	4.2
<b>% DESVIACIÓN ABSOLUTA</b>	5.0	1.6	4.6



#### 4.3.8. SELECTIVIDAD DEL MÉTODO.

No se observaron señales del plasma y de los fármacos adicionados (ácido salicílico, paracetamol y cafeína) que interfirieran con la respuesta cromatográfica del piroxicam y del estándar interno.

En la tabla 14 se muestran los tiempos de retención de los fármacos añadidos y la altura de los picos y en la figura 6 se presenta el cromatograma respectivo.

**Tabla 14. SELECTIVIDAD DEL MÉTODO.**

FÁRMACO	CONCENTRACIÓN ( $\mu\text{g/mL}$ )	TIEMPO DE RETENCIÓN	ALTURA
		DEL PICO	
Ácido salicílico	100	N. D.	N. D.
Paracetamol	100	N. D.	N. D.
Cafeína	100	N. D.	N. D.
Piroxicam	5.0	9.47	176750
E. I.	10	4.05	38097

Por lo tanto, se demuestra que el método es selectivo y específico para piroxicam, ya que el plasma y fármacos de uso común no interfieren con la cuantificación del fármaco.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



# V

# CONCLUSIONES



## V. CONCLUSIONES.

El método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de piroxicam en plasma, resultó ser:

- ▣ Lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones de 0.10 a 5.0  $\mu\text{g/mL}$ .
- ▣ Sensible, ya que la concentración mínima que puede ser cuantificada con exactitud y precisión es de 0.10  $\mu\text{g/mL}$  y la concentración mínima detectable es de 0.05  $\mu\text{g/mL}$ .
- ▣ Selectivo y específico, ya que fármacos de uso común (ácido acetilsalicílico, paracetamol y cafeína) y la matriz biológica, no interfieren con la cuantificación de piroxicam.



El piroxicam adicionado al plasma fue estable en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante dos meses.

Este método, por su técnica de extracción rápida y sencilla, tiempo de corrida analítica corto y alto porcentaje de recobro del fármaco, se considera adecuado para el análisis de muestras en estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y bioequivalencia.

VI


BIBLIOGRAFÍA







## VI. BIBLIOGRAFÍA.



1. Aiche, J. M., Guyot-Hermann, A. M. Biofarmacia. Editorial El Manual Moderno. Págs. 86 – 94 (1983)
2. Cárdenas, H. Aspectos biofarmacéuticos de la evaluación de medicamentos. Universidad Autónoma de México Campus Xochimilco. México, D. F. 1ª edición. Págs. 19-42, 109-112 (1996)
3. Acuerdo por el que se relacionan las especialidades farmacéuticas susceptibles de incorporarse al Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables y se determinan las pruebas que deberán aplicárseles.  
Diario Oficial de la Federación, 19 de marzo de 1998.
4. Convocatoria a las personas interesadas en operar como terceros autorizados para realizar pruebas de intercambiabilidad de medicamentos.  
Diario Oficial de la Federación, 26 de marzo de 1998.
5. Reglamento de Insumos para la Salud. Diario Oficial de la Federación 1998.



- 
6. Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos. Consejo de Salubridad General. Segunda Edición. México, D. F. (1999)
  7. The Merck Index. Twelfth Edition. Pág. 1292 (1996)
  8. Diccionario de especialidades Farmacéuticas – PLM. Ediciones PLM, S. A. de C. V. México, D. F. 44ª edición. Págs. 378-379, 898-900 (1998)
  9. Martindale. The Extra Pharmacopoeia. The Pharmaceutical Press. Thirtieth edition. Pág. 30.3 (1993)
  10. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica Vol. I. Mc Graw-Hill – Interamericana. México, D. F. 9ª edición. Págs. 661 – 669, 687 – 689 (1996)
  11. Litter, M. Farmacología Experimental y Clínica. Librería “El Ateneo” Editorial. Argentina. 7ª edición. Págs. 1353 – 1355 (1988)
  12. Hobbs, D. Piroxicam Pharmacokinetics: Recent Clinical Results Relating Kinetics and Plasma Levels to Age, Sex, and Adverse Effects. Am. J. Med. 81(5B): 22 - 28 (1986)
  13. Rugstad, H. The Norway Study: Plasma Concentrations, Efficacy, and Adverse Effects. Am. J. Med. 81(5B): 29 - 33 (1986)

- 
14. Citroy, D., Tomlinson, A., Willoughby, D. Differential effects of inhibitors of cyclooxygenase (cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2) in acute inflammation. *European J. Pharma.* 355: 211-217 (1998)
15. Shah, V., Midha, K., Dighe, S., McGilveray, I., Skelly, J., Yacobi, A., Layloff, T., Viswana, C., Cook, C. E., McDowall, R., Pittman, K., Spector, S. *Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetics Studies.* *J. Pharma. Sci.* 81(3): 309-312 (1992)
16. Twomey, T., Bartolucci, S., Hobbs, D. Analysis of piroxicam in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. App.* 183: 104-108 (1980)
17. Dixon, J., Lowe, J. Rapid method for the determination of either piroxicam or tenoxicam in plasma using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. App.* 310: 455-459 (1984)
18. Richardson, J., Ross, S. High-performance liquid chromatographic analysis of piroxicam and its major metabolite 5'-hydroxypiroxicam in human plasma and urine. *J. Chromatogr. Biomed. App.* 382: 382-388 (1986)
- 

- 
19. Macek, J., Vácha, J. Rapid and sensitive method for determination of piroxicam in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. App.* 420: 445-449 (1987)
20. Ibrahim, S., Boudinot, F. High-performance liquid chromatographic assay for piroxicam in human plasma. *J. Chromatogr. Biomed. App.* 430: 424-428 (1988)
21. Gillian, R., Mason, W., Fu, C. Rapid analysis of piroxicam in dog, rat and human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. App.* 487: 232-235 (1989)
22. Saeed, K., Becher, M. On line solid-phase extraction of piroxicam prior to its determination by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. App.* 567: 185-193 (1991)
23. Milligan, A. Determination of piroxicam and its major metabolites in the plasma, urine and bile of humans by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. App.* 576: 121-128 (1992)
24. Cerretani, D., Micheli, L., Fiaschi, A., Giorgi, G. Rapid and sensitive determination of piroxicam in rat plasma, muscle and skin by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. Biomed. App.* 614: 103-108 (1993)
- 

- 
25. Avgerinos, A., Axarlis, S., Dragatsis, J., Karidas, T., Malamataris, S. Extractionless high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of piroxicam and 5'-hydroxypiroxicam in human plasma and urine. *J. Chromatogr. B* 673: 142 - 146 (1995)
26. Amanlou, M., Dehpour, A. Rapid method for the determination of piroxicam in rat plasma using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 696: 317-319 (1997)
27. Hirai, T., Matsumoto, S., Kishi, I. Simultaneous analysis of several non-steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B* 692: 375-388 (1997)
28. Yritia, M., Parra, P., Fernández, J., Barbanoj, J. Piroxicam quantitation in human plasma by high-performance liquid chromatography with on- and off-line solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A* 846:199-205 (1999)
- 

29. Hubert, Ph., Chiap, P., Crommen, J., Boulanger, B., Chapuzet, E., Mercier, N., Bervoas-Martin, S., Chevalier, P., Grandjean, D., Lagorce, P., Lallier, M., Laparra, M., Laurentie, M., Nivet, J. the SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. *Ana. Chim. Act.* 391: 135-148 (1999)
30. Ermer, J. Validation in pharmaceutical analysis. Part. I: An integrated approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24: 755-767 (2001)
31. The United States Pharmacopeia & National Formulary. Twenty fourth edition. Págs. 2149 – 2152.
32. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. *Diario Oficial de la Federación*, Primera Sección, viernes 7 de mayo de 1999.