

00524
134



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO
POR CLAR PARA CUANTIFICAR PIROXICAM EN PLASMA
Y SU APLICACION EN UN ESTUDIO FARMACOCINETICO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
MARTHA LIZBETH PEREZ LOZA

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.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Helgi Helen Jung Cook
Vocal: M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado
Secretario: M. en F. Luis Jesús García Aguirre
1er. Suplente: M. en C. Lauro Misael Del Rivero Ramírez
2°. Suplente: Q.F.B. Julio Cesar Rivera Leyva

Lugar donde se desarrollo el tema: Laboratorio de Farmacocinética, edificio de investigación. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema:



M. en F. Luis Jesús García Aguirre

Supervisor técnico:



O.F.B. Maribel Ramírez Reséndiz

Sustentante:



Martha Lizbeth Pérez Loza

B

DEDICATORIAS

A DIOS

A mis padres, Juan y Ada, con infinito amor, orgullo y agradecimiento por cultivar en mí lo mejor de sus vidas.

A mi hermano Cesar, y que siempre estemos juntos como hasta hoy. Te quiero mucho. Va la tuya (tú tesis).

A mis Loza porque el amor y la unidad es el ejemplo. Gracias.

A mis Pérez, que sigamos adelante.

A Eduardo, porque lo importante no es llegar primero pero sí hay que saber llegar. Tú puedes. Te quiero.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, porque su enseñanza me permitió lograr uno de mis más altos objetivos.

A mi asesor de tesis M. en F. Luis Jesús García Aguirre, por su ayuda brindada para la realización de este trabajo.

A todo el laboratorio de Farmacocinética en especial Abraham y Mari, por compartir sus conocimientos y algo más.

A cada una de aquellas personas que en toda mi vida escolar compartió su amistad, apoyo y momentos que siempre recordaré.

	Pág.
ÍNDICE GENERAL	
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1,2
CAPÍTULO II. GENERALIDADES	3
2.1. Monografía de piroxicam.....	4
2.1.1. Propiedades fisicoquímicas.....	4
2.1.2. Mecanismo de acción.....	4
2.1.3. Farmacocinética.....	4
2.1.4. Aplicaciones terapéuticas.....	5
2.1.5. Precauciones e interacciones.....	6
2.1.6. Presentaciones comerciales.....	6
2.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).....	6
2.2.1. Parámetros cromatográficos.....	7
2.2.2. Desarrollo de métodos por CLAR.....	9
2.2.3. Fase reversa.....	10
2.2.3.1. Propiedades de la columna.....	10
2.2.3.2. Propiedades de los solventes.....	10
2.2.3.3. Propiedades de la fase móvil.....	11
2.2.3.4. Propiedades de los detectores.....	11
2.2.3.5. Otros factores.....	12
2.3. Validación de métodos analíticos.....	12
2.3.1. Rango.....	13
2.3.2. Recuperación absoluta.....	13
2.3.3. Linealidad.....	13
2.3.4. Precisión.....	13
2.3.5. Repetibilidad.....	13
2.3.6. Reproducibilidad intralaboratorio.....	14
2.3.7. Exactitud.....	14
2.3.8. Estabilidad de la muestra.....	14
2.3.9. Límite de detección.....	14
2.3.10. Límite de cuantificación.....	14
2.3.11. Selectividad.....	15
2.3.12. Tolerancia.....	15
2.4. Estudios farmacocinéticos.....	15
2.4.1. Tamaño de la muestra.....	16
2.4.2. Toma de muestras.....	16
2.4.3. Parámetros farmacocinéticos.....	16
2.5. Condiciones cromatográficas reportadas para cuantificar piroxicam en plasma.....	18

	Pág.
CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL.....	19
3.1. Desarrollo del método analítico por CLAR para cuantificar piroxicam en plasma.....	19
3.1.1. Selección del tipo de columna.....	19
3.1.2. Selección de la fase móvil.....	19
3.1.3. Selección de la longitud de onda.....	19
3.1.4. Selección del método de extracción.....	19
3.1.5. Selección del estándar interno.....	20
3.2. Método analítico por CLAR para cuantificar piroxicam en plasma.....	20
3.2.1. Material, reactivos y equipo.....	20,21
3.2.2. Fluido biológico.....	21
3.2.3. Preparación de soluciones.....	22
3.2.3.1. Preparación de soluciones para fase móvil.....	22
3.2.3.2. Preparación de soluciones estándar.....	22
3.2.3.3. Preparación de soluciones para evaluar adecuabilidad del sistema.....	23
3.2.4. Preparación de curva patrón y controles.....	24
3.3. Validación del método analítico por CLAR para cuantificar piroxicam en plasma.....	25
3.3.1. Validación del método.....	25
3.3.1.1. Linealidad.....	25
3.3.1.2. Precisión y exactitud.....	25
3.3.1.3. Límite de cuantificación.....	26
3.3.1.4. Límite de detección.....	27
3.3.1.5. Selectividad.....	27
3.3.1.6. Recobro.....	28
3.3.1.7. Estabilidad.....	28
3.3.1.7.1. Estabilidad en congelación.....	28
3.3.1.7.2. Estabilidad bajo ciclos de congelación-descongelación.....	29
3.3.1.7.3. Estabilidad de la muestra procesada.....	29
3.3.1.8. Tolerancia.....	29
3.4. Diseño del estudio clínico.....	30
3.4.1. Selección de voluntarios.....	31
3.4.1.1. Criterios de exclusión.....	32
3.4.1.2. Retiro de voluntarios.....	32
3.5. Análisis de las muestras en voluntarios.....	33
3.5.1. Cuantificación de las muestras plasmáticas.....	33
3.6. Análisis farmacocinético.....	34

	Pág.
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	36
4.1. Método analítico por CLAR para cuantificar piroxicam en plasma.....	36
4.1.1. Condiciones cromatográficas utilizadas.....	36
4.1.2. Método de extracción.....	37
4.2. Validación del método analítico para cuantificar piroxicam en plasma.....	38
4.2.1. Validación del método.....	38
4.2.1.1. Linealidad.....	38
4.2.1.2. Precisión y exactitud.....	39
4.2.1.2.1. Repetibilidad.....	39
4.2.1.2.2. Reproducibilidad.....	40
4.2.1.3. Límite de cuantificación y Límite de detección.....	41
4.2.1.4. Selectividad.....	41
4.2.1.5. Recobro.....	42
4.2.1.6. Estabilidad.....	42
4.2.1.6.1. Estabilidad en congelación.....	43
4.2.1.6.2. Estabilidad bajo ciclos de congelación-descongelación.....	43
4.2.1.6.3. Estabilidad de la muestra procesada.....	44
4.2.1.7. Tolerancia.....	45
4.3. Estudio farmacocinético.....	47
4.3.1. Análisis de las muestras plasmáticas de los voluntarios.....	48
4.3.2. Resultados promedio del estudio farmacocinético.....	50
CAPÍTULO V CONCLUSIONES.....	53
APÉNDICE I.....	54
Tablas y Gráficas correspondientes a los resultados de concentración plasmática <i>versus</i> tiempo, determinadas para cada voluntario.	
APÉNDICE II.....	75
Parámetros farmacocinéticos determinados para cada voluntario.	
APÉNDICE III.....	76
Peso en Kg de cada uno de los 21 voluntarios.	
BIBLIOGRAFÍA.....	77

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Presentaciones comerciales de piroxicam.....	6
Tabla 2. Condiciones cromatográficas reportadas para la cuantificación de piroxicam en plasma.....	18
Tabla 3. Preparación de curva patrón y controles.....	24
Tabla 4. Preparación de soluciones estándar para determinar límite de cuantificación.....	27
Tabla 5. Cambios realizados en la proporción de fase móvil y temperatura de la columna para la determinación de la tolerancia.....	30
Tabla 6. Reporte de análisis de piroxicam (Feldene [®]) tabletas 20 mg. No. lote: 21804011.....	31
Tabla 7. Condiciones cromatográficas utilizadas en el método analítico.....	36
Tabla 8. Resultados obtenidos en la linealidad del método para cuantificar piroxicam.....	38
Tabla 9. Repetibilidad y exactitud del método analítico para la cuantificación de piroxicam.....	40
Tabla 10. Reproducibilidad y exactitud del método analítico para la cuantificación de piroxicam.....	40
Tabla 11. Límite de cuantificación y límite de detección.....	41
Tabla 12. Recobro del método analítico para la cuantificación de piroxicam...	42
Tabla 13. Estabilidad en congelación a -70°C.....	43
Tabla 14. Estabilidad bajo ciclos de congelación-descongelación.....	44
Tabla 15. Estabilidad como muestra procesada.....	45
Tabla 16. Tolerancia del método analítico en las condiciones originales de trabajo.....	46
Tabla 17. Tolerancia del método con proporción de fase móvil (66:34 v/v) y 30°C como temperatura de la columna.....	46

H

	Pág.
Tabla 18. Tolerancia del método analítico con proporción de fase móvil 66:34 v/v) y 40°C como temperatura de la columna.....	46
Tabla 19. Tolerancia del método analítico con proporción de fase móvil (62:38 v/v) y 38°C como temperatura de la columna.....	47
Tabla 20. Tolerancia del método analítico con proporción de fase móvil (72:28 v/v) y 38° C como temperatura de la columna.....	47
Tabla 21. Seguimiento de las muestras de control de calidad para piroxicam.	48
Tabla 22. Seguimiento de curvas de calibración para piroxicam.....	49
Tabla 23. Valores promedio de concentración plasmática de piroxicam ($\mu\text{g}/\text{mL}$) \pm D.E., a los diferentes tiempos de muestreo.....	50
Tabla 24. Parámetros Farmacocinéticos promedio de los 21 voluntarios con respecto a los parámetros reportados en bibliografía.....	52

ÍNDICE DE FIGURAS		Pág.
Figura 1.	Estructura química de piroxicam.....	3
Figura 2.	Pasos en el desarrollo de métodos analíticos por CLAR.....	9
Figura 3.	Método de extracción de piroxicam a partir de plasma.....	37
Figura 4.	Gráfica de linealidad del método.....	39
Figura 5.	Selectividad del método analítico para la cuantificación de piroxicam.....	41
Figura 6.	Gráfica de la concentración plasmática promedio <i>versus</i> tiempo, después de la administración de piroxicam.....	51
Figura 7.	Gráfica de logaritmo de la concentración plasmática promedio <i>versus</i> tiempo, después de la administración de piroxicam.....	51

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La administración de un fármaco a un organismo vivo conlleva una serie de procesos que son objeto de estudio de la farmacocinética; dentro de éstos procesos, se encuentra la absorción, distribución, metabolismo y eliminación. En este sentido, para la caracterización de un perfil de concentración del fármaco con respecto al tiempo, es necesario contar con una metodología analítica, que al ser aplicado al fluido biológico de interés, sea lo suficientemente sensible que permita la cuantificación de dicho fármaco en el fluido.

En la actualidad la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), es una de las herramientas más utilizadas a nivel mundial, ya que proporciona un amplio rango de eficiencia, resolución, sensibilidad y selectividad.

Así mismo, para trabajar muestras de fármaco en fluidos biológicos es necesario que éstas sean sometidas a diferentes procesos donde se eliminen las sustancias que puedan dañar las columnas empleadas o que interfieran en el análisis. Dichos procesos pueden ir desde la precipitación de proteínas hasta procesos de extracción en fase sólida, sin embargo, la semipurificación dependerá de las propiedades fisicoquímicas y de las concentraciones del fármaco a utilizar.

Independientemente del proceso de extracción utilizado, para que los métodos analíticos sean empleados en la cuantificación de fármacos, es necesario cumplir con ciertos criterios de validación establecidos en la NOM-SSA-177-1998. Que señala las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.

Con base en lo anterior, se llevó a cabo el presente trabajo, cuyos objetivos fueron:

Objetivo general:

- Desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) para cuantificar piroxicam en plasma.

Objetivo específico:

- Aplicar la metodología desarrollada y validada en un estudio de farmacocinética de piroxicam en población mexicana.

CAPÍTULO II. GENERALIDADES

2.1. Monografía del piroxicam

El piroxicam pertenece al grupo de los fármacos antiinflamatorios no esteroidales (AINEs), es uno de los derivados del oxicam, una clase de ácidos enólicos que posee propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas.¹

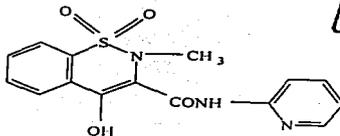
Nombres comerciales: Feldene®, Artinor®, Brucam®, Facicam®, Osteral®, Oxicanol®, Piroxan® y Pirox®.

Nombre genérico: Piroxicam

Nombre químico²: 4-Hydroxi-2-metil-N-2-piridinil-2H-1,2-benzotiazina-3-carboxamida-1,1-dioxido.

Fórmula condensada²: C₁₅H₁₃N₃O₄S

Estructura química:



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1. Estructura química de Piroxicam.¹

Peso molecular²: 331.35 g/mol

Punto de fusión²: 198 a 200 °C

2.1.1. Propiedades fisicoquímicas.

Descripción: es un polvo blanco o ligeramente amarillo cristalino.

Solubilidad: prácticamente insoluble en agua. Soluble en diclorometano y en la mayoría de los solventes orgánicos.³

pKa: exhibe un protón débil ácido 4-hydroxi (pKa 5,1) y un nitrógeno débil básico del piridil (pKa 1,8)⁴

2.1.2. Mecanismo de acción.

El piroxicam es un bloqueador de la síntesis de prostaglandinas por inhibición de la enzima ciclooxigenasa; inhibe la migración de polimorfonucleares y monocitos en el área de inflamación, así como la liberación de las enzimas lisosomales de los leucocitos estimulados y disminuye la producción del factor reumatoide tanto sistémico como del líquido sinovial en pacientes con artritis reumatoide seropositiva.⁵ Sin embargo, se han propuesto otros mecanismos de acción antiinflamatoria propios del piroxicam y entre ellos está la inhibición de la proteoglucanasa y de la colagenasa en cartilago.¹

2.1.3. Farmacocinética.^{1,4,5}

Absorción: piroxicam se absorbe completamente y de 2 a 4 horas se logran sus concentraciones máximas en plasma. Así mismo, una sola dosis de 20 mg produce generalmente los niveles máximos en plasma de piroxicam de 1,5 a 2 µg/mL. La mayoría de los pacientes alcanzan los niveles plasmáticos al estado estacionario entre los 7 y 12 días.

La administración oral del fármaco junto con alimento produce un ligero retraso en la velocidad de absorción, pero no influye sobre la magnitud de la misma.

Distribución: el volumen de distribución del piroxicam es aproximadamente 0.1 L/kg y se une extensamente a proteínas plasmáticas en un 99%.

Metabolismo: la principal transformación metabólica, en seres humanos, es la hidroxilación en la posición 5 del anillo piridil, mediada por citocromo P450 (predominantemente por la isoenzima de la subfamilia CYP2C) seguida de la conjugación con ácido glucurónico y posterior eliminación principalmente por vía renal.

Excreción: aproximadamente 5% del fármaco se excreta por la orina inalterado y aunque los valores de vida media plasmática son variables, en el adulto al parecer es de aproximadamente 50 horas. El aclaramiento o depuración registrado para piroxicam es de 0.03 mL/min/kg. Por otro lado, se excreta en la leche materna de 1% a 3% de la dosis administrada.

2.1.4. Aplicaciones terapéuticas.⁶

Analgésico, antirreumático, antiinflamatorio, reumatismo articular, osteoartritis (coxartrosis, gonartrosis y artrosis de manos, dedos y de columna vertebral), artritis reumatoides, gota, espondilitis anquilosante y artritis reumatoides juvenil.

Otorrinolaringología: como coadyuvante para aliviar la inflamación y dolor de amigdalitis, faringitis.

Aparato músculo esquelético: bursitis, capsulitis, tendinitis, miositis, cervicalgias, sinovitis y dolor postraumático.

Ginecología: en dismenorrea primaria.

2.1.5 Precauciones e interacciones.

Existe aproximadamente un 20% de efectos colaterales y cerca del 5% de los pacientes abandonan el uso del fármaco por efectos adversos, entre los más comunes son las reacciones gastrointestinales; donde la incidencia de úlcera péptica es menor del 1%; además el piroxicam disminuye la excreción renal de litio en grado clínicamente importante.¹

Con lo que respecta a las interacciones, el piroxicam interfiere en la acción natriúrica de los diuréticos, potencializa los anticoagulantes de tipo cumarínico, por lo que la administración de ambos fármacos debe ser controlada. Existe también un aumento en los niveles plasmáticos de litio y causa retención de sodio, potasio y agua.^{1,6}

2.1.6 Presentaciones comerciales.⁷

Tabla 1. Presentaciones comerciales de Piroxicam.

Nombre Comercial	Forma Farmacéutica	Laboratorio
Feldene	Cápsulas, supositorios, inyectable, tabletas dispersables y gel	Pfizer
Oxicanol	Cápsulas	Ivax
Piroxan	Cápsulas	Laboratorios Diba
Brucam	Tabletas	Bruluart
Artinor	Tabletas dispersables e inyectable	ICN
Pirox	Cápsulas	Hexal
Facicam	Solución inyectable	Senosiain
Osteral	Tabletas y suspensión oral	Silanes

2.2. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

La cromatografía es un método usado primordialmente para la separación de los componentes de una muestra, distribuyéndose en dos fases; una de las cuales es

estacionaria, mientras la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel y la fase móvil puede ser líquida o gaseosa.⁸

2.2.1. Parámetros cromatográficos⁸

A continuación se describen algunos de los parámetros cromatográficos más importantes.

Volumen de elución: (V_e) es el volumen de fase móvil eluida entre la inyección y la elución de la concentración máxima del soluto.

Volumen muerto (V_0): es el volumen total de solvente entre el punto de inyección y el de detección, exceptuando el correspondiente a las partículas de fase estacionaria. Comprende al volumen que la fase móvil puede ocupar entre las partículas y la pared de la columna, en el interior de las tuberías, uniones, filtrados, etc.

Línea base: es la porción del cromatograma donde sólo se aprecia la elución de la fase móvil, sin señal debida al soluto.

Tiempo de Retención (t_R): es una medida del tiempo entre inyección de la muestra y el tiempo en que aparece el pico.

Factor de capacidad (k'): es el cociente entre el número de moles de soluto en la fase estacionaria y el número de moles de soluto en la fase móvil y está relacionado con el coeficiente de distribución entre ambas fases. Puede demostrarse que k' es proporcional al tiempo de retención del soluto y se calcula para el pico enésimo como:

$$k' = \frac{(t_n - t_0)}{t_0}$$

$$k' = \frac{(V_n - V_0)}{V_0}$$

De las anteriores ecuaciones k' puede variar entre cero e infinito. Si el soluto no se retiene, su tiempo de elución será igual a t_0 (o bien su volumen de elución igual a V_0) y si se retiene en forma irreversible, su tiempo (y su volumen) de elución será infinito.

Factor de separación (α): es el cociente entre los factores de capacidad (k') de un par de picos. Si no existe separación, α es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

Resolución (R_s): es la separación entre dos picos en un cromatograma, se calcula por cada par de picos adyacentes, esta definido como:

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{0.5(w_1 + w_2)}$$

donde, t_1 y t_2 son el tiempo de retención y w_1 , w_2 son los anchos de los picos medidos en su base.

Platos teóricos (H): nos permite medir la eficiencia de una columna cromatográfica y por lo tanto de su "poder" separativo. Entonces, para una columna de longitud L , con N platos teóricos, la altura del plato resulta:

$$H = \frac{L}{N}$$

Asimetría (As): es una de las formas más comunes de alejamiento de la curva gaussiana y su medición es importante puesto que puede llevar a errores considerables de cuantificación. Sin embargo aunque no existe un criterio único para el cálculo de asimetría, las fórmulas empleadas con mayor frecuencia son:

$$As_{10\%} = \frac{b}{a}$$

$$As_{5\%} = \frac{b}{a}$$

Donde a y b son las medidas entre la línea que une el máximo del pico con la línea de base y los extremos anterior y posterior del pico, tomados a 10% de su altura. Por tanto a' y b' son los mismos parámetros al 5% de dicha altura.

2.2.2. Desarrollo de métodos por CLAR ^{8,9}

Dado que el desarrollo de métodos es costoso y puede llevarse mucho tiempo, es necesario tener un método adecuado que garantice obtener los mejores resultados, para lograr esto último, es preferible emplear caminos sistemáticos, efectuando ensayos en una dirección segura o con buenas probabilidades de éxito, documentando los resultados obtenidos y evitando ensayos innecesarios.

En la siguiente figura se muestra un diagrama de flujo de los pasos a seguir en un desarrollo sistemático de métodos por CLAR que, con algunas modificaciones, puede ser utilizado.

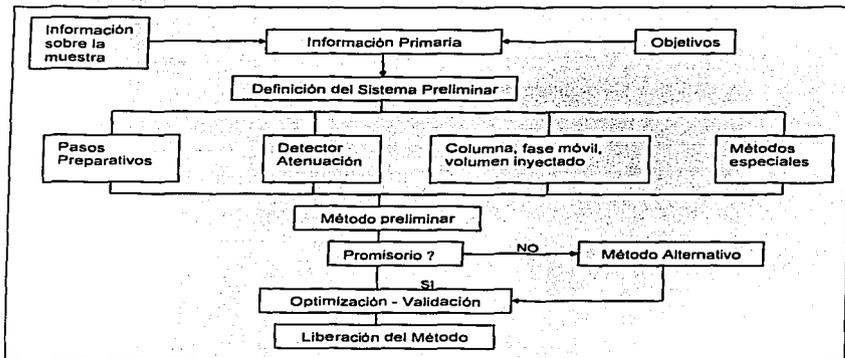


Figura 2. Pasos en el desarrollo de métodos analíticos por CLAR.

Sin lugar a dudas son muchos los aspectos a considerar en el desarrollo de métodos, en primer lugar debe evaluarse la definición del sistema preliminar, que consiste en determinar qué pasos preparativos pueden necesitarse para mantener el analito en solución a una concentración determinada, esto implica conocer la identidad del o los

componentes de interés, estructura química, pKa, solubilidad, espectros UV, rango de pesos moleculares del o los componentes de interés, naturaleza de la matriz (suero, orina, tabletas, etc)

2.2.3. Fase reversa ⁸

2.2.3.1. Propiedades de la columna ⁹

En la actualidad, las mas utilizadas son las columnas en fase reversa, C₈ y C₁₈, debido a que en la mayoría de los casos se obtiene una mejor separación y el volumen de la fase ligada ofrece un mejor efecto protector contra la disolución de la matriz de sílica; sin embargo, no siempre se emplean ya que depende en gran medida de las características de la muestra que se desea analizar.

2.2.3.2. Propiedades de los solventes. ⁸

Se debe tener en cuenta que no todos los solventes son adecuados para trabajar en CLAR ya que la condición del estado líquido no es suficiente por sí misma para que una sustancia se pueda emplear como fase móvil. Un solvente apropiado para CLAR debe cumplir con algunas características, entre los cuales podemos destacar alto poder solubilizante, baja reactividad, punto de ebullición adecuado, baja viscosidad, seguridad, alto grado de pureza, así como una absorción baja a la longitud de onda de interés.

2.2.3.3. Propiedades de la fase móvil⁹

La selectividad de la fase móvil depende del tipo de interacción de la misma con la muestra. La magnitud de las interacciones para cada solvente está en función de su fuerza de elución y según su selectividad (aceptores de protones, donadores de protones y fuerza dipolar).

Por otro lado para la determinación de la proporción de la fase móvil pueden seguirse diferentes caminos como:

- Comenzar con una concentración media de agua-modificador orgánico y ajustar la proporción según los resultados obtenidos.
- Comenzar con una concentración alta de modificador, reduciendo su proporción en fracciones de 10-20% según los resultados.

Con respecto al valor del pH de la fase móvil, éste puede ser un parámetro crítico que debe controlarse rigurosamente, ya que se obtendrán mejores resultados si los compuestos están protonados o ionizados. Por tal razón se recomienda que el pH de la fase móvil esté 1.5 unidades alrededor del pka del compuesto de interés. Así mismo es importante mencionar que la fase móvil a utilizar debe ser filtrada y desgasificada antes de ponerla en contacto con el cromatógrafo ya que de lo contrario pueden existir variaciones significativas en los resultados.

2.2.3.4. Propiedades de los detectores

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite ver y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica. Y aunque, si bien es cierto que la elección del detector dependerá en gran medida del tipo de analito en estudio, uno de los que se utiliza con mayor frecuencia es el

ultravioleta (UV), usado por su simplicidad de uso, robustez y confiabilidad; sin embargo también es posible usar otros detectores como índice de refracción, fluorescencia o electroquímicos.

Así mismo, los detectores deben reunir ciertas características para ser utilizados, como: tener un amplio rango dinámico de respuesta, poseer una respuesta lineal, responder a todos los solutos, tener la sensibilidad apropiada, no afectarse por cambios de temperatura, poseer una buena relación señal / ruido, no destruir la muestra, etc.

2.2.3.5. Otros factores⁹

Se deben considerar otros factores en el desarrollo de métodos como que la retención cambia 1-3% por 1°C que cambie de temperatura, por lo que es importante controlar la temperatura de la columna, ya que puede entonces haber un cambio en la selectividad.

2.3. Validación de métodos analíticos

Una parte complementaria del desarrollo de un método analítico es la validación del mismo, donde el método es sometido a una serie de pruebas para determinar su efectividad.

La Secretaría de Salud en la NOM-177-SSA1-1998 definió validación como acción de probar que cualquier material, proceso, procedimiento, actividad, equipo o mecanismo empleado en la fabricación o control debe lograr los resultados para los cuales se destina. Así mismo la validación de métodos analíticos se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.^{10,11}

Dentro de los parámetros a evaluar según la norma NOM-177-SSA1-1998, están:

2.3.1. Rango ¹¹

Es el intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

2.3.2. Recuperación absoluta ¹¹

Es la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.

2.3.3. Linealidad

Se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Conjuntamente se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado. ^{8,11}

2.3.4. Precisión ¹¹

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.

2.3.5. Repetibilidad ¹¹

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

2.3.6. Reproducibilidad intralaboratorio ¹¹

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.

2.3.7. Exactitud ¹¹

Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

2.3.8. Estabilidad de la muestra ¹¹

Es la propiedad del compuesto por analizar de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

2.3.9. 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 y se expresa en unidades de concentración. Su determinación puede efectuarse por comparación con la respuesta de un blanco o placebo, considerándose límite de detección cuando la señal supere la relación señal /ruido.^{8,11}

2.3.10. Límite de cuantificación ¹¹

Es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método y se expresa también en unidades de concentración.

2.3.11. 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. Estos componentes pueden ser excipientes de un fármaco, productos de degradación, subproductos o productos laterales de síntesis de un fármaco, metabolitos del mismo analito en un fluido biológico, etc.^{8, 11}

2.3.12. Tolerancia¹¹

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.

2.4. Estudios farmacocinéticos

La farmacocinética es el estudio de la evolución temporal de los niveles de los fármacos y/o sus metabolitos en los diferentes fluidos, tejidos y excreciones del organismo así como de las relaciones matemáticas necesarias para desarrollar e interpretar tales datos.¹²

En forma general los estudios farmacocinéticos, tras una administración oral se pueden realizar tomando muestras de sangre a tiempos prefijados y, mediante una técnica analítica apropiada, previamente validada, se determinan las concentraciones plasmáticas de fármaco en cada muestra. Una vez completados estos datos, se realiza el cálculo de los parámetros farmacocinéticos del modelo.

2.4.1 Tamaño de la muestra.¹¹

El tamaño de la muestra se debe basar en consideraciones estadísticas y debe ser capaz de proveer un indicador confiable de los parámetros farmacocinéticos relevantes ($C_{m\acute{a}x}$, ABC y Ae_{∞}) y su variación.

2.4.2. Toma de muestras.¹¹

El muestreo debe realizarse por un periodo que permita cubrir por lo menos el 80% del área bajo la curva de concentración plasmática (como mínimo 4 vidas medias, en el caso de sangre). Se deben obtener muestras de sangre por lo menos en once diferentes tiempos de muestreo, que incluyan el tiempo 0, 3-4 puntos antes del $C_{m\acute{a}x}$, 3-5 puntos alrededor del $C_{m\acute{a}x}$ y 4 a 6 puntos durante la fase de eliminación.

2.4.3. Parámetros farmacocinéticos.

Área bajo la Curva (ABC): se considera representativa de la concentración total de fármaco que llega a la circulación después de ser administrado o en otras palabras nos dice del grado de exposición del fármaco en el organismo. Este parámetro se puede obtener por integración cinética o regla de los trapecios.

Concentración máxima ($C_{m\acute{a}x}$): es la máxima concentración de un fármaco que esta presente en el plasma o suero después de ser administrada cierta dosis¹⁴. La $C_{m\acute{a}x}$ es una función de la fracción de dosis que entra al organismo, del volumen aparente de distribución y de las constantes de velocidad de absorción y de eliminación de primer orden aparente.¹⁵

Constante de eliminación (k_e): es la proporción entre la velocidad del proceso de eliminación del fármaco y la cantidad del mismo remanente en el organismo en cualquier instante considerado.¹³

Depuración (Cl): es el volumen de plasma que es limpiado de fármaco por un órgano en una unidad de tiempo. También se le llama depuración renal al volumen de plasma que es limpiado de fármaco por el riñón en una unidad de tiempo.¹³

Tiempo máximo (t_{max}): es el tiempo requerido para alcanzar los niveles máximos de concentración de fármaco en la sangre y se observará un máximo en la concentración plasmática del fármaco.¹⁴

Tiempo de vida media ($t_{1/2}$): es el tiempo necesario para eliminar el 50% de fármaco presente en el organismo.

Volumen de distribución (Vd): representa el volumen acuoso del organismo en el cual es capaz de distribuirse una cantidad determinada de fármaco, de acuerdo con sus características fisicoquímicas.¹³

Volumen de distribución aparente: relaciona la concentración de fármaco en la sangre plasma con la cantidad total de fármaco en el cuerpo. Usualmente no tiene significado fisiológico directo y no se refiere a un volumen real.

2.5. Condiciones cromatográficas reportadas para cuantificar piroxicam en plasma.^{16,17,18,19,20}

Tabla 2. Condiciones cromatográficas reportadas para la cuantificación de piroxicam en plasma.

Columna	Fase móvil	Detector	λ de interés (nm)	Estándar Interno
Kromasil C ₁₈ 5 μ m	Acetonitrilo 20 mM, solución amortiguadora de fosfato pH 3.1 (50:50 v/v)	UV	360	Tenoxicam
Novapak C ₁₈ 4 μ m	0.1 M acetato de sodio-acetonitrilo-trietanolamina (61:39:0.05 v/v) pH 4.0	UV	330	Naproxen
Scharlau C ₁₈ 5 μ m	Acetonitrilo-ácido. acético 4% pH 2.8 45:55 v/v	Arreglo de diodos	354	Tenoxicam
HP ODS Shypersil C ₁₈ 5 μ m	Solución amortiguadora de fosfato pH 7.0 0.05 M, metanol 60:40 v/v	UV	254	-----
Lichrospher 100 RP18 5 μ m	Metanol-solución amortiguadora de acetato pH 4.3, 0.4 M 45:55 v/v	Arreglo de diodos	254	-----

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Desarrollo del método analítico por CLAR para cuantificar piroxicam en plasma

3.1.1. Selección del tipo de columna

Se utilizaron dos columnas una Hewlett Packard ODS Hypersil 5 μm 150 x 4.6 mm y una columna Waters YMC ODS-AQ S5 150 x 3.0 mm, 120 Å.

3.1.2. Selección de la fase móvil

Para la selección de la fase móvil se utilizó una solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.05 M, pH ácidos, como componente acuoso y acetonitrilo como componente orgánico. Así mismo se escogió aquella que proporcionara valores adecuados de los parámetros cromatográficos principales como son simetría < 1.5 , resolución > 2 , K' (factor de capacidad), N (número de platos teóricos), y un tiempo de corrida no mayor a 10 minutos, libre de interferencias provenientes del plasma, etc.

3.1.3. Selección de la longitud de onda

Se realizó un barrido en la región de 200-400 nm y se escogió la longitud de onda en donde se observó la mayor respuesta.

3.1.4. Selección del método de extracción

Para elegir el método de extracción, se probaron dos métodos de extracción:

1. Precipitación de proteínas.
2. Extracción líquido – líquido.

Para la selección del mejor método de extracción se escogió aquel que proporcionara el mejor recobro absoluto y una menor presencia de impurezas en el cromatograma.

3.1.5. Selección del estándar interno

Para la selección del estándar interno, se evaluó a tenoxicam, compuesto cuyas características estructurales y/o propiedades fisicoquímicas, como solubilidad, son semejantes a piroxicam.

Dicho compuesto debe ser extraído con la técnica propuesta y mostrar una resolución mayor o igual a 2 con respecto a piroxicam para ser elegido como estándar interno

3.2. Método analítico por CLAR para cuantificar piroxicam en plasma

3.2.1. Material, reactivos y equipo

Material

- Matraces volumétricos de 2 L.
- Matraces volumétricos de 100 mL.
- Matraces volumétricos de 50 mL.
- Matraces volumétricos de 10 mL.
- Pipetas volumétricas de 5 mL.
- Pipeta automática eppendorf de 100-1000 μ L.
- Puntas para pipeta automática eppendorf de 1 mL.
- Repipeteadora eppendorf de volumen variable y puntas intercambiables.
- Puntas para repipeteador
- Pipetas Pasteur
- Vasos de precipitados de 250 mL.
- Vasos de precipitados de 100 mL.
- Vasos de precipitados de 2 L.
- Tubos de 10 mL con tapón de rosca
- Gradillas para tubos de 16 x 150 mm.
- Tubos de 50 mL.
- Gradillas para tubos de 50 mL.
- Frascos con tapón de rosca de 1000mL.
- Microviales de 200 μ L para automuestreador Waters 717 plus.
- Tapones para microviales.
- Viales de 1 mL para automuestreador Waters 717 plus.

Reactivos

- Ácido o-fosfórico, Merck.
- Fosfato monobásico de potasio Sigma.
- Acetonitrilo HPLC, J.T. Baker.
- Diclorometano HPLC, J.T. Baker.
- Metanol HPLC, J. T. Baker.
- Piroxicam, Laboratorios Nacionales S.S.A
- Tenoxicam, Roche, S.A. de C.V
- Agua HPLC obtenida a partir de agua destilada y desionizada con equipo Milli Q Waters System.

Equipo

- Agitador vórtex thermolyne Maxi Mix II.
- Agitador horizontal dual action shaker.
- Balanza analítica Ohaus Standard Analytical.
- Sonificador Cole-Palmer 8890.
- Sistema de filtración Millipore.
- Membranas para filtración Millipore de 0.45 μm .
- Potenciómetro OAKTON ph 1000 series.
- Centrífuga Sigma.
- Baño de agua Isotemp 220.
- Cromatógrafo Waters equipado con bomba cuaternaria con desgasificador en línea, modelo 600 controlled, Waters. Integrador paquete computacional Millenium 32, Waters. Automuestreador inyector automático, modelo 717 plus de Waters.

3.2.2. Fluido biológico

Para el desarrollo del estudio se utilizó plasma proporcionado por el banco de sangre del Centro Nacional de la transfusión sanguínea. El plasma fue obtenido de seres humanos clínicamente sanos, comprobado mediante exámenes de laboratorio como hematología, química sanguínea, marcadores para hepatitis A, B y C, detección de VIH y VDRL, examen general de orina y detección de drogas de abuso (ABUSIGN). El plasma se filtró utilizando papel Whatman del No. 40.

3.2.3. Preparación de soluciones

3.2.3.1. Preparación de soluciones para fase móvil

Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.05 M pH 2.0

Se pesaron 13.61 g de fosfato de potasio de monobásico y se transfirió a un matraz volumétrico de 2 L, se disolvió con agua desionizada y se llevó a volumen con la misma, posteriormente se ajustó el pH a 2.0 con ácido fosfórico concentrado. Esta solución se filtró, a través de una membrana de 0.45 μm , y se desgasificó con vacío durante 20 minutos.

Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 0.1 M pH 2.0

Se pesaron 13.61 g de fosfato de potasio monobásico transfiriéndose a un matraz volumétrico de 1L, se disolvió con agua desionizada y se llevó a volumen con la misma para posteriormente ajustar el pH a 2.0 con ácido fosfórico concentrado.

Acetonitrilo HPLC: Se filtró, a través de una membrana de 0.45 μm , 1 L de Acetonitrilo HPLC y se desgasificó con vacío durante 20 min.

3.2.3.2. Preparación de soluciones estándar

Solución patrón de Piroxicam (100 $\mu\text{g/mL}$)

Se pesaron con exactitud el equivalente a 10 mg de Piroxicam (0.010 g), transfiriéndose a un matraz volumétrico de 100 mL y llevándose a volumen con metanol. Esta solución contiene 100 $\mu\text{g/mL}$ de Piroxicam.

Solución patrón de Piroxicam (10 µg/mL)

Se transfirieron cuantitativamente 5 mL de la solución de 100 µg/mL de Piroxicam a un matraz volumétrico de 50 mL, se llevó a volumen con metanol. Ésta solución contiene 10 µg/mL de piroxicam.

Solución patrón de Piroxicam (1 µg/mL)

Se transfirieron cuantitativamente 5 mL de la solución de 10 µg/mL de Piroxicam a un matraz volumétrico de 50 mL. Se llevó a volumen con metanol. Esta solución contiene 1 µg/mL de Piroxicam.

Solución estándar interno de Tenoxicam (100 mg/mL)

Se pesaron con exactitud el equivalente a 10 mg de Tenoxicam (0.010 g), se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a volumen con metanol. Ésta solución contiene 100 µg/mL de Tenoxicam.

Solución estándar interno de Tenoxicam (10 µg/mL)

Se transfirieron cuantitativamente 10 mL de la solución de 100 µg/mL de Tenoxicam a un matraz volumétrico de 100 mL, se llevó a volumen con metanol. Ésta solución contiene 10 µg/mL de Tenoxicam

3.2.3.3. Preparación de soluciones para evaluar adecuabilidad del sistema

Con el fin de evaluar la adecuabilidad del sistema cromatográfico y de llevar un monitoreo de la columna cromatográfica se preparó una solución de piroxicam (3 µg/mL) y de tenoxicam (2 µg/mL). Disueltos en solución amortiguadora de fosfato de potasio 0.05 M,

pH 2.0:ACN (65:35) v/v. Esta solución se dividió en 20 alícuotas respectivamente de 3 mL y fueron almacenadas a -70°C . Previo a cada corrida analítica, se descongeló una de las alícuotas y se realizaron 6 inyecciones consecutivas de 10 μL .

3.2.4. Preparación de curva patrón y controles

La curva patrón y controles se realizó como se describe en la tabla 3.

1. En un tubo de vidrio con tapón de rosca se añadió la alícuota correspondiente a piroxicam.
2. Posteriormente se añadió 30 μL de estándar interno de tenoxicam y se evaporó bajo atmósfera de nitrógeno a 40°C durante 5 minutos.
3. Se adicionó 500 μL de plasma y después se prosiguió como se muestra en la figura 3 con respecto al método de extracción de piroxicam.

Tabla 3. Preparación de curva patrón y controles.

μL de Piroxicam (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	μL de Piroxicam (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	μL de Tenoxicam (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volumen de plasma (μL)	Concentración final de Piroxicam ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
10	-	30	500	0.02
25	-	30	500	0.05
50	-	30	500	0.1
100	-	30	500	0.2*
150	-	30	500	0.3
-	25	30	500	0.5
-	50	30	500	1.0
-	80	30	500	1.6*
-	100	30	500	2.0
-	150	30	500	3.0*
-	170	30	500	3.4
-	200	30	500	4.0

*Puntos control de calidad bajo (0.2), medio (1.6) y alto (3.0), para la determinación de los parámetros de estabilidad, exactitud, precisión y recobro del método

3.3. Validación del método analítico por CLAR para cuantificar piroxicam en plasma

Para la validación del método analítico se evaluaron los parámetros señalados en la 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.

3.3.1. Validación del método

Se analizaron tres series independientes de curvas patrón y cinco series independientes de muestras de control de calidad (control bajo, medio y alto por serie), en el primer día de trabajo; y analizando series independientes de muestras de control de calidad (control bajo, medio y alto) por duplicado el segundo y tercer día de trabajo respectivamente. Los parámetros de la validación se describen detalladamente a continuación

3.3.1.1. Linealidad

Se prepararon tres curvas patrón en plasma, en un día de trabajo, en el rango de concentración de 0.02 a 4.0 $\mu\text{g/mL}$. La linealidad fue evaluada graficando la relación de alturas. (Piroxicam /estándar interno) con respecto a la concentración para cada punto de la curva patrón. Se realizó un ajuste lineal por mínimos cuadrados y se determinó la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación.

Especificación: el coeficiente de correlación (r) debe ser igual o mayor a 0.99.

3.3.1.2. Precisión y exactitud

La precisión del método fue evaluada como repetibilidad (precisión intradía) y reproducibilidad (precisión interdía), analizando tres concentraciones conocidas de

Piroxicam en plasma, diferentes a los de la curva patrón, pero incluidos dentro del rango, en un nivel bajo, medio y alto (0.2, 1.6, 3.0 µg/mL)

Para el caso de la repetibilidad del método analítico, los niveles anteriores fueron analizados a partir de soluciones estándar preparadas de mane independiente por quintuplicado y determinándose el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las 5 determinaciones.

Mientras tanto para evaluar la reproducibilidad entre dos analistas se analizaron dos muestras preparadas de forma independiente para cada nivel de concentración (bajo, medio y alto) y una curva de calibración durante tres días diferentes de análisis.

La exactitud fue definida como la desviación absoluta (Desviación absoluta %) del valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración (tanto para los datos de repetibilidad como de reproducibilidad) con respecto al valor nominal (cantidad adicionada), en donde:

$$\text{Desv.abs\%} = 100 \times \frac{|\text{Cantidad adicionada} - \text{Cantidad recuperada}|}{\text{Cantidad adicionada}}$$

Especificación: para la precisión el coeficiente de variación de las concentraciones recuperadas no deberá ser mayor al 15% y para la exactitud la desv. absoluta % tiene que estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

3.3.1.3. Límite de cuantificación

La sensibilidad del método fue determinada como la concentración mínima cuantificable (CMC) ó limite de cuantificación (LC). Para determinar éste parámetro se preparó por quintuplicado a partir de soluciones estándar independientes, los siguientes puntos en plasma:

Tabla 4. Preparación de soluciones estándar para determinar límite de cuantificación.

μL de Piroxicam (1 $\mu\text{g/mL}$)	Volumen de Tenoxicam (μL) (10 $\mu\text{g/mL}$)	Volumen de plasma (μL)	Concentración final de piroxicam ($\mu\text{g/mL}$)
5	30	500	0.01
10	30	500	0.02

Especificación: El LC es la concentración más baja del rango de trabajo, que cumple con precisión y exactitud, con un coeficiente de variación no mayor al 20 % y un % desviación absoluta del $\pm 20\%$ con respecto al valor nominal.

3.3.1.4. Límite de detección

El límite de detección (LD) fue determinado como la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica es tres veces mayor que el nivel de ruido y la precisión y la exactitud son mayores al 20%.

3.3.1.5. Selectividad

La selectividad del método fue determinada, analizando muestras blanco de la matriz biológica (plasma) proveniente de cada voluntario y muestras de plasma conteniendo fármacos de uso común, como ácido acetilsalicílico, paracetamol y heparina, evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de piroxicam y tenoxicam (estándar interno)

Especificación: no deben existir interferencias entre el pico cromatográfico de Piroxicam y los compuestos mencionados anteriormente.

3.3.1.6. Recobro

Se analizaron por quintuplicado tres concentraciones conocidas (baja, media y alta), donde el recobro fue definido como el porcentaje de la altura de piroxicam recuperada después de la extracción de las muestras de la matriz biológica, comparada con la altura de un estándar no extraído.

Especificación: La variación en los tres niveles de concentración debe encontrarse dentro $\pm 15\%$ con respecto al coeficiente de variación y debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango analizado.

3.3.1.7. Estabilidad

Se evaluaron las estabildades en congelación, bajo ciclos de congelación-descongelación y como muestra procesada.

Especificación: para estabilidad bajo condiciones de congelación, ciclos de congelación – descongelación y estabilidad de la muestra procesada se consideran estables las muestras si presentan una desviación absoluta del $\pm 15\%$ del valor original o tiempo cero (primer día de análisis)

3.3.1.7.1. Estabilidad en congelación

La estabilidad de piroxicam en plasma en congelación a -70°C fue documentada preparando dos series de muestras control de calidad conteniendo piroxicam a las siguientes concentraciones: 0.2, 1.6 y 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las cuales fueron almacenadas a -70°C y congeladas durante 90 días.

3.3.1.7.2. Estabilidad bajo ciclos congelación-descongelación

La estabilidad de piroxicam en plasma bajo dos ciclos congelación-descongelación a menos 70°C se realizó preparando por duplicado tres series de muestras control de calidad conteniendo piroxicam a las siguientes concentraciones: 0.2, 1.6 y 3.0 µg/mL, las cuales fueron congeladas a -70°C y descongeladas a las 24 horas. Las muestras se volvieron a congelar y fueron nuevamente descongeladas a las 48 hrs.

3.3.1.7.3. Estabilidad de la muestra procesada.

Para determinar la estabilidad de la muestra procesada se prepararon por duplicado muestras de piroxicam en plasma a tres niveles de concentración (alto, medio y bajo), las cuales fueron sometidas al procedimiento de extracción descrito en la figura 3 y se inyectaron en el sistema cromatográfico a los tiempos: 0, 24 y 48 horas después de su preparación.

3.3.1.8. Tolerancia

Para evaluar tolerancia se prepararon por duplicado y a partir de soluciones estándar independientes, muestras de concentraciones 0.2, 1.6, 3.0 µg/mL, las cuales se inyectaron a las condiciones normales del método y posteriormente se realizaron cambios en la proporción de la fase móvil y temperatura de la columna como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 5. Cambios realizados en la proporción de fase móvil y temperatura de la columna para la determinación de la tolerancia.

Cambios en la proporción de fase móvil solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH 2.0:ACN (v/v)	Temperatura de la columna °C
(condiciones de trabajo) 66:34	38
66:34	30
66:34	40
62:38	38
72:28	38

Especificación: el método se considera tolerante a estos cambios si no se presenta una desviación absoluta con respecto a las condiciones originales, mayor al 15%.

3.4. Diseño del estudio clínico

Para llevar a cabo el estudio se seleccionaron 21 voluntarios, a los cuales se les administró una tableta de piroxicam de 20 mg (Pfizer) lote 21804011, caducidad marzo 2005. La ingesta del medicamento se consideró como tiempo cero. El medicamento se ingirió después de por lo menos 10 horas de ayuno y dos horas antes del desayuno y con 250 mL de agua, administrándose a todos los voluntarios el día del estudio, en grupos de dos y dejando un periodo de 5 minutos entre cada dos voluntarios.

Se tomaron muestras de sangre de 10 mL, con el sistema vacutainer en viales estériles. Los tiempos de muestreo después de la administración fueron de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 12, 22, 48, 96, 120, 168, 192, 216 horas. La sangre se centrifugó para obtener el plasma que se mantuvo a -70°C hasta el día de su análisis.

La secuencia de dosificaciones y muestras de sangre entre los sujetos, se mantuvo de manera que los tiempos para estas actividades fueran los mismos.

En la siguiente tabla se añade el reporte de análisis del producto innovador piroxicam (Feldene[®]) como producto terminado.

Tabla 6. Reporte de análisis de piroxicam (Feldene[®]) tabletas 20 mgg o. lote: 21804011.

Determinación	Especificación	Resultado
Valoración	92.5 – 107.5 %	101.7 %
Uniformidad de dosis	85.0 – 115. 0 %	101.6
Disolución	no menos de 75 %	89.9 %

3.4.1. Selección de voluntarios

- Personas clínicamente sanas que no presenten sensibilidad al fármaco bajo estudio, lo que se determina por medio de la historia clínica y pruebas de laboratorio; deben ser como mínimo: examen general de orina, química sanguínea, biometría hemática, transaminasas hepáticas, prueba de la hepatitis B, VIH, radiografía de tórax y electrocardiograma.
- Edades entre 18 y 55 años, con un peso \pm 10% del ideal.
- Sin antecedentes de drogadicción o de abuso de alcohol, café, tabaco o bebidas de cola, ni estar bajo la administración de medicamentos concomitantes.
- Se realizó una valoración psicológica para evaluar el perfil de personalidad de los voluntarios que se encuentren en el estudio y el IDARE (intervalo de ansiedad: rasgo - estado)
- La participación de los sujetos fue de manera voluntaria, para lo cual se firmó una carta de aceptación para participar en el estudio de acuerdo con los lineamientos propuestos en la Ley General de Salud.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.4.1.1. Criterios de exclusión

- Voluntarios con alguna alteración en sus constantes vitales registradas en la selección de voluntarios.
- Voluntarios con antecedentes de padecimientos cardiovasculares, renales, hepáticos, musculares, metabólicos, gastrointestinales, incluyendo estreñimiento, neurológicos, endocrinos, hematopoyéticos o cualquier tipo de anemia, asma, enfermedad mental u otras anomalías orgánicas. Así como aquellos que haya tenido un traumatismo muscular dentro de los 21 días previos al estudio.
- Voluntarios que requieran de cualquier medicamento durante el curso del estudio, aparte del medicamento que está siendo estudiado.
- Voluntarios que hayan estado expuestos a fármacos conocidos como inductores o inhibidores enzimáticos hepáticos o que hayan tomado medicamentos potencialmente tóxicos dentro de los 30 días previos al inicio del estudio.
- Voluntarios que hayan sido hospitalizados por cualquier problema durante los cuatro meses previos al inicio del estudio.
- Sujetos alérgicos a cualquier antibiótico y/o analgésicos antiinflamatorios no esteroideos.
- Sujetos que hayan donado o perdido 450 mL o más de sangre dentro de los 60 días previos al inicio del estudio.
- Voluntarias que resulten positivas a la prueba de embarazo.

3.4.1.2. Retiro de voluntarios

Los sujetos podrán ser retirados del estudio por no cumplir con el protocolo o en opinión del investigador por razones médicas (eventos adversos), estos sujetos no podrán ser reemplazados. Cualquier sujeto puede en cualquier momento, dejar de participar en el estudio si así lo desea.

3.5. Análisis de las muestras en voluntarios

Una vez procesadas las muestras por medio del método de extracción líquido-líquido descrita en la figura 3, se prosiguió a realizar el análisis de las muestras en la forma que a continuación se describe.

Las muestras se analizaron en una corrida analítica que incluye una curva patrón y dos series de controles (control bajo, control medio, control alto) intercalados cada 15 muestras plasmáticas. Se usó el integrador computacional Millennium 32 de Waters para determinar las alturas de piroxicam y tenoxicam (estándar interno)

3.5.1. Cuantificación de las muestras plasmáticas

La relación de alturas piroxicam / estándar interno (y) y la concentración de los estándares (x) se ajustaron por medio de un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación $\log y = m \log x + \log b$, donde "log b" es la ordenada al origen (intercepto- y) y "m" es la pendiente de la curva de calibración. Para cuantificar las muestras del estudio, la relación de alturas piroxicam / estándar interno, se interpoló en la ecuación obtenida de la curva de calibración.

La validez de cada corrida durante el procesamiento de las muestras se determinó examinando los resultados de la linealidad y muestras control de calidad. Una corrida analítica fue aceptada si:

- El 75% o un mínimo de seis valores de concentraciones estándar (incluyendo la concentración superior), caen dentro del $\pm 15\%$ de su valor nominal, excepto para el límite de cuantificación, el cual deberá estar en el $\pm 20\%$ con respecto a su valor nominal y el valor del coeficiente de correlación "r" sea ≥ 0.99 .

- Si al menos el 67% de los valores de control de calidad se encuentran dentro del límite $\pm 20\%$ de los valores esperados.
- Las concentraciones para las muestras de control de calidad baja, media y alta deben ser diferentes de las usadas en la curva de calibración pero deben encontrarse dentro del rango evaluado.
- Si el 75% del total de muestras analizadas en la corrida presentan una simetría en los picos cromatográficos de interés menor a 2 (calculado con el integrador Millennium 32 de Waters con el método USP)

3.6. Análisis farmacocinético.

Se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos utilizando el paquete computacional Biopak® 2.0:

- 1.- El área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración hasta el último tiempo " t " ($ABC_{0 \rightarrow t}$), fue determinada con el método trapezoidal.
- 2.- El área bajo la curva de concentración plasmática extrapolada desde el tiempo " t " a infinito ($ABC_{t \rightarrow \infty}$), fue determinada dividiendo la última concentración plasmática entre la fase lineal terminal (K_e)
- 3.- El área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración (tiempo cero) a infinito ($ABC_{0 \rightarrow \infty}$) fue calculada sumando el $ABC_{0 \rightarrow t}$ y el $ABC_{t \rightarrow \infty}$.
- 4.- La concentración plasmática máxima (C_{max}) fue determinada directamente de la curva de concentración plasmática-tiempo.
- 5.- El tiempo al cual se alcanza la concentración plasmática máxima (T_{max}) fue determinada directamente de la curva de concentración plasmática-tiempo.
- 6.- La constante de eliminación (K_e) fue calculada mediante la pendiente de la porción lineal terminal

7.- El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) fue calculado a partir de la pendiente de la porción lineal terminal (**0.693/K_e**).

Los siguientes parámetros farmacocinéticos fueron calculados por medio de programa excel, mediante las siguientes formulas:

8.- La depuración (**Cl/F**) fue calculada por medio de la fórmula: $\frac{Cl}{F} = \frac{D}{ABC_{0-\infty}}$, donde F es la biodisponibilidad.

9.- El volumen de distribución (**Vd/F**) fue calculada mediante la fórmula: $\frac{Vd}{F} = \frac{D}{ABC_{0-\infty} * K_e}$, donde F es la biodisponibilidad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Método analítico por CLAR para cuantificar piroxicam en plasma

4.1.1. Condiciones cromatográficas utilizadas

Las mejores condiciones cromatográficas obtenidas después de desarrollar el método fueron las siguientes:

Tabla 7. Condiciones cromatográficas utilizadas en el método analítico.

Columna	Waters YMC ODS-AQ S5 150 x 3.0 mm, 120 Å
Flujo	0.6 mL/min
Fase Móvil	Solución Amortiguadora de fosfato de potasio 0.05 M, pH 2.0:ACN 66:34 v/v
Longitud de onda	354 nm
Tiempo de retención	Piroxicam 8.0 min. Tenoxicam (estándar interno) 3.0 min

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.1.2. Método de extracción

Para la validación del método analítico y el estudio farmacocinético, se empleó un método de extracción líquido-líquido que se describe a continuación:

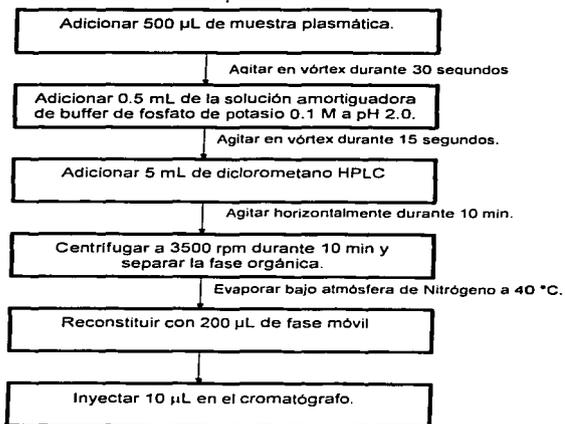


Figura 3. Método de extracción de piroxicam a partir de plasma.

4.2. Validación del método analítico por CLAR para cuantificar piroxicam en plasma

4.2.1. Validación del método

4.2.1.1. Linealidad

Los resultados de la linealidad del método se muestran en la siguiente tabla, donde se observa que el método fue lineal en el rango de concentraciones de 0.02 a 4.0 µg/mL, los valores del coeficiente de correlación (r) obtenidos fueron de 0.99 o mayores. El valor promedio para la pendiente (m) fue de 1.1006 y para la ordenada al origen (b) fue de -0.0199. En la figura 3 se observa la linealidad del método.

Tabla 8. Resultados obtenidos en la linealidad del método para cuantificar piroxicam.

		Concentración de Piroxicam (µg/mL)											
Concentración		0.02	0.05	0.1	0.3	0.5	1.0	2.0	3.4	4.0	m	B	r
Respuesta *	1	0.018	0.038	0.096	0.258	0.479	1.048	---	3.255	3.990	0.98389	-0.00463	0.9995
	2	0.016	0.043	0.099	0.307	0.567	1.094	2.241	3.834	4.374	1.11108	-0.0064	0.9997
	3	0.022	0.048	0.104	0.335	0.501	1.100	2.057	4.155	4.772	1.1996	-0.0606	0.9979
Prom.		0.019	0.043	0.100	0.300	0.516	1.081	2.149	3.748	4.379			
D.E.		0.003	0.005	0.004	0.039	0.046	0.028	0.130	0.456	0.391			
C.V.%		16.36	11.63	4.05	12.99	8.88	2.63	6.05	12.17	8.93			

m = pendiente, b = ordenada al origen, r = coeficiente de correlación
D.E = desviación estándar. C.V % = por ciento coeficiente de variación.
*respuesta = relación de alturas piroxicam / estándar interno.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

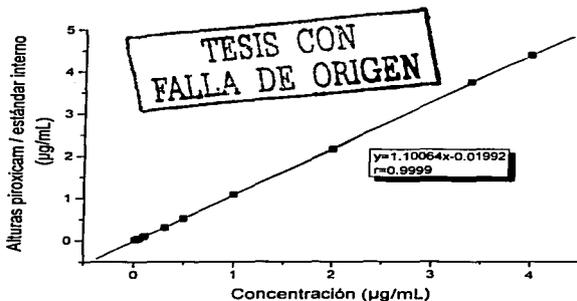


Figura 4. Gráfica de Linealidad del método

4.2.1.2. Precisión y exactitud

Los valores de la precisión del método evaluados como repetibilidad y reproducibilidad se muestran en las tablas 9 y 10 respectivamente, así como la exactitud definida como la desviación absoluta (Desv. abs.%) tanto para repetibilidad como para reproducibilidad.

4.2.1.2.1. Repetibilidad

En la siguiente tabla de resultados se observa que el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración fue menor o igual al 3.79%, mientras que la desviación absoluta (Desv.abs%) en los niveles de concentración estudiados fue menor o igual al 5.00%.

Tabla 9. Repetibilidad y exactitud del método analítico para la cuantificación de piroxicam.

Muestra	Concentración recuperada (µg/mL)		
	Control bajo	Control Medio	Control Alto
1	0.22	1.63	3.04
2	0.21	1.63	2.90
3	0.20	1.61	3.00
4	0.21	1.69	3.17
5	0.21	1.62	3.17
Promedio	0.21	1.636	3.056
D.E.	0.007	0.031	0.116
C.V. %	3.33	1.90	3.79
Concentración adicionada (µg/mL)	0.2	1.6	3.0
Desv.abs %	5.00	2.25	1.87

C.V es el coeficiente de variación

D.E es la desviación estándar o el error relativo a la regresión

4.2.1.2.2. Reproducibilidad

En la tabla 10 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método, donde se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de trabajo osciló de 1.99 a 2.89% como máximo, mientras que la desviación absoluta % fue menor o igual a 8.33 %, en las diferentes concentraciones evaluadas.

Tabla 10. Reproducibilidad y exactitud del método analítico para la cuantificación de piroxicam.

Día	Réplica número	Concentración Recuperada (µg/mL)		
		Control bajo	Control Medio	Control Alto
1	1	0.22	1.63	3.04
	2	0.21	1.63	2.90
2	1	0.22	1.65	3.05
	2	0.22	1.61	3.02
3	1	0.22	1.52	2.94
	2	0.21	1.59	2.98
Promedio		0.217	1.605	2.988
D.E		0.005	0.046	0.059
C.V %		2.30	2.89	1.97
Concentración adicionada (µg/mL)		0.2	1.6	3.0
Desviación absoluta %		8.33	0.31	0.39

4.2.1.3. Límite de cuantificación (LC) y Límite de detección (LD)

Tabla 11. Límite de cuantificación y límite de detección.

	Límite de Cuantificación ($\mu\text{g/mL}$)	Límite de Detección ($\mu\text{g/mL}$)
Piroxicam	0.02	0.01

Para el caso del límite de cuantificación la precisión inter día fue de 18.46 % y la exactitud (desviación absoluta %) fue de 9.00.

4.2.1.4. Selectividad

En los siguientes cromatogramas se puede observar que no hay interferencias entre piroxicam, tenoxicam y los demás fármacos evaluados.

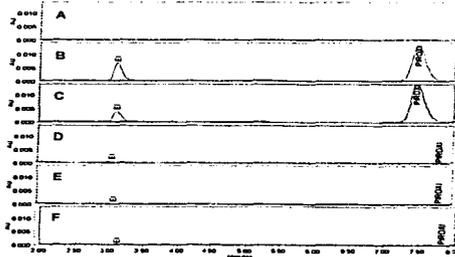


Figura 5. Selectividad del método analítico para la cuantificación de piroxicam. Se muestran los cromatogramas de Piroxicam. (A) blanco de plasma; (B) estándar en plasma con 2 $\mu\text{g/mL}$ de Piroxicam; (C) plasma de un voluntario sano 2 horas después de una administración oral de Piroxicam; (D) plasma añadido con ácido acetilsalicílico; (E) plasma añadido con paracetamol; (F) plasma añadido con heparina.

4.2.1.5. Recobro

Como se observa en la siguiente tabla el recobro promedio fue del 83.63%, determinado a las concentraciones de 0.2 µg/mL (control bajo), 1.6 µg/mL (control medio) y 3.0 µg/mL (control alto)

Tabla 12. Recobro del método analítico para la cuantificación de piroxicam.

Estándar	Estándar en fase móvil (no extraído) Altura de Piroxicam	Estándar en plasma (extraído) Altura de Piroxicam	Recobro %
C. Alto 3.0 µg/mL	31127.28	24186.28	
	31343.60	28477.48	
	32213.46	31472.30	
	32333.78	32035.6	
	32544.47	26350.01	
Promedio	31912.52	28504.33	89.32
C. Medio 1.6 µg/mL	16716.53	13331.10	
	16962.33	13723.64	
	16531.04	14270.06	
	17234.49	13459.83	
	17129.61	13354.30	
Promedio	16914.80	13627.79	80.57
C. Bajo 0.2 µg/mL	1968.84	1803.69	
	1980.81	1504.03	
	1983.56	1330.81	
	1990.45	1832.35	
	1980.82	1551.96	
Promedio	1980.89	1604.57	81.00
Promedio total			83.63

4.2.1.6. Estabilidad

En las tablas 13,14 y15 se muestran los resultados de estabilidad en condiciones de almacenamiento, en ciclos de congelación-descongelación y de la muestra procesada.

4.2.1.6.1. Estabilidad en congelación (-70°C)

Los resultados del análisis, mostraron una desviación absoluta menor al 15% con respecto al valor a tiempo cero, por lo que se considera que piroxica es estable en congelación a -70°C durante 20 días.

Tabla 13. Estabilidad en congelación (-70°C)

Tiempo 0			
	C. Bajo 0.2 µg/mL	C. Medio 1.6 µg/mL	C. Alto 3.0 µg/mL
	0.22	1.56	2.84
	0.22	1.62	2.80
Promedio	0.22	1.59	2.82
Tiempo 20 días			
	C. Bajo 0.2 µg/mL	C. Medio 1.6 µg/mL	C. Alto 3.0 µg/mL
	0.27	1.87	3.19
	0.23	1.68	3.13
Promedio	0.25	1.775	3.16
Desv.abs%	13.63	11.63	12.06

4.2.1.6.2. Estabilidad bajo ciclos de congelación-descongelación

Dado que la desviación absoluta fue menor al 15% con respecto al valor original, se considera que el piroxicam es estable bajo estas condiciones.

Tabla 14. Estabilidad bajo ciclos de congelación-descongelación.

Tiempo 0			
	C. Bajo 0.2 µg/mL	C. Medio 1.6 µg/mL	C. Alto 3.0 µg/mL
	0.22	1.56	2.84
	0.22	1.62	2.80
Promedio	0.22	1.59	2.82
Primer Ciclo			
	C. Bajo 0.2 µg/mL	C. Medio 1.6 µg/mL	C. Alto 3.0 µg/mL
	0.23	1.94	3.22
	0.23	1.68	3.16
Promedio	0.23	1.81	3.19
Desv.abs%	4.55	13.84	13.12
Segundo Ciclo			
	C. Bajo 0.2 µg/mL	C. Medio 1.6 µg/mL	C. Alto 3.0 µg/mL
	0.20	1.71	3.26
	0.20	1.68	3.17
Promedio	0.20	1.69	3.21
Desv.abs%	9.09	6.29	13.83

4.2.1.6.3. Estabilidad de la muestra procesada.

El piroxicam fue estable en la solución de inyección durante 48 hrs. después de su preparación ya que su desviación absoluta no fue mayor del 15% con respecto al valor original o tiempo cero (primer día de análisis).

Tabla 15. Estabilidad como muestra procesada.

Tiempo 0			
	C. Bajo 0.2 µg/ml	C. Medio 1.6 µg/ml	C. Alto 3.0 µg/ml
	0.22	1.65	3.05
	0.22	1.61	3.02
Promedio	0.22	1.63	3.03
Tiempo 24 horas			
	C. Bajo 0.2 µg/ml	C. Medio 1.6 µg/ml	C. Alto 3.0 µg/ml
	0.21	1.65	3.12
	0.21	1.63	3.14
Promedio	0.21	1.64	3.13
Desv.abs%	4.54	0.61	3.30
Tiempo 48 horas			
	C. Bajo 0.2 µg/mL	C. Medio 1.6 µg/mL	C. Alto 3.0 µg/mL
	0.19	1.67	3.20
	0.19	1.64	3.25
Promedio	0.19	1.65	3.22
Desv.abs%	13.64	1.23	6.26

4.2.1.7. Tolerancia

Se realizaron los cambios en la proporción de la fase móvil y temperatura de la columna indicados en la tabla 5. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 16, 17, 18, 19 y 20.

Tabla 16. Tolerancia del método analítico en las condiciones originales de trabajo.

Condiciones originales: solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M:ACN (66:34 v/v), 38°C			
	C. Bajo 0.2 µg/mL	C. Medio 1.6 µg/mL	C. Alto 3.0 µg/mL
	0.17	1.32	2.72
	0.24	1.58	3.03
Promedio	0.205	1.45	2.88

Tabla 17. Tolerancia del método analítico con proporción de fase móvil (66:34 v/v) y 30°C como temperatura de la columna.

Cambio de temperatura a 30°C fase móvil de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M: ACN (66:34 v/v)			
	C. Bajo 0.2 µg/mL	C. Medio 1.6 µg/mL	C. Alto 3.0 µg/mL
	0.17	1.34	2.75
	0.24	1.6	3.13
Promedio	0.20	1.47	2.94
Desv.abs%	0.0	1.37	2.08

Tabla 18. Tolerancia del método analítico con proporción de fase móvil 66:34 v/v) y 40°C como temperatura de la columna.

Cambio de temperatura a 40°C fase móvil de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M: ACN (66:34 v/v)			
	C. Bajo 0.2 µg/mL	C. Medio 1.6 µg/mL	C. Alto 3.0 µg/mL
	0.17	1.33	2.74
	0.21	1.59	3.01
Promedio	0.19	1.46	2.87
Desv.abs%	7.32	0.69	0.35

Tabla 19. Tolerancia del método analítico con proporción de fase móvil (62:38 v/v) y 38°C como temperatura de la columna.

Cambio de proporción de solución amortiguadora a 38°C (fase móvil de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M: ACN (62:38 v/v)			
	C. Bajo 0.2 µg/mL	C. Medio 1.6 µg/mL	C. Alto 3.0 µg/mL
	0.17	1.35	2.77
	0.24	1.6	3.15
Promedic	0.20	1.47	2.96
Desv.abs%	2.44	1.38	2.78

Tabla 20. Tolerancia del método analítico con proporción de fase móvil (72:28 v/v) y 38° C como temperatura de la columna.

Cambio de proporción de solución amortiguadora a 38°C (fase móvil de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M: ACN (72:28 v/v)			
	C. Bajo 0.2 µg/mL	C. Medio 1.6 µg/mL	C. Alto 3.0 µg/mL
	0.19	1.31	2.61
	0.26	1.56	2.95
Promedio	0.225	1.43	2.78
Desv.abs%	9.75	1.38	3.47

Dados los resultados anteriormente mostrados se considera que el método es tolerante a los cambios realizados ya que la desviación absoluta no fue mayor al 15% con respecto al valor original.

4.3. Estudio farmacocinético

Después de realizar el desarrollo y validación del método analítico, éste se aplicó a un estudio farmacocinético en 21 voluntarios clínicamente sanos.

4.3.1. Análisis de las muestras plasmáticas de los voluntarios

Las muestras del estudio se analizaron en siete corridas. Los resultados de las muestras de control de calidad (bajo, medio y alto) de todas las corridas del estudio se resumen en la tabla 21, mientras que los resultados de las curvas de calibración de todas las corridas del estudio se resumen en la tabla 22.

Tabla 21. Seguimiento de las muestras de control de calidad para piroxicam.

Voluntarios	Concentración de Piroxicam en plasma (µg/mL)		
	C. Bajo 0.2 µg/mL	C. Medio 1.6 µg/mL	C. Alto 3.0 µg/mL
1, 2, 3	0.19	1.71	2.77
	0.2	1.62	3.01
4, 5, 6	0.18	1.53	3.30
	0.20	1.57	2.69
7, 8, 9	0.19	1.80	3.34
	0.19	1.89	3.33
10, 11, 12	0.17	1.60	3.24
	0.21	1.45	2.74
13, 14, 15	0.21	1.37	2.59
	*	1.34	2.57
16, 17, 18	0.18	1.48	2.88
	*	1.47	2.79
19, 20, 21	0.18	*	2.87
	0.20	1.56	*
REPETICIÓN1	0.20	1.69	3.01
	0.20	1.59	3.16
REPETICION2	0.21	1.51	3.02
	0.17	1.52	2.89
Promedio	0.19	1.58	2.96
D.E. (n-1)	0.01	0.15	0.27
C.V.%	5.26	9.49	9.12
Conc.nominal	0.2	1.6	3.0
Dev.abs(%)	2.86	1.33	1.20

Nota: * valores que excedieron el límite de $\pm 20\%$ del valor nominal

Tabla 22. Seguimiento de curvas de calibración para piroxicam.

Volumenios	Concentración de Piroxicam en Plasma (µg/mL)									Intercepto (b)	Pendiente (m)	Coeficiente de correlación (r)
1.2.3	0.022	0.063	0.101	0.302	0.488		1.821	3.462	4.062	0.0068	1.0393	0.9998
4.5.6	0.025	0.049	0.110	0.289	0.511	1.10	1.925	3.324	4.041	0.0219	1.0287	0.9994
7.8.9	0.020	0.047	0.105	0.322	0.504	0.95	2.021	3.323	4.263	0.0558	0.9839	0.9998
10.11.12	0.023		0.104	0.309		1.00	2.143	3.387	3.848	0.0293	1.0004	0.9999
13.14.15	0.025	0.052	0.111	0.311	0.552	1.02	1.996	3.285	3.713	0.0301	1.0721	0.9997
16.17.18	0.024	0.055	0.098	0.313	0.515	1.07	2.031	3.253	3.875	0.0202	1.0445	0.9997
19.20.21	0.023	0.053	0.098	0.330	0.536	1.02	2.055		3.643	0.0151	1.0224	0.9997
Repetición es	0.021	*	0.103	0.341	0.523	0.94	1.732	3.545	4.234	0.0350	1.0288	0.9995
Repetición es	0.021	0.051	0.102	0.329	0.469	1.09	1.993	3.403	3.896	0.0195	1.0307	0.9998
Promedio	0.023	0.053	0.104	0.316	0.512	1.024	1.980	3.372	3.953	0.0259	1.0276	0.9997
D.E. (n-1)	0.0018	0.0052	0.0046	0.0159	0.0261	0.0602	0.1145	0.0968	0.2147			
C.V. %	7.826	9.811	4.423	5.032	5.098	5.879	5.783	2.871	5.431			
Conc. nominal	0.02	0.05	0.10	0.30	0.50	1.00	2.00	3.40	4.00			
Desv. abs. %	13.043	5.680	3.846	5.063	2.344	2.344	1.010	0.830	1.189			

* valores que exceden $\pm 15\%$ con respecto a la concentración nominal.

Los valores de "r" mostrados a lo largo del estudio fueron de 0.995 o mejor. La exactitud fue del 8.54% o mejor para todos los puntos.

Las concentraciones de las muestras por debajo del límite de cuantificación (tomando en cuenta la variabilidad máxima permitida del $\pm 20\%$), no se incluyeron en los cálculos.

4.3.2. Resultados promedio del estudio farmacocinético

En la siguiente tabla se presentan los valores promedio de las concentraciones plasmáticas de piroxicam, la gráfica promedio de la concentración plasmática *versus* tiempo y la gráfica semilogarítmica de la concentración plasmática *versus* tiempo se muestran en la figura 6 y 7 respectivamente.

Las concentraciones plasmáticas determinadas para cada uno de los voluntarios, y sus respectivas gráficas, se muestran en el apéndice I.

Tabla 23. Valores promedio de concentración plasmática de piroxicam ($\mu\text{g/mL}$) \pm D.E., a los diferentes tiempos de muestreo.

Tiempo (h)	Concentración promedio de piroxicam en plasma \pm D. E ($\mu\text{g/mL}$)
0	0
1	2.54 \pm 0.55
2	2.80 \pm 0.51
3	2.53 \pm 0.62
4	2.50 \pm 0.70
5	2.67 \pm 0.59
8	2.58 \pm 0.80
12	2.19 \pm 0.58
22	2.12 \pm 0.69
48	1.63 \pm 0.48
96	0.82 \pm 0.30
120	0.55 \pm 0.22
168	0.36 \pm 0.20
192	0.22 \pm 0.17
216	0.15 \pm 0.09

D.E = desviación estándar

La gráfica de concentración plasmática *versus* tiempo, así como la gráfica de transformación logarítmica de los datos de concentración se muestran a continuación:

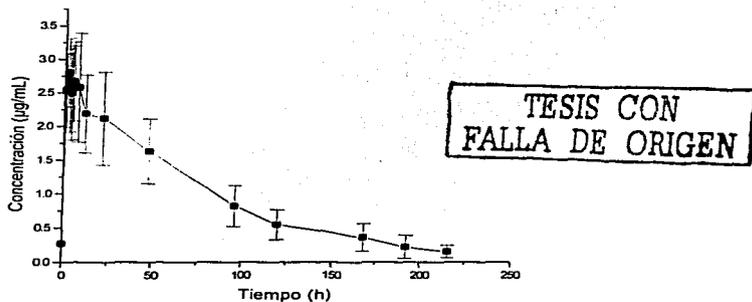


Figura 6. Grafica de la concentración plasmática promedio versus tiempo, después de la administración oral de piroxicam 20 mg.

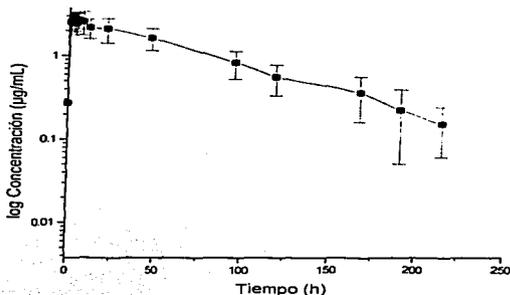


Figura 7. Grafica semilogarítmica de concentración versus tiempo después de la administración oral de piroxicam 20 mg.

En la siguiente tabla se muestran los valores promedio de los parámetros farmacocinéticos después de una administración oral de 20 mg de piroxicam.

Tabla 24. Parámetros farmacocinéticos promedio de los 21 voluntarios con respecto a los parámetros reportados en bibliografía.

Parámetro farmacocinético	Piroxicam (promedio \pm D.E.)	Parámetros reportados en bibliografía
ABC $0 \rightarrow t$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	214.42 \pm 67.90	*
ABC $0 \rightarrow \text{inf}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$)	231.09 \pm 77.91	*
Cmax ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	3.25 \pm 0.64	1.5 – 2.0 ⁽²⁴⁾
Tmax (h)	3.8 \pm 2.16	3.0 – 5.0 ⁽²⁵⁾
T $\frac{1}{2}$ (h)	50.67 \pm 7.99	30 – 60 ⁽²⁷⁾
Ke (h^{-1})	0.014 \pm 0.002	*
Cl ($\text{mL}/\text{Kg} \cdot \text{min}$) / F	0.019 \pm 0.006	0.03 ⁽²¹⁾
Vd (L/Kg) / F	0.11 \pm 0.03	0.1 ⁽²¹⁾

* No reportada

En el apéndice II se presentan los resultados del análisis estadístico obtenido en el programa Biopak®. para los parámetros farmacocinéticos de ABC $0 \rightarrow t$, ABC $0 \rightarrow \text{inf}$, Cmax y Tmax, T $\frac{1}{2}$ así como para los parámetros como, ke, Cl / F, Vd/F, que fueron obtenidos mediante una hoja de cálculo para cada uno de los 21 voluntarios.

Con base en lo anterior, los resultados presentados en la tabla 24 muestran que los niveles plasmáticos de piroxicam en población mexicana, son ligeramente mayores que los reportados en la literatura, lo cual nos lleva a pensar en diferencias en la etapa de eliminación de este fármaco entre poblaciones, misma que se descarta al observar que los parámetros de Vd, Cl y T $\frac{1}{2}$ no cambian de manera significativa y de la misma manera, al observar que el parámetro de Tmax esta de acuerdo con lo reportado, es probable que ese ligero aumento en la concentración plasmática máxima se deba simplemente a la formulación utilizada.

CONCLUSIONES

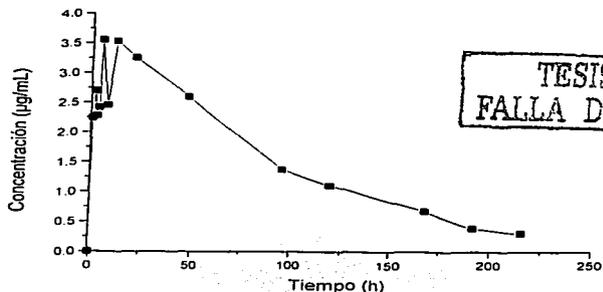
- El método analítico para la determinación de piroxicam en plasma fue lineal, preciso y exacto en el rango de concentración de 0.02 a 4.0 µg/mL.
- El método analítico fue selectivo a componentes endógenos del plasma y a fármacos de uso común como: ácido acetilsalicílico, paracetamol y heparina.
- El método analítico fue tolerante a cambios de 30,38,40°C de temperatura y 62,;38, 72:28 como proporción del componente orgánico de la fase móvil.
- Piroxicam en plasma es estable almacenando las muestras a una temperatura de menos 70°C por 20 días.
- El método analítico desarrollado y validado puede ser aplicado para estudios farmacocinéticos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

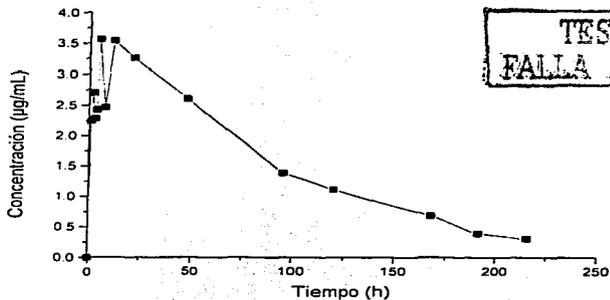
APÉNDICE I.

Tablas y Gráficas correspondientes a los resultados de concentración plasmática *versus* tiempo, determinadas para cada uno de los 21 voluntarios.

VOLUNTARIO 1	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	3.35
2	2.18
3	3.39
4	3.92
5	3.13
8	3.01
12	2.46
22	2.75
48	1.62
96	0.88
120	0.84
168	0.4
192	0.33
216	0.29

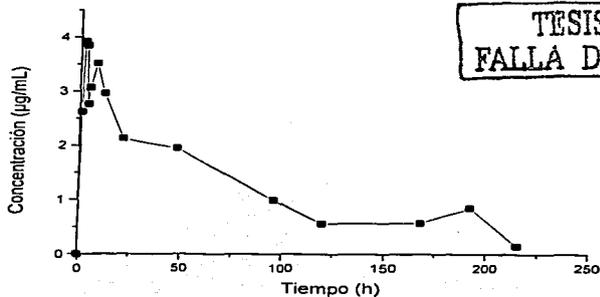


VOLUNTARIO 2	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2,24
2	2,7
3	2,28
4	2,42
5	3,56
8	2,46
12	3,54
22	3,26
48	2,6
96	1,38
120	1,11
168	0,68
192	0,39
216	0,31



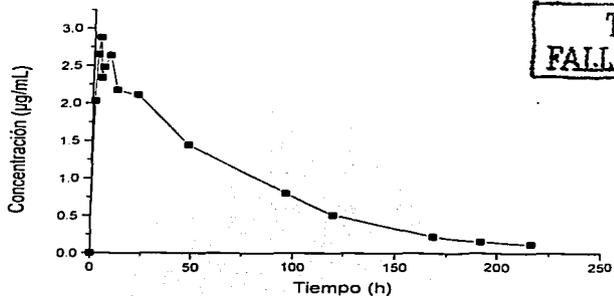
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VOLUNTARIO 3	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2.62
2	3.92
3	3.84
4	2.76
5	3.06
8	3.51
12	2.96
22	2.13
48	1.95
96	0.99
120	0.56
168	0.57
192	0.85
216	0.16



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

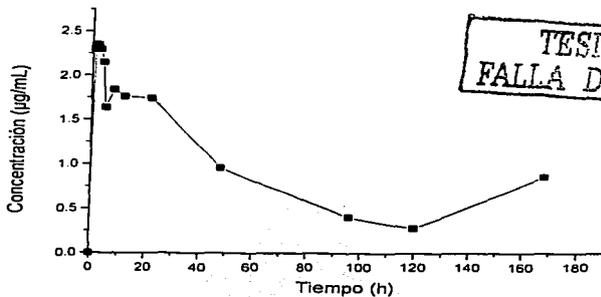
VOLUNTARIO 4	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2.03
2	2.65
3	2.88
4	2.34
5	2.48
8	2.64
12	2.18
22	2.2
48	1.45
96	0.8
120	0.51
168	0.22
192	0.15
216	0.12



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

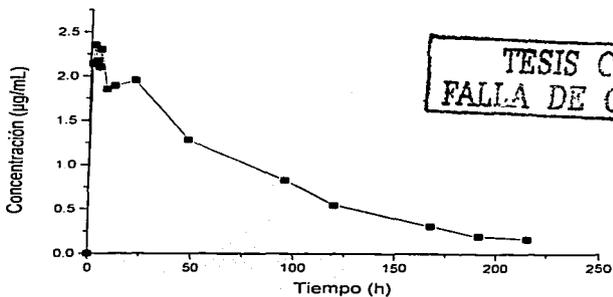
VOLUNTARIO 5	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2.3
2	2.35
3	2.3
4	2.15
5	1.64
8	1.84
12	1.76
22	1.74
48	0.96
96	0.4
120	0.28
168	0.86
192	N.D
216	N.D

N.D = no detectable

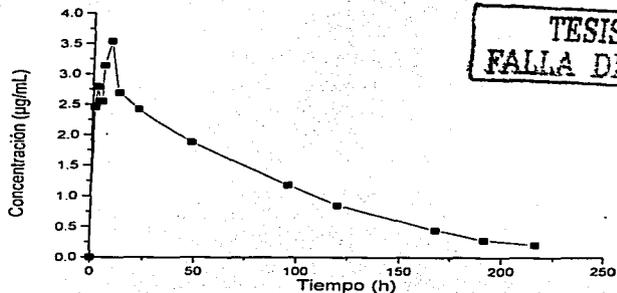


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VOLUNTARIO 6	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2.14
2	2.35
3	2.17
4	2.1
5	2.3
8	1.85
12	1.89
22	1.95
48	1.28
96	0.83
120	0.55
168	0.31
192	0.2
216	0.17



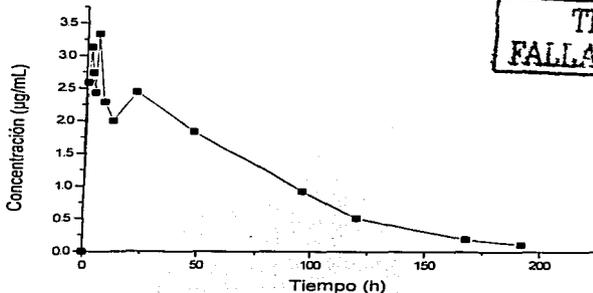
VOLUNTARIO 7	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2.45
2	2.79
3	2.55
4	2.55
5	3.14
8	3.54
12	2.69
22	2.42
48	1.88
96	1.18
120	0.85
168	0.45
192	0.28
216	0.21



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

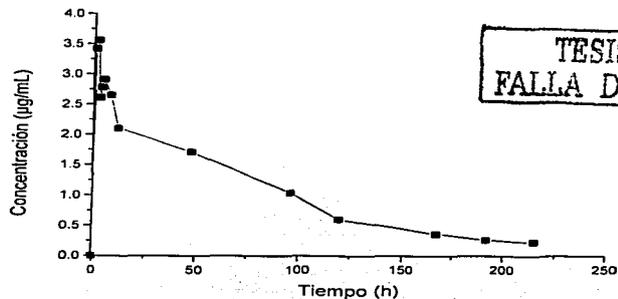
VOLUNTARIO 8	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2.59
2	3.13
3	2.74
4	2.43
5	3.33
8	2.29
12	2.00
22	2.44
48	1.83
96	0.92
120	0.51
168	0.19
192	0.11
216	N.D

N.D = no detectable



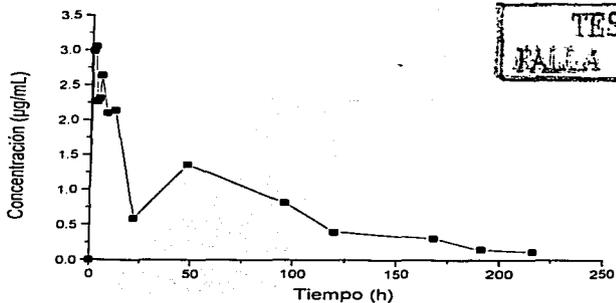
VOLUNTARIO 9	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	3.42
2	3.56
3	2.61
4	2.78
5	2.91
8	2.65
12	2.1
22	X
48	1.71
96	1.04
120	0.6
168	0.36
192	0.26
216	0.23

X = muestra perdida



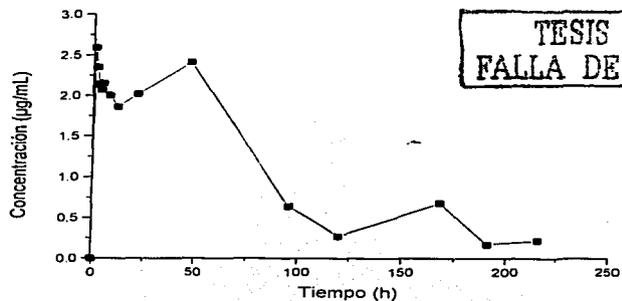
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VOLUNTARIO 10	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2.99
2	3.05
3	2.27
4	2.31
5	2.64
8	2.1
12	2.14
22	0.58
48	1.36
96	0.82
120	0.4
168	0.31
192	0.15
216	0.12



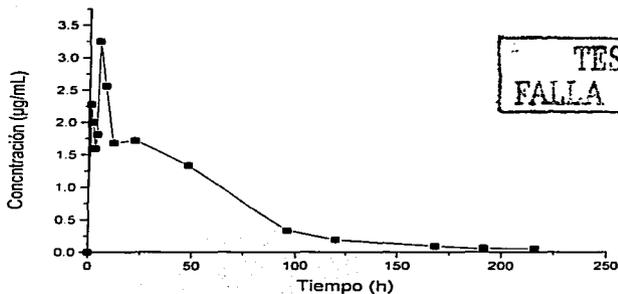
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VOLUNTARIO 11	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2.59
2	2.35
3	2.14
4	2.07
5	2.15
8	2.0
12	1.86
22	2.02
48	2.41
96	0.64
120	0.27
168	0.68
192	0.17
216	0.22



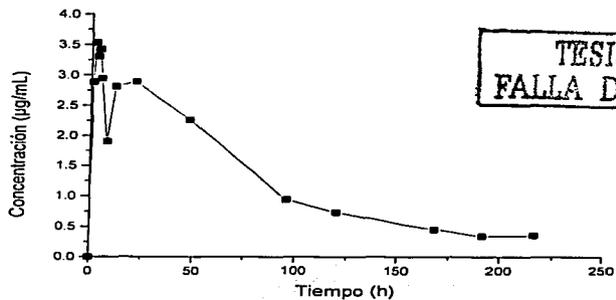
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VOLUNTARIO 12	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2.28
2	2.0
3	1.59
4	1.81
5	3.25
8	2.56
12	1.68
22	1.72
48	1.33
96	0.33
120	0.19
168	0.09
192	0.06
216	0.05



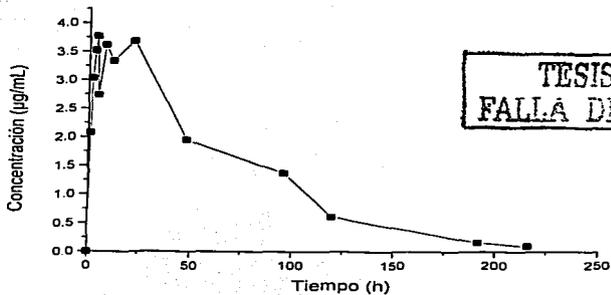
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VOLUNTARIO 13	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2.88
2	3.53
3	3.3
4	3.42
5	2.94
8	1.9
12	2.81
22	2.89
48	2.26
96	0.94
120	0.73
168	0.45
192	0.34
216	0.35

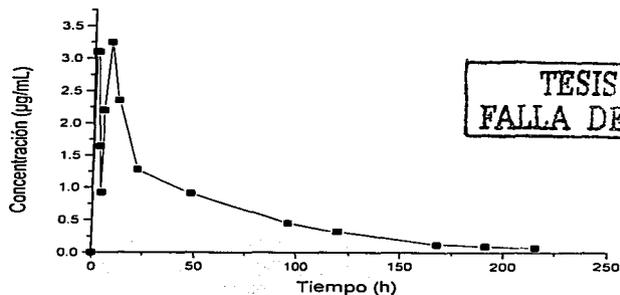


VOLUNTARIO 14	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2.08
2	3.04
3	3.52
4	3.77
5	2.74
8	3.62
12	3.34
22	3.69
48	1.95
96	1.37
120	0.61
168	X
192	0.16
216	0.1

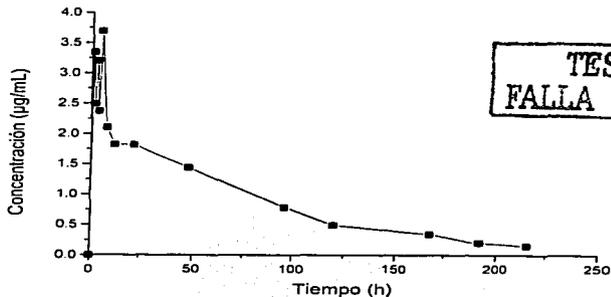
X = muestra perdida.



VOLUNTARIO 15	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	3.1
2	3.1
3	1.64
4	0.92
5	2.2
8	3.25
12	2.35
22	1.28
48	0.91
96	0.45
120	0.32
168	0.12
192	0.1
216	0.07

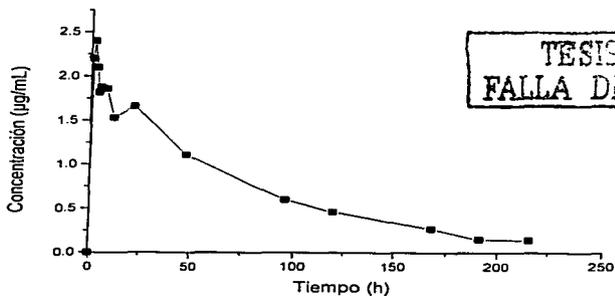


VOLUNTARIO 16	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	3.34
2	2.49
3	3.2
4	2.37
5	3.69
8	2.1
12	1.82
22	1.82
48	1.44
96	0.78
120	0.49
168	0.34
192	0.2
216	0.15



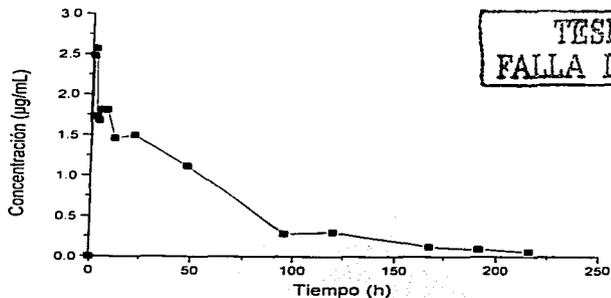
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VOLUNTARIO 17	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2.2
2	2.4
3	2.1
4	1.82
5	1.88
8	1.86
12	1.53
22	1.66
48	1.11
96	0.6
120	0.46
168	0.27
192	0.15
216	0.14



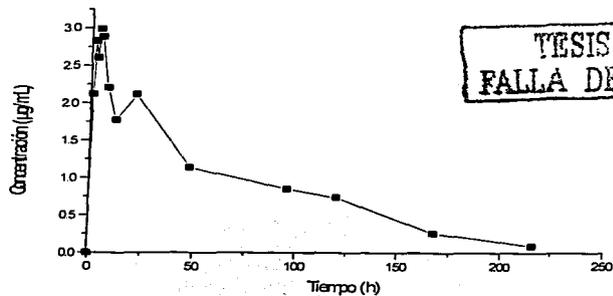
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VOLUNTARIO 18	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2.48
2	2.57
3	1.73
4	1.68
5	1.81
8	1.81
12	1.46
22	1.49
48	1.12
96	0.28
120	0.3
168	0.12
192	0.09
216	0.06



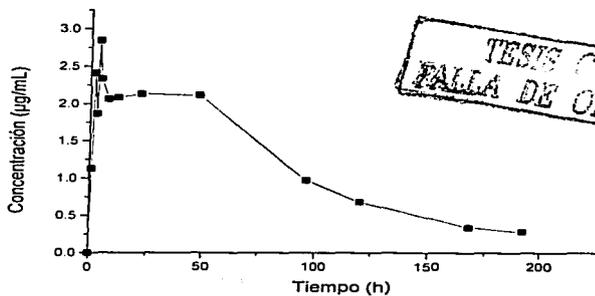
VOLUNTARIO 19	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2.12
2	2.83
3	2.61
4	2.99
5	2.89
8	2.21
12	1.78
22	2.12
48	1.14
96	0.85
120	0.74
168	0.26
192	N.D
216	0.09

N.D = no detectable

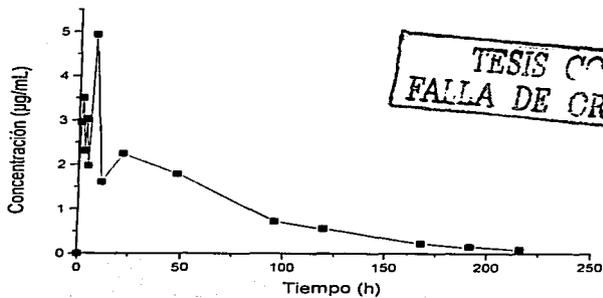


VOLUNTARIO 20	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	1.13
2	2.41
3	1.86
4	2.84
5	2.2
8	2.06
12	2.08
22	2.13
48	2.11
96	0.97
120	0.68
168	0.34
192	0.28
216	X

X = muestra perdida



VOLUNTARIO 21	
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
1	2.95
2	3.5
3	2.31
4	3.03
5	1.97
8	4.94
12	1.61
22	2.25
48	1.79
96	0.72
120	0.55
168	0.22
192	0.15
216	0.09



APÉNDICE II.

Parámetros farmacocinéticos para cada voluntario.

Sujeto	ABC _{0-∞}	ABC _{0-inf}	Cmax	Tmax	t _{1/2}	K _e	Vd/F	Cl/F
1	244.02	269.31	3.92	4	60.45	0.0114	0.0771	0.0147
2	332.23	356.82	3.56	5	54.98	0.0126	0.0617	0.0111
3	261.4	276.86	3.92	2	66.98	0.0103	0.1269	0.0143
4	191.11	199.13	2.88	3	46.34	0.0149	0.1086	0.0199
5	155.46	157.24	2.35	2	41.11	0.0168	0.1178	0.0252
6	183.21	196.57	2.35	2	54.49	0.0127	0.1152	0.0201
7	259.48	275.9	3.54	8	54.2	0.0127	0.1030	0.0143
8	212.99	216.98	3.33	5	39.43	0.0175	0.0845	0.0182
9	222.29	240.88	3.56	2	56.03	0.0123	0.1725	0.0164
10	159.11	167.31	3.05	2	47.33	0.0146	0.1158	0.0237
11	222.96	240.4	2.59	1	54.94	0.0126	0.1048	0.0165
12	139.07	141.65	3.25	5	35.72	0.0194	0.0909	0.0280
13	269.65	299.63	3.53	2	59.38	0.0116	0.1121	0.0132
14	403.11	410.23	3.77	4	49.31	0.01405	0.0648	0.0096
15	132.98	137.44	3.25	8	44.21	0.01567	0.1428	0.0288
16	189.47	200.77	3.69	5	52.2	0.01327	0.1531	0.0197
17	153.61	164.41	2.4	2	53.48	0.01295	0.1370	0.0241
18	124.98	128.58	2.57	2	41.7	0.01661	0.1462	0.0308
19	188.75	196.2	2.99	4	57.45	0.01206	0.1640	0.0202
20	247.32	361.55	2.84	4	53.14	0.01304	0.0633	0.0109
21	209.7	215.06	4.94	8	41.29	0.01678	0.0939	0.0184

APÉNDICE III

Peso en kilogramos (Kg) de cada uno de los 21 voluntarios para la determinación de los parámetros de aclaramiento o depuración (Ci) y para el volumen de distribución (Vd).

Voluntario	Peso (Kg)
1	84.0
2	72.0
3	55.0
4	61.8
5	64.0
6	69.4
7	55.0
8	62.0
9	68.9
10	70.5
11	62.9
12	80.0
13	51.0
14	53.5
15	65.0
16	49.0
17	68.5
18	64.0
19	51.50
20	67.0
21	59.0

BIBLIOGRAFÍA

1. Hardman, Joel G, Goodman y Gilman. Las bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9ª edición. Mcgraw-Hill interamericana, Vol.1. México 1996, pp. 687,688.
2. The Merck Index. White house Station, twelfth edition. USA 1996, pp.7657
3. Martindale. The complete drug reference. Pharmaceutical Press, thirty-third edition. Great Britain 2002, pp.79
4. PDR Generics. Medical Economics Company, Fourth Edition. Montvale, New Jersey 1998, pp.2240-2442.
5. <http://www.pfizer.es/productos/feldene/tecnica.htm>
6. http://www.google.com.mx/search?q=cache:qPJJRipJ64MC:www.casasco.com/info_a mp/brionot.htm+PIROXICAM+farmacocin%C3%A9tica&hl=es&lr=lang_es&ie=UTF-8
7. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. PLM. Edición 49, México 2003, versión CD.
8. Quattochi Oscar Alberto, et.al. Introducción a la HPLC. Artes Farro. Argentina 1992. pp. 3, 4, 26, 27 46-48, 51, 267, 268, 269, 270.
9. Dolan, John W. Guide to LC Method Development. LCGC Magazine, Advanstar Communications 1999.
10. USP 24 U.S Pharmacopeia national Formulary. Printed by National Publishing, Philadelphia 2000. pp.1342
11. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen pruebas. Diario Oficial de la Federación, primera sección, viernes 7 de mayo de 1999.
12. Gibaldi Milo y Perrier Donald. Farmacocinética. Editorial Reverté. España 1982 pp. 1,
13. Doménech Berrozpe José, et.al. Biofarmacia y Farmacocinética. Editorial Síntesis, Vol.1 España, 1997 pp.62, 63,64,77,78, 84
14. Ansel C. Howard, Popovich G. Nicholas, Allen V. Loyd. Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 6ª edición 1995,pp 69,70.

15. Cárdenas H. Aspectos Biofarmacéuticos de la Evaluación de Medicamentos. Universidad Autónoma Metropolitana. 1ª edición. México D.F., 1996.
16. Yiritia M., Parra P., Fernandez J. M., Barbanoj J.M., Piroxicam quantitation in human plasma by high-performance liquid chromatography with on- and off-line solid-phase extraction. Journal of Chromatography A 846(1999) pp. 199-205
17. Dadashzadeh S, Vali A. M, Rezaghali N. LC determination of piroxicam in human plasma Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 28 (2002) pp. 1201–1204.
18. Doliwa A., Santoyo S, Campanero M. A, Ygartua.P. Sensitive LC determination of piroxicam after in vitro transdermal permeation studies. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 26 (2001) pp. 531–537.
19. Basan Hansan, Nilgün Günden Gö, Nusret Ertas, Tevfik Orbey. M. Quantitative determination of piroxicam in a new formulation (piroxicam– cyclodextrin) by derivative UV spectrophotometric method and HPLC. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 26 (2001) pp. 171–178.
20. Bartsch H, Eiper A, Kopelent-Frank H. Stability indicating assays for the determination of piroxicam—comparison of methods. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 20 (1999) pp. 531–541.
21. Clarke's. Isolation and Identification of Drugs. The Pharmaceutical Society of Great Britain. Second edition. London 1986, pp. 911.