



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAR UN NUEVO PROFARMACO DE NAPROXENO
(NAPROXENATO DE NAPROXENILO) POR CROMATOGRFÍA DE
LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN EN PLASMA DE RATAS Y
PLASMA HUMANO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

RAFAEL FABIAN OLIVO MARTINEZ



MÉXICO , D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Prof. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado
Vocal: Prof. Ricardo Rodríguez Sáenz
Secretario: Prof. Juan Manuel Rodríguez
1er Suplente: Prof. Liz Jannet Medina Reyes
2do Suplente: Prof. Kenneth Rubio Carrasco

El trabajo experimental para la elaboración de esta tesis se desarrollo en el laboratorio 113 del conjunto “E” de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

M. en C. Juan Manuel Rodríguez
Asesor del tema

M. en C. Kenneth Rubio Carrasco
Supervisor técnico

Rafael Fabián Olivo Martínez
Sustentante

Dedicatorias

A mis padres, Irma Martínez y Rafael Olivo por brindarme la vida y darme la oportunidad de decidirla, por su apoyo en cada momento difícil; y enseñarme que nunca hay que dejar de luchar por las cosas que uno desea y por las personas a quién amamos.

A ti **madrecita** que siempre has creído en mí incondicionalmente y has estado a mí lado durante 26 años reservando tu hombro para apoyarme en noches que me arrebataron el sueño para conseguir una formación académica.

A ti **papíchu**, por transformar una vida de miseria a una nueva llena de sueños y alcances que parecían tan lejanos, sin perder la humildad de un ser humano tan sencillo y admirable como eres tú; por tus esfuerzos y sacrificios para que yo pudiera salir a conseguir una carrera profesional.

A ti **Mony** porque nunca dejaste de creer en mí, por crecer a tu lado, por enseñarme a soñar, a disfrutar más de la vida, a contagiarme tu alegría, por ser mi mejor amiga, por escucharme cuando más lo necesite y por traer a unos hermosos sobrinos que iluminaron mucho mi vida.

A mis sobrinos **Jonathan y Alondra** por transmitir toda su inocencia y alegría por compartir conmigo sus sonrisas y travesuras. Por contagiar sus ganas de aprender más de todas las cosas que hay en la vida cuando uno es pequeño. Por ser unos niños muy inteligentes.

A mi **abuelita Margarita** y mi **abuelito Andrés** (que en paz descanse) por ser unas personas admirables, que a través de su historia me impulsaron a ser una mejor persona y nunca dejar de luchar para conseguir lo que uno quiere y desea.

Y por tener un carácter de superación ante las peores situaciones que se presentan en la vida.

A todos **mis seres queridos** por compartir todas las emociones, las alegrías, los llantos, la unión, las vivencias y por los momentos que jamás olvidaré.

A mí primo **Alejandro** que creyó que yo podía lograr ingresar en la UNAM después de su intento al presentar su examen y por ser mi mejor confidente. Y por ser un gran hermano.

A **todos mis amigos** de la **Facultad de Química** y del **CCH Naucalpan** que a través de los años, me han enseñado que existe una gran diversidad de formas de pensar y de ver las cosas, que hace posible la existencia de la diversidad cultural.

A los **GenoMOS** que me apoyaron durante la carrera y mi trabajo; por dejarme ser mis amigos.

**A todos ellos,
¡muchas gracias!**

Agradecimientos:

A el *M. en C. Juan Manuel Rodríguez* por toda su atención, su confianza y brindarme la oportunidad de colaborar con su experiencia científica, permitiéndome trabajar en este proyecto.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra del laboratorio 212 por sintetizar el profármaco para el presente estudio.

Un agradecimiento especial a la *M. en C. Marcela Hurtado y de la Peña* y a la *M. en C. Kenneth Rubio Carrasco* por su amistad, sus conocimientos y apoyo durante mi permanencia en el laboratorio para completar el trabajo experimental de este proyecto; a la *Dra. Inés Fuentes Noriega* por permitir realizar mi servicio en el Laboratorio de Biofarmacia.

Con un especial cariño a la Dra. Maria Eva González Trujano y a la Q.F.B. Ana Laura Martínez Martínez del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” por la donación del plasma de rata, colaboración y por su fina atención.

A todos *los profesores de la Facultad de Química* que a lo largo de mí carrera, compartieron su cátedra, me ofrecieron sus enseñanzas y motivaron para completar mi formación académica así como seguir aprendiendo infinidad de información en beneficio de la Salud.

A los *amigos del Instituto de Investigaciones Biomédicas* que me apoyaron durante mi estancia; junto con la *Dra. Romina Rodríguez Sanoja* y la Maestra *Norma Oviedo de Anda* por apoyarme durante el proyecto de estancias tutelares y; finalmente, a la Universidad Nacional Autónoma de México que me abrió las puertas y me brindo una nueva oportunidad y calidad de vida.

“Hay un tiempo para todo. Hoy una brizna de pasión; mañana un poco de reflexión y descanso. Cada cosa en su tiempo”

(Marcelo Hernán Figoli)

Índice

CONTENIDO	PÁGINA
INDICE DE FIGURAS	i
INDICE DE TABLAS	ii
ABREVIATURAS	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	3
2.1 ANTIINFLAMATORIOS	3
2.1.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINES).....	4
2.1.2 Mecanismos de acción de los AINES.....	4
2.1.3 Efectos adversos gastrointestinales y toxicidad atribuidos a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa.....	5
2.1.4 Naproxeno	7
2.1.4.1 Propiedades físicas	7
2.1.4.2 Propiedades farmacológicas	8
2.1.5 Naproxol	9
2.1.6 Profármaco.....	10
2.1.7 Naproxenato de naproxenilo	10
2.2 DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO	11
2.2.1 El proceso analítico	13
2.2.2 Muestreo.....	14
2.2.2.1 Toma de muestra	14
2.2.2.2 Componentes de la muestra para analizar	15

2.2.3 Tratamiento de la muestra	15
2.2.4 Medición	18
2.2.4.1 Cromatografía	19
2.2.4.2 Tipos de cromatografía	19
2.2.4.3 Cromatografía de liquido-líquido.....	19
2.2.4.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	21
2.2.4.5 Bases de la separación	22
2.2.4.6 Cromatografía en fase reversa	24
2.2.4.7 La fase móvil.....	24
2.2.4.8 Mecanismos de retención	25
2.2.4.9 La cadena hidrocarbonada.....	25
2.2.4.10 El detector de UV	25
2.2.5 Manejo de datos	26
2.2.5.1 Diseño de experimentos	27
2.3 VALIDACIÓN	29
III. PARTE EXPERIMENTAL	35
3.1 PROCESO ANALÍTICO	36
3.1.1 Muestra	36
3.1.2 Tratamiento de la muestra	36
3.1.3 Medición	36
3.1.4 Manejo de datos	37
3.2 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO	37
3.2.1 Condiciones cromatográficas que se mantuvieron constantes durante la etapa de desarrollo del método analítico	37
3.2.2 DISEÑO 1. Diseño factorial 2^2 para evaluar el efecto del pH y la polaridad de la fase móvil sobre el tiempo de retención del Naproxeno, Naproxol y Naproxenato de naproxenilo	37
3.2.3 DISEÑO 2. Diseño factorial 2^2 para evaluar el efecto de la acidez y el flujo	

de la fase móvil sobre los tiempos de retención de los analitos	39
3.2.4 DISEÑO 3. Diseño factorial 2^2 para evaluar el efecto del pH de la fase móvil y la concentración (baja y alta) de Nx y NxOH sobre la resolución entre ellos	41
3.2.5 Método Analítico desarrollado	43
3.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.....	44
3.3.1 Evaluación del Adecuabilidad.....	44
3.3.2 Validación del sistema	44
3.3.2.1 Linealidad y precisión del sistema.....	44
3.3.3 Validación del método	44
3.3.3.1 Recuperación absoluta	44
3.3.3.2 Especificidad	45
3.3.3.3 Limite de detección y cuantificación	45
3.3.3.4 Linealidad del método analítico y rango.....	46
3.3.3.5 Precisión	46
3.3.3.6 Exactitud	47
3.3.3.7 Estabilidad de las muestras.....	47
IV. RESULTADOS	48
4.1 RESULTADOS DEL DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO	48
4.1.1 Resultados del diseño 1. Diseño factorial 2^2 para evaluar el efecto del pH y la polaridad de la fase móvil sobre el tiempo de retención del Naproxeno, Naproxol y Naproxenato de naproxenilo.....	48
4.1.2 Resultados del diseño 2. Diseño factorial 2^2 para evaluar el efecto de la acidez y el flujo de la fase móvil sobre los tiempos de retención de los analitos	49
4.1.3 Resultados del diseño 3. Diseño factorial 2^2 para evaluar el efecto del pH de la fase móvil y la concentración (baja y alta) de Nx y NxOH sobre la resolución entre ellos	49
4.2 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN	50
4.2.1 Adecuabilidad	50

4.2.2 Resultados de la validación del sistema	50
4.2.2.1 Determinación de la linealidad y precisión del sistema	51
4.2.3 Resultados de la validación del método.....	54
4.2.3.1 Recuperación absoluta	54
4.2.3.2 Especificidad	55
4.2.3.3 Identificación, determinación y comprobación del límite de cuantificación (LC)	55
4.2.3.3.1 LD y LC para Naproxeno	57
4.2.3.3.2 LD y LC para Naproxol	58
4.2.3.3.3 LD y LC para Naproxenato de naproxenilo	58
4.2.3.3.4 Comprobación del límite de cuantificación	59
4.2.3.4 Evaluación de la linealidad del método	59
4.2.3.4.1 Naproxeno en plasma.....	59
4.2.3.4.2 Naproxol en plasma	60
4.2.3.4.3 Naproxenato de naproxenilo en plasma	61
4.2.3.5 Rango en plasma de rata.....	62
4.2.3.6 Determinación de la precisión del método analítico.....	62
4.2.3.6.1 Evaluación de la repetibilidad	63
4.2.3.6.2 Evaluación de la reproducibilidad	64
4.2.3.7 Determinación de la exactitud del método analítico	65
4.2.3.8 Estudios de estabilidad del método analítico para NxNx.....	70
4.2.3.8.1 Estabilidad a corto plazo	71
a) Evaluación de condiciones de la muestra procesada	71
b) Evaluación de condiciones de almacenaje a temperatura ambiente	72
c) Evaluación después de tres ciclos de congelación descongelación.....	73
d) Estabilidad de la muestra de naproxenato de naproxenilo disuelto en fase móvil y bajo diferentes condiciones de almacenamiento.	74
4.2.3.8.2 Estabilidad a largo plazo	75

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	76
5.1 DISCUSIÓN DE RESULTADOS DEL DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO	76
5.1.1 Discusión de resultados del diseño 1. Diseño factorial 2^2 para evaluar el efecto del pH y la polaridad de la fase móvil sobre el tiempo de retención del Naproxeno, Naproxol y Naproxenato de naproxenilo	76
5.1.2 Discusión de resultados del diseño 2. Diseño factorial 2^2 para evaluar el efecto de la acidez y el flujo de la fase móvil sobre los tiempos de retención de los analitos.....	79
5.1.3 Discusión de resultados diseño 3. Diseño factorial 2^2 para evaluar el efecto del pH de la fase móvil y la concentración (baja y alta) de Nx y NxOH sobre la resolución entre ellos	82
5.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN MÉTODO ANALÍTICO	84
5.2.1 Adecuabilidad	84
5.2.2 Validación del sistema	84
5.2.2.1 Determinación de la linealidad del sistema	84
5.2.2.2 Determinación de la precisión del sistema.....	84
5.2.3 Validación del método	84
5.2.3.1 Recuperación absoluta	84
5.2.3.2 Especificidad	85
5.2.3.3 Identificación, determinación y comprobación del límite de cuantificación..	85
5.2.3.4 Determinación de la linealidad del método	86
5.2.3.5 Rango en plasma de rata.....	86
5.2.3.6 Determinación de la precisión del método	86
5.2.3.6.1 Evaluación de la repetibilidad	86
5.2.3.6.2 Evaluación de la reproducibilidad	87
5.2.3.7 Determinación de la exactitud del método.....	87

5.2.3.8 Estudios de estabilidad del método analítico para cuantificar NxNx	88
5.2.3.8.1 Estabilidad a corto plazo	88
a) Evaluación de condiciones de la muestra procesada	88
b) Evaluación de condiciones de almacenaje a temperatura ambiente	88
c) Evaluación después de tres ciclos de congelación descongelación	88
d) Estabilidad de la muestra de naproxenato de naproxenilo disuelto en fase móvil y bajo diferentes condiciones de almacenamiento.....	89
5.2.3.8.2 Estabilidad a largo plazo.....	89
VI. CONCLUSIONES	90
APÉNDICES	91
BIBLIOGRAFÍA	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Síntesis de prostaglandinas y leucotrienos	6
2	Estructura química del naproxeno	7
3	Espectro de absorción del naproxeno	8
4	Estructura química del naproxol	10
5	Estructura química del naproxenato de naproxenilo	11
6	Esquema general del proceso analítico	13
7	Tipos de cromatografía	20
8	Esquema de un aparato de HPLC	23
9	Linealidad de naproxeno en fase móvil	51
10	Linealidad de naproxol en fase móvil	52
11	Linealidad de naproxenato de naproxenilo en fase móvil	53
12	Linealidad del método para naproxeno en plasma de rata	60
13	Linealidad del método para naproxol en plasma de rata	61
14	Linealidad del método para naproxenato de naproxenilo en plasma de rata.....	62
15	Efecto del pH y la polaridad sobre el t_R del N_x	76
16	Efecto del pH y la polaridad sobre el t_R del N_xOH	76
17	Efecto del pH y la polaridad sobre el t_R del N_xN_x	76
18	Grafica de superficie del primer diseño experimental	77
19	Efecto de la acidez y el flujo sobre el t_R de N_x	79
20	Efecto de la acidez y el flujo sobre el t_R de N_xOH	79
21	Efecto de la acidez y el flujo sobre el t_R de N_xN_x	79
22	Efecto de la acidez y el flujo sobre la R de CE y N_x	79
23	Efecto de la acidez y el flujo sobre la R de N_x y N_xOH	79
24	Grafica de superficie del segundo diseño experimental	80
25	Efecto de la concentración y el pH sobre la resolución entre el N_x y N_xOH	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos	4
2	Resumen de las condiciones de CLAR para el naproxeno.....	9
3	Ejemplo de profármacos de naproxeno	12
4	Guía para la selección de fases para la cromatografía de líquidos.....	21
5	Diferencias en las características entre una fase normal y una fase reversa...	24
6	Diseño factorial 2^2 . Relación entre factores y niveles.....	28
7	Datos elementales que requiere la USP para un ensayo de validación de formas farmacéuticas	31
8	Factores y niveles del primer diseño experimental.....	38
9	Respuestas a medir en el primer diseño experimental.....	39
10	Factores y niveles del segundo diseño experimental	40
11	Respuestas a medir en el segundo diseño experimental.....	41
12	Factores y niveles del tercer diseño experimental	42
13	Respuestas a medir en el tercer diseño experimental.	42
14	Resultados obtenidos del primer diseño experimental	48
15	Resultados obtenidos del segundo diseño experimental	49
16	Resultados obtenidos del tercer diseño experimental	49
17	Resultados de Adecuabilidad para evaluar el sistema cromatográfico	50
18	Linealidad de naproxeno en fase móvil	51
19	Linealidad de naproxol en fase móvil	52
20	Linealidad de naproxenato de naproxenilo en fase móvil	53
21	Recobro absoluto para Naproxeno	54
22	Recobro absoluto para Naproxol	54
23	Recobro absoluto para Naproxenato de naproxenilo	54
24	Identificación del límite de cuantificación	55
25	Determinación para el límite de cuantificación para Nx	56
26	Determinación para el límite de cuantificación para NxOH	56
27	Determinación para el límite de cuantificación para NxNx	57

28	Valores de LD y LC en plasma para Naproxeno	58
29	Valores de LD y LC en plasma para Naproxol	58
30	Valores de LD y LC en plasma para Naproxenato de naproxenilo	58
31	Comprobación del límite de cuantificación	59
32	Resultados obtenidos de la linealidad del método analítico para naproxeno.	59
33	Resultados obtenidos de la linealidad del método analítico para naproxol....	60
34	Resultados obtenidos de la linealidad del método analítico para naproxenato de naproxenilo	61
35	Intervalo de concentración encontrado para los analitos en estudio	62
36, 37	Resultados para la evaluación de la repetibilidad, con Nx, NxOH y NxNx a y 38 una concentración: baja, media y alta, respectivamente	63
39	Resultados de reproducibilidad para Naproxeno	64
40	Resultados de reproducibilidad para Naproxol	65
41	Resultados de reproducibilidad para Naproxenato de naproxenilo	65
42	Resultados de exactitud para Naproxeno a concentración baja	66
43	Resultados de exactitud para Naproxeno a concentración media	66
44	Resultados de exactitud para Naproxeno a concentración alta	67
45	Resultados de exactitud para Naproxol a concentración baja	67
46	Resultados de exactitud para Naproxol a concentración media	68
47	Resultados de exactitud para Naproxol a concentración alta	68
48	Resultados de exactitud para Naproxenato de naproxenilo a concentración baja	69
49	Resultados de exactitud para Naproxenato de naproxenilo a concentración media	69
50	Resultados de exactitud para Naproxenato de naproxenilo a concentración alta	70
51	Muestra procesada de naproxenato de naproxenilo	71
52	Muestra almacenada a temperatura ambiente (22°C) de Naproxenato de naproxenilo a tres niveles de concentración: Alta, media y baja, respectivamente.....	72
53	Resultados después de tres ciclos de congelación descongelación	73

54	Estabilidad del naproxenato de naproxenilo en fase móvil conservados en diferentes condiciones de almacenamiento	74
55	Estabilidad a largo plazo para naproxenato de naproxenilo almacenado a – 20 ° C	75
56 y	Resultados obtenidos del efecto del pH en la preparación de la fase móvil	
57	sobre las muestras de plasma de rata con Nx y NxOH añadido a concentración, baja y alta, respectivamente	83
58	Tiempos de retención para naproxeno, naproxol y naproxenato de naproxenilo	83
59	Limite de detección y cuantificación en plasma de rata para Nx, NxOH y NxNx	86
60	Columnas utilizadas durante el desarrollo y la validación del método analítico	99

ABREVIATURAS

AcN, ACN	Acetonitrilo
AINES	Antiinflamatorios no esteroidales
As	Asimetría
CE	Componentes endógenos
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
cm	Centímetros
C.V.	Coefficiente de variación
D.E.	Desviación estándar
g	gramos
k'	Factor de capacidad
L	Longitud
LD ₅₀	Dosis letal 50
MeOH	Metanol
min	Minutos
mL	Mililitros
μL	Microlitros
mUA*s	Mili unidades de absorbancia por segundo
N	Platos teóricos
nm	nanómetros
Nx	Naproxeno
NxNx	Naproxenato de naproxenilo
NxOH	Naproxol
r	Coefficiente de correlación
R	Resolución
SR	Sustancia de referencia

$t_{1/2}$

Tiempo de vida media

t_R

Tiempo de retención

UV

Ultravioleta

I. INTRODUCCIÓN

Un procedimiento para ejecutar un programa riguroso de validación de métodos analíticos, anteriormente no estaba bien definido. En la actualidad, en la USP establece que parámetros se deben realizar pero estos dependen de la aplicación. Las cuestiones de interés que se deben considerar antes de la validación incluyen: a) ¿qué parámetros de validación deben ser establecidos? b) ¿Considerar que algunos procedimientos específicos requieren evaluar parámetros particulares? y c) ¿cuales son los criterios de aceptación para los parámetros establecidos?⁴⁸

Existen autoridades reconocidas internacionalmente que establecen los parámetros de validación como: United States Pharmacopeia (USP), Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) y la Food and Drug Administration (FDA)⁴⁸. Por ejemplo, una de las guías de la FDA es “Bioanalytical Methods Validation” y se refiere a los parámetros de validación que deben cumplirse durante la evaluación de fármacos en fluidos biológicos. Las guías de la USP y CPMP se refieren a la validación en productos farmacéuticos; por otro lado, en la Guía de Eurachem¹ aplica la validación de métodos analíticos en cualquier matriz, cuando debe llevarse a cabo, que métodos deben ser validados; por ejemplo, cuando se desarrolla un nuevo método o bien para demostrar la equivalencia entre 2 métodos distintos, etc. También contiene un cuadro con los requerimientos de un método analítico aplicado a diferentes problemas particulares, herramientas que se pueden utilizar durante la validación y cual puede ser el uso de métodos validados.

La validación de métodos bioanalíticos puede ser empleada, entre otros usos, para garantizar la calidad de los datos de Biodisponibilidad, bioequivalencia y estudios farmacocinéticos⁴⁸. En México, la validación de los métodos analíticos debe cumplir con ciertos criterios conforme a la norma oficial mexicana de la Secretaria de Salud la NOM-177-SSAI-1998 que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable³⁵. Específicamente en su sección 9.1 de dicha norma, establece los requisitos que debe cumplir la validación del método analítico para el análisis de muestras biológicas³⁵

Esta tesis forma parte de una investigación orientada a la búsqueda de nuevos profármacos de antiinflamatorios no esteroidales. En la cual se desarrolló y validó un método analítico para la cuantificación de un nuevo profármaco de naproxeno (Naproxenato de naproxenilo), el naproxeno y un producto del metabolismo del naproxeno (Naproxol) en plasma de rata y plasma humano.

Este método podrá ser utilizado para estudios de farmacocinética del naproxenato de naproxenilo en ratas y humanos.

Así el objetivo principal del presente trabajo es:

- Desarrollar y validar un método analítico para la determinación de un nuevo profármaco de Naproxeno (Naproxenato de naproxenilo) en plasma de ratas y plasma humano, así como dos de sus metabolitos el naproxeno y el naproxol.

II. GENERALIDADES

2.1 ANTIINFLAMATORIOS

Los antiinflamatorios son fármacos que disminuyen la sensación dolorosa y el daño en los tejidos al inhibir la síntesis de prostaglandinas^{21,30,43,66}.

El dolor es esencial para la supervivencia ya que previene contra lesiones; esta sensación se origina cuando son estimuladas las terminaciones nerviosas que se encuentran en las distintas partes del cuerpo. Los receptores del dolor (nociceptores) pueden ser excitados por medios mecánicos o químicos. Las sustancias que producen la sensación dolorosa, como la histamina o las cininas, estimulan directamente las terminaciones nerviosas, mientras que las prostaglandinas reducen el umbral del dolor al aumentar la sensibilidad de los receptores al estímulo³⁰.

El proceso inflamatorio puede ser iniciado por microorganismos invasores, respuestas inmunitarias, deterioro del tejido y muchos otros fenómenos poco conocidos. Se considera que los mediadores de la inflamación hacen que se libere la mayor cantidad de precursores de ácidos grasos de prostaglandinas (PG) e incrementen la velocidad de síntesis de estas últimas³⁰.

Como la síntesis de prostaglandinas es singular en especies y tejidos, la evaluación final de las propiedades benéficas y tóxicas de estos fármacos requiere experiencia prolongada en seres humanos³⁰.

El aumento notable en el número de fármacos antiinflamatorios puede atribuirse a la facilidad y confiabilidad de las pruebas modernas *in vivo* e *in vitro*; por ejemplo: biodisponibilidad, co-cultivos, micromasas, cultivos organotípicos, biología molecular, etc; para verificar la acción farmacológica deseada.^{3,8,11,13,17,21,40,49,52,53,59,62,65}

Los antiinflamatorios se dividen en antiinflamatorios esteroidales (no se hablará de estos en la presente tesis) y los antiinflamatorios no esteroidales que se mencionan a continuación.

2.1.1 Antiinflamatorios no esteroidales (AINES)

Los fármacos antiinflamatorios no esteroidales se conocen comúnmente como AINES. Estos son químicamente diferentes a los antiinflamatorios esteroidales, pero comparten en gran medida los mecanismos de acción y los efectos adversos (más adelante se hablará de ellos)^{11,13,17,21,30,40,43,52,59}.

Al igual que los fármacos esteroidales presentan actividad analgésica (calma el dolor) y antipirética (disminuye la fiebre).

Se ha clasificado a estos fármacos antiinflamatorios no esteroidales como se muestra en la tabla 1^{15,21}:

Tabla 1. Clasificación de los antiinflamatorios no esteroidales

GRUPO	EJEMPLOS
Derivados del ácido salicílico	Aspirina, Salicilato de sodio, ácido salicilsalicílico, sulfasalazina
Derivados del para-aminofenol	Acetaminofen
Indol y ácidos indenacéticos	Indometacina, sulindac, etodolac
Ácidos heteroarilacéticos	Tolmetín, diclofenaco, ketorolaco
Ácidos arilpropiónicos	Ibuprofeno, naproxeno , flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, oxaprozina
Ácidos antranílicos (fenamatos)	Ácido mefenámico, ácido meclofenámico
Ácidos enólicos	Oxicam (piroxicam, tenoxicam) Pirozalidindionas (fenilbutazona)
Alcanonas	Nebumetona

2.1.2 Mecanismos de acción de los AINES

Todos los AINES inhiben la ciclooxigenasa 2 actuando sobre la inflamación; sin embargo, algunos AINES también lo hacen frente a la ciclooxigenasa 1.

La ciclooxigenasa es una enzima requerida para la conversión del ácido araquidónico a los intermediarios endoperóxidos: prostaglandina G₂ (PGG₂) y prostaglandina H₂ (PGH₂) durante la síntesis de prostaglandinas.³¹ En la figura 1 se muestra un esquema que representa a grandes rasgos, la síntesis de prostaglandinas. Las prostaglandinas y los leucotrienos se liberan en respuesta de agresiones mecánicas, térmicas, químicas, bacterianas y contribuyen de forma importante a la patogenia de la inflamación.²⁰

Es posible revertir la inhibición de manera rápida o lenta, según el compuesto y el origen tisular de la enzima microsómica probada. Sus efectos antipirético, analgésico e inhibidores de plaquetas dependen, en la mayoría de los casos, de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa^{3,8,18,21,30,43,53,65}. Se conocen dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa: la ciclooxigenasa 1 (COX-1) o isoforma constitutiva, esta presente en casi todos los tejidos aunque su expresión está aumentada en tracto gastrointestinal, riñón, células epiteliales y plaquetas; la ciclooxigenasa 2 (COX-2) es indetectable basalmente en la mayoría de los tejidos, es una isoforma inducible, puede ser expresada prácticamente por cualquier célula como respuesta a citocinas proinflamatorias, promotores tumorales o factores de crecimiento²⁰.

2.1.3 Efectos adversos gastrointestinales y toxicidad atribuidos a la inhibición de la enzima ciclooxigenasa

Los AINES dañan la mucosa gástrica por dos mecanismos: por efecto tópico (dañan directamente a la célula epitelial) y por efecto sistémico (Inhibición de la síntesis de prostaglandinas; disminución del mecanismo de citoprotección). Los AINES son ácidos orgánicos débiles y pueden dañar la mucosa gástrica, tanto al inhibir la síntesis de prostaglandina como al acumularse intracelularmente debido a que disminuyen el pH del lumen gástrico⁴³.

El efecto tópico de los AINES depende de su grado de disociación o pKa que tengan, para un compuesto ácido que se encuentre en una solución ácida aumenta el número de moléculas no disociadas (muy liposolubles).

Por lo tanto, pueden cruzar la membrana plasmática de las células epiteliales donde inhibe la glucólisis y hay una alteración de la fosforilación oxidativa⁷⁰. Un ejemplo de estos, son los derivados de ácido propiónico (Naproxeno) que en su estructura química contiene un grupo carboxílico (COOH)⁴³.

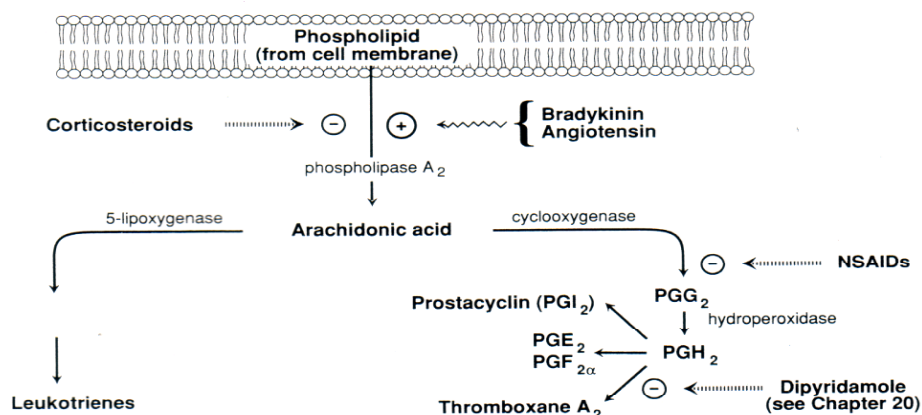


Figura 1. Síntesis de prostaglandinas y leucotrienos³¹

El efecto sistémico depende de la inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas endógenas de la mucosa gástrica. Las principales acciones citoprotectoras de las prostaglandinas (PG), se caracterizan por incrementar la secreción de moco y bicarbonato. Por lo tanto, su inhibición adelgaza la capa protectora y esto disminuye el gradiente de pH entre la luz gástrica y la superficie epitelial⁷⁰.

Se ha documentado que produce los siguientes efectos adversos: hemorragia gastrointestinal oculta con anemia, gastritis, dolor epigástrico, hematemesis, dispepsia, esofagitis ulcerosa, úlcera gástrica y duodenal agudas y reactivadas con perforación y hemorragia, además de ulceración y perforación del intestino grueso y recto.

Estos efectos son retardados cuando los fármacos se administran por vías rectal, o en formulaciones con capa entérica y la coadministración de bloqueadores del receptor H₂ o de análogos de prostaglandina^{18,43}.

2.1.4 Naproxeno

El Naproxeno es un agente antiinflamatorio no esteroidal derivado del ácido propiónico. Tiene actividad anti-inflamatoria, analgésica y antipirética. El mecanismo de acción es que interfiere en la síntesis de prostaglandinas^{9,11,12,13,15,17,21,22,30,39,40,43,44,52,58,64,67}. Su nombre químico es ácido (S)-6-metoxi- α -metil-2-naftalenacético, ácido d-2-(6-metoxi-2-naftil) propiónico, ácido 2-naftalenacético, entre otros. Su fórmula empírica es C₁₄ H₁₄O₃ y su peso molecular es de 230.26 g/mol.

Su estructura molecular es la que se muestra en la figura 2.

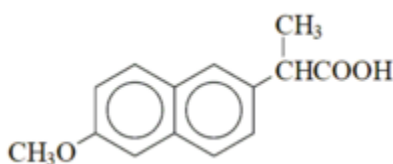


Figura 2. Estructura química del Naproxeno

Es un polvo blanco cristalino, inodoro con un ligero sabor picante.

2.1.4.1 Propiedades físicas^{12,14,17,18,42,43,58,67}

El Naproxeno tiene su punto de fusión que va desde 152 – 154 ° C, aunque se han reportado 155 ° C, 155.3 ° C y 156 ° C.

Solubilidad

- Prácticamente es insoluble en agua;
- Es soluble en 25 partes de etanol (96%)
- Es soluble en 20 partes de metanol
- Es soluble en 15 partes de cloroformo
- Es soluble en 40 partes de éter.

Constante de disociación

Su pka es igual a 4.2 a una temperatura de 25 ° C

Estabilidad^{11,13,16,17,39,40,52}

No debe ser expuesto a temperaturas mayores de 40 °C

Es muy sensible a la luz.

Espectro de ultravioleta (UV)^{17,25,36}

El espectro de UV del Naproxeno en etanol (6% mg) con un barrido de 200 – 400 nm como se muestra en figura 3.

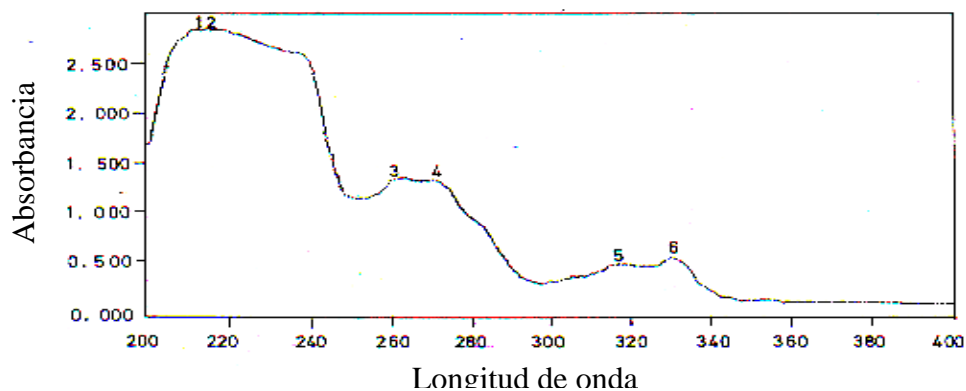


Figura 3 : Espectro de absorción del Naproxeno¹⁷

Los puntos máximos de absorción son: 212, 215, 263, 271, 317, 331 nm

2.1.4.2 Propiedades farmacológicas^{11,13,15,17,39,40,52,58,63}

Tiempo de vida media en plasma ($t_{1/2}$)¹⁴

Tiene un tiempo de vida media que va de 10 – 20 horas

Volumen de distribución (Vd)

Su volumen de distribución es de 0.1 L / Kg

Concentración efectiva CE₅₀:

La concentración efectiva CE₅₀ es de 50 mg/L o 50 µg/ml

Dosis letal 50 (LD₅₀)

LD₅₀ (mg / kg)	Vía de administración
435	Intravenosa
1235	Oral

Unión a proteínas de 99.7 %

Un resumen de algunos métodos de análisis del Naproxeno por CLAR se muestran en la tabla 2. Es importante saber que treinta por ciento del fármaco presenta desmetilación, y el producto de esta reacción es otro compuesto llamado naproxol¹⁷.

Tabla 2 Resumen de condiciones de CLAR para el Naproxeno

Columna	Fase móvil	Velocidad de flujo (mL/min)	Detección	Muestra
Octadecilsilano de 5-um (15 cm x 4.6)	Acetonitrilo-agua- ácido acético anhidro (1125:1375:8)	***	240 nm	Plasma o sangre total
Brownlee RP 18 (5um) (10 cm x 4.6 mm)	Buffer de fosfatos (pH 3.0) en 75 % de metanol	***	254 nm	Plasma
Hipersil ODS (5um) de (25 cm x 4 mm)	Buffer de acetatos – acetonitrilo (pH 4.8 o 4.2)	***	240 nm	Plasma o suero
Columna de Octadecilsilano de (25 cm x 4.5 mm)	Buffer acetatos – metanol.	1.5 mL/min	235 nm	Plasma

2.1.5 Naproxol ^{5,15,28,55, 64}

El naproxeno es metabolizado en humanos y ratas directamente por O- desalquilación para producir 6-O-desmetilnaproxeno (DMN), el DMN posee los grupos funcionales: carboxílico y fenólico⁵³.

El Naproxol es un metabolito que se encuentra en orina por completo. No existe algún reporte que hable del tiempo de vida media del naproxol; pero se ha encontrado que después del tiempo de vida media del naproxeno, se obtiene un 14.3 +/- 3.4 % de recobro de naproxol en orina⁶². También es llamado simplemente como o- desmetilnaproxeno, no es farmacológicamente activo y su estructura química se muestra en la figura 4.

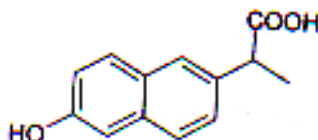


Figura 4. Estructura química del Naproxol

2.1.6 Profármaco

Un profármaco es el derivado de un fármaco, es farmacológicamente inactivo; y requiere de una transformación química o enzimática para liberar el principio activo in situ.^{45,57}

Los profármacos se diseñan con el propósito de modificar las propiedades farmacocinéticas, fisicoquímicas o de toxicidad de la molécula activa^{6,7,15,37,47}. Algunos ejemplos de estos se encuentran en la tabla 3.

Todos los profármacos son más lipofílicos que el fármaco o principio activo; por lo tanto, su solubilidad en solución acuosa disminuye marcadamente con respecto a la molécula original.

Los profármacos de naproxeno exhiben una lipoficidad óptima (coeficiente de partición). El enmascaramiento del grupo carboxílico del naproxeno, a través de una vía de esterificación simple se ha propuesto para reducir la irritación gastrointestinal (GI)^{47,57}.

2.1.7 Naproxenato de naproxenilo¹⁹

El Naproxenato de naproxenilo (ver figura 5) es evaluado como profármaco del Naproxeno, está constituido por dos moléculas de este y está sujeto a hidrólisis por esterasas para liberar la forma activa.

El uso a futuro del Naproxenato de naproxenilo en clínica esta condicionado por su paso satisfactorio a través de las fases preclínica y clínica de desarrollo e investigación de un nuevo fármaco¹⁵.

Para su estudio farmacocinético o de toxicidad en animales de laboratorio es necesario contar con un método analítico confiable que nos permita saber su concentración en plasma, la cantidad de Naproxeno como sustancia activa y de Naproxol como principal metabolito puesto que así se espera encontrar en plasma.

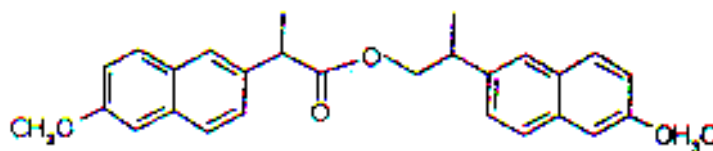


Figura 5. Estructura química del Naproxenato de naproxenilo

2.2 DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO^{41,42}

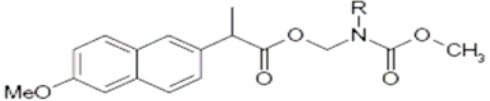
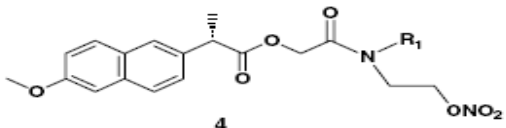
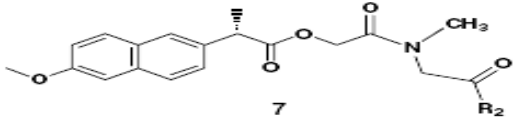
El desarrollo de un método analítico puede llegar a ser muy costoso y consumir mucho tiempo; por lo tanto, es preferible emplear caminos sistemáticos, efectuando los ensayos en una dirección segura o al menos con buenas probabilidades de éxito, evitando ensayos innecesarios y documentando los resultados, no solo para el desarrollo mismo sino para futuras revisiones⁴¹

El primer paso debería consistir en una investigación bibliográfica, donde se busquen todas las propiedades física, químicas, fisicoquímicas y farmacológicas de los analitos de interés.

El número de componentes a valorar tiene que ver con el “espacio” útil en el cromatograma. Los métodos isocráticos son incapaces de dar cabida a más de 10 – 20 picos. Con respecto a la muestra, es importante o conveniente conocer:

- 1) Identidad de los componentes de interés (Estructura química, pKa, solubilidad, espectros UV)
- 2) Rango de pesos moleculares de los componentes de interés
- 3) Naturaleza de la matriz

Tabla 3. Ejemplo de profármacos de naproxeno⁶⁸

Profármacos de Naproxeno	Estructura
<p>1. (NANAOCAM) conjugado con naproxeno</p> <p>6-8. (NArNAOCAM) conjugado con naproxeno</p>	 <p>1. R = Me, Naproxen prodrug 6-8. R = Aryl, Naproxen prodrug</p> <p>1. N-alkyl-N-alkyloxycarbonylaminomethyl (NANAOCAM) 6-8. N-Aryl-N-alkyloxycarbonylaminomethyl (NArNAOCAM)</p>
<p>4a. (N-Methyl-N-(2-(nitrooxy)ethyl)carbamoyl)methyl (2S)-2-(6-methoxy(2-naphthyl))propanoate</p> <p>4b. (N-Ethyl-N-(2-(nitrooxy)ethyl)carbamoyl)methyl (2S)-2-(6-methoxy (2-naphthyl)) propanoate</p>	 <p>4</p> <p>4a R₁ = -CH₃ 4b R₁ = -CH₂CH₃</p>
<p>7a. N-Methyl-N-((N-(2-(nitrooxy)ethyl)carbamoyl)methyl carbamoyl)methyl (2S)-2-(6-methoxy (2naphthyl)) propanoate</p> <p>7b. N-Methyl-N-(((2-(nitrooxy)ethyl)oxycarbonyl)methyl carbamoyl)methyl (2S)-2-(6-methoxy(2-naphthyl)) propanoate</p> <p>7c. N-Methyl-N-(((3-(nitrooxy)propyl) oxycarbonyl)methyl carbamoyl) methyl (2S)-2-(6-methoxy(2 naphthyl)) propanoate</p>	 <p>7</p> <p>7a R₂ = -NHCH₂CH₂ONO₂ 7b R₂ = -OCH₂CH₂ONO₂ 7c R₂ = -OCH₂CH₂CH₂ONO₂</p>

2.2.1 El proceso analítico

Un proceso analítico es un conjunto de operaciones o actividades analíticas que están interrelacionadas entre la muestra y el resultado. Consiste en todos los componentes detallados necesarios para poner en práctica un método analítico^{34,42,60}.

El método analítico es un conjunto de operaciones específicas para caracterizar cuali y cuantitativamente a un analito en una determinada muestra. La intención de los análisis es proporcionar información confiable sobre la naturaleza y la composición de los materiales sometidos al análisis³⁴. Algunas de las razones por las que se debe desarrollar un método analítico, son:

- 1) Por la adquisición de nueva tecnología
- 2) Para obtener mayor eficiencia del proceso
- 3) Para tener una alternativa más efectiva
- 4) Porque no existe el proceso
- 5) Sustituir un método analítico ya existente
- 6) Para obtener mayor sensibilidad al analito

Un proceso es un conjunto de actividades relacionadas para lograr un objetivo determinado. Un procedimiento es una serie de instrucciones a seguir para realizar una actividad o proceso. Dentro de un proceso analítico (ver figura 6) hay que realizar una serie de actividades:

- a) Conocer de donde proviene la muestra
- b) Tratamiento de la muestra
- c) Medición de alguna propiedad del analito
- d) Obtención y manejo de datos

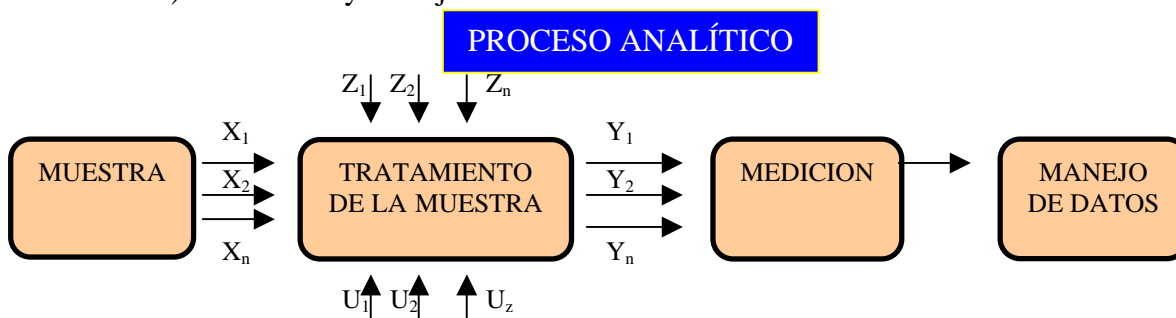


Figura 6: Esquema general del proceso analítico⁷¹

Una variable es una magnitud incógnita que puede llegar a tener un valor cualquiera. En el método analítico, existen variables de entrada X_1, X_2, \dots, X_n que representan a la composición en la muestra (concentración, cantidad, identidad) y las variables de salida Y_1, Y_2, \dots, Y_n que representan las mediciones (voltajes, distintas lecturas). También existen las variables controladas U_1, U_2, \dots, U_n que tienen gran influencia sobre la medición y las variables no controladas Z_1, Z_2, \dots, Z_n , por lo general se desconocen aunque se tiene conciencia de su presencia y posible efecto (ej. Cambios en el voltaje de luz, temperatura ambiente, etc)⁷¹.

2.2.2 Muestreo

El subproceso muestreo del proceso analítico es de suma importancia, ya que se requiere saber qué es la muestra y de dónde se va a obtener^{2,60}.

En los fluidos biológicos, el fármaco de interés se puede encontrar rodeado de una mezcla compleja de carbohidratos, proteínas, lípidos y otros componentes, que pueden interactuar entre sí interfiriendo con su determinación. La selección de la matriz biológica en la que se realizará la cuantificación de fármacos depende directamente de la farmacocinética del analito, ruta de eliminación, capacidad para unirse a proteínas y de los alcances del método.

La sangre, el plasma, el suero y la orina son de los fluidos biológicos más comunes para el análisis de fármacos, debido a su fácil obtención y manipulación¹⁰. Durante la etapa de muestreo, se debe tomar en cuenta cuáles son los factores que pueden afectar el análisis⁶⁹.

- 1) Toma de muestra
- 2) Componentes de la muestra para analizar

2.2.2.1 Toma de muestra⁶⁹

Cuando se utilizan dispositivos o jeringas para la recolección de muestras, las de mayor uso, son las jeringas de vidrio con respecto a las de plástico (ya que algunos tipos de plásticos reaccionan con el disolvente y pueden interferir con los resultados del método analítico).

Otro ejemplo es la hemólisis, que puede no ser un problema al medir concentraciones cuando se trabaja con sangre total. Sin embargo, en aquellos casos en que el compuesto farmacéutico, esta en concentraciones altas en las células rojas y no en el plasma, la lisis de células puede dar resultados falsos o muy elevados cuando se analiza el suero o el plasma.

Finalmente, cuando la sangre ha sido mezclada con un aditivo o anticoagulante, los tubos deben ser ligeramente mezclados y asegurarse que este aditivo no afecte el análisis.

2.2.2.2 Componentes de la muestra para analizar⁶⁹

En particular, la porción de sangre que será analizada para el contenido de fármaco está determinada por un número de factores: incluyendo la técnica analítica disponible, los componentes que están relacionados con respecto a la concentración, y el efecto farmacológico del fármaco.

En general, los cuatro tipos de muestra que pueden derivarse de la muestra de sangre venosa son (sangre, suero, plasma y fracción libre de proteínas).

Las células pueden ser lisadas por sonicación o por congelación de la muestra durante un periodo de tiempo.

El plasma se distingue del suero en que a este último se le ha removido el fibrinógeno durante el proceso de coagulación. El plasma se obtiene a partir de la sangre total, cuando se adiciona una sustancia como anticoagulante para retardar la formación del coagulo. Por otro lado, para la obtención del suero, se recolecta la sangre total en un tubo sin anticoagulante, para que ocurra la formación del coagulo, luego se centrifuga y se separa el sobrenadante.

La fracción libre de proteínas es la porción de sangre remanente después de que los componentes celulares y el plasma se han removido. Contiene (electrolitos, glucosa, etc) no unido a proteínas del plasma. La medición de la concentración de fármaco en la fracción libre de proteínas es importante en la determinación de proteínas que se unen a los compuestos.

2.2.3 Tratamiento de la muestra^{7,29,60}

La preparación de la muestra es una etapa muy importante dentro del análisis cuantitativo. Es muy tediosa y requiere consumo de tiempo excesivo.

Es una etapa decisiva en todo método de análisis, en los casos donde la matriz que rodea al analito es muy compleja, puede llegar a contribuir en un 30 % de la fuente de error dentro del proceso analítico.

Los objetivos de la preparación de la muestra, pueden ser los siguientes:

a) Dentro de la modificación de la matriz: 1) Para preparar la muestra y así poder introducirla dentro de la columna cromatográfica; 2) Para prolongar el tiempo de vida media del instrumento.

b) Limpieza 1) Remover impurezas y obtener la eficacia analítica requerida y la selectividad; 2) Reducir las interferencias de la matriz.

c) Enriquecer al analito.

La selección del método más apropiado depende de muchos factores como pueden ser⁴²:

- Propiedades físicas y químicas del analito.
- Concentración del analito en la muestra
- Naturaleza de la matriz de la muestra.
- Forma en la que se presenta el analito en la muestra. En muestras de origen biológico el analito puede no encontrarse como tal sino unido a proteínas transportadoras (análisis de fármacos en suero o plasma).
- Compatibilidad con los medios de solubilización y extracción con el sistema cromatográfico.
- Tipo de detector.
- Compatibilidad con el detector

La naturaleza de la muestra dicta el modo básico de preparar la solución a inyectar. Si la muestra es líquida puede inyectarse directamente previa filtración; en cambio si es un sólido, es necesario molerlo y homogeneizarlo apropiadamente, y posteriormente las sustancias a analizar presentes en la matriz sólida deben solubilizarse en un solvente adecuado. Estos solventes deben seleccionarse por su poder solubilizante de los componentes de la matriz³⁸.

Para llevar a cabo el tratamiento de la muestra pueden utilizarse todas las operaciones conocidas de la química analítica como: liofilización, evaporación, filtración, centrifugación, precipitación y solubilización.

La liofilización y la evaporación son operaciones que se utilizan para remover el vehículo líquido en el cual se encuentra el analito con el fin de concentrarlo.

La filtración y la centrifugación son operaciones que se utilizan para la separación de líquidos y sólidos.

La precipitación se utiliza habitualmente para separar del analito sustancias que pueden interferir. Por ejemplo, la desproteización es una forma particular de la separación de sustancias por precipitación. Los solventes orgánicos como el acetonitrilo o etanol agregados a una solución acuosa de una proteína disminuyen su solubilidad y, en condiciones adecuadas, inducen a su precipitación. Cuanto menor sea la polaridad del solvente agregado mejor será su capacidad de desproteización⁴².

La extracción líquido - líquido, también denominada lixiviación es la distribución (partición) de un analito entre dos líquidos inmiscibles y está representada por el equilibrio:



Donde $[A]_o$, es la concentración de analito en la fase orgánica, y $[A]_{aq}$, es la concentración de analito en la fase acuosa. La distribución (coeficiente de partición) está dado por la relación de concentraciones de analito en las dos fases⁴².

Las sustancias neutras no polares, se retienen de vehículos polares en las columnas no polares del tipo C8 o C18, estas columnas se lavan con mezclas de agua: solvente orgánico y los analitos se eluyen con algún solvente orgánico (metanol, acetonitrilo) ya sea puro o en mezclas con agua.

La retención de las sustancias ionizables está regulada por el valor del pH del medio en el que se encuentran, pudiendo comportarse como sustancias no polares (formas no disociadas) o polares (formas disociadas).

La elusión se consigue bajando el valor del pH del medio por debajo del pKa, incrementando la fuerza iónica, utilizando un solvente orgánico o combinando las tres condiciones.

Existe una técnica moderna de preparación de la muestra, como es la Extracción fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés Solid-phase extraction), es particularmente atractiva, rápida y efectiva para el aislamiento y preconcentración de los analitos.

El principio de la SPE comprende de la partición de los analitos para ser extraídos entre 2 fases: una fase sólida, el sorbente y una fase líquida, la matriz, que contiene posibles interferencias. Los analitos deben tener mayor afinidad por la fase sólida que por la matriz de la muestra (paso de retención o adsorción); y subsecuentemente ser removidos por la elusión con un solvente que tiene gran afinidad por los analitos (Paso de elusión o desorción)³⁸.

La técnica ideal para el tratamiento de una muestra es aquella que cumple con las siguientes características:

- 1) Simplicidad y rapidez
- 2) Especificidad para los analitos
- 3) Utiliza la mínima cantidad de solvente, es compatible con muchas técnicas analíticas.

2.2.4 Medición^{50,60}

Para la medición en fluidos biológicos se comparan los resultados obtenidos con respecto a un estándar conocido de los analitos. El objetivo de la medición es determinar el valor de la magnitud específica a medir, denominada mensurando.

Durante la realización de una medición intervienen una serie de factores que determinan su resultado:

a) El objeto de medición, b) el procedimiento de medición, c) los instrumentos de medición, d) el ambiente de medición y e) el observador.

Una medición comienza con una especificación apropiada del mensurando, del método de medición y de los procedimientos de medición. El método de medición es la secuencia lógica de operaciones usada en la ejecución de las mediciones⁵⁰.

El procedimiento de medición es el conjunto de operaciones, descritas de forma específica utilizadas en la ejecución de mediciones particulares, de acuerdo a un método de medición determinado.

2.2.4.1 Cromatografía

La **cromatografía** es un método analítico de separación mediante el cual los componentes de una mezcla se distribuyen entre dos fases, una móvil y otra estacionaria; esta técnica fue documentada por primera vez por el botánico ruso Mikhail Tswett a principios del siglo XX; él eligió el nombre para el método (del griego *chroma* que significa “color” y *graphein* que significa “escribir”), debido a que empleó la técnica para separar pigmentos vegetales como clorofilas y xantofilas, haciendo pasar disoluciones de estos compuestos a través de una columna de vidrio empacada con carbonato de calcio finamente dividido. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna^{16,54}.

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con una **fase móvil**, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una **fase estacionaria** con la que es inmisible, y que se fija a una columna o a una superficie sólida^{16,42,54,56}.

Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez. Esto permite analizar cuantitativa o cualitativamente una muestra⁴².

2.2.4.2 Tipos de cromatografía¹⁵

La cromatografía se ha dividido según la naturaleza de las fases involucradas y los mecanismos de separación como se puede ver en la figura 7. Los distintos mecanismos de separación que se llevan a cabo en la cromatografía de líquidos dan lugar a una clasificación de este método analítico en particular.

2.2.4.3 Cromatografía de líquido-líquido^{16,42}

En este caso se hablará de la cromatografía de tipo líquido-líquido, conocida como cromatografía de partición. En la que dos fases líquidas pueden llevar a cabo la separación de los analitos porque presentan una composición química distinta y son inmiscibles entre

sí; la fase estacionaria forma una película delgada en la superficie de un soporte sólido y el soluto se equilibra entre este líquido estacionario y la fase móvil.

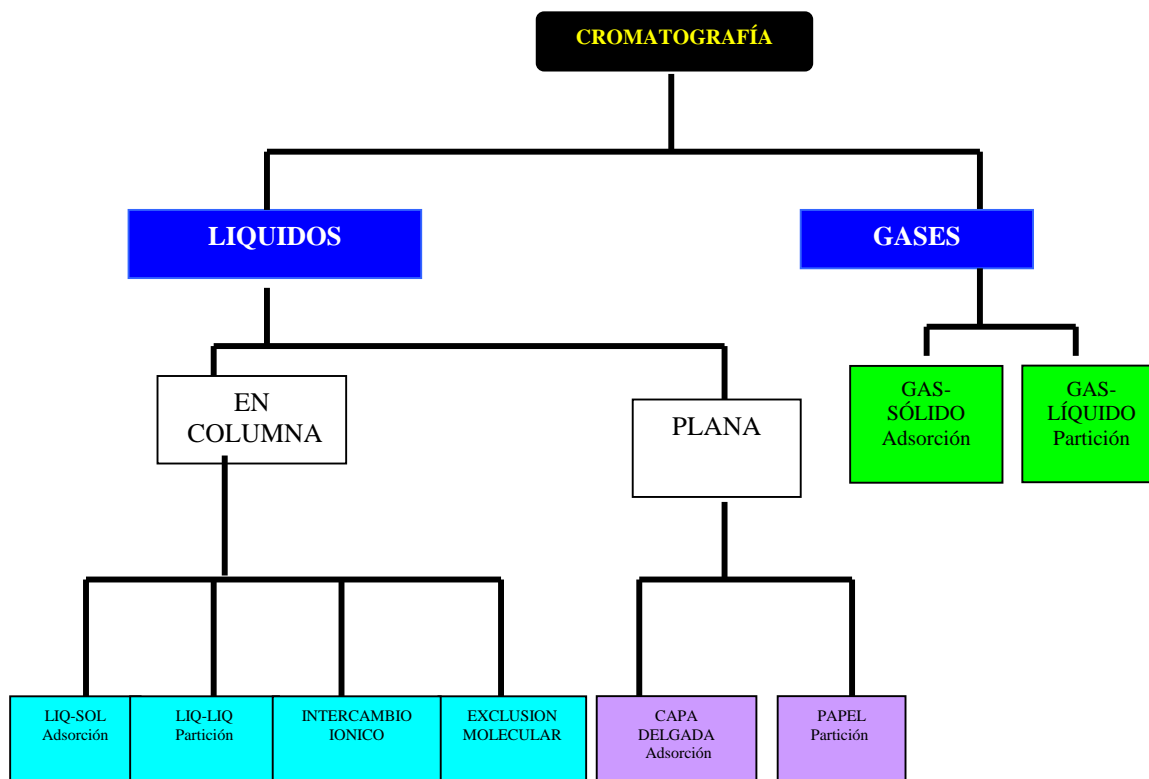


Figura 7: Tipos de cromatografía

Se basa en la diferencia de solubilidad de los componentes de la mezcla entre las dos fases o en las diferentes interacciones de los componentes de la mezcla con los grupos funcionales presentes en la fase estacionaria. En función de la polaridad de la fase líquida estacionaria, se distingue entre:

- a) Cromatografía normal (carácter polar)
- b) Cromatografía en fase reversa (carácter no polar)

La primera, generalmente se emplea para la separación de compuestos muy polares. En la segunda, como fase móvil se emplean mezclas de agua con disolventes no polares miscibles, como metanol o acetonitrilo. Por lo tanto la fase móvil es más polar que la fase estacionaria; y se emplea para la separación de compuestos de polaridad baja.

2.2.4.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada, debido a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés^{41,54}.

El éxito en la aplicación de la CLAR para un compuesto dado depende de la combinación correcta de las condiciones de operación, es decir: el tipo de columna, la fase móvil, la longitud y diámetro de la columna, la velocidad de flujo de la fase móvil¹⁶. (ver tabla 4).

Tabla 4: Guía para la selección de fases para la cromatografía de líquidos.

Tipo de compuesto	Modo	Fase estacionaria	Fase Móvil
Neutros Ácidos débiles Bases débiles	Fase inversa	C18,C8,C4, ciano, amino	Agua / orgánicos Modificadores
Iónicos, bases, ácidos	Par iónico	C18,C8	Agua /orgánicos Reactivo par iónico
Compuestos no solubles en agua	Fase normal	Sílica, amino, ciano, diol	Orgánicos
Compuestos iónicos, iones inorgánicos	Intercambio iónico	Resina de intercambio aniónico o catiónica	Buffer acuoso
Compuestos de alto peso molecular, Polímeros	Exclusión molecular	Poliestireno Sílica	Acuosa –orgánico Para permeación en gel

La migración diferencial en la CLAR es resultado del equilibrio de la distribución de los componentes de una mezcla entre las dos fases. Dichos componentes se separan en la columna y al salir de ésta son conducidos por la fase móvil y en el orden en que emergieron, hacia el detector donde se registran las concentraciones y sus tiempos de retención en la columna.

A continuación se mencionarán cuales son las partes que constituyen un equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, estos se representan en la figura 8¹⁶:

- a) **Reservorio.** Es donde se encuentra la fase móvil
- b) **Sistema de Bombeo.** Tiene como objetivo impulsar la fase móvil a través de la columna.
- c) **Sistema de inyección.** Es por donde se introduce la muestra en el sistema.
- d) **Detector.** Puede ser de dos tipos: aquellos que miden alguna propiedad del soluto y la fase móvil; y aquellos que miden alguna propiedad del soluto únicamente.
- e) **Columna.** Es la parte fundamental de la cromatografía ya que en ésta, es donde se lleva a cabo la separación.
- f) **Registrador de señales.** Es donde la señal que provoca el compuesto al pasar por el detector, queda registrada por un graficador o integrador.

Las ventajas de la cromatografía de líquidos de alta Resolución, son:

- a) Se puede tener un flujo rápido y controlado del solvente aunque la columna es relativamente impermeable.
- b) La operación resulta ser más reproducible
- c) Se tiene una alta precisión y exactitud en el análisis

2.2.4.5 Bases de la separación⁴²

Como resultado del análisis cromatográfico se obtienen dos productos: 1) Un gráfico, el cromatograma, que relaciona la concentración de soluto en función del tiempo (de elusión). 2) Un eluido o eluato, fluido proveniente de la columna que debe recolectarse en forma secuencial.

Cuando la muestra y la fase móvil son forzados a atravesar la fase estacionaria, entran en juego distintos tipos de interacción entre cada uno de estos componentes: Interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, interacciones dipolares y electrostáticas, las cuales son responsables de la mayor o menor afinidad de cada uno de los componentes de la muestra por la fase móvil o la fase estacionaria.

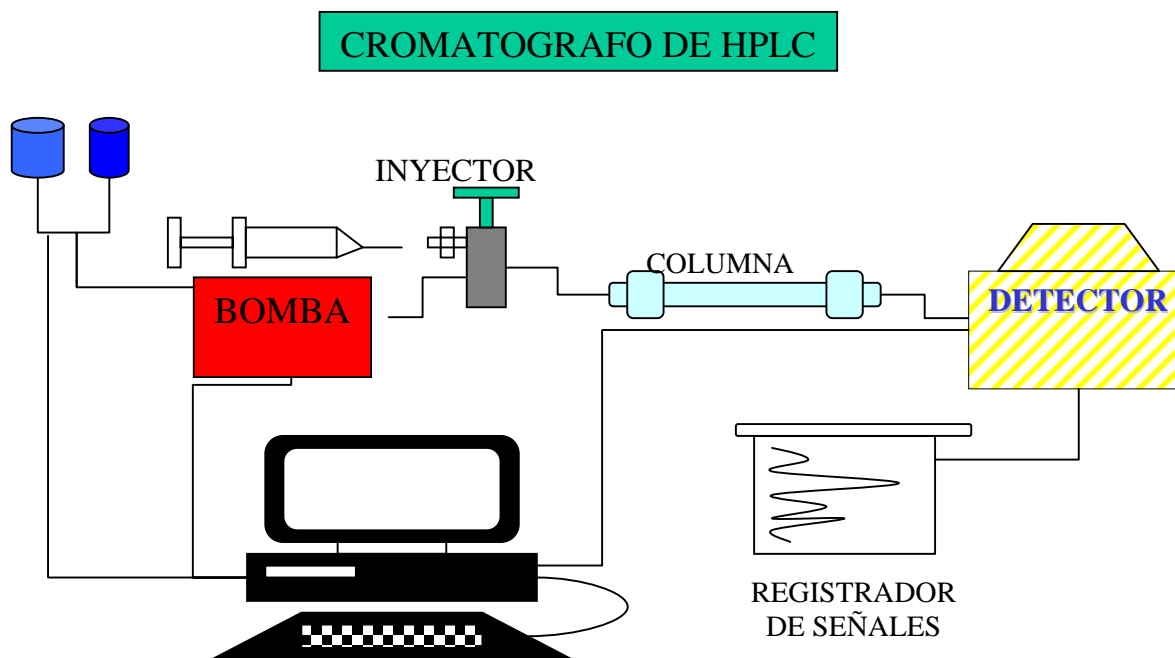


Figura 8. Esquema de un aparato de HPLC

Algunos conceptos de cromatografía que se mencionan a continuación, se definen muy bien en el libro de Introducción a la HPLC (Quattrocchi, 1992) ⁴²

Línea base, Tiempo de retención (t_R), Factor de capacidad (K'), Factor de separación (α), Resolución (R), Platos teóricos. Asimetría (A_s).

Los principales logros de CLAR se concentraron en tres parámetros fundamentales: resolución, reproducibilidad y rapidez.

La partícula base de la silicagel se modifica químicamente para reemplazar sus grupos funcionales activos, los silanoles, de características polares, por determinados grupos funcionales: octadecilsilano (frecuentemente llamado ODS o C18), octilsilano (C8).

Un relleno ligado a grupos ciano funcionará en fase normal si la fase móvil es hidrófoba o en fase reversa, cuando se emplean mezclas hidroalcohólicas (ver tabla 5).

Tabla 5: Diferencias en las características entre una fase normal y fase reversa.

FASE	NORMAL	REVERSA
Polaridad del relleno	Alta	Baja
Polaridad del solvente	Baja	Alta
Orden de elusión	Primero el menos polar	Primero el más polar
Efecto del incremento de polaridad del solvente	Reduce los tiempos de retención	Aumenta los tiempos de retención

2.2.4.6 Cromatografía en fase reversa⁴²

Las ventajas de la cromatografía en fase reversa pueden resumirse en:

Compuestos no iónicos, iónicos e ionizables pueden ser separados en la misma columna, con la misma fase móvil.

La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil

La adsorción irreversible, frecuente en silicagel, raramente ocurre

La fase móvil predominante es agua, abundante y económica

El modificador orgánico predominante, metanol, es asequible en calidad y precios adecuados.

El orden de elusión es predecible, en función de la hidrofobicidad del analito.

Se necesita poco tiempo para el equilibrio del sistema de un cambio de fase móvil.

2.2.4.7 La fase móvil⁴²

La fase móvil en cromatografía de líquidos en fase reversa (RPLC) está en general constituida por un solvente polar, mezcla de agua y un modificador orgánico, a los que se podrá según veremos agregar aditivos, sales o amortiguadores.

Se considera que la selectividad del sistema está dada por el modificador, en función de su capacidad aceptor o dador de protones y momento dipolar, propiedades que determinarán el tipo y magnitud de la interacción con la muestra.

2.2.4.8 Mecanismos de retención⁴²

Se ha sugerido que el modo de interacción entre el soluto y la fase ligada puede ser de tres tipos, partición del soluto entre la fase móvil y una fase estacionaria líquida, adsorción sobre una fase estacionaria sólida, o bien un proceso mixto partición-adsorción.

En RPLC, la fase móvil es muy polar (en general mezcla de agua y un modificador orgánico, MeOH, AcN o THF). Como el material de relleno de la columna es no polar, las únicas fuerzas de interacción posibles deberían ser las de Van der Waals, destacándose a priori otras interacciones, por ejemplo, puentes de hidrógeno, formación de complejos, interacción iónica, etc.

La teoría solvofóbica de Horvath es probablemente la de mayor aceptación. Según ésta, la fuerza de retención en fase reversa se debe al aumento de entropía que acompaña a la transferencia del soluto a cada una de las fases. Dicho de otro modo, la interacción entre moléculas de soluto y de solvente es mucho más débil que la interacción de las moléculas de solvente entre sí.

Como consecuencia, el soluto es expulsado de la fase móvil y forzado a penetrar en la fase estacionaria, que actúa como receptor pasivo.

2.2.2.9 La cadena hidrocarbonada⁴²

El tipo de sustituyente más empleado en la fase reversa es de tipo alquílico, especialmente C8 o C18. La retención de una serie de solutos aumenta con la longitud de la cadena hidrocarbonada de la fase ligada. A mayor hidrofobicidad del soluto corresponde mayor retención. Sin embargo, las columnas de cadena corta producen picos más simétricos que las de cadena larga, probablemente porque los silanoles libres, más accesibles, interaccionan con los solventes polares de la fase móvil, permitiendo la solvatación de la fase estacionaria y con ello, un equilibrio más rápido.

2.2.4.10 El detector UV⁴²

Dentro de la etapa de desarrollo analítico, se necesita conocer cual es el tipo de detector que se va a utilizar.

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. El de primera elección y el más empleado es el detector de ultravioleta (UV), por su simplicidad de uso, robustez y confiabilidad. Es muy utilizado ya que muchas moléculas pueden absorber luz en su región de longitud de onda, opera en un rango de 190 a 350 nm.

La señal generada por el detector se transmite al integrador, donde calcula el área o altura de los picos y efectúan una serie de operaciones programadas generando finalmente el reporte analítico. Finalmente, se buscan cuales son las mejores condiciones experimentales para llevar a cabo el método analítico.

2.2.5 Manejo de datos

Los métodos de medida generan una serie de valores que tienen que transformarse en resultados analíticos útiles para su interpretación. Con la ayuda de sistemas de computo, se pueden procesar los datos al mismo tiempo que permite almacenar los resultados.

La cuantificación de los picos cromatográficos puede realizarse midiendo su área o altura como respuesta directa. En algunos casos se requiere una sencilla etapa de cálculo o de modelos sencillos, para obtener diferentes respuestas indirectas; por ejemplo la concentración, o bien la cantidad de los analitos, etc. La selección de métodos o modelos adecuados es crucial para no obtener información errónea^{2,60}.

Como la concentración de un analito es directamente proporcional al área que genera, cualquier factor que modifique el valor del ancho del pico, influirá sobre su cuantificación.

En los integradores digitales, a pesar de su simplicidad de manejo, muchas veces existen errores en la integración de los picos, debidos a la mala definición de las condiciones de trabajo. Valores de ancho de pico inadecuados conducen a defectos o excesos en la cantidad de intervalos con los que se integra un pico⁴².

Valores de pendiente muy bajos conducen a la integración de ruidos en la línea base, mientras que con valores de pendiente demasiado elevados se puede eliminar parte del pico en la integración.

2.2.5.1 Diseño de experimentos^{15,34}

Un diseño de experimentos es un bosquejo o descripción de una prueba de laboratorio para resolver algún problema analítico planteado. En el que se requiere una serie de pruebas en las que se conoce que inducen cambios deliberados en las variables de entrada de un proceso para observar e identificar las causas de los cambios en las respuestas de salida. Se requiere el conocimiento que abarca ciertas áreas de la ciencia como son: las matemáticas, química analítica, química orgánica, desarrollo farmacéutico y de tecnología, etc; para tener un buen diseño y se puede aplicar a un gran número de disciplinas para optimizar el trabajo de experimentación; como puede ser en el desarrollo de nuevos procesos o para mejorar rendimientos de los que ya fueron implementados; dentro del diseño se suele utilizar los resultados para seleccionar parámetros o condiciones de trabajo.

Este diseño al ser validado nos permite tener mayor confiabilidad y mejor funcionamiento en el campo en el que se este empleando, así como reducir costos y tiempo en el desarrollo del producto.

El experimento puede realizarse eficientemente empleando el método científico en su planeación y, con el objeto de producir conclusiones válidas y objetivas; también se requiere de un enfoque estadístico, es un aspecto importante dentro del planteamiento experimental, que debe estar estrechamente vinculado dentro de todo el proceso.

Los tres principios básicos en el diseño de experimentos, son:

1. Obtención de replicas, lo que permite estimar el error experimental y ser más precisos al prever los efectos. (Esto es, si se puede reproducir).
2. Aleatorización, proceso que elimina los factores externos que pudieran afectar a las variables independientes. (Para conocer si no tiene que ver con los experimentos).
3. Análisis por bloques, paso que incrementa la precisión del experimento al manejar “paquetes” o porciones de material experimental más homogéneas en comparación con el total.

Para enfrentar un problema analítico utilizando un diseño de experimentos, se debe seguir un procedimiento lógico, como el siguiente:

1. Comprender y plantear dicho problema.
 2. Elegir los factores, niveles y variables que influyen en las respuestas.
-

Seleccionar la variable respuesta más adecuada que ofrezca la información deseada y sea capaz de medirse.

3. Elegir el diseño experimental considerando: el tamaño de muestra y el orden de los ensayos tratando de eliminar los factores que pudieran intervenir y que no son controlables.

4 Realizar el experimento respetando las condiciones ya establecidas.

5 Análisis de datos con métodos estadísticos.

6 Concluir con base en los resultados y hacer recomendaciones prácticas y útiles para trabajos posteriores.

7 Rediseñar.

Los experimentos factoriales, son una técnica general muy útil que permite descubrir las interacciones directas entre variables ya que en estos se investigan todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores en cada ensayo o réplica completa.

El tipo más sencillo de experimento factorial 2^2 es aquel donde intervienen solo dos factores con dos niveles (diferentes valores experimentales). Ver tabla 6.

Tabla 6. Diseño factorial 2^2 . Relación entre factores y niveles.

		Factores	
		A	B
Niveles	Bajo -	Respuesta 1,1 (1)	Respuesta 2.1 (b)
	Alto +	Respuesta 1,2 (a)	Respuesta 2,2 (ab)

Los experimentos factoriales se pueden complicar al aumentar el número de factores (n); y al utilizar dos niveles (2), como lo indica la fórmula 2^n . Por ejemplo si se estudian 2 factores, el número de experimentos necesarios serían cuatro experimentos. Lo que para tres factores en estudio, se requieren de ocho experimentos necesarios.

2.3 VALIDACIÓN DE UN METODO ANALITICO

Para asegurar los niveles de calidad mínimos y que sean comunes en un proceso analítico, se requiere que el uso de métodos validados, aumente. El bioanálisis es una de las raíces de la ciencia analítica que requiere la validación de un método analítico: por ejemplo, que los resultados obtenidos de un estudio de bioequivalencia deben estar basados en un método analítico validado²⁴.

En 1990, en la conferencia de Washington se encontró una discusión sobre métodos bioanalíticos que pueden consistir de parámetros analíticos (bias, precisión, etc), que necesitan ser documentados para validar un método empleado en estudios de: biodisponibilidad, bioequivalencia y farmacocinética en animales y humanos. Además, para algunos de estos parámetros, los criterios mínimos de aceptación deben ser determinados.

Aunque esto puede ser un buen inicio para estandarizar la validación en los bioanálisis, se tuvieron recomendaciones severas, determinadas durante la reunión y el reporte de la conferencia se mantiene sujeto a críticas²⁴.

En general, se habló de que los criterios de aceptación necesitan estar basados bajo consideraciones estadísticas.

Una importante deficiencia en el reporte de la Conferencia de Washington y en otras guías disponibles es que no ponen suficiente atención en la demanda de los proyectos experimentales para ser utilizados. El objetivo del documento es proveer información para auxiliar a los analistas en los experimentos de validación y al mismo tiempo, para proveer una guía para evaluar el ruido de los datos estadísticos²⁴.

Desarrollar la validación de un método abarca un amplio campo que debe ser cubierto con precisión por un simple documento; principalmente se enfoca sobre la validación de los métodos cromatográficos cuantitativos como un sistema de detección convencional utilizado en bioanálisis²⁴.

Para la validación de formulaciones farmacéuticas, la discusión sobre el consenso de la terminología fue relativamente avanzada.

Lo cual sugirió seguir un propósito general para la validación de métodos analíticos por iniciativa de la industria farmacéutica y las agencias regulatorias, de las tres mayores autoridades (la unión Europea, USA y Japón), la International Conference on Harmonisation (ICH)^{4,24,26}.

En este camino, la industria farmacéutica quiere aplicar las mismas definiciones y hablar con el mismo lenguaje para la validación.

Las guías publicadas por las organizaciones (autoridades reconocidas como la United States Pharmacopeia (USP), Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMP) y el Center for Drug Evaluation and Research (CDER) de la FDA de US o en la literatura química⁴⁸); pueden ser utilizadas para determinar que parámetros operacionales pueden ser incluidos en un protocolo de validación formal.

Ya que un método analítico es empleado para la determinación cuali y cuantitativa de un fármaco, sus metabolitos y/o profármaco tiene un papel muy importante en la evaluación de datos en un estudio de biodisponibilidad, bioequivalencia o farmacocinética.

Es por ello que el método analítico debe ser validado para garantizar la veracidad y confiabilidad de los resultados derivados de estos estudios.

La validación es la confirmación documental, de que el método cumple con lo establecido; dicho de otra forma, la validación de un método analítico esta definida como el proceso por el cual queda establecido por medio de estudios de laboratorio, que las características del método cumplen con el propósito para el cual fue diseñado, estas características se expresan en términos de parámetros de validación^{15,23,27,35,41,46,48,61}.

Los datos elementales que requiere la USP para un ensayo de validación de formas farmacéuticas se muestran en la tabla 7. Depende de la categoría en la que entre el analito en estudio.

La categoría I. Es para métodos analíticos para cuantificar los principales componentes de una sustancia a granel o ingredientes activos en la forma farmacéutica.

La categoría II. Es para métodos analíticos para la determinación de impurezas en la sustancia a granel o productos de degradación en la forma de dosificación final, incluye ensayos cuantitativos y pruebas límite.

La categoría III. Es para métodos analíticos para la determinación de características.

La categoría IV. Pruebas de identificación

Tabla 7. Datos elementales que requiere la USP para un ensayo de validación de formas farmacéuticas

Parámetros analíticos	Ensayo Categoría I	Ensayo categoría II		Ensayo Categoría III	Ensayo Categoría IV
		Cuantitativo	Pruebas limite		
Exactitud	Si	SI	*	*	No
Precisión	Si	Si	No	Si	No
Especificidad	Si	Si	Si	*	Si
LD	No	No	Si	*	No
LC	No	Si	No	*	No
Linealidad	Si	Si	No	*	No
Rango	Si	Si	*	*	No

* Puede ser requerido, dependiendo de la naturaleza de la prueba específica

En México, el organismo que se encarga de la regulación sanitaria es la Secretaría de Salud (SSA) a través de COFEPRIS ^(*) y el Consejo General de Salubridad ^(**), dentro de su normatividad se encuentra la Norma oficial NOM 177-SSA1-1998 (publicada en el Diario oficial de la Federación) que establece los criterios y requisitos que deben observarse en la realización de las pruebas para demostrar la intercambiabilidad de los medicamentos genéricos.

^(*) **COFEPRIS** (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios) es un órgano desconcentrado de la Secretaría de Salud con autonomía técnica, administrativa y operativa, que tiene como misión proteger a la población contra riesgos sanitarios, para lo cual integra el ejercicio de la regulación, control y fomento sanitario bajo un solo mando, dando unidad y homogeneidad a las políticas que se definan.

^(**) El **Consejo de Salubridad** General es un órgano que depende directamente del Presidente de la República en los términos del Artículo 73, fracción XVI, base 1a. de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos. Está integrado por un presidente que será el Secretario de Salud, un secretario y trece vocales titulares, dos de los cuales serán los presidentes de la Academia Nacional de Medicina y de la Academia Mexicana de Cirugía, y los vocales que su propio reglamento determine.

Y más específico en la sección 9.1 de dicha norma establece los requisitos que debe cumplir la validación del método analítico para el análisis de muestras biológicas y define los parámetros como³⁵: Linealidad, Precisión (que se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, recuperación absoluta, límite de detección, límite de cuantificación, estabilidad de la muestra analítica, especificidad y tolerancia³⁵.

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 o los analitos en la muestra.

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.

La **repetibilidad** es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones; en cambio, la **reproducibilidad intralaboratorio** expresa la variación obtenida a diferentes condiciones de análisis, tales como días, columnas, equipo, etc.

La **exactitud** es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

La **recuperación absoluta** es el porcentaje de el o los analitos en estudio que se recupera una vez que se lleva a cabo el tratamiento de la muestra. Es la eficiencia de un método analítico para cuantificar compuestos en una muestra biológica.

El **límite de detección** es la concentración mínima de un analito en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

El **límite de cuantificación** es la concentración más baja que puede cuantificarse con precisión y exactitud establecidas por el método.

La **estabilidad** es la comprobación de que los analitos en estudio son estables en cuanto a temperatura y tiempo. También es la propiedad de un compuesto de que conserve sus características desde su toma de muestra hasta su análisis.

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

La **especificidad o 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. Este parámetro se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida solo a la presencia del analito, libre de interferencia de otros componentes, en la matriz de la muestra.

En este tipo de ensayos resulta muy ventajoso el empleo del detector de ordenamiento de fotodiodos, ya que complementa la información convencional con la relativa a la pureza de los picos.

Este detector tiene la ventaja múltiple, es decir, puede medir la señal no solo a una longitud de onda discreta, sino el espectro de absorción completo en tiempo real (centésimas o milésimas de segundo), de modo que las dimensiones habituales de tiempo y absorbancia, se agrega una tercera, la longitud de onda, permitiendo apreciar detalles que escapan a detectores convencionales.

En el estudio de fluidos biológicos o de muestras naturales, donde la complejidad de la matriz dificulta la identificación inequívoca de los picos, deberá recurrirse a otro tipo de métodos para la determinación de la selectividad.

La determinación de la especificidad no puede seguir modelos tan sistemáticos y dependerá del arte e ingenio del analista, pudiéndose tomar como referencias:

Tiempo de retención

La modificación de las condiciones cromatográficas (proporción de solventes o modificadores, pH, etc)

La caracterización espectral

Detectores de mayor selectividad

Empleo de técnicas enzimáticas para la transformación del analito, consistentes en la incubación del fluido en presencia de la enzima apropiada, en condiciones adecuadas de temperatura, pH, y la inyección del producto para comprobar la reducción o desaparición del sustrato.

Las reacciones degradativas (oxidación, reducción, fotólisis) para comprobar la disminución o desaparición de la señal del analito en el cromatograma.

La **robustez** de un método analítico corresponde a los estudios que indican el grado de confiabilidad del ensayo ante cambios de variables comunes. Estos cambios pueden ser ligeras diferencias operativas, de equipos, analistas, laboratorios, fuente de columnas, etc.

Un método robusto quiere decir que es reproducible.

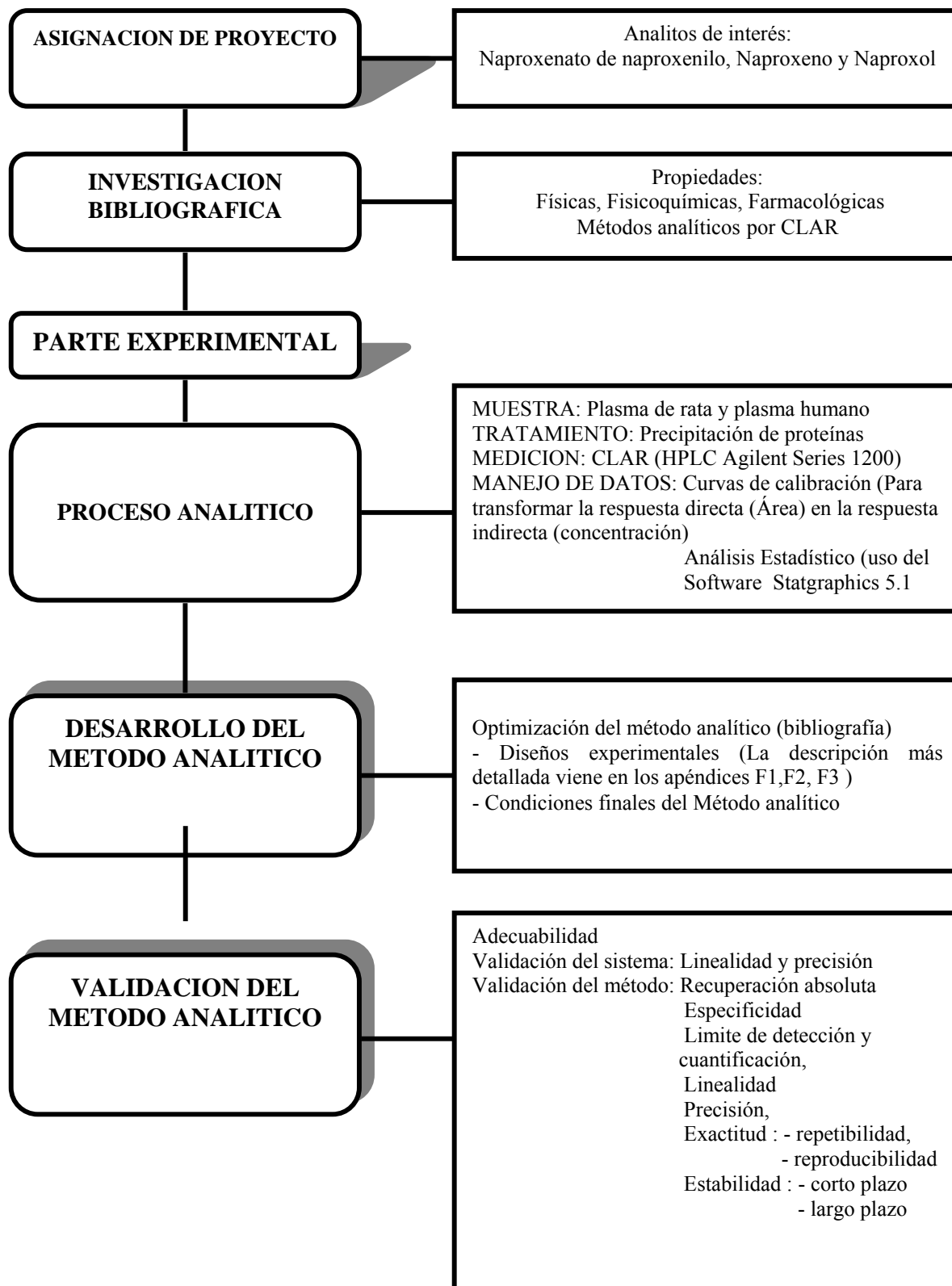
En CLAR deberá estudiarse la eventual variación de resultados (precisión, resolución, eficiencia, asimetría, etc) ante cambios de variables tales como columna (fuente, tipo de partículas, longitud, número de inyecciones), cambios de pH, de temperatura, de composición de la fase móvil.

Las variables seleccionadas se indican con letras: las letras mayúsculas corresponden al nivel alto y las letras minúsculas al nivel bajo de la variable en cuestión.

En el capítulo III, se mencionan los criterios de aceptación para cada parámetro de la validación.

III. PARTE EXPERIMENTAL

A continuación se presenta un esquema general del trabajo experimental:



3.1 PROCESO ANALITICO

3.1.1 Muestra

La muestra que fue seleccionada es el plasma de rata y plasma humano, debido al metabolismo del Naproxeno, como base fundamental y por su unión a proteínas como se encontró en la bibliografía, ya comentada. La muestra de plasma de humano se obtuvo de siete voluntarios sanos identificada como 220405 24/24 B-106 A /Folio 51. Donado en el laboratorio de Biofarmacia.

El plasma de rata proviene de ratas macho Wistar de 200 gramos en promedio, que fueron donadas por el Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, donde se llevó el control de su dieta, la realización de la toma de muestra sanguínea para posteriormente separar el plasma. En un principio, fue recolectado en tubos Vacutainer de 5 mL con K₂EDTA (no se indica la cantidad), que se adquieren comercialmente.

El plasma de rata o humano contiene: componentes endógenos; la muestra añadida contiene una mezcla de naproxeno (Nx), naproxol (NxOH) y naproxenato de naproxenilo (NxNx) a diferentes concentraciones.

Se determinó la necesidad de uso de un inhibidor enzimático recolectando el plasma de rata en tubos Vacutainer comerciales de 6 mL con y sin fluoruro de sodio (Inhibidor enzimático) y oxalato de potasio (anticoagulante), no se indican las cantidades; y fue almacenado y conservado en congelación a una temperatura de -20 ° C. Por la presencia de esterasas del plasma que hidrolizan al Naproxenato de naproxenilo.

3.1.2 Tratamiento de la muestra⁵

En el apéndice E, se muestra en diagrama de flujo que describe los pasos que se siguieron para llevar a cabo el tratamiento de las muestras por precipitación de proteínas.

3.1.3 Medición

Para realizar la etapa de medición se utilizó la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

3.1.4 Manejo de datos

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos durante la etapa de desarrollo y validación del método analítico, se utilizó el software Statgraphics Versión 5.1.

3.2 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

3.2.1 Condiciones cromatográficas que se mantuvieron constantes durante la etapa de desarrollo del método analítico.

Los factores que permanecen constantes se muestran a continuación:

Cromatógrafo de líquidos	Modulo de análisis para CLAR Agilent Serie 1050
Inyector	Automático
Detector	Agilent UV-Visible (leído a 254 nm)
Bomba	Binaria
Precolumna	C18 4.0 x 3 mm
Columna	C8 4.6 x 250 mm
Volumen de inyección	30 µL
Muestra a inyectar :	Fase móvil añadido con los siguientes analitos: 25 µg/mL de Naproxeno SR 25 µg/mL de Naproxol SR 25 µg/mL de Naproxenato de naproxenilo

Durante el trabajo experimental de la presente tesis, se realizaron los siguientes experimentos para encontrar las mejores condiciones cromatográficas para cuantificar los analitos: Nx, NxOH y NxNx por CLAR en plasma de rata y plasma humano.

3.2.2 DISEÑO 1. Diseño factorial 2² para evaluar el efecto del pH y la polaridad de la fase móvil sobre el tiempo de retención del Naproxeno, Naproxol y Naproxenato de naproxenilo.

El objetivo de este diseño experimental fue determinar el efecto de los factores (pH y polaridad) de la fase móvil para optimizar los tiempos de retención (t_R) en minutos de los analitos bajo estudio (Nx, NxOH y NxNx) como respuestas y así lograr un tiempo de corrida cromatográfica corto. La polaridad se controla modificando la proporción de amortiguador de fosfatos de la fase móvil (A mayor proporción de amortiguador de fosfatos mayor polaridad). Este diseño se muestra en la tabla 8 con 2 replicas.

Las hipótesis de prueba fueron las siguientes:

1. Si el analito tiene un pKa bajo (menor a 7) entonces al aumentar el pH de la fase móvil, el analito se encontrará en su forma ionizada; por lo tanto es menos afín por la fase estacionaria y su tiempo de retención disminuye.
2. Si el analito es un compuesto polar, entonces al utilizar una fase móvil de polaridad alta, disminuye su tiempo de retención del mismo. Si el analito es un compuesto no polar, entonces al aumentar la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de retención del analito.

Tabla 8. Factores y niveles del primer diseño experimental

Niveles	Factores	
	A	B
	pH	Polaridad (%)
-1	6.0	30
+1	7.0	35

Se trabajó con dos niveles (-1 y +1) para cada factor (A y B), y se utilizaron los valores numéricos para cada nivel evaluado.

La descripción de la metodología se puede ver en el apéndice F1.

Los factores que permanecen constantes en este diseño experimental se muestran a continuación:

Flujo de la fase móvil	1.0 mL/min
Fase móvil	Acetonitrilo (X %)
(pH aparente Z)	Amortiguador de fosfatos 0.05 M (Y %)
Volumen de inyección	30 µL
Muestra a inyectar :	Fase móvil añadido con los siguientes analitos: 25 µg/mL de Naproxeno SR 25 µg/mL de Naproxol SR 25 µg/mL de Naproxenato de naproxenilo

Para este diseño no se muestran los cromatogramas.

Las variables de respuesta a analizar son (ver tabla 9):

- a) Tiempo de retención del Naproxeno
- b) Tiempo de retención del Naproxol
- c) Tiempo de retención del Naproxenato de naproxenilo

Tabla 9: Respuestas a medir en el primer diseño experimental.

Experimento	pH	Polaridad de F.M* (% de amortiguador de fosfatos)	Tiempo de retención (min)		
			Nx	NxOH	NxNx
1	6.0	30			
a	7.0	30			
b	6.0	35			
ab	7.0	35			

* F.M: Fase móvil

Se prepararon por separado cada una de las fases al pH y polaridad correspondiente a cada experimento. Y se inyectó por duplicado la muestra en solución de fase móvil.

3.2.3 DISEÑO 2. Diseño factorial 2² para evaluar el efecto de la acidez y el flujo de la fase móvil sobre los tiempos de retención de los analitos

El objetivo de este diseño experimental fue concluir si las condiciones de acidez y flujo de la fase móvil ayuda a optimizar los tiempos de retención (t_R) en minutos de los analitos bajo estudio (Nx, NxOH y NxNx).

Las hipótesis de prueba fueron las siguientes:

1. Si los componentes endógenos son sensibles a la acidez, entonces a mayor acidez se obtendrá un frente del cromatograma más limpio.
2. Si el flujo de la fase móvil influye en los tiempos de retención de los analitos; entonces a mayor flujo de la fase móvil los tiempos de retención serán menores y así el tiempo de corrida será más corto. El segundo diseño experimental se muestra en la tabla 10.

Tabla 10: Factores y niveles del segundo diseño experimental

Niveles	Factores	
	A	B
	Tratamiento de la muestra	Flujo de fase móvil mL/min
-1	AcN (Sin H ₃ PO ₄)	0.8
+1	10 µl H ₃ PO ₄ /200 µl AcN	1.0

Los factores que permanecen constantes en este diseño experimental se muestran a continuación:

Fase móvil	Acetonitrilo (70 %)
(pH aparente 7.0)	Amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 6.0 (30 %)
Volumen de inyección	30 µL
Muestra a inyectar :	Blanco de plasma humano y Blanco de plasma humano con los siguientes analitos: 25 µg/mL de Naproxeno SR 25 µg/mL de Naproxol SR 25 µg/mL de Naproxenato de naproxenilo

Fue necesario realizar repeticiones por duplicado para así poder evaluar el tiempo de retención de los analitos como respuesta (en minutos) y la resolución que existe entre el par de señales (CE y Nx) y el NxOH y NxNx. (ver la tabla 11 que muestra un diseño factorial 2²). La descripción de la metodología se puede ver en el apéndice F2.

Las variables de respuesta a analizar:

- Tiempo de retención del Naproxeno
- Tiempo de retención del Naproxol
- Tiempo de retención del Naproxenato de naproxenilo
- Resolución entre señales (CE y Nx)
- Resolución entre señales de NxOH y NxNx

Los cromatogramas correspondientes a este diseño se muestran en el apéndice A.

Tabla 11: Respuestas a medir en el segundo diseño experimental.

Experimento	Tx Mta*	ϕ FM (mL/min)	Tiempo de retención (min)			Resolución	
			Nx	NxOH	NxNx	CE / Nx	NxOH / NxNx
1	Sin H ₃ PO ₄	0.8					
a	Con H ₃ PO ₄	0.8					
b	Sin H ₃ PO ₄	1.0					
ab	Con H ₃ PO ₄	1.0					

Donde:

Tx Mta*: Tratamiento de la muestra: AcN (Sin H₃PO₄) ó 10 μ l H₃PO₄/200 μ l AcN
(con H₃PO₄)

ϕ FM: Flujo de la fase móvil

CE / Nx: Resolución entre las señales de respuesta de los componentes endógenos del plasma y Naproxeno.

NxOH / NxNx: Resolución entre las señales de respuesta del Naproxol y Naproxenato de naproxenilo.

3.2.4 DISEÑO 3. Diseño factorial 2² para evaluar el efecto del pH de la fase móvil y la concentración (baja y alta) de Nx y NxOH sobre la resolución entre ellos.

El objetivo del tercer diseño experimental fue determinar el efecto del pH de la fase móvil y la concentración de los analitos sobre la resolución de las señales de Naproxeno y Naproxol. Así como realizar un pequeño estudio de robustez del método analítico.

La hipótesis de prueba es:

1. Se espera que a un pH mayor de 5.4 y menor de 6.0 del amortiguador de fosfatos se obtenga una buena resolución entre las señales de los picos de Nx y NxOH, evitando la interferencia debida a los componentes endógenos del plasma humano.
2. Se espera que a una menor concentración de los analitos se obtenga una mayor resolución.

El diseño experimental se muestra en la tabla 12. La descripción de la metodología se puede ver en el apéndice F3.

Tabla 12. Factores y niveles del tercer diseño experimental

Niveles	Factores	
	A	B
	Concentración de los analitos en plasma ($\mu\text{g/mL}$)	pH en el Amortiguador de fosfatos
-1	1	5.55
+1	20	5.65

En el caso del tercer diseño experimental los experimentos se hicieron individualmente para las muestras y se evaluó la resolución entre la señal del Nx y NxOH (ver la tabla 13).

Los parámetros cromatográficos que se mantuvieron constantes fueron los siguientes:

Flujo de la fase móvil	1.0 mL/min (cada uno durante cada secuencia de tabla)
Fase móvil	Acetonitrilo (70 %)
(pH aparente 6.55 y 6.65)	Amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 5.55 y 5.65 (30 %)
Volumen de inyección	30 μL
Muestra a inyectar :	Blanco de plasma humano con los siguientes analitos: 1.0 y 20 $\mu\text{g/mL}$ de Naproxeno SR 1.2 y 22 $\mu\text{g/mL}$ de Naproxol SR

La variable de respuesta a analizar fue la Resolución entre señales (Nx y NxOH)

Tabla 13: Respuestas a medir en el tercer diseño experimental.

Experimento	Concentración Nx y NxOH ($\mu\text{g/mL}$)	pH	Rs (Nx/NxOH)
1	1	5.55	
a	20	5.55	
b	1	5.65	
ab	20	5.65	

Donde: **C Nx y NxOH** : Concentración de Nx y NxOH en plasma humano.

Rs Nx / NxOH: Resolución entre las señales de respuesta del Naproxeno y Naproxol.

3.2.5 Método Analítico desarrollado

- a) La **muestra** es plasma de rata recolectado en tubos Vacutainer con fluoruro de sodio como inhibidor enzimático y oxalato de potasio como anticoagulante. Añadido con Nx, NxOH y NxNx a diferentes concentraciones.
- b) El **tratamiento de la muestra**⁵ se muestra en el apéndice E
- c) Para llevar a cabo la **medición y la validación del método analítico**, se utilizó el cromatógrafo de líquidos HPLC Agilent Technologies Serie 1200 donde se intentó reproducir las condiciones cromatográficas quedando los parámetros como se menciona a continuación:

Cromatógrafo de líquidos	Sistema Agilent Technologies Serie 1200
Inyector	Automático
Detector DAD	Agilent UV-Visible (leído a 270 nm)
Bomba	Binaria
Precolumna	Agilent Technologies C18 4.0 x 3 mm
Columna	C8 4.6 x 250 mm SphereClone. Phenomenex
Flujo de la fase móvil	1.0 mL/min
Fase móvil	Acetonitrilo (67 %)
(pH aparente 5.7)	Amortiguador de fosfatos 0.05 M (33 %)
Volumen de inyección	30 µL
Muestra a inyectar :	Acetonitrilo
	Blanco de plasma de rata y
	Pool de plasma de rata con los siguientes analitos:
	X µg/mL de Naproxeno SR
	Y µg/mL de Naproxol SR
	Z µg/mL de Naproxenato de naproxenilo

X, Y, Z, son las concentraciones de trabajo de los estándares para cada determinación

3.3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

3.3.1 Evaluación de la Adecuabilidad

Para evaluar el equipo cromatográfico, se prepararon seis muestras a una concentración de 25 µg/mL de Naproxol, se hizo el tratamiento de la muestra (apéndice E) y luego se inyectaron. La respuesta a evaluar fue el área (mUA*s) Los parámetros estadísticos que se obtuvieron fueron: la media, la desviación estándar y el porcentaje de coeficiente de variación (C.V.); este último debe ser < al 2 %.

3.3.2 Validación del Sistema

3.3.2.1 Linealidad y precisión del sistema

Para determinar la linealidad del sistema, se prepararon concentraciones de (50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 y 0.78 µg/mL) de la mezcla de los estándares de Nx, NxOH y NxNx disueltos en fase móvil (ver apéndice D.7) a partir de una solución stock de 500 µg/ml de la mezcla de estándares: Nx, NxOH y NxNx (ver apéndice D.3), se lleva a cabo el tratamiento de las muestras (como se muestra en el apéndice E) y se inyectan por duplicado. El criterio de aceptación es el coeficiente de regresión (r) debe ser mayor a 0.99 y el error debido a la regresión (Sx/y) < al 2 %.

Para obtener la precisión del sistema, se tiene que demostrar que el C.V. del factor de respuesta (FR) es < al 2 %.

$$\text{Donde el FR} = \frac{\text{respuesta en area (mUA*s)}}{\text{Concentración(µg/mL)}} = \frac{\text{mUA*s mL}}{\mu\text{g}}$$

3.3.3 Validación del método.

Se llevo a cabo la comprobación del cumplimiento de los siguientes parámetros:

3.3.3.1 Recuperación absoluta

Se prepararon por triplicado las concentraciones alta, media y baja (30, 15 y 3.0 µg/mL, respectivamente) de la mezcla de analitos en plasma de rata y por triplicado a las mismas concentraciones en fase móvil. A cada muestra en plasma o en fase móvil, se hizo

el tratamiento de la muestra como se muestra en el apéndice E y se inyectaron de manera individual.

Con el promedio de las respuestas obtenidas en cada nivel de concentración para las muestras en plasma de rata, se compararon con el promedio de las respuestas obtenidas a cada nivel de concentración para las muestras en fase móvil, y se calculó el porcentaje de recobro en las muestras plasmáticas. El criterio de aceptación, la razón no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible a cada nivel de concentración.

3.3.3.2 Especificidad

Para esta prueba se prepararon cinco blancos de plasma de rata y se administró a una rata macho de 200 g una dosis de 5 mg de Naproxenato de naproxenilo disuelto en 2 mL de agua por vía oral y se hizo toma de muestra sanguínea a las 2 y 4 horas. Se hizo el tratamiento de las muestras como se describe en el apéndice E y se inyectaron para comparar las posibles interferencias que existen a los tiempos de retención en que salen los analitos.

También se prepararon tres blancos de plasmas de rata y dos blancos de plasma humano y cinco muestras añadidas con los tres analitos a una concentración de 25 µg/ml, para comparar si las señales fueron debidas a los analitos o a otros componentes endógenos del plasma. El criterio de aceptación es que no deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.

3.3.3.3 Límite de detección y de cuantificación

El límite de cuantificación se determino utilizando el método de relación señal - ruido.

Para la **identificación**, se prepararon seis muestras de blanco de plasma de rata y se hizo el tratamiento descrito en el apéndice E y se inyectaron las muestras, para así conocer la señal de ruido a los intervalos de tiempo ± 1 minuto del tiempo de retención (t_R) para cada analito.

Para la **determinación**, se preparó una curva de calibración con las concentraciones de (5, 4, 3, 2 y 1 $\mu\text{g/mL}$) de la mezcla de analitos en plasma de rata (ver apéndice D8).

Límite de detección (LD) = 3 * señal de ruido (tres veces la señal de ruido)

Límite de cuantificación (LC) = 5* señal de ruido (cinco veces la señal de ruido)

Para la **comprobación** del límite de cuantificación, se preparó por sextuplicado, la concentración estimada como límite de cuantificación, se hizo tratamiento de la muestra (ver apéndice E) y se inyectó individualmente. El criterio de aceptación es si el valor promedio del LC cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un C.V no mayor que 20% .

3.3.3.4 Linealidad del método analítico y rango

Para determinar la linealidad del método se preparó una serie de concentraciones (50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56) y el LC (0.78 $\mu\text{g/mL}$) en una mezcla de los analitos Nx, NxOH y NxNx en plasma de rata (ver apéndice D7). Las muestras se prepararon por triplicado a partir de cada nivel de concentración; se sometieron al tratamiento descrito en el apéndice E y se inyectaron de forma individual.

El criterio de aceptación es que r no debe ser menor a 0.99. Y el C.V. para cada nivel de concentración es $<$ al 15% excepto para el LC que puede ser $<$ al 20% .

3.3.3.5 Precisión

Para evaluar la precisión del método, los experimentos se dividieron en dos partes: la primera fue la repetibilidad, en la que se prepararon por quintuplicado las concentraciones de 30 (alta), 15 (media) y 3.0 (baja) $\mu\text{g/mL}$ de la mezcla de los analitos en plasma de rata, se sometió al tratamiento (descrito en el apéndice E) y se inyectaron las muestras.

La segunda parte fue la reproducibilidad, en la que se prepararon por duplicado las concentraciones de 30 (alta), 15 (media) y 3.0 (baja) $\mu\text{g/mL}$ de la mezcla de los analitos en plasma de rata durante tres días. A cada nivel de concentración se hizo tratamiento de la muestra y se inyectaron de forma individual.

El criterio de aceptación es que el C.V. para cada nivel de concentración sea $<$ al 15% .

3.3.3.6 Exactitud

Los datos obtenidos en la precisión del método, se utilizaron para la determinación de la exactitud del método. El criterio de aceptación es 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 (DEA).

$$DEA = \frac{|\text{valor nominal} - \text{valor obtenido}|}{\text{Valor nominal}} \times 100$$

3.3.3.7 Estabilidad de las muestras

Para determinar la estabilidad del método al tiempo cero, se prepararon las concentraciones de 30 (alta), 15 (media) y 3.0 (baja) $\mu\text{g/mL}$ de la mezcla de los estándares de Nx, NxOH y NxNx en plasma de rata, suficiente para obtener 24 muestras.

Se separaron en tres fracciones y se prepararon por duplicado muestras a cada nivel de concentración para obtener las respuestas al tiempo cero (t_0) y para la estabilidad de la muestra procesada, se volvió a inyectar a las 12, 24, 48 y 72 horas.

La primer fracción se almacenó en congelación (estabilidad a largo plazo) para analizar por duplicado y a cada nivel de concentración cada semana durante un mes. La segunda fracción de cada nivel de concentración, se almacenó a temperatura ambiente y se analizó por duplicado a las 24, 48 y 72 hora (estabilidad a corto plazo).

La tercer fracción se dividió en dos partes, una para almacenar en congelación para realizar tres ciclos de congelación- descongelación y luego analizar. Y la segunda para almacenar en refrigeración haciendo tres ciclos de refrigeración- temperatura ambiente para después analizar.

Cada vez que se realizó el análisis se hizo el tratamiento de la muestra de acuerdo al método descrito en el apéndice E.

IV. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DEL DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

4.1.1 Resultados del diseño 1. Diseño factorial 2² para evaluar el efecto del pH y la polaridad de la fase móvil sobre el tiempo de retención del Naproxeno, Naproxol y Naproxenato de naproxenilo. (ver tabla 14)

Tabla 14. Resultados obtenidos del primer diseño experimental

Experimento	pH	Polaridad (% Amortiguador de fosfatos)	Tiempo de retención (min)		
			Nx	NxOH	NxNx
1	6.0	30	3.11	4.22	10.77
			3.12	4.24	10.78
a	7.0	30	2.77	3.87	10.64
			2.78	3.86	10.43
b	6.0	35	4.47	4.90	12.03
			4.46	4.93	12.16
ab	7.0	35	3.8	4.88	11.93
			3.75	4.89	11.88

4.1.2 Resultados del diseño 2. Diseño factorial 2^2 para evaluar el efecto de la acidez y el flujo de la fase móvil sobre los tiempos de retención de los analitos (ver tabla 15)

Tabla 15. Resultados obtenidos del segundo diseño experimental

Experimento	Tx Mta*	ϕ FM (mL/min)	Tiempo de retención (min)			Resolución	
			Nx	NxOH	NxNx	CE / Nx	NxOH / NxNx
1	Sin H ₃ PO ₄	0.8	3.29	4.91	13.57	2.34	9.3
			3.19	4.91	13.57	2.15	9.38
a	Con H ₃ PO ₄	0.8	3.39	3.93	13.64	1.3	5.15
			3.65	3.93	13.66	1.48	4.84
b	Sin H ₃ PO ₄	1.0	2.54	3.95	10.41	2.72	7.8
			2.58	3.93	10.43	2.91	7.6
ab	Con H ₃ PO ₄	1.0	2.83	3.95	10.97	2.09	5.32
			2.85	3.96	10.95	2.04	5.41

4.1.3 Resultados del diseño 3. Diseño factorial 2^2 para evaluar el efecto del pH de la fase móvil y la concentración (baja y alta) de Nx y NxOH sobre la resolución entre ellos. (ver tabla 16)

Tabla 16. Resultados obtenidos del tercer diseño experimental

Experimento	Coordenadas	Conc Nx (μ g/mL)	Conc NxOH (μ g/mL)	pH Buffer	TR Nx (min)	TR NxOH (min)	Area Nx (mAU*s)	Area NxOH (mAU*s)	Rs
1	(-1,-1)	1.67	1.83	5.55	3.41	4.33	7.26	11.65	2.57
a	(+1,-1)	20	22	5.55	3.33	4.29	219.05	314.82	2.89
b	(-1,+1)	1.67	1.83	5.65	3.48	4.36	8.69	12.9	2.95
ab	(+1,+1)	20	22	5.65	3.37	4.33	218.41	330.77	2.88

Después del tercer diseño experimental, se establecieron las condiciones cromatográficas (ver punto 3.2.5) en el equipo cromatográfico HPLC Agilent Technologies Serie 1200 y se continuó con la etapa de validación.

4.2 RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN

4.2.1 Adecuabilidad

Los resultados obtenidos para conocer como se encuentra el equipo cromatográfico, se muestran a continuación, en la tabla 17.

Tabla 17. Resultados de adecuabilidad para evaluar el sistema cromatográfico.

No. inyección	Respuesta Area (mAU*s)
1	188.417
2	188.667
3	189.321
4	189.094
5	189.094
6	188.928
Promedio	188.920
D.E.	0.216
C.V. (%)	0.11

4.2.2 Resultados de la validación del sistema

A continuación se presentan los resultados para evaluar la linealidad y precisión del sistema, que fue preparado como se describe en el punto 3.3.2.1 de la parte experimental.

4.2.2.1 Determinación de la linealidad y precisión del sistema

Tabla 18. Linealidad de Naproxeno en fase móvil

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas (mAU*s)			Factor Respuesta1	Factor Respuesta2
	Curva 1	Curva 2			
50	440.9140	440.1830		8.8183	8.8037
25	220.0100	220.0150		8.8004	8.8006
12.5	110.5900	110.7500		8.8472	8.8600
6.25	54.3400	55.3800		8.6944	8.8608
3.125	27.0700	26.9340		8.6624	8.6189
1.5625	13.4500	13.5100		8.6080	8.6464
0.78	6.8100	6.7900		8.7308	8.7051
r	0.9999	0.9999	PROMEDIO	8.7373	8.7565
S x/y,r	0.21	0.14	DESV	0.0818	0.0922
			C.V.	0.94	1.05

LINEALIDAD DEL NAPROXENO EN FASE MOVIL

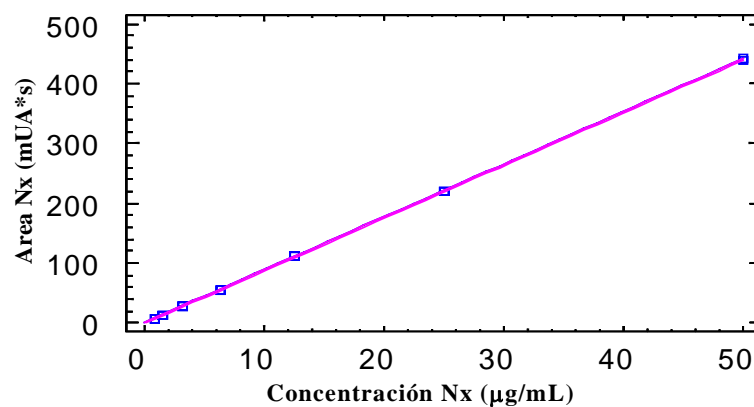


Figura 9. Linealidad de naproxeno en fase móvil

Tabla 19. Linealidad de Naproxol en fase móvil

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Areas (mAU*s)		PROMEDIO	Factor Respuesta1	Factor Respuesta2
	Curva 1	Curva 2			
53	404.8420	404.8500		7.6385	7.6387
26.5	202.1800	202.0800		7.6294	7.6257
13.25	101.0300	101.8700		7.6249	7.6883
6.625	50.4500	50.5900		7.6151	7.6362
3.3125	24.8600	24.8500		7.5049	7.5019
1.65625	12.4230	12.4260		7.5007	7.5025
0.828	6.2400	6.2430		7.5362	7.5399
r	0.9999	0.9999	PROMEDIO	7.5785	7.5904
S x/y,r	0.12	1.85	DESV	0.0573	0.0691
			C.V.	0.76	0.91

LINEALIDAD DE NAPROXOL EN FASE MOVIL

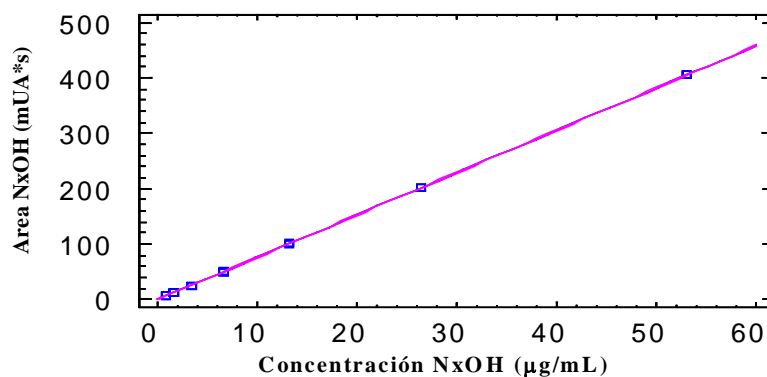


Figura 10. Linealidad de naproxol en fase móvil

Tabla 20 . Linealidad de naproxenato de naproxenilo en fase móvil

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Areas (mAU*s)			Factor Respuesta1	Factor Respuesta2
	Curva 1	Curva 2			
52	366.4000	364.3000		7.0462	7.0058
26	185.3200	182.9600		7.1277	7.0369
13	92.1670	91.9400		7.0898	7.0723
6.5	46.2700	45.7300		7.1185	7.0354
3.25	23.8600	23.8760		7.3415	7.3465
1.625	11.9360	11.8360		7.3452	7.2837
0.8125	5.8500	5.7000		7.2000	7.0154
r	0.9999	0.9999	PROMEDIO	7.1813	7.1137
S x/y,r	0.26	0.21	DESV	0.1110	0.1299
			C.V.	1.55	1.83

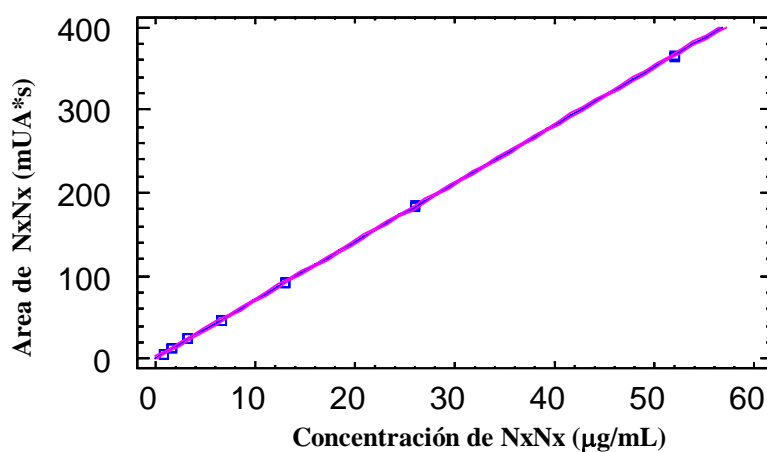
LINEALIDAD DE N_xN_x EN FASE MOVIL

Figura 11 Linealidad de naproxenato de naproxenilo en fase móvil

4.2.3 Resultados de la validación del método

4.2.3.1 Recuperación absoluta

Tabla 21. Recobro absoluto para Naproxeno

Concentración Nx (µg/mL)	TIPO	Respuesta Area (mAU*s)			Promedio	D.E.	C.V. (%)	Recobro Absoluto (%)
		1	2	3				
3.0	FASE MOVIL	26.9	27.7	26.8	27.1333	0.4933	1.82	95.95
	PLASMA	24.8	27.5	25.8	26.0333	1.3650	5.24	
15.0	FASE MOVIL	149.9	144.3	150.0	148.0667	3.2624	2.20	98.74
	PLASMA	145.2	147.1	146.3	146.2000	0.9539	0.65	
30.0	FASE MOVIL	299.3	301.7	304.9	301.9667	2.8095	0.93	95.41
	PLASMA	274.8	288.6	300.9	288.1000	13.0572	4.53	

C.V del % de recobro absoluto = 1.85 %

Tabla 22. Recobro absoluto para Naproxol

Concentración Nx (µg/mL)	TIPO	Respuesta Area (mAU*s)			Promedio	D.E.	C.V. (%)	Recobro Absoluto (%)
		1	2	3				
3.0	FASE MOVIL	28.9	29.1	29.7	29.2333	0.4163	1.42	95.89
	PLASMA	27.3	28	28.8	28.0333	0.7506	2.68	
15.0	FASE MOVIL	134.7	130.1	135.1	133.3000	2.7785	2.08	97.69
	PLASMA	133.3	136.2	121.2	130.2333	7.9563	6.11	
30.0	FASE MOVIL	268.1	269.4	272.1	269.8667	2.0404	0.76	95.92
	PLASMA	268.8	257.2	250.3	258.7667	9.3490	3.61	

C.V del % de recobro absoluto = 1.07 %

Tabla 23. Recobro absoluto para Naproxenato de naproxenilo

Concentración Nx (µg/mL)	TIPO	Respuesta Area (mAU*s)			Promedio	D.E.	C.V. (%)	Recobro Absoluto (%)
		1	2	3				
3.0	FASE MOVIL	20.8	20.9	21.8	21.1667	0.5508	2.60	91.96
	PLASMA	21.4	16.9	20.1	19.4667	2.3159	11.90	
15.0	FASE MOVIL	117.39	113.0	117.2	115.8633	2.4815	2.14	93.01
	PLASMA	112.1	115.2	96.0	107.7667	10.3074	9.56	
30.0	FASE MOVIL	237.9	232.7	239.1	236.5667	3.4020	1.44	97.99
	PLASMA	236.1	231.5	227.9	231.8333	4.1102	1.77	

C.V del % de recobro absoluto = 3.42 %

4.2.3.2 Especificidad

En el apéndice B12 y B14, se muestran los cromatogramas correspondientes a las muestras de plasma de rata recolectadas a las 2 y 4 horas, respectivamente; en el cromatograma B13 aparece la señal de Nx a los 3.48 minutos con 70.4 mUA*s de área. (10 veces mayor con respecto al LC). Y en el cromatograma B14 aparece la señal de Nx con 143.8 mUA*s como respuesta y comienza a aparecer la señal de NxOH con 10.95 mUA*s. Al tiempo cero, las áreas (mUA*s) son de 16.12 y 8.74, para Nx y NxOH, respectivamente.

En el apéndice B6 y B11, también se muestra un ejemplo del cromatograma correspondientes al blanco de plasma de rata y de humano, respectivamente. En el apéndice B10 y B12, se muestran cromatogramas donde únicamente aparecen los picos de los tres analitos en estudio de muestra añadida en plasma de rata y humano, respectivamente. Sin embargo, existe una pequeña interferencia debido a los componentes endógenos del plasma donde sale la señal de Nx, representa el 7.35 % con respecto al LDC. No existe interferencia donde aparece la señal de NxOH y NxNx.

4.2.3.3 Identificación, determinación y comprobación del límite de cuantificación (LC). Las unidades de la señal ruido son mUA*s

Tabla 24. Identificación del límite de cuantificación

Nx		NxOH		NxNx	
Replica	Señal de ruido	Replica	Señal de ruido	Replica	Señal de ruido
1	0.4158	1	0.5959	1	0.173
2	0.4558	2	0.5714	2	0.177
3	0.4760	3	0.6890	3	0.176
4	0.5543	4	0.7828	4	0.162
5	0.4995	5	0.7187	5	0.159
6	0.5106	6	0.8269	6	0.164
Promedio	0.4853	Promedio	0.6975	Promedio	0.1685
D.E.	0.0310	D.E.	0.0674	D.E.	0.0059
C.V. (%)	6.38	C.V. (%)	9.67	C.V. (%)	3.48

Para la determinación del límite de cuantificación, los resultados fueron los siguientes:

Tabla 25. Determinación del límite de cuantificación para Nx

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas (mAU*s)		Media	D.E.	C.V. (%)
	Curva 1	Curva 2			
5	32.41	39.30	35.855	3.445	9.61
4	27.26	31.20	29.230	1.970	6.74
3	19.46	23.10	21.280	1.820	8.55
2	14.00	15.20	14.600	0.600	4.11
1	6.60	7.60	7.100	0.500	7.04
b	0.48	-0.54	-0.029		
m	6.49	7.94	7.214		
r	0.9981	0.9999	0.9990		

Tabla 26 Determinación del límite de cuantificación para NxOH

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Áreas (mAU*s)		Media	D.E.	C.V. (%)
	Curva 1	Curva 2			
5.3	40.06	41.20	40.630	0.570	1.40
4.24	34.50	31.90	33.200	1.300	3.92
3.18	21.94	23.80	22.870	0.930	4.07
2.12	17.50	15.40	16.450	1.050	6.38
1.06	7.70	7.60	7.650	0.050	0.65
b	-0.1760	-1.1300	-0.6530		
m	7.7094	7.8962	7.8028		
r	0.9912	0.9995	0.9954		

Tabla 27 Determinación del límite de cuantificación para NxNx

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Areas (mAU*s)		Media	D.E.	C.V. (%)
	Curva 1	Curva 2			
5.2	36	34.1	35.050	0.950	2.71
4.16	25.7	23.4	24.550	1.150	4.68
3.12	19.2	17.7	18.450	0.750	4.07
2.08	11.2	11.2	11.200	0.000	0.00
1.04	5.7	5.6	5.650	0.050	0.88
b	-2.97	-2.36	-2.6650		
m	7.221153846	6.65384615	6.9375		
r	0.9946	0.9909	0.9928		

Con los datos de pendiente y ordenada al origen de las curvas de calibración, se interpolaron los valores de señal de ruido multiplicado por el factor y se predijo la concentración calculada para cada analito.

4.2.3.3.1 LD y LC para Naproxeno

A partir de la linealidad del Naproxeno en plasma de rata, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\text{área Nx} = -0.029 + 7.214 * \text{Concentración Nx}$$

Haciendo un análisis en un rango de tiempo de 3.4 a 3.6 minutos de la señal de ruido en plasma de rata es igual a 0.4853

Para calcular el límite de detección (LD) se necesita sustituir 3 x señal de ruido en la ecuación de linealidad en plasma de rata y para el límite de cuantificación (LC) se sustituye por 5 x señal de ruido.

Entonces, para el LD en plasma es $3 \times 0.4853 = 1.4559$ y sustituyendo en la ecuación de linealidad en plasma de rata, la concentración obtenida para el LD es de $0.21 \mu\text{g/mL}$ en plasma de rata (ver tabla 28)

Para el LC en plasma de rata es $5 \times 0.4853 = 2.4265$ y sustituyendo en la ecuación, la concentración obtenida para el LC es de $0.34 \mu\text{g/mL}$ en plasma de rata.

Tabla 28. Valores teóricos de LD y LC en plasma de rata para Naproxeno

 0.21 µg/mL LD en Plasma de rata

0.34 µg/mL LC en Plasma de rata

$$LC_{\text{Experimental}} = 0.78 \mu\text{g/mL}$$

4.2.3.3.2 LD y LC para Naproxol

A partir de la linealidad del Naproxol en plasma de rata, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\text{área NxOH} = -0.6530 + 7.8028 * \text{Concentración}$$

Haciendo un análisis en un rango de tiempo de 3.8 a 4.2 minutos de la señal de ruido en plasma de rata es igual a 0.6975.

De la misma forma que con el Nx se obtienen los valores para NxOH (ver tabla 29)

Tabla 29. Valores teóricos de LD y LC en plasma de rata para Naproxol

 0.38 µg/mL LD en plasma de rata

0.53 µg/mL LC en plasma de rata

$$LC_{\text{Experimental}} = 0.82 \mu\text{g/mL}$$

4.2.3.3.3 LD y LC para Naproxenato de naproxenilo

A partir de la linealidad del naproxenato de naproxenilo en plasma de rata, se obtuvo la siguiente ecuación:

$$\text{área NxNx} = -2.6650 + 6.9375 * \text{Concentración}$$

Haciendo un análisis en un rango de tiempo de 10.8 a 11.6 minutos de la señal de ruido en plasma de rata es igual a 0.1685

De la misma forma que con el Nx se obtienen los valores predichos para NxNx (ver tabla 30)

Tabla 30. Valores teóricos de LD y LC en plasma de rata para Naproxenato de naproxenilo

 0.46 LD en plasma de rata

0.51 LC en plasma de rata

$$LC_{\text{Experimental}} = 0.81 \mu\text{g/mL}$$

4.2.3.3.4 Comprobación del límite de cuantificación

Para la comprobación del límite de cuantificación, se prepararon seis muestras con los estándares a la concentración determinada (ver tablas 28, 29 y 30)

Tabla 31. Comprobación del límite de cuantificación

Analito	Nx (mUA*s)	Concentración recuperada (µg/mL)	NxOH (mUA*s)	Concentración recuperada (µg/mL)	NxNx (mUA*s)	Concentración recuperada (µg/mL)
1	5.0301	0.7013	5.5407	0.7938	5.1551	1.1272
2	5.0077	0.6982	5.3865	0.7740	5.5750	1.1877
3	5.1291	0.7150	5.8709	0.8361	5.0028	1.1053
4	5.1970	0.7244	6.0233	0.8556	5.4152	1.1647
5	5.0673	0.7064	5.9955	0.8521	5.4472	1.1693
6	5.5126	0.7682	6.1119	0.8670	5.4479	1.1694
MEDIA	5.1572	0.7189	5.8215	0.8298	5.3405	1.1539
D.E.	0.1873	0.0259	0.2918	0.0374	0.2154	0.0310
C. V. %	3.63	3.61	5.01	4.51	4.03	2.69

4.2.3.4 Evaluación de la linealidad del método

4.2.3.4.1 Naproxeno en plasma de rata

Tabla 32. Resultados obtenidos de la linealidad del método analítico para naproxeno

Concentración (µg/mL)	Areas (mAU*s)			Curva promedio	D.E	C.V (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
50	447.4	450.8	452.5	450.2333	2.4042	0.53
25	232.9	230.6	227.8	230.4333	1.6263	0.71
12.5	117.6	121	122.5	120.3667	2.4042	2.00
6.25	60.6	57.5	62.4	60.1667	2.1920	3.64
3.125	35.3	35.1	36.3	35.5667	0.1414	0.40
1.5625	17.4	16.7	16.6	16.9000	0.4950	2.93
0.78	9.4	8.6	8.8	8.9333	0.5657	6.33
r	0.9998	0.9999	0.9998			
m	8.8942	8.9656	8.9524			
b	5.4486	4.3941	5.5239			
S x/y,r	0.91	0.93	0.96			

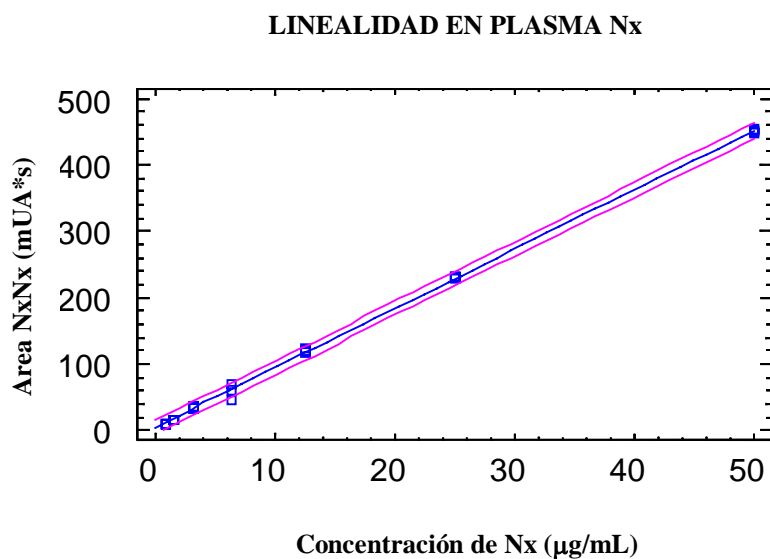


Figura 12. Linealidad del método para naproxeno en plasma de rata

4.2.3.4.2 Naproxol en plasma de rata

Tabla 33. Resultados obtenidos de la linealidad del método analítico para naproxol.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Areas (mAU*s)			Curva promedio	D.E	C.V (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
53	429.44	432.6	434.9	432.3133	2.2345	0.52
26.5	220	231	219.8	223.6000	7.7782	3.48
13.25	119.9	120	108.6	116.1667	0.0707	0.06
6.625	57.9	48.3	43.3	49.8333	6.7882	13.62
3.3125	32.4	31.5	23.8	29.2333	0.6364	2.18
1.65625	16.4	14.6	11.3	14.1000	1.2728	9.03
0.828	7.2	6.3	6.9	6.8000	0.6364	9.36
r	0.9999	0.9999	0.9999			
m	8.0523	8.2251	8.2929			
b	5.1954	2.88	-3.3681			
S x/y,r	1.31	1.83	1.36			

LINEALIDAD EN PLASMA NxOH

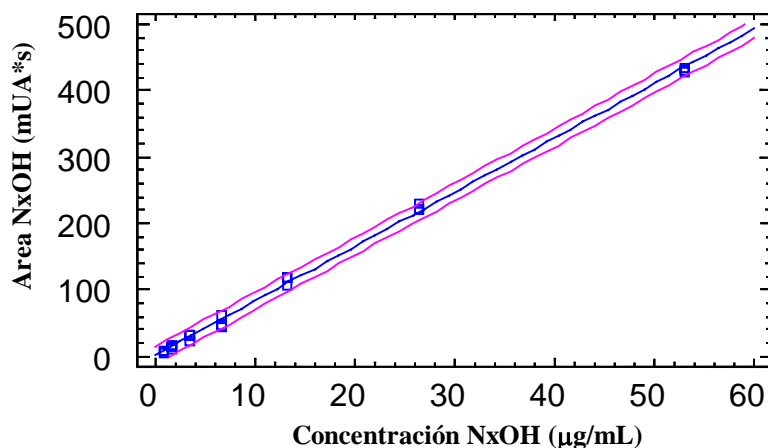


Figura 13. Linealidad del método para naproxol en plasma de rata

4.2.3.4.3 Naproxenato de naproxenilo en plasma de rata

Tabla 34. Resultados obtenidos de la linealidad del método analítico para naproxenato de naproxenilo

Concentración (µg/mL)	Áreas (mAU*s)			Curva promedio	D.E	C.V (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
52	387.7	388.1	388.3	387.9	0.2828	0.07
26	190.6	195.8	194.3	193.2	3.6770	1.90
13	100	100.9	98.2	100.45	0.6364	0.63
6.5	40.5	39.3	42.2	39.9	0.8485	2.13
3.25	20.1	20.9	20.9	20.5	0.5657	2.76
1.625	10	9.6	9.4	9.8	0.2828	2.89
0.8125	5.2	5.1	5.2	5.15	0.0707	1.37
r	0.9999	0.9999	0.9999			
m	7.509	7.547	7.5338			
b	-2.9615	-2.7218	-2.6994			
S x/y,r	1.25	1.46	0.86			

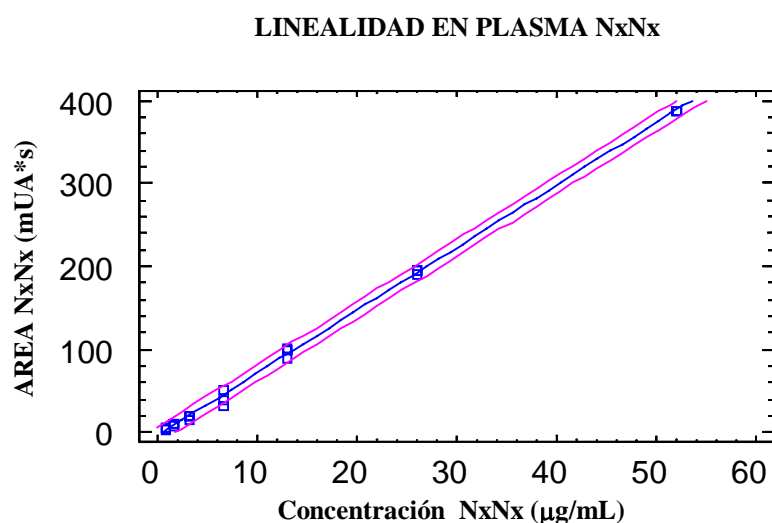


Figura 14. Linealidad del método para naproxenato de naproxenilo en plasma de rata

4.2.3.5 Rango en plasma de rata

Se establece el rango de acuerdo con los resultados que se obtuvieron en la linealidad de los analitos en plasma de rata. Se presenta en la tabla 35.

Tabla 35. Intervalo de concentración encontrado para los analitos en estudio

Analito de estudio	Intervalo (µg/mL)
Naproxeno	0.78 – 50.0
Naproxol	0.83 – 50.0
Naproxenato de naproxenilo	0.82 – 50.0

4.2.3.6 Determinación de la precisión del método analítico

A partir de la determinación de la precisión del método analítico, se reportan las concentraciones de los analitos que se tuvieron al preparar las muestras.

4.2.3.6.1 Evaluación de la repetibilidad

Tablas 36, 37 y 38. Resultados para la evaluación de la repetibilidad, con Nx, NxOH y NxNx a una concentración: baja, media y alta, respectivamente.

Concentración baja de los analitos, en la preparación de las muestras:

Nx = 3.0 µg/mL
NxOH = 3.18 µg/mL
NxNx = 3.12 µg/mL

Tabla 36.

Respuesta	Area (mAU*s)		
Muestra	Nx	NxOH	NxNx
1	30.3	28	19.6
2	31.0	29.1	20.7
3	31.3	29.5	20.4
4	30.8	29.5	20.1
5	30.7	29.8	21.5
Promedio	30.82	29.18	20.46
D.E	0.33	0.63	0.63
C.V	1.07	2.16	3.10

Concentración media de los analitos, en la preparación de las muestras:

Nx = 15.0 µg /mL
NxOH = 15.9 µg /mL
NxNx = 15.6 µg /mL

Tabla 37.

Respuesta	Area (mAU*s)		
Muestra	Nx	NxOH	NxNx
1	153.4	155.3	110.6
2	152.9	154.9	108.4
3	152.0	152.1	109.2
4	150.6	152.4	107.3
5	154.2	153.2	108.1
Promedio	152.62	153.58	108.72
D.E	1.24	1.30	1.12
C.V	0.81	0.85	1.03

Concentración alta de los analitos, en la preparación de las muestras:

N_x = 30.0 µg/mL
N_xOH = 31.8 µg/mL
N_xN_x = 31.2 µg/mL

Tabla 38.

Respuesta	Area (mAU*s)			
	Muestra	N _x	N _x OH	N _x N _x
1		291.3	269.9	227.7
2		295.1	271.9	228.4
3		292.8	270.7	227.4
4		295.1	273.1	231.2
5		294.5	271.9	230.5
Promedio		293.76	271.5	229.04
D.E		1.49	1.10	1.53
C.V		0.51	0.41	0.67

4.2.3.6.2 Evaluación de la reproducibilidad

Resultados obtenidos durante tres días de análisis a tres niveles de concentración de N_x, N_xOH y N_xN_x.

Tabla 39. Resultados de reproducibilidad para Naproxeno

Concentración N _x (µg/mL)	Analista	Replica	Respuesta Area (mAU*s)			Promedio	D.E	C.V. (%)
			Día 1	Día 2	Día 3			
3.0	1	1	27.3	30.3	28.2	27.8242	1.4991	5.39
		2	26.99	30.7	27.4			
	2	1	25.5	28.0	28.4			
		2	26.1	27.3	27.7			
15.0	1	1	156.9	148.8	153.1	150.0833	9.9082	6.60
		2	158.1	152.9	153.6			
	2	1	144.2	142.3	160.4			
		2	141.4	127.3	162.0			
30.0	1	1	284.5	298.5	269.5	287.5667	10.3209	3.59
		2	289.1	277.8	297.7			
	2	1	274.0	288.6	283.6			
		2	302.6	287.9	297.0			

Tabla 40. Resultados de reproducibilidad para Naproxol

Concentración NxOH $\mu\text{g/mL}$	Analista	Replica	Respuesta Area (mAU*s)			Promedio	D.E.	C.V. (%)
			Día 1	Día 2	Día 3			
3.0	1	1	27.7	28.9	27.3	27.4000	1.1362	4.15
		2	28.6	26.7	28.0			
		1	26.3	25.3	28.8			
		2	26.4	26.7	28.1			
15.0	1	1	145.6	153.9	153.7	148.4250	6.5785	4.43
		2	146.4	154.4	144.4			
		1	144.2	150.4	154.7			
		2	148.6	131.9	152.9			
30.0	1	1	271.7	307.6	273.4	283.6417	12.7446	4.49
		2	278.7	285.3	292.9			
		1	259.1	289.6	274.8			
		2	289.2	292.4	289.0			

Tabla 41. Resultados de reproducibilidad para Naproxenato de naproxenilo

Concentración NxNx ($\mu\text{g/mL}$)	Analista	Replica	Respuesta Area (mAU*s)			Promedio	D.E.	C.V. (%)
			Día 1	Día 2	Día 3			
3.0	1	1	19.6	20.8	23.9	21.2250	1.6097	7.58
		2	20	21.1	23.7			
		1	20.1	20.3	22.1			
		2	19.6	20.2	23.3			
15.0	1	1	101.1	120.7	121.8	115.4417	7.1405	6.19
		2	104.5	123.5	120.6			
		1	114.5	122.9	116.2			
		2	114.3	111.8	113.4			
30.0	1	1	252.5	252.2	233.5	246.0500	9.4134	3.83
		2	249.1	252.9	224.6			
		1	244.0	252.5	236.9			
		2	252.6	251.9	249.9			

4.2.3.7 Determinación de la exactitud del método analítico

Los mismos datos obtenidos para la precisión del método analítico son utilizados para poder determinar la exactitud del método analítico, para los tres analitos de estudio a las concentraciones baja, media y alta. Mostrándose estos resultados en las tablas 42 a la 50.

Tabla 42. Resultados de exactitud para Naproxeno a concentración baja

Concentración Nominal (µg/mL)	Respuesta Area (mAU*s)	Concentración obtenida (µg/mL)	% DEA	$\frac{\text{Area (mUA*s)}}{\text{Concentracion obtenida (µg/mL)}}$
3.0	30.3	3.17	-5.83	9.54
3.0	31.0	3.25	-8.36	9.54
3.0	31.3	3.28	-9.44	9.53
3.0	30.8	3.23	-7.64	9.54
3.0	30.7	3.22	-7.27	9.54
3.0	27.3	2.77	7.72	9.86
3.0	26.99	2.73	8.85	9.87
3.0	25.5	2.57	14.29	9.92
3.0	26.1	2.64	12.10	9.90
3.0	30.3	2.88	4.16	10.54
3.0	30.7	2.92	2.74	10.52
3.0	28.0	2.63	12.33	10.65
3.0	27.3	2.56	14.82	10.68
3.0	28.2	2.65	11.62	10.64
3.0	27.4	2.57	14.46	10.68
3.0	28.4	2.67	10.91	10.63
3.0	27.7	2.60	13.40	10.66

Tabla 43. Resultados de exactitud para Naproxeno a concentración media

Concentración Nominal (µg/mL)	Respuesta Area (mAU*s)	Concentración obtenida (µg/mL)	% DEA	$\frac{\text{Area (mUA*s)}}{\text{Concentracion obtenida (µg/mL)}}$
15.0	153.4	16.53	-10.17	9.28
15.0	152.9	16.47	-9.81	9.28
15.0	152.0	16.37	-9.16	9.28
15.0	150.6	16.22	-8.15	9.28
15.0	154.2	16.61	-10.75	9.28
15.0	156.9	16.96	-13.04	9.25
15.0	158.1	17.09	-13.91	9.25
15.0	144.2	15.57	-3.77	9.26
15.0	141.4	15.26	-1.73	9.27
15.0	148.8	15.51	-3.39	9.59
15.0	152.9	15.95	-6.30	9.59
15.0	142.3	14.82	1.23	9.60
15.0	127.3	13.22	11.89	9.63
15.0	153.1	15.97	-6.45	9.59
15.0	153.6	16.02	-6.80	9.59
15.0	160.4	16.75	-11.63	9.58
15.0	162.0	16.92	-12.77	9.58

Tabla 44. Resultados de exactitud para Naproxeno a concentración alta

Concentración Nominal (µg/mL)	Respuesta Area (mAU*s)	Concentración obtenida (µg/mL)	% DEA	Area (mUA*s) Concentracion obtenida (µg/mL)
30.0	291.3	31.48	-4.94	9.25
30.0	295.1	31.90	-6.32	9.25
30.0	292.8	31.65	-5.49	9.25
30.0	295.1	31.90	-6.32	9.25
30.0	294.5	31.83	-6.10	9.25
30.0	284.5	30.92	-3.08	9.20
30.0	289.1	31.43	-4.76	9.20
30.0	274.0	29.77	0.75	9.20
30.0	302.6	32.91	-9.68	9.20
30.0	298.5	31.47	-4.89	9.49
30.0	277.8	29.26	2.46	9.49
30.0	288.6	30.41	-1.38	9.49
30.0	287.9	30.34	-1.13	9.49
30.0	269.5	28.38	5.41	9.50
30.0	297.7	31.38	-4.61	9.49
30.0	283.6	29.88	0.40	9.49
30.0	297.0	31.31	-4.36	9.49

Tabla 45. Resultados de exactitud para Naproxol a concentración baja

Concentración Nominal (µg/mL)	Respuesta Area (mAU*s)	Concentración obtenida (µg/mL)	% DEA	Area (mUA*s) Concentracion obtenida (µg/mL)
3.18	28	2.67	15.91	10.47
3.18	29.1	2.81	11.74	10.37
3.18	29.5	2.86	10.22	10.33
3.18	29.5	2.86	10.22	10.33
3.18	29.8	2.89	9.08	10.31
3.18	27.7	2.88	9.29	9.60
3.18	28.6	2.99	5.85	9.55
3.18	26.3	2.71	14.63	9.69
3.18	26.4	2.73	14.25	9.68
3.18	28.9	3.16	0.48	9.13
3.18	26.7	2.90	8.80	9.21
3.18	25.3	2.73	14.09	9.26
3.18	26.7	2.90	8.80	9.21
3.18	27.3	2.97	6.53	9.18
3.18	28.0	3.06	3.88	9.16
3.18	28.8	3.15	0.86	9.14
3.18	28.1	3.07	3.51	9.16

Tabla 46. Resultados de exactitud para Naproxol a concentración media

Concentración Nominal (µg/mL)	Respuesta Area (mAU*s)	Concentración obtenida (µg/mL)	% DEA	Area (mUA*s) Concentracion obtenida (µg/mL)
15.9	155.3	18.05	-13.51	8.60
15.9	154.9	18.00	-13.21	8.61
15.9	152.1	17.66	-11.08	8.61
15.9	152.4	17.70	-11.31	8.61
15.9	153.2	17.79	-11.92	8.61
15.9	145.6	17.19	-8.13	8.47
15.9	146.4	17.29	-8.74	8.47
15.9	144.2	17.02	-7.06	8.47
15.9	148.6	17.56	-10.42	8.46
15.9	153.9	18.19	-14.39	8.46
15.9	154.4	18.25	-14.77	8.46
15.9	150.4	17.77	-11.75	8.46
15.9	131.9	15.54	2.24	8.49
15.9	153.7	18.16	-14.24	8.46
15.9	144.4	17.05	-7.21	8.47
15.9	154.7	18.28	-15.00	8.46
15.9	152.9	18.07	-13.64	8.46

Tabla 47. Resultados de exactitud para Naproxol a concentración alta

Concentración Nominal (µg/mL)	Respuesta Area (mAU*s)	Concentración obtenida (µg/mL)	% DEA	Area (mUA*s) Concentracion obtenida (µg/mL)
31.8	269.9	31.89	-0.28	8.46
31.8	271.9	32.13	-1.04	8.46
31.8	270.7	31.99	-0.58	8.46
31.8	273.1	32.28	-1.49	8.46
31.8	271.9	32.13	-1.04	8.46
31.8	271.7	32.50	-2.19	8.36
31.8	278.7	33.35	-4.86	8.36
31.8	259.1	30.97	2.62	8.37
31.8	289.2	34.62	-8.87	8.35
31.8	306.6	36.54	-14.91	8.39
31.8	285.3	33.98	-6.86	8.40
31.8	289.6	34.50	-8.49	8.39
31.8	292.4	34.84	-9.55	8.39
31.8	273.4	32.55	-2.36	8.40
31.8	292.9	34.90	-9.73	8.39
31.8	274.8	32.72	-2.89	8.40
31.8	289.0	34.43	-8.26	8.39

Tabla 48. Resultados de exactitud para Naproxenato de naproxenilo a concentración baja

Concentración Nominal (µg/mL)	Respuesta Area (mAU*s)	Concentración obtenida (µg/mL)	% DEA	Area (mUA*s)
				Concentracion obtenida (µg/mL)
3.12	19.6	3.23	-3.38	6.08
3.12	20.7	3.37	-8.06	6.14
3.12	20.4	3.33	-6.78	6.12
3.12	20.1	3.29	-5.51	6.11
3.12	21.5	3.48	-11.46	6.18
3.12	19.6	3.52	-12.73	5.57
3.12	20	3.57	-14.50	5.60
3.12	20.1	3.59	-14.94	5.60
3.12	19.6	3.52	-12.73	5.57
3.12	20.8	3.54	-13.34	5.88
3.12	21.1	3.58	-14.68	5.90
3.12	20.3	3.47	-11.11	5.86
3.12	20.2	3.45	-10.66	5.85
3.12	23.9	3.28	-5.05	7.29
3.12	23.7	3.25	-4.25	7.29
3.12	22.1	3.05	2.20	7.24
3.12	23.3	3.20	-2.64	7.28

Tabla 49. Resultados de exactitud para Naproxenato de naproxenilo a concentración media

Concentración Nominal (µg/mL)	Respuesta Area (mAU*s)	Concentración obtenida (µg/mL)	% DEA	Area (mUA*s)
				Concentracion obtenida (µg/mL)
15.6	110.6	15.29	1.96	7.23
15.6	108.4	15.00	3.83	7.23
15.6	109.2	15.11	3.15	7.23
15.6	107.3	14.86	4.76	7.22
15.6	108.1	14.96	4.08	7.22
15.6	101.1	14.76	5.39	6.85
15.6	104.5	15.23	2.39	6.86
15.6	114.5	16.61	-6.45	6.89
15.6	114.3	16.58	-6.28	6.89
15.6	120.7	17.45	-11.86	6.92
15.6	123.5	17.84	-14.36	6.92
15.6	122.9	17.76	-13.82	6.92
15.6	111.8	16.21	-3.91	6.90
15.6	121.8	17.60	-12.84	6.92
15.6	120.6	17.44	-11.77	6.92
15.6	116.2	16.82	-7.84	6.91
15.6	113.4	16.43	-5.34	6.90

Tabla 50. Resultados de exactitud para Naproxenato de naproxenilo a concentración alta

Concentración Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta Area (mAU^*s)	Concentración obtenida ($\mu\text{g/mL}$)	% DEA	Area (mUA^*s)
				Concentracion obtenida ($\mu\text{g/mL}$)
31.2	227.7	30.82	1.20	7.39
31.2	228.4	30.92	0.90	7.39
31.2	227.4	30.79	1.33	7.39
31.2	231.2	31.29	-0.29	7.39
31.2	230.5	31.20	0.01	7.39
31.2	252.5	35.64	-14.24	7.08
31.2	249.1	35.17	-12.73	7.08
31.2	244.0	34.47	-10.48	7.08
31.2	252.6	35.66	-14.28	7.08
31.2	252.2	35.76	-14.63	7.05
31.2	252.9	35.86	-14.94	7.05
31.2	252.5	35.81	-14.76	7.05
31.2	251.9	35.72	-14.50	7.05
31.2	233.5	33.16	-6.28	7.04
31.2	224.6	31.92	-2.31	7.04
31.2	236.9	33.63	-7.80	7.04
31.2	249.9	35.44	-13.60	7.05

4.2.3.8 Estudios de estabilidad del método analítico para NxNx

A continuación se presentan los resultados de la estabilidad de la muestra procesada para NxNx, a tres niveles de concentración, alto, medio y bajo, que corresponde al periodo de tiempo de 0 a 72 horas. Únicamente se realizó la evaluación de la estabilidad para NxNx porque es el profármaco de interés. Y no es necesario realizarlo para el Nx y NxOH, pues estos son productos del metabolismo del NxNx.

4.2.3.8.1 Estabilidad a corto plazo

a) Evaluación de condiciones de la muestra procesada (tabla 51)

Tabla 51: Muestra procesada de Naproxenato de naproxenilo

Nivel de Concentración	TIEMPO (Horas)	Concentración Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta Area (mAU*s)	Concentración obtenida ($\mu\text{g/mL}$)	% DEA	
ALTO	CERO	31.2	252.8	35.40	-13.45	
		31.2	252.5	35.36	-13.32	
	12	31.2	253.8	35.70	-14.42	
		31.2	253.1	35.60	-14.11	
	24	31.2	257.7	34.16	-9.49	
		31.2	255.4	33.85	-8.50	
	48	31.2	265.9	34.08	-9.24	
		31.2	275.9	35.35	-13.32	
	72	31.2	292.9	33.47	-7.29	
		31.2	319.4	36.47	-16.88	
	MEDIO	CERO	15.6	121.2	17.12	-9.74
			15.6	121.5	17.16	-10.01
12		15.6	119.1	17.10	-9.59	
		15.6	119.5	17.15	-9.94	
24		15.6	132.5	17.44	-11.82	
		15.6	124.5	16.38	-4.98	
48		15.6	138.3	17.87	-14.55	
		15.6	131.6	17.02	-9.10	
72		15.6	144.2	16.67	-6.87	
		15.6	144.2	16.67	-6.87	
BAJO		CERO	3.12	21.3	3.24	-3.99
			3.12	20.2	3.09	0.91
	12	3.12	17.57	3.07	1.54	
		3.12	16.6	2.94	5.84	
	24	3.12	23.1	2.84	9.02	
		3.12	23.1	2.84	9.02	
	48	3.12	24.6	3.42	-9.72	
		3.12	22.8	3.19	-2.38	
	72	3.1	26.8	3.41	-9.16	
		3.1	27.2	3.45	-10.60	

Los siguientes resultados corresponden a la estabilidad de las muestras almacenadas a temperatura ambiente.

b) Evaluación de condiciones de almacenaje a temperatura ambiente (tabla 52)

Tabla 52: Muestra almacenada a temperatura ambiente (22°C) de Naproxenato de naproxenilo a tres niveles de concentración: Alta, media y baja, respectivamente.

Nivel de Concentración	TIEMPO (Horas)	Concentración Nominal (µg/mL)	Respuesta Area (mAU*s)	Concentración obtenida (µg/mL)	% DEA	
ALTO	CERO	31.2	252.8	35.40	-13.45	
		31.2	252.5	35.36	-13.32	
	12	31.2	220.1	31.05	0.49	
		31.2	215.5	30.41	2.53	
	24	31.2	198.7	26.28	15.76	
		31.2	226.3	29.97	3.95	
	48	31.2	227.9	29.26	6.23	
		31.2	216.7	27.83	10.79	
	72	31.2	224.7	25.77	17.41	
		31.2	222.0	25.46	18.39	
	MEDIO	CERO	15.6	121.2	17.12	-9.74
			15.6	121.5	17.16	-10.01
12		15.6	67.8	10.01	35.84	
		15.6	67.1	9.91	36.46	
24		15.6	47.1	6.04	61.26	
		15.6	40.2	5.12	67.17	
48		15.6	19.8	2.81	81.97	
		15.6	18.7	2.67	82.86	
72		15.6	4.5	0.89	94.32	
		15.6	5.1	0.95	93.89	
BAJO		CERO	3.12	21.3	3.24	-3.99
			3.12	20.2	3.09	0.91
	12	3.12	10.9	2.15	31.07	
		3.12	12.9	2.43	22.22	
	24	3.12	2.5	0.09	97.18	
		3.12	2.7	0.11	96.32	

c) Evaluación después de tres ciclos de congelación descongelación (tabla 53)

Tabla 53. Resultados después de tres ciclos de congelación descongelación.

Nivel de Concentración	Condiciones de almacenamiento	TIEMPO (DIAS)	Concentración Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta Area (mAU^*s)	Concentración obtenida ($\mu\text{g/mL}$)	% DEA
ALTO	3 CICLOS DE CONGELACIÓN DESCONGELACIÓN	0	31.2	252.8	35.40	-13.45
			31.2	252.5	35.36	-13.32
		4	31.2	243.8	27.93	10.50
MEDIO	3 CICLOS DE CONGELACIÓN DESCONGELACIÓN	0	15.6	121.2	17.12	-9.74
			15.6	121.5	17.16	-10.01
		4	15.6	111.8	13.01	16.60
			15.6	112.7	13.11	15.95
BAJO	3 CICLOS DE CONGELACIÓN DESCONGELACIÓN	0	3.12	25.4	3.55	-13.72
			3.12	24.01	3.36	-7.85
		4	3.12	8.6	1.35	56.76
			3.12	7.2	1.19	61.83

d) Estabilidad de la muestra de naproxenato de naproxenilo disuelto en fase móvil y bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

Tabla 54. Estabilidad del naproxenato de naproxenilo en fase móvil conservados en diferentes condiciones de almacenamiento

Nivel de Concentración	Condiciones de almacenamiento	TIEMPO (HORAS)	Concentración Nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Respuesta Area (mAU^*s)	Concentración obtenida ($\mu\text{g/mL}$)	% DEA
ALTO	TA	0	31.2	233.1	33.50	-7.37
		24	31.2	231	33.12	-6.17
		48	31.2	237.7	31.52	-1.02
		72	31.2	250.6	32.60	-4.47
	T = - 4°C	0	31.2	233.1	30.91	0.92
		24	31.2	233.7	30.99	0.67
		48	31.2	235.7	31.26	-0.18
		72	31.2	230.1	29.93	4.07
MEDIO	TA	0	15.6	112.7	16.35	-4.79
		24	15.6	112.2	16.20	-3.85
		48	15.6	116.5	15.55	0.32
		72	15.6	120.3	15.65	-0.33
	T = - 4°C	0	15.6	112.7	15.05	3.53
		24	15.6	112.4	15.01	3.78
		48	15.6	116.5	15.55	0.32
		72	15.6	117.6	15.30	1.92
BAJO	TA	0	3.12	22.3	3.47	-11.22
		24	3.12	21.8	3.32	-6.52
		48	3.12	20.8	2.94	5.70
		72	3.12	22.9	2.99	4.30
	T = - 4°C	0	3.12	22.3	3.47	-11.22
		24	3.12	22.9	3.22	-3.16
		48	3.12	24.9	3.48	-11.61
		72	3.12	23.5	3.06	1.80

4.2.3.8.2 Estabilidad a largo plazo

Finalmente, se presentan los resultados que corresponden a la estabilidad a largo plazo de las muestra de naproxenato de naproxenilo almacenada en congelación a una temperatura de - 20 ° C, y analizada cada semana durante un mes.

Tabla 55. Estabilidad a largo plazo para naproxenato de naproxenilo almacenado a – 20 ° C

Nivel de Concentración	TIEMPO (SEMANAS)	Concentración Nominal (µg/mL)	Respuesta Area (mAU*s)	Concentración obtenida (µg/mL)	% DEA	
ALTO	0	31.2	252.8	35.40	-13.45	
		31.2	252.5	35.36	-13.32	
	1	31.2	236.7	31.12	0.27	
		31.2	236.3	31.06	0.43	
	2	31.2	235.7	30.61	1.90	
		31.2	235.9	30.63	1.82	
	3	31.2	232.4	28.48	8.72	
		31.2	245.2	30.08	3.59	
	4	31.2	230.7	27.35	12.35	
		31.2	230.2	27.29	12.54	
	MEDIO	0	15.6	121.2	17.12	-9.74
			15.6	121.5	17.16	-10.01
1		15.6	115.3	15.43	1.08	
		15.6	115.1	15.41	1.25	
2		15.6	115.2	14.73	5.58	
		15.6	113.5	14.51	7.01	
3		15.6	112.9	13.54	13.19	
		15.6	112.4	13.48	13.59	
4		15.6	101.8	11.95	23.41	
		15.6	105.6	12.40	20.50	
BAJO		0	3.12	25.4	3.55	-13.72
			3.12	24.01	3.36	-7.85
	1	3.12	19.9	3.11	0.45	
		3.12	19.1	3.00	3.76	
	2	3.12	18.4	2.87	7.94	
		3.12	18.7	2.91	6.68	
	3	3.12	17.3	2.48	20.43	
		3.12	17.3	2.48	20.43	
	4	3.12	16.6	2.20	29.54	
		3.12	16.4	2.17	30.31	

V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 DISCUSIÓN DE RESULTADOS DEL DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

5.1.1 Discusión de resultados del diseño 1. Diseño factorial 2² para evaluar el efecto del pH y la polaridad de la fase móvil sobre el tiempo de retención del Naproxeno, Naproxol y Naproxenato de naproxenilo.

Gráfico de Efectos principales para Tiempo de retención Nx

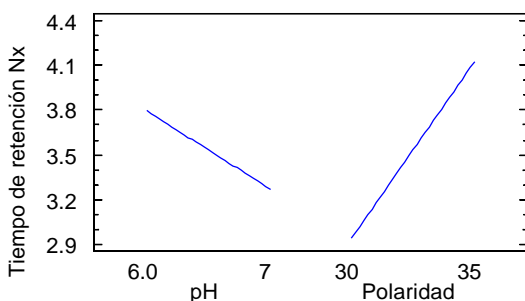


Figura 15. Efecto del pH y la polaridad sobre el t_R de Nx

Gráfico de Efectos principales para Tiempo de retención NxOH

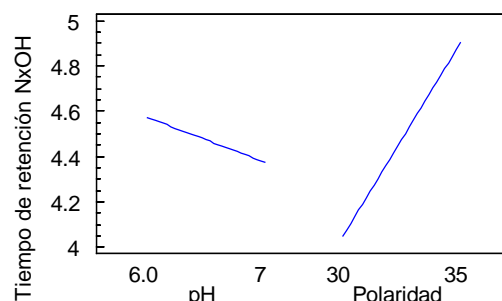


Figura 16. Efecto del pH y la polaridad sobre el t_R de NxOH

Gráfico de Efectos principales para Tiempo de retención NxNx

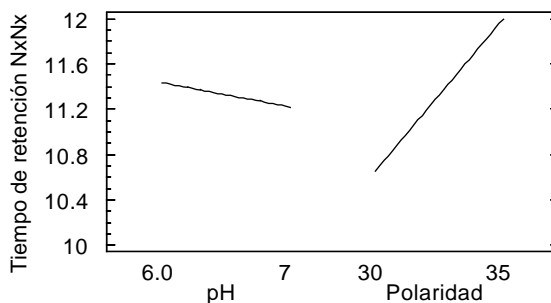


Figura 17. Efecto del pH y la polaridad sobre el t_R de NxNx

Las figuras 15,16 y 17 representan el comportamiento de los resultados de la tabla 14, correspondientes al primer diseño experimental. Se observa que la influencia del pH (6 – 7) tiene un efecto negativo y la polaridad (30-35%) tiene un efecto positivo sobre el tiempo de retención de los tres analitos; es decir, al aumentar el pH, disminuye el tiempo de retención; en cambio, al aumentar la polaridad, aumenta el tiempo de retención de los analitos.

Para ambos factores, los efectos son mayores para el Naproxeno en comparación con el Naproxol y el naproxenato de naproxenilo.

Debido a que el Naproxeno a un pH bajo se encuentra en su forma no ionizada (carácter no polar); por lo tanto, se retiene mas; y al aumentar el pH pasa a su forma ionizada (carácter polar); entonces se retiene menos.

Al aumentar la polaridad de la fase móvil, los analitos tardan en salir en mayor tiempo, porque tienen mayor afinidad por la fase estacionaria. El efecto de los factores, se puede apreciar mejor en la figura 18.

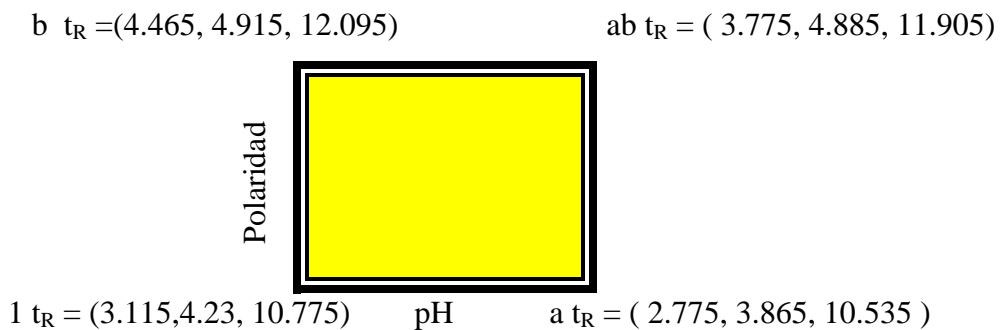


Figura 18. Grafica de superficie del primer diseño Experimental

Modelo matemático para obtener el tiempo de retención de Naproxeno:

Tiempo de retención $N_x = -15.545 + 1.76 \cdot \text{pH} + 0.69 \cdot \text{Polaridad} - 0.07 \cdot \text{pH} \cdot \text{Polaridad}$

Análisis de la Varianza para Tiempo de retención N_x

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:pH	0.53045	1	0.53045	1326.13	0.0000
B:Polaridad	2.76125	1	2.76125	6903.13	0.0000
AB	0.06125	1	0.06125	153.13	0.0011
Error Total	0.0012	3	0.0004		
Total (corr.)	3.35435	7			

Modelo matemático para obtener el tiempo de retención de Naproxol:

Tiempo de retención $N_{xOH} = 14.37 - 2.375 \cdot \text{pH} - 0.265 \cdot \text{Polaridad} + 0.067 \cdot \text{pH} \cdot \text{Polaridad}$

Análisis de la Varianza para Tiempo de retención NxOH

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:pH	0.0780125	1	0.0780125	534.94	0.0002
B:Polaridad	1.45351	1	1.45351	9966.94	0.0000
AB	0.0561125	1	0.0561125	384.77	0.0003
Error Total	0.0004375	3	0.000145833		
Total (corr.)	1.58839	7			

Modelo matemático para obtener el tiempo de retención de Naproxenato de naproxenilo:

$$\text{Tiempo de retención NxNx} = 6.095 - 0.54 \cdot \text{pH} + 0.204 \cdot \text{Polaridad} + 0.01 \cdot \text{pH} \cdot \text{Polaridad}$$

Análisis de la Varianza para Tiempo de retención NxNx

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:pH	0.09245	1	0.09245	9.24	0.0558
B:Polaridad	3.61805	1	3.61805	361.80	0.0003
AB	0.00125	1	0.00125	0.12	0.7471
Error Total	0.03	3	0.01		
Total (corr.)	3.74355	7			

Los resultados de la prueba de F que se muestran en las tablas de análisis de varianza para Nx, NxOH y NxNx (para el primer diseño de experimentos), indican que el efecto de los factores (pH y polaridad de la fase móvil), así como la interacción es estadísticamente significativo con un 95 % de significancia; lo cual corrobora con lo mencionado.

5.1.2 Discusión de resultados del diseño 2. Diseño factorial 2² para evaluar el efecto de la acidez y el flujo de la fase móvil sobre los tiempos de retención de los analitos

Efecto de los factores sobre el Tiempo de retencion N

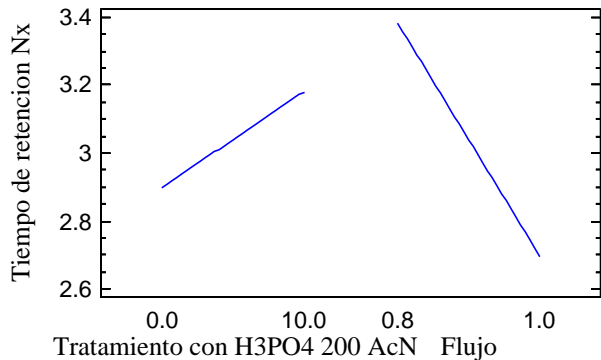


Figura 19. Efecto de la acidez y el flujo sobre el t_r de Nx

Efecto de los factores sobre el Tiempo de retencion NxOH

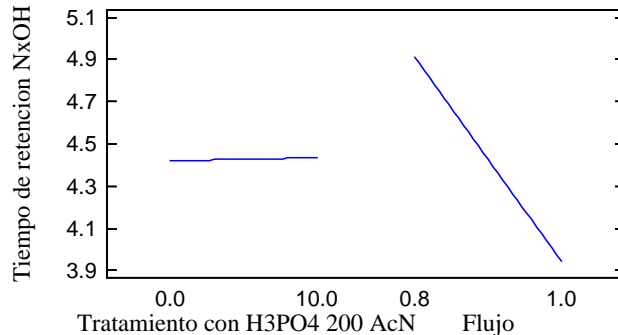


Figura 20. Efecto de la acidez y el flujo sobre el t_r de NxOH

Efecto de los factores sobre el Tiempo de retencion NxNx

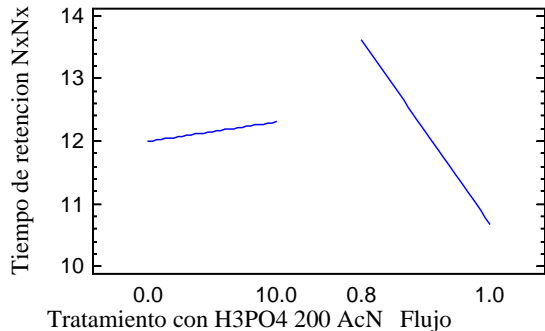


Figura 21. Efecto de la acidez y el flujo sobre el t_r de NxNx

Efecto de los factores sobre la Resolucion CE Nx

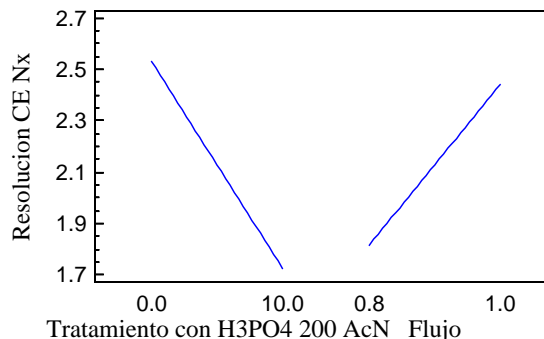


Figura 22. Efecto de la acidez y el flujo sobre la R de CE y Nx

Efecto de los factores sobre la Resolucion entre Nx y NxOH

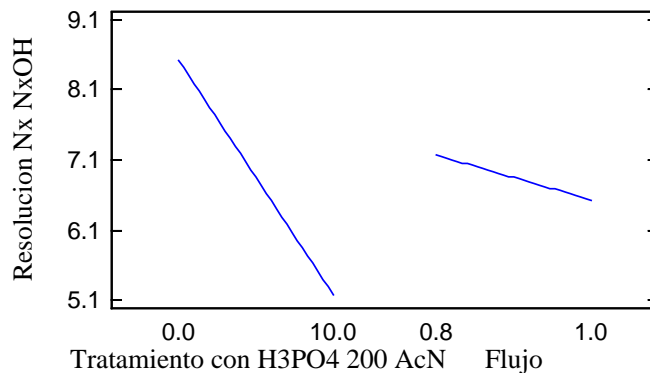


Figura 23. Efecto de la acidez y el flujo sobre la R de Nx y NxOH

Las figuras 19, 20 y 21 representan el comportamiento de los datos de la tabla 15, donde el efecto de la acidez (0 – 10 µl en 200 µl de AcN) es positivo sobre el tiempo de retención del Nx y NxNx, pero prácticamente no tiene efecto sobre el t_R del NxOH. El flujo (0.8 – 1.0 ml/min) tiene un efecto negativo sobre el tiempo de retención de los analitos.

En cambio, en la figura 22 y 23 se observa que la acidez tiene un efecto negativo sobre la resolución entre las señales de CE/Nx y Nx/NxOH. El flujo tiene un efecto positivo sobre la resolución entre las señales de CE/Nx, pero negativo sobre Nx/NxOH.

En la figura 24 se puede observar mejor este comportamiento.

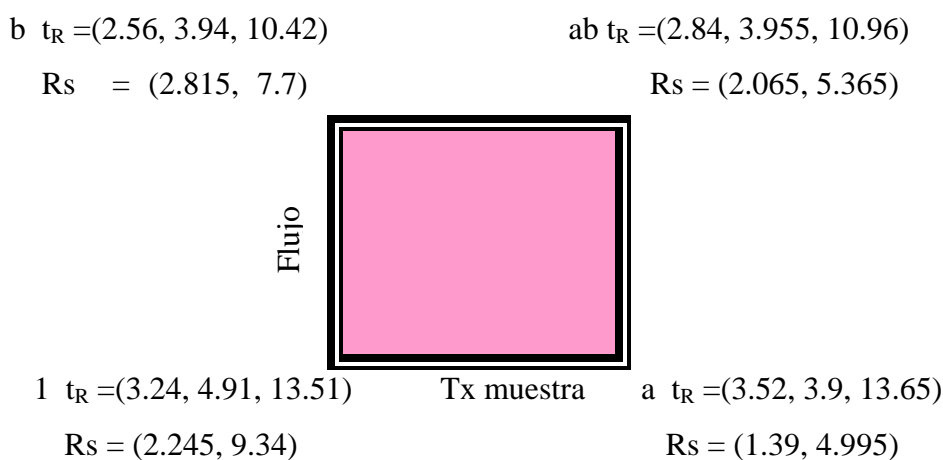


Figura 24. Grafica de superficie del segundo diseño experimental

Modelo matemático para obtener el tiempo de retención de Naproxeno:

Tiempo de retención Nx = 5.96 + 0.028*Tratamiento con H3PO4 200 AcN - 3.4*Flujo + 0.0*Tratamiento con H3PO4 200 AcN*Flujo

Análisis de varianza para el Tiempo de retención Nx

Fuente	Suma de cuadrados	g.l	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:Tratamiento con H3PO4	0.1568	1	0.1568	13.16	0.0361
B:Flujo	0.9248	1	0.9248	77.61	0.0031
AB	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
Total error	0.03575	3	0.0119167		
Total (corr.)	1.1214	7			

Modelo matemático para obtener el tiempo de retención de Naproxol:

Tiempo de retención NxOH = 8.83 - 0.0075*Tratamiento con H3PO4 200 AcN - 4.9*Flujo + 0.01*Tratamiento con H3PO4 200 AcN*Flujo

Análisis de varianza para Tiempo de retención NxOH

Fuente	Suma de cuadrados	g.l	Cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:Tratamiento con H3PO4	0.00045	1	0.00045	27.00	0.0138
B:Flujo	1.8818	1	1.8818	112908.00	0.0000
AB	0.0002	1	0.0002	12.00	0.0405
Total error	0.00005	3	0.0000166667		
Total (corr.)	1.88255	7			

Modelo matemático para obtener el tiempo de retención de Naproxenato de naproxenilo:

Tiempo de retención NxNx = 26.17 - 0.176*Tratamiento con H3PO4 200 AcN - 15.75*Flujo + 0.23*Tratamiento con H3PO4 200 AcN*Flujo

Análisis de varianza para Tiempo de retención NxNx

Fuente	Suma de cuadrados	g.l	cuadrado medio	F-Ratio	P-Valor
A:Tratamiento con H3PO4	0.1922	1	0.1922	1048.36	0.0001
B:Flujo	17.0528	1	17.0528	93015.27	0.0000
AB	0.1058	1	0.1058	577.09	0.0002
Total error	0.00055	3	0.000183333		
Total (corr.)	17.3514	7			

Los resultados de la prueba de F que se muestran en las tablas de análisis de varianza para Nx, NxOH y NxNx (para el segundo diseño de experimentos), indican que el efecto de los factores (tratamiento con H₃PO₄ y flujo de la fase móvil), así como la interacción es estadísticamente significativo con un 95 % de significancia; lo cual ayuda a confirmar con los resultados.

5.1.3 Discusión de resultados diseño 3. Diseño factorial 2² para evaluar el efecto del pH de la fase móvil y la concentración (baja y alta) de Nx y NxOH sobre la resolución entre ellos.

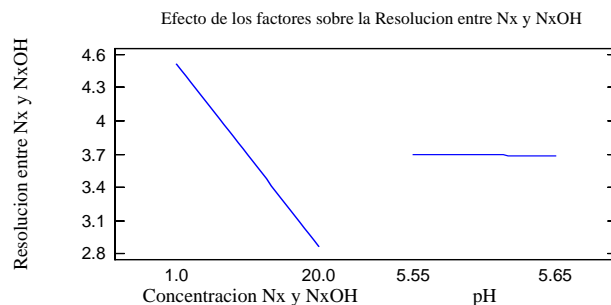


Figura 25. Efecto de la concentración y pH sobre la resolución entre Nx y NxOH

La grafica de la figura 25 representa los resultados del tercer diseño experimental (ver tabla 16). Y el efecto del factor concentración (de 1 a 20 µg/ml) es negativo sobre la resolución que hay entre Nx y NxOH; esto es, al aumentar la concentración de los analitos, la resolución disminuye. Por otro lado, el pH (5.55 – 5.65) tiene un ligero efecto negativo sobre la resolución de los analitos; pero prácticamente es nulo, por lo tanto el método es robusto a cambios pequeños de pH.

Tabla 56 y 57 Resultados obtenidos del efecto del pH en la preparación de la fase móvil sobre las muestras de plasma humano con Nx y NxOH añadido a concentración, baja y alta, respectivamente.

Experimento	Coordenadas	Conc Nx (µg/mL)	Conc NxOH (µg/mL)	pH Buffer	TR Nx (min)	TR NxOH (min)	Area Nx (mAU*s)	Area NxOH (mAU*s)	Altura Nx mAU	Altura NxOH mAU	Rs
1	(-1,-1)	1.67	1.83	5.55	3.41	4.33	7.26	11.65	0.68	1.18	2.57
b	(-1,+1)	1.67	1.83	5.65	3.48	4.36	8.69	12.9	0.82	1.28	2.95
Prom	---	---	---	---	3.445	4.345	7.975	12.275	0.752	1.23	2.76
DE	---	---	---	---	0.049	0.021	1.011	0.884	0.096	0.071	0.269
CV	---	---	---	---	1.437	0.488	12.679	7.201	12.788	5.749	9.736

Experimento	Coordenadas	Conc Nx (µg/mL)	Conc NxOH (µg/mL)	pH Buffer	TR Nx (min)	TR NxOH (min)	Area Nx (mAU*s)	Area NxOH (mAU*s)	Altura Nx mAU	Altura NxOH mAU	Rs
a	(+1,-1)	20	22	5.55	3.33	4.29	219.05	314.82	16.55	24.56	2.89
ab	(+1,+1)	20	22	5.65	3.37	4.33	218.41	330.77	16.96	24.87	2.88
Prom	---	---	---	---	3.35	4.31	218.73	322.795	16.755	24.715	2.885
DE	---	---	---	---	0.028	0.028	0.453	11.278	0.290	0.219	0.007
CV	---	---	---	---	0.84	0.66	0.21	3.49	1.73	0.89	0.25

Modelo matemático para obtener la resolución entre Nx y NxOH:

$$\text{Resolución entre Nx y NxOH} = 11.3216 - 0.646579 * \text{Concentración Nx y NxOH} - 1.2 * \text{pH} + 0.1 * \text{Concentración Nx y NxOH} * \text{pH}$$

Las condiciones cromatográficas con las que se trabajo fueron isocráticas, estas se definen en el punto 3.2.5 de esta tesis (ver pagina 43) y los tiempos de retención de los analitos en plasma de rata y plasma humano, se muestran en la siguiente tabla .

Tabla 58. Tiempos de retención para naproxeno, naproxol y naproxenato de naproxenilo.

Analito de estudio	Tiempo de retención (min)
Naproxeno (Nx)	3.52 ± 0.2
Naproxol (NxOH)	4.27 ± 0.2
Naproxenato de naproxenilo (NxNx)	11.13 ± 0.3

En el apéndice B se pueden ver los cromatogramas correspondientes del método de análisis.

5.2 DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA VALIDACIÓN MÉTODO ANALÍTICO

5.2.1 Adecuabilidad

Como se puede observar en los resultados de la tabla 17, se obtuvo un coeficiente de variación menor al 2 %. El cual indica que el equipo cromatográfico Agilent 1200, se encontraba en buenas condiciones para operar.

5.2.2 Validación del sistema

5.2.2.1 Determinación de la linealidad del sistema

Como se puede observar en las tablas 18, 19 y 20 Existe una relación lineal para los tres analitos en el rango de concentraciones de 0.8 – 50 µg/ml obteniéndose un coeficiente de correlación (r) mayor a 0.99 y un error debido a la regresión ($S_{x/y,x}$) menor al 2 %. Por lo tanto cumple con el criterio de aceptación para Nx, NxOH y NxNx.

5.2.2.2 Determinación de la precisión del sistema

En las tablas 18, 19 y 20, se observa que el coeficiente de variación del factor de respuesta a cada nivel de concentración es menor al 2 %. Esto indica que el sistema es preciso para los tres analitos: Nx, NxOH y NxNx.

5.2.3 Validación del método

5.2.3.1 Recuperación absoluta

Como se puede observar en las tablas 21, 22 y 23, el porcentaje de recobro de: Naproxeno es mayor al 95 %; para NxOH es mayor del 95.0 %; y para el NxNx es mayor de 93.0. Por lo tanto, utilizando este método analítico se obtiene una buena eficiencia para cuantificar los analitos.

5.2.3.2 Especificidad

En el apéndice B13 y B14 que corresponden los cromatogramas de las muestras de rata Wistar administradas con el profármaco y recolectadas a las 2 h y 4 h, se observa la presencia de Nx; sin embargo a las 4 h aparece una señal de NxOH. No hay presencia de otros metabolitos o productos de degradación.

No se observan interferencias que salgan a los tiempos de retención del NxOH y NxNx; por lo tanto, el método analítico es específico para estos dos analitos; sin embargo, a los 3.5 minutos aparece una ligera señal debido a los componentes endógenos del plasma que logra interferir con la señal del Nx.

Aparecen las señales de los analitos en plasma de rata y humano (ver apéndice B10 y B12, respectivamente) y no existen otras señales debido a otros productos o analitos, se puede hablar de que el método analítico es específico para los analitos NxOH y NxNx bajo las condiciones cromatográficas establecidas. Sin embargo, el frente del cromatograma debido a los componentes endógenos del plasma de rata y humano (ver apéndice B6 y B11), deja de salir aproximadamente cuando aparece la señal de Nx, por lo tanto, no es específico para este analito. Con base en lo anterior, se espera que los resultados de la validación en plasma de rata se puedan relacionar con los resultados en muestras de plasma humano (por lo tanto, no se realizaron estos experimentos).

5.2.3.3 Identificación, determinación y comprobación del límite de cuantificación.

En la tabla 24, se muestra el promedio de la señal de ruido para cada analito, este se multiplica por un factor de 5 para establecer el LC teórico.

Las tablas 25, 26 y 27, se utilizaron para determinar el LC para Nx, NxOH y NxNx, respectivamente interpolando el factor multiplicado por el promedio de la señal de ruido para cada analito. Y en las tablas 28, 29 y 30 se presentan los resultados de los límites de detección y cuantificación teóricos en plasma de rata para los analitos: naproxeno, naproxol y naproxenato de naproxenilo, respectivamente. Sin embargo, el equipo Agilent Technologies Serie 1200, bajo las condiciones cromatográficas, únicamente permitió cuantificar con exactitud hasta 0.8 µg/ml para los analitos.

En la tabla 59 se enlistan los resultados obtenidos para LD y LC en plasma de rata para los analitos.

Tabla 59. Limite de detección y cuantificación en plasma de rata para Nx, NxOH y NxNx.

Analito	LD en plasma humano (µg/mL)	LC en plasma humano (µg/mL)
Nx	0.21	0.8
NxOH	0.38	0.82
NxNx	0.46	0.81

Para la determinación de la linealidad del método (muestras en plasma de rata), se incluyen estos valores dentro de la curva de calibración, como lo indica la NOM-177-SSA1-1998.

5.2.3.4 Determinación de la linealidad del método

En las tablas (32, 33 y 34) se muestran los resultados y el análisis de resultados de la regresión lineal de cada analito. Donde existe una relación lineal para los tres analitos en el rango de concentraciones de 0.8 – 50 µg/ml obteniéndose un coeficiente de correlación (r) mayor a 0.99 y un error debido a la regresión (S_{x/y,x}) menor al 2%. Por lo tanto cumple con el criterio de aceptación para Nx, NxOH y NxNx.

5.2.3.5 Rango en plasma de rata

El intervalo de confianza se establece de acuerdo a la linealidad del método analítico y tiene valores que van entre 0.80 y 50 µg / ml para los tres analitos en estudio (ver tabla 35).

5.2.3.6 Determinación de la precisión del método

Como se observa en la sección de los resultados del método para determinar la precisión del método analítico, la evaluación se divide en dos partes:

5.2.3.6.1 Evaluación de la repetibilidad

En las tablas 36, 37 y 38 que corresponden a la evaluación de la repetibilidad para los tres analitos, se puede observar que a una concentración baja, media y alta para cada analito, el

coeficiente de variación es menor al 15 %, cumpliendo con las especificaciones de este parámetro para fluidos biológicos, que en esta tesis es el plasma de rata.

5.2.3.6.2 Evaluación de la reproducibilidad

Así pues durante la evaluación de la reproducibilidad, que se llevo a cabo durante tres días consecutivos de estudio, los resultados presentados en las tablas 39, 40 y 41 .

También se puede observar que a los tres niveles de concentración: bajo, medio y alto para cada analito, el coeficiente de variación es menor al 15 %, por lo tanto cumple con este parámetro para fluidos biológicos.

De acuerdo a los resultados anteriores, de repetibilidad y reproducibilidad, nos indica que el método es preciso, para el rango de concentraciones establecidas.

5.2.3.7 Determinación de la exactitud del método.

En las tablas 42 a la 50 se muestran los resultados obtenidos realizando un tratamiento de las respuestas correspondientes a los tres niveles de concentración y para cada analito en estudio; empezando con Nx, NxOH y NxNx, respectivamente utilizados para determinar la exactitud.

En este punto, se tienen como datos la concentración nominal, la respuesta obtenida. Utilizando los datos de la linealidad del método de cada día de análisis y para cada compuesto en estudio (datos no presentados), se calcula la concentración obtenida, para obtener el % de desviación estándar absoluta (DEA). Se obtienen un % de DEA para cada compuesto valores menores del ± 15 %, esto sugiere que el método es exacto.

Para verificar la exactitud del método analítico se realizó un tratamiento de los datos, y consistió en dividir la respuesta área (mUA*s) entre la concentración obtenida ($\mu\text{g/mL}$), para finalmente obtener: el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de los 51 datos obtenidos de cada analito.

Los resultados de área entre concentración obtenida en las tablas 42, 43 y 44 que corresponden a la concentración baja, media y alta para Nx, indican que el método es exacto para Naproxeno; las tablas 45, 46 y 47 concentración baja, media y alta, respectivamente, indican que el método es exacto para Naproxol.

Finalmente las tablas 48, 49 y 50 concentración baja, media y alta indican que el método es exacto para el naproxenato de naproxenilo ya que el C.V. es menor al $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

5.2.3.8 Estudios de estabilidad del método analítico para cuantificar NxNx

5.2.3.8.1 Estabilidad a corto plazo

a) Evaluación de condiciones de la muestra procesada

En la tabla 51 indica que la muestra procesada y evaluada durante 72 horas para NxNx, tiene un C.V. menor al 15% para cada nivel de concentración: alta, media y baja, respectivamente. Indicando que la estabilidad de la muestra procesada puede analizarse durante 72 horas siendo confiables los resultados que se adquieran con el método.

b) Evaluación de condiciones de almacenaje a temperatura ambiente

En la tabla 52 se observa que la muestra almacenada a temperatura ambiente, se muestra que a concentraciones altas de NxNx puede analizarse sin problemas durante las primeras 48 horas; ya que tiene un C.V. menor al 15%. Sin embargo, para el nivel: medio y bajo, el C.V. es mayor al 15%, después de las 12 horas de análisis. Esto indica que la concentración de inhibidor enzimático, no es suficiente para evitar la degradación del NxNx, cuando las muestras se conservan a temperatura ambiente. Por lo tanto se debe realizar un estudio de concentración óptima de inhibidor enzimático.

c) Evaluación después de tres ciclos de congelación descongelación

En la tabla 53, también se puede observar que a concentraciones altas de NxNx es estable cuando se realiza el análisis de las muestras después de tres ciclos de congelación – descongelación; debido a que el C.V. es menor al 15%. Por lo tanto, la degradación enzimática es mínima. Sin embargo, para los niveles medio y bajo, el C.V es mayor al 15 %, lo cual indica también que la concentración de inhibidor enzimática no es suficiente para evitar la hidrólisis del NxNx.

d) Estabilidad de la muestra de naproxenato de naproxenilo disuelto en fase móvil y bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

Los resultados de la tabla 54 indican que las muestras preparadas en fase móvil y a los tres niveles de concentración: alto, medio y bajo para NxNx, se mantienen estables durante 72 horas, cuando estas se almacenan a temperatura ambiente y a -4°C (refrigeración). Esto amplía más la hipótesis de que la concentración de inhibidor enzimático, no es suficiente para evitar la hidrólisis de el NxNx en el plasma de rata.

5.2.3.8.2 Estabilidad a largo plazo

Los resultados de la tabla 55, indican que las muestras almacenadas en tubos Vacutainer con inhibidor enzimático y conservadas a una temperatura de -20°C y a los tres niveles de concentración: alto, medio y bajo; para NxNx. Se mantienen estables durante 2 semanas porque la concentración de inhibidor enzimático no es suficiente para evitar la hidrólisis del NxNx.

Se sugiere hacer un estudio para conocer la concentración óptima de inhibidor enzimático, para evitar que las esterasas del plasma hidrolicen el naproxenato de naproxenilo.

De acuerdo con los criterios de aceptación para cada uno de los parámetros de validación y los resultados que se obtuvieron para la presente tesis, se puede aprobar que el método analítico puede ser utilizado para estudios posteriores de farmacocinética del profármaco en ratas; y estos podrán correlacionarse con estudios farmacodinámicos para este profármaco. Sin embargo, se debe hacer una investigación más a fondo sobre la concentración de inhibidor que hay que añadir (Evitar la hidrólisis del naproxenato de naproxenilo), para los estudios de farmacocinética y farmacodinamia, que están fuera de alcance de la presente tesis.

VI. CONCLUSIONES

Se desarrollaron y optimizaron las condiciones analíticas para la cuantificación de Naproxeno, naproxol y naproxenato de naproxenilo en plasma humano aplicando el manejo de diseño de experimentos.

El primer diseño de experimentos me demostró que el pH tiene mayor influencia sobre los tiempos de retención de los compuestos polares que sobre los compuestos no polares, disminuyendo sus tiempos de retención. También me demostró que la polaridad de la fase móvil influye incrementando los tiempos de retención de compuestos polares y no polares. Me sirvió para establecer el pH y polaridad de la fase móvil.

El segundo diseño de experimentos me demostró que la acidez durante el tratamiento de la muestra influye más sobre analitos polares, incrementando su tiempo de retención y disminuyendo la resolución. Y el flujo tiene gran influencia disminuyendo los tiempos de retención para compuestos polares y no polares. Me sirvió para establecer el flujo de la fase móvil.

El tercer diseño de experimentos me demostró que la concentración influye mucho sobre la resolución de los compuestos, disminuyéndola. También que pequeños cambios en el pH de la fase móvil no influye significativamente sobre la resolución de los analitos.

El método analítico puede optimizarse haciendo uso de herramientas como es el diseño de experimentos. Y se aplicó para llevar a cabo la validación en plasma de rata.

La evidencia documentada para los parámetros de validación del método analítico cumplen con las especificaciones que se reportan en la sección 9.1 de la NOM-177-SSAI-1998. Por lo tanto el método analítico es preciso, exacto y lineal bajo las condiciones cromatográficas establecidas.

La cuantificación de los tres analitos en estudio (Nx, NxOH y NxNx) se lleva a cabo en 13 minutos mediante el presente método. Se pueden cuantificar al mismo tiempo el naproxeno, naproxol y naproxenato de naproxenilo cuando se encuentran en fase móvil de acetonitrilo- amortiguador de fosfatos (67:33) pH aparente de 5.7; en plasma de rata con el método de análisis cromatográfico desarrollado y validado en el presente trabajo.

APÉNDICES

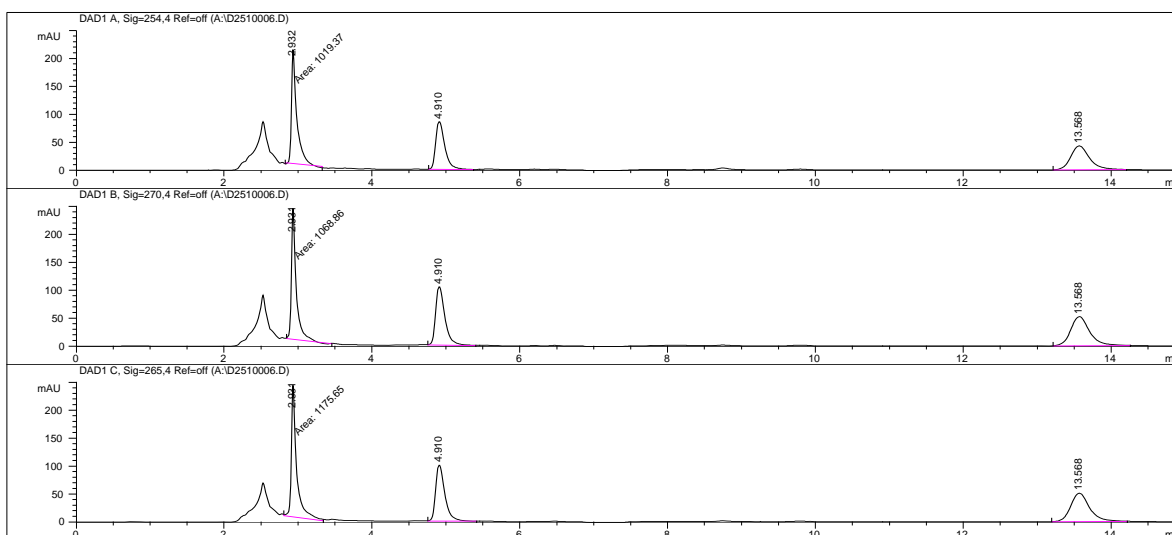
DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO:

APÉNDICE A. Cromatogramas del segundo diseño experimental en el tratamiento de las muestras.

Ver los resultados de la tabla 15 en la página 49

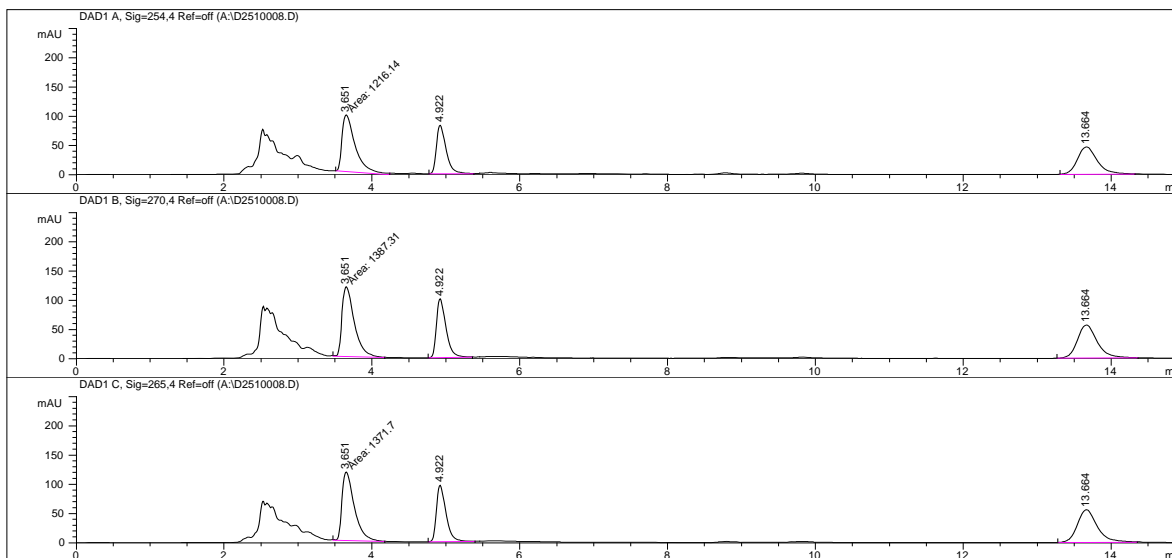
Cromatograma A1. Con 0.8 mL/min de flujo de la fase móvil

Experimento 1: Tratamiento de la muestra sin 10 µL de H₃PO₄ en 200 µL de AcN



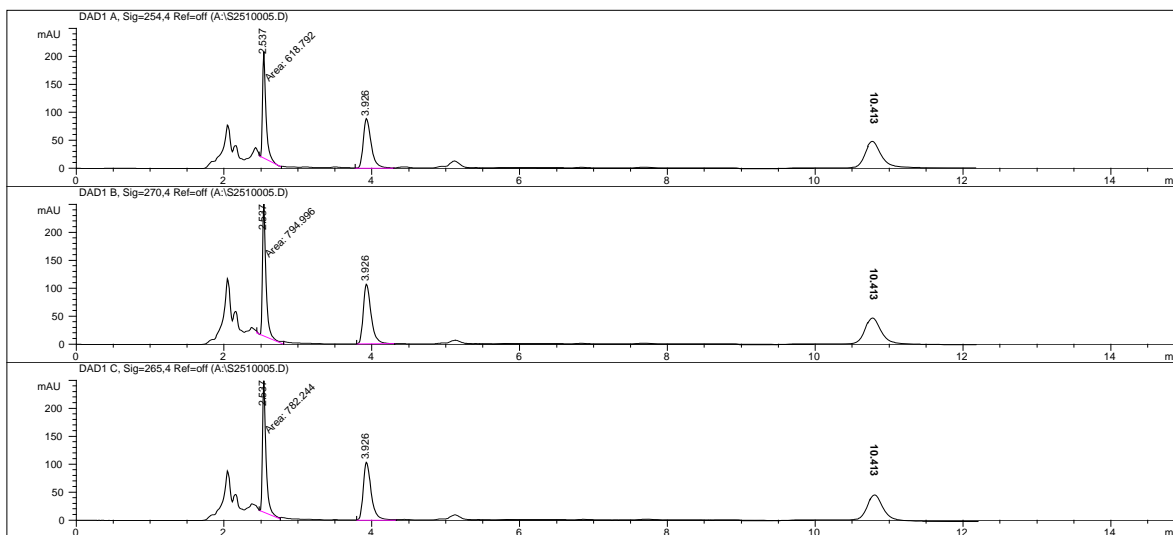
Cromatograma A2. Con 0.8 mL/min de flujo de la fase móvil

Experimento a: Tratamiento de la muestra con 10 µL de H₃PO₄ en 200 µL de AcN



Cromatograma A3. Con 1.0 mL/min de flujo de la fase móvil

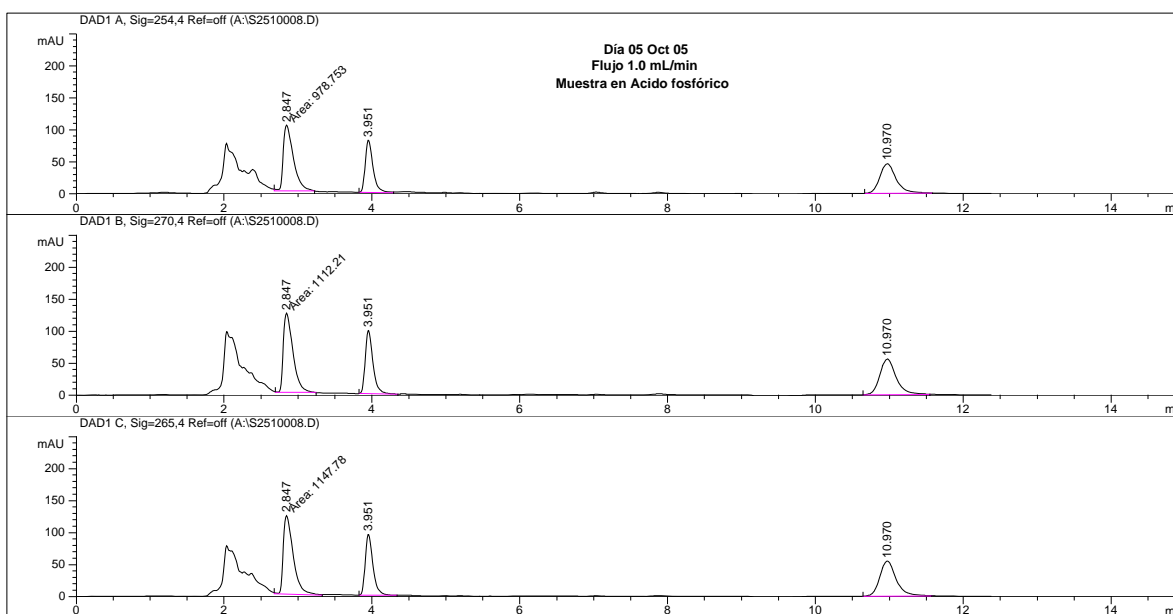
Experimento b: Tratamiento de la muestra sin 10 µl de H₃PO₄ en 200 µL de AcN



Cromatograma A4. Con 1.0 mL/min de flujo de la fase móvil

Experimento ab: Tratamiento de la muestra con 10 µl de H₃PO₄ en 200 µL de AcN

70 % de Acetonitrilo en la fase móvil y 30 % pH del amortiguador de fosfatos pH = 7.0

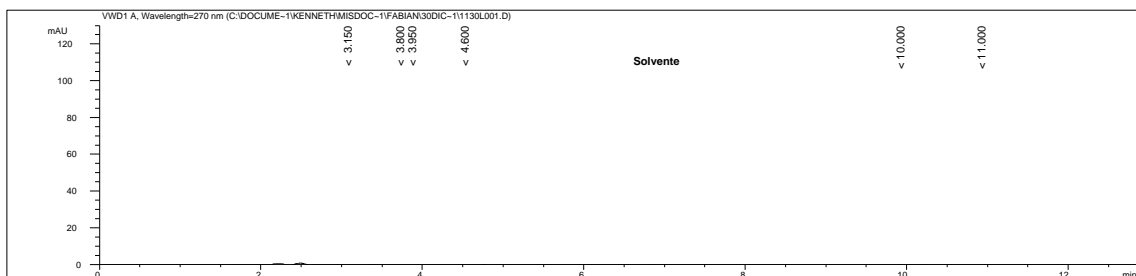


APÉNDICE B. Cromatogramas del método analítico

A continuación se presentan los cromatogramas obtenidos con las condiciones finales desarrolladas (ver página 43)

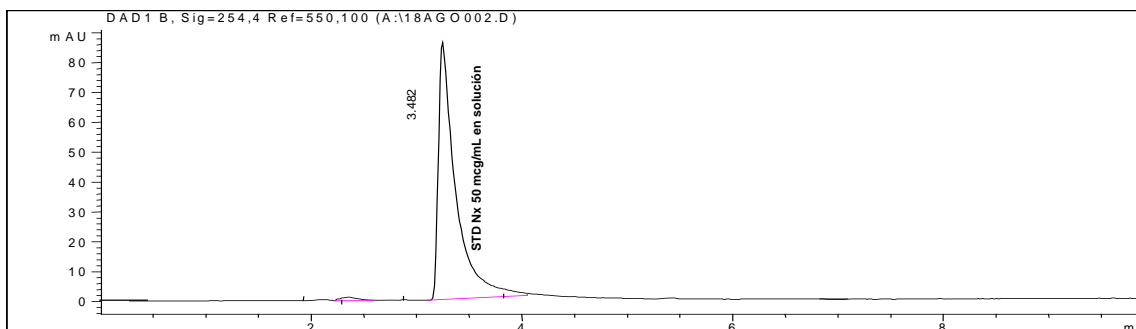
Cromatograma B1.

Solvente (acetonitrilo)



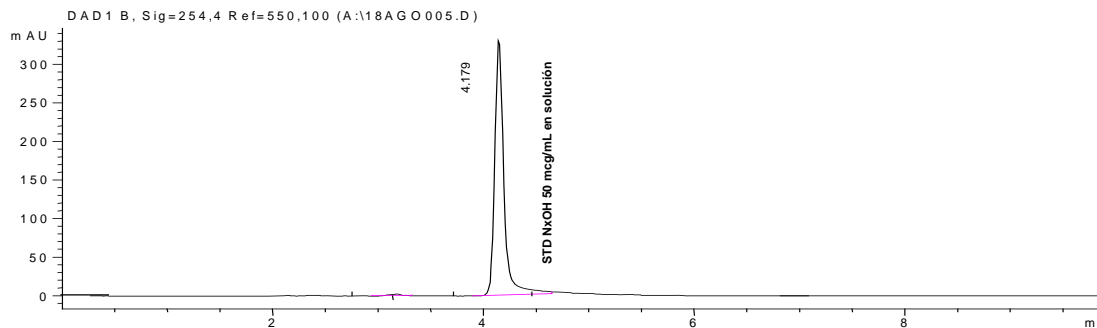
Cromatograma B2.

Estándar de Naproxeno en fase móvil a 50 µg/mL de concentración



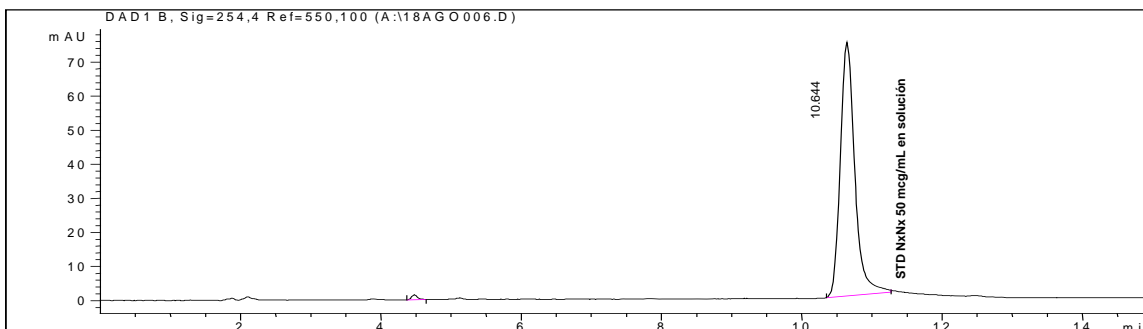
Cromatograma B3.

Estándar de Naproxol en fase móvil a 50 µg/mL de concentración



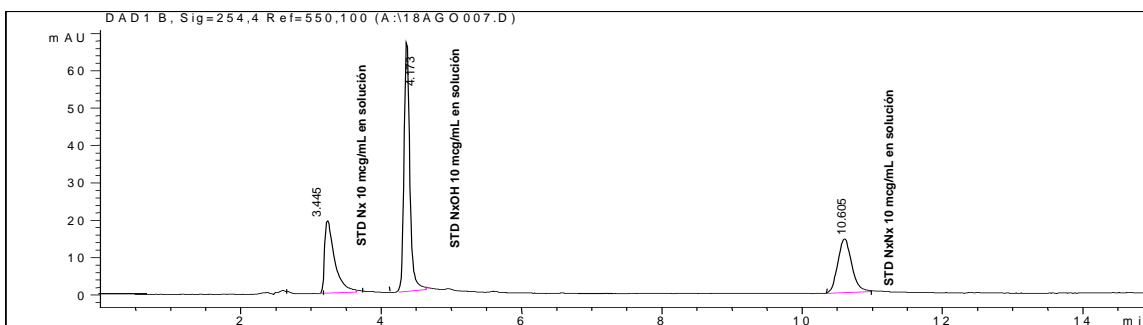
Cromatograma B4.

Estándar de Naproxenato de naproxenilo en fase móvil a 50 µg/mL de concentración



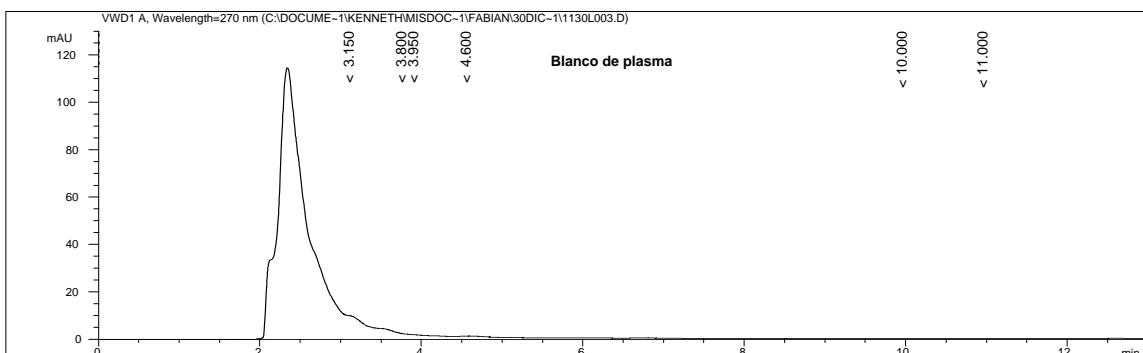
Cromatograma B5.

Mezcla de estándares en fase móvil a 10 µg/mL de concentración



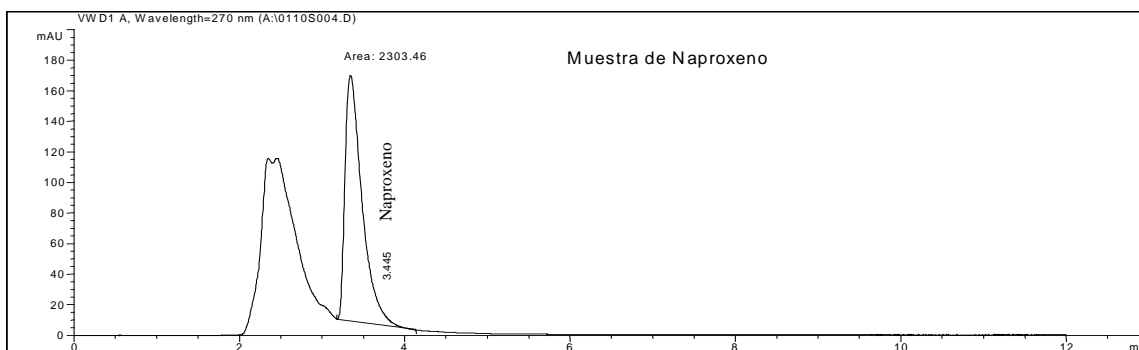
Cromatograma B6.

Blanco de plasma de rata



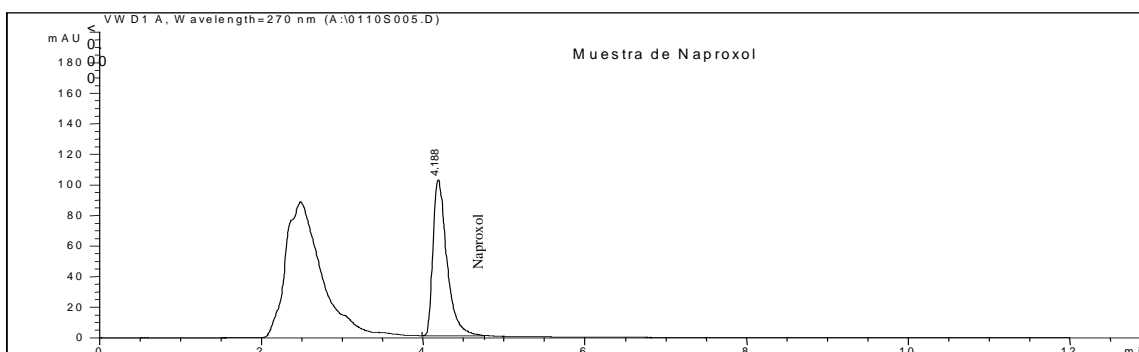
Cromatograma B7.

Muestra añadida con Naproxeno a 120 µg/mL de concentración



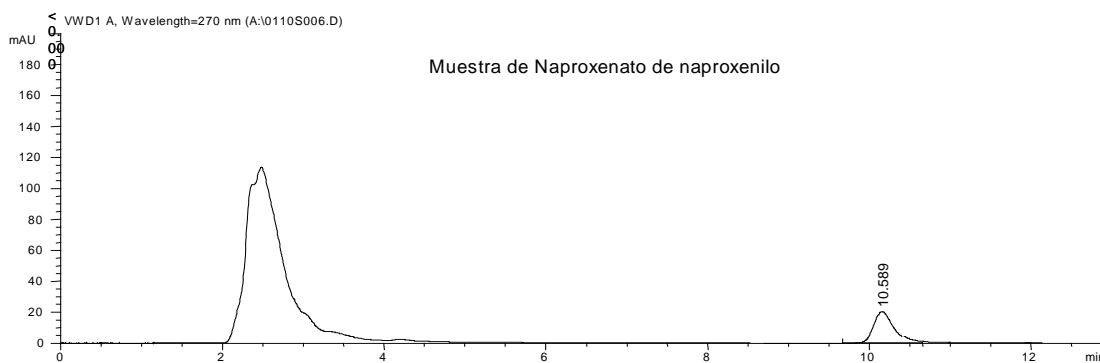
Cromatograma B8.

Muestra añadida con Naproxol a 120 µg/mL de concentración



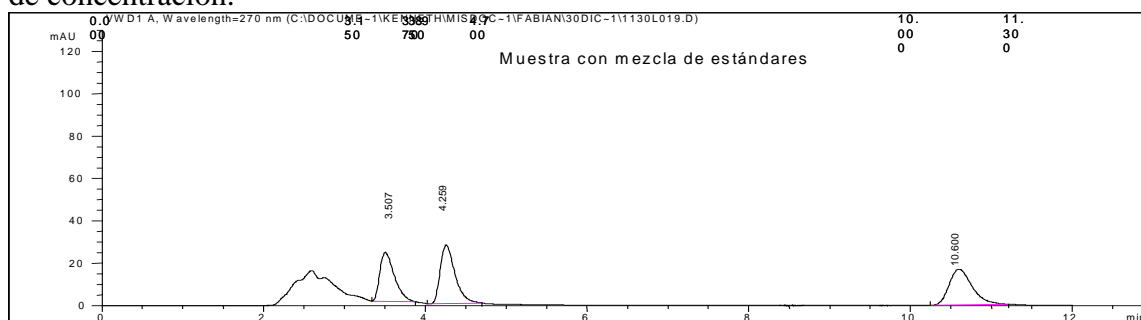
Cromatograma B9.

Muestra añadida con Naproxenato de naproxenilo a 120 µg/mL de concentración



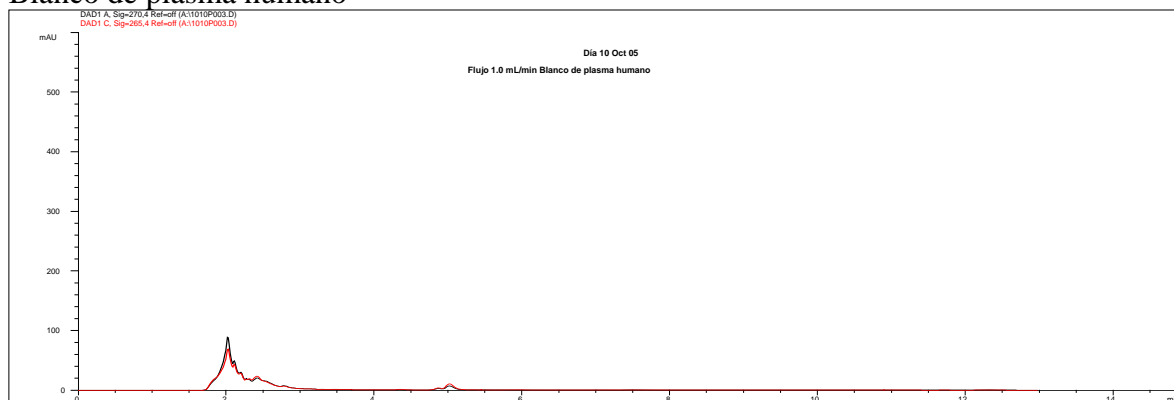
Cromatograma B10.

Plasma de rata añadido con Naproxeno, naproxol y naproxenato de naproxenilo a 25 µg/mL de concentración.



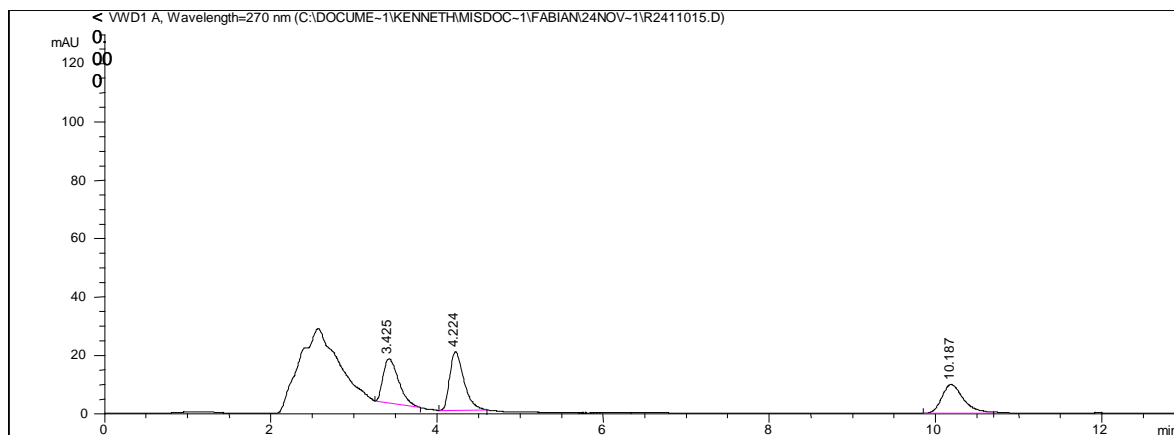
Cromatograma B11.

Blanco de plasma humano



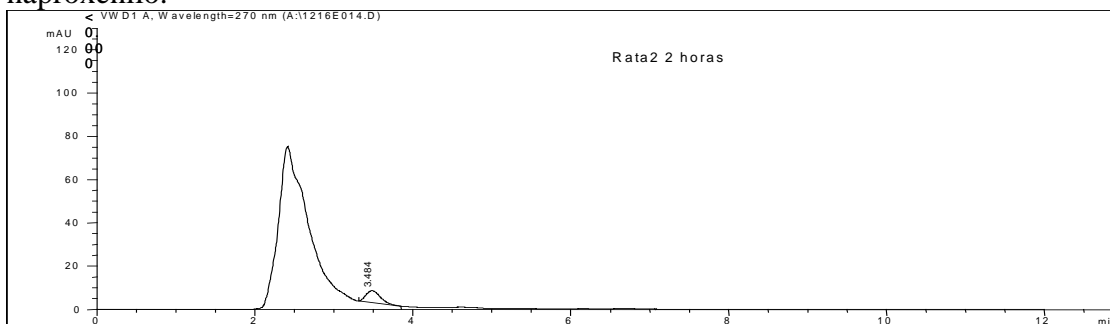
Cromatograma B12.

Plasma humano añadido con Naproxeno, naproxol y naproxenato de naproxenilo a 25 µg/mL de concentración.

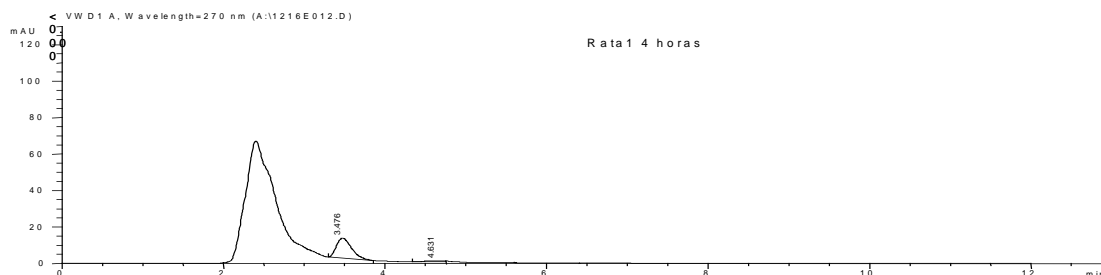


Cromatograma B13.

Muestra de plasma de rata recolectada a las 2 horas de administrado el naproxenato de naproxenilo.

**Cromatograma B14.**

Muestra de plasma de rata recolectada a las 4 horas de administrado el naproxenato de naproxenilo.

**APÉNDICE C. MATERIAL****C.1 Equipo**

- **Balanza Sartorius s/n**
- **Congelador horizontal con puerta sólida:** Marca Nieto Modelo CPA25
- **Cromatógrafos:**

HPLC I: Hewlett Packard Serie 1050 Modelo: 79852A X Bomba: Modelo 79852A X 3117601833. Detector: Arreglo de diodos Syntex 000337

HPLCII: Hewlett Packard Serie 1090 No Serie 2719G01851

HPLC Agilent Serie:1200**Módulos:**

- Detector de arreglo de diodos(DAD SL) G1315C No. Serie DE55055207
 - Compartimiento de la columna (TCC5L) G1316B No. serie DE60555226
 - Inyector (HIP-ALS SL) G1367C No. serie DE60555130
 - Termostato (FC/ ALS Therm) G1330B No. serie DE60555489
 - Bomba binaria (Bin Pump SL) G1312B No. serie DE60555169
 - Desgasificador (Degasser) G1379B No. serie JP60800437
-
- **Desionizador (Sistema Mill-Q)** Marca Millipore No serie: 0251

 - **Microcentrifuga refrigerada** Marca ThermoIEC Modelo: Micromax R.F No serie: 35920733

 - **Parrilla de agitación** Marca: Thermolyne Modelo Nuova II SP18425 No. Serie 306921129120

 - **potenciómetro** Marca: Termo Orion Modelo 410 No serie 058090

 - **Refrigerador** Marca Mabe Modelo Spaceline

 - **Sonicador** Marca Branson 52100R-DTH

 - **Vórtex** Marca Thermolyne Tipo 37600 Modelo: M37615 No Serie 376

C.2 Instrumentos:

- **Embudo de filtración rápida** Marca Pall Gelman Sciences

- **Membranas de Nylon** Marca Millipore Tipo GVHP 0.22 μm ; GV 0.22 μm (universales) y GS 0.22 μm (agua)

- **Micropipeta de 0.1 a 1.0 mL** Marca Brand No serie 0276501

C.3 Estándares

- Naproxeno (Nx) Estándar de trabajo Lote. 0000000819 Pureza 99.0 %
Rev 25/08/99
- Naproxol (NxOH) Estándar de trabajo Kc-34 ETN-005 (Donado por el Dr. Mario González de la Parra)
- Naproxenato de naproxenilo (NxNx) Estándar de trabajo 05/04/05 (Sintetizado por Dr. Mario González de la Parra)

Todos los estándares pertenecen al laboratorio de Biofarmacia 112 –113, Edificio E, Facultad de Química.

C.4 Reactivos

- **Acetonitrilo** Mallinckrodt ChomAR HPLC, CAS 75-05-8 99.9 % Lote: 2856B18D54 Rev 250803
- **Ácido clorhídrico concentrado** J.T. Baker 9535-05 CAS 7647-01-0 36.5 – 38.0 %
Rev 160703
- **Ácido fosfórico H₃PO₄** J.T Baker 0260-62 85.0 % P.M. 97,99 RLA-006
- **Fosfato de potasio monobásico (Cristales)** J.T. Baker 3246-01 CAS 7778-77-0
99.8 % Rev. 041202
- **Fosfato de potasio dibásico (Polvo)** J.T. Baker 3252-05 CAS 7758-11-4 99.3 %
Rev. 018002
- **Hidróxido de sodio (Perlas)** J.T. Baker 3722-01 CAS 1310-73-2 99.1 % Rev.
010796

C.5 Columnas (ver tabla 60):

Tabla 60. Columnas utilizadas durante el desarrollo y la validación del método analítico.

Columna	Spherisorb S5 C8	SphereClone 5U C8
Marca	Waters	SphereClone
Dimensiones	4.6 x 250 mm	4.6 x 250 mm
Tamaño de partícula	5 µm, esférica	5 µm, esférica
No. Serie	0108182391 H10	300162-5

APÉNDICE D. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:**D.1 Soluciones:**Hidróxido de sodio 1N.

Pesar 4.0 g de perlas de hidróxido de sodio en una nave de vidrio y disolver poco a poco en un vaso de precipitados de 250 mL que contenga aproximadamente 50 mL de agua destilada. Agitar muy bien con la ayuda de un agitador magnético en una parrilla de agitación. Transferir esta solución a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar al aforo con agua destilada o desmineralizada. Mezclar homogéneamente.

Ácido clorhídrico 1N.

Colocar un poco de agua destilada o desmineralizada (aproximadamente 30 mL) en un matraz volumétrico de 100 mL. Adicionar poco a poco una alícuota de 8 mL de ácido clorhídrico concentrado, agitando suavemente el matraz ya que se calienta esta solución. Llevar al aforo con agua destilada o desmineralizada y mezclar homogéneamente.

Acetonitrilo ácido (10µl ácido fosfórico/200 µl ACN)

En un tubo de ensayo, añadir 100 µl de ácido fosfórico concentrado. Adicionar 10 mL de Acetonitrilo. Mezclar con vótex durante 1 minutos hasta homogenizar.

D.2 Amortiguador :Amortiguador de fosfatos 0.05 M a pH= 6.0, pH= 5.4, pH= 5.5, pH = 5.6

Pesar 1.5300 g de fosfato de potasio monobásico en una nave de vidrio e incorporar con un poco de agua desmineralizada HPLC a un matraz volumétrico de 250 mL. Agitar con movimiento rotatorio el matraz hasta disolver completamente. Pesar 0.2500 g de fosfato de potasio dibásico trihidratado en una nave de vidrio e incorporar al matraz volumétrico anterior con la ayuda de agua desmineralizada HPLC y agitar hasta incorporar completamente. Si es necesario ajustar pH a 6.0 (ó pH = 5.4, o pH = 5.5, o pH= 5.6 con Hidróxido de sodio 1N o HCl 1N Llevar a volumen con agua desmineralizada HPLC y mezclar homogéneamente.

D.3 Stock:

Naproxenato de naproxenilo ó naproxeno ó naproxol de 500 µg/mL ó mezcla * (10 mL)

Pesar exactamente 0.0050g de estándar (ya sea naproxenato de naproxenilo ó naproxeno ó naproxol) utilizando una nave de vidrio. Incorporar el estándar a un matraz volumétrico de 10 mL, ayudando a pasar con acetonitrilo. Llevar al aforo con acetonitrilo y mezclar homogéneamente.

D.4 Estándares :

Naproxenato de naproxenilo ó naproxeno ó naproxol ó mezcla* de 50 µg/mL (10 mL)

En un matraz volumétrico de 10 mL adicionar 1 mL de la solución stock según sea el caso, con una pipeta volumétrica de 1 mL. Llevar al aforo con acetonitrilo

*Para estas soluciones se incorporan los tres estándares en el mismo matraz.

D.5 Fase móvil:

Acetonitrilo- amortiguador de fosfatos pH 5.0 (70:30) pH aparente = 6.0 (300 mL)

Medir 210 mL de acetonitrilo con una probeta de 500 mL y vaciar a un vaso de precipitados de 500 mL que contenga un agitador magnético. Medir 90 mL de Buffer de fosfatos pH 5.0 con una probeta de plástico de 100 mL y vaciar al vaso de precipitados que contiene el acetonitrilo. Agitar suavemente, utilizando una parilla de agitación.

Con la ayuda de un potenciómetro, medir el pH de la solución anterior y de ser necesario ajustar el pH a 6.0 con unas gotas de la solución de ácido clorhídrico 1N o hidróxido de sodio 1N. Filtrar la solución a través de un embudo de filtración rápida al vacío, que contenga una membrana de Nylon de 0.22 micras (µm) adecuada para solventes orgánicos y contenerla en un matraz de Kitasato. Desgasificar al vacío con agitación utilizando un agitador magnético.

Acetonitrilo-amortiguador de fosfatos (67:33) pH aparente = 5.7 (1000 mL)

Medir 670 mL de acetonitrilo con una probeta de 1000 mL y vaciar a un vaso de precipitados de 1000 mL que contenga un agitador magnético. Medir 330 mL de Buffer de fosfatos 0.05M con una probeta de plástico de 500 mL y vaciar al vaso de precipitados que contiene el acetonitrilo. Agitar suavemente, utilizando una parilla de agitación.

Con la ayuda de un potenciómetro, medir el pH de la solución anterior y de ser necesario ajustar el pH a 5.7 con aproximadamente 24 gotas de la solución de HCl 1N; en caso de bajar más el pH, aumentarlo con NaOH 0.1 N. Filtrar la solución a través de un embudo de filtración rápida al vacío, que contenga una membrana de Nylon de 0.22 micras (μm) adecuada para solventes orgánicos y contenerla en un matraz de Kitasato. Desgasificar al vacío con agitación utilizando un agitador magnético.

D.6 Muestra biológica:

Plasma humano:

La primera es un pool de plasma humano de siete voluntarios sanos del 220405 24/24 B-106^a / Folio 51. Laboratorio 112 de Biofarmacia., Conjunto E Facultad de Química UNAM. Conservado en congelación. La segunda es una mezcla de plasma de siete voluntarios sanos. Su procedencia es de Estudios biofarmacéuticos y bioequivalencia 020304 Folio 009 Fracción 2 de 3. Laboratorio 112 de Biofarmacia., Conjunto E Facultad de Química UNAM.

Plasma de ratas:

Mezcla de plasma de ratas macho de la cepa Wistar de 200 g en promedio. Su procedencia es del Laboratorio de Microdiálisis. Instituto de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” 171005, donado por la Dra. María Eva González Trujano y Q.F.B Ana Laura Martínez Martínez.

Blanco de plasma:

Adicionar 100 μL plasma filtrado en un tubo eppendorf

Plasma adicionado:

A partir de un pool de plasma proveniente de una mezcla de 7 voluntarios sanos, hacer pasar a través de un embudo de filtración de vidrio con papel filtro número 4. Tomar 900 μL del plasma filtrado y colocarlos en un tubo de ensayo y adicionar 100 μl de la solución stock de $\text{N}_x \text{N}_x\text{OH}$ y N_xN_x de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Agitar con vórtex durante 2 minutos. Tomar 100 μL y colocarlo en un tubo eppendorf.

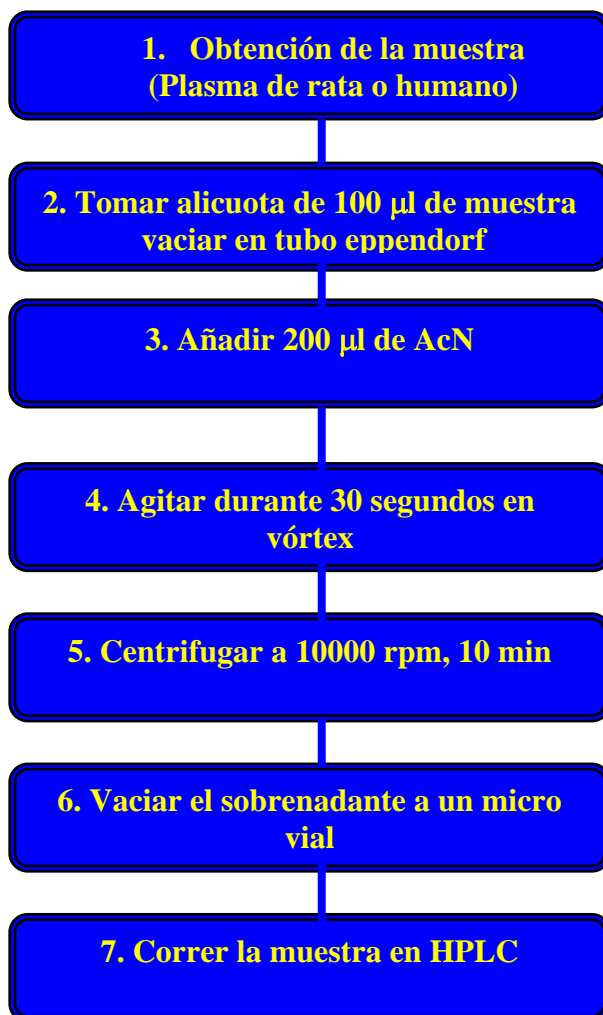
D7. Curva de Calibración

Nivel	Concentración inicial ($\mu\text{g/mL}$)	Alícuota (mL)	Volumen añadido de fase móvil o plasma de rata (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)
---	500	2	8 mL de fase móvil	10	100
1	100	0.4	0.4	0.8	50
2	50	0.4	0.4	0.8	25
3	25	0.4	0.4	0.8	12.5
4	12.5	0.4	0.4	0.8	6.25
5	6.25	0.4	0.4	0.8	3.12
6	3.12	0.4	0.4	0.8	1.56
7	1.56	0.4	0.4	0.8	0.78

D8. Curva para la determinación del límite de cuantificación

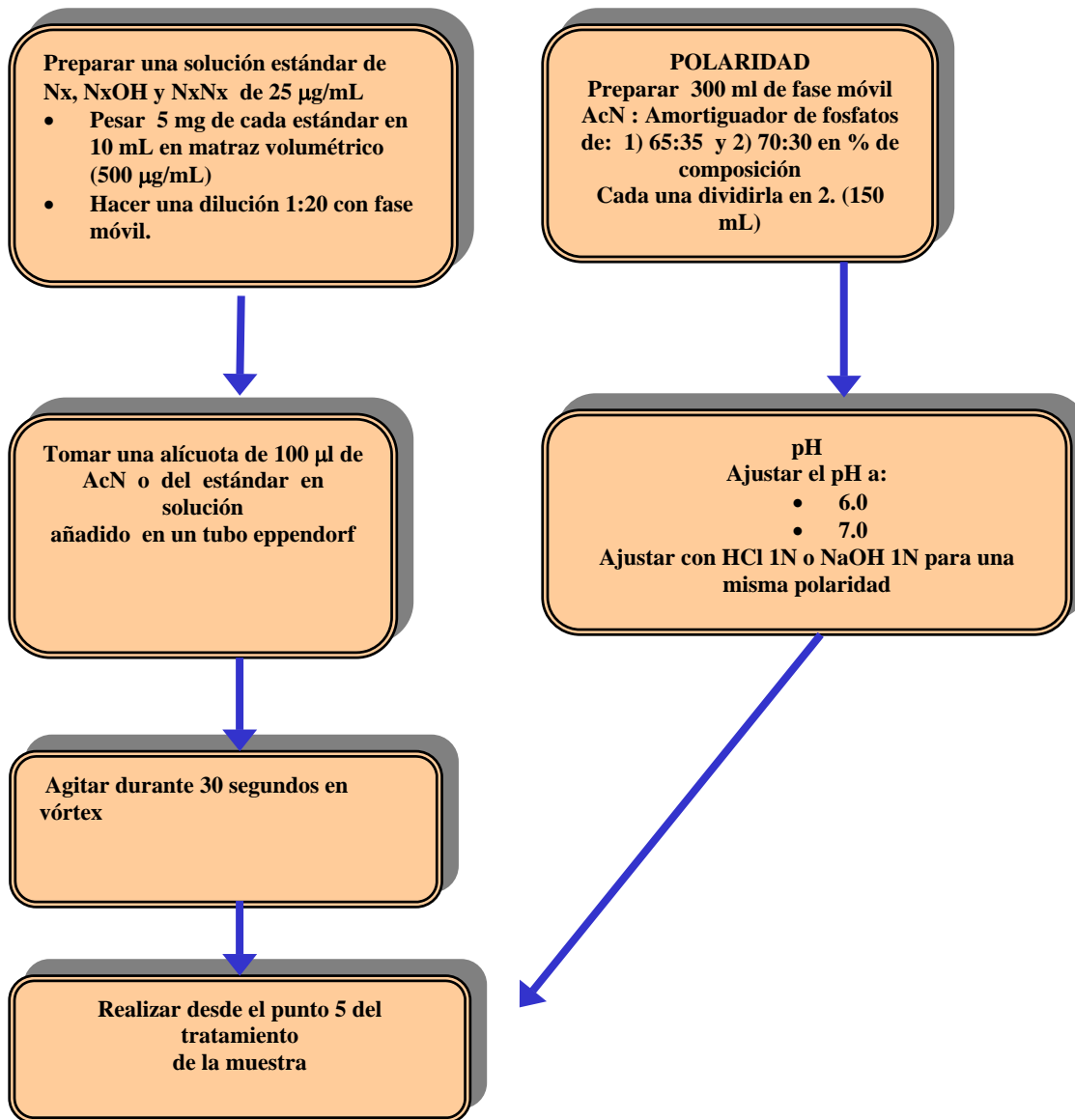
Nivel	Concentración inicial ($\mu\text{g/mL}$)	Alícuota (mL)	Volumen añadido de plasma de rata (mL)	Volumen final (mL)	Concentración final ($\mu\text{g/mL}$)
---	500	1	9 mL de fase móvil	10	50
---	50	0.2	0.80	1.0	10
1	10	0.1	0.10	0.2	5.0
2	25	0.08	0.12	0.2	4.0
3	12.5	0.06	0.14	0.2	3.0
4	6.25	0.04	0.16	0.2	2.0
5	3.12	0.02	0.18	0.2	1.0

APÉNDICE E. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

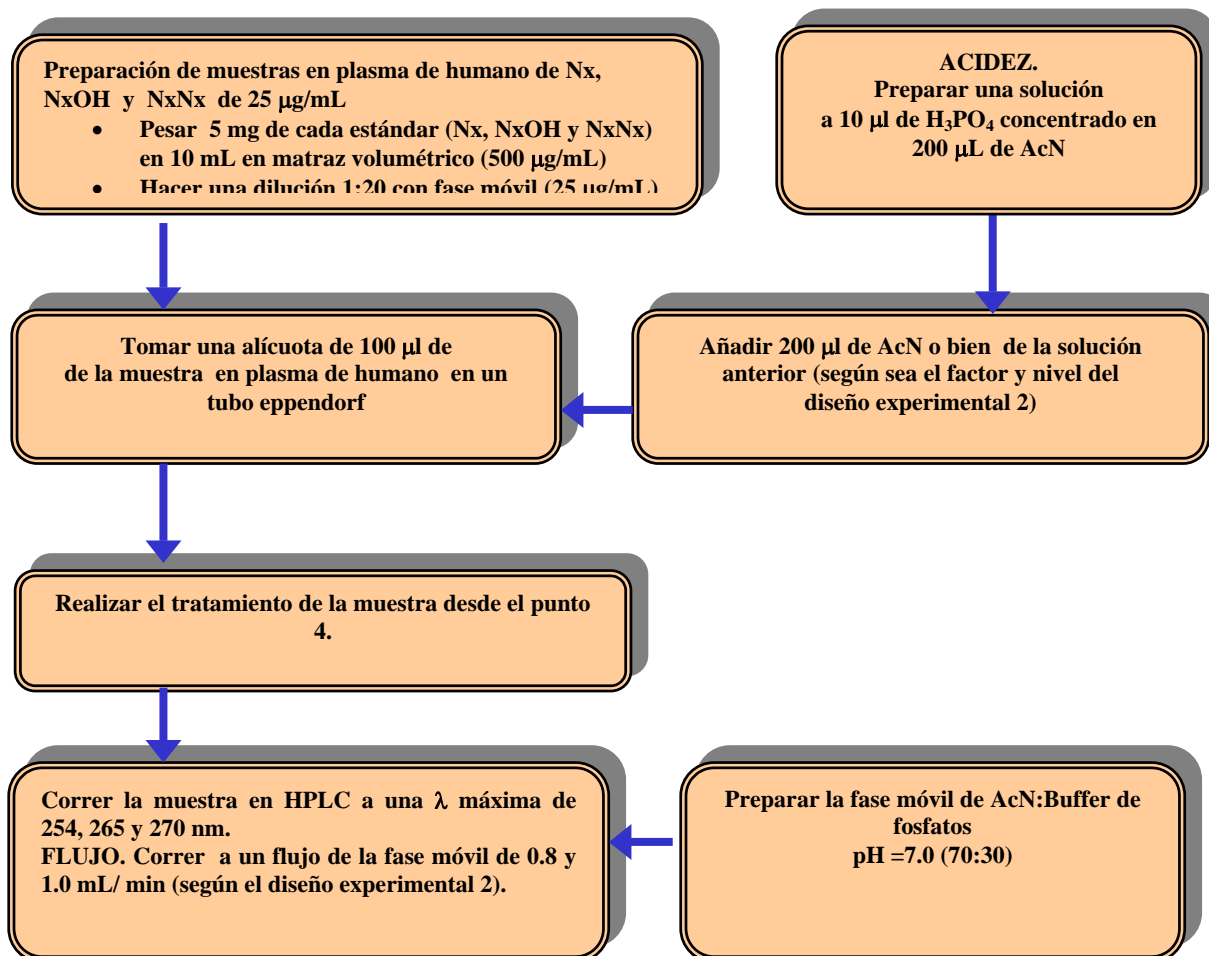


APÉNDICE F. DESARROLLO DEL METODO ANALITICO

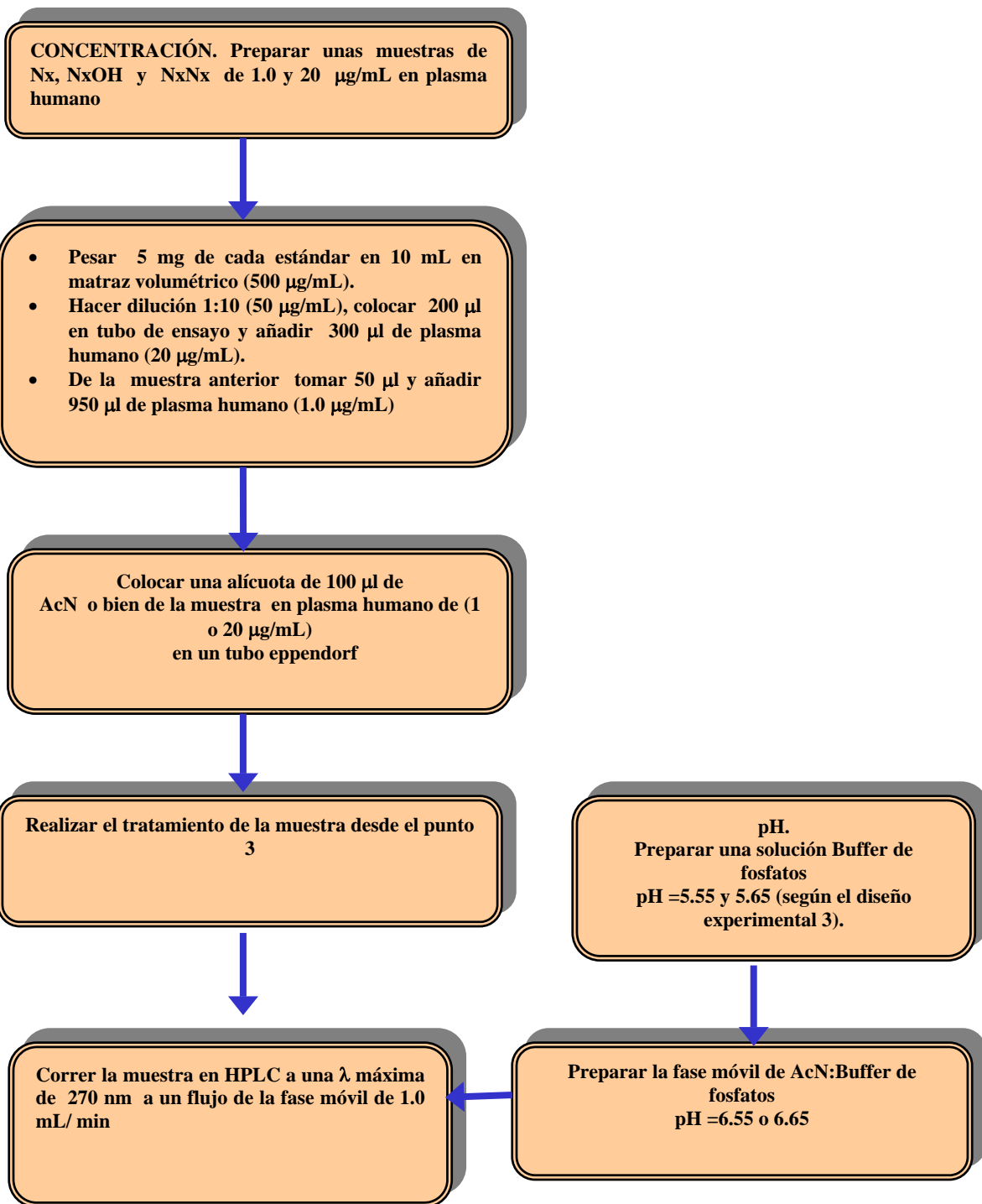
F.1 Efecto del pH y la polaridad de la fase móvil sobre el tiempo de retención del Naproxeno, Naproxol y Naproxenato de naproxenilo.



F2. Efecto de la acidez y el flujo de la fase móvil sobre los tiempos de retención de los analitos.



F.3 Efecto del pH de la fase móvil y la concentración (baja y alta) de Nx y NxOH sobre la resolución entre ellos.



BIBLIOGRAFÍA:

- 1 Eurachem Guide. The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, , Teddington, UK, 1998.
- 2 A. Martín Andrés, Luna del Castillo, J.D. Bioestadística para las Ciencias de la salud. Norma, Granada, 1994.
- 3 Albrecht C, Reichen J, Visser J, Meijer D.K.F. and Thormann W. Differentiation between naproxen, naproxen-protein conjugates, and naproxen – lysine in plasma via micellar electrokinetic capillary chromatography- a new approach in the bioanalysis of drug targeting preparations. *Clinical Chemistry* Vol 43 No.11(1997) Pag 2083 – 2090
- 4 Analytical Procedures and Methods Validation, Draft Guidance, CDER/CBER, FDA, Rockville, MD, USA, 2000.
- 5 Aresta A., Carbonara T. Palmisano F, Zambonin C. Profiling urinary metabolites of naproxen by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* Vol. 41 (2006) Pag 1312 – 1316.
- 6 Avendaño López M. C. Introducción a la Química Farmacéutica; Mc Graw Hill Interamericana; España (1993) Pag 198 – 200.
- 7 Banker, G. S y Rhodes C.T. Modern Pharmaceutics. Drug and the Pharmaceutical Sciences. Marcel Dekker Inc; 3a Edición; EUA (1990) Pag 451, 596-599, 627-628.
- 8 Blagrrough, I.S., Daykin, M.M., Doherty, M., Patrirk, M. And Shaw, P.N. High performance liquid chromatographic determination of naproxen, ibuprofen and diclofenac in plasma and synovial fluid in man. *Journal of Chromatography* Vol 578 No 2 (1992) Pag 251 – 257.
- 9 Broquaire, M., Rovei, V. and Brithwaite, R. Quantitative determination of naproxen in plasma by a simple High Performance Liquid Chromatography method. *Journal of Chromatography* Vol. 224 (1981) Pag 43-49.
- 10 Chamberlain J. Why analyze drugs in biological fluids and Special problems with biological fluids en *Analysis of Drugs in Biological Fluids*. USA. CRC Press. (1987) Pag 25-31.

-
- 11 De Camp, W. H. J. *Assoc. Off. Anal. Chem* Vol 67 No. 5 (1984) Pag 927-933.
 - 12 Desager, J.P., Vanderbist, M. y Harvengt, C. Naproxen plasm levels in volunteers after single dose administration by oral and rectal routes. *Journal of Clinical Pharmacology*, Vol. 16 No. 4 (1976) Pag 189-193.
 - 13 Drug Information. American Society of Hospital Pharmacists. Vol 91 pag 1124.
 - 14 Ekpe Anthony, Tong, J.H, and Rodriguez L. High-Performance Liquid Chromatographic Method Development and Validation for the Simultaneous Quantitation of Naproxen sodium and Pseudoephedrine Hydrochloride Impurities. *Journal of Chromatographic Science*, Vol 39 (2001) Pag 81 – 86.
 - 15 Espino S. Miriam. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM; México, D.F. (2003).
 - 16 Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaria de Salud. 7a Edición; México (2000) Pag 877.
 - 17 Florey J. *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*. Edited by Harry G. Brittain; Volumen 21. Pag 350,351,364.
 - 18 Fu, J.; Masferrer, J; Seibert, K; Raz, A; Needleman, P. The Introduction and Suppression of Prostaglandin H2 Syntethase (Ciclooxigenase) in Human Monocytes. *Journal Clin Inves* Vol. 86 (1990) Pag 1375-1379.
 - 19 González de la Parra, M., Ramos Mundo, C., et al. A Germination bioassay as a toxicological screening system for studying the effects of potential prodrugs of naproxen. *ATLA*, Vol. 26 (1998) Pag 635.647.
 - 20 González Pérez R., Poza G. P. ,Vives R. Canto G. Antiinflamatorios inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (COX-2). *Alergol Inmunol Clin*. Vol. 17 (2002) Pag 247 – 254.
 - 21 Goodman & Gillman. *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*; Mc Graw Hill Interamericana. 9ª Edición en Español; México (1996) Pag. 666- 689.
 - 22 Goto, J., Goto N. and Nambara, T. Separation and determination of naproxen enantiomers in serum by HPLC. *Journal Chomatography* Vol 239 (1982) Pag 559 – 564.
-

-
- 23 Guideline for Industry. Text on Validation of Analytical Procedures ICH-Q2A.. Food and Drug Administration, EUA. March (1995)
 - 24 Hartmann, C; Smeyers, J; Massart, D; McDowall,R. Validation of bioanalytical chromatographic methods. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. Vol. 17 (1998) Pag 193-218.
 - 25 Hirai, T., Matsumoto, S. and Kishi, S. Simultaneous analysis of several non steroidal anti-inflammatory drugs in human urine by HPLC with normal solid phase extraction. Journal of Chromatography B Vol. 692 (1997). 375 – 388.
 - 26 ICH Q2B: Validation of Analytical procedures: Methodology, Consensus Guideline, International Conference on Harmonization (ICH), (1998).
 - 27 International Conference on Harmonization, Note for Guidance on Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology, Committee for Proprietary Medical Products, CPMP/ICH/381/95 approval November (1994).
 - 28 Jaggi R., Addison S., King A., Suthers B., Dickinson R. Conjugation of desmethylnaproxen in the rat- a novel acyl glucuronide- sulfate diconjugate as a major biliary metabolite. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics Vol. 30 (2002) Pag 161 – 166.
 - 29 Jenke, D.R.; J. Liq.Chrom. & Rel. technol. Vol. 19 (1996) Pag 737 – 757.
 - 30 Kalant Harold. Principios de farmacología Médica. Oxford, 6ª Edición México, D.F. (2003) Pag 413-15,423.
 - 31 Lippincott's. Pharmacology Illustrated Reviews. J.B. Lippincott Company. USA (1992). Pag 361- 367.
 - 32 Loftus Bernard T. Nash Robert Pharmaceutical Process Validation. Marcel Dekker, Inc. New York USA Volumen 23 (1984). Pag 255.
 - 33 Maroto S, Alicia. Tesis Doctoral. Incertidumbre en métodos analíticos de rutina. Universitat Rovira I Virgili. Facultad de Química. (2002) Pag 7.
 - 34 Montgomery, Douglas C. Diseño y Análisis de experimentos. Grupo editorial Iberoamerica, México (1991). Pag 170 - 350

-
- 35 NOM-177-SSAI-1998 Norma Oficial Mexicana. Diario Oficial (1999).
 - 36 Owen, S., Roberts, M. y Friesen, W. Rapid High Pressure Liquid Chromatography assay for the simultaneous analysis of Non - steroidal antiinflammatory drugs in plasma. *Journal Chromatography* Vol. 416 (1987) Pag 293 – 302.
 - 37 P. Ettmayer, G.L. Amidon, B. Clement, and B. Testa. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. *J. Med. Chem* Vol. 47 (2004) Pag 2393-2404.
 - 38 Papadoyannis, I, Samanidou V. Sample Preparation Prior to HPLC. *Encyclopedia of Chromatography*. Marcel Dekker; New York, USA (2003) Pag 1-4.
 - 39 Peng, G. W.; Chiou, W.L.; *J. Chromatogr. B*. Vol. 531 (1990) Pag 3-50.
 - 40 *Pharmaceutical Sciences*. Marck Publishing Co., Easton, PA (1989) Pag 1059.
 - 41 P.N.O GEN-BIO-001.Unidad Analítica de Estudios de Bioequivalencia. Biofarmacia Lab 112. Facultad de Química. UNAM (2005)
 - 42 Quattrocchi, Oscar. *Introducción a la HPLC. Aplicación y practica*; Buenos Aires, Argentina (1992). Pag 1 – 64, 203 – 327.
 - 43 Rang H.P *Farmacología*. Elsevier science; 4a Edición; Barcelona, España (2002). Pag 242 – 246.
 - 44 Rarrar H, Letzig L, Gill M. Validation of liquid chromatographic method for the determination of ibuprofen in human plasma. *Journal of Chromatography B*. Vol. 780 (2002) Pag 341 – 348.
 - 45 Rautio J., Taipale J., Gynther J., Vepsalainen J., Nevelainen T. and Jarvinen T. In Vitro evaluation of acyloxyalkyl ester as dermal prodrugs of ketoprofeno and naproxeno *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Vol. 87 No. 12 (1998) Pag 1622-1628.
 - 46 Review Guidance. *Validation of Chromatographic Methods*. Center for Drug Evaluation and Research. U.S. Food and Drug Administration, Rockville, MD, Nov (1994)

-
- 47 Roche, Edward. Design of Biopharmaceutical Properties through Prodrugs and Analogs. Published by American Pharmaceutical sciences; USA, Washington, D.C (1977) Pag 2, 344.
 - 48 Rosing, H; Man, W.; Doyle, E.; Bult, A. and Beijnen, J. Bioanalytical Liquid Chromatographic Method Validation. A Review of Current Practices and Procedures. Marcel Dekker, Inc (2000) Pag 329 –354.
 - 49 Runkel R., Kraft K., Boost G, Sevelius H, Forchielli E, Hill R, Magoun R, Szakacs J, Segre E. Naproxen oral absorption characteristics. Chem Pharm Bull Vol. 20 (1972) Pag 1457 – 1466.
 - 50 Sáez Ruiz, Font Avila. Incertidumbre de la medición: Teoría y práctica. L & S Consultores C. A. 1ª edición; Maracay ,Estado Aragua (2001) Pag 2-3.
 - 51 Sarfaraz K., Syed M. and Syed I Ahmad. Partial-Area Method in Bioequivalence Assessment: Naproxen. Biopharmaceutics & drug Disposition, Vol 18 No.2. (1997) Pag 103 – 116.
 - 52 Severliius H, Runkel R, Segre E, Bloomfiel S. Bioavailability of naproxen sodium and its relationship to clinical analgesic effects. Br J. Clin Pharmacol Vol.10 (1980) Pag 259 – 263.
 - 53 Shimek, J. Rao, N. and Khalil, S. An isocratic High- Pressure liquid chromatographic determination of naproxen and desmethylnaproxen in human plasma. Journal of Pharmaceutical Science Vol.71 No. 4 (1982) Pag 436 – 439.
 - 54 Skoog, Douglas A. Principios de Análisis Instrumental. Mc Graw Hill. 5ª edición; España, Madrid (2001) Pag 730 –807.
 - 55 Slattery, J. and Levy, G. Determination of naproxen and its desmethyl metabolite in human plasma o serum by High Performance Liquid Chromatography. Clinical Biochemistry Vol.12 No.3 (1979) Pag 100- 103.
 - 56 Snyder L. Kirkland J. Introduction to Modern Liquid Chromatography. 2ª edición; J. Willey, N.Y (1979). Pag 83 - 123
 - 57 Stella, V.; Charman, W.; Naringrekar, V. Prodrugs: Do They Have Advantages in Clinical Practice? Drugs Vol. 29 (1985) Pag 455 – 473.
-

-
- 58 O'Neil J. Smith A, Heckelman P, Obenchain J. The Index Merck. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals; Merck & Co , 9a Edición; USA (1996) Pag 1101.
 - 59 Toothaker, R.; Barker S., Gillen M., Helsing S., Kindberg C., Hunt T. and Powell J. Absence of Pharmacokinetic Interaction Between Orally Co- administered Naproxen Sodium and Diphenhydramine. Biopharmaceutics & Drug Disposition Vol. 21 (2000) Pag 229-233.
 - 60 Tortajada G. Tesis Doctoral Europea. Soluciones quimiométricas para optimizar el análisis de parámetros químicos en aguas. Universitat de Valencia. Departamento de Química Analítica. (2002) Pag 37-38.
 - 61 United States Pharmacopeia 23, <Sección 1225> Validation of Compendial Methods. United States Pharmacopeia Convention, Inc., Rockville, MD (1995) Pag 1982- 1984.
 - 62 Upton, R., Buskin, J., Guentert, T., Williams, R. and Riegelman S. Convenient and sensitive High-Performance Liquid Chromatography assay for ketoprofen, naproxen and other allied drug in plasma or urine. Journal of Chromatography Vol. 190 No.1 (1980) Pag 119 – 128.
 - 63 Upton R., Williams R., Kelly J, Jones R. Naproxen pharmacokinetics in the elderly. Br J Clin Pharmacol Vol. 18 (1984) Pag 207 – 214.
 - 64 USP DI, Volumen III. Approved Drug Products and Legal Requirements . The United States Pharmacopeial Convention, Inc. Publishing, Philadelphia. (2001).
 - 65 Vree. T., Van den Biggelaar- Martea, M. and Verwey –van Wissen, C. Determination of Naproxen and its metabolite O-desmethylnaproxen with their acylglucuronides in human plasma and urine by means of direct gradient. High Performance Liquid Chromatography Journal of Chromatography and Biomedical Applications Vol. 578 (1992) Pag 239 –249.
 - 66 Whitehouse, M.; Rainsford, K. Side-Effects of Antiinflammatory Drugs: Are They Essential or Can They Be Circumvented? Agents Actions Vol. 3 (1977) Pag 171 – 187.
-

-
- 67 Zakeri P.; Barzegar B; Tajerzadeh, H.; Simultaneous determination of naproxen, ketoprofen and phenol red in samples from rat intestinal permeability studies: HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical Analysis and Biomedical Analysis* Vol. 39 (2005) Pag 1 – 7.
 - 68 Najlah M., Freeman S., Attwood D., D`Emanuele A. In vitro evaluation of dendrimer prodrugs for oral drug delivery. *International Journal Pharmaceutics Pharmaceutical Nanotechnology*. (2006). Pag 175 –182.
 - 69 Menson James W. *Pharmaceutical Analysis Modern Methods*. Capitulo 1. Marcel Dekker Inc. Parte B. New York, EUA (1989) Pag 1 – 14.
 - 70 Frisancho Velarde O. Gastropatía por Antiinflamatorios no esteroideos. *Enfermedades de Aparato digestivo*. Vol 1. No. 4 (1998) Pag 36 – 42
 - 71 Massart, D. L. Diskstra, A. and Kaufman L. *Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures*. Elsevier Scientific Publishing Company. 3a impression Amsterdam Oxford (1984) Pag 563 – 572.