



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA**

---



TESIS

**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR  
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A MASAS (CLAR-  
MS) PARA CUANTIFICAR TACROLIMUS EN SANGRE TOTAL Y SU APLICACIÓN EN UN  
ENSAYO DE BIODISPONIBILIDAD EN LA POBLACIÓN MEXICANA.**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**HERNÁNDEZ PIÑA OMAR EMMANUEL**

**MÉXICO, D.F.**

**2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente	Dra. Helgi Helen Jung Cook	_____
Vocal	M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado	_____
Secretario	M. en F. Luis Jesús García Aguirre	_____
1er. Suplente	M en C. Lauro Misael Del Rivero Ramírez	_____
2do. Suplente	M en C. Liz Jannet Medina Reyes	_____

**LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

Investigación Farmacológica y Biofarmacéutica S.A. de C.V.

**ASESOR DEL TEMA**

\_\_\_\_\_  
M. en F. Luis Jesús García Aguirre

**SUSTENTANTE**

\_\_\_\_\_  
Hernández Piña Omar Emmanuel

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres...

Durante toda mi vida han sabido hacerme feliz y sentirme querido, mientras que me han apoyado y orientado en todo momento. Por eso les dedico especialmente este logro que no es más que el fruto del cariño que me han brindado. Los amo.

A mis hermanos...

Me siento muy contento de que la vida me haya brindado la oportunidad de compartir mis experiencias con compañeros tan diferentes pero al mismo tiempo muy parecidos a mí. Quiero que se sientan orgullosos de mí como yo estoy de ustedes y espero que el esfuerzo que se ve reflejado en este trabajo sea una motivación en sus vidas para cada uno de ustedes. Los amo.

A mi familia...

A toda la familia Díaz, tío Nacho, tía Rosa, Sandy, Fabi, Nachito y Nestor; a la familia Ramírez, tío Julián, tía Sofía, Laura, Chofis y ¿?; a la familia Reyes; tío Valentín, tía Alejandra, Dina, Lore y Tachido; a mis abuelos, Polín, Bola, Toñita y Manuel; a mis demás tíos, en especial Ernesto y Fernando. A mis demás primos y padrinos, que aunque no convivo mucho con ellos pero quiero reconocerles el tiempo que han pasado conmigo.

A mis amigos...

A esas personas que han estado en todo momento y que me han dado mucho de su tiempo. En especial a mis amigos más cercanos Cesar, Iván y Juan.

Al profesor Luis Jesús...

A la persona que creyó en mí, y que no ha tenido ninguna reserva en brindarme parte de sus conocimientos, tanto en las aulas de la facultad como en el inicio de mi carrera laboral y profesional. También le agradezco por su amistad y solidaridad en los momentos difíciles.

A mis compañeros y amigos de la facultad...

A toda la bola de bolsones que compartieron fracasos y éxitos, preocupaciones y alivios, alegrías y tristezas. Que no menciono por no omitir a nadie pero cada uno de ustedes saben a quienes me refiero.

A mis compañeros y amigos del IFaB...

Gracias Liz, Normita, Magorita, Araceli, Chío, Yaya, Mayra, Ely, Oly, Abraham, Manuel, y José, por ayudarme en mi formación profesional y en colaborar con el grato sabor que tengo de nuestra amistad laboral.

A mi alma Mater...

Gracias a la Facultad de Química y a la Universidad Nacional Autónoma de México por aceptarme como un hijo más y por darme sin reserva alguna todo lo necesario para crecer como persona y como profesionista.

A Fabiola...

Gracias por darme todo ese cariño y comprensión cuando más lo he necesitado además de tu compañía incondicional. Parte de todo esto te lo debo a ti.

## INDICE

1. RESUMEN <sup>1-2</sup> .....	9
2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	10
2.1. GENERALIDADES .....	11
2.2. Tacrolimus .....	11
2.2.1. Propiedades fisicoquímicas .....	11
2.2.2. Indicaciones Terapéuticas .....	12
2.2.3. Farmacodinamia .....	12
2.2.4. Farmacocinética .....	13
2.2.5. Contraindicaciones y precauciones .....	14
2.2.6. Efectos secundarios .....	14
2.2.7. Interacciones medicamentosas .....	15
2.2.8. Métodos analíticos para la cuantificación de Tacrolimus en sangre <sup>7-12</sup> .....	16
2.3. Cromatografía de Líquidos <sup>13</sup> .....	18
2.3.1. Técnicas de ionización <sup>14</sup> .....	19
2.4. Validación de Métodos Analíticos <sup>1</sup> .....	22
3. PARTE EXPERIMENTAL .....	26
3.1. Material, equipos e instrumentos .....	26
3.1.1. Material .....	26
3.1.2. Equipos e instrumentos .....	27
3.2. Reactivos y sustancias de referencia .....	27
3.2.1. Reactivos .....	27
3.2.2. Sustancias de referencia .....	28
3.3. Desarrollo del método analítico .....	28
3.3.1. Condiciones del detector y elección del estándar interno .....	28
3.3.2. Condiciones cromatográficas .....	28
3.3.3. Método de extracción .....	29
3.4. Validación del método .....	30
3.4.1. Preparación de soluciones .....	30
3.4.2. Soluciones de trabajo de Tacrolimus para la preparación de la curva de calibración .....	32
3.4.3. Preparación de los puntos control de calidad en Acetonitrilo (sistema) .....	33
3.4.4. Preparación de curvas de calibración y muestras de control de calidad en sangre total .....	33
3.4.5. Adecuabilidad del sistema .....	34
3.4.6. Linealidad .....	35
3.4.7. Selectividad del Sistema .....	35
3.4.8. Precisión del método .....	35
3.4.9. Exactitud del método .....	36
3.4.10. Recobro .....	36
3.4.11. Límite de cuantificación y Límite de detección .....	37
3.4.12. Selectividad del método .....	37
3.4.13. Estabilidad .....	37
3.4.14. Tolerancia .....	40
3.5. Etapa clínica .....	40
3.5.1. Criterios de inclusión .....	41
3.5.2. Criterios de exclusión de voluntarios .....	42
3.5.3. Retiro de voluntarios del estudio .....	43
3.5.4. Evolución del estudio .....	43
3.5.5. Eventos adversos .....	44
3.5.6. Cuantificación de las concentraciones de Tacrolimus en sangre total .....	45
4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	46
4.1. Desarrollo del método analítico .....	46
4.2. Condiciones del detector y elección del estándar interno .....	46

---

---

4.21.	Condiciones cromatográficas .....	47
4.22.	Método de extracción .....	47
4.3.	Resultados de validación .....	48
4.31.	Adecuabilidad del sistema .....	48
4.32.	Linealidad del método .....	49
4.33.	Precisión del método .....	53
4.34.	Recobro .....	55
4.35.	Límite de detección y cuantificación .....	56
4.36.	Selectividad .....	59
4.37.	Estabilidad .....	63
4.38.	Tolerancia .....	67
4.4.	Etapas clínicas .....	68
4.5.	Estadística demográfica descriptiva .....	68
4.6.	Estadística descriptiva de los datos de concentración sanguínea con respecto al tiempo .....	69
4.7.	Concentración sanguínea promedio con respecto al tiempo (escala normal y escala semilogarítmica) .....	70
4.8.	Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos .....	72
5.	CONCLUSIONES .....	75
6.	ANEXOS .....	76
7.	BIBLIOGRAFIA .....	85

**ABREVIATURAS**

Para efecto de esta tesis se entiende por:

±	Más, menos.
%	Por ciento.
ABC0-∞	Área bajo la curva de concentración plasmática extrapolada a infinito.
ABC0-t	Área Bajo la Curva de concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t.
ACN	Acetonitrilo
APCI	Ionización Química con Presión Atmosférica.
API	Ionización a Presión Atmosférica.
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
C <sub>máx</sub>	Concentración plasmática máxima.
C.V.	Coeficiente de Variación.
Dwell	Velocidad de adquisición.
ESI	Ionización con Electrospray.
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos vigente.
G	Gramos.
H	Horas.
IMC	Índice de Masa Corporal.
LC	Cromatografía de Líquidos.
MeOH	Metanol.
ml	Mililitros.
MS	Espectrometría de Masas.
MSD	Detector de Espectrometría de Masas.
mseg	Milisegundos.
mm	Milímetros.
PNO	Procedimiento Normalizado de Operación.
R	Coeficiente de regresión.
seg	Segundos.
SIM	Monitoreo de Ión Específico.
t <sub>½</sub>	Vida media de eliminación.
TAC/EI	Relación de respuesta de Tacrolimus sobre respuesta del Estándar Interno.
tmáx	Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima.
TMR	Tiempo Medio de Residencia.
UV-VIS	Detector UV-Visible.
V	Volts.
vs	Contra.

## 1. RESUMEN<sup>1-2</sup>

En los estudios para caracterizar la biodisponibilidad de los fármacos, la metodología analítica tiene un papel fundamental, considerando que la obtención de datos confiables repercutirá en cualquier decisión correspondiente al medicamento.

Tacrolimus es un fármaco utilizado por su actividad como depresor inmunológico utilizado principalmente en los trasplantes de hígado y riñón; la importancia de la tesis a realizar radicó directamente en la obtención de un método analítico validado para cuantificar tacrolimus en sangre total y poder aplicarlo en un estudio de Biodisponibilidad en población mexicana; éste tipo de estudios brindan mucha información sobre la absorción del fármaco a la circulación general en el organismo después de su administración y el tiempo que requiere para hacerlo.

Debido a las propiedades fisicoquímicas de tacrolimus y específicamente a su interacción con unas proteínas intracitoplasmáticas denominadas inmunofilinas, nos vimos en la necesidad de utilizar como matriz biológica sangre total y no plasma, como usualmente se utiliza, eso dificultó en cierto grado el desarrollo del método analítico, sin embargo, con ayuda de un equipo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a Masas, se contó con las herramientas necesarias para la tarea propuesta.

El estudio se propuso para muestras provenientes de voluntarios sanos mexicanos, por lo que la validación del método y el análisis de los voluntarios se rigió por la legislación mexicana vigente: "Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.

Por lo tanto, las pruebas incluidas en la validación del método fueron las siguientes: linealidad, precisión, exactitud, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC), recobro absoluto, selectividad, tolerancia (prueba de volumen parcial de muestra para casos que estén dentro del intervalo de análisis) y estabilidad a diferentes condiciones de almacenamiento.

A los voluntarios sanos se les administró una dosis de 5 mg y se les tomaron muestras sanguíneas a diferentes intervalos de tiempo durante 96 horas en tubos con EDTA como anticoagulante. Éstas fueron almacenadas a -70 °C y se procesaron conforme al método analítico previamente validado. Los resultados fueron analizados y se determinaron los parámetros farmacocinéticos de dicho fármaco.



## 2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



El trasplante de órganos es una práctica que ha tomado auge a partir de los años 60's, con el único objetivo de ampliar las expectativas de vida. Para éstos propósitos se utilizan medicamentos como tacrolimus que neutralicen la actividad inmunológica del receptor hacia los injertos extraños.

Éste fármaco es un macrólido con potentes propiedades inmunosupresoras, que también se puede usar en forma tópica para el tratamiento de la dermatitis atópica en niños y adultos, y está actualmente sometido a investigación para poder ser usado en otras enfermedades autoinmunes.

Actualmente se buscan propuestas terapéuticas alternas para que sean de fácil acceso a la mayoría de la población. La inquietud de la industria farmacéutica por cubrir las necesidades terapéuticas ha provocado, especialmente para la población con pocos recursos, generación de nuevos productos farmacéuticos (medicamentos genéricos); la obtención y autorización de éstos productos está sujeta al cumplimiento de una serie de pruebas, entre los que se encuentran los estudios de biodisponibilidad comparativa de equivalentes farmacéuticos (bioequivalencia), lo anterior en población mexicana.

Para lograr lo anterior es importante contar con un método analítico confiable y conocer el comportamiento farmacocinético del fármaco en la población bajo estudio.

De esta manera, en el presente trabajo se optimizó y validó una metodología analítica para poder ser aplicada en muestras provenientes de voluntarios mexicanos sanos, cuyos objetivos se dirigieron hacia los siguientes aspectos:

-  Desarrollo y validación de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) acoplada a masas para cuantificar tacrolimus en sangre total.
  
-  Evaluación de la Biodisponibilidad de una formulación de tacrolimus después de la administración de una dosis oral única de 5 mg.

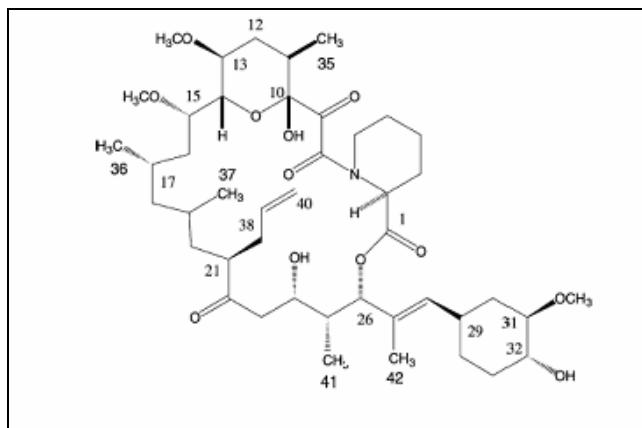
## 2.1. GENERALIDADES


### 2.2. Tacrolimus.


El tacrolimus es un potente fármaco inmunosupresor descubierto en 1984 por los científicos de la Fujisawa Pharmaceutical Co., LTD en Tsukuba, Japón.

#### 2.2.1. Propiedades fisicoquímicas.

 Estructura química:



 Nombre químico: Monohidrato de [3S-3R\*[E(1S\*,3S\*,4S\*)],4S\*,5R\*,8S\*, 9E,12R\*, 14R\*, 15S\*,16R\*,18S\*,19S\*,26aR\*]]5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a-hexadecahidro-5,19- dihidroxi-3-[2-(4-hidroxi-3-metoxiciclohexil) -1-metileténil]-14,16-dimetoxi- 4,10,12,18-tetrametil-8-(2-propenil)-15,19-epoxi-3H-pirido[2,1-c][1,4]oxaazaciclotricosina- 1,7,20,21




 (4H,23H)-tetrona.

 Sinónimos: FK-506

 Nombre Genérico: Tacrolimus

 Fórmula condensada: C<sub>44</sub>H<sub>69</sub>NO<sub>12</sub>H<sub>2</sub>O

 Peso Molecular: 822.05 g/mol

-  Solubilidad: Muy soluble en disolventes orgánicos como: cloroformo, acetona, acetonitrilo y metanol; e insoluble en agua.
-  pKa: No reportado
-  Máximos UV: 200 nm.

### 2.2.2. Indicaciones Terapéuticas<sup>3</sup>.

El fármaco tacrolimus, previamente conocido como FK-506, es un macrólido inmunodepresor producido por *Streptomyces tsukubaensis*. Está indicado en la profilaxis del rechazo de órganos en pacientes que reciben trasplantes alogénicos. También se puede usar en forma tópica para casos de dermatitis atópica.

### 2.2.3. Farmacodinamia<sup>2-3</sup>.

El mecanismo de acción es todavía desconocido, sin embargo, la evidencia experimental ha mostrado que tacrolimus induce una inmunosupresión al inhibir la primera fase de la activación de las células T. En esta primera fase, se activa la transcripción de ciertos factores como la interleucina IL-2, IL-3, IL-4, el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos y de interferon gamma, factores que permiten que las células T progresen desde la fase G0 a la G1. El tacrolimus se fija a una inmunofilina, la FKBP-12 (proteínas captadoras de FK), en conjunto con calcio, calmodulina y calcineurina A y B forman un complejo pentamérico que inhibe la actividad de la fosfatasa de calcineurina(1). Como la calcineurina cataliza una reacción de defosforilización crítica para la transcripción del gen de las linfocinas, la inhibición de la calcineurina resulta en el bloqueo de la transducción de un factor nuclear necesario para la activación de las células B y T. La reducción de los niveles de los activadores de las células T, reduce la respuesta proliferativa de estas células T frente a antígenos y mitógenos.

En la dermatitis atópica, el tacrolimus actúa inhibiendo la inflamación al reducir la actividad de las células T. El tacrolimus se une también a los receptores esteroides de la superficie de las células, inhibiendo la liberación de mediadores de los mastocitos, regulando el número de los receptores a IL-8, disminuyendo la adhesión intracelular y la expresión de la E-selectina en los vasos sanguíneos. Todas estas acciones resultan en una disminución del reconocimiento de los antígenos y en una regulación de la cascada inflamatoria.

---

El tacrolimus tópico no inhibe la síntesis de colágeno y no produce una atrofia de la piel como ocurre en el caso de los corticoides.

#### **2.2.4. Farmacocinética<sup>3</sup>.**

Después de la administración oral de tacrolimus, la absorción es baja y variable; alcanzando su concentración máxima (C<sub>max</sub> 25 ng/mL) en sangre de 1-2 horas después de su administración oral con una dosis única de 5 mg en individuos sanos. La biodisponibilidad absoluta de tacrolimus por vía oral varía entre 13 a 23% en voluntarios sanos, mientras que para pacientes con transplante de hígado está entre 7 a 27% y para pacientes con transplante de riñón fluctúa entre 16 a 28%. Los alimentos afectan notablemente tanto la extensión como la velocidad de absorción. En los voluntarios sanos, el área bajo la curva (ABC) y la C<sub>max</sub> son reducidas en un 37% y 77%, respectivamente después de una comida rica en grasas. Una comida rica en carbohidratos reduce el ABC y C<sub>max</sub> promedio en el 28% y 65%, respectivamente. El tacrolimus se une a las proteínas plasmáticas como lo es la albúmina y la alfa-1-acido glicoproteína, pero también tiene una fuerte asociación con eritrocitos (específicamente a la inmunofilina FKBP-12) en más del 99%. La distribución de tacrolimus entre la sangre total y el plasma depende de muchos factores, como el hematocrito, la temperatura de separación del plasma de la sangre total, concentración del fármaco, y concentración de proteínas plasmáticas. Su volumen de distribución en humanos es de 1.5-2.5 L/kg, por lo que la distribución tisular del fármaco es muy extensa; su depuración es de 0.68 min/mL/kg, debido a el gran tamaño de la molécula y a que es prácticamente insoluble en medios acuosos (como se mencionó anteriormente). El tiempo de vida media de eliminación (t<sub>1/2</sub>) de tacrolimus administrado por vía oral varía de 23 a 46 horas en sujetos sanos después de una dosis única y en regímenes de dosis múltiple. Los estudios farmacocinéticos con tacrolimus han demostrado la existencia de grandes diferencias inter e intra individuales en su cinética en los pacientes con órganos transplantados.







El tacrolimus es sustrato de la glicoproteína P, una bomba ATP-dependiente localizada en el epitelio intestinal y en la barrera hematoencefálica que es capaz de extraer el fármaco de las células intestinales, llevándolo de nuevo al lumen donde es metabolizado por el citocromo P-450 (CYP3A4), lo que limita su biodisponibilidad. Cuando el tacrolimus se administra con inhibidores del CYP3A4 y de la glicoproteína la biodisponibilidad del inmunosupresor aumenta, por lo que su concentración en la sangre se incrementa.



Se ha estudiado su excreción y biotransformación en humanos después de una dosis única de 2.5 mg de fármaco marcado radioactivamente, encontrando que el 95% fue excretado por las heces fecales, mientras que sólo el 2% fue excretado por la orina en un periodo de 48 horas. Los principales metabolitos de tacrolimus identificados en incubaciones con microsomas de hígado humano es el 13-O-desmetil y 15-O-desmetil Tacrolimus, que están presentes en las heces fecales y en la orina, producto de la desmetilación e hidroxilación en la biotransformación de Tacrolimus, también existe la presencia de otros siete metabolitos, pero en menos abundancia. No existe evidencia que demuestre que se produce acumulación del fármaco en el organismo.

### 2.2.5. Contraindicaciones y precauciones<sup>3</sup>.

Hipersensibilidad a tacrolimus o a cualquier otro componente de la formulación. La inmunosupresión puede dar como resultado exacerbación en la susceptibilidad a infecciones o al posible desarrollo de linfoma. Es necesario prohibir el uso de medicamentos de ésta clase a personas que no sean expertas en terapia inmunosupresora o que no estén familiarizados con el manejo de pacientes receptores.

### 2.2.6. Efectos secundarios<sup>3</sup>.

-  Sistema Nervioso: Sueños anormales, agitación, amnesia, ansiedad, confusión, convulsión, depresión, encefalopatía, alucinaciones, poca coordinación, neuropatía, psicosis, somnolencia y pensamientos anormales.
-  Sentidos Especiales: Visión anormal, ambliopia, otitis media.
-  Gastrointestinal: Anorexia, dispepsia, disfagia, esofagitis, flatulancias, gastritis, hemorragia gastrointestinal, perforación gastrointestinal, hepatitis, incremento del apetito, daño hepático, moniliasis oral, desorden rectal y estomatitis.
-  Cardiovascular: Hemorragia, hipotensión, desorden vascular periférico, plebitis, taquicardia, trombosis, vasodilatación.
-  Metabólico/Nutricional: Acidosis, alcalosis, bilirubinemia, hipercalcemia, hipercolesterolemia, hiperlipemia, hiperfosfatemia, hiperuricemia, hipervolemia, hipercalcemia, hipoglacemia, hiponatremia, hipofosfatemia, incremento de deshidrogenasa láctica, aumento de peso.
-  Endocrinológico: Síndrome de Cushing, diabetes mellitus.

-  Urogenital: Albuminuria, cistitis, disuria, hematuria, hidronefrosis, daño renal, mecrisis tubular renal, incontinencia urinaria, vaginitis.
-  Hematológico/Linfático: Desorden de coagulación, anemia hipocromica, leucocitosis, leucopenia, policitemia.

### 2.2.7. Interacciones medicamentosas<sup>3</sup>.

Debido a que el tacrolimus se metaboliza vía CYP3A4, los fármacos que inhiban ésta enzima provocarán la reducción del metabolismo del fármaco y, por lo tanto, el aumento en las concentraciones de tacrolimus en sangre; por ejemplo, los bloqueadores de los canales de calcio: diltiazem, nifedipina, verapamil; antifúngicos: clotrimazol, fluconazol, Itraconazol, ketoconazol; antibióticos macrólidos: claritromicina, eritromicina, troleandomicina; procinéticos gastrointestinales: cisaprida, metoclopramida; y otros fármacos como: bromocriptina, cimetidina, ciclosporina, danazol, metilprednisolona e Inhibidores de la proteasa anti-retroviral.

También, en forma contraria hay fármacos que pueden alterar el metabolismo de tacrolimus, aumentando la actividad de CYP3A4, provocando una disminución en los niveles del fármaco en circulación. Algunos ejemplos de estos fármacos son los anticonvulsivos: carbamazepina, fenobarbital, fenitoína; antibióticos: rifabutina y rifampin.

La administración concomitante de troleandomicina y tacrolimus puede aumentar los niveles de éste último aumentando el riesgo de nefrotoxicidad. Se debe evitar el uso de este antibiótico y si fuera indispensable se deben monitorizar los niveles de Tacrolimus. Se han comunicado fallo renal, delirio y altas concentraciones de Tacrolimus en pacientes tratados simultáneamente con tacrolimus y nefazodona (antidepresivo). También puede presentar interacciones con algunos antagonistas del calcio como diltiazem, nifedipina, verapamil ya que son metabolizados por la misma vía que tacrolimus.

El uso concomitante de agentes nefrotóxicos debe ser considerado con precaución para evitar efectos aditivos. Algunos agentes que pueden causar nefrotoxicidad son los antibióticos aminoglucósidos, la amfotericina B, el cisplatino, foscarnet, ganciclovir, la bacitracina o la polimixina B, y la vancomicina.

El paracetamol, la aspirina y los AINES deben ser utilizados con precaución dado que pueden enmascarar la fiebre, dolor e inflamación y otros síntomas de infección.

La administración concomitante de Tacrolimus y ciclosporina aumenta el riesgo de nefrotoxicidad por efectos aditivos o sinérgicos.

Se recomienda no utilizar ambos fármacos simultáneamente. Cuando se sustituye la ciclosporina por el Tacrolimus, se recomienda esperar al menos 24 h después de la última dosis de ciclosporina antes de comenzar el tratamiento con tacrolimus.

También pueden verse efectos aditivos con otros fármacos antineoplásicos e inmunosupresores como la rapamicina (sirolimus). Los pacientes pueden desarrollar una super-inmunosupresión con un riesgo mayor de infecciones, leucemia, linfomas y síndromes mielodisplásicos y linfoproliferativos.

La respuesta inmune de los pacientes inmunocomprometidos a las vacunas es reducida y se necesitan dosis mayores de estas, al igual que una mayor frecuencia de las revacunaciones. Las vacunas con virus vivos están contraindicadas durante el tratamiento con fármacos inmunosupresores por quedar potenciadas la replicación de los virus y las reacciones adversas. Por la misma razón, los pacientes tratados con tacrolimus no deben ser expuestos a otras personas que hayan sido recientemente vacunadas con vacunas con virus vivos. Con menor frecuencia, las vacunas con virus muertos están asociadas a una mayor incidencia de efectos secundarios en los pacientes inmunocomprometidos.

La administración concomitante de diuréticos ahorradores de potasio y de tacrolimus no está recomendada ya que el tacrolimus puede originar hiperkalemia.

El tacrolimus se adsorbe en los geles de hidróxido de aluminio, por lo que se deben evitar los antiácidos que contienen este producto.

El tratamiento con tacrolimus reduce el aclaramiento de la bleomicina aumentando el riesgo de una toxicidad pulmonar inducida por ésta última.

Se ha observado un aumento de los niveles en sangre de tacrolimus cuando se añade al tratamiento cisaprida o metoclopramida. Aunque los datos existentes son limitados, se ha comprobado que la metoclopramida oral aumenta la biodisponibilidad del tacrolimus en un 30%. Se cree que este aumento de los niveles sanguíneos se debe a que la metoclopramida promueve una mejor absorción del tacrolimus en el intestino delgado. La misma interacción puede ocurrir con la cisaprida u otros fármacos gastrocinéticos

Se han observado rubores faciales y otras reacciones de intolerancia al alcohol en pacientes tratados con el ungüento de tacrolimus.

#### **2.2.8. Métodos analíticos para la cuantificación de Tacrolimus en sangre<sup>7-12</sup>.**

En la revisión bibliográfica encontramos varios métodos para la extracción de tacrolimus de matrices biológicas, los cuales se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Métodos de extracción

Método	Preparación de la Muestra	Estándar Interno	Columna de Extracción	Columna Analítica	Fase Móvil	Método de Ionización	Instrumentos	Resultados de Validación
Método LC/MS para la medición de tacrolimus en sangre	* 1 mL de muestra + 0.5 mL de ACN. * Extracción en fase sólida * Volumen de inyección: 25 µL	32-O-acetil-tacrolimus	No fue utilizada	C <sub>18</sub> (3.9 mm * 150 mm, 5 µm tamaño de partícula) Temperatura de columna: 35°C	Isocrático: MeOH/Agua (90:10 v/v) Flujo: 0.4 mL/min. Tiempo de corrida: 3.0 min	ES -	HPLC: L-6000 y L6200 MS: particle beam 5989B	Recobro: 90%, Linealidad: (0.2-100 µg/L), r <sup>2</sup> = 0.96
Método LC/MS para la medición de sirolimus en sangre	* 1 mL de muestra + 2mL MeOH/ZnSO <sub>4</sub> saturado (50/50 v/v) * Extracción en fase sólida * Volumen de inyección: 25 µL	28-O-acetil-sirolimus	No fue utilizada	C <sub>18</sub> (3.9 mm * 150 mm, 5 µm tamaño de partícula) Temperatura de columna: 35°C	Isocrático: MeOH/0.1 % ácido fórmico (90:10 v/v) Flujo: 0.5 mL/min. Tiempo de corrida: 3.0 min	ES +	HPLC: L-6000 y L6200; MS: particle beam 5989B	Recobro: 71 %, Linealidad: (0.2-100 µg/L), r <sup>2</sup> : 0.98
Método LC/LC-MS para la medición de sirolimus incluyendo sus metabolitos en sangre	* 1 mL de muestra + 1mL MeOH/ ZnSO <sub>4</sub> 0.4 mol/L (80/20 v/v) * Mezclado en vortex y centrifugación * Volumen de inyección: 400 µL	No se utilizó	Nucleosil 100 C <sub>18</sub> (2 mm * 10 mm, 10 µm de tam. de part. Flujo: 0.35 mL/min	Hypersil ODS (2 mm * 250 mm, 5 µm tamaño de partícula) Temperatura de columna: 35°C	Isocrático: MeOH/Agua (90:10 v/v) Flujo: 0.2 mL/min. Tiempo de corrida: 15.0 min	ES +	HPLC WellChrom Microstar K-100; HPLC HP-1090; MS: HP5989B	Recobro: 90 %, Linealidad: (0.4-100 µg/L), r <sup>2</sup> : 0.998
Método LC/LC-MS para la medición de tacrolimus y sirolimus en sangre	* 0.1 mL de muestra + 0.2 mL de ZnSO <sub>4</sub> 0.2 mol/L/MeOH (30/70 v/v) * Mezclado en vortex y centrifugación * Volumen de inyección: 100 µL	Ascomicina	Hypersil ODS-1 (2 mm * 10 mm, 10 µm tam. de part.	Xorbax XDB C <sub>8</sub> (4.6 mm * 50 mm, 3.5 µm tamaño de partícula) Temperatura de columna : 65°C	Gradiente: MeOH/0.1 % ácido fórmico con formato sódico 1µmol/L. A los 9 min. 95% MeOH; Tiempo de corrida 9.5 min.	ES+	HPLC I: G1311A bomba cuaternaria; HPLC G1312A bomba binaria; MS: G1946A	Recobro: 85 %, Linealidad (0.25-100 µg/L), r <sup>2</sup> > 0.99
Método LC/MS para la medición de tacrolimus y sirolimus en sangre	* 0.3 mL de muestra + 0.6 mL MeOH/ ZnSO 0.2 mol/L (80/20 v/v) * Mezclado en vortex y centrifugación * Volumen de inyección: 50 µL	32-Desmetoxi-rafamicina	(2.1 mm * 20 mm HL-B); Flujo 0.35 mL/min	Hypersil C <sub>18</sub> (2 mm * 250 mm, 5 µm tamaño de partícula) Temperatura de columna: 33°C	Isocrático: MeOH/Agua (90/10 v/v) Flujo: 0.25 mL/min. Tiempo de corrida: 27.0 min	ES +	LC/MSD 1100 SL Series	Recobro: 90 %, Linealidad: (0.3-200 µg/L), r <sup>2</sup> > 0.999



---

---

### 2.3. Cromatografía de Líquidos<sup>4-5</sup>.

La cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales está en reposo (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida.

La cromatografía líquida de alta resolución es la técnica de separación de sustancias más ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su capacidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles, y sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general, como por ejemplo fármacos, proteínas, triglicéridos, vitaminas, muestras medioambientales, etc.

La técnica se complementa con una serie de detectores cuya aplicación depende del tipo del compuesto a analizar. Existen detectores de fluorescencia, detector diferencial de índice de refracción, y otros de carácter universal como el detector de UV-VIS y arreglo de diodos. A éstos, se unió el detector desarrollado más reciente que es por espectrometría de masas.

El sistema de detección es clave en cuanto a la sensibilidad y selectividad de análisis. Por ésta razón la espectrometría de masas es de gran importancia, ya que se encuentra entre los sistemas de mayor sensibilidad con un alto grado de reproducibilidad y selectividad/especificidad.

La separación cromatográfica no pasa a ser menos importante con éste tipo de detectores, sin embargo, permite análisis más rápidos.

Los sistemas acoplados CLAR-MS, no sólo informan el peso molecular sino además son capaces de generar información estructural, que es un aspecto relevante para la identificación de compuestos.

Los distintos tipos de analizadores iónicos, son apoyo en distintos requerimientos por ejemplo:

- Cuadrupolos. Son de alta sensibilidad, con buena reproducibilidad.
- Trampa de iones. Poseen alto grado de selectividad/especificidad, ya que es la única capaz de generar información espectral. Son aún más sensibles que los triple cuadrupolos por lo que se utilizan en el análisis de trazas por su capacidad de identificación de análisis desconocidos. Pero su rango de cuantificación es menor comparado con los cuadrupolos.
- Tiempos de vuelo. Determinación de masa exacta. No son recomendados para análisis cuantitativos.

### 2.3.1. Técnicas de ionización<sup>6</sup>.

El espectrómetro de masas puede trabajar en dos diferentes modos de ionización:

ESI: Se aplica un diferencial de potencial a la muestra, de ésta manera la muestra queda en forma de pequeñas gotas cargadas eléctricamente. Por evaporación del disolvente aumenta la densidad de carga eléctrica en la superficie de las gotas hasta llegar a un punto crítico (límite de estabilidad de Rayleigh), provocando la división de éstas, en gotas más pequeñas, hasta quedar únicamente las moléculas de la muestra cargadas. Éstos son introducidos al capilar de transferencia a través de una interfase de extracción de iones y son enfocados a través de lentes iónicas hacia el detector. En las figuras 1 y 2 se esquematiza la ESI.

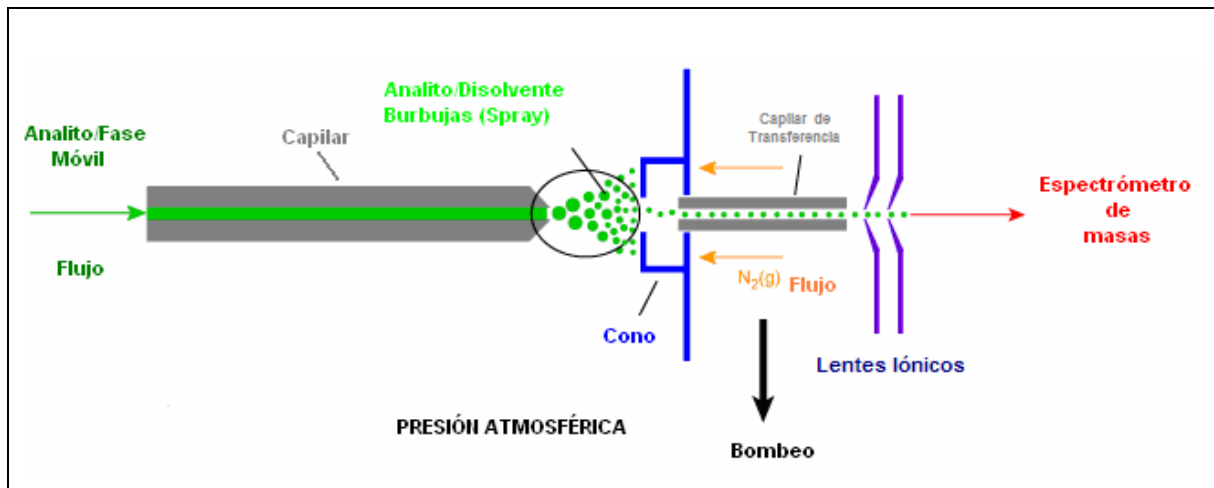


Fig. 1 Componentes de la interface ESI

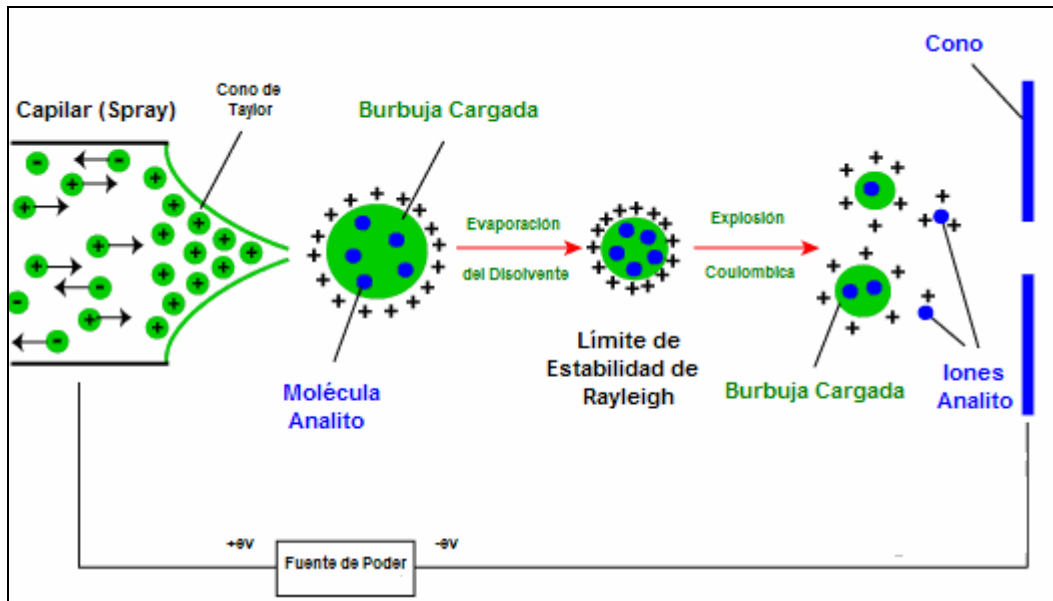


Fig. 2 Mecanismo de formación del ión por ESI

APCI: La fase procedente del cromatógrafo de líquidos, entra a una cámara de nebulización en presencia de nitrógeno, donde es convertida en pequeñas gotas para posteriormente ser desolvatadas a altas temperaturas (300 – 600 °C). De ésta manera las moléculas pasan en su forma neutra hacia la corona de descarga, donde son formados los iones. Éstos son introducidos al capilar de transferencia a través de una interfase de extracción de iones y son enfocados a través de lentes iónicas hacia el detector. En las figuras 3 y 4 se esquematiza la APCI.

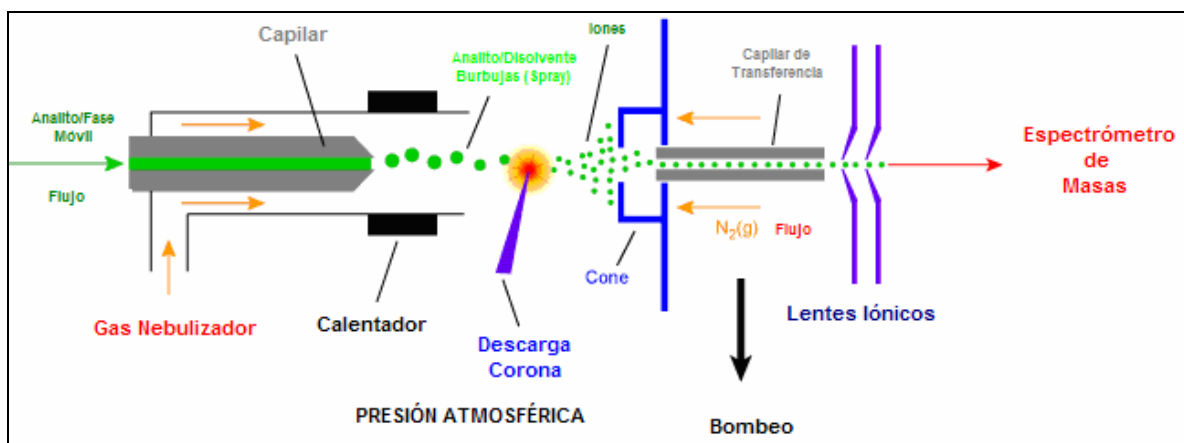


Fig. 3 Componentes de la interfase APCI

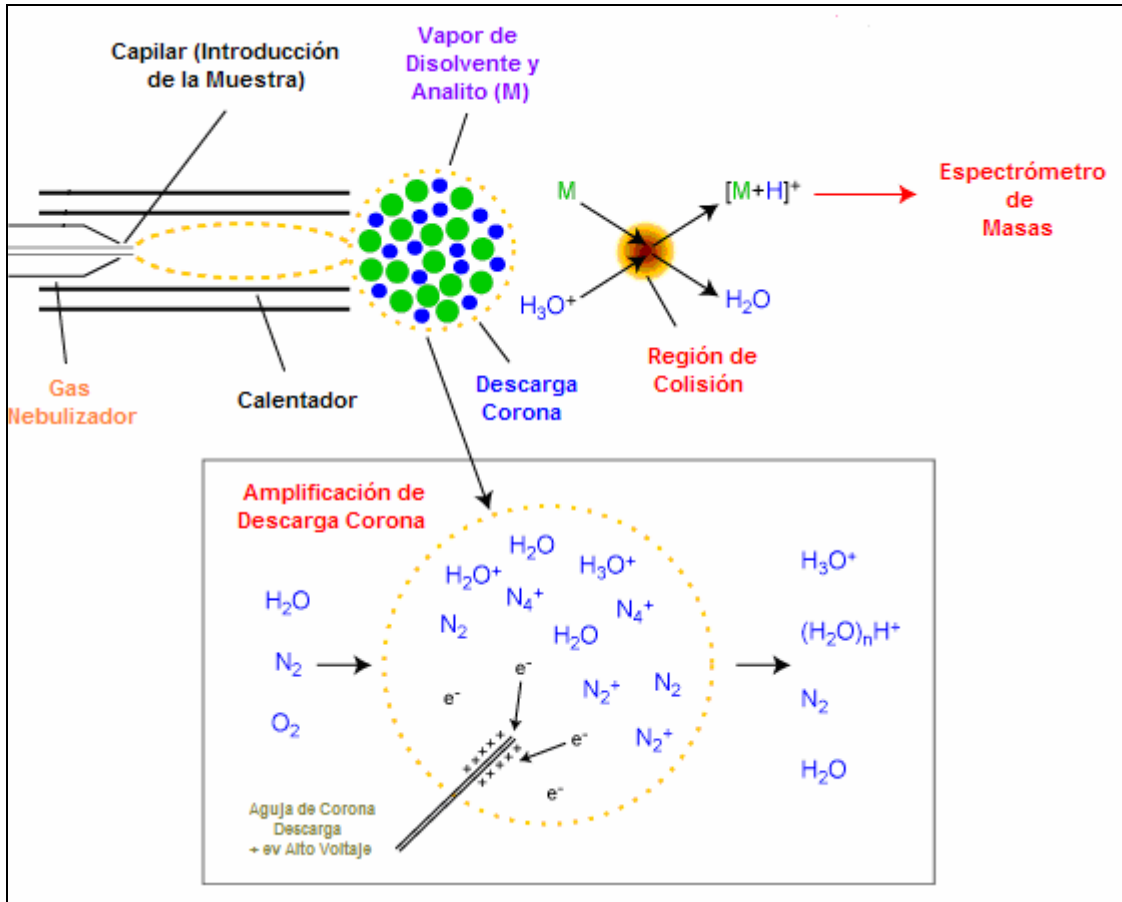


Fig. 4 Mecanismo de formación del ion por APCI

La utilización de las dos técnicas nos ofrece un mayor rango de análisis y la posibilidad de trabajar con un mayor número de moléculas. Ver tabla 2.

Tabla 2. Diferencias entre las técnicas ESI y APCI

Diferencias entre las técnicas ESI y APCI		
	ESI	APCI
Generación de iones	Fase líquida de ionización	Fase gaseosa de ionización
Analitos Compatibles	Compuestos polares, termolábiles y biomoléculas de alto peso molecular.	Compuestos poco polares, con bajo peso molecular y levemente volátil
Flujos Compatibles	0.001 a 1 mL / min	0.2 a 2 mL / min

La técnica con la cual trabajamos es la ESI, por lo cual nos enfocamos a señalar las características que corresponden a ésta interface.

En la búsqueda de una buena respuesta del analito se hace un ajuste de parámetros (Tuning): Es un espectro de todas las relaciones masa/carga que se detectan en un rango de 2 a 4000 m/z al hacer pasar soluciones de 1 µg/mL del analito en solución hacia el detector. Lo que se pretende es identificar la relación m/z correspondiente a las sustancias de referencia con un nivel de respuesta suficiente para cubrir la sensibilidad necesaria.

Efecto de la fase móvil sobre la respuesta del analito.

- En general, la respuesta del analito disminuye cuando, la concentración de otros iones aumenta.
- La competencia entre el analito y otros iones, provoca supresión iónica por ocupación iónica en la superficie de las gotas.
- En modo ESI positivo (+), el analito debe ser mucho más básico que la fase móvil o lo suficientemente polar para formar aductos estables.
- En modo ESI negativo (-), el analito debe ser mucho más ácido que la fase móvil o lo suficientemente polar para formar aductos estables.

La fase móvil debe estar constituida por soluciones amortiguadores volátiles, y las concentraciones de éstas no deben excederse de 20 mM.

Efecto del flujo de la fase móvil sobre la respuesta del analito.

- Las respuestas del analito disminuyen, al incrementar la velocidad de flujo.
- El rango óptimo de trabajo es con flujo de 100-1000 µL/min.

#### **2.4. Validación de Métodos Analíticos<sup>1</sup>.**

La Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, menciona las pruebas y criterios generales para la validación de un método analítico cuya aplicación será un estudio de biodisponibilidad y bioequivalencia.

**Validación**, Evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado;

Para llevar a cabo la validación, una vez establecidas las condiciones analíticas, es necesario incluir como mínimo los parámetros que se describen a continuación:

**Exactitud**; Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

**Linealidad**. Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.

**Límite de detección**. Mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.

**Límite de cuantificación**. Concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.

**Precisión**; 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.

**Repetibilidad**; Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

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

**Rango;** Intervalo de un método analítico definido, se puede caracterizar por uno o más intervalos constituidos al menos por cinco concentraciones distintas cada uno sin incluir las muestras blanco, siempre y cuando contengan puntos intermedios en común e incluyan el límite de cuantificación y concentración máxima del rango.

**Recuperación absoluta;** Eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.

**Selectividad;** 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.

**Tolerancia;** Capacidad de un método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

**Estabilidad de la muestra,** a la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

Además homogeniza los conceptos relacionados, tales como:

**Sustancia de referencia;** Sustancia de uniformidad reconocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas, físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con las sustancias en evaluación.

**Curva de calibración;** al conjunto de concentraciones que describen el rango en el cual se cuantifica el compuesto por analizar.

**Muestras control;** Muestras de concentración conocida que se cuantifican durante la corrida analítica para corroborar la validez del método, estas no forman parte de la curva de calibración, sin embargo, están dentro del rango de trabajo.

**Matriz biológica:** Al material de origen biológico en el cual se encuentra la sustancia de interés.

**Calibración;** Al conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medición material y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.

**Corrida analítica;** al conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales.



### 3. PARTE EXPERIMENTAL

La parte experimental se divide en dos fases:

Fase 1: Optimización y validación del método analítico por CLAR-MS para cuantificar el fármaco en sangre total.

Fase 2: Aplicación del método en muestras de voluntarios sanos de nacionalidad mexicana.

#### 3.1. Material, equipos e instrumentos

##### 3.1.1. Material

- Membranas de filtración de Nylon de 0.45 micras y 47 mm de diámetro.
- Puntas de volumen variable para pipeta repetidora Repeater Plus.
- Frascos de polipropileno con tapa de rosca de: 30, 60 y 500 mL.
- Matraces volumétricos calibrados: 10, 50, 100 y 1000 mL.
- Frascos de vidrio con tapa rosca de: 1000 y 2000 mL.
- Vasos de precipitados de vidrio: 100, 250 y 1000 mL.
- Puntas para repetidora 200 y 1000  $\mu$ L.
- Viales para automuestreador 2695.
- Pipetas volumétricas: 1 mL.
- Gradillas para microtubos.
- Probeta graduada de 1 L.
- Tubos Axigen de 2 mL.
- Guantes de nitrilo.
- Propipetas.

### 3.1.2. Equipos e instrumentos.



- ☞ Sistema de detección LC/MSD Marca Agilent Technologies, que consta de módulo desgasificador, Bomba binaria, Automuestreador, Termostato del automuestreador, Termostato de la columna y Generador de nitrógeno todos Marca Agilent.
- ☞ Balanza analítica marca Kern modelo 770-12.
- ☞ Potenciómetro marca Hanna instruments modelo pH 213.
- ☞ Agitador vórtex marca Barnstead-Thermolyne, modelo M16715.
- ☞ Ultracongelador marca REVCO modelo ULT2186-S-A35.
- ☞ Sistema de purificación de agua marca Barnstead.
- ☞ Pipeta repetidora electrónica marca Eppendorf, modelo Multipipette plus.
- ☞ Micropipeta volumen variable 100-1000 marca Eppendorf modelo Referente.
- ☞ Sistema de procesamiento de datos marca HP Compaq.
- ☞ Refrigerador marca Nieto modelo REB300.
- ☞ Centrífuga refrigerada marca Hettich Rotina 35 R.
- ☞ Sonicador Branson marca Bransonic modelo 3510R-MT.
- ☞ Bomba de vacío Felisa marca Siemems modelo FE-1500L.

### 3.2. Reactivos y sustancias de referencia.

#### 3.2.1. Reactivos

- ☞ Acetonitrilo grado cromatográfico, J.T, Baker.
- ☞ Metanol grado cromatográfico J.T. Baker.
- ☞ Ácido fórmico RA, Merck.
- ☞ Agua grado HPLC obtenida del sistema de purificación de agua marca Barnstead.
- ☞ Sangre total humano proveniente de sujetos sanos con heparina como anticoagulante.

### 3.2.2. Sustancias de referencia.

-  Tacrolimus. Estándar secundario, Moléculas Finas, potencia 96.54% BH, lote B-0511621/00006
-  Sirolimus. Estándar de trabajo, Sigma, potencia 99.45% BH, lote LMP06F36.

### 3.3. Desarrollo del método analítico.

Las premisa en el desarrollo de cualquier método analítico, consta en identificar el tipo y condiciones del detector, condiciones cromatográficas y un método de extracción para las muestras en sangre total.

#### 3.3.1. Condiciones del detector y elección del estándar interno.

La búsqueda de las condiciones óptimas del detector están relacionadas con la estabilidad, el nivel de respuesta y la selectividad/especificidad que se tengan para los analitos a cuantificar. Se hacen barridos con las diferentes variables del detector para elegir las condiciones que faciliten el análisis de las moléculas de interés.

Con el fin de disminuir la variabilidad en la respuesta de las muestras por pérdidas en el método de extracción o en el momento de la detección, se incluyó el segundo analito para utilizarse como Estándar Interno.

Se evaluaron dos fármacos como Estándar Interno (EI); sirolimus y ciclosporina, debido a su similitud de características fisicoquímicas con el fármaco de interés.

#### 3.3.2. Condiciones cromatográficas.

Posteriormente a las condiciones de detección, se trabajó con las condiciones cromatográficas; para obtener una adecuada separación e identificación de los analitos.

#### Fase móvil

Los componentes, proporción y pH de la fase móvil están directamente relacionados con las propiedades fisicoquímicas de la molécula (ej. pKa, polaridad, solubilidad).

Las fases estudiadas fueron mezclas a diferentes proporciones de ACN:AcONH<sub>4</sub> pH 3.0, ACN:AcONH<sub>4</sub> 2 mM con Ac. Fórmico 0.1 %, AcONH<sub>4</sub> 2 mM y ACN:Ac. Fórmico 0.1% pH 2.6.

### Fase estacionaria








Se probaron las siguientes columnas: Zorbax C18 4.6 x 50 mm y Zorbax C18 2.1 x 50 mm, en los dos casos el tamaño de partícula fue de 1.8  $\mu\text{m}$ .

### Volumen de inyección y velocidad de flujo

Se consideró que el volumen de inyección debía ser menor a 100  $\mu\text{L}$ , debido al volumen final de la muestra.

Se evaluaron volúmenes de inyección desde 5 a 20  $\mu\text{L}$  y velocidades de flujo de 0.5 a 1 mL/min.

Por lo tanto, los parámetros considerados en la elección de las mejores condiciones cromatográficas fueron:

-  Sensibilidad
-  Resolución entre picos
-  Ancho del pico
-  Seguimiento de la presión
-  Simetría de los picos
-  Eficiencia de la columna en la separación de los compuestos.
-  Tiempo de retención de los compuestos (tiempo de corrida breve).

### 3.3.3. Método de extracción.

El método de extracción seleccionado fue aquel en el que se obtuvo la muestra libre de impurezas para la cuantificación (o menores al 5% de la respuesta del fármaco de interés) de Tacrolimus y del estándar interno, además de un recobro preferentemente mayor al 40%.

#### Métodos evaluados

Extracción 1. A 500  $\mu\text{L}$  de sangre total conteniendo Tacrolimus, se le adicionó 250  $\mu\text{L}$  de sulfato de zinc 0.2 M y 50  $\mu\text{L}$  de EI (Sirolimus 500 ng/mL). Agitamos en vortex y adicionamos 1 mL de MeOH. Repetimos la agitación, centrifugamos a 14500 rpm durante 5 minutos e inyectamos el sobrenadante.

Extracción 2. A 500 µL de sangre total conteniendo Tacrolimus, se le adicionó 250 µL de sulfato de zinc 0.2 M, 50 µL de EI (Sirolimus 500 ng/mL) y 1 mL de MeOH. Agitamos en vortex y centrifugamos a 14500 rpm durante 5 minutos. Inyectamos el sobrenadante.

Extracción 3. A 200 µL de sangre total conteniendo Tacrolimus, se le adicionó 100 µL de sulfato de zinc 0.2 M y 20 µL de EI (Sirolimus 500 ng/mL). Agitamos en vortex y centrifugamos a 14500 rpm durante 5 minutos e inyectamos el sobrenadante.

Extracción 4. A 500 µL de sangre total conteniendo Tacrolimus, se le adicionó 1 mL de solución de Sirolimus 100ng/mL en una mezcla de acetonitrilo: metanol 3:1, se agitó en vortex 30 segundos y se centrifugó a 14500 rpm durante 5 min. Se decantó el sobrenadante y se inyectó 20 µL al sistema cromatográfico.

Extracción 5. A 500 µL de sangre total conteniendo Tacrolimus, se le adicionó 250 µL de agua y se agitó en vortex. Posteriormente se adicionó 250 µL de sulfato de zinc 0.2 M, 500 µL de ACN y 10 µL de EI (Sirolimus 10 µg/mL), se agitó en vortex durante 2 minutos y se centrifugó a 14500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se adicionó en cartuchos Bond Elut, previamente activados con 2 mL de MeOH, 2 mL de ACN y 1 mL de acetato de amonio 10 mM. El lavado fue con 2 mL de agua grado cromatográfico y para la elusión se probaron distintos disolventes como: ACN, MeOH y mezcla ACN:MeOH 3:1, para todos ellos se utilizó 1 mL. Se evaporó a sequedad con corriente de aire a 40°C. La muestra se reconstituyó en 100 µL de ACN e inyectamos 20 µL al sistema.

### 3.4. Validación del método.

La validación del método analítico, se llevó a cabo bajo lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, en lo referente a validación de métodos analíticos y a los criterios y requisitos para el análisis químico de muestras biológicas de una prueba de bioequivalencia<sup>1</sup>.

#### 3.4.1. Preparación de soluciones.



Solución de ácido fórmico al 0.1% pH 2.6.


Tomar 1 mL de ácido fórmico y transferirlos a un matraz volumétrico de 1L, disolver con agua CLAR y llevar a volumen con el mismo disolvente. Ajustar el pH a 2.6 con ácido fórmico concentrado.

 Mezcla acetonitrilo: metanol ( 3:1 v/v).

Mezclar 750 mL de acetonitrilo CLAR + 250 mL de metanol CLAR en una probeta graduada de 1 litro.

 Acetonitrilo CLAR.

Filtrar 1L de Acetonitrilo CLAR con membrana de 0.45  $\mu$  y desgasificar con vacío durante 20 min.

 Solución de referencia de Tacrolimus (100  $\mu$ g/mL).

Pesar con exactitud el equivalente a 10 mg de Tacrolimus, transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a volumen con acetonitrilo CLAR.

 Dilución de la solución de referencia de Tacrolimus (10  $\mu$ g/mL).

Transferir cuantitativamente 2.5 mL de la solución de 100  $\mu$ g/mL de Tacrolimus a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a volumen con acetonitrilo CLAR.

 Solución de referencia de Sirolimus (200  $\mu$ g/mL).

Pesar con exactitud el equivalente a 10 mg de Sirolimus, transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL, disolver y llevar al aforo con acetonitrilo CLAR.

 Dilución de la solución de referencia de Sirolimus (10  $\mu$ g/mL).

Tomar 2.5 mL de la solución de referencia de 200  $\mu$ g/mL de Sirolimus, transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar a volumen con acetonitrilo CLAR.

 Preparación de Sirolimus solución para precipitar(100 ng/mL)

Tomar 1 mL de la solución de referencia de Sirolimus de concentración de 10  $\mu$ g/mL y transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con la mezcla acetonitrilo: metanol (3:1 v/v).

- Preparación de la solución Tacrolimus y Sirolimus (17 ng/mL y 67 ng/mL) para evaluar la adecuabilidad del sistema

Transferir cuantitativamente con pipeta electrónica 0.085 mL de la solución de 10 µg/mL de Tacrolimus y 0.335 mL de solución de 10 µg/mL de Sirolimus a un matraz volumétrico de 50 mL y llevar a volumen con la mezcla acetonitrilo: metanol (3:1 v/v). Dividir la solución en 30 alícuotas de 1.5 mL y almacenarlas en microtubos de polipropileno para centrifuga a -70°C. Descongelar una de las alícuotas cada día de trabajo a temperatura ambiente.

### 3.4.2. Soluciones de trabajo de Tacrolimus para la preparación de la curva de calibración.

Preparar cada uno de los puntos tal y como se muestra en la Tabla 3, utilizando pipeta repetidora Eppendorf para tomar las alícuotas correspondientes con puntas de 0.5 mL para volúmenes de 10 a 40 µL y de 10 mL para volúmenes de 100 a 2000 µL.

Depositar las alícuotas anteriores en matraces volumétricos de 10 mL y llevar a volumen con acetonitrilo grado cromatográfico.

**Tabla 1. Soluciones de trabajo para la preparación de la curva de calibración.**

µL de Tacrolimus (10 µg/mL)	Concentración de Tacrolimus (ng/mL)
10	10
20	20
30	30
40	40
100	100
200	200
400	400
800	800
1000	1000
1200	1200
1600	1600
2000	2000

**3.4.3. Preparación de los puntos control de calidad en Acetonitrilo (sistema).**

Preparar cada uno de los puntos tal y como se muestra en la Tabla 4, utilizando pipeta repetidora Eppendorf para tomar las alícuotas correspondientes con puntas de 2.5 mL.

Depositar las alícuotas anteriores en tubos eppendorf de 2 mL y añadir 1 mL de solución de Sirolimus 100 ng/mL en ACN para precipitar.

**Tabla 2. Preparación de puntos control de calidad en acetonitrilo.**

μL de Tacrolimus (100 ng/mL)	μL de Tacrolimus (1000 μg/mL)	μL de Tacrolimus (1600 μg/mL)	μL de Agua grado cromatográfico	μL de Sirolimus (100 ng/mL)	Concentración real de Tacrolimus (ng/mL)	Concentración nominal de Tacrolimus (ng/mL)
25	-	-	475	1000	1.66	5
-	25	-	475	1000	16.66	50
-	-	25	475	1000	26.66	80

**3.4.4. Preparación de curvas de calibración y muestras de control de calidad en sangre total.**

a) Depositar en tubos Eppendorf de 2 mL, 475 μL de una mezcla de sangre total proveniente de 6 voluntarios.

b) Adicionar las alícuotas de Tacrolimus correspondientes para obtener cada concentración, tal y como se muestra en la tabla 5, utilizando la misma pipeta repetidora Eppendorf con puntas de 0.5mL. Continuar como se indica en la sección 4.2.2 “Método de extracción” pág. 47.



**Tabla 3. Preparación de Curva de calibración y puntos control.**

Conc. solución de trabajo (ng/mL)	Alícuota de la solución de trabajo (µL)	µL de sangre total	Concentración de Tacrolimus (ng/mL)
10	25	475	***0.5
20	25	475	**1.0
30	25	475	1.5
40	25	475	2
60	25	475	3
100	25	475	5*
200	25	475	10
400	25	475	20
800	25	475	40
1000	25	475	50*
1200	25	475	60
1600	25	475	80*
2000	25	475	100



\*Puntos control de calidad bajo, medio y alto.

\*\*Límite de cuantificación; \*\*\*Límite de detección

### 3.4.5. Adecuabilidad del sistema

Con el fin de evaluar la adecuabilidad del sistema cromatográfico y de llevar un monitoreo de la columna cromatográfica, se preparó una solución de 17 ng/mL de Tacrolimus y 67 ng/mL de Sirolimus en acetonitrilo, de acuerdo a lo establecido anteriormente, dicha solución se dividió en alícuotas de 1 mL y se almacenó en congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Previo a cada corrida analítica, se descongeló una de las alícuotas y se realizaron mínimo 6 inyecciones consecutivas de 20 µL.

El sistema se consideró adecuado al cumplir con cada uno de los parámetros señalados a continuación:

-  Repetibilidad (área de pico y/o relación de áreas) con un C.V.  $\leq 5\%$
-  Repetibilidad (tiempo de retención) con un C.V.  $\leq 2.0\%$

### 3.4.6. Linealidad

Se prepararon cinco curvas de calibración a partir de pesadas independientes, con el método de extracción optimizado (sección 4.2.2 “Método de extracción” pág. 47), contemplándose las concentraciones de 1, 1.5, 2, 3, 10, 20, 40, 60 y 100 ng/mL.

La relación entre la respuesta cromatográfica con respecto a la concentración en cada curva de calibración, fue ajustado a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación  $y = mx + b$ , donde la variable “y” es la relación de áreas TAC/E.I. obtenida para la concentración nominal de Tacrolimus “x”. La linealidad del método fue definida a partir del coeficiente de correlación (r), cuyo valor de cumplimiento para cada curva de calibración fue de 0.99 o mayor, considerándose para esta evaluación las primeras 5 curvas de la validación del método analítico y la desviación porcentual de la concentración recuperada (interpolada) con respecto a la nominal (adicionada) era menor o igual al 15% en todos los puntos que constituyen la curva de calibración, a excepción del límite de cuantificación cuya desviación no debía ser mayor al 20%.

### 3.4.7. Selectividad del Sistema

Antes de cada corrida se evaluó la selectividad del sistema, inyectando un blanco de reactivos y uno de sangre procesados de acuerdo al método establecido (sección 4.2.2 “Método de extracción” pág. 47), los cuales se analizaron a las condiciones cromatográficas establecidas. En ninguno de los casos se debieron presentar interferencias con el pico de interés.

### 3.4.8. Precisión del método

#### Repetibilidad

A partir de una solución de referencia se prepararon y cuantificaron por quintuplicado, muestras sanguíneas con Tacrolimus de 5, 50 y 80 ng/mL, éstas se procesaron con el método ya establecido (sección 4.2.2 “Método de extracción” pág. 47); las muestras no pertenecen a la curva, pero se encuentran dentro del intervalo de concentraciones establecido. Con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las 5 determinaciones de cada nivel. El coeficiente de variación no debía ser mayor al 15%.

### Reproducibilidad del método

Para evaluar la reproducibilidad entre días se preparó una curva en sangre con controles de calidad (5, 50 y 80 ng/mL) por quintuplicado, durante tres días, empleando cada día una solución de referencia preparada recientemente.

Se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los puntos de control de calidad (concentración recuperada), para cada día. El coeficiente de variación global no debió ser mayor al 15% en cada nivel de concentración.

#### 3.4.9. Exactitud del método

En la determinación de la exactitud del método, se tomó en cuenta el valor promedio en cada nivel de concentración de los puntos control durante las pruebas realizadas para evaluar repetibilidad y reproducibilidad, para la cual debieron estar dentro del 15% de su valor nominal correspondiente, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Desv Abs} = \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración nominal}}$$

#### 3.4.10. Recobro

Para la evaluación del recobro del método se prepararon y procesaron por quintuplicado los puntos de control de calidad de Tacrolimus en sangre (5, 50 y 80 ng/mL) y se compararon sus respuestas cromatográficas (área de pico) promedio, contra las respuestas promedio obtenidas de los analitos en solución a las mismas concentraciones, que no fueron sometidas al procedimiento de extracción.

El recobro no necesariamente debió ser del 100%, pero tuvo que ser constante en los niveles de concentración evaluados y ser suficiente para poder cuantificar el nivel más bajo de concentración contemplado en la curva de calibración, por lo que debe ser preferentemente mayor al 40%. En el caso del Tacrolimus, los valores promedio individuales no deben desviarse del promedio total en más del 15%, mientras que en el caso del estándar interno, se determinó el recobro promedio con las quince determinaciones obtenidas en sangre y solución respectivamente (considerando la respuesta de ésta última como el 100 %).

#### **3.4.11. Límite de cuantificación y Límite de detección**

Se prepararon por quintuplicado, muestras de Tacrolimus en sangre a las concentraciones de 0.5 y 1.0 ng/mL, las cuales fueron procesadas e inyectadas en el sistema cromatográfico correspondiente. El Límite de Cuantificación (LC) es la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor promedio no se desvía más del  $\pm 20\%$  del valor nominal (concentración adicionada), con un CV  $\leq 20\%$ ; mientras que el Límite de Detección (LD) es la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica se distingue del nivel de ruido (aproximadamente tres veces mayor) y el CV de la concentración recuperada (precisión) y/o la desviación absoluta por ciento (exactitud) son mayores al 20%.

#### **3.4.12. Selectividad del método.**

La selectividad del método fue determinada con sangre total proveniente de seis voluntarios sanos con certificado de sangre segura, sometidos por duplicado al método de extracción (sección 4.2.2 "Método de extracción" pág. 47). Se consideró que el método analítico era selectivo si en las seis muestras sanguíneas no se presentaba interferencia alguna en el tiempo de retención de los fármacos de interés. Se evaluó la selectividad del método analizando muestras de fármacos de uso común a las concentraciones en matriz biológica reportadas (por ejemplo: paracetamol, ácido acetilsalicílico, naproxeno y cafeína); así como a otros agentes en contacto con la sangre como lo son los anticoagulantes (heparina y EDTA).

#### **3.4.13. Estabilidad**

Se evaluó para determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el fármaco (tacrolimus) permaneció estable en sangre total, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, al evaluar la respuesta (concentración) del compuesto en la sangre total.

##### **a) Ciclos de congelación-descongelación, temperatura ambiente, refrigeración y estabilidad a largo plazo (congelación a $-70^{\circ}\text{C}$ ).**

Se evaluó el efecto de los cambios de temperatura sobre la estabilidad del fármaco, registrando los cambios en la concentración en sangre total de tacrolimus después de su exposición a tres ciclos de congelación/descongelación (dejando las muestras un periodo de 24 h a  $-70^{\circ}\text{C}$  entre cada ciclo).

Así como su estabilidad en matriz biológica bajo condiciones de congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$  (estabilidad a largo plazo), temperatura ambiente y refrigeración, la cual se documentó de manera que por lo menos se cubriera el tiempo de exposición de las muestras a las diferentes condiciones de almacenamiento.

Para ello, se prepararon tres series de muestras de control de calidad conteniendo tacrolimus a las siguientes concentraciones: 5, 50 y 80 ng/mL, procesándolas de acuerdo al método de extracción establecido (sección 4.2.2 "Método de extracción" pág. 47), almacenándolas y analizándolas de acuerdo a la tabla 6.

**Tabla 4. Preparación de muestras para las pruebas de estabilidad**

Concentración (ng/mL)	Muestra	Condiciones de almacenamiento	Día de análisis	Cantidad de muestras preparadas				
5	1	Tiempo cero o inicial	Inmediatamente después de su preparación	3				
	2							
	3							
50	1			Tres ciclos congelación-descongelación a $-70^{\circ}\text{C}$	24, 48 y 72 horas	3		
	2							
	3							
80	1					Largo plazo (congelación a $-70^{\circ}\text{C}$ )	30, 60, 90, 120 y 180 días	3
	2							
	3							
5	1	Temperatura ambiente y refrigeración	24 y 48 horas					15
	2							
	3							
50	1			Temperatura ambiente y refrigeración	24 y 48 horas			15
	2							
	3							
80	1					Temperatura ambiente y refrigeración	24 y 48 horas	15
	2							
	3							
Total muestras 5 ng/mL								<b>33</b>
Total muestras 50 ng/mL								<b>33</b>
Total muestras 80 ng/mL								<b>33</b>

Los valores de concentración interpolada promedio obtenidos de las determinaciones en cada nivel de concentración, deben cumplir con el límite de  $\pm 15\%$  del valor original (tiempo cero) para considerar que son estables bajo esas condiciones durante determinado tiempo.

**b) Estabilidad de la muestra procesada en el automuestreador.**

Para determinar la estabilidad de la muestra procesada, se prepararon por triplicado las muestras de control de calidad de tacrolimus en sangre (nivel bajo medio y alto), las cuales se sometieron al procedimiento de extracción establecido (sección 4.2.2 “Método de extracción” pág. 47) y se inyectaron al sistema cromatográfico (tiempo cero). Las muestras se almacenaron en el automuestreador y se inyectaron de nuevo a las 24, 48 y 96 horas después de su preparación.

Para que el compuesto de interés se considere estable a la condición evaluada, los resultados de concentración interpolada promedio obtenidos para cada nivel de concentración deben estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor promedio obtenido al tiempo cero.

**3.4.14. Tolerancia**

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

**a) Prueba de integridad de la dilución (concentración dentro de la curva de calibración).**








Se prepararon por triplicado una muestra del analito en sangre, a una concentración dentro del rango de cuantificación (80 ng/mL). Se aplicó el proceso de extracción empleando la mitad de muestra establecida en la metodología (completando el volumen con mezcla de sangre) y se determinó la concentración del analito. La concentración interpolada y multiplicada por un factor de dilución de 2 no debe desviarse más del 15% con respecto a muestras procesadas por el método original con un C.V. menor o igual al 15%.

**3.5. Etapa clínica**

Se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos señalados en la Ley General de Salud y en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

### 3.5.1. Criterios de inclusión.

- a) La participación de los sujetos en el estudio de tacrolimus fue de manera voluntaria.
- b) Se incluyeron solamente voluntarios sanos, de entre 18 y 40 años de edad.
- c) El índice de masa corporal de los voluntarios sanos estuvo entre 20 y 27.
- d) Los voluntarios contaban con un buen estado de salud determinado por los resultados de una historia clínica completa realizada por médicos capacitados y los estudios de laboratorio realizados en Laboratorios Clínicos certificados.
- e) Los límites de variación permitidos dentro de la normalidad en la visita de selección fueron: tensión arterial (sentado) de 90 a 130 mm Hg la sistólica y de 60 a 90 mm Hg la diastólica, frecuencia cardiaca entre 55 y 100 latidos por minuto y frecuencia respiratoria entre 14 y 20 respiraciones por minuto.
- f) Los exámenes de laboratorio y gabinete efectuados para la inclusión de los sujetos al estudio son:

-  Hematología: hemoglobina, hematocrito, cuenta total de glóbulos blancos con diferencial y cuenta de plaquetas.
-  Química sanguínea de 24 elementos.
-  Marcadores para hepatitis B y C.
-  Detección de VIH.
-  Examen general de orina.
-  Prueba de abuso de drogas al inicio del estudio.
-  Electrocardiograma.

Los límites de variación permitidos dentro de la normalidad para los valores de laboratorio fueron de +/- 10% del intervalo de lo normal.



### 3.5.2. Criterios de exclusión de voluntarios

- a) Sujetos a los que se les encontrara alguna alteración en sus constantes vitales registradas en la selección de voluntarios.
- b) Voluntarios que no cumplieron con los criterios de inclusión propuestos.
- c) Voluntarios con antecedentes de padecimientos cardiovasculares, renales, hepáticos, musculares, metabólicos, gastrointestinales incluyendo estreñimiento, neurológicos, endocrinos, hematopoyéticos o cualquier tipo de anemia, asma, enfermedad mental u otras anormalidades orgánicas. Así como aquellos que tuvieron un traumatismo muscular dentro de los 21 días previos al estudio.
- d) Voluntarios que requirieron de cualquier medicamento durante el curso del estudio, aparte del medicamento que se encontraba en estudio.
- e) Voluntarios con antecedentes de dispepsia, de gastritis, esofagitis, úlcera duodenal o gástrica.
- f) Voluntarios que estuvieron expuestos a fármacos conocidos como inductores o inhibidores enzimáticos hepáticos o que tomaron medicamentos potencialmente tóxicos 30 días previos al estudio.
- g) Voluntarios que recibieron cualquier medicamento, durante 14 días o 5 vidas medias (cualquiera que sea más largo) previos al inicio del estudio.
- h) Voluntarios que fueron hospitalizados por cualquier problema durante los cuatro meses previos al inicio del estudio.
- i) Sujetos que hayan recibido fármacos en investigación 2 meses antes del presente estudio.
- j) Sujetos alérgicos a cualquier antibiótico y/o a los analgésicos antiinflamatorios no esteroideos.
- k) Sujetos que ingirieron alcohol o bebidas con xantinas (café, té, cocoa, chocolate, mate, refrescos de cola) o alimentos asados al carbón o jugo de toronja dentro de las 72 horas previas al inicio del periodo de hospitalización, o sujetos que fumaron tabaco dentro de las 72 horas previas al inicio del estudio.
- k) Sujetos que donaron o perdieron 450 mL o más de sangre dentro de los 2 meses previos al inicio del estudio.
- l) Sujetos con antecedentes de abuso de drogas y alcoholismo.

### 3.5.3. Retiro de voluntarios del estudio.

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

En caso del retiro de algún voluntario, todos los datos y muestras para biodisponibilidad, deben ser enviados a la valoración analítica con aviso a la Unidad Analítica y al patrocinador y monitores, quedando asentada la fecha y razón del porqué se retiran del estudio.

### 3.5.4. Evolución del estudio.

Los voluntarios del estudio fueron informados con relación al protocolo de estudio, se aclararon sus dudas y emitieron su consentimiento en forma escrita. El estado de salud de los voluntarios se determinaron mediante las pruebas señaladas en el sección 3.5.1.

Los voluntarios sanos fueron admitidos en la unidad clínica de IFaB, siendo hospitalizados entre las 19:00 y 20:00 horas del día correspondiente. Su estancia en las instalaciones de IFaB fue durante 36 horas desde su llegada y 22 horas a partir de la administración del medicamento. Recibieron en IFaB desayuno, comida y cena estandarizados. Una vez ingresados los voluntarios y asignado su lugar dentro del estudio, se verificó su adecuado estado de hidratación, signos vitales y se realizó prueba de abuso de drogas a todos los voluntarios. Recibieron cena y permanecieron en ayuno a partir de las 22:00 horas, los voluntarios pudieron consumir agua *ad libitum* hasta dos horas antes de la administración del medicamento. Al otro día por la mañana, los voluntarios fueron canalizados mediante un catéter en alguna de las venas del brazo y se tomó la muestra correspondiente al tiempo 0, este catéter fue retirado al egreso del voluntario o pudo haber sido antes en caso necesario. Las tomas correspondientes a 48, 72 y 96 horas se tomaron de forma directa.

A cada voluntario se le administró una cápsula de gelatina dura conteniendo 5 mg de Tacrolimus monohidrato, después de por lo menos 10 horas de ayuno y 3 horas antes del desayuno con 250 mL de agua. El medicamento se administró a todos los voluntarios en grupos de seis y dejando un tiempo de 3 minutos entre cada grupo.

Se tomaron muestras de sangre de 7 mL, con el sistema vacutainer en tubos estériles con EDTA como preservador. Estas se obtuvieron con una frecuencia temporal a los 10, 20, 30, 45, 60, 75, 90 y 105 minutos y 2, 2.5, 3, 4, 8, 12, 22, 48, 72 y 96 horas después de la administración.

La tolerancia para la toma de muestras fue de  $\pm 1$  minuto hasta las 22 horas y de  $\pm 2$ h de las 48 horas en adelante ya que el voluntario no estaba ya internado en IFaB. La sangre obtenida fue congelada inmediatamente a  $-70$  °C hasta su análisis en la unidad analítica. Se efectuó registro de signos vitales durante cada una de las tomas de las muestras.

La secuencia de dosificaciones y muestras de sangre entre los sujetos, se mantuvo de manera que los tiempos para estas actividades fuesen los mismos. La hora exacta en la que se tomó la muestra se registró con las iniciales de la persona que la tome en la Forma de Reporte de Caso correspondiente. Los voluntarios desayunaron tres horas después de la administración del medicamento.

No se tomó ningún otro medicamento durante el tiempo que duró el estudio a menos que sea necesario ante la presencia de reacciones adversas y autorizado por el Investigador Principal, lo cual debió quedar debidamente documentado en las Formas de Reporte de Caso y de Eventos Adversos correspondientes.

Los sujetos debieron reportar al personal médico responsable de la conducción del estudio cualquier síntoma que presentaron, asimismo el personal médico realizó un interrogatorio dirigido en cada uno de los momentos de las tomas sobre cualquier síntoma que presente el voluntario después de la administración del medicamento y si fue el caso debió quedar asentado en la Forma de Reporte de Caso correspondiente.

Antes de iniciar el estudio, debió efectuarse valoración clínica consistente en interrogatorio por aparatos y sistemas, con el fin de verificar que el voluntario es y sigue siendo apto para el estudio.

#### **3.5.5. Eventos adversos.**

Todos los signos y síntomas de eventos adversos que ocurrieron durante el estudio quedaron registrados en detalle en las formas de registro de eventos adversos correspondientes del sitio de Investigación Clínica. Esta descripción incluye la naturaleza de los signos y síntomas, fecha y hora en que ocurrió, severidad, si necesitó tratamiento o no y si los efectos pudieron o no ser atribuidos al medicamento. Cualquier reacción inusual o severa debió ser reportada dentro de las primeras 24 horas a la Comisión de Revisión, al responsable sanitario de la Unidad Clínica y de la Unidad Analítica, al monitor externo, a la autoridad sanitaria, al responsable del aseguramiento de la calidad y al patrocinador. Asimismo, el investigador clínico principal informaría por escrito dentro de los tres primeros días de ocurrido el evento a cada una de las partes mencionadas.

### **3.5.6. Cuantificación de las concentraciones de Tacrolimus en sangre total.**

Se recibieron 228 muestras recolectadas en el área clínica provenientes de 12 voluntarios sanos.

Las muestras fueron separadas por tiempos de muestreo y almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  en el ultracongelador, para permanecer allí hasta el momento de su análisis; el cual se llevó a cabo utilizando el método de cromatografía de alta resolución acoplado a un detector de masas previamente validado.

## 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

### 4.1. Desarrollo del método analítico

El equipo utilizado durante el desarrollo, validación y análisis de muestras fue un LC/MSD Modelo G1956B de Agilent Technologies.

### 4.2. Condiciones del detector y elección del estándar interno.

Las condiciones óptimas del detector para la cuantificación de tacrolimus se muestran en la tabla 7.

**Tabla 1. Condiciones del detector.**

Parámetro	Valor
Detector	LC/MSD
Interface	API-ES
Modo	Positivo
SIM ION	Tacrolimus 826.5
	Sirolimus 936.7
Fragmentador	Tacrolimus 180
	Sirolimus 200
Dwell (msec)	280
% rel Dwell	100
Flujo de gas de secado	9 L/min
Presión de nebulizador	44 psi
Temperatura del gas de secado	250°C
Voltaje del capilar	3500 V

La ciclosporina presentó inestabilidad iónica a las condiciones óptimas de análisis para tacrolimus, mientras que sirolimus, reflejó mayor reproducibilidad en las repuestas, por lo tanto, se eligió éste último como estándar interno.

**4.2.1. Condiciones cromatográficas.**

Las condiciones cromatográficas que mejor cumplieron con los parámetros anteriores se resumen en la tabla 8.

**Tabla 2. Condiciones Cromatográficas**

Parámetro	Descripción	
Columna cromatográfica	Zorbax C18 4.6 x 50 mm, 1.8 µm, 80 Å	
Temperatura de la columna	80 °C	
Fase Móvil	Acido fórmico 0.1% pH 2.6: Acetonitrilo 25:75 v/v %	
Velocidad de Flujo	1 mL / min	
Volumen de inyección	20µL	
Temperatura del Automuestreador	7°C	
Tiempo de Retención Aproximado	Tacrolimus	2.8 min
	Sirolimus	2.7 min

**4.2.2. Método de extracción.**

El método de extracción descrito a continuación es un método sencillo y rápido y es con el que obtuvimos mejores resultados. Ver figura 5.

- a) A 500 µL de sangre total añadir 1 mL de solución de Sirolimus 100ng/mL en una mezcla de acetonitrilo: metanol 3:1, utilizando pipeta repetidora Eppendorf y puntas de 1000 µL.
- b) Agitar en vortex 30 segundos.
- c) Centrifugar a 14, 500 rpm durante 5 min.
- d) Decantar el sobrenadante a un vial e inyectar 20 µL en el sistema cromatográfico.

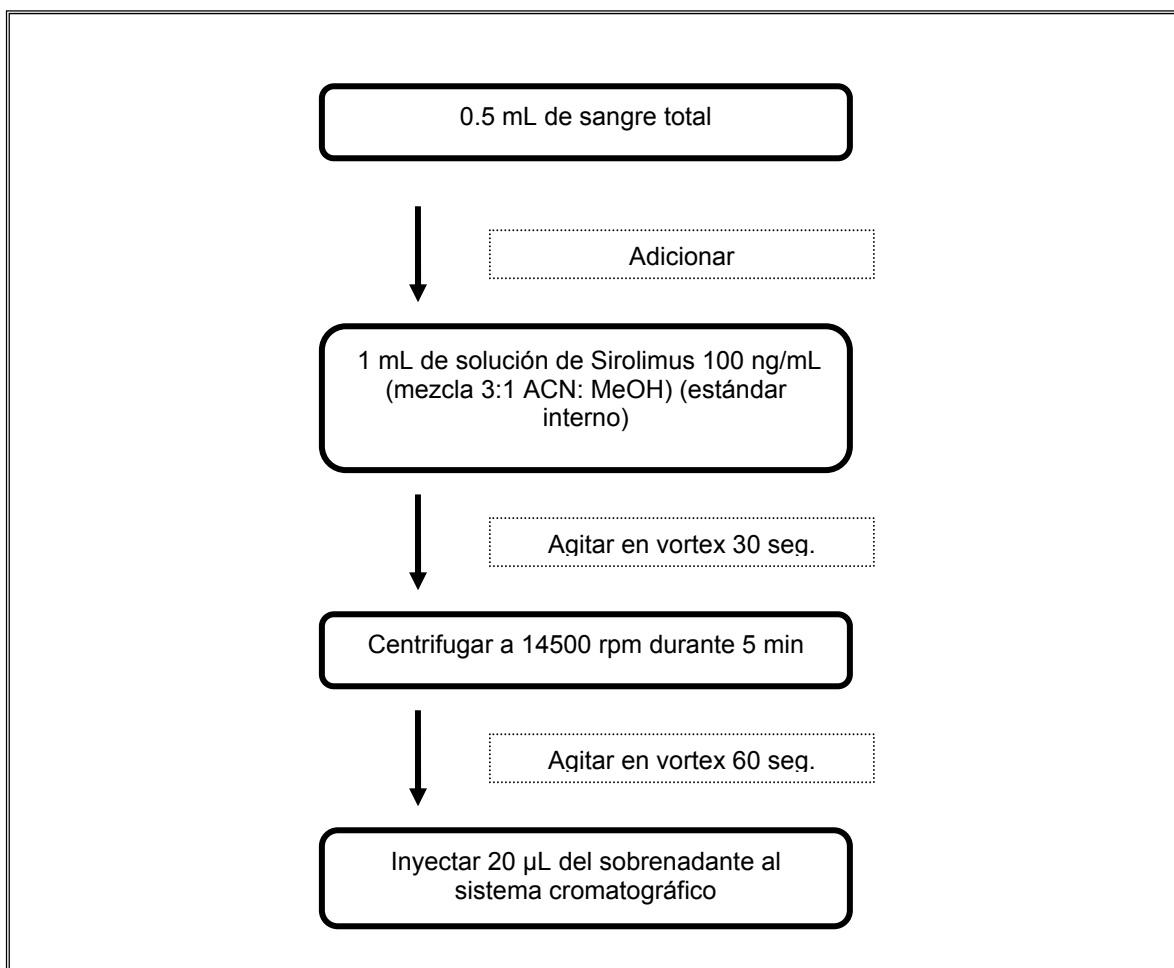


Fig. 1 Diagrama del Método de Extracción

### 4.3. Resultados de validación.

#### 4.3.1. Adecuabilidad del sistema.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en las corridas que se llevaron a cabo para validar el método (Tabla 9).

**Tabla 3. Adecuabilidad del sistema.**

No. de la corrida analítica	Analito	C.V%. del tiempo de retención (min)	C.V% del área (N=6)	C.V% de la relación de áreas (N=6)
1	Tacrolimus	0.1561	1.2501	0.4610
	Sirolimus	0.0842	1.0908	
2	Tacrolimus	0.1837	3.0468	0.7796
	Sirolimus	0.1696	3.5987	
3	Tacrolimus	0.1856	10.0725	2.3386
	Sirolimus	0.2067	11.7327	
4	Tacrolimus	0.1542	6.3728	1.1627
	Sirolimus	0.1606	6.8903	
5	Tacrolimus	0.2282	8.8283	0.4522
	Sirolimus	0.2216	9.0367	
6	Tacrolimus	0.1649	4.5833	1.0228
	Sirolimus	0.0922	4.0020	

Las corridas analíticas cumplen con el criterio de aceptación ya que se obtuvo un coeficiente de variación no mayor al 5% para el área (y/o relación de áreas) y tiempo de retención con  $CV\% \leq 2.0$ .

Adicionalmente cada día de análisis se comprobó que en la solución en la que se eluyen las muestras (blanco de reactivos) así como en la matriz biológica utilizada (blanco de sangre total) no existieran interferencias con el pico de interés. Ver figuras 9 y 10.

#### 4.3.2. Linealidad del método.

En la tabla 10 se muestran los resultados de la prueba de linealidad para cinco curvas de calibración en sangre total, expresados en Relación de Áreas de Tacrolimus/El con respecto a la concentración nominal. Las curvas fueron ajustadas a través de un arreglo lineal.

Ecuación de la línea recta:

$$y = a + b * x$$



**Tabla 4. Linealidad del método para cuantificar Tacrolimus en Sangre Total.**

Resultados de la linealidad del método para las corridas de la validación.									
Relación de Áreas									
CONC NOM (ng/mL)	1.0	1.5	2	3	10	20	40	60	100.0
CURVA 1	0.0091	0.0153	0.0195	0.0280	0.0930	0.1952	0.3897	0.5849	0.9652
CURVA 2	0.0097	0.0142	0.0163	*	0.0896	0.1818	0.3506	0.5344	0.8878
CURVA 3	0.0098	0.0138	0.0163	0.0245	0.0793	0.1532	0.3087	0.4689	0.7819
CURVA 4	0.0102	0.0141	0.0184	0.0290	0.0967	0.1911	0.3808	0.5674	0.9524
CURVA 5	0.0096	0.0153	0.0181	0.0302	0.0972	0.2015	0.3842	0.5729	0.9695
PROMEDIO	0.0097	0.0145	0.0177	0.0279	0.0912	0.1846	0.3628	0.5457	0.9114
DESV EST	0.0004	0.0007	0.0014	0.0025	0.0073	0.0189	0.0338	0.0468	0.0795
C.V. (%)	4.09	4.88	7.88	8.79	8.02	10.26	9.33	8.58	8.72

\* Valores no considerados por exceder el  $\pm 15\%$  de desviación con respecto a la concentración nominal.

En la tabla 11 se muestran los parámetros de linealidad del método para las corridas de validación y en la figura 6 se reportan los datos de pendiente (b), ordenada al origen (a) y coeficiente de correlación para las 5 curvas de calibración graficando concentración nominal vs relación de áreas TAC/EI.

**Tabla 5. Parámetros de linealidad del método para las corridas de validación.**

Parámetros de linealidad del método para las corridas de la validación			
Relación de Áreas			
	Pendiente	Ordenada	r
CURVA 1	0.0097	-1.3E-06	0.99997
CURVA 2	0.0089	5.1E-04	0.99997
CURVA 3	0.0078	5.1E-04	0.99997
CURVA 4	0.0095	2.8E-04	0.99999
CURVA 5	0.0097	7.0E-04	0.99992
PROMEDIO	0.0091		
DESV EST	0.0008		
C.V. (%)	8.85		

Las curvas de calibración cumplen con criterios de aceptación, ya que la mayoría de los puntos tienen desviaciones menores al 15 % con respecto de su valor nominal y  $r \geq 0.99$ .

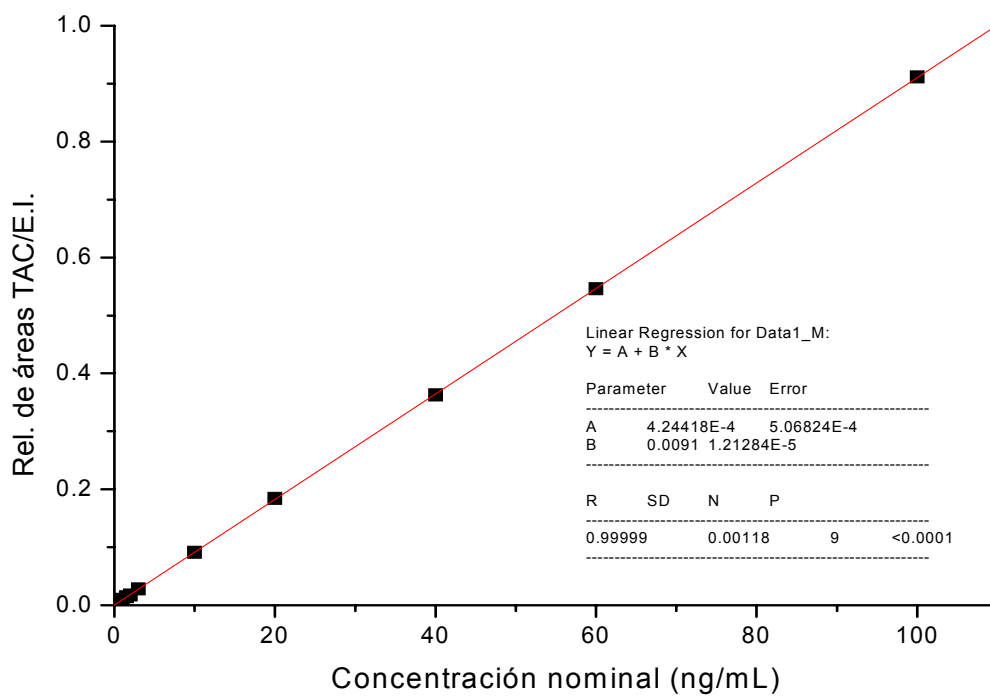


Fig. 2 Gráfico de Linealidad del Método

En la tabla 12 se muestran los resultados de la prueba de linealidad para cinco curvas de calibración en sangre total, expresados como concentración recuperada. En la tabla 13 se muestran los parámetros de linealidad del método para las Concentraciones Recuperadas.

**Tabla 6 Concentraciones obtenidas al aplicar el arreglo lineal.**

Resultados de la linealidad del método para las corridas de la validación. Concentración Recuperada (ng/mL)									
CONC NOM (ng/mL)	1.0	1.5	2	3	10	20	40	60	100.0
CURVA 1	0.937	1.581	2.010	2.892	9.605	20.156	40.248	60.399	99.67
CURVA 2	1.034	1.545	1.781	*	10.041	20.434	39.468	60.179	100.02
CURVA 3	1.187	1.709	2.021	3.081	10.108	19.587	39.526	60.068	100.21
CURVA 4	1.048	1.455	1.909	3.017	10.141	20.076	40.031	59.657	100.17
CURVA 5	0.920	1.514	1.807	3.059	10.001	20.806	39.730	59.283	100.38
PROMEDIO	1.025	1.561	1.906	3.012	9.979	20.212	39.801	59.917	100.090
DESV EST	0.107	0.095	0.111	0.084	0.216	0.451	0.333	0.445	0.267
C.V. (%)	10.42	6.08	5.84	2.80	2.17	2.23	0.84	0.74	0.27
% DESV ABS	2.52	4.05	4.72	0.41	0.21	1.06	0.50	0.14	0.09

\* Valores no considerados por exceder el  $\pm 15\%$  de desviación con respecto a la concentración nominal.

**Tabla 7 Parámetros de las concentraciones obtenidas al aplicar el arreglo lineal.**

Parámetros de linealidad del método para las corridas de la validación Concentración Recuperada (ng/mL)			
	Pendiente	Ordenada	r
CURVA 1	0.99998	2.3E-04	0.99997
CURVA 2	1.00002	-2.6E-04	0.99997
CURVA 3	0.99998	2.1E-04	0.99997
CURVA 4	1.00004	-4.9E-04	0.99999
CURVA 5	1.00000	-1.2E-04	0.99992
PROMEDIO	1.000005		
DESV EST	0.00003		
C.V. (%)	0.00299		

**4.3.3. Precisión del método.**

**Repetibilidad y exactitud intradía.**

En la tabla 14 se ilustran los resultados correspondientes a la repetibilidad, en los cuales se puede observar que el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración evaluados fue menor o igual que 3.82%, mientras que la desviación absoluta (Desv. Abs %) fue menor o igual que 3.48%.

**Tabla 8. Repetibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar Tacrolimus en Sangre Total.**

<i>Muestra</i>	<i>Control Bajo (5 ng/mL)</i>	<i>Control Medio (50 ng/mL)</i>	<i>Control Alto (80 ng/mL)</i>
1	5.257	48.567	77.632
2	5.207	50.038	78.675
3	5.420	49.198	76.923
4	5.094	49.532	78.421
5	4.889	51.224	78.548
<i>Promedio</i>	<b>5.17</b>	<b>49.71</b>	<b>78.04</b>
<i>D. E</i>	<b>0.20</b>	<b>1.00</b>	<b>0.74</b>
<i>C. V (%)</i>	<b>3.82</b>	<b>2.01</b>	<b>0.95</b>
<i>Conc. Nominal (ng/mL)</i>	<b>5</b>	<b>50</b>	<b>80</b>
<i>Desv. Abs. (%)</i>	<b>3.48</b>	<b>0.58</b>	<b>2.45</b>

**Reproducibilidad y exactitud interdía.**

En la tabla 15 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método y exactitud interdía correspondiente, en donde se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de trabajo fue de 1.87 a 3.54%, mientras que la desviación absoluta % fue igual o menor a 2.08%, en las diferentes concentraciones evaluadas.

**Tabla 9. Reproducibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar Tacrolimus en Sangre Total entre días.**

<i>Día</i>	<i>Control Bajo (5 ng/mL)</i>	<i>Control Medio (50 ng/mL)</i>	<i>Control Alto (80 ng/mL)</i>
<i>Día 1</i>	5.257	48.567	77.632
	5.207	50.038	78.675
	5.420	49.198	76.923
	5.094	49.532	78.421
	4.889	51.224	78.548
<i>Día 2</i>	5.014	48.393	80.998
	4.892	48.487	80.955
	5.020	49.708	80.635
	4.960	46.471	81.631
	4.966	48.610	80.411
<i>Día 3</i>	5.176	47.169	79.147
	4.765	46.978	80.928
	4.936	50.187	80.506
	4.939	50.079	80.783
	4.814	49.767	81.597
<i>Promedio</i>	<b>5.023</b>	<b>48.960</b>	<b>79.853</b>
<i>D. E</i>	<b>0.178</b>	<b>1.331</b>	<b>1.494</b>
<i>C. V (%)</i>	<b>3.54</b>	<b>2.72</b>	<b>1.87</b>
<i>Conc. Nominal (ng/mL)</i>	<b>5</b>	<b>50</b>	<b>80</b>
<i>Desv. Abs. (%)</i>	<b>0.47</b>	<b>2.08</b>	<b>0.19</b>

De acuerdo con los resultados generados, el método fue repetible, reproducible y exacto al cumplir con los criterios de un coeficiente de variación y una desviación absoluta % no mayores al 15% para la concentración en sangre total promedio.

**4.3.4. Recobro.**

Recobro absoluto del método analítico para cuantificar Tacrolimus en Sangre Total.

El recobro fue definido como el cociente de la respuesta del analito (área de tacrolimus) obtenida después de haberse sometido al método de extracción en fluido biológico (sección 4.2.2 “Método de extracción” pág. 47), entre la respuesta obtenida en muestras en solución a concentraciones equivalentes, las cuales no fueron sometidas al proceso de extracción (muestras para evaluación del sistema). Los resultados se muestran en la tabla 16. En la tabla 17 se encuentran los resultados del recobro global para el estándar interno.

**Tabla 10. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar Tacrolimus en Sangre Total.**

	ÁREAS		Recobro	% Desv
	SISTEMA	MÉTODO		
<i>Control Bajo (5 ng/mL)</i>	1517.1781	906.1701		
	1499.9816	914.1771		
	1529.0555	932.6667		
	1540.1124	908.4059		
	1490.2300	932.7080		
<i>Promedio</i>	<b>1515.3</b>	<b>918.8</b>	<b>60.64</b>	<b>0.18</b>
<i>Control Medio (50 ng/mL)</i>	15144.7588	9436.0303		
	15283.4668	9228.3789		
	15101.5527	9239.1982		
	15049.7725	9003.9043		
	14974.0303	9341.4141		
<i>Promedio</i>	<b>15110.7</b>	<b>9249.8</b>	<b>61.21</b>	<b>0.77</b>
<i>Control Alto (80 ng/mL)</i>	23850.5762	14864.7754		
	24177.3809	15666.0664		
	24242.8672	14765.5430		
	24141.6504	14036.7588		
	23637.3809	13171.0322		
<i>Promedio</i>	<b>24010.0</b>	<b>14500.8</b>	<b>60.40</b>	<b>0.58</b>
	<b>Promedio global</b>		<b>60.75</b>	<b>0.51</b>

El recobro del método analítico para cuantificar Tacrolimus en sangre total fue constante en las concentraciones evaluadas (puntos control bajo, medio y alto), dando como resultado un recobro global del 60.75% y una desviación de los promedios individuales con respecto al global, menor al 15%.

Recobro global absoluto de Sirolimus (EI).

**Tabla 11. Recobro global absoluto del método analítico para cuantificar Sirolimus en Sangre Total.**

	AREA	
	SISTEMA	MÉTODO
100 ng/mL	24791.1777	18900.8418
	24627.6602	19539.3945
	24029.8203	19429.6348
	23838.2285	19150.9727
	24683.7500	19638.7266
	23520.3594	20500.0879
	24099.8320	20009.8867
	24677.6406	19541.8379
	24079.3691	20369.8516
	23582.0508	20203.9785
	23498.0176	19299.1973
	24201.7207	20350.3066
	23568.0937	19256.5527
	23389.6895	18082.9180
	22624.1152	17225.0273
Promedio	<b>23947.4</b>	<b>19433.3</b>
	<b>Recobro</b>	<b>81.15</b>

El recobro global absoluto para cuantificar Sirolimus en matriz biológica es de 81.15%.

#### 4.3.5. Límite de detección y cuantificación.

La sensibilidad del método fue determinada a partir de la concentración mínima cuantificable ó límite de cuantificación (LC) y del límite de detección (LD). En la tabla 18 se muestran los resultados:

**Tabla 12. Límite de detección y cuantificación del método analítico para cuantificar Tacrolimus en sangre total.**

<i>Muestra</i>	<i>Concentración (0.5 ng/mL)</i>	<i>Concentración (1.0 ng/mL)</i>
1	0.788	0.827
2	0.748	1.177
3	0.603	1.111
4	0.635	0.835
5	0.678	1.088
<i>Promedio</i>	<b>0.690</b>	<b>1.007</b>
<i>D. E</i>	<b>0.08</b>	<b>0.16</b>
<i>C. V (%)</i>	<b>11.17</b>	<b>16.35</b>
<i>Conc. Nominal (ng/mL)</i>	<b>0.5</b>	<b>1.0</b>
<i>Desv. Abs. (%)</i>	<b>38.05</b>	<b>0.75</b>

La Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, indica que el LC es la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor promedio no se desvía más del  $\pm 20\%$  del valor nominal (concentración adicionada), con un coeficiente de variación menor o igual que 20%; mientras que el LD se define como la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica se distingue del nivel de ruido (aproximadamente tres veces mayor) y el coeficiente de variación de la concentración recuperada (precisión) y/o la desviación absoluta por ciento (exactitud) son mayores al 20%.

De acuerdo a los criterios anteriores, el límite de cuantificación establecido para esta metodología fue de 1 ng/mL (precisión y exactitud de 16.35% y 0.75% respectivamente).

Por otro lado, la concentración nominal de 0.5 ng/mL fue considerada como el LD, debido a que la relación señal/ruido que se presenta a este nivel es mayor a 3 (ver figuras 7 y 8).



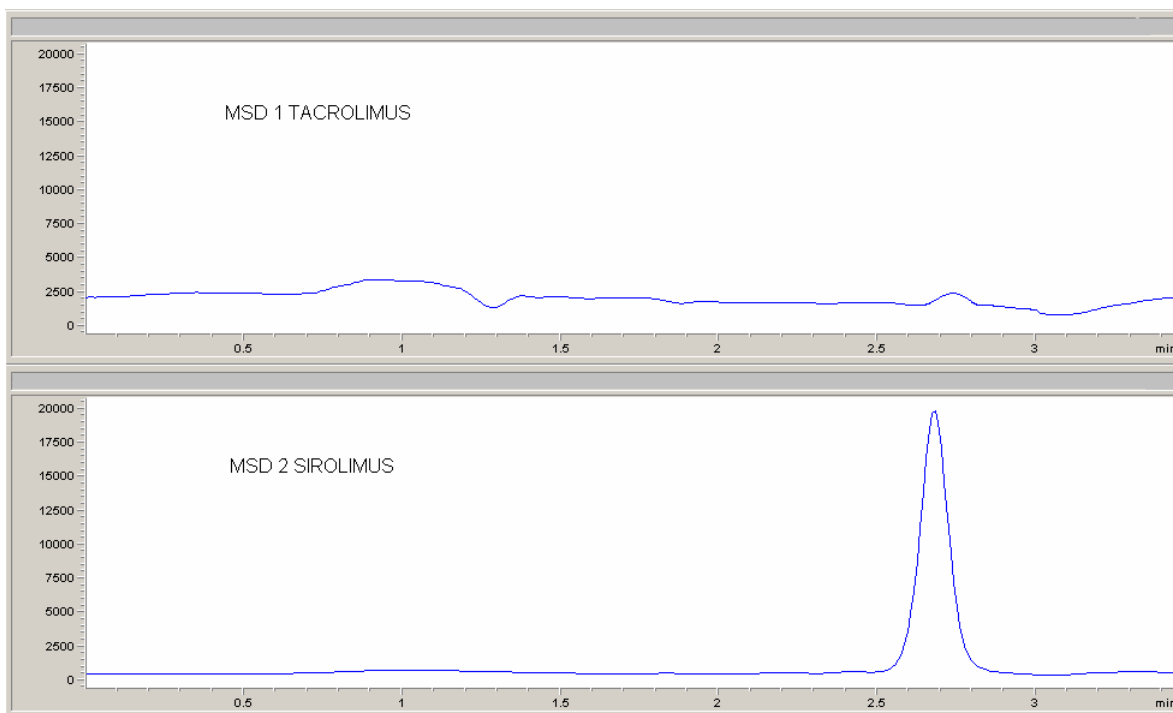


Fig. 3 Límite de Detección

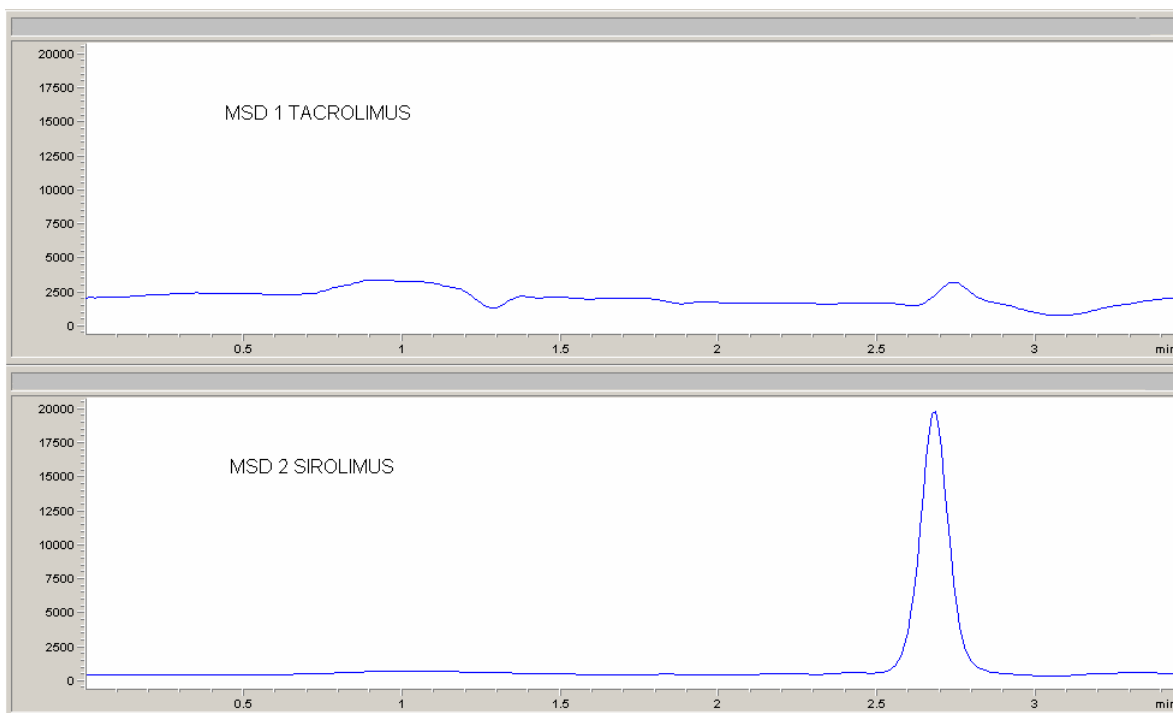


Fig. 4 Límite de Cuantificación

#### 4.3.6. Selectividad

La selectividad del método fue determinada, analizando sangre total proveniente de seis diferentes donadores, así como la mezcla de éstos y muestras de sangre total conteniendo fármacos de uso común, como ácido acetilsalicílico (300 µg/mL), paracetamol (20µg/mL), naproxeno (100 µg/mL), cafeína (80 µg/mL) y los anticoagulantes (Heparina 143 unidades USP y EDTA), evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de tacrolimus y el EI. El método mostró ser selectivo para los compuestos evaluados al no presentarse interferencias con el pico cromatográfico de tacrolimus ni el EI. Ver fig. 9 – 16.

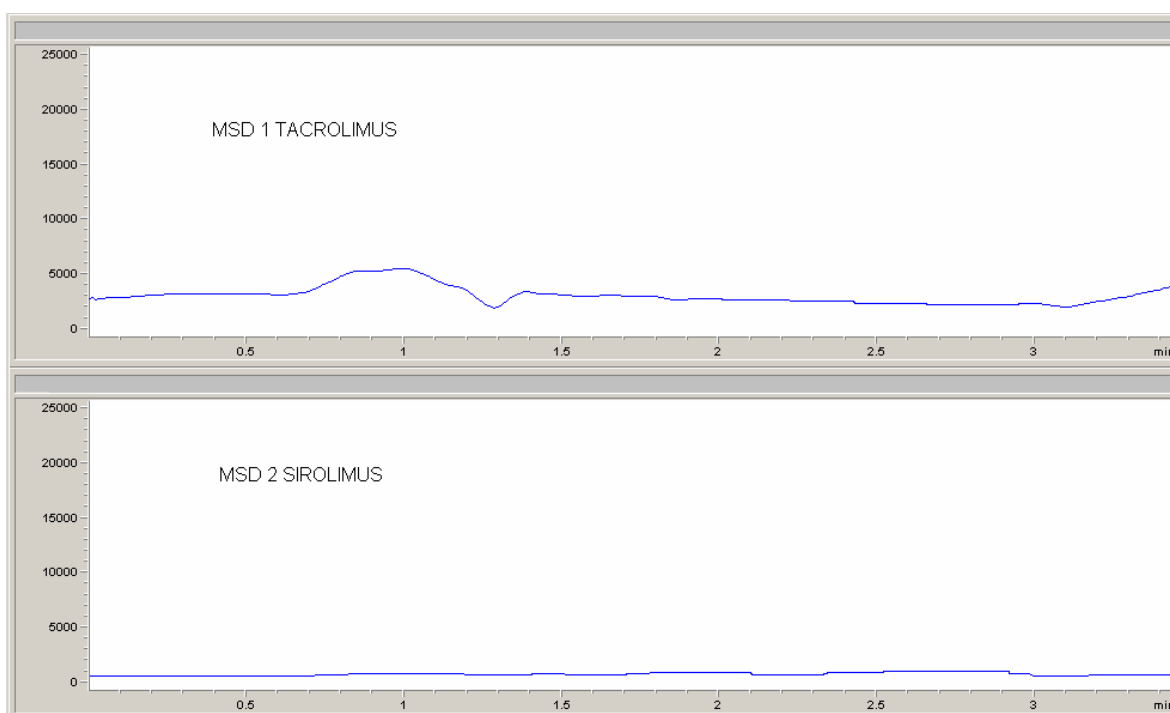


Fig. 5 Blanco de Reactivos

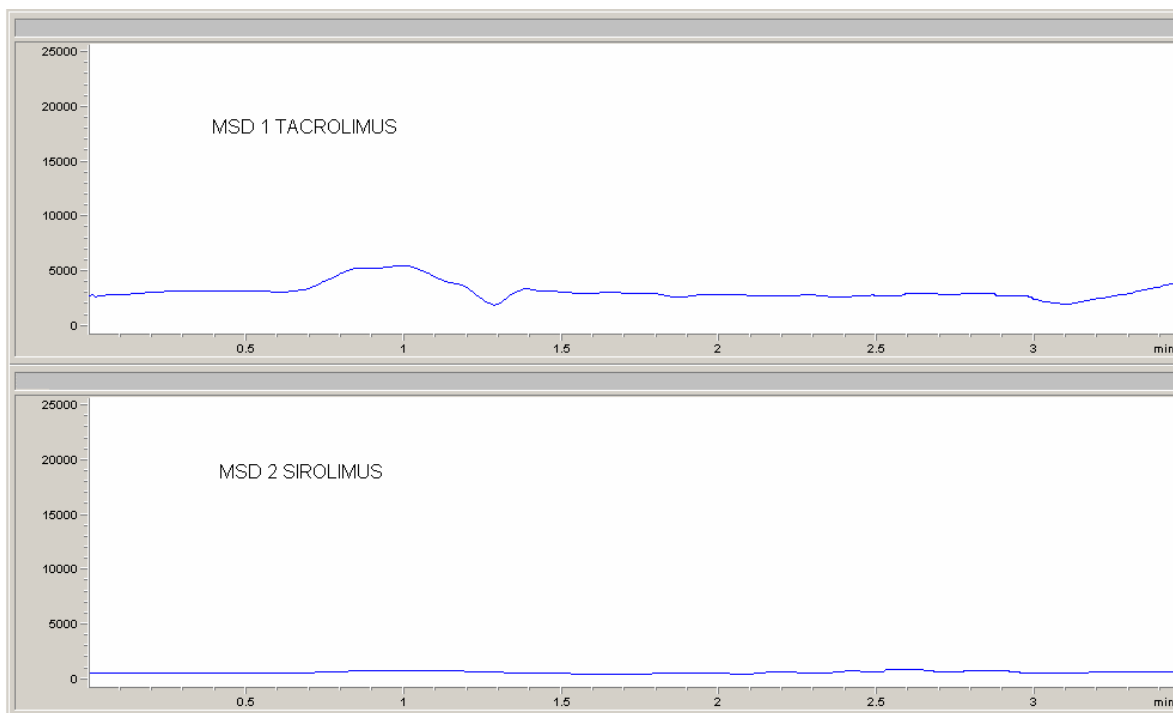


Fig. 6 Selectividad del Método por la mezcla de Sangre Total

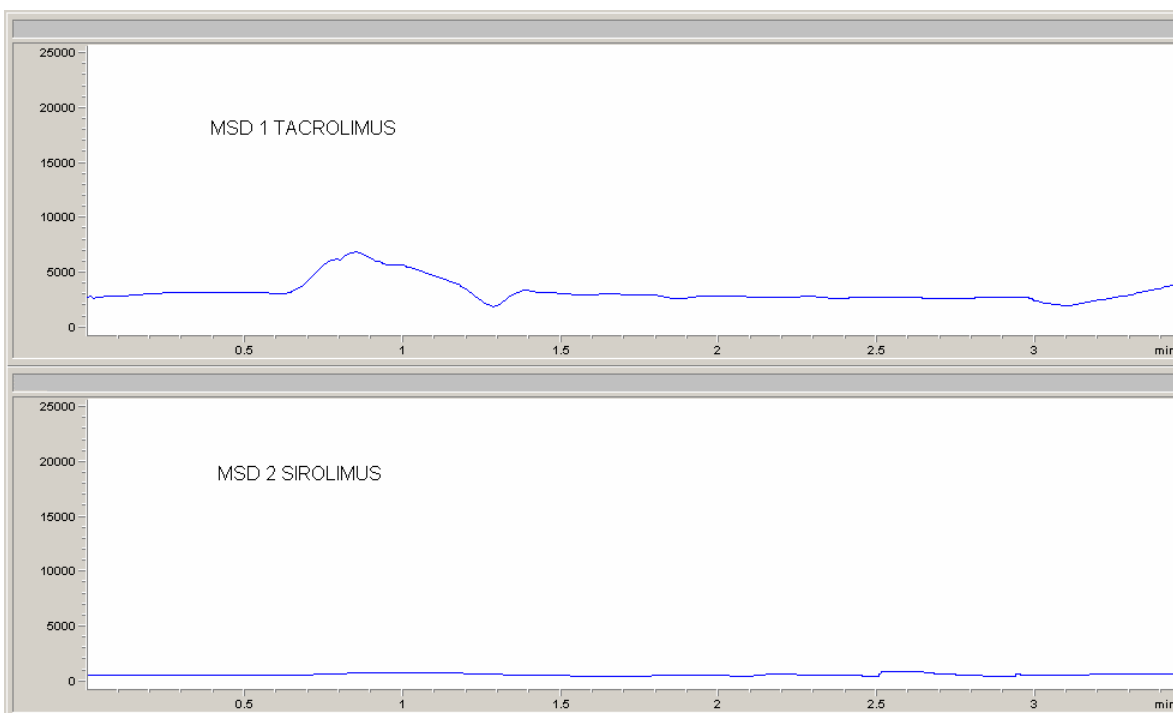


Fig. 7 Selectividad del Método para Ácido acetilsalicílico

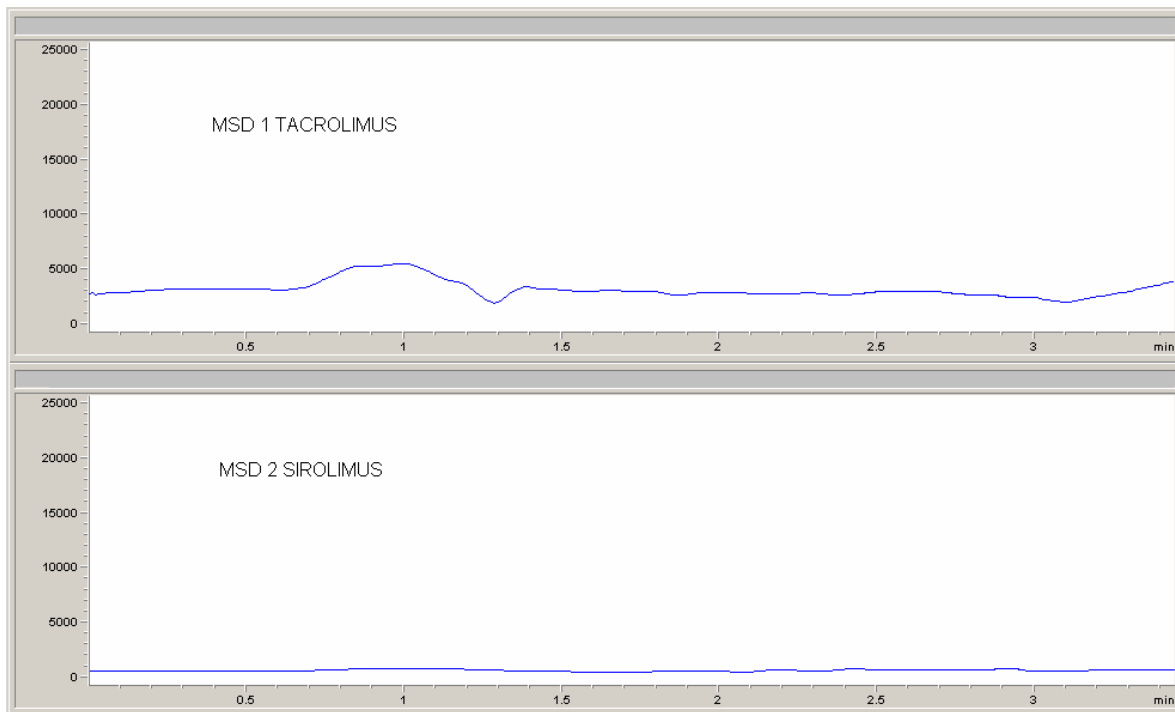


Fig. 8 Selectividad del método para Paracetamol

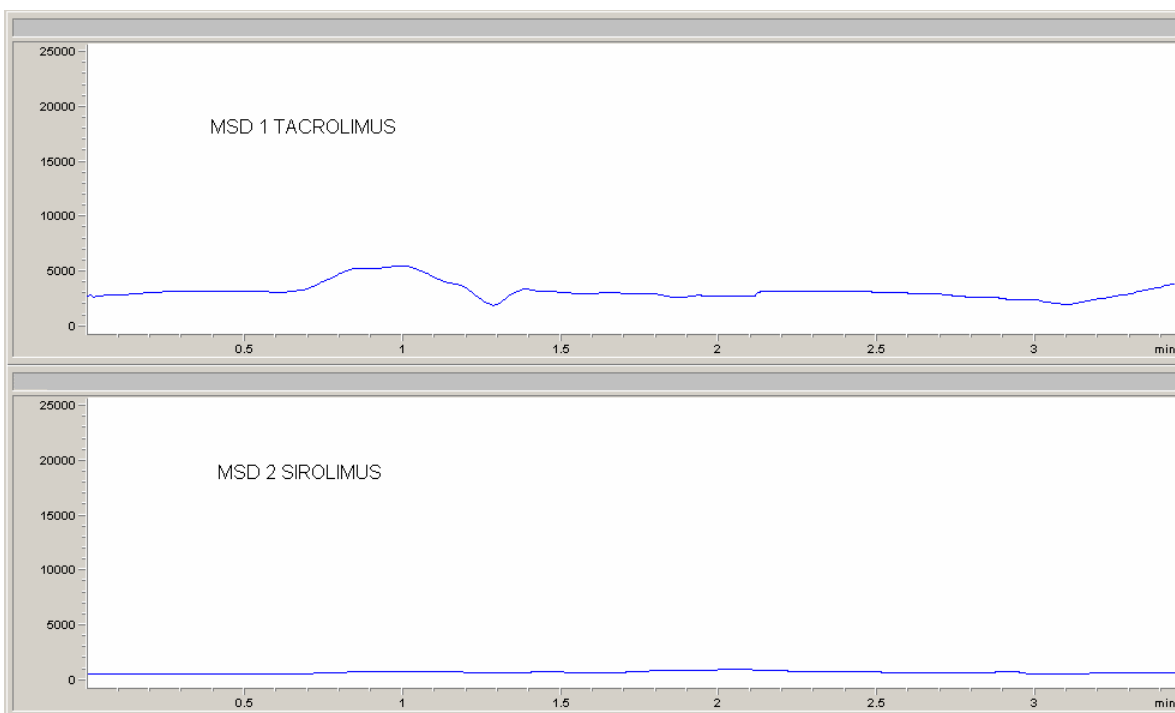


Fig. 9 Selectividad del Método para Naproxen

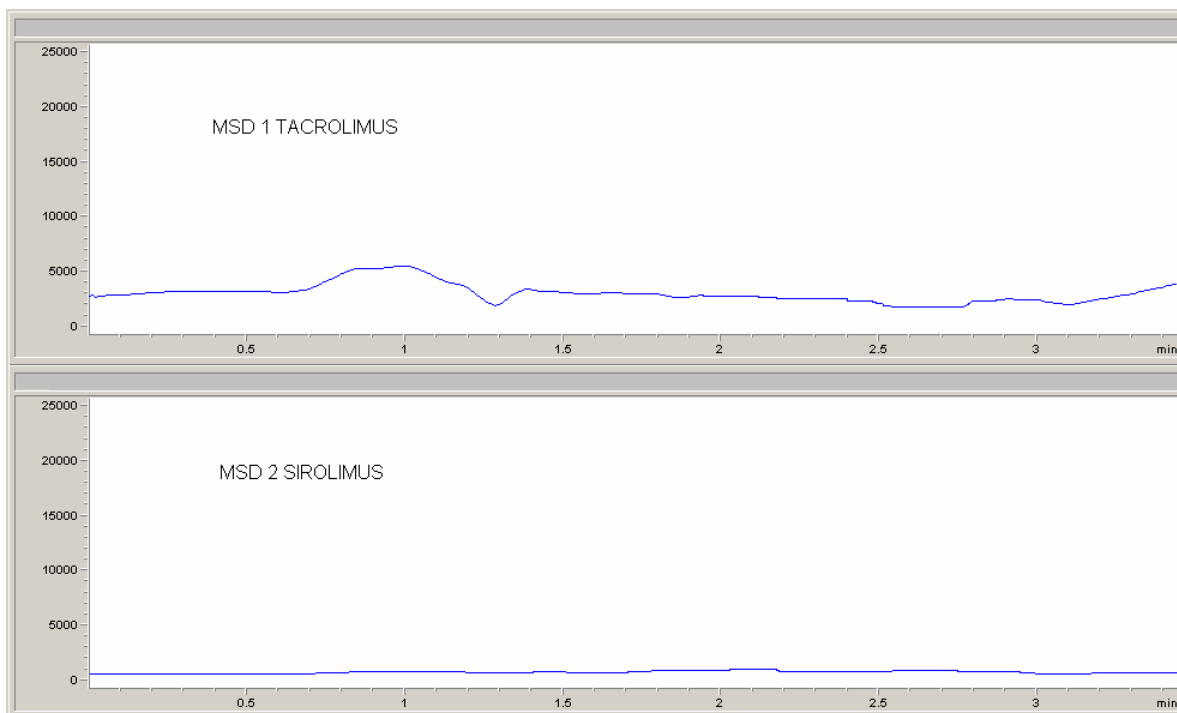


Fig. 10 Selectividad del Método para Cafeína

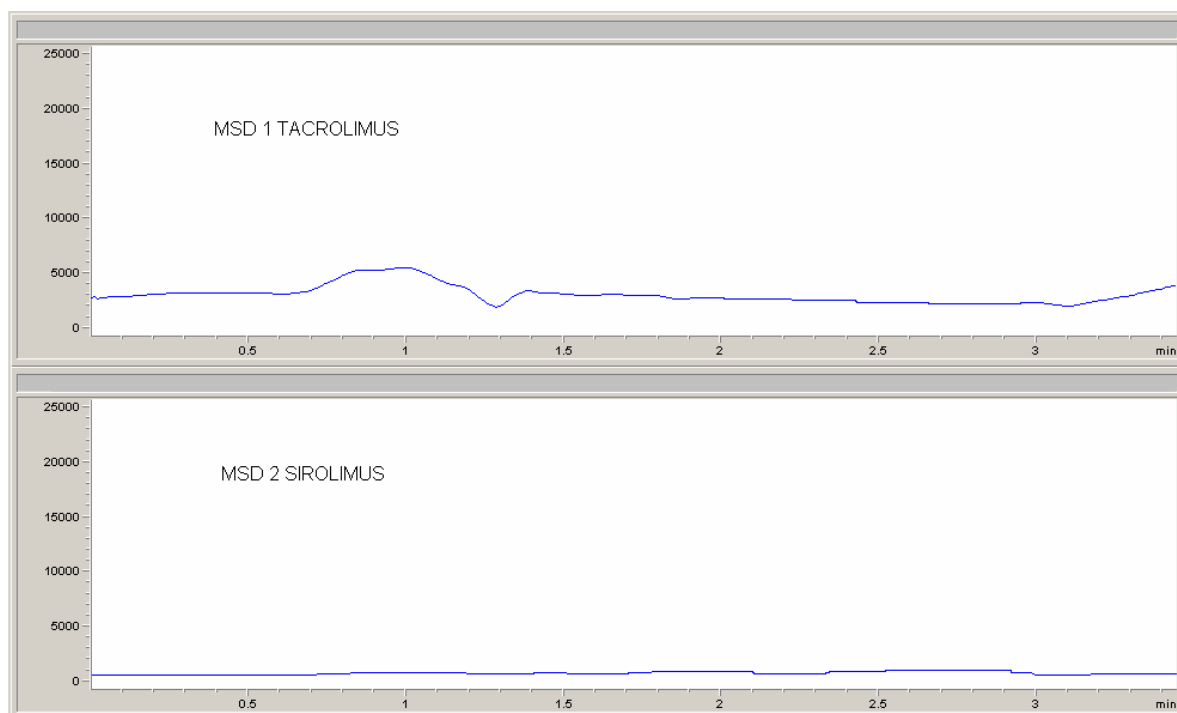


Fig. 11 Selectividad del Método para Heparina

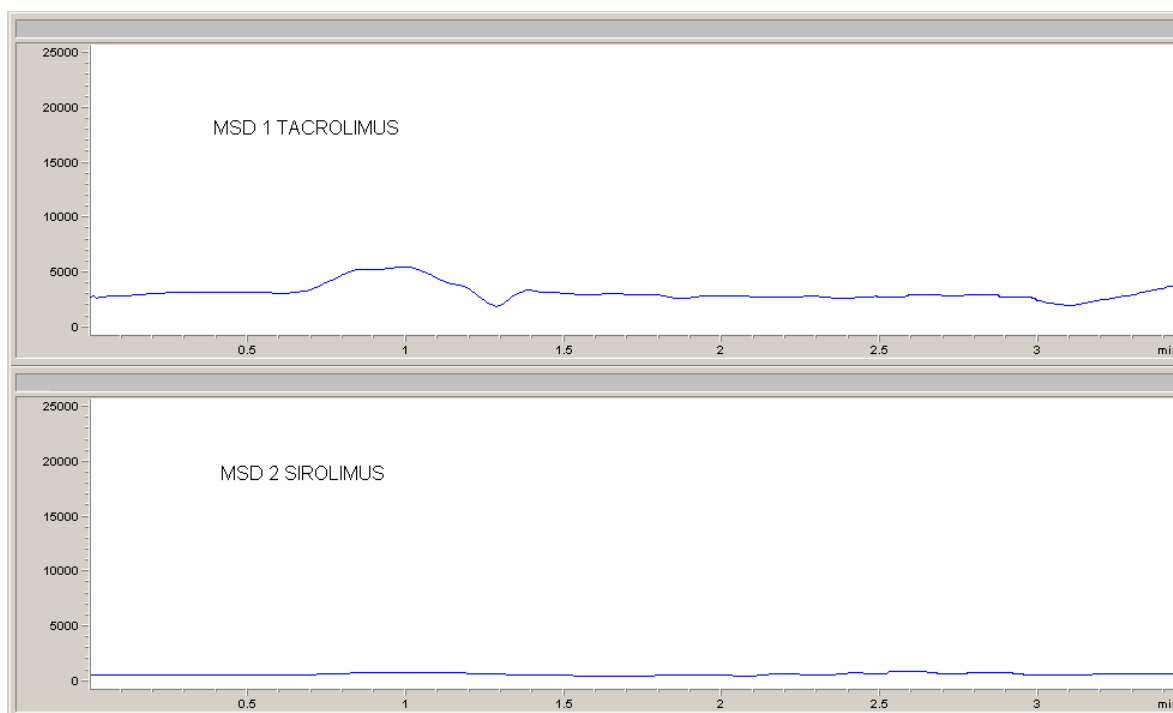


Fig. 12 Selectividad del Método para EDTA

#### 4.3.7. Estabilidad.

La prueba de estabilidad tiene como función determinar el efecto de los cambios de temperatura sobre la estabilidad del analito (ciclos congelación/descongelación), así como de las condiciones de temperatura y tiempo en las que el compuesto permanece estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, evaluando la concentración recuperada del compuesto por analizar en la matriz biológica.

##### **Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación en matriz biológica.**

La estabilidad de Tacrolimus en sangre total bajo ciclos congelación-descongelación fue evaluada como a continuación se describe:

Se prepararon por triplicado, muestras en sangre total de Tacrolimus a las siguientes concentraciones: 5, 50 y 80 ng/mL. Una serie de tres controles de cada concentración fueron analizados en el momento de su preparación (tiempo cero) de acuerdo al método analítico establecido y el resto se congeló a -70 °C.

Las muestras fueron sometidas a tres ciclos de congelación-descongelación, dejando las muestras un periodo mínimo de 12 horas a -70°C entre cada ciclo. En la tabla 19 se muestran los resultados del análisis de las muestras.

Tabla 13. Estabilidad en ciclos congelación-descongelación en sangre total.

<b>Muestra</b>	<b>Control Bajo (5 ng/mL)</b>	<b>Control Medio (50 ng/mL)</b>	<b>Control Alto (80 ng/mL)</b>
<i>Condición Inicial (t= 0 h)</i>			
1	4.92	49.99	78.88
2	4.83	49.58	77.84
3	4.84	49.22	79.40
<i>Promedio</i>	<b>4.87</b>	<b>49.60</b>	<b>78.71</b>
<i>D.E</i>	<b>0.050</b>	<b>0.387</b>	<b>0.794</b>
<i>C.V. (%)</i>	<b>1.02</b>	<b>0.78</b>	<b>1.01</b>
<i>1er. Ciclo</i>			
1	4.87	53.28	85.31
2	5.19	53.01	82.53
3	5.12	50.69	82.64
<i>Promedio</i>	<b>5.06</b>	<b>52.33</b>	<b>83.49</b>
<i>D.E</i>	<b>0.170</b>	<b>1.426</b>	<b>1.571</b>
<i>C.V. (%)</i>	<b>3.35</b>	<b>2.72</b>	<b>1.88</b>
<i>Desv. Abs. (%)</i>	<b>4.00</b>	<b>5.51</b>	<b>6.08</b>
<i>3er. Ciclo</i>			
1	5.18	51.57	82.35
2	4.94	51.21	83.81
3	5.03	50.80	80.98
<i>Promedio</i>	<b>5.05</b>	<b>51.19</b>	<b>82.38</b>
<i>D.E</i>	<b>0.118</b>	<b>0.384</b>	<b>1.417</b>
<i>C.V. (%)</i>	<b>2.34</b>	<b>0.75</b>	<b>1.72</b>
<i>Desv. Abs. (%)</i>	<b>3.76</b>	<b>3.22</b>	<b>4.67</b>

Como se puede observar no hubo resultados del segundo ciclo de congelación-descongelación por haberse rechazado la corrida, debido a que el equipo se detuvo durante ésta. Sin embargo las muestras fueron estables durante tres ciclos congelación-descongelación ya que el tercer ciclo presenta desviaciones dentro del 15% con respecto al valor de referencia (tiempo cero).

**Estabilidad a temperatura ambiente y refrigeración en matriz biológica.**

Para evaluar la estabilidad de tacrolimus en sangre total almacenada a temperatura ambiente y en refrigeración, se prepararon por triplicado muestras de las siguientes concentraciones: 5, 50 y 80 ng/mL. Se analizaron una serie de tres controles de cada concentración de manera inmediata (tiempo cero), dos series mas de tres muestras cada una fueron almacenadas a temperatura ambiente y otras dos en refrigeración para ser procesadas y analizadas a las 24 y 48 horas.

En las tablas 20 y 21 se muestran los resultados del análisis de las muestras anteriores. Se puede observar que las muestras almacenadas a temperatura ambiente y en refrigeración son estables únicamente durante 24 horas, mostrando una desviación absoluta % con respecto al valor original menor o igual que  $\pm 15\%$ . No hubo resultados a las 48 horas por haberse rechazado la corrida correspondiente, debido a causas ya antes mencionadas.

**Tabla 14. Estabilidad a temperatura ambiente de tacrolimus en sangre total.**

Muestra	Control Bajo (5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (80 ng/mL)
<i>Condición Inicial (t= 0 h)</i>			
1	4.92	49.99	78.88
2	4.83	49.58	77.84
3	4.84	49.22	79.40
<i>Promedio</i>	<b>4.87</b>	<b>49.60</b>	<b>78.71</b>
<i>D.E</i>	<b>0.050</b>	<b>0.387</b>	<b>0.794</b>
<i>C.V. (%)</i>	<b>1.02</b>	<b>0.78</b>	<b>1.01</b>
<i>24 h</i>			
1	5.47	52.72	81.92
2	4.92	51.12	80.07
3	5.13	49.95	84.84
<i>Promedio</i>	<b>5.17</b>	<b>51.26</b>	<b>82.28</b>
<i>D.E</i>	<b>0.280</b>	<b>1.394</b>	<b>2.406</b>
<i>C.V. (%)</i>	<b>5.42</b>	<b>2.72</b>	<b>2.92</b>
<i>Desv. Abs. (%)</i>	<b>6.32</b>	<b>3.36</b>	<b>4.53</b>



Tabla 15. Estabilidad en refrigeración de tacrolimus en sangre total.

Muestra	Control Bajo (5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (80 ng/mL)
<i>Condición Inicial (t= 0 h)</i>			
1	4.92	49.99	78.88
2	4.83	49.58	77.84
3	4.84	49.22	79.40
<i>Promedio</i>	<b>4.87</b>	<b>49.60</b>	<b>78.71</b>
<i>D.E</i>	<b>0.050</b>	<b>0.387</b>	<b>0.794</b>
<i>C.V. (%)</i>	<b>1.02</b>	<b>0.78</b>	<b>1.01</b>
<i>24 h</i>			
1	5.28	51.12	81.20
2	4.87	51.94	82.67
3	5.21	50.72	85.06
<i>Promedio</i>	<b>5.12</b>	<b>51.26</b>	<b>82.98</b>
<i>D.E</i>	<b>0.223</b>	<b>0.623</b>	<b>1.945</b>
<i>C.V. (%)</i>	<b>4.35</b>	<b>1.22</b>	<b>2.34</b>
<i>Desv. Abs. (%)</i>	<b>5.22</b>	<b>3.36</b>	<b>5.42</b>

#### Estabilidad de la muestra procesada.

Para determinar la estabilidad de la muestra procesada se preparó por triplicado suficiente muestra de Tacrolimus en sangre total, a tres niveles de concentración (bajo, medio y alto), las cuales se sometieron al procedimiento de extracción establecido y se inyectaron en el sistema cromatográfico (tiempo cero). Los controles permanecieron en el automuestreador a 7°C y fueron inyectadas a las 96 horas. Los resultados se presentan en la tabla 22, en la cual se puede observar que el Tacrolimus fue estable en la solución de inyección hasta 96 horas posteriores a su preparación, ya que la concentración recuperada promedio para cada día de análisis cumple con el criterio establecido.

Tabla 16. Estabilidad de la muestra procesada.

Muestra	Control Bajo (5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (80 ng/mL)
<i>Condición Inicial (t= 0 h)</i>			
1	4.92	49.99	78.88
2	4.83	49.58	77.84
3	4.84	49.22	79.40
<i>Promedio</i>	<b>4.87</b>	<b>49.60</b>	<b>78.71</b>
<i>D.E</i>	<b>0.050</b>	<b>0.387</b>	<b>0.794</b>
<i>C.V. (%)</i>	<b>1.02</b>	<b>0.78</b>	<b>1.01</b>
<i>24 h</i>			
1	5.02	53.29	79.73
2	5.28	52.42	80.75
3	5.15	51.80	83.68
<i>Promedio</i>	<b>5.15</b>	<b>52.50</b>	<b>81.39</b>
<i>D.E</i>	<b>0.387</b>	<b>0.750</b>	<b>2.047</b>
<i>C.V. (%)</i>	<b>7.52</b>	<b>1.43</b>	<b>2.51</b>
<i>Desv. Abs. (%)</i>	<b>5.89</b>	<b>5.86</b>	<b>3.40</b>
<i>96 h</i>			
1	5.17	49.50	77.80
2	4.84	45.77	80.39
3	4.92	48.62	70.54
<i>Promedio</i>	<b>4.98</b>	<b>47.96</b>	<b>76.24</b>
<i>D.E</i>	<b>0.171</b>	<b>1.950</b>	<b>5.103</b>
<i>C.V. (%)</i>	<b>3.44</b>	<b>4.07</b>	<b>6.69</b>
<i>Desv. Abs. (%)</i>	<b>2.27</b>	<b>3.29</b>	<b>3.13</b>

#### 4.3.8. Tolerancia.

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

Se evaluó la capacidad del método para cuantificar muestras empleando un volumen parcial de muestra. La prueba se realizó cuantificando tres muestras de 80 ng/mL empleando la mitad del volumen (0.25 mL), completando a 0.5 mL con mezcla de sangre total y sometiénolas a las condiciones establecidas para la extracción. Se consideró que la prueba era aceptable si la desviación absoluta % del promedio de las muestras con respecto al muestras procesadas por el método original (80 ng/mL) no excedía el 15%. Los resultados se muestran en la tabla 23.

Tabla 17. Integridad de la dilución del método analítico para cuantificar Tacrolimus en sangre total con volumen parcial de muestra (dentro de la curva de calibración).

MUESTRA DE 80 ng/mL		
CONDICIONES ORIGINALES	CONCENTRACIÓN INTERPOLADA	
	85.19	
	79.84	
	81.02	
Promedio	<b>82.02</b>	
D. E	<b>2.809</b>	
C. V (%)	<b>3.43</b>	
CONDICIONES MODIFICADAS	CONCENTRACIÓN INTERPOLADA (CI)	CI * Factor de dilución (FD) (2)
	42.63	85.25
	40.44	80.87
	40.63	81.26
	Promedio	<b>82.46</b>
	D. E	<b>2.424</b>
	C. V (%)	<b>2.94</b>
	Desv. Abs. (%)	<b>0.54</b>

Los resultados nos muestran que en caso de que no hubiera suficiente muestra, se podría utilizar un volumen menor para procesarla sin que se vea comprometido el resultado.

#### 4.4. Etapa clínica.

En el estudio clínico participaron 12 voluntarios (hombres) clínicamente sanos demostrado a través de exámenes de laboratorio.

#### 4.5. Estadística demográfica descriptiva.

De los voluntarios incluidos en el estudio se calcularon los siguientes parámetros demográficos: la Media, Desviación Estándar (Desv. Est.), Error Estándar (Error Est.), Mínimo (Min), Mediana, Máximo (Max.) y Coeficiente de Variación (CV%) de las variables demográficas de edad, peso, talla e índice de masa corporal (IMC). Ver la tabla 24. Los datos demográficos individuales se encuentran en el Anexo II.

**Tabla 18. Estadística Descriptiva de las Variables Demográficas.**

Variable	Genero	N	Media	Desv. Est.	Error Est.	Min.	Mediana	Max.	CV%
Edad (años)	Hombres	12	25.00	6.00	1.73	18.00	24.00	39.00	24.00
Peso (Kg)	Hombres	12	65.50	4.45	1.29	60.00	65.00	73.50	6.80
Talla (cm)	Hombres	12	168.75	5.55	1.60	158.00	168.00	179.00	3.29
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Hombres	12	23.06	2.09	0.60	20.02	22.86	26.18	9.07

**4.6. Estadística descriptiva de los datos de concentración sanguínea con respecto al tiempo.**

En la tabla 25 se muestran los resultados obtenidos en la estadística descriptiva de los datos de concentración sanguínea con respecto al tiempo de tacrolimus, el número de voluntarios considerado para el análisis estadístico fue de 12. Los datos individuales se muestran en el Anexo II.

**Tabla 19. Estadística descriptiva para las concentraciones sanguíneas de Tacrolimus con respecto al tiempo.**

Tiempo (h)	N	Media (ng/mL)	Desv. Est (ng/mL)	Error Est (ng/mL)	Min (ng/mL)	Mediana (ng/mL)	Max (ng/mL)	CV%
0	12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-
0.167	12	0.45	1.10	0.32	0.00	0.00	3.49	245.82
0.333	12	1.43	1.74	0.50	0.00	0.89	4.67	121.80
0.5	12	4.38	3.32	0.96	0.00	3.02	12.44	75.68
0.75	12	12.25	9.18	2.65	0.00	9.63	34.51	74.91
1	12	22.19	15.92	4.59	7.95	16.51	62.10	71.72
1.25	12	24.74	15.40	4.44	7.88	20.11	68.09	62.23
1.5	12	26.53	13.51	3.90	11.53	22.22	61.91	50.91
1.75	12	27.57	13.29	3.84	8.76	24.74	59.85	48.22
2	12	28.59	12.69	3.66	9.67	26.80	58.17	44.40
2.5	12	26.08	11.87	3.43	0.00	27.31	45.00	45.53
3	12	25.24	12.54	3.62	5.58	22.77	51.71	49.70
4	12	19.00	9.94	2.87	4.84	17.00	43.12	52.32
8	12	8.47	7.29	2.10	0.00	6.66	28.77	86.14
12	12	5.74	2.78	0.80	2.76	4.90	10.88	48.39
22	12	3.92	2.02	0.58	0.00	3.67	7.14	51.70
48	12	2.57	1.70	0.49	0.00	2.13	6.41	66.22
72	12	1.40	1.25	0.36	0.00	1.36	3.56	89.68
96	12	0.77	0.85	0.25	0.00	0.52	2.12	110.97

**4.7. Concentración sanguínea promedio con respecto al tiempo (escala normal y escala semilogarítmica).**

En el análisis del comportamiento farmacocinético de Tacrolimus se realizan gráficos de concentración sanguínea promedio con respecto al tiempo (Fig. 17 y 18). En el Anexo III se presentan los perfiles farmacocinéticos independientes de todos los voluntarios.

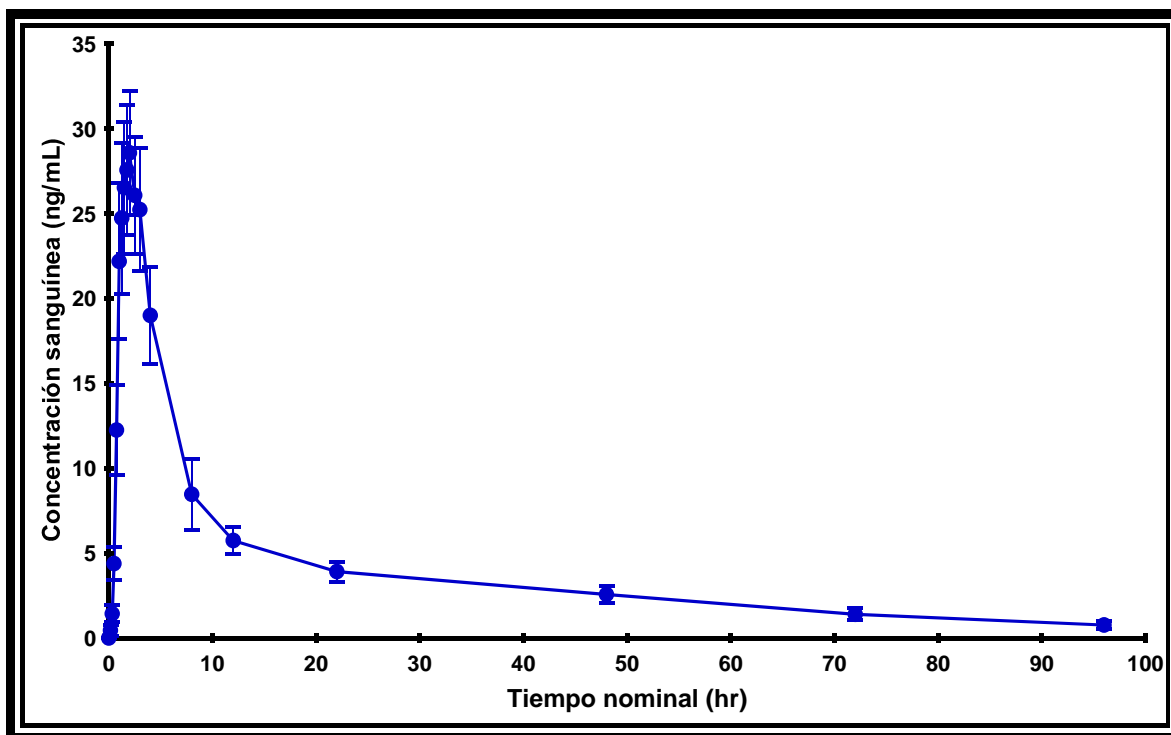


Fig. 13 Perfil farmacocinético promedio de Tacrolimus  $\pm$  error estándar en escala normal.

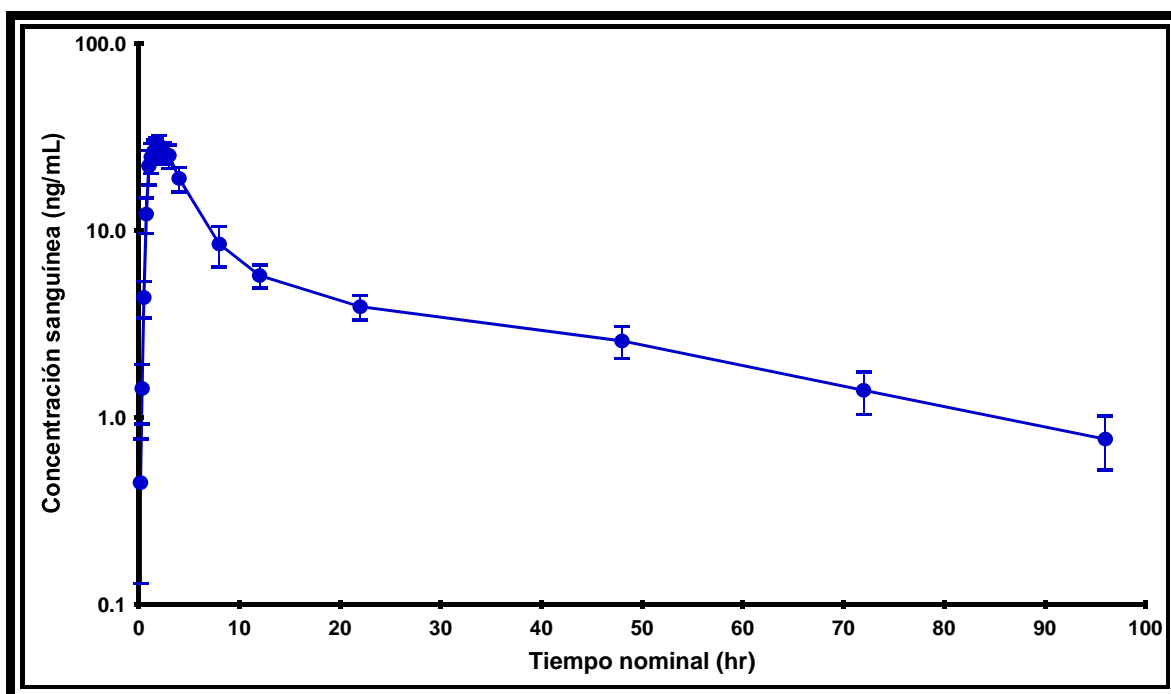


Fig. 14 . Perfil farmacocinético promedio de Tacrolimus en escala semilogarítmica.

#### 4.8. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos.

Los parámetros farmacocinéticos fueron determinados a través de métodos no compartimentales (modelo independiente).

##### Cálculo de parámetros farmacocinéticos.

**C<sub>max</sub>**: Concentración plasmática máxima obtenida de manera gráfica, a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.

**T<sub>max</sub>**: Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima, obtenido de manera gráfica a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.

**ABC<sub>0-t</sub>**: Área bajo la curva de la concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t (último tiempo de muestreo) calculada por el método trapezoidal. El procedimiento para el cálculo de este parámetro se describe en la siguiente fórmula:

Donde:

n= número de tiempos de muestreo utilizados en el perfil plasmático.

t<sub>i</sub>= tiempo en que se realiza la iésima toma de muestra

C<sub>i</sub>= Concentración obtenida en el iésimo tiempo de muestreo.

**ABC 0-inf**: Área bajo la curva de la concentración plasmática desde la administración al tiempo extrapolado al infinito.

$$ABC\ 0-inf = ABC\ 0-t + C_f/Ke$$

Donde:

C<sub>f</sub>= Concentración de la última muestra

Ke= Constante de eliminación

**Ke:** Constante de eliminación: se estima a partir de la porción lineal terminal del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo (en escala semilogarítmica).

Vida media de Ke: mediante el cociente de  $\ln(2)/K_e$

**TMR<sub>0-inf</sub>:** Tiempo medio de residencia extrapolado a tiempo infinito

$$TMR_{0-inf} = \frac{ABCM_{0-inf}}{ABC_{0-inf}}$$

**ABCM 0-inf:** Área bajo la curva del primer momento extrapolado a tiempo infinito

$$ABCM_{0-inf} = \sum_{i=1}^n \frac{(t_n C_n + t_{n-1} C_{n-1})(t_n - t_{n-1})}{2} + \frac{t_f C_f}{K_e} + \frac{C_f}{K_e^2}$$

Donde:

tf = Tiempo de la última muestra

Cf = Concentración de la última muestra

La estadística descriptiva con la cual se pudo caracterizar la farmacocinética de tacrolimus en la población mexicana se muestra en la tabla 26. En el anexo IV se encuentran los resultados de los parámetros farmacocinéticos independientes para cada voluntario.



Tabla 20. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos de Tacrolimus.

Variable	N	Media	Desv. Est	Error Est	Min	Mediana	Max	CV%
Tmax (h)	12.00	1.92	0.65	0.19	1.00	1.88	3.00	33.98
Cmax (ng/mL)	12.00	35.53	14.24	4.11	17.13	32.79	68.09	40.06
ABC <sub>0-t</sub> (h*ng/mL)	12.00	360.49	209.56	60.49	89.59	299.71	780.07	58.13
ABC <sub>0-inf</sub> (h*ng/mL)	12.00	433.53	225.80	65.18	143.02	353.34	898.05	52.08
Ke (1/h)	12.00	0.02	0.01	0.00	0.01	0.02	0.03	26.30
T <sub>1/2</sub> (h)	12.00	33.11	8.29	2.39	20.84	32.92	48.59	25.04
TMR <sub>0-inf</sub> (h)	12.00	38.76	10.39	3.00	22.02	38.32	53.37	26.81
Vd/F (L)	12.00	657.93	296.90	85.71	300.30	658.71	1470.73	45.13
Cl/F (mL/min)	12.00	14.89	8.20	2.37	5.57	14.16	34.96	55.04

## 5. CONCLUSIONES

El método analítico desarrollado por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a un detector de masas para la cuantificación de Tacrolimus en sangre total, fue lineal en el intervalo de concentraciones de 1 a 100 ng/mL, exacto, preciso, selectivo y estable para el fármaco bajo las condiciones experimentales evaluadas, por lo tanto, se considera que cumple con los parámetros de validación establecidos en la norma oficial NOM-177-SSA1-1998 siendo confiable para el análisis de tacrolimus en sangre total y para su aplicación en estudios de Biodisponibilidad.

Se logró determinar los parámetros farmacocinéticos de tacrolimus en la población mexicana encontrando que el  $C_{max}$  y el ABC fueron de 35.5 ng/mL y 360.5 h\*ng/mL respectivamente.

Habiéndose aplicado exitosamente la metodología analítica a muestras biológicas provenientes de voluntarios sanos, podemos considerar su posible aplicación en estudios de Bioequivalencia y así aportar mayor información a la industria farmacéutica a favor de la ciencia y la salud de la población mexicana.

## 6. ANEXOS

### ANEXO I. Datos demográficos de los participantes del estudio.

Genero	Voluntario	Edad (años)	Peso (Kg)	Talla (cm)	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )
Hombres	1	39	68.5	163	25.78
	2	25	62	176	20.02
	3	25	60	158	24.03
	4	23	73.5	170	25.43
	5	20	62	171	21.20
	6	29	65	179	20.29
	7	19	66	172	22.31
	8	23	65	168	23.03
	9	26	67.5	167	24.20
	10	18	62.5	166	22.68
	11	21	61	168	21.61
	12	32	73	167	26.18

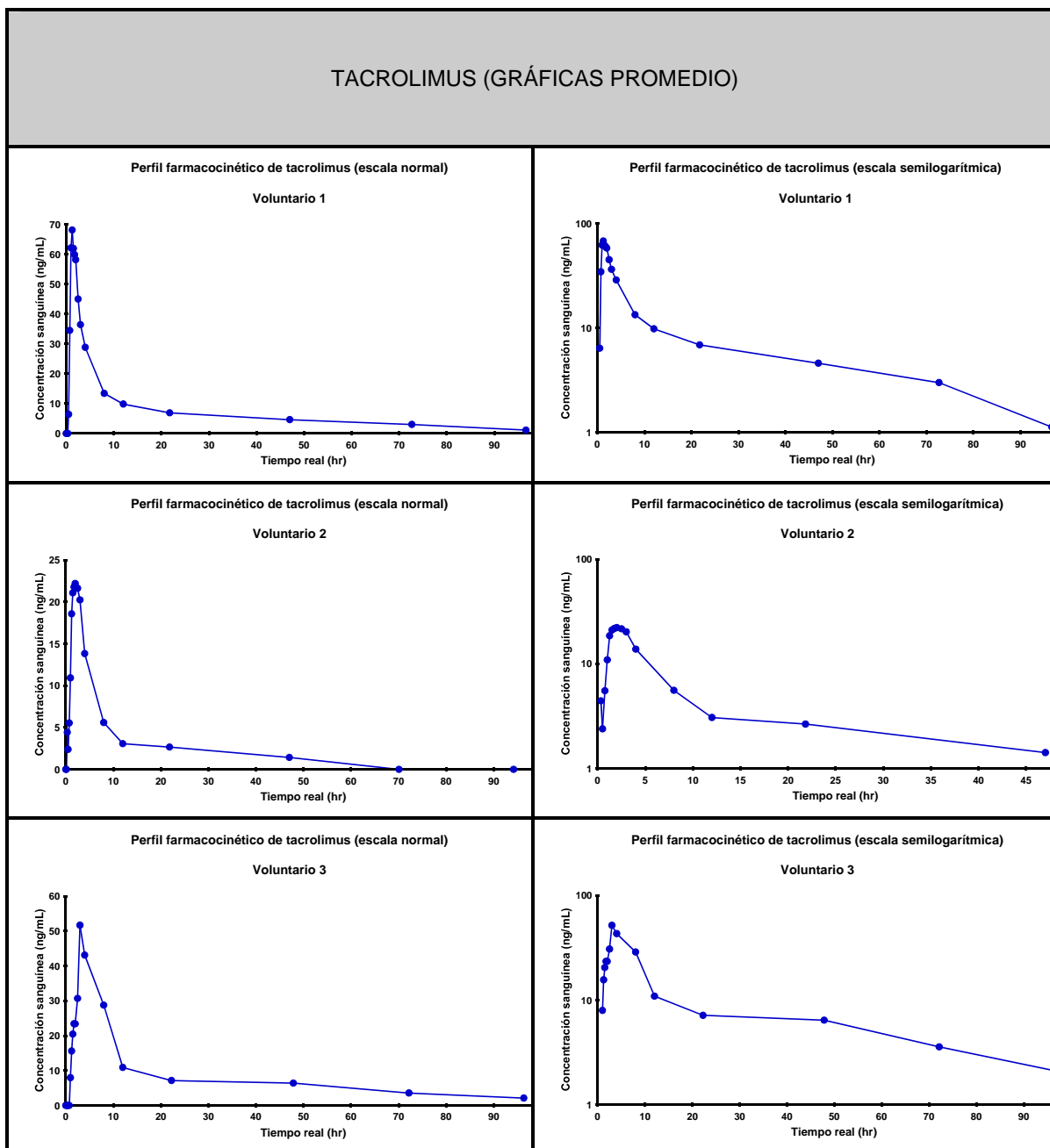
## ANEXO II. Concentración Sanguínea de Tacrolimus para cada voluntario en los diferentes tiempos de muestreo.

Voluntario	Tiempo Nominal (hr)	Tiempo Real (hr)	Concentración (ng/mL)	Voluntario	Tiempo Nominal (hr)	Tiempo Real (hr)	Concentración (ng/mL)
1	0	0	0	2	0	0	0
	0.167	0.167	0		0.167	0.167	0
	0.333	0.333	0		0.333	0.333	4.43
	0.5	0.5	6.41		0.5	0.5	2.39
	0.75	0.75	34.51		0.75	0.75	5.54
	1	1	62.1		1	1	10.93
	1.25	1.25	68.09		1.25	1.25	18.58
	1.5	1.5	61.91		1.5	1.5	21.09
	1.75	1.75	59.85		1.75	1.75	21.79
	2	2	58.17		2	2	22.21
	2.5	2.5	45		2.5	2.5	21.63
	3	3	36.43		3	3	20.25
	4	4	28.82		4	4	13.83
	8	8	13.41		8	8	5.59
	12	12	9.84		12	12	3.07
22	21.75	6.9	22	21.82	2.66		
48	47	4.61	48	47.03	1.42		
72	72.67	3.01	72	70.08	0		
96	96.67	1.13	96	94.17	0		
Voluntario	Tiempo Nominal (hr)	Tiempo Real (hr)	Concentración (ng/mL)	Voluntario	Tiempo Nominal (hr)	Tiempo Real (hr)	Concentración (ng/mL)
3	0	0	0	4	0	0	0
	0.167	0.167	0		0.167	0.167	0
	0.333	0.333	0		0.333	0.333	0
	0.5	0.5	0		0.5	0.5	2.9
	0.75	0.75	0		0.75	0.75	9.8
	1	1	7.95		1	1	16.95
	1.25	1.25	15.61		1.25	1.25	25.15
	1.5	1.5	20.45		1.5	1.5	27.06
	1.75	1.75	23.42		1.75	1.75	28.61
	2	2	23.39		2	2	31.81
	2.5	2.5	30.7		2.5	2.5	30.32
	3	3	51.71		3	3	22.64
	4	4	43.12		4	4	13.76
	8	8	28.77		8	8	6.86
	12	12	10.88		12	12	4.63
22	22.25	7.14	22	22.25	3.35		
48	47.87	6.41	48	48.6	2.11		
72	72.18	3.56	72	71.7	1.17		
96	96.32	2.12	96	95.37	0		

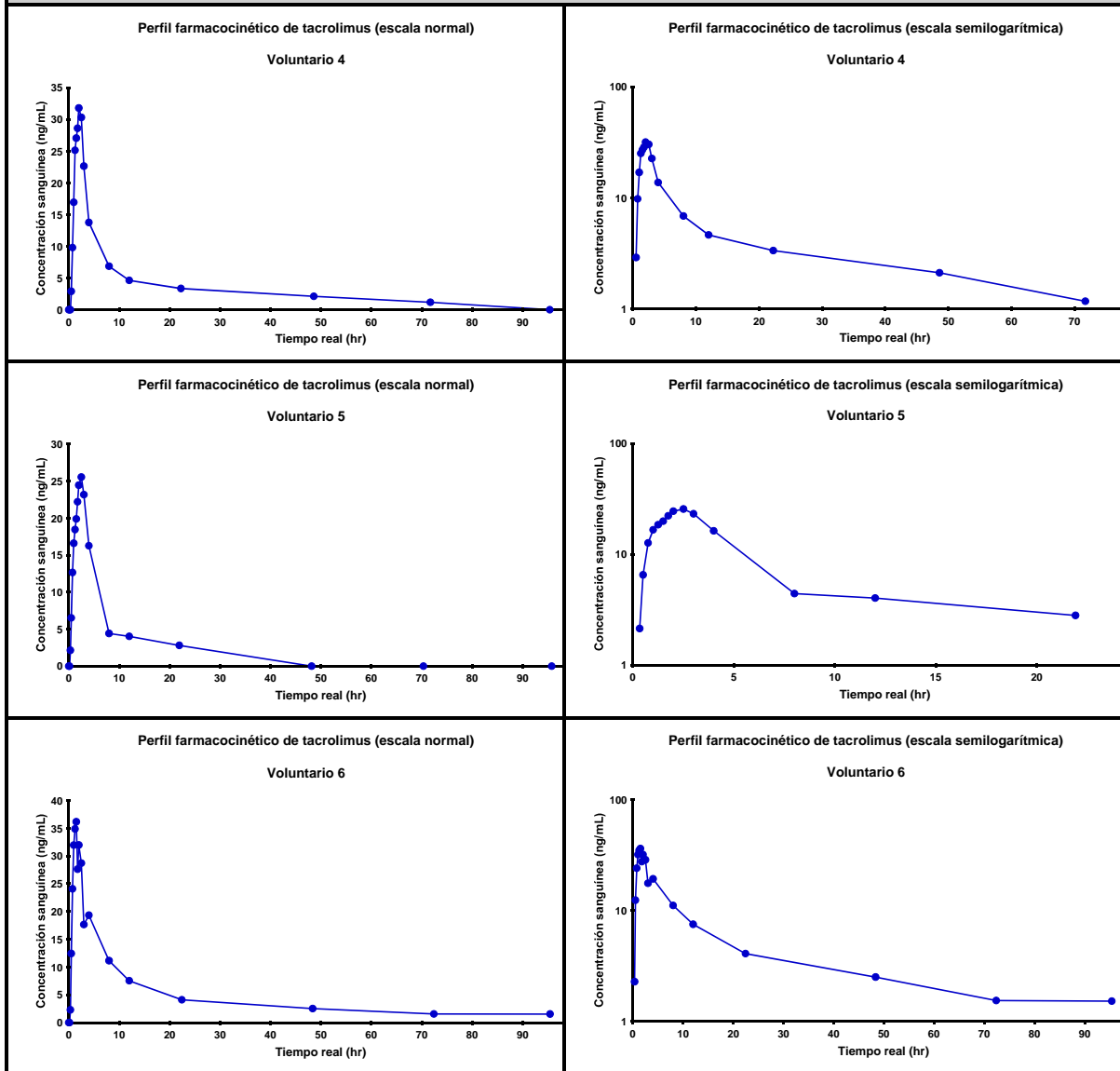
Voluntario	Tiempo Nominal (hr)	Tiempo Real (hr)	Concentración (ng/mL)	Voluntario	Tiempo Nominal (hr)	Tiempo Real (hr)	Concentración (ng/mL)
5	0	0	0	6	0	0	0
	0.167	0.167	0		0.167	0.167	0
	0.333	0.333	2.14		0.333	0.333	2.29
	0.5	0.5	6.52		0.5	0.5	12.44
	0.75	0.75	12.65		0.75	0.75	24.1
	1	1	16.61		1	1	31.97
	1.25	1.25	18.46		1.25	1.25	34.88
	1.5	1.5	19.9		1.5	1.5	36.17
	1.75	1.75	22.22		1.75	1.75	27.63
	2	2	24.46		2	2	31.98
	2.5	2.5	25.56		2.5	2.5	28.73
	3	3	23.19		3	3	17.66
	4	4	16.28		4	4	19.34
	8	8	4.42		8	8	11.14
	12	12	4.03		12	12	7.53
	22	21.92	2.81		22	22.43	4.1
48	48.17	0	48	48.37	2.52		
72	70.33	0	72	72.4	1.55		
96	95.75	0	96	95.43	1.53		
Voluntario	Tiempo Nominal (hr)	Tiempo Real (hr)	Concentración (ng/mL)	Voluntario	Tiempo Nominal (hr)	Tiempo Real (hr)	Concentración (ng/mL)
7	0	0	0	8	0	0	0
	0.167	0.167	0		0.167	0.167	3.49
	0.333	0.333	0		0.333	0.333	1.77
	0.5	0.5	3.06		0.5	0.5	2.97
	0.75	0.75	10.4		0.75	0.75	9.46
	1	1	19.72		1	1	12.76
	1.25	1.25	28.3		1.25	1.25	14.87
	1.5	1.5	35.92		1.5	1.5	17.16
	1.75	1.75	42.04		1.75	1.75	23.24
	2	2	42.38		2	2	21.85
	2.5	2.5	41.83		2.5	2.5	20.12
	3	3	39.03		3	3	19.94
	4	4	26.11		4	4	12.41
	8	8	9.2		8	8	6.75
	12	12	7.76		12	12	2.79
	22	21.93	5.75		22	22.43	2.47
48	47.27	3.58	48	46.7	1.61		
72	70.1	2.58	72	70.45	0		
96	94.27	1.92	96	94.43	0		

Voluntario	Tiempo Nominal (hr)	Tiempo Real (hr)	Concentración (ng/mL)	Voluntario	Tiempo Nominal (hr)	Tiempo Real (hr)	Concentración (ng/mL)
9	0	0	0	10	0	0	0
	0.167	0.167	0		0.167	0.167	0
	0.333	0.333	0		0.333	0.333	1.84
	0.5	0.5	2.46		0.5	0.5	1.97
	0.75	0.75	6.34		0.75	0.75	8.59
	1	1	43.15		1	1	12.4
	1.25	1.25	7.88		1.25	1.25	26.29
	1.5	1.5	11.53		1.5	1.5	28.93
	1.75	1.75	13.46		1.75	1.75	33.76
	2	2	15.21		2	2	32.77
	2.5	2.5	13.77		2.5	2.5	25.89
	3	3	12.36		3	3	22.89
	4	4	11.89		4	4	17.72
	8	8	5.57		8	8	6.57
	12	12	5.17		12	12	3.69
	22	22	3.99		22	22.6	2.95
	48	46.83	2.15		48	46.22	1.88
72	72.1	1.59	72	70.48	1.13		
96	96.02	1.04	96	94.47	0		
Voluntario	Tiempo Nominal (hr)	Tiempo Real (hr)	Concentración (ng/mL)	Voluntario	Tiempo Nominal (hr)	Tiempo Real (hr)	Concentración (ng/mL)
11	0	0	0	12	0	0	0
	0.167	0.167	1.88		0.167	0.167	0
	0.333	0.333	4.67		0.333	0.333	0
	0.5	0.5	7.34		0.5	0.5	4.14
	0.75	0.75	16.63		0.75	0.75	8.99
	1	1	16.4		1	1	15.38
	1.25	1.25	17.13		1.25	1.25	21.64
	1.5	1.5	14.92		1.5	1.5	23.35
	1.75	1.75	8.76		1.75	1.75	26.06
	2	2	9.67		2	2	29.13
	2.5	2.5	0		2.5	2.5	29.4
	3	3	5.58		3	3	31.2
	4	4	4.84		4	4	19.93
	8	8	3.3		8	8	0
	12	12	2.76		12	12	6.76
	22	22.53	0		22	22.03	4.87
	48	46.7	1.27		48	47.87	3.25
72	72.67	0	72	72.45	2.19		
96	95.53	0	96	96.2	1.45		

### ANEXO III. Gráficas de concentración sanguínea en escala normal y semilogarítmica con respecto al tiempo para cada voluntario.

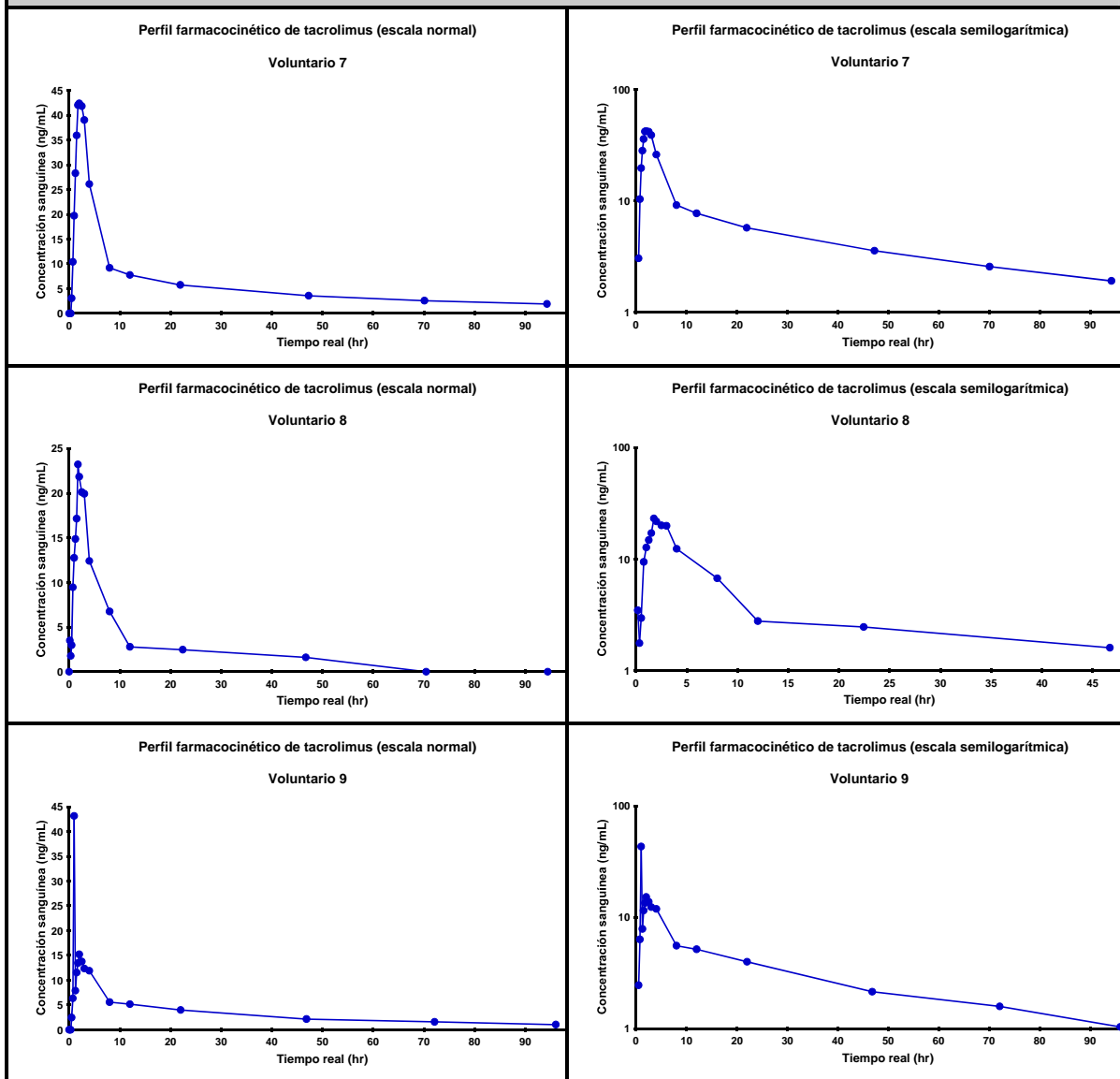


TACROLIMUS (GRÁFICAS PROMEDIO)

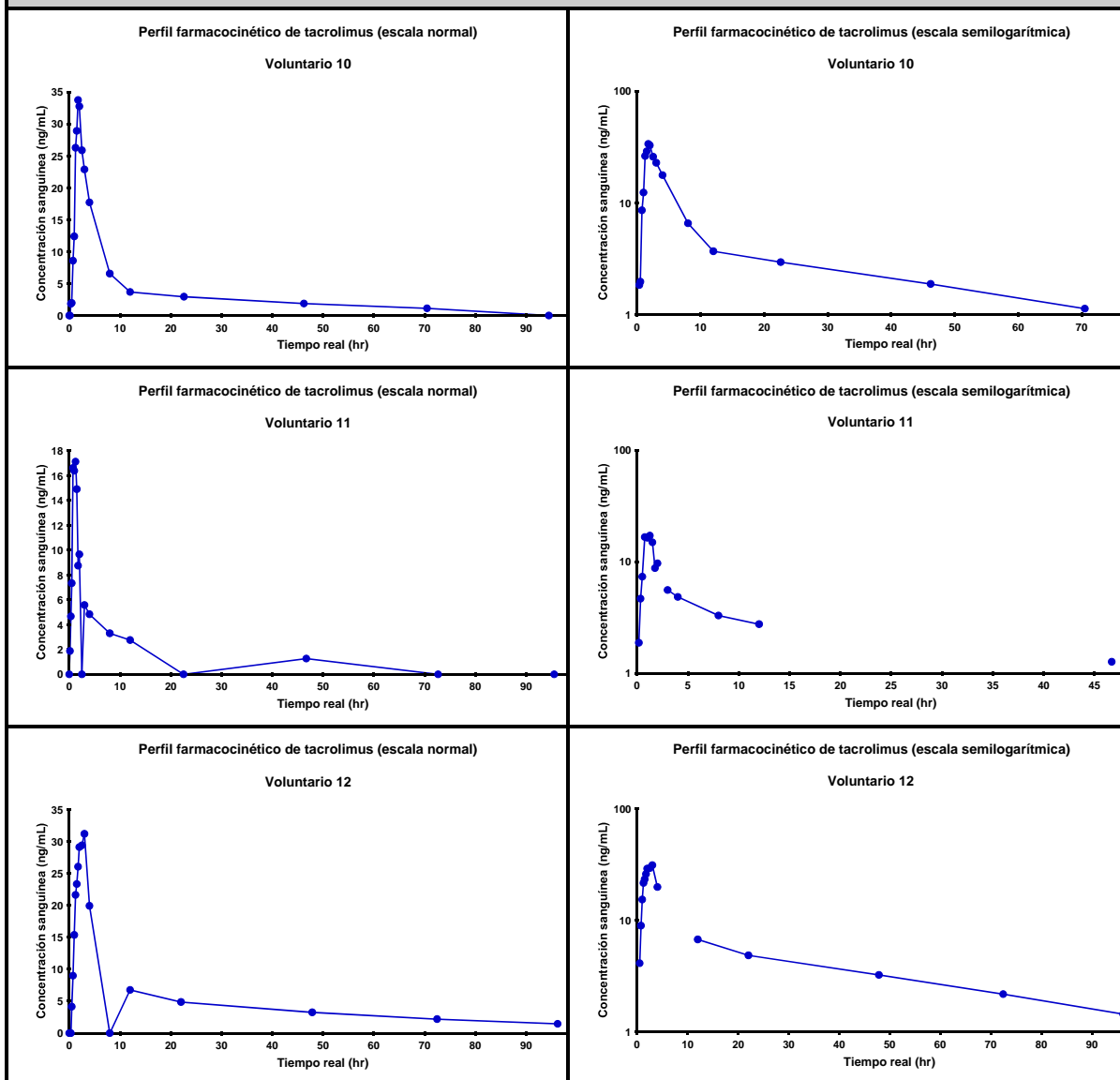




TACROLIMUS (GRÁFICAS PROMEDIO)



TACROLIMUS (GRÁFICAS PROMEDIO)



### ANEXO IV. Parámetros farmacocinéticos de Tacrolimus obtenidos para cada voluntario.

Voluntario	T <sub>max</sub> (h)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	ABC0-t (h*ng/mL)	ABC0-inf (h*ng/mL)	Ke (1/h)	T <sub>1/2</sub> (h)	TMR0-inf (h)	V <sub>d</sub> /F (L)	Cl/F (L/h)
1	1.25	68.09	664.36	712.73	0.02	29.67	32.88	300.30	7.02
2	2.00	22.21	197.69	245.15	0.03	23.17	25.97	681.69	20.40
3	3.00	51.71	780.07	898.05	0.02	38.57	44.10	309.84	5.57
4	2.00	31.81	293.38	346.28	0.02	31.34	34.53	652.84	14.44
5	2.50	25.56	163.89	248.36	0.03	20.84	22.02	605.19	20.13
6	1.50	36.17	420.11	527.36	0.01	48.59	53.37	664.57	9.48
7	2.00	42.38	528.40	643.68	0.02	41.62	49.64	466.40	7.77
8	1.75	23.24	194.62	250.59	0.03	24.10	28.44	693.61	19.95
9	1.00	43.15	306.04	360.40	0.02	36.22	46.99	725.04	13.87
10	1.75	33.76	277.32	333.56	0.02	34.50	35.40	746.07	14.99
11	1.25	17.13	89.59	143.02	0.02	29.16	41.23	1470.73	34.96
12	3.00	31.20	410.40	493.19	0.02	39.57	50.60	578.82	10.14

---

## 1. BIBLIOGRAFIA

- 1 Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados para que realicen las pruebas.
- 2 <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/tema26/etexto26.htm>
- 3 Mosby's GenRx. A comprehensive reference for generic for generic and brand prescription drugs. 11 Edición, Editorial Mosby pp. III 2302- III 2307.
- 4 [http://www.iupac.org/index\\_to.html](http://www.iupac.org/index_to.html)
- 5 Robert E. Ardrey. Liquid chromatography – mass spectrometry: an introduction. 1a. Edición, Edit. Wiley. Inglaterra, 2003.
- 6 Operator training. Alliance LC/MS System ZQ. Connections.
- 7 Ala M. Alak, Selina Moy y Paula Lizak. An HPLC/MS/MS assay for tacrolimus in patient blood samples. Elsevier. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 1997 pp. 7-13.
- 8 Paul Salm. Evaluation of microparticle enzyme immunoassay against HPLC-Mass Spectrometry for the determination of whole-blood Tacrolimus in Heart – and lung- transplant recipients. Elsevier, Clinical Biochemistry, Canadá 2000. Vol 33, No. 7 pp 557-562.
- 9 Panos Hatsis y Dietrich A. Volmer. Evaluation of a cyano stationary phase for the determination of tacrolimus, sirolimus and cyclosporin A in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Elsevier. Journal of Chromatography B 809. Canadá, 2004. pp. 287-294.
- 10 Andrew Volosov. Simultaneous simple and fast quantification of three major immunosuppressants by liquid chromatography –tandem mass espectrometry. Elsevier. Clinical Biochemistry 34. USA 2001. pp 285-290.
- 11 Therese Koal. Simultaneous determination of four immunosupressants by means of high speed and robust on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. Elsevier. Journal of Chromatography B. 805 2004. pp 215-222.
- 12 Laviero M. Mancinelli. The pharmacokinetics ans metabolic disposition of tacrolimus: A comparison acroos ethnic groups. Clinical pharmacology & therapeutics. San Francisco 2000. Vol 69, núm 1.