



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**TESIS DE LICENCIATURA**

Desarrollo y Validación de un Método Analítico para la  
Cuantificación de Lumiracoxib en Plasma de Rata, por  
Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

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

Karen Vázquez Tolentino

**Director de Tesis:** Dr. Gilberto Castañeda Hernández

**Asesor de Tesis:** Dra. Leticia Cruz Antonio





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

*Para comenzar un gran proyecto,  
hace falta valentía.*

*Para terminar un gran proyecto,  
hace falta perseverancia.*

# *Dedicatorias*

*Agradezco primeramente a Dios por estar conmigo en cada paso que doy e iluminar mi mente en los momentos más difíciles. Gracias por permitirme llegar a la culminación de este proyecto y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante esta larga jornada.*

*Dedico este trabajo a mi madre Elvira Tolentino y a mi padre Román Vázquez en agradecimiento por el apoyo brindado en todo momento. Porque sin escatimar esforzó alguno han sacrificado gran parte de su vida en mi formación y porque nunca podré pagarles ni con las riquezas más grandes del mundo todos sus desvelos y tiempo que les e robado pensando en mí.*

*A mi hermano Jaime Vázquez por poner a prueba mi paciencia y mis habilidades de negociación, y por darme la oportunidad de tener un cómplice en situaciones de alegría, pero que también es el único que siente lo mismo que yo en algunos momentos difíciles muy específicos, los cuales comparte conmigo, y aligera la carga.*

*A la QFB Juana Rosas por creer en mí y enseñarme que no hay límites, que lo que me proponga lo puedo lograr porque todo depende de mí. Gracias por sostenerme y caminar a mi lado durante este agradable y difícil camino. Y a su mamá por el apoyo brindado y por recibirme tan calidamente haciéndome sentir siempre bienvenida. Recuerda siempre que un momento de gloria en tu vida no consiste solo en no haber caído nunca, sino en haberse levantado después de cada caída.*

# *Agradecimientos*

*Al Dr. Gilberto Castañeda por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y por cada una de sus enseñanzas.*

*Gracias por depositar su confianza en mí y hacer posible este proyecto.*

*Con especial cariño y admiración a la Dra. Leticia Cruz por su amistad y cada una de las oportunidades brindadas. Gracias por compartir sus conocimientos conmigo, asesorarme y resolver cada una de mis dudas durante el desarrollo del proyecto.*

*A la Química Lourdes Gonzáles por los momentos en los que más que un asesor se comportó como una amiga y por formar parte de este proyecto. Fuiste un pilar importante en los ánimos y desarrollo de este trabajo. Gracias por tu amistad.*

*Agradezco al QFB Mauro Arrieta, al Químico Jorge Rivas y a la QFB Mónica Mendoza por su participación como sinodales en este trabajo. Gracias por su disposición y ayuda brindada.*

*Con cariño a mi tía Graciela y Martín por el ejemplo de superación y por sus consejos. Gracias por el apoyo brindado en cada una de mis tareas, las cuales me permitieron encontrar mi camino y llegar hasta el lugar donde ahora me encuentro.*

*A Sarita por guiarme en el camino de la vida y hacer posible a través de sus consejos que este sueño se convirtiera en realidad. Gracias por su apoyo incondicional en esos momentos difíciles en los que a veces siento que ya no puedo seguir adelante. Pero sobre todo gracias por su amistad y cariño.*

*A mis amigos Orlando, Verónica y Norma con quienes e compartido gran parte de mi vida y han hecho más amena mi estancia en este mundo. Gracias por su apoyo incondicional y prestarme sus hombros para llorar en esos momentos tan difíciles, por ayudarme a crecer y por darme muchos días de felicidad. Gracias por dejarme entrar en sus vidas.*

*A mis amigas QFB's Sandra, Claudia, María Juana, Diana y Marisela con quienes compartí momentos de alegría y tristeza en la Facultad. La amistad es como un violín. Tal vez la música se para de vez en cuando, pero las cuerdas siguen intactas.*

*A todos mis amigos del laboratorio de Farmacología del CINVESTAV que me brindaron su amistad y quienes con su alegría hicieron más amena mi estancia, especialmente la QFB*

*Elena Olvera y la M. en C. Sofía Reyes.*

*Gracias a cada uno de los profesores que participaron en mi desarrollo profesional durante mi estancia en la facultad, sin su ayuda y conocimientos no estaría donde me encuentro ahora.*

*A la Sección Externa de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por haber proporcionado las instalaciones y el material necesario para el desarrollo de este proyecto.*

*Por último quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México y la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza donde viví una de las mejores etapas de mi vida, por mi formación profesional y por ofrecerme todas las actividades que contribuyeron a mi continuo aprendizaje.*





## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>AA</b>	Ácido Araquidónico
<b>AINEs</b>	Antiinflamatorios No Esteroideos
<b>CLAR</b>	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
<b>CNQFB</b>	Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos
<b>COX-1</b>	Ciclooxigenasa-1
<b>COX-2</b>	Ciclooxigenasa-2
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>EE</b>	Error Estándar
<b>EI</b>	Estándar Interno
<b>HPLC</b>	High Performance liquid Chromatography
<b>PGs</b>	Prostaglandinas
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinación
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>Ss1</b>	Solución stock de lumiracoxib uno (50 mg/mL)
<b>Ss2</b>	Solución stock de lumiracoxib dos (5 mg/mL)
<b>Ss3</b>	Solución stock de lumiracoxib tres (3 mg/mL)
<b>TX</b>	Tromboxanos



## ÍNDICE GENERAL

Abstract.....	i
Introducción.....	ii
<b>I. Antecedentes Teóricos.....</b>	<b>1</b>
<b>A. Inflamación.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Manifestaciones de la Inflamación.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Tipos de Inflamación.....</b>	<b>2</b>
<b>a. Inflamación aguda.....</b>	<b>2</b>
<b>b. Inflamación crónica.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Enfermedades relacionadas con la inflamación.....</b>	<b>2</b>
<b>a. Artritis Reumatoide.....</b>	<b>3</b>
<b>b. Osteoartritis.....</b>	<b>4</b>
<b>4. Tratamiento para algunas enfermedades reumáticas.....</b>	<b>4</b>
<b>B. Eicosanoides.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Ácido Araquidónico.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Derivados del Ácido Araquidónico.....</b>	<b>6</b>
<b>a. Prostaglandinas.....</b>	<b>6</b>
<b>b. Tromboxanos.....</b>	<b>6</b>
<b>c. Leucotrienos.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Síntesis de Prostaglandinas y Tromboxanos.....</b>	<b>8</b>
<b>C. Ciclooxygenasa (COX).....</b>	<b>10</b>
<b>1. Ciclooxygenasa-1 (COX1).....</b>	<b>10</b>
<b>2. Ciclooxygenasa-2 (COX2).....</b>	<b>10</b>
<b>3. Diferencias estructurales.....</b>	<b>11</b>
<b>D. Fármacos Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs).....</b>	<b>12</b>
<b>E. Antiinflamatorios No Esteroideos inhibidores selectivos de la ciclooxygenasa-2 (COX-2).....</b>	<b>15</b>
<b>1. Diaril heterociclos.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Modificación del diclofenaco.....</b>	<b>16</b>
<b>F. Lumiracoxib.....</b>	<b>16</b>
<b>1. Parámetros farmacocinéticos.....</b>	<b>17</b>
<b>a. Absorción.....</b>	<b>17</b>
<b>b. Distribución.....</b>	<b>18</b>
<b>c. Biotransformación.....</b>	<b>18</b>



<b>d.</b> Excreción.....	18
<b>G.</b> Desarrollo de un método analítico.....	19
<b>1.</b> Definición.....	19
<b>2.</b> Recopilación de información.....	20
<b>3.</b> Elección del método de análisis.....	20
<b>4.</b> Técnicas de separación.....	21
<b>5.</b> Primer análisis y optimización del método.....	21
<b>6.</b> Validación.....	22
<b>a.</b> Estabilidad de la muestra.....	22
<b>b.</b> Exactitud.....	22
<b>c.</b> Linealidad.....	23
<b>d.</b> Límite de cuantificación.....	23
<b>e.</b> Límite de detección.....	23
<b>f.</b> Precisión.....	24
<b>g.</b> Repetibilidad.....	24
<b>h.</b> Reproducibilidad intralaboratorio.....	24
<b>i.</b> Recuperación absoluta.....	24
<b>j.</b> Selectividad.....	25
<b>H.</b> Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).....	26
<b>1.</b> Origen de la cromatografía.....	26
<b>2.</b> Definición.....	28
<b>3.</b> Clasificación de CLAR.....	28
<b>a.</b> Cromatografía líquido-sólido (o de adsorción).....	28
<b>b.</b> Cromatografía iónica.....	28
<b>c.</b> Cromatografía de exclusión o por tamaño.....	29
<b>d.</b> Cromatografía de reparto.....	29
<b>1)</b> Fase normal.....	29
<b>2)</b> Fase reversa.....	29
<b>4.</b> Componentes de CLAR.....	30
<b>a.</b> Recipientes.....	30
<b>b.</b> Sistema de bombeo.....	30
<b>c.</b> Sistema de inyección.....	31
<b>d.</b> Precolumnas.....	31
<b>e.</b> Columnas de separación.....	31
<b>f.</b> Detector.....	31
<b>g.</b> Registrador.....	31
<b>5.</b> Ventajas de CLAR.....	32



Justificación.....	34
Objetivo.....	35
Objetivos particulares.....	35
Hipótesis.....	36
<b>II. Diseño experimental.....</b>	<b>37</b>
<b>A. Metodología propuesta.....</b>	<b>37</b>
1. Lugar de desarrollo.....	37
2. Material biológico.....	37
3. Fármacos y reactivos.....	37
4. Equipo.....	38
5. Preparación de soluciones.....	38
6. Desarrollo del método.....	39
a. Fase móvil.....	39
b. Velocidad de flujo y Estándar Interno (EI).....	39
c. Selección de longitud de onda.....	40
7. Selección del método de extracción.....	40
a. Precipitación de proteínas.....	40
b. Extracción líquido-líquido.....	41
c. Tratamiento de resultados.....	41
8. Propuesta del método.....	42
a. Lumiracoxib en solución (Sistema).....	42
b. Lumiracoxib en plasma (Método).....	42
c. Tratamiento de muestras.....	43
9. Determinación del rango de concentración.....	43
a. Cinética piloto.....	43
b. Preparación de muestras.....	44
10. Optimización del método.....	44
11. Validación.....	44
a. Selectividad.....	44
b. Límite de detección.....	45
c. Límite de cuantificación.....	45
d. Recuperación absoluta.....	45
e. Linealidad.....	45
1) Sistema.....	45
a) Precisión del sistema.....	45
2) Método.....	45
f. Precisión.....	47
1) Repetibilidad.....	47
2) Reproducibilidad.....	47



g. Exactitud.....	47
h. Estabilidad.....	47
1) Muestras procesadas.....	47
2) Muestras sin procesar.....	47
12. Aplicación del método.....	48
<b>III. Resultados.....</b>	<b>49</b>
1. Desarrollo del método.....	49
2. Validación.....	53
<b>IV. Análisis de resultados.....</b>	<b>61</b>
<b>V. Conclusiones.....</b>	<b>65</b>
<b>VI. Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>68</b>



## ABSTRAC

In the present study was conducted on the development and subsequent validation of an analytical method for *High Performance Liquid Chromatography* with UV detection for the quantitative analysis of lumiracoxib in rat plasma. During the development of the method several variables were selected mobile phase (flow rate, wavelength and internal standard) as well as a method for extracting the drug from the biological matrix. For the extraction of the drug was tested for protein precipitation whit solvents such as methanol and acetonitrile, and a liquid-liquid extraction with ethyl acetate. The separation of the drug was performed on a reversed phase column (Nava-pack C18) with a mobile phase of sodium acetate-methanol (38:62 v/v). Under the conditions of work selected a retention time of 3.56 min for internal standard and 8.50 min for Lumiracoxib were obtained. The validate method presented linearity in a concentration range of 0.1 - 8 mg / mL, with a coefficient of determination of 0.99 with an equation  $Y = 0.4893x + 0.0073$  and a detection limit of 0.06  $\mu\text{g/mL}$ . At each level of concentration was a greater recovery to 90% with coefficients of variation less than 7%. The analytical method was applied to a pharmacokinetic profile of lumiracoxib in rats after an oral administration of a single dose of 30 mg/kg. This method has the advantage of being simple, economical and use minimum sample of 100 $\mu\text{L}$ .



## INTRODUCCIÓN

Los Analgésicos Antiinflamatorios No Esteroides (AINEs) constituyen uno de los grupos de medicamentos más prescritos debido a su actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética. Son empleados en el tratamiento de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios como la Artritis Reumatoide y Osteoartritis; también son ampliamente utilizados para aliviar cefaleas, fiebre y para reducir los dolores después de intervenciones quirúrgicas.<sup>12,13</sup>

Sin embargo, su utilización se ve limitada por sus eventos adversos que van desde síntomas como dispepsia por el tratamiento de semanas, hasta severas complicaciones como sangrado y perforaciones que conducen a la hospitalización o muerte.<sup>19,17</sup>

Ante la necesidad de reducir dichos efectos adversos se han desarrollado nuevos fármacos selectivos denominados Analgésicos Antiinflamatorios No Esteroides Selectivos de la Ciclooxygenasa-2, los cuales presentan un doble mecanismo de acción que permite controlar la inflamación y el dolor con una marcada reducción en la capacidad de producir principalmente lesiones en la mucosa gastroduodenal.<sup>13,19</sup>

El Lumiracoxib es el principio activo del Prexyge®, es un fármaco que pertenece a esta nueva generación de AINEs y se encuentra indicado principalmente en el tratamiento de la osteoartritis (OA), artritis reumatoide (AR) y dolor agudo.



A diferencia de otros coxibs como el refecoxib, éste no aumenta el riesgo cardiovascular y se encuentra asociado con una reducción del 79% en cuanto a complicaciones gastrointestinales.<sup>20,22</sup>

En la actualidad el interés clínico de la farmacología de lumiracoxib es creciente, por lo que se encuentran reportados métodos analíticos que permiten su cuantificación en líquido sinovial y plasma humano por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) que describe el uso de CLAR acoplado a masas, uso de bomba de gradiente, reactivos poco accesibles y análisis largos que dificultan su reproducibilidad en el Laboratorio de Farmacología del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV); además no se encuentran reportados métodos analíticos que permitan la cuantificación del fármaco en rata.<sup>20,21,22</sup>

Por lo tanto, en este trabajo se presenta el desarrollo de un método analítico que permite la cuantificación del lumiracoxib en plasma de rata de forma sencilla, económica y eficiente con aplicación a estudios farmacocinéticos.





## I. ANTECEDENTES

### A. Inflamación

La inflamación es una reacción protectora normal del tejido conjuntivo vascular ante una lesión tisular originada por factores endógenos (necrosis tisular o rotura ósea) o factores exógenos como lesiones por agentes mecánicos (corte), físicos (quemaduras), químicos (corrosivos), biológicos (microorganismos) e inmunológicos (reacciones de hipersensibilidad). Se encarga de la respuesta que inactiva o destruye los microorganismos invasores, elimina las sustancias irritantes e inicia la etapa de reparación tisular; sin embargo en algunos casos, como la hipersensibilidad, la inflamación puede tener consecuencias nocivas.<sup>1, 2</sup>

#### 1. MANIFESTACIONES DE LA INFLAMACIÓN

Los eventos de inflamación involucran una serie de reacciones complejas, que involucran la activación enzimática, liberación de mediadores bioquímicos, extravasación de líquidos y migración celular. El resultado de las reacciones comprendidas dentro de la inflamación son responsables de:

- rubor (coloración roja)
- tumor (hinchazón)
- calor
- dolor
- y pérdida de funcionalidad temporal.<sup>3</sup>

La coloración y el calor se deben a un aumento del flujo sanguíneo en el área traumática y la constricción de las venas. Los cambios de la microcirculación son inducidos por mediadores químicos como la histamina y la serotonina, que además, aumentan la permeabilidad capilar a líquidos y células sanguíneas al espacio extravascular provocando hinchazón y un aumento de presión local que originan el dolor.<sup>1,2,4</sup>



Por otra parte, los tejidos inflamados liberan líquido intracelular, conocido como exudado inflamatorio que se infiltra y acumula en los tejidos, dificultando o imposibilitando el funcionamiento del órgano o de la región afectada.<sup>1,2,4</sup>

## 2. TIPOS DE INFLAMACIÓN

La inflamación puede clasificarse en aguda y crónica según su periodo de duración.

**a. La inflamación aguda** es de duración relativamente corta (minutos, horas o unos pocos días), se inicia muy rápidamente y se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos predominantemente neutrófilos.<sup>1</sup>

**b. La inflamación crónica** dura semanas, meses o incluso años y se caracteriza histológicamente por el infiltrado de linfocitos y macrófagos con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo.<sup>1</sup>

Esta lesión puede producirse por diversas causas como la progresión de una inflamación aguda; episodios recurrentes de inflamación aguda o presencia de inflamación crónica desde el comienzo asociada frecuentemente a infecciones intracelulares (tuberculosis, lepra, etc).<sup>1</sup>

## 3. ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA INFLAMACIÓN

Las enfermedades reumáticas son estados de inflamación que pueden clasificarse como trastornos del tejido conectivo y pertenecen al complejo grupo de los estados autoinmunitarios. Dentro de estos se comprenden la artritis reumatoide, osteoartritis, gota, fiebre reumática, lupus eritematoso sistémico y psoriasis entre otras.<sup>5</sup>

La Artritis es un término general que se usa para describir la patología inflamatoria o degenerativa de una o más articulaciones que aparece cuando el cartílago y el fluido sinovial de las articulaciones se degeneran.<sup>6,7</sup>

Los síntomas comunes son: dolor, hinchazón, rigidez, restricción del movimiento y rubor de la piel en el lugar de la lesión.<sup>6,7</sup>

En la actualidad se conocen 100 tipos de artritis, sin embargo los más comunes son la Artritis Reumatoide (AR) y la Osteoartritis (OA).<sup>6,7</sup>

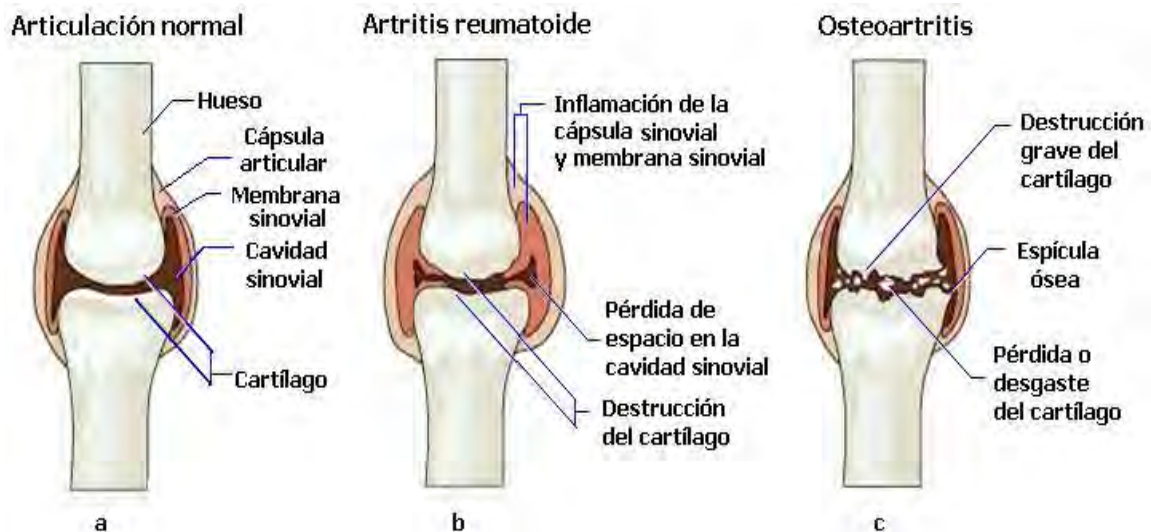


Figura No 1. Esquema de: (a) Articulación Normal; (b) Articulación con Artritis Reumatoide; (c) Articulación con Osteoartritis.

**a. Artritis Reumatoide.** Esta enfermedad es progresiva y degenerativa de etiología hasta el momento desconocida, que se presenta cuando el fluido sinovial se inflama y se destruye junto con la articulación, debido a que el sistema inmunológico del cuerpo ataca la membrana sinovial (figura 1b).<sup>6,7</sup>

Entre las articulaciones que más comúnmente se ven afectadas por la artritis reumatoide se incluyen:



- aquellas localizadas entre la palma de la mano y los dedos
- entre las vértebras
- en las caderas
- en las rodillas
- y en las muñecas

**b. Osteoartritis.** También conocida como artrosis o enfermedad articular degenerativa. Este padecimiento es el más común de las enfermedades reumáticas que aparece generalmente entre las personas mayores por el desgaste frecuente de las articulaciones, aunque se ha observado que se desarrolla en todas las edades (fig. 1b).<sup>6,7</sup>

Las articulaciones que más comúnmente se ven afectadas por la osteoartritis son:

- las articulaciones que se encuentran entre los dedos
- vértebras
- caderas
- rodillas
- y muñecas

#### 4. TRATAMIENTO PARA ALGUNAS ENFERMEDADES REUMATICAS

Generalmente la terapia indicada para dichas enfermedades son los Analgésicos Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs) ya que se encargan de contrarrestar algunos síntomas asociados con estos padecimientos como son la inflamación y el dolor, mediante la inhibición de la síntesis de prostaglandinas al bloquear la enzima ciclooxigenasa.<sup>8</sup>

Para conocer el mecanismo de acción de estos fármacos es necesario hacer referencia al metabolismo del Ácido Araquidónico, ya que tanto sus efectos terapéuticos como adversos surgen de la interacción resultante entre los AINEs y este ácido.<sup>8</sup>



## B. Eicosanoides

Los eicosanoides son ácidos carboxílicos formados por 20 átomos de carbono (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) que derivan de ácidos grasos y desempeñan funciones importantes en procesos fisiológicos como:

- Respuesta inflamatoria: Osteoartritis, artritis reumatoide, psoriasis (piel) y en ojos (mucosas).
- En la producción del dolor y la fiebre.
- Regulación de la presión sanguínea.
- Inducción de la coagulación.
- Funciones reproductivas: labor de parto y menstruación.
- Secreción ácida gástrica.

### 1. ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

El ácido araquidónico (ácido eicosatetranoico, figura 2) es un ácido graso de 20 átomos de carbono que se encuentra como componente de los fosfolípidos (en especial fosfatidilinositol) de las membranas celulares y es el principal precursor de los leucotrienos, tromboxanos y prostaciclina.<sup>2</sup>

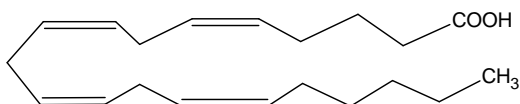


Figura No 2. Ácido araquidónico

La presencia de dobles enlaces ofrece a la molécula varios sitios potenciales de oxidación enzimática y química, que junto con el posterior reordenamiento, permite la formación de derivados con actividades biológicas distintas.<sup>2</sup>



## 2. DERIVADOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

Las prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos se producen a partir de los fosfolípidos de las membranas celulares mediante una serie de transformaciones mediadas por la enzima ciclooxigenasa y lipooxigenasa.<sup>9</sup>

**a. Prostaglandinas.** Las prostaglandinas son lípidos oxidados e insaturados, producidos por la vía de la ciclooxigenasa. Estructuralmente poseen un ciclo con oxígeno, un ácido carboxílico y dos cadenas alifáticas (figura 3).<sup>10</sup>

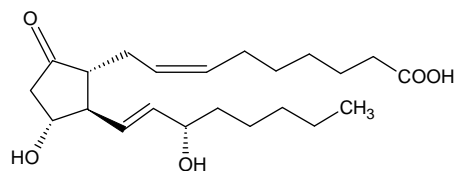


Figura No 3. Prostaglandina E<sub>2</sub>

**b. Tromboxanos.** Son moléculas cíclicas producidas también por la vía de la ciclooxigenasa. Estructuralmente pueden presentar heterociclos de 6C o heterociclos de 5C y un Oxígeno, sus estructuras son similares a las prostaglandinas, ya que también presentan dos cadenas alifáticas (figura 4).<sup>10</sup>

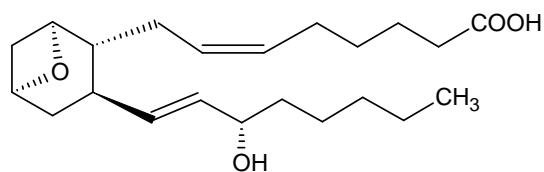


Figura No 4. Tromboxano A<sub>2</sub>

Tanto las prostaglandinas como los tromboxanos tienen efectos importantes principalmente sobre las vías respiratorias, aparato gastrointestinal, reproductor y vascular.



Sin embargo, otros blancos importantes son las plaquetas y los monocitos, los riñones, el sistema nervioso central (SNC), terminaciones nerviosas presinápticas, órganos endocrinos y tejido adiposo, entre otros.<sup>8</sup>

**c. Leucotrienos.** A diferencia de las prostaglandinas y tromboxanos, estos son producidos por la vía de las lipooxigenasas. Estas son moléculas lineales que también juegan un papel importante en los procesos inflamatorios ya que se encargan de la respuesta alérgica (figura 5).<sup>11</sup>

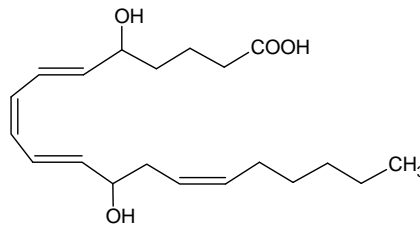


Figura No 5. Leucotrieno B<sub>4</sub>

Tabla No 1. Actividad Biológica de Algunos Eicosanoides

Lugar de acción	PGE <sub>2</sub>	PGE <sub>2α</sub>	PGI <sub>2</sub>	TXA <sub>2</sub>	LTB <sub>4</sub>
<b>Músculo Bronquial</b>	Relaja	Contrae	Relaja	Contrae	Contrae
<b>Músculo Gastrointestinal</b>	Contrae	Contrae	Contrae	Contrae	Contrae
<b>Sangre</b>	Disminuye la agregación plaquetaria y la función leucocitaria	---	Disminuye la agregación plaquetaria	Aumenta excesivamente la agregación plaquetaria	Aumenta la función leucocitaria
<b>Sistema Digestivo</b>	Disminuye la producción ácida	Aumenta la secreción de líquidos	Disminuye la secreción de líquidos	Aumenta el daño mucoso	Aumenta el Daño mucoso
<b>Sistema Nervioso</b>	Aumenta la fiebre y el Umbral del dolor	---	Disminuye el umbral del dolor	---	Disminuye el umbral del dolor



### 3. SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS Y TROMBOXANOS

La producción de los eicosanoides comienza cuando se activa la enzima fosfolipasa  $A_2$  ( $FLA_2$ ) por una lesión en el tejido, la liberación del Ácido Araquidónico (AA) ocurre inmediatamente ya que la enzima se encarga de hidrolizar los fosfolípidos de la membrana.<sup>8</sup>

Una vez liberado el AA es oxidado por la actividad de la Ciclooxygenasa a hidroperoxi endoperóxido ( $PGG_2$ ) por la introducción de dos moléculas de oxígeno y posteriormente esté compuesto es reducido a hidroxí endoperóxido ( $PGH_2$ ) por la actividad peroxidada. El  $PGH_2$  es un endoperóxido altamente inestable que actúa como sustrato intermedio para la biosíntesis de las prostaglandinas de la serie  $E_2$ ,  $F_2$  y  $D_2$ , prostacilinas ( $PGI_2$ ) y tromboxanos ( $TXA_2$ ) (Figura 6). La formación de estos compuestos se lleva a cabo por diferentes enzimas específicas, cuya presencia varía en función de del tipo de célula y de tejido.<sup>9</sup>



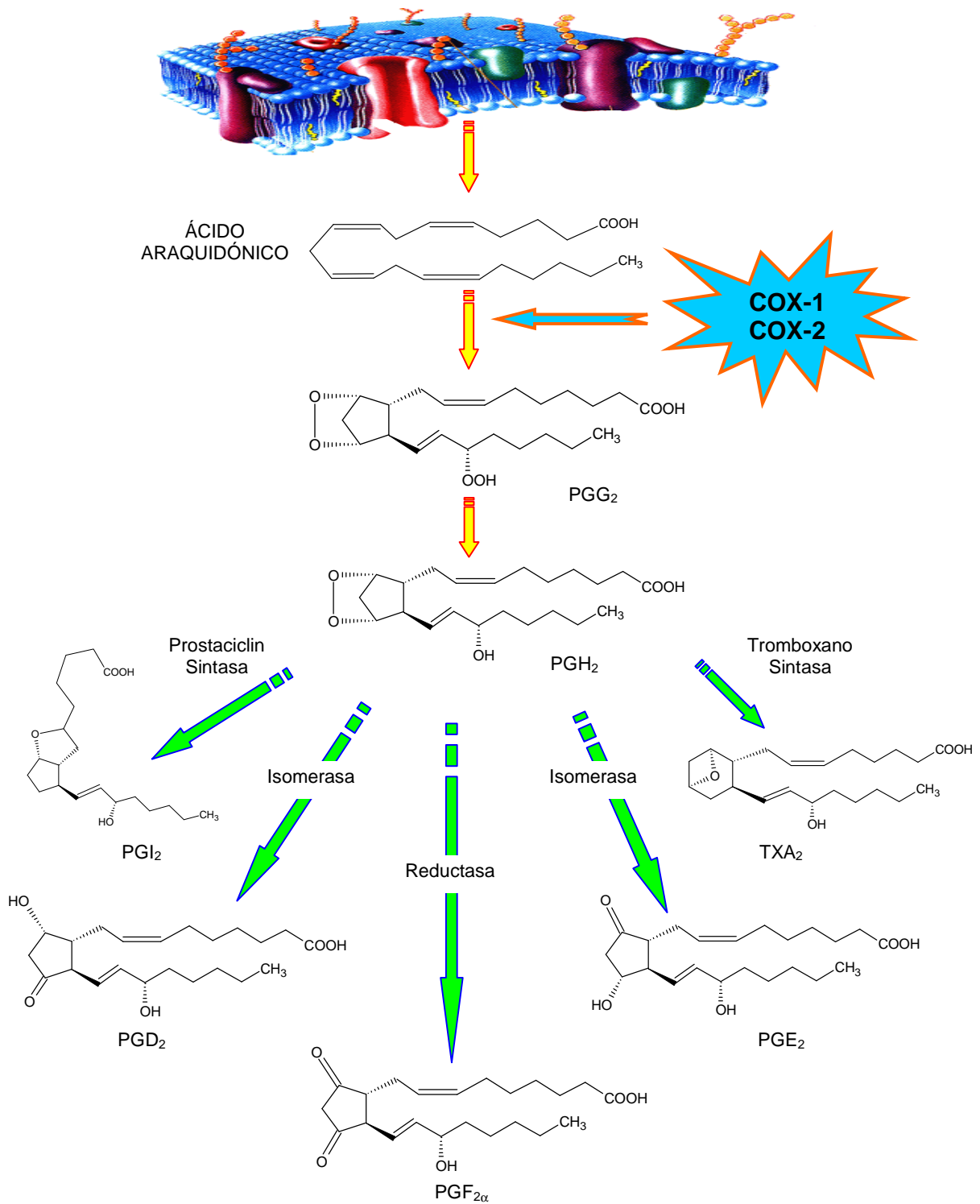


Figura No 6. Síntesis de prostaglandinas y tromboxanos a partir de la liberación del ácido araquidónico. Prefijos: PG: prostaglandinas; TX: tromboxanos.



## C. Ciclooxigenasa (COX)

La isoenzima ciclooxigenasa también llamada prostaglandina endoperoxido sintasa, es una proteína con actividad endoperoxidasa sintasa, que oxigena y cicla el ácido graso no esterificado para formar la PGG endoperoxidasa cíclica, y una actividad peroxidasa que convierte la PGG en PGH (figura 6). De esta enzima se han localizado las isoformas COX-1 y COX-2 en la membrana celular, ambas son de origen común y con estructuras similares, sin embargo, difieren en términos de regulación y expresión fisiológica.<sup>10</sup>

### 1. CICLOOXIGENASA-1 (COX-1)

También conocida como isoforma constitutiva, está presente en casi todos los tejidos, aunque su expresión está aumentada en tracto gastrointestinal, riñón, células endoteliales, músculo liso y plaquetas. En condiciones normales es asociada con un papel fisiológico protector, fundamentalmente en mucosa gástrica y riñón.<sup>10,12,13</sup>

A nivel gástrico preserva el mucus gástrico y por lo tanto la integridad de la mucosa del estomago; a nivel renal provoca vasodilatación permitiendo un buen flujo renal y a nivel plaquetario promueve su agregación evitando el sangrado excesivo. Sus niveles se incrementan de dos a cuatro veces en respuesta al estímulo inflamatorio.<sup>14</sup>

### 2. CICLOOXIGENASA-2 (COX-2)

Esta enzima es responsable de la biosíntesis de las prostaglandinas inflamatorias, se conoce también como una isoforma inducida ya que se expresa como respuesta al daño tisular, a la inflamación o un estado de crecimiento anormal.<sup>9,10</sup>



La COX-2 también es de carácter constitutivo en bajas cantidades y se encuentra en el cerebro, corazón, riñón, ovarios, testículos, músculos estriados, epitelio traqueal y otros órganos.<sup>9,10</sup>

Participa en el proceso de la ovulación, la implantación del óvulo, así como en la cicatrización de úlceras de la mucosa y debido a que se expresa constitutivamente en los riñones, participa en el flujo sanguíneo y en el equilibrio sodio/agua.<sup>9</sup>

Sus niveles pueden incrementarse de diez a veinte veces durante la inflamación, especialmente en macrófagos, monocitos, membrana sinovial, fibroblastos y células endoteliales.<sup>14</sup>

### 3. Diferencias estructurales

La resolución de la estructura cristalina por Rayos X de COX-1 y COX-2 supuso un importante avance, ya que permitió conocer los aminoácidos implicados en la interacción del sustrato con el sitio activo y por lo tanto, comprender el mecanismo de acción de los fármacos que actúan inhibiendo ambas isoenzimas. Además, permitió dirigir el diseño y desarrollo de fármacos 800 veces más selectivo para la COX-2, con respecto a la COX-1.<sup>15</sup>

La estructura tridimensional de la COX-1 y COX-2 es casi idéntica, ambas presentan una estructura alargada y acanalada, similar a un tubo; las dos enzimas son susceptibles de ser inhibidas por los AINES, mediante un mecanismo que involucra la unión de dichos fármacos con una arginina en la posición 120. Sin embargo, difieren en su centro activo ya que la ciclooxigenasa-2 presenta un canal hidrofóbico más largo en comparación al canal de la ciclooxigenasa-1; esto debido a que en la posición 523, la COX-2 presenta una valina, la cual, por su pequeño tamaño incrementa el sitio de unión, abriendo un espacio lateral selectivo. Por el contrario, en COX-1 se encuentra una isoleucina, que por su mayor tamaño, hace inaccesible dicho canal para los fármacos (figura 7).

Otro cambio importante afecta a la Histamina (His) en la posición 513 en la COX-1, que es reemplazada por una Arginina (Arg) en la COX-2. Esta Arginina se encuentra en el espacio de selectividad y es la responsable de establecer enlaces de hidrógeno con el grupo sulfonilo presente en la mayoría de los inhibidores de la COX-2. Estas pequeñas diferencias han permitido el desarrollo de fármacos con una constitución tridimensional tal, que les permita fijarse en el bolsillo lateral abierto por la molécula de valina de COX-2. 15,16,17

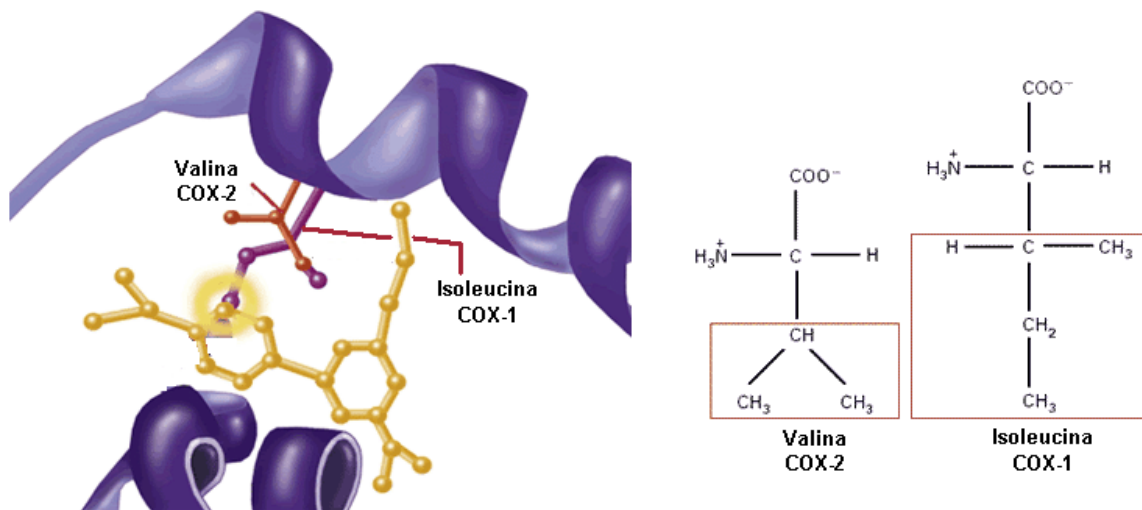


Figura No 7. Se puede observar los sitios activos de la COX-1 y COX-2 (cintas de color morado); los fármacos selectivos de la ciclooxigenasa 2 (Celebrex®) puede unirse a enzimas COX-2, pero no a la COX-1. Adaptado de National Institute of General Medical Sciences; 2007.

## D. Fármacos Antiinflamatorios No Esteroides (AINEs)

Los Antiinflamatorios No Esteroides (AINEs) constituyen un grupo farmacológico, químicamente heterogéneo y ampliamente prescrito ya que se emplean para el tratamiento del dolor y la inflamación.<sup>18</sup>



Por su actividad antiinflamatoria son muy empleados en las enfermedades del aparato locomotor como la Artritis Reumatoide y la Osteoartritis, donde se ven afectadas las articulaciones, los músculos, los huesos y los tendones.<sup>12,18</sup>

También se utilizan en otros padecimientos como el dolor dentario, cefaleas, dismenorrea y después de traumatismos y de intervenciones quirúrgicas, por su capacidad de disminuir el dolor (efecto analgésico).

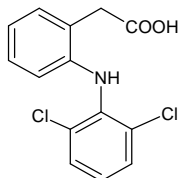
Además, pueden disminuir la fiebre (efecto antipirético) y algunos como el ácido acetyl salicílico pueden ayudar a prevenir una trombosis sanguínea (efecto antiagregante).<sup>18</sup>

Estos fármacos actúan a través de la inhibición de las isoenzimas COX-1 y COX-2, por lo tanto los efectos que producen se derivan de esta inhibición no específica. La inhibición de la COX-2 es la responsable de los efectos terapéuticos, y la inhibición de la COX-1 provoca una disminución de las PGs fisiológicas, lo que conlleva la aparición de una serie de efectos adversos principalmente a nivel gastrointestinal (lesión en la mucosa gástrica y duodenal, produciendo perforación, hemorragias digestivas o úlceras sangrantes) y renal, provocando efectos adversos potencialmente letales como insuficiencia renal.<sup>12,15</sup>

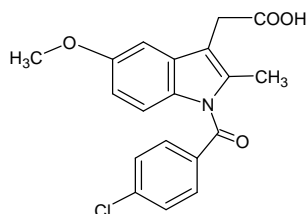
En la actualidad se dispone de numerosos fármacos que pertenecen a diferentes familias químicas que no se encuentran relacionadas estructuralmente, pero comparten efectos terapéuticos y colaterales. A pesar de su diversidad química (figura 8), la mayoría de estos compuestos presenta un grupo carboxílico que es capaz de formar un enlace iónico con la Arg120 localizada en el sitio activo de la COX.

Las interacciones restantes entre la enzima y el fármaco tienden a ser hidrofóbicas, excepto la unión a la Ser530 que se establece por enlaces de hidrógeno.<sup>12, 15, 17</sup>

### A. Derivados del ácido acético

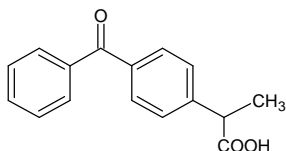


**diclofenaco**

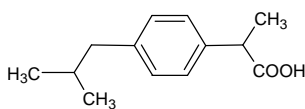


**indometacina**

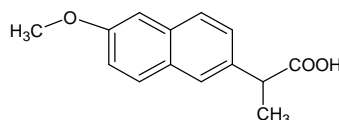
### B. Derivados del ácido propiónico



**ketoprofeno**

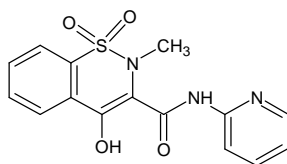


**ibuprofeno**

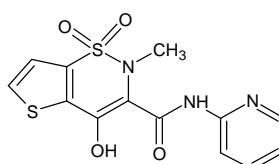


**naproxeno**

### C. Derivados del Isoxicam



**piroxicam**



**tenoxicam**

Figura 8. Estructura química de algunos AINEs clásicos<sup>15</sup>

Debido a la elevada capacidad que presentan los AINEs para provocar reacciones adversas, su utilidad terapéutica se ve limitada, siendo así que la relación beneficio riesgo de estos dependerá de su capacidad para bloquear en mayor o menor grado las formas de la COX.<sup>19</sup>



La eficacia relativa de cada uno puede ser diferente para cada acción; es decir, un fármaco puede mostrar mayor actividad antiinflamatoria y menor analgesia que otro y viceversa; e ahí que su utilización en una u otra indicación terapéutica (artritis reumatoide, osteoartritis, esguinces, torceduras, etc.) dependerán de su grado de eficacia y de su grado de toxicidad.<sup>17,19</sup>

## **E. Antiinflamatorios No Esteroides inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa-2 (COX-2)**

Ante la necesidad de reducir los efectos adversos de los Antiinflamatorios No Esteroides se han desarrollado nuevos fármacos selectivos que inhiben específicamente a la ciclooxigenasa-2 denominados genéricamente "coxibs", que manteniendo sus propiedades terapéuticas, producen menos efectos adversos.<sup>12</sup>

Hasta hoy en día, se han diseñado numerosos compuestos selectivos de forma racional que proponen nuevas estructuras como potentes inhibidores selectivos, tales como el rofecoxib, celecoxib, valdecoxib y etoricoxib. Sin embargo, otra estrategia seguida por muchos investigadores para el desarrollo de nuevos inhibidores ha sido la modificación estructural de AINEs convencionales como el diclofenaco e indometacina.<sup>15</sup>

### **1. DIARIL HETEROCICLOS**

A este grupo pertenecen los inhibidores de la COX-2 de primera generación (celecoxib y rofecoxib) y segunda generación (valdecoxib, parecoxib y etoricoxib) más importante existentes hasta este momento.<sup>15</sup>



Los compuestos que se incluyen en este grupo se caracterizan por tener un anillo central carbocíclico o heterocíclico al cual se unen dos grupos arilos en posición vecinal. La importancia de este anillo central radica en la capacidad de orientar adecuadamente los grupos aromáticos en el espacio para la correcta unión a la enzima, su naturaleza química puede ser muy variada: furona (rofecoxib), pirazol (celecoxib), isoxazol (valdecoxib), piridina (etoricoxib).<sup>15</sup>

## 2. MODIFICACIÓN DEL DICLOFENACO

El diclofenaco es un AINE clásico que pertenece al grupo de los derivados de fenilacéticos. Este fármaco es un potente antiinflamatorio, analgésico y antipirético, pero como todos los inhibidores no selectivos presentan efectos adversos a nivel gastrointestinal. Sin embargo, la modificación estructural de este compuesto ha dado lugar a un potente y altamente selectivo inhibidor de la COX-2 denominado lumiracoxib.<sup>15</sup>

### F. Lumiracoxib

El lumiracoxib es el principio activo del Prexige® (Ácido 2-[(2-fluor-6-clorofenil)amino]-5-metil-bencenoacético) es un fármaco Antiinflamatorio No Esteroideo, obtenido de la modificación estructural del diclofenaco (figura 9), es altamente selectivo y un potente inhibidor de la isoenzima ciclooxigenasa 2.<sup>20,21,22</sup>

A diferencia de otros inhibidores selectivos como el celecoxib y referecoxib, éste no presenta el grupo sulfonilo, pero posee un ácido carboxílico, que le confiere características ligeramente ácidas ( $pK_a$  4.7).<sup>15,21</sup>



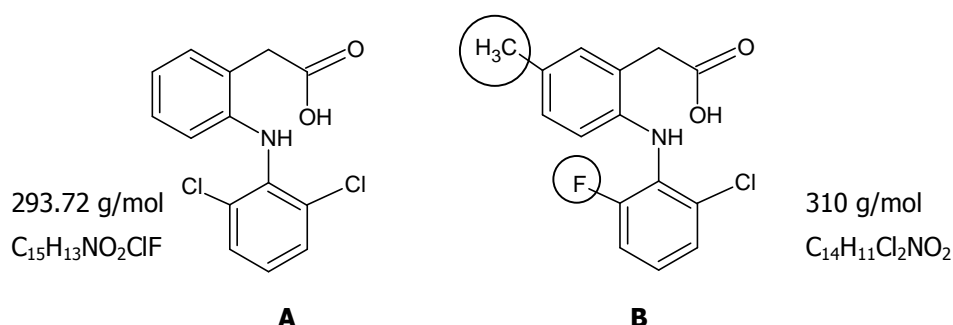


Figura No 9. Diferencias estructurales entre A) Diclofenaco y B) Lumiracoxib

Hasta el momento las investigaciones indican que el mecanismo por el cual el lumiracoxib se une a la enzima COX-2 es diferente del resto de los inhibidores selectivos, ya que el grupo carboxílico forma enlaces de hidrógeno con la Tyr385 y con la Ser530 en la COX-2, en lugar de interactuar con la Arg 120.<sup>22</sup>

## 1. PARAMETROS FARMACOCINÉTICOS

**a. Absorción.** Se absorbe rápidamente a través del tracto gastrointestinal, alcanzando su concentración máxima ( $C_{max}$ ) después de 2-3 horas. Tras una dosis de 400 mg de lumiracoxib, se han llegado a encontrar concentraciones de 0.6  $\mu\text{g/mL}$  en plasma después de 15 minutos, la cual es suficientemente alta para inhibir a la COX-2.

En dosis de 25 a 800 mg se ha observado que el área bajo la curva aumenta proporcionalmente de forma lineal y la concentración plasmática es proporcional a la dosis. (Ver tabla No 2). Por otra parte, presenta una buena bioequivalencia oral (74%).<sup>20,21,23</sup>



Tabla No 2. Resumen de Datos Farmacocinéticos del Lumiracoxib en Humanos

Dosis de Lumiracoxib (mg)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng*h/mL)	C <sub>max</sub> (ng/mL)	t <sub>max</sub> medio	T <sub>1/2</sub> (h)
25	2530±619	645±220	2.5 (1.0:4.0)	2.9±1.9
50	5480±1550	1930±776	2.0 (2.0:6.0)	3.6±2.6
100	8350±2220	2420±1130	2.5(0.8:6.0)	3.4±1.6
200	16700±4660	4180±1510	3.0(1.0:4.0)	4.5±1.2
400	40900±9150	6740±2060	2.3(1.0:4.0)	6.2±1.9
800	78800±16000	10800±1620	2.8(2.0:4.0)	6.0±1.3

AUC<sub>0-∞</sub> bajo la curva de concentración-tiempo de cero a infinito; C<sub>max</sub> concentración máxima plasmática observada después de la dosis; t<sub>max</sub> momento en que se encontró la C<sub>max</sub>.

**b. Distribución.** La unión del lumiracoxib a proteínas es relativamente alto (≥98%) y presenta un volumen de distribución de 9L.

En pacientes con artritis reumatoide, se han reportado concentraciones 2 a 3 veces más altas en líquido sinovial en comparación con el plasma, después de 12 a 24 horas.<sup>20</sup>

**c. Biotransformación.** Presenta un metabolismo hepático y efecto de primer paso, "in Vitro" es metabolizado extensivamente por el citocromo hepático P450 isoenzima CYP2C9. Se han identificado principalmente los metabolitos 4'-hidroxi-lumiracoxib, 5-carboxy-lumiracoxib y 4'-hidroxy-5-carboxy-lumiracoxib en plasma, sin embargo, sólo el metabolito 4'-hidroxy a presentado potencia y selectividad para la COX-2 similar al lumiracoxib.<sup>20,21</sup>

**d. Excreción.** El lumiracoxib es eliminado predominante por vía hepática, sin embargo, después de administrar una dosis única de 400 mg de lumiracoxib en sujetos sanos, se a obtenido 54.1% por vía renal y 42.7% por vía fecal, resultando así casi un recobro completo (96.8%).



Presenta un aclaramiento plasmático de 7.7 L/h y una vida media plasmática de aproximadamente 4 horas.<sup>24</sup>

El lumiracoxib fue desarrollado para el tratamiento de la osteoartritis (OA), artritis reumatoide (AR) y dolor agudo, sin embargo también se encuentra indicado para dolor agudo asociado a la dismenorrea primaria, cirugías dentales u ortopédicas o cefalea de tipo tensional. Su administración es por vía oral y se recomiendan dosis de 100-200 mg/día para la Osteoartritis y 400 mg/día para el dolor agudo.<sup>20,21</sup>

A diferencia de otros coxibs, el lumiracoxib no aumenta el riesgo cardiovascular como el rofecoxib y se encuentra asociado con una reducción del 79% en cuanto a complicaciones gastrointestinales (GI).<sup>22</sup>

## **G. Desarrollo de un método analítico**

### **1. DEFINICIÓN**

El método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de una muestra. El método debe incluir entre otras cosas: especificaciones de instrumentos y de equipos; las características del material a analizar, incluidas las condiciones de almacenamiento; lista de reactivos, su procedencia comercial, descripción detallada de los pasos, especialmente de los críticos, cualquier precaución de seguridad en el manejo de muestras, la preparación de muestras, intervalo de concentraciones de los compuestos en una muestra para que pueda aplicarse el método sin modificación.<sup>25,26</sup>



## 2. RECOPIACIÓN DE INFORMACIÓN

Para proponer un nuevo método de análisis o seleccionar uno ya conocido, es necesario hacer usos de las propiedades físicas y químicas correspondientes a la estructura y composición del analito (componente específico de una muestra a medir en un análisis).<sup>26</sup>

Por lo tanto, como primer paso para el desarrollo de un método, es la recopilación de la información disponible del o los componentes a analizar; es decir, nombre, fórmula y peso molecular, apariencia (color y olor), propiedades físicas como espectrofotometría infrarroja, de resonancia magnética nuclear, de masas, ultravioleta, pKa, solubilidad y punto de fusión entre otras. En función a esta información, se propondrán técnicas de separación y técnicas analíticas que permitan determinar al analito de interés.<sup>26</sup>

## 3. ELECCIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS

La elección de un método de análisis depende del propósito de la valoración, según sea cuantitativa o cualitativa y de la complejidad de la muestra. Sin embargo, los parámetros más determinantes en el desarrollo de un método son: la cantidad y pureza del compuesto a analizar, junto con las disponibilidades económicas y las técnicas instrumentales disponibles. El mejor método de análisis será el más sencillo de los que posean la sensibilidad que se requiere, por ejemplo, en estudios de estabilidad se requiere detectar pequeños cambios que pueden ser significativos a lo largo del tiempo de almacenamiento de muestras o medicamentos para lo cual se requiere de un método que pueda detectar pequeñas cantidades ( $\mu\text{g}$  o  $\text{ng}$ ).<sup>26</sup>



#### **4. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN**

Un método de análisis puede ser muy sencillo para una sustancia pura, pero inaplicable a una muestra compleja; por ejemplo, en la determinación de un fármaco en una forma farmacéutica como un comprimido es relativamente sencilla. Basta con triturar una muestra y tal vez realizar una extracción simple con un disolvente y aplicar el análisis concreto. Sin embargo, la determinación de fármacos en fluidos biológicos como orina, plasma y otro tipo de matriz biológica (material de origen biológico en el cual se encuentra la sustancia de interés), en los que se encuentran presentes en concentraciones bajas, requiere una preparación de muestra más laboriosa, como una extracción previa líquido-líquido (el fármaco pasa de una fase acuosa como las citadas a un disolvente orgánico), o líquido-sólido, en cuyo caso un sólido retiene un compuesto en cuestión, dejando pasar las impurezas y eluyendo el compuesto retenido posteriormente con el disolvente adecuado. El proceso de extracción o separación dependerá principalmente de las características del compuesto de interés.<sup>26</sup>

El objetivo de contar con una técnica de separación, es llevar a cabo una preparación previa de la muestra, para aislar el compuesto de interés de la mayoría de sustancias presentes en la matriz biológica, que puedan interferir con su determinación.<sup>26</sup>

#### **5. PRIMER ANÁLISIS Y OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO**

Después de seleccionar el método de extracción y la técnica analítica, se llevan a cabo los primeros análisis. Durante esta etapa se determinan todos los problemas del método y se solucionan modificando algunas condiciones de trabajo como, temperatura, presión, cantidad de disolvente para extraer el analito, longitud de onda para su detección, cantidad de muestra y concentración del analito, entre otras.<sup>26</sup>



## 6. VALIDACIÓN

Una vez determinado el método analítico se debe asegurar la confiabilidad de éste para su uso rutinario; por lo que es necesario llevar a cabo la validación del método y así establecer por medio de estudios de laboratorio y una base de datos que demuestren científicamente que el método analítico satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.<sup>26,27</sup>

La validación de un método, es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado, por lo que es necesario evaluar los parámetros de: exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y estabilidad de la muestra.<sup>28</sup>

**a. Estabilidad de la muestra.** La estabilidad es la propiedad de una muestra de conservar su integridad fisicoquímica y concentración de la sustancia de interés después de almacenarse bajo condiciones específicas, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

Se determina a partir de la comparación de los resultados de análisis iniciales con los obtenidos de las mismas muestras después de permanecer almacenadas por un tiempo determinado en diferentes condiciones. En este parámetro se evalúa la concentración del compuesto por analizar en la matriz biológica al menos por duplicado y a tres niveles de concentración dentro del intervalo de trabajo. Para que el o los compuestos de interés se consideren estables en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados obtenidos deben cumplir los criterios de exactitud y repetibilidad del método.<sup>28,29</sup>

**b. Exactitud.** Expresa la concordancia entre el valor de referencia y el valor experimental, obtenido al aplicar el procedimiento de análisis a un número de muestras del analito en presencia de la matriz biológica.



El valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración.<sup>28,29</sup>

**c. Linealidad.** Es la capacidad de un método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la cantidad del compuesto en una muestra, comprendido entre el nivel de concentración superior e inferior del compuesto. En este parámetro se define un modelo que describa la relación matemática entre concentración y respuesta; esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del intervalo de concentración. La amplitud del intervalo dependerá de las concentraciones esperadas del compuesto por analizar y las aplicaciones del método (control de calidad, estudios de estabilidad, disolución, impurezas, farmacocinética, etc.).<sup>28, 29</sup>

**d. Limite de cuantificación.** Es la cantidad más pequeña de un compuesto presente en una muestra que puede cuantificarse con la precisión y exactitud establecidas en el método y se expresa como concentración del analito.

Se determina al analizar por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo y se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del  $\pm 20\%$  del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20%. Este parámetro es utilizado en análisis cuantitativos para niveles de concentración bajos presentes en matrices como análisis de impurezas y productos de degradación. Concentraciones por debajo de éste no deben ser reportadas como muestras cuantificadas ni deben ser usadas para la interpretación de resultados sin una justificación.

<sup>27,28,30</sup>

**e. Limite de detección.** Es la mínima concentración de un compuesto en una muestra, el cual puede ser detectado con un nivel de confianza determinado, pero no necesariamente es cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas y se expresa como concentración del analito.



La concentración del analito propuesta como límite de cuantificación debe distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés.<sup>28,30</sup>

**f. Precisión.** Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad. Al menos tres concentraciones representativas entre el intervalo de concentración de la curva de calibración debe ser analizadas, una cerca del límite de cuantificación, otro cerca de la concentración central y el último cerca del límite superior de la curva estándar. Las muestras deben ser analizadas en la matriz biológica equivalente y contener cantidades conocidas del analito.<sup>28, 29</sup>

**g. Repetibilidad.** Es la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones (mismo día, analista, equipo, etc.). En un mismo día se analizan por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones de los analitos de interés y el coeficiente de variación en cada nivel no debe ser mayor al 15%.<sup>28,31</sup>

**h. Reproducibilidad intralaboratorio.** Es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas. Se analiza un mínimo de tres concentraciones por duplicado durante tres días y el coeficiente de variación en cada nivel no debe ser mayor al 15%.<sup>28</sup>

**i. Recuperación absoluta.** Es la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica. Para la evaluación de este parámetro se analizan al menos por triplicado un mínimo de tres concentraciones dentro del intervalo de concentraciones propuesto y se comparan estos resultados con las respuestas de soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones y en los mismos disolventes.





El porcentaje de esta(s) razón(es) no necesariamente es del 100%, pero debe haber reproducibilidad en cada nivel de concentración. Se considera la pendiente de la curva de calibración en solución como el 100% de recuperación y la pendiente obtenida en la matriz biológica, determina el porcentaje o la eficacia de extracción del compuesto de interés, alcanzada con este método analítico. <sup>28,32</sup>

**j. 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. La selectividad se establece a partir del análisis de muestras blanco de la matriz biológica proveniente de por lo menos seis voluntarios, además de la evaluación del método contra posibles interferencias como metabolitos, productos de degradación del compuesto de interés y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante, los cuales no deben interferir en la cuantificación del compuesto por analizar. <sup>28</sup>

Cabe mencionar que no necesariamente todos los parámetros de validación antes descritos son aplicables para todos los métodos. Por ejemplo, para validar métodos bajo las condiciones de un laboratorio en particular que no será aplicado en matrices complejas o poco comunes, pueden no ser de interés el aspecto de selectividad. <sup>33</sup>

Por otra parte, según el principio físico o químico de la medición algunas variables no son susceptibles de ser obtenidas porque no aplican o porque no es viable contar con un patrón de comparación confiable. <sup>33</sup>



## H. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

El uso de técnicas analíticas muy sensibles es imprescindible para la cuantificación de compuestos que se encuentren en baja concentración o acompañados de una gran cantidad de sustancias que pueden interferir con su determinación. Por ejemplo, para el control de calidad, que determina la eficacia y seguridad de los medicamentos, es necesario contar con una técnica que permita su determinación, así como la de sus posibles productos de degradación física, química o metabólica. Por otra parte, el análisis de los metabolitos en una matriz biológica, es un aspecto fundamental en los estudios farmacocinéticos, ya que determinan la biodisponibilidad y la duración de la respuesta clínica.<sup>26</sup>

En la actualidad la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es ampliamente utilizada debido a que presenta una alta sensibilidad y se puede adaptar fácilmente a determinaciones cuantitativas exactas. Su campo de aplicación se extiende a una gran diversidad de sustancias como aminoácidos, proteínas, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides y una gran cantidad de sustancias inorgánicas.<sup>34</sup>

### 1. ORIGEN DE LA CROMATOGRAFÍA

El botánico ruso Mikhail S. Tswett realizó por primera vez la técnica cromatográfica, al intentar aislar los pigmentos de plantas y fue quien eligió el nombre de cromatografía que deriva de las palabras griegas "croma", que significa "color", y "grafía", que significa "escrito" (literalmente "escritura de color") para describir su "colorido" experimento.<sup>33,35</sup>

Años después la cromatografía líquida seguía llevándose a cabo en columnas abiertas de vidrio de 15-20 cm de longitud por 1-4 cm de diámetro interno, las cuales se rellenaban con una fase fija (silica, alumina) y se hacía fluir una muestra a través de ella mediante la adición continua de una fase móvil por efecto de la gravedad.<sup>33,36,37</sup>

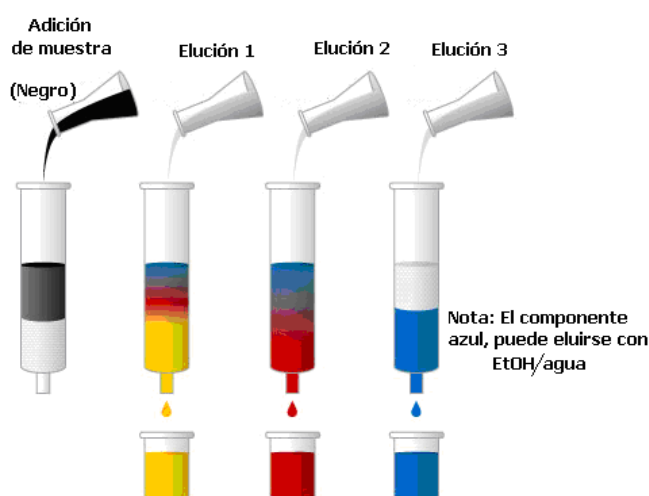


Figura No 10. Extracción de pigmentos de una planta por cromatografía en columna de vidrio. Un solo cartucho puede separar los tres componentes.

Sin embargo, con el paso del tiempo los investigadores se dieron cuenta de que podían aumentar la eficiencia de las separaciones al disminuir el tamaño de partícula de los rellenos de las columnas. Siendo así hasta finales de los años sesenta cuando se desarrolla la tecnología adecuada para producir y utilizar rellenos de tamaño de partícula tan pequeños como los del orden de 3 a 10  $\mu\text{m}$ , generando también la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil.

De manera que surge, la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), que requiere de instrumental especial que permita trabajar con altas presiones requeridas.<sup>36,37</sup>



## 2. DEFINICIÓN

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) o en inglés *High performance liquid chromatography* (HPLC) es esencialmente un método físico basado en la separación de compuestos a partir de su distribución e interacción selectiva entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y una móvil que se desplaza a altas presiones a través de fase fija.<sup>33,36</sup>

## 3. CLASIFICACIÓN DE CLAR

La cromatografía puede clasificarse según la naturaleza física de las fases, el procedimiento utilizado o el fenómeno físico-químico originario del coeficiente de distribución K. Sin embargo, la clasificación seguida a continuación da prioridad a la naturaleza de las fases presentes.<sup>38</sup>

**a. Cromatografía líquido-sólido (o de adsorción).** La fase estacionaria es un sólido finamente dividido sobre el que las moléculas se adhieren por un doble efecto de adsorción física y química. El parámetro físico-químico es el coeficiente de adsorción.<sup>38</sup>

**b. Cromatografía iónica.** La fase estacionaria presenta una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra y la fase móvil consta de una disolución tampón acuosa, en la que el pH y la polaridad se encargan de controlar el tiempo de elusión. La fase estacionaria permite el intercambio de estos contraiones móviles con iones del mismo signo de la muestra.

Cuanto mayor sea la carga de la muestra, más fuertemente será atraída hacia la superficie iónica y, por tanto, más tiempo tardará en ser eluida.<sup>34</sup>



**c. Cromatografía de exclusión o por tamaño.** La fase fija está formada por material que posee poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, llevando a cabo un fraccionamiento relacionado con el tamaño molecular. En este caso el coeficiente de distribución toma el nombre de coeficiente de difusión.<sup>29,31</sup>

La moléculas de tamaño mayor son excluidas y eluyen primero, mientras que las más pequeñas que penetran en los poros son retenidas más tiempo.<sup>36</sup>

**d. Cromatografía de reparto.** En casi todos los casos, como fase estacionaria se utilizan compuestos unidos químicamente a un soporte sólido de sílice. Esta técnica se divide en "fase normal", y "fase reversa", cuyas principales diferencias radican en las distintas polaridades de sus fases estacionaria y móvil.<sup>36</sup>

**1) Fase normal.** Se compone de una fase estacionaria de naturaleza fuertemente polar (sílice) y una fase móvil no polar (hexano, tetrahidrofurano, etc). La retención de cada compuesto presente en una muestra se debe a la distinta solubilidad en la fase móvil (no polar) y afinidad en cuanto a la fase estacionaria (polar). Respectivamente el analito menos polar es el primero en eluir y el más polar será el último.<sup>36,37</sup>

**2) Fase reversa.** Esta técnica a diferencia de la normal, se utiliza una fase estacionario de naturaleza no polar (hidrocarburo), mientras la fase móvil es un líquido polar (agua o un alcohol). En este caso también la separación de los compuestos se basa en la afinidad por la fase estacionaria y la fase móvil (solubilidad). Los compuestos que permanecen mayor tiempo retenidos son los no polares y los más polares eluyen primero.<sup>39,40</sup>

La retención y selectividad se controlan fundamentalmente con la composición de la fase móvil. Por lo tanto, para obtener una fase móvil de fuerza de elución óptima, se ensayan mezclas de agua, metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano en agua.<sup>39,40</sup>

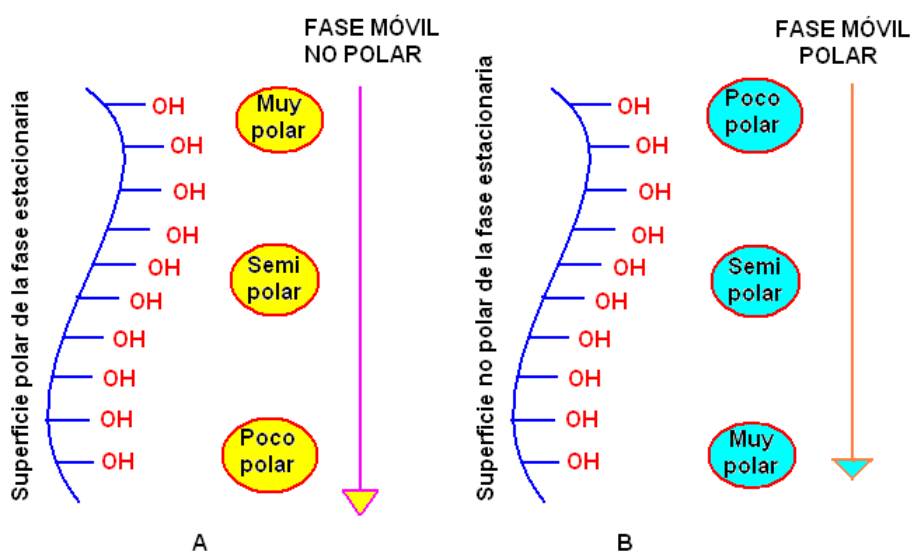


Figura No 11. A. Cromatografía de Líquidos en fase Normal; B. Cromatografía en fase inversa. Los círculos representan los tipos de compuestos presentes en la muestra e indican su orden de elusión en dirección del flujo de la fase móvil. (Adaptado de Yost W, Ettre S. 1980)

#### 4. COMPONENTES DE CLAR

Básicamente el sistema CLAR se encuentra equipado con:

**a. Recipientes.** Puede ser uno o más recipientes de vidrio o de acero inoxidable para la fase móvil, cada uno de los cuales contiene de 200 a 1000 mL de un disolvente.<sup>37,40</sup>

**b. Sistema de bombeo.** El cual se considera el componente más importante de la cromatografía de líquidos ya que impulsa a la fase móvil hacia el inyector y permite el arrastre de la muestra a través de la columna.<sup>37,40</sup>



**c. Sistema de inyección.** El cual puede ser manual o automatizado que permite introducir la muestra en solución través de bucles de muestra. Estos dispositivos son normalmente una parte integrada del equipo cromatográfico y pueden ser bucles intercambiables que permiten la elección de tamaños de muestra desde 5 a 500  $\mu\text{L}$ .<sup>37</sup>

**d. Precolumnas.** En ocasiones para aumentar la vida media de la columna de separación se coloca una precolumna que elimina no sólo las partículas en suspensión y los contaminantes de los disolventes sino también componentes de la muestra que se unen irreversiblemente a la fase estacionaria.<sup>37</sup>

**e. Columna de separación.** Son tubos largos de acero inoxidable que contienen el empaque necesario para efectuar la separación deseada.<sup>40</sup>

**f. Detector.** El cual permite observar y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna.<sup>37</sup>

**g. Registrador.** Sistema que se encarga de la captura y procesamiento de datos, el cual puede ser un integrador o un PC de computación con el software adecuado para el procesamiento de datos cromatográficos.<sup>37</sup>

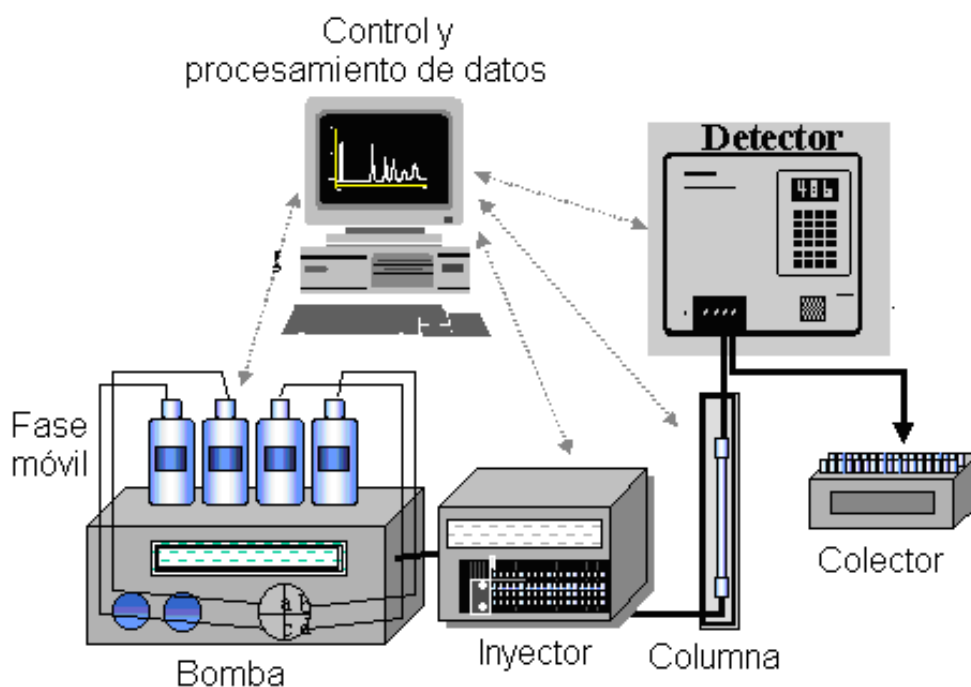


Figura 12. Componentes básicos en un sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

## 5. VENTAJAS DE CLAR

Debido a que el proceso cromatográfico se realiza por cromatografía a temperatura ambiente, la ruptura de compuestos termolábiles dentro de la columna es poco frecuente, además se evita la preparación de derivados que permitan estabilizar el compuesto.<sup>37</sup>

El material de relleno usado en las columnas son partículas muy pequeñas (3-50  $\mu\text{m}$ ) que permiten aumentar la eficiencia de la separación de las muestras, además en muchos casos las columnas usadas generalmente son reutilizables para otros analitos.<sup>33</sup>

Se pueden lograr separaciones en minutos de varios analitos presentes en una misma muestra ya que las presiones y la velocidad de flujo pueden ser controladas.<sup>33</sup>





Los detectores empleados son capaces de detectar cantidades del analito muy pequeñas y generalmente son detectores no destructivos, por lo que este método puede ser empleado no solo para la cuantificación de los productos sin degradar y/o degradados, sino también para el aislamiento y la identificación de los mismos.<sup>33,37</sup>

El costo inicial del equipo y disolventes presentan la desventaja de ser alto, aunque se compensa con la rapidez del análisis ya que la mayoría de los equipos son automatizados y permiten obtener una gran cantidad muestra analizadas por jornada laboral.<sup>33,37</sup>

Entre otras ventajas, puede mencionarse que la cantidad de muestra requerida para el análisis es pequeña (microlitros).<sup>33</sup>



## ➤ JUSTIFICACIÓN

El lumiracoxib es un fármaco selectivo de la ciclooxigenasa-2 que forma parte de una nueva generación de los Antiinflamatorios No Esteroideos (AINEs) (Cheremina O, Brune K, Burkhard B, et al. 2006; Esser R, Miserendino, Sharr M. 2005; James B, Gu H. 2004), para el cual se encuentran reportados métodos de cuantificación en fluidos biológicos por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución que describe el uso de condiciones no accesibles para la reproducibilidad de los mismos en el laboratorio de Farmacología (bomba de gradiente, reactivos poco accesibles, análisis largos, entre otros), donde se requiere cuantificar el lumiracoxib en plasma de rata, para ser empleado en estudios farmacocinéticos.

Por lo anterior, surge la necesidad de implementar un nuevo método analítico bajo las condiciones de equipo y recursos del laboratorio, que permita cuantificar el lumiracoxib de forma sencilla, económica, eficiente, así como analizar la mayor cantidad de muestras en un corto periodo de análisis.



➤ **OBJETIVO**

Establecer un método analítico que permita cuantificar lumiracoxib en plasma de rata con alta confiabilidad por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

➤ **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Implementar el método analítico para la cuantificación de lumiracoxib en plasma de rata.
- Validar el método desarrollado para la cuantificación del lumiracoxib en el fluido biológico.



➤ **HIPOTESIS**

La separación de lumiracoxib se puede llevar a cabo por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución de fase reversa, debido a su baja solubilidad en agua y baja polaridad; así mismo podrá cuantificarse por espectrofotometría ultravioleta, ya que presenta pares de electrones sin compartir y dobles enlaces que pueden excitarse a niveles de energía más elevados.



## **II. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **A. Metodología propuesta**

#### **1. LUGAR DE DASARROLLO**

La parte experimental se realizó en el Centro De Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del Instituto Politécnico Nacional; Sección Externa de Farmacología. Ubicado en Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508 Col. San Pedro Zacatenco. CP 07360 México, DF.

#### **2. MATERIAL BIOLÓGICO**

Para el desarrollo y la validación del método se utilizaron muestras de plasma de ratas wistar hembra con un peso de 200 a 250g, libres de fármacos, así mismo, para la cinética se utilizaron ratas con los mismos criterios de inclusión y con un ayuno de 24 horas antes del experimento.

#### **3. FARMACOS Y REACTIVOS**

Se utilizó lumiracoxib proporcionado por Novartis Farmacéutica, naproxeno de Grupo Roche Syntex, ketorolaco de Laboratorios Liomont y diclofenaco de Sigma Aldrich. Otros reactivos empleados fueron: acetato de sodio, sulfato de zinc heptahidratado, acetato de etilo, ácido acético, y ácido perclórico de J.T-Baker. Disolventes: acetonitrilo y metanol grado HPLC obtenidos de J.T-Baker, así como agua grado HPLC.



#### 4. EQUIPO

Inyector manual con un loop de 20  $\mu\text{L}$ , una bomba Waters modelo 501 y un detector ultravioleta (UV) de absorbancia variable Waters 486. La separación se llevó a cabo a temperatura ambiente en una columna C18 Novapack de fase reversa (150 mm de largo x 3.9 mm de diámetro interno y un tamaño de partícula de 4  $\mu\text{m}$  Waters) y una precolumna waters C18 con un tamaño de partícula de 4  $\mu\text{m}$ . El registro de las señales se obtuvo a partir de un registrador Varian 4270 (Varian, USA). Cada fase móvil se filtro con membranas millipore HVLP 0.45  $\mu\text{m}$  y se desgasificaron en un desgasificador Ultrasonic Cleaner durante 5 min.

#### 5. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Se prepararon tres solución stock de lumiracoxib en metanol, una de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $Ss^1$ ), otra de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $Ss^2$ ) y la última de 0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ( $Ss^3$ ); el diclofenaco, ketorolaco y naproxeno se prepararon igualmente en metanol a una concentración de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Para la fase móvil se preparó una solución de acetato de sodio a una concentración de 0.035 M ajustada a un pH de 3.3 con ácido acético al 85 por ciento.

En la extracción del lumiracoxib se empleo una solución de ácido perclórico al 6% y una solución de sulfato de zinc heptahidratado a una concentración de 0.3 M.

Para la obtención de plasma se empleo heparina al 0.2%, en solución salina al 0.9%.

La suspensión de lumiracoxib administrada a las ratas por vía oral en el estudio farmacocinético, se preparó con una solución de carboximetilcelulosa al 5% y tween 80 (83:17 v/v).



## 6. DESARROLLO DEL MÉTODO

**a. Fase móvil.** Para determinar la fuerza adecuada de la fase móvil, se ensayaron distintas combinaciones de la fase móvil metanol:acetato de sodio y acetonitrilo:acetato de sodio (ver tabla 3). Cada fase móvil se ensayó a una longitud de onda de 270 nm a una velocidad de flujo de 1.2 mL/min. En cada cambio se analizó de forma independiente un volumen de 60  $\mu$ L de las soluciones stock de lumiracoxib ( $Ss^1$ ), diclofenaco, ketorolaco y naproxeno. Una vez elegida la fuerza de la fase móvil, se realizó otra prueba con las mismas proporciones pero sustituyendo el metanol por acetonitrilo y de forma similar se analizaron las soluciones stock. En todos los análisis se evaluó la presencia de interferencias, el tiempo de retención de cada compuesto, así como la separación de los picos de interés con respecto al pico del frente de disolvente.

Tabla 3. Fases móviles de Metanol con acetato de sodio en concentración 0.035 M, ensayadas durante el desarrollo del método

FASE MÓVIL	COMPOSICIÓN
Metanol-Acetato de sodio	70:30
Metanol-Acetato de sodio	60:40
Metanol-Acetato de sodio	50:50
Metanol-Acetato de sodio	40:60

**b. Velocidad de flujo y Estándar interno (EI).** Luego de seleccionar la fase móvil más adecuada, se procedió a realizar estudios de variación de flujo entre 0.8 y 1.2 mL/min. Bajo las condiciones establecidas se ensayaron de forma independiente muestras de lumiracoxib-diclofenaco, lumiracoxib-naproxeno y lumiracoxib-ketorolaco con adición de plasma en metanol con el propósito de seleccionar el estándar interno. En cada caso se evaluó la resolución y el tiempo de retención de los picos de interés, así como la presencia de interferencias.



**c. Selección de longitud de onda.** Una vez establecida la velocidad de flujo y el estándar interno, se procedió a analizar a 280 nm, muestras de lumiracoxib con naproxeno en metanol, de las cuales se evaluó la altura de los picos de interés y la presencia de productos endógenos.

## 7. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

Los métodos de extracción propuestos para la extracción del lumiracoxib y el estándar interno, fueron propuestos con base en las características del fármaco y la matriz biológica.

**a. Precipitación de proteínas.** Para la extracción del lumiracoxib desde la matriz biológica por precipitación de proteínas, se evaluó de forma independiente la extracción con sulfato de zinc, ácido perclórico, acetonitrilo y metanol. Con cada precipitante se realizaron tres curvas sin plasma y tres con adición de la misma (tabla 4 y 5).

Tabla 4. Curva de Calibración de Lumiracoxib en Solución (Sistema)

PUNTO	Concentración [µg/mL]	Ss <sup>1</sup> µL Lumiracoxib [5 µg/mL]	Ss <sup>2</sup> µL Lumiracoxib [50 µg/mL]	µL EI [30 µg/mL]	µL precipitante
1	0.1	20	--	75	905
2	1.0	--	20	75	905
3	10	--	200	75	725

Tabla 5. Curva de Calibración de Lumiracoxib en Plasma (Método)

PUNTO	Concentración [µg/mL]	µL plasma	Ss <sup>1</sup> µL Lumiracoxib [5 µg/mL]	Ss <sup>2</sup> µL Lumiracoxib [50 µg/mL]	µL EI [30 µg/mL]	µL precipitante
1	0.1	100	20	--	75	805
2	1.0	100	--	20	75	805
3	10.0	100	--	200	75	625





En ambos casos, las muestras se agitaron mecánicamente durante 5 minutos y se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos. De las muestras con plasma, se separó la fase sólida de la líquida y de esta se analizaron 60  $\mu\text{L}$ . Las muestras en solución se analizaron directamente después del tratamiento.

**b. Extracción líquido-líquido.** A partir de las soluciones  $Ss^2$  y  $Ss^3$  de lumiracoxib y una solución de naproxeno de 3  $\mu\text{g/mL}$  (tabla 4 y 5), se realizaron tres curvas en solución y tres curvas con adición de plasma. El primer punto de la curva se preparó con la solución  $Ss^2$  y los niveles de concentración restantes se prepararon con la solución  $Ss^3$ ; las muestras en solución fueron extraídas con 600  $\mu\text{L}$  de acetato de etilo, y las muestras en plasma con 500  $\mu\text{L}$  de dicho disolvente.

Las muestras se agitaron durante 3 minutos en un vortex y se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 minutos. La fase acuosa se desechó y la fase orgánica se evaporó en un baño de agua a 45  $^{\circ}\text{C}$ .

Las muestras se reconstituyeron con 100  $\mu\text{L}$  de fase móvil, se agitaron mecánicamente durante 30 segundos y se analizaron.

**C. Tratamiento de resultados.** En cada método de extracción se evaluó la respuesta (altura de los picos), la resolución de los picos y en la adición de plasma se determinó la presencia de productos endógenos.

Para cada método, se realizó el promedio de los niveles de concentración de las curvas en plasma y los resultados se compararon con el promedio de los niveles de concentración de las curvas en solución realizadas bajo las mismas condiciones. En cada nivel de concentración se valuó el porcentaje de recobro y la reproducibilidad.



## 8. PROPUESTA DEL MÉTODO

Se determinó que el mejor proceso de extracción se realizaba con metanol.

**a. Lumiracoxib en solución (Sistema).** La curva de calibración estuvo definida de 0.1 – 8 µg/mL, por los siguientes niveles de concentración:

Tabla 6. Curva de Calibración de Lumiracoxib en Solución, Usando Metanol como Extrayente (Sistema)

PUNTO	Concentración [µg/mL]	Ss <sup>1</sup> µL Lumiracoxib [5 µg/mL]	Ss <sup>2</sup> µL Lumiracoxib [50 µg/mL]	µL Naproxeno [30 µg/mL]	µL Metanol
1	0.1	20	----	75	905
2	0.5	----	10	75	915
3	1	----	20	75	905
4	3	----	60	75	865
5	5	----	100	75	825
6	8	----	160	75	765

**b. Lumiracoxib en plasma (Método).** A 100 µL de plasma se le adicionó la cantidad necesaria de las soluciones stock de lumiracoxib para obtener la curva de calibración (tabla 7).

Tabla 7. Curva de Concentración de Lumiracoxib en Plasma, por Precipitación de Proteínas (Método)

PUNTO	Concentración [µg/mL]	µL plasma	Ss <sup>1</sup> µL Lumiracoxib [5 µg/mL]	Ss <sup>2</sup> µL Lumiracoxib [50 µg/mL]	µL EI [30 µg/mL]	µL metanol
1	0.1	100	20	----	75	805
2	0.5	100	----	10	75	815
3	1	100	----	20	75	805
4	3	100	----	60	75	765
5	5	100	----	100	75	725
6	8	100	----	160	75	665

La tabla 8 muestra las concentraciones baja, media y alta propuestas para la repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad de la muestra para la validación.



Tabla 8. Puntos Control de la Curva de Calibración del Lumiracoxib en Plasma, por Precipitación de Proteínas

PUNTO	[ $\mu\text{g/mL}$ ]	$\mu\text{L}$ plasma	Ss <sup>1</sup> $\mu\text{L}$ Lumiracoxib [5 $\mu\text{g/mL}$ ]	Ss <sup>2</sup> $\mu\text{L}$ Lumiracoxib [50 $\mu\text{g/mL}$ ]	$\mu\text{L EI}$ [30 $\mu\text{g/mL}$ ]	$\mu\text{L}$ metanol
1	0.2	100	40	0	75	785
2	2	100	0	40	75	785
3	7	100	0	140	75	685

**c. Tratamiento de muestras.** Cada muestra se agitó durante 5 minutos en un vortex y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos. De las muestras con plasma, se separó la fase sólida de la fase líquida y se analizó un volumen de 60  $\mu\text{L}$  de cada muestra.

## 9. DETERMINACIÓN DEL INTERVALO DE CONCENTRACIÓN

Una vez seleccionadas las condiciones cromatográficas y el método de extracción del lumiracoxib, se verificó que las muestras problema se encontraran dentro del intervalo de concentración propuesto, a partir de una cinética piloto.

**a. Cinética piloto.** Se llevó a cabo la cinética del lumiracoxib en tres ratas hembras. Inicialmente se inserto una cánula en la arteria caudal de las ratas, las cuales se encontraban anestesiadas bajo una atmósfera ligera de éter. Después de su recuperación se les administró una dosis de lumiracoxib de 30 mg/kg de peso por vía oral mediante una cánula organogástrica y posteriormente se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de sangre a los tiempos de 0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120, 240, 480 y 600 minutos.

Cada muestra sanguínea se depositó en tubos cónicos de polietileno de alta densidad de 1500  $\mu\text{L}$ , con 20  $\mu\text{L}$  de heparina al 0.2%. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 10 min, el plasma de cada muestra se separó y se depositó en tubos limpios de la misma capacidad. Debido a que las muestras no fueron analizadas de inmediato, éstas se almacenaron a una temperatura de -37 °C para su posterior análisis.



**b. Preparación de muestras.** Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y cada una se preparó con 825  $\mu\text{L}$  de metanol y 75  $\mu\text{L}$  de estándar interno; el tratamiento posterior se realizó conforme al apartado 8c.

La concentración de las muestras se obtuvo a partir del promedio de tres curvas con adición de plasma analizadas bajo las mismas condiciones el mismo día de análisis.

## 10. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

Debido a la presencia de metabolitos endógenos en las muestras de la cinética, se procedió a modificar las proporciones de la fase móvil y la velocidad de flujo. La proporción de metanol se aumentó un 2% y la proporción de acetatos se disminuyó un 2% (62:38 v/v); el flujo se cambió a una velocidad de 1 mL/min.

El análisis de las muestras se siguió a una longitud de onda de 270 nm con 2.25  $\mu\text{g/mL}$  de naproxeno sódico en cada muestra como estándar interno.

## 11. VALIDACIÓN

Después de optimizar el método de separación se procedió a validar el método analítico propuesto, para lo cual se estudiaron los siguientes parámetros: selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, recuperación absoluta, linealidad del sistema y método, precisión y exactitud, así como la estabilidad de las muestras.

**a. Selectividad.** Se analizaron de forma individual fase móvil, metanol, heparina, una muestra de lumiracoxib en plasma, así como una muestra de Estándar Interno en plasma; además fueron analizadas, seis muestras de plasma provenientes de animales distintos, libres de lumiracoxib y naproxeno.



En cada caso se evaluó la presencia de interferencias con respecto al tiempo de retención de los picos de interés.

**b. Limite de detección.** Se analizó por triplicado las concentraciones de 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mg/mL de lumiracoxib en plasma y se determinó la concentración a la cuál, se podía distinguir el pico del lumiracoxib de las señales de ruido.

**c. Limite de cuantificación.** La concentración de 0.1  $\mu\text{g/mL}$  se analizó por sextuplicado en presencia de plasma. En este parámetro se evaluó la exactitud y la precisión.

**d. Recuperación absoluta.** Se analizaron por triplicado cada uno de los niveles de la curva en plasma (tabla No 7), y los resultados se compararon con el promedio de tres curvas en solución de dicho fármaco bajo las mismas condiciones (tabla 6). En cada caso se evaluó la reproducibilidad y el por ciento de recobro de cada nivel de concentración.

**e. Linealidad.**

**1) Sistema.** A partir de una curva de calibración de lumiracoxib en solución (tabla 6) se determinó la linealidad del sistema; cada muestra se analizó por triplicado bajo las mismas condiciones de trabajo.

**a) Precisión del sistema.** Se analizó por quintuplicado la concentración de 3  $\mu\text{g/mL}$  y se determinó la precisión.

**2) Método.** Se realizó el análisis de seis curvas con adición de plasma, en el intervalo de concentración de 0.1 a 8  $\mu\text{g/mL}$  (tabla 7). Cada curva se preparó a partir de soluciones stock independientes.



En la determinación de la linealidad del sistema y método se evaluó la altura de los picos de interés y se determinó la ecuación de la recta, el coeficiente de determinación y la precisión de cada nivel de concentración.

A partir de los siguientes modelos matemáticos, se determinó el intervalo de confianza para la ordenada y la pendiente del método:

- Intervalo de confianza para la pendiente

$$(m - t_{\alpha/2}) \frac{(\hat{S}_{x/y})}{\sigma_x \sqrt{n-1}} < A < (m + t_{\alpha/2}) \frac{(\hat{S}_{x/y})}{\sigma_x \sqrt{n-1}}$$

- Intervalo de confianza para el intercepto

$$(b - t_{\alpha/2}) (\hat{S}_{x/y}) \sqrt{\frac{(\sum x_i^2)}{n \sum (x_i - X)^2}} < B < (b + t_{\alpha/2}) (\hat{S}_{x/y}) \sqrt{\frac{(\sum x_i^2)}{n \sum (x_i - X)^2}}$$

donde:

**A, a** = pendiente

**B, b** = Intercepto

**t<sub>α/2</sub>** = t de student con un α= 0.05

**Ŝ<sub>x/y</sub>** = Error estándar de regresión

**σ<sub>x</sub>** = Desviación estándar de las concentraciones teóricas

**x<sub>i</sub>** = Cantidad de la concentración i-esima

**X** = Promedio de las concentraciones teóricas

**n** = Total de niveles de concentración



## f. Precisión.

- 1) Repetibilidad.** Se realizaron cinco repeticiones de las concentraciones alta (7  $\mu\text{g/mL}$ ), media (2  $\mu\text{g/mL}$ ) y baja (0.2  $\mu\text{g/mL}$ ) propuestas en la tabla 8; el mismo día, por un mismo analista, y los resultados fueron obtenidos del mismo equipo. De cada nivel se determinó el coeficiente de variación (CV).
- 2) Reproducibilidad.** Un mismo analista realizó por triplicado las concentraciones baja, media y alta de lumiracoxib propuestas en la tabla 8, durante tres días y se determinó el coeficiente de variación de cada nivel.

**g. Exactitud.** De los resultados obtenidos en la repetibilidad y reproducibilidad se determinó la concentración promedio de cada nivel.

**h. Estabilidad.** Se determinó la estabilidad de muestras procesadas por un periodo de ocho días y de muestras sin procesar por 60 días. En ambos casos se realizó un análisis inicial por triplicado (tiempo cero) de las concentraciones baja (0.2  $\mu\text{g/mL}$ ) media (2  $\mu\text{g/mL}$ ) y alta (7  $\mu\text{g/mL}$ ), siguiendo la tabla 8.

**1) Muestras procesadas.** Se analizaron por triplicado las concentraciones baja, media, y alta y cada sobrenadante fue fraccionado en cantidades de 150  $\mu\text{L}$  en tubos cónicos de polietileno de alta densidad y se resguardaron a  $-37^{\circ}\text{C}$ . Tres muestras de cada concentración se analizaron a las 24, 48, 72 y 160 horas.

**2) Muestras sin procesar.** Muestras de 100  $\mu\text{L}$  plasma de rata con cantidades necesarias de lumiracoxib para obtener los niveles de concentración bajo (0.2  $\mu\text{g/mL}$ ), medio (2  $\mu\text{g/mL}$ ) y alto (7  $\mu\text{g/mL}$ ), se resguardaron a  $-37^{\circ}\text{C}$  y cada nivel se analizó por triplicado a los 8, 15, 22, 30 y 60 días.



En ambas condiciones se determinó la cantidad de lumiracoxib presente y la presencia de metabolitos endógenos.

Para la preparación de las muestras se usó plasma recién extraído y soluciones stock preparadas el mismo día. La cantidad de fármaco presente en cada muestra se determinó con el promedio de tres curvas en plasma, analizadas bajo las mismas condiciones (mismo día, analista, equipo y fase móvil).

#### 14. Aplicación del método

Se llevó a cabo la cinética del lumiracoxib en tres ratas wistar hembras, previamente cánuladas y en ayuno. Posteriormente se les administró una dosis de lumiracoxib de 30 mg/kg de peso por vía oral y se tomaron muestras de 200  $\mu$ L de sangre a los 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 120, 240, 480 y 600 min.

Cada muestra fue separada y procesada para su posterior análisis como se menciona en el apartado 8c, 9a y 9b.

Los resultados obtenidos de la cinética se analizaron en el programa Win-nonlin versión 2.1, para determinar los parámetros farmacocinéticos de:

**$C_{max}$**  = concentración máxima esperada

**$t_{max}$**  = Tiempo correspondiente a la concentración máxima

**$ABC_{0-t}$**  = Área Bajo la Curva hasta la última concentración

**$ABC_{0-t}$**  = Área Bajo la Curva desde la administración del fármaco extrapolada a infinito

**$t_{1/2}$**  = Tiempo de vida media





### III. RESULTADOS

#### A. Desarrollo del método

##### 1. SELECCIÓN DE FASE MÓVIL

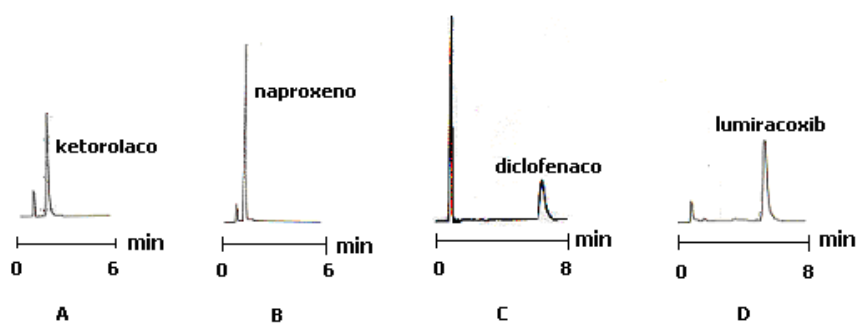


Figura 13. Cromatogramas típicos de las soluciones stock de A. Ketorolaco 2.30 min, B. Naproxeno 2.04 min, C. Diclofenaco 6.30 min y D. Lumiracoxib 5.50 min, obtenidos con la fase móvil metanol-acetatos (60:40) a una velocidad de flujo de 1.2 mL/min.

##### 2. SELECCIÓN DE ESTÁNDAR INTERNO

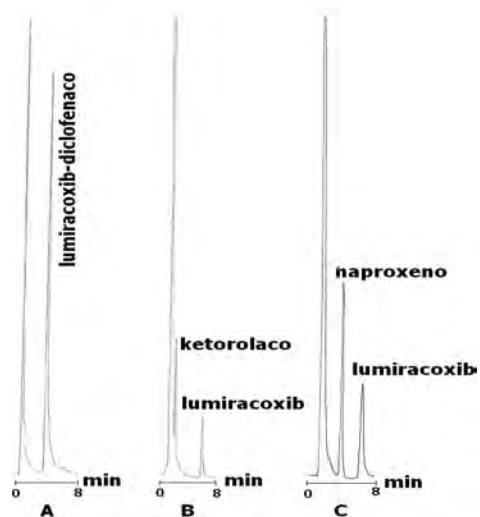


Figura 14. Cromatogramas correspondientes a muestras en plasma de: A. Diclofenaco-lumiracoxib 7.0 min, B. Ketorolaco 1.59 min y lumiracoxib 6.50 min, C. Naproxeno 2.40 min y lumiracoxib 6.30.



### 3. SELECCIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN

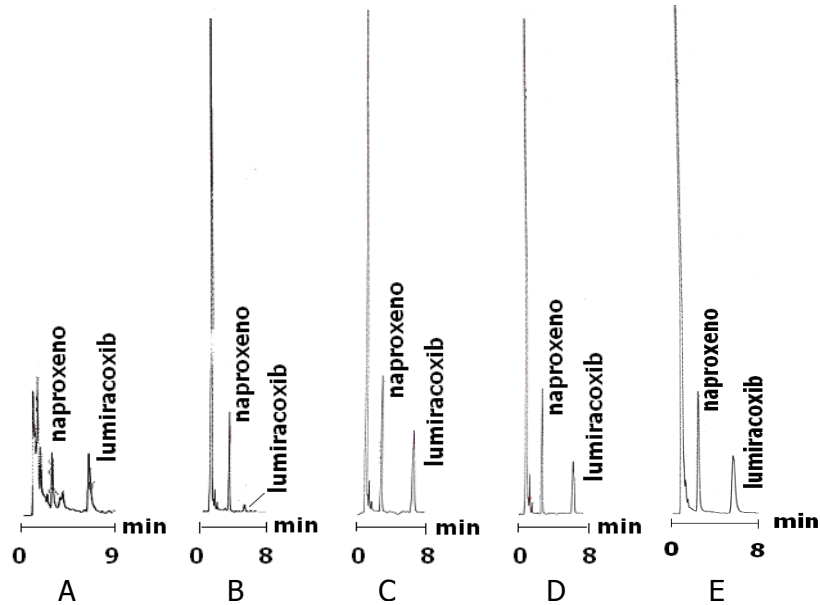
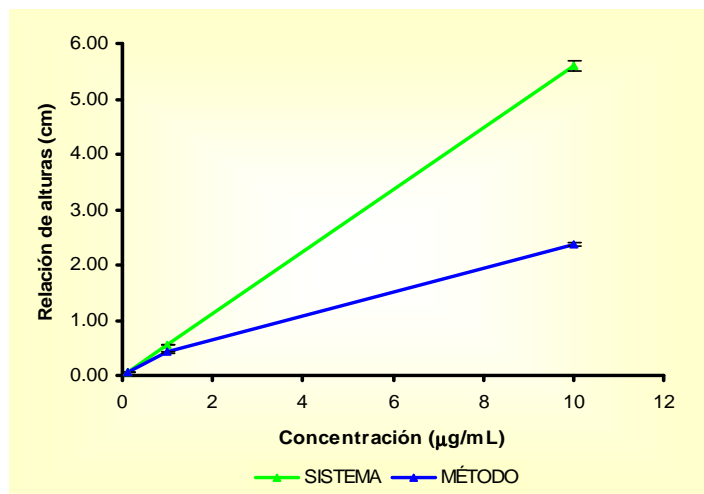


Figura 15. Cromatogramas correspondientes a los métodos de extracción ensayados durante el desarrollo del método: A. extracción líquido-líquido con acetato de etilo, B. extracción con ácido perclórico al 6%, C. Extracción con sulfato de zinc 0.3 M, D. Extracción con acetonitrilo y E. Extracción con metanol. Todas las muestras contienen 1  $\mu\text{g/mL}$  de lumiracoxib y 2.25 $\mu\text{g/mL}$  de naproxeno.

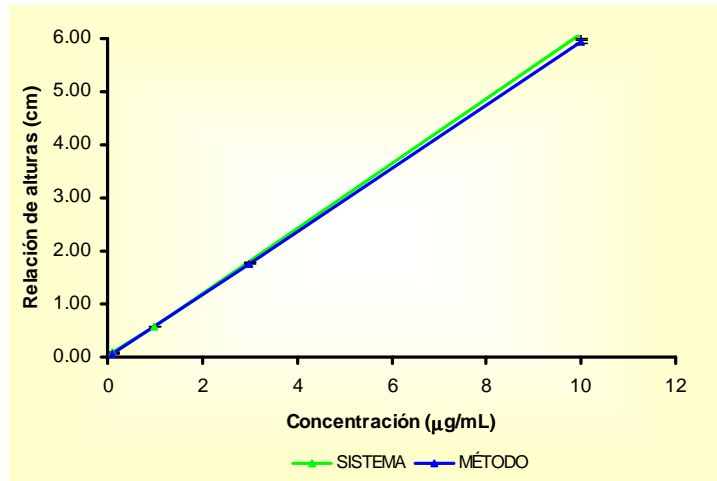
#### a. Extracción con sulfato de Zinc



Gráfica 1. Promedio de tres curvas de lumiracoxib  $\pm$  EE en solución (sistema) y lumiracoxib con adición de plasma (método) correspondientes a la extracción con sulfato de zinc 0.3 M.

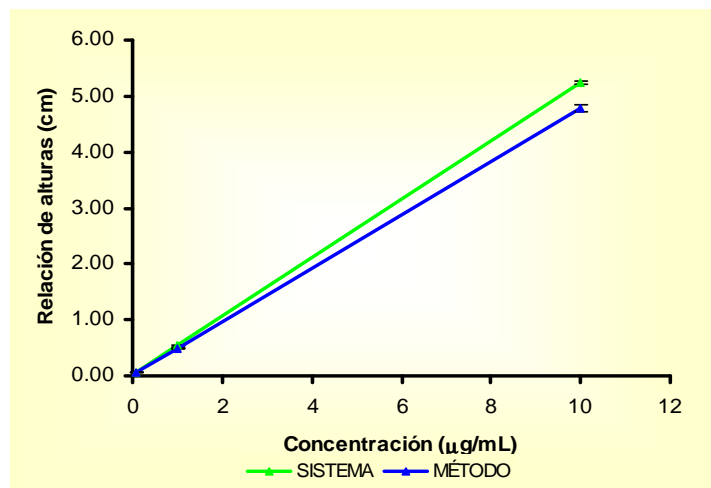


### b. Extracción con acetonitrilo



Gráfica 2. Promedio de tres curvas de lumiracoxib  $\pm$  EE en solución (sistema) y lumiracoxib con adición de plasma (método) correspondientes a la extracción con acetonitrilo.

### c. Extracción con metanol



Gráfica 3. Promedio de tres curvas de lumiracoxib  $\pm$  EE en solución (sistema) y lumiracoxib con adición de plasma (método) correspondientes a la extracción con metanol.



Tabla 9. Valores de Intercepto y Pendiente Obtenidos de la Linealidad del Método y Sistema de los Métodos de Extracción Ensayados.

Método de extracción	Parámetro	Pendiente	Ordenada	Coefficiente de determinación	% de recobro
Sulfato de zinc	Sistema	0.5594	0.0012	1.0000	105.81
	Método	0.2265	0.1146	0.9966	9.69
Acetonitrilo	Sistema	0.6226	0.0062	0.9999	111.94
	Método	0.5953	0.0015	1.0000	103.5
Metanol	Sistema	0.5227	0.0086	1.0000	98.6314
	Método	0.4777	0.0045	1.0000	98.8931

#### 4. CINÉTICA PILOTO

Durante el análisis de las muestras de la cinética, se observó la presencia de un pico endógeno a los 2 min, que interfería con la cuantificación del estándar interno, debido a que aumentaba de tamaño conforme transcurría el tiempo de muestreo, como se puede observar en los siguientes cromatogramas.

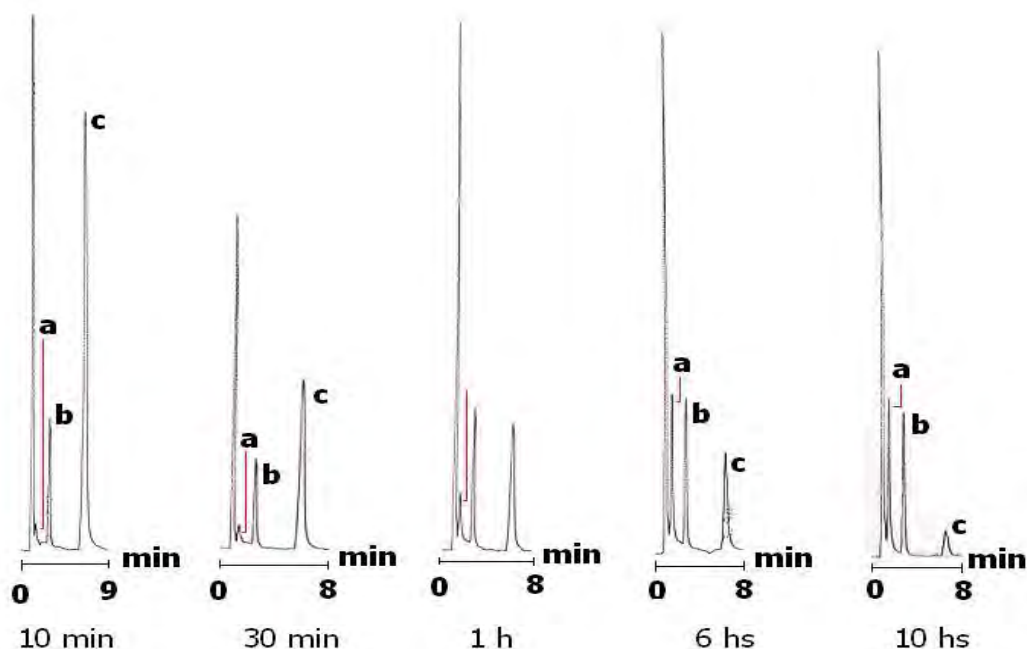
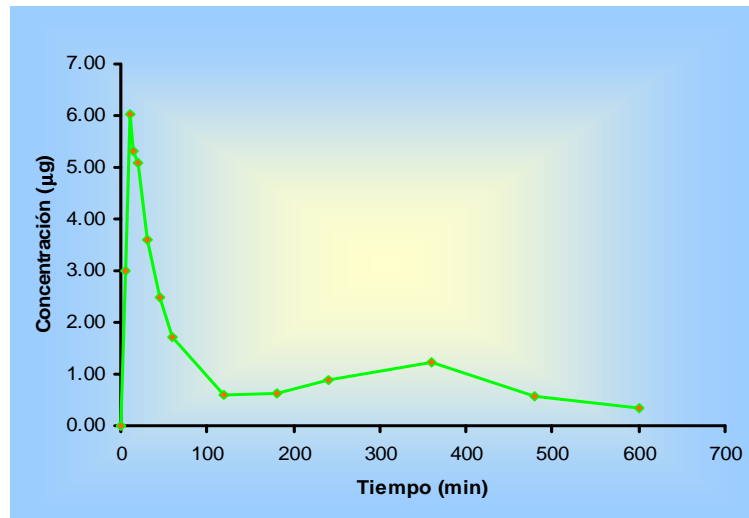


Figura 16. Cromatogramas típicos de cinética correspondiente a la administración de lumiracoxib por vía oral a una rata hembra, donde a. Pico endógeno (1.55 min), b. Naproxeno (3 min) y c. Lumiracoxib (7 min).



Después de la administración del lumiracoxib por vía oral, se terminó a los 10 min una concentración máxima de 6.0428  $\mu\text{g/mL}$ , como se puede observar en la siguiente gráfica.



Gráfica 4. Curva de concentración plasmática vs tiempo, después de una administración de lumiracoxib por vía oral de 30 mg/kg de peso, a una rata hembra.

## B. VALIDACIÓN

### 1. SELECTIVIDAD

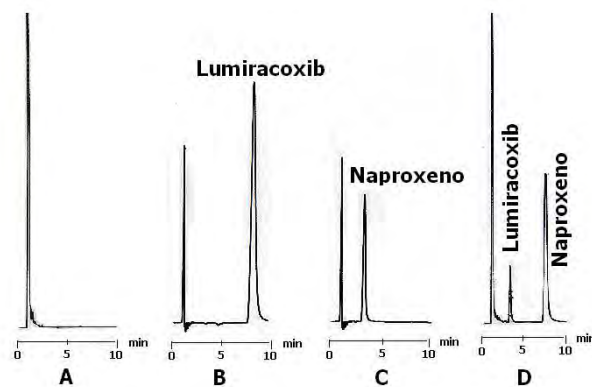


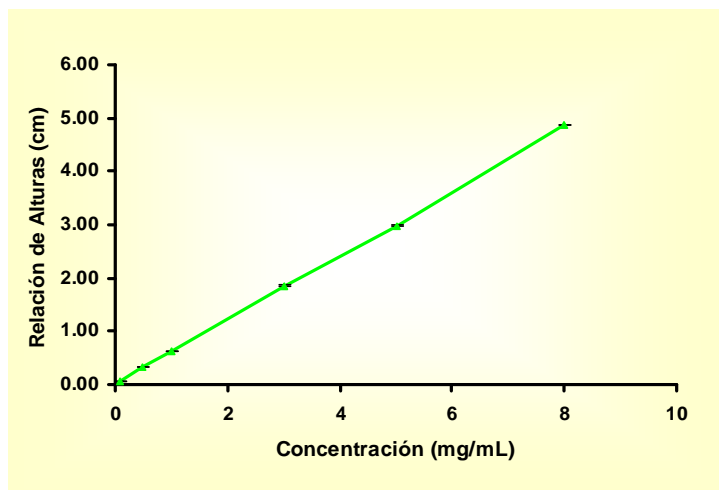
Fig 17. Cromatogramas típicos de (A) plasma de rata libre de fármacos, (B) plasma de rata con 50  $\mu\text{g/mL}$  lumiracoxib, (C) plasma de rata con 40  $\mu\text{g/mL}$  de naproxeno (estándar interno) Y (D) Plasma de rata con lumiracoxib y naproxeno. El resultado de los tiempos de retención fue de 3 minutos para el estándar interno y 9 minutos para el lumiracoxib.



## 2. LINEALIDAD DEL SISTEMA

Tabla 10. Porcentaje de Recobro del lumiracoxib en Solución. Linealidad del Sistema

Concentración Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Exactitud (%)	CV (%)
0.1	91.32	0.0
0.3	103.57	0.0
1	100.44	1.15
3	101.19	1.44
5	98.17	1.21
8	100.53	0.0



Gráfica 5. Se muestra la curva correspondiente al lumiracoxib en solución (sistema) en el intervalo de concentración de 0.1 A 8  $\mu\text{g/mL}$ , con una ecuación de  $Y = 0.6050X + 0.0093$  y un coeficiente de determinación de 0.9998. Los datos son expresados por la media  $\pm$  el EE de tres determinaciones.

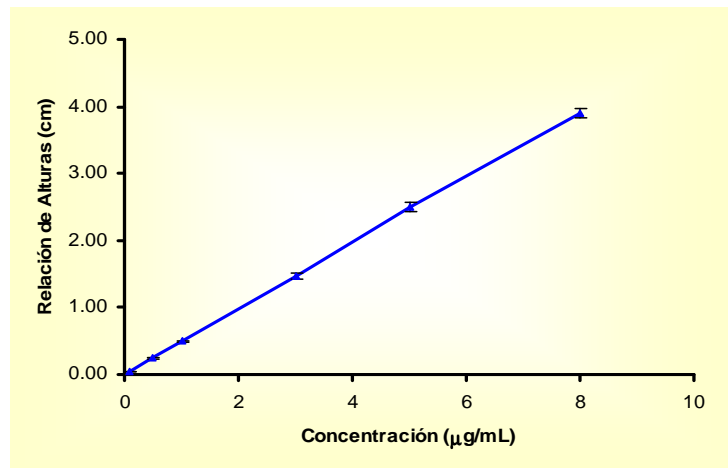
La precisión del sistema se determinó con el promedio de seis determinaciones de la concentración central de la curva (3  $\mu\text{g/mL}$ ), obteniéndose una concentración promedio de  $3.0263 \pm 0.0363$  y un coeficiente de variación de 1.20.



### 3. LINEALIDAD DEL MÉTODO

Tabla 11. Porcentaje de Recobro de Lumiracoxib en Plasma de Rata. Linealidad del Método.

Concentración Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Exactitud (%)	CV (%)
0.1	91.13	6.43
0.3	96.14	5.35
1	100.29	3.87
3	99.60	3.94
5	101.69	3.48
8	99.41	2.03



Grafica 6. Se muestra la curva correspondiente al lumiracoxib en plasma (método) en un intervalo de concentración de 0.1 a 8  $\mu\text{g/mL}$  con una ecuación  $Y = 0.4893X + 0.0073$  y un coeficiente de determinación de 0.9998. Los datos son expresados por la media  $\pm$  EE de seis determinaciones.

El intervalo de confianza calculado para la pendiente fue de 0.5001 a 0.4785 y para el intercepto de 0.0564 a -0.0418



#### 4. RECUPERACIÓN ABSOLUTA

Tabla 12. Porcentaje de Recobro de Lumiracoxib en Metanol (Sistema). Los Datos son Expresados por la Media  $\pm$  EE de tres Determinaciones en Cada Nivel de Concentración.

Concentración Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración recuperada( $\mu\text{g/mL}$ )	Recobro (%)
0.1	0.0913	91.3234 $\pm$ 0.0000
0.5	0.5179	103.5713 $\pm$ 0.0000
1	1.0044	100.4370 $\pm$ 0.0038
3	3.0356	101.1862 $\pm$ 0.0146
5	4.9087	98.1740 $\pm$ 0.0199
8	8.0422	100.5270 $\pm$ 0.0000

Tabla 13. Porcentaje de Recobro de Lumiracoxib en Plasma de Rata Método). Los datos son Expresados por la Media  $\pm$  EE de Tres Determinaciones en Cada Nivel de Concentración.

Concentración Adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración recuperada( $\mu\text{g/mL}$ )	Recobro (%)
0.1	0.0939	93.9354 $\pm$ 0.0000
0.5	0.4844	96.8871 $\pm$ 0.0133
1	1.0110	101.1029 $\pm$ 0.0230
3	2.9831	99.4365 $\pm$ 0.0468
5	5.0573	101.1464 $\pm$ 0.1136
8	7.9702	99.6273 $\pm$ 0.1071

#### 5. LIMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

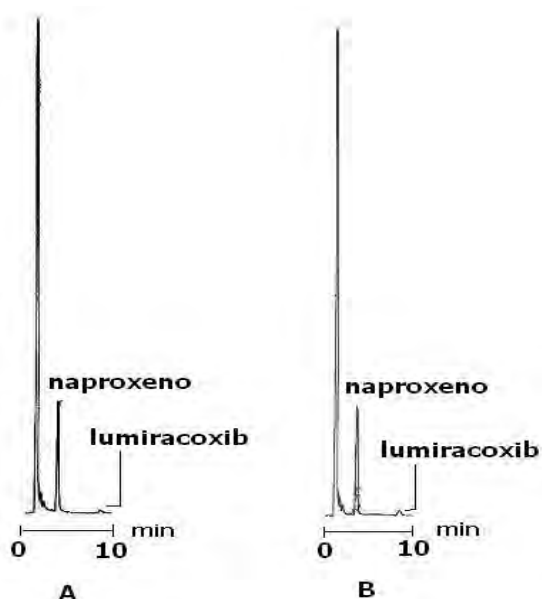


Figura 18. Cromatogramas típicos de: A. Límite de detección (0.06  $\mu\text{g/mL}$ ) y B. límite de cuantificación (0.1  $\mu\text{g/mL}$ ). El estándar interno presenta un tiempo de retención de 3.50 min y el lumiracoxib de 9 min.





Tabla 14. Concentración Determinada como Limite de Detección y Límite de Cuantificación

Parámetro	Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Coefficiente de variación	Recobro (%)
Limite de detección	0.06	----	----
Limite de cuantificación	0.1	6.43	91.13

## 6. PRECISIÓN Y EXACTITUD

Tabla 15. Repetibilidad (Coeficiente de Variación, CV) y Exactitud para la Concentración Baja, Media y Alta de Lumiracoxib.

Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Lumiracoxib intra-día (n=5 cada nivel)		
	Concentraciones medidas (medida $\pm$ SD, $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	Exactitud (%)
0.2	0.1997 $\pm$ 0.0031	1.5606	99.8543
2	2.0297 $\pm$ 0.0238	1.1759	101.4841
7	7.1242 $\pm$ 0.0289	0.4062	101.7750

Tabla 16. Reproducibilidad (Coeficiente de Variación, CV) y Exactitud para la Concentración Baja, Media y Alta de Lumiracoxib

Concentración adicionada ( $\mu\text{g/mL}$ )	Lumiracoxib, inter-día (3 días, n=3 cada nivel)		
	Concentración (medida $\pm$ SD, $\mu\text{g/mL}$ )	CV (%)	Exactitud (%)
0.2	0.1942 $\pm$ 0.0106	5.4891	97.0805
2	1.9689 $\pm$ 0.0568	2.8899	98.4454
7	6.9565 $\pm$ 0.1.1550	2.2294	99.3897

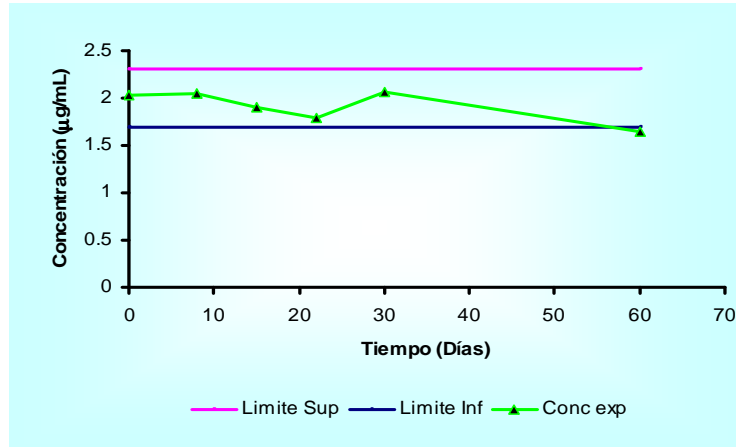
## 7. ESTABILIDAD DE LAS MUESTRAS

Tabla 17. Resultados de la Estabilidad del Lumiracoxib en Muestras Procesadas y sin Procesar a  $-37^{\circ}\text{C}$ .

PARÁMETRO	RESULTADOS
Estabilidad de muestras sin procesar	30 días
Estabilidad de muestras procesadas	24 horas

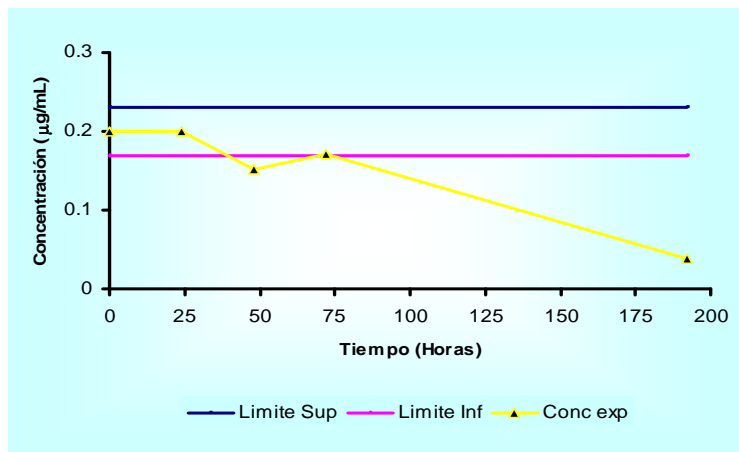


**a. Muestras sin procesar.**



Gráfica 7. Análisis de Estabilidad de muestras sin procesar de 2 µg/mL de lumiracoxib a -37 °C, donde se muestra el comportamiento de la concentración del lumiracoxib a lo largo de 60 días. Se observa un descenso en la concentración del analito con respecto al límite inferior transcurridos 60 días. Límite superior 2.3µg/mL y límite inferior 1.7 µg/mL

**b. Muestras procesadas**



Gráfica 9. Estabilidad de muestras procesadas de 0.2 µg/mL de lumiracoxib con 2.25 µg/mL de naproxeno (EI) a -37 °C, donde se muestra el comportamiento de la concentración del lumiracoxib durante 192 horas. Transcurridas 48 horas se observa un descenso en la concentración del analito con respecto al límite inferior. Límite superior 0.23µg/mL y límite inferior 0.17 µg/mL



## 8. APLICACIÓN DEL MÉTODO

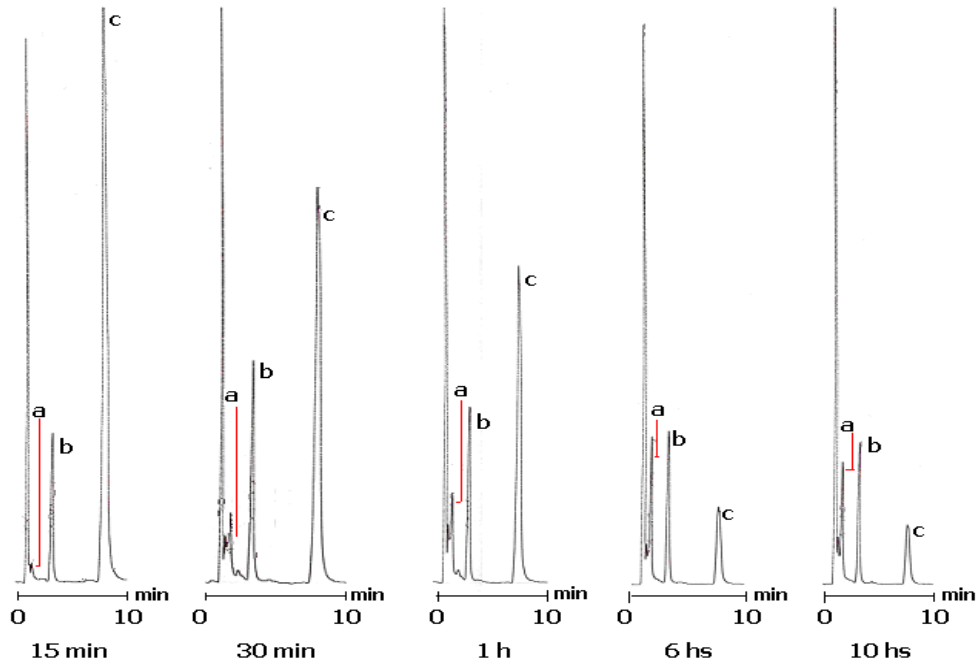
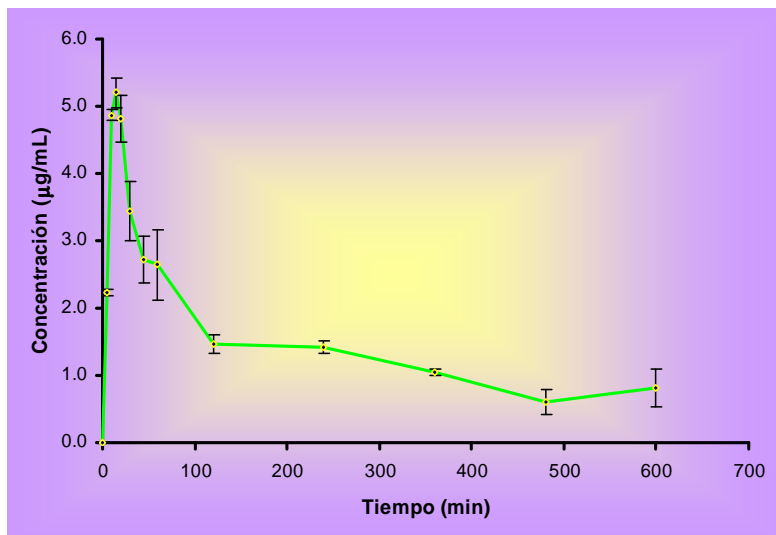


Figura 19. Cromatogramas típicos de cinética correspondiente a la administración de lumiracoxib por vía oral a una rata hembra, donde a. Pico endógeno (2.30 min), b. naproxeno (4 min) y c. Lumiracoxib (9.30 min).



Grafica 9. Curva de concentración plasmática vs tiempo, de lumiracoxib después de una administración de 30 mg/kg de peso,  $\pm$  error estándar, con una  $n = 2$



DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE LUMIRACOXIB EN PLASMA DE RATA, POR CLAR



Tabla 18. Parámetros Farmacocinéticos Obtenidos de Dos ratas Hembras Después de una Administración de 30 mg/kg de Lumiracoxib por Vía Oral.

<b>C<sub>max</sub> (µg/mL)</b>	<b>t<sub>max</sub> (min)</b>	<b>AUC<sub>t</sub> (µg/mL)</b>	<b>AUC<sub>∞</sub> (µg/mL)</b>	<b>t<sub>1/2</sub> (min)</b>
5.2015	15	830.89	1109.09	233.64

C<sub>max</sub> Concentración máxima plasmática; t<sub>max</sub>, tiempo en que se alcanza la concentración máxima plasmática; AUC<sub>t</sub> área bajo la curva de la concentración plasmática-tiempo, AUC<sub>∞</sub> área bajo la curva de la concentración plasmática-tiempo extrapolada al infinito, t<sub>1/2</sub> vida media.



## IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los cromatogramas obtenidos con las fases móviles propuestas presentaron simetría, sin embargo, con la fase móvil No. 1 que contenía mayor cantidad de metanol, los fármacos presentaron tiempos de retención muy cercanos entre sí. La fase 3 y 4 proporcionaron tiempos de retención muy largos, en especial para el lumiracoxib (14 min). La fase móvil No.2 produjo los mejores resultados, ya que el lumiracoxib presentó un tiempo de retención de 7 minutos y el resto de los fármacos alrededor de 2 minutos (figura 13). Como flujo óptimo se estableció 1.2 mL/min. Las fases preparadas con acetonitrilo fueron descartadas debido a que este disolvente presenta una fuerza de elución menor al metanol, por lo que la resolución de los picos disminuye y se corroboró al realizar una prueba bajo las mismas condiciones de flujo y longitud de onda con las proporciones de la fase No. 2, pero cambiando el metanol por acetonitrilo; los tiempos de retención de los fármacos se observaron más cortos en comparación a los de la fase móvil preparada con metanol. Además de la baja resolución presenta la desventaja de aumentar el costo en cada análisis ya que se requiere de una mayor cantidad de acetonitrilo en la fase móvil para mejorar la resolución de los picos de interés.

La cuantificación del lumiracoxib se llevó a cabo a partir del método de estándar interno (EI), por lo que fue necesario seleccionar un fármaco que presentará un comportamiento cromatográfico similar al del lumiracoxib. Durante el análisis de los fármacos propuestos como posibles estándares, se rechazó el uso del diclofenaco, ya que bajo las condiciones de trabajo establecidas su tiempo de retención era muy cercano al del lumiracoxib (6 min para el diclofenaco y 7 min para el lumiracoxib) lo que tuvo como consecuencia que solo se observara un pico cromatográfico a los 7 min como se puede observar en la figura 14A; esto debido a la gran similitud que presenta la molécula del diclofenaco y el lumiracoxib como se puede observar en la figura No 9. El ketorolaco también se rechazó, debido a que presentaba una mayor afinidad por la fase móvil en comparación al diclofenaco y naproxeno, haciendo su tiempo de retención más cercano al frente de disolvente.



Por lo tanto, el estándar interno seleccionado para la cuantificación del lumiracoxib fue el naproxeno, debido a que presentó una mejor señal a los 2.40 min y una mejor separación con respecto al frente de disolvente y el lumiracoxib (fig 14C). La concentración de naproxeno propuesta para la cuantificación de las muestras problema fue de 2.25 µg/mL, con un tiempo de retención de 2.40 minutos bajo las condiciones propuestas.

A la longitud de onda de 270 nm se determinó una mejor respuesta porque los picos cromatográficos se observaron más grandes en comparación a los obtenidos con la longitud de 280 nm. Esto se debe a que la longitud de onda de máxima absorción de los fármacos analizados se encuentra más cercana a los 270 nm (lumiracoxib 270 nm y naproxeno 272 nm). Por lo tanto esta longitud de onda permite asegurar que la respuesta de los fármacos permanecerá constante en cada determinación.

En la selección del método de extracción, inicialmente el lumiracoxib y el EI presentaron señal con todos los disolventes propuestos como extrayentes, sin embargo, la primer extracción descartada fue la extracción líquido-líquido con acetato de etilo, debido a que al analizar los fármacos en la matriz biológica, se determinó que los metabolitos presentes en el plasma presentaban afinidad por este disolvente, interfiriendo así con la determinación de los fármacos como se puede observar en el cromatograma de la figura 15A. Además este método presentó la desventaja de tener un proceso de evaporación de 30 a 40 minutos, mientras que con los otros disolventes se requería tan solo de 15 minutos para llevar a cabo la extracción total del fármaco, lo cual hace más eficiente al método.

Con el ácido perclórico al 6% no se observó la presencia de interferencias como en el caso anterior, sin embargo, se observó la reducción de los tiempos de retención debido al cambio de pH por la presencia del ácido; por otro lado la respuesta obtenida para cada fármaco era menor en comparación con los otros disolventes (figura 15B) esto debido a la baja solubilidad de los fármacos en soluciones ácidas.



Esta desventaja hace poco sensible al método a bajas concentraciones del lumiracoxib, ya que no se puede extraer la cantidad suficiente del fármaco para dar señal.

Con el sulfato de zinc tampoco se observó la presencia de productos endógenos (figura 15C), sin embargo, se presentó la misma desventaja de la baja solubilidad de los fármacos ya que se obtuvo un recobro pobre (9.69%), en este caso el método presentó baja sensibilidad a altas concentraciones ya que la cantidad de solución de sulfato de zinc era insuficiente para extraer todo el fármaco contenido en muestras de concentraciones altas (10  $\mu\text{g/mL}$ ), por lo que el método no presentó linealidad en el rango propuesto de 0.1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ , como se muestra en la gráfica No 1.

Para los métodos de extracción con acetonitrilo y metanol (figura 15D y 15E) no se observó la presencia de productos endógenos y los porcentajes de extracción del lumiracoxib con ambos disolventes fueron similares (acetonitrilo 109.57, 99.55 y 100.04% y metanol 95.39, 100.50 y 99.99%) por la alta solubilidad de los fármacos en dichos disolventes; sin embargo, se descartó la extracción con acetonitrilo ya que se presentó una sobreestimación en la cuantificación del fármaco a concentraciones bajas (0.1  $\mu\text{g/mL}$ , tabla 9), además la altura de los picos correspondientes a los fármacos se observaron disminuidos en comparación a los obtenidos en la extracción con metanol. Por lo tanto, la precipitación de proteínas con metanol fue el método de extracción elegido para la extracción del lumiracoxib, ya que presentó una buena señal, linealidad en el intervalo de trabajo y un buen recobro en cada nivel de concentración.

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas y el método de extracción, se llevó a cabo una cinética piloto, alcanzándose una concentración máxima de 6.0428  $\mu\text{g/mL}$  a los 10 minutos después de la administración del lumiracoxib (Gráfica 4) y con base a este dato se determinó que la concentración máxima se encontraba casi a la mitad del intervalo de concentración propuesto (0.1 a 10  $\mu\text{g/mL}$ ); por lo que se decidió bajar el último nivel de concentración a 8  $\mu\text{g/mL}$ .



Durante el análisis de las muestras se observó la presencia de un metabolito endógeno casi a los 2 minutos que aumentaba de tamaño conforme aumentaba el tiempo de muestreo, dificultando la medición del EI (3 min) (figura 16). Por el comportamiento observado de este metabolito endógeno, se puede decir que es un producto del metabolismo del lumiracoxib que se une al plasma de la rata ya que aumentaba su concentración conforme disminuía la del lumiracoxib en el organismo del animal; además en muestras cargadas no se presentó el mismo comportamiento, ya que se observó el mismo pico pero de tamaño poco significativo y de altura constante que no interfirió con la determinación del EI. Por otra parte, el aumento de la temperatura del laboratorio durante el análisis de las muestras, facilitaba la evaporación del metanol de la fase móvil, por lo que los tiempos de retención se redujeron cerca de 1 minuto y teniendo como consecuencia la interferencia del pico endógeno con la determinación del EI. Estos problemas se solucionaron al aumentar la proporción de metanol en la fase móvil y disminuyendo la velocidad de flujo.

Finalmente la fase móvil utilizada durante la validación del método fue metanol: acetato de sodio 62:38 v/v a una velocidad de flujo de 1 mL/min con detección a 270 nm, usando 2.25 µg/mL de naproxeno sódico como estándar interno en cada muestra y realizando la extracción del fármaco con metanol.

El método es sensible y específico para la determinación de lumiracoxib en plasma de rata; no se encontraron interferencias debidas a compuestos endógenos al evaluar por cromatografía el blanco del plasma de rata, que interfirieran con los picos del lumiracoxib y el estándar interno, como se observa en la figura 17. Por lo tanto, ni la fase móvil empleada ni el metanol con el que fueron preparadas las muestras, presentan influencia en cuanto a la señal del lumiracoxib y el estándar interno.

Al aplicar el método analítico a muestras en solución, se observó linealidad en el intervalo de concentración de 0.1 a 8 µg/mL, con una ecuación  $Y = 0.6050X + 0.0093$  y un coeficiente de determinación de 0.9998 (Grafica 5).





Lo que asegura que el equipo se comportará de manera confiable durante las posteriores etapas de la validación y la aplicación del método. Por otra parte, al evaluar cinco veces una muestra de 3 µg/mL de lumiracoxib en solución, se determinó que el inyector funciona adecuadamente, ya que se observó repetibilidad en cada inyección y se obtuvo un coeficiente de variación menor a 1.5 ( $CV = 1.2$ ), como lo marca el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos (CNQFB).

El método analítico también presentó linealidad en un intervalo de concentración de 0.1 a 8 µg/mL, con una ecuación  $Y = 0.4893x + 0.0073$  y un coeficiente de determinación de 0.9998 al analizar muestras de lumiracoxib de concentración conocida en plasma; lo cual demuestra que la respuesta es directamente proporcional a la concentración del fármaco presente en cada muestra. El recobro obtenido fue mayor al 90% con un coeficiente de variación menor al 7% en cada nivel de concentración estudiado como se observa en la tabla 11.

Cada curva evaluada durante la validación del método, presentó linealidad en el intervalo de concentración propuesto y los valores de la pendiente se encontraron dentro del intervalo de confianza de 0.4785 a 0.5001, así como los valores de la ordenada al origen se encontraron dentro del intervalo de 0.0418 a 0.0563.

Al realizar la comparación de las curvas de lumiracoxib en solución contra las curvas con adición de plasma se determinó que el método es sensible, ya el método es capaz de diferenciar con claridad, entre las pequeñas variaciones de la concentración del analito. Como se puede observar en la gráfica 3, la curva en solución presentó una mayor respuesta en cada nivel de concentración; esto se debe a que no se encuentran interferencias debidas a la matriz biológica que pueda interferir con la respuesta del analito, por lo que se tiene una respuesta del 100% del lumiracoxib y el estándar interno (tabla 12).



Con estos resultados también se puede determinar que el método de extracción es eficiente, ya que el porcentaje de recuperación del lumiracoxib en cada nivel de concentración en plasma presentó una gran similitud con respecto al porcentaje de recuperación obtenido en solución (ver tabla 12 y 13).

A partir de una serie de diluciones se determinó que el límite de detección es de 0.06  $\mu\text{g/mL}$  de Lumiracoxib, ya que a esta concentración se puede diferenciar el pico del ruido, aunque no se puede medir con precisión y exactitud (figura 18). Así mismo, se determinó como límite de cuantificación a la concentración de 0.1  $\mu\text{g/mL}$  con un coeficiente de variación menor al 20% del valor nominal (6.43%), como lo marca la NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.

La precisión intra e inter-día cumplió con los criterios de la NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, en ambos casos el coeficiente de variación se observó menor al 15% en cada nivel de concentración analizado como se observa en la tabla 15 y 16.

Los ensayos de estabilidad llevados a cabo durante 60 días a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  demostraron que el Lumiracoxib se mantiene estable en el plasma solo por 30 días (gráfica 7), ya que después de este tiempo a la concentración de 2  $\mu\text{g/mL}$  se observó una degradación del fármaco menor al 15% (NOM-177-SSA1-1998). Por otra parte, las muestras preparadas y procesadas sólo presentaron una estabilidad de 24 horas, ya que después de este periodo de tiempo las muestras de 0.2  $\mu\text{g/mL}$  presentaron degradación significativa como se puede observar en la gráfica 8.

La evidencia de que el método cumplió con el objetivo, fue la aplicación del mismo a muestras provenientes de una farmacocinética después de una administración por vía oral de 30 mg/kg de rata. Las concentraciones de cada muestra se presentaron dentro del rango de concentración del método validado. La concentración máxima del lumiracoxib observada fue de 5.2015  $\mu\text{g/mL}$  a los 15 min después de la administración del fármaco (tabla 18).



## V. CONCLUSIONES

Esté método analítico desarrollado es adecuado para la separación y cuantificación del lumiracoxib en plasma de rata con alta confiabilidad por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección UV; ya que el método cumplió con las especificaciones y atributos de calidad establecidos por la Norma Oficial Mexicana 177 y el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Por lo tanto, este método es adecuado para uso rutinario en estudios farmacocinéticos del lumiracoxib después de una administración por vía oral de 30 mg/kg.

Debido a que el método validado presento linealidad en un intervalo de 0.1 a 8  $\mu\text{g/mL}$ , así como precisión y exactitud en cada nivel de concentración propuesto, no se recomienda llevar a cabo cuantificaciones fuera de este intervalo de concentración, ya que el método puede presentar posibles desviaciones a concentraciones mayores o tener una sobreestimación en concentraciones por debajo del límite de cuantificación, que pueden llevar a una incorrecta interpretación de los resultados. En caso de obtener concentraciones mayores a 8  $\mu\text{g/mL}$ , se recomienda realizar diluciones de las muestras, para asegurar que la cuantificación se está llevando a cabo con exactitud y precisión.

Las ventajas que presenta el método es ser sencillo y económico ya que para el tratamiento de la muestra solo se requiere de una precipitación de proteínas con metanol y posteriormente una separación por decantación; aún cuando la extracción del fármaco es muy sencilla, se obtiene una extracción del fármaco del 98%. Otra ventaja que presenta el método es su eficiencia, ya que el análisis se puede aplicar a muestras biológicas de 100  $\mu\text{L}$  de plasma de rata para estudios farmacocinéticos y permite analizar un número mayor de muestras en un periodo de tiempo corto. Además este método puede ser adaptado en determinaciones de lumiracoxib en plasma humano.



## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Inmunologia-online (sede web). España: José Peña Martínez; 2003 [acceso 2 de julio de 2007]. 25 Inmunología inflamación. Disponible en: <http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/inmunologia/>
2. Mycek M, Harvey R, Champe P. Farmacología. 2a edición. México: Mc Graw Hill; 2004. Pág. 475-477.
3. Salazar E, Orellana A y Pimentel E. Inhibidores específicos de cox-2: ¿Riesgo para el paciente cardiópata?. Acta Odontológica Venezolana [revista de Internet] 2004 [acceso:2 de julio de 2007]; 42 (1). Disponible en: [http://www.actaodontologica.com/ediciones/2004/1/inhibidores\\_especificos\\_cox\\_2\\_riesgo\\_paciente\\_cardiopata.asp](http://www.actaodontologica.com/ediciones/2004/1/inhibidores_especificos_cox_2_riesgo_paciente_cardiopata.asp)
4. Guía medica familiar [sede web] Barcelona: Medina M; 1998 [2 de julio de 2007]. Enfermedades más corrientes Inflamación. Disponible en: <http://www.explored.com.ec/guia/fas828.htm>
5. Foyer W. Principios de Química Farmacéutica. Vol. 2 España: Reverte; 1991
6. Patient Education Institute [sede web]. Coralville: Jorgensen L. 2007 [acceso 21 de agosto de 2007]. Reumatología [6]. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/tutorials/arthritisspanish/id2791s2.pdf>
7. National Institute for Clinical Excellence. Guidance on the use of cyclo-oxygenase (cox) II selective inhibitors, celecoxib, rofecoxib, meloxicam and etodolac for osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Thechnology Appraisal Guidance 2004 (27).
8. Champe P, Harvey R. Farmacología. 2ª ed. México: Mc Graw Hill; 2004. Pág. 475-477.
9. Luján M, López E, Guajardo R, Castañeda J, Tena S, Juárez M, Ibáñez Y. Farmacología de los COXIB. Especificidad vs selectividad. Revista Médica del Hospital General de México [Revista en Internet] 2001 [11 de octubre de 2007]; 64 (1): [4]. Disponible en:



<http://www.medigraphic.com/espanol/e-htms/e-h-gral/e-hg2001/e-hgs01-1/em-hgs011c.htm>

10. Martínez A, Rivas S. Funciones de las prostaglandinas en el sistema nervioso central [monografía en Internet]. México: Departamento de Fisiología. Facultad de Medicina UNAM; [11 de octubre de 2007]. Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/revfacmed/no48-5/RFM48509.pdf>
11. García R. Inhibidores de la Cox-2 y función renal. Rev. méd. Chile. [online]. oct. 2000; 128 (10) [citado 09 Noviembre 2007], p.1177-1178. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-9887200001000015&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-9887200001000015&lng=es&nrm=iso). ISSN 0034-9887.
12. González R, Guedes P, Vives R, Canto G. Antiinflamatorios inhibidores selectivos de la cicloxigenasa-2 (COX-2). Alergol Inmunol [Revista en Internet] 2002. [Acceso 2 de julio de 2007]
13. Agudo C. Nuevos AINEs: Inhibidores de la COX-2. Boletín de información Farmacéutica de Navarra. 2002; 10 (2).
14. Bautista H. Sangrado intestinal asociado al empleo de los inhibidores de la cox-2 (coxib-2). Revista Medica del Hospital General (México). 2000; 7 (83):102-105.
15. Cruz López O. Diseño, Síntesis y Evaluación Biológica De N-Fenilindoles Como Inhibidores Selectivos de la Ciclooxygenasa 2 [Tesis doctoral]. Granada: Universidad de Granada; 2005.
16. Caviedes B, Estévez M, Rojas P. Analgésicos usados en el manejo del dolor dental: acetaminofen, inhibidores de la cox-2, ketorolaco y nimesulida. [Internet]. Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Odontología; 2006 [acceso 9 de julio de 2008] Disponible en: [http://www.javeriana.edu.co/academiapgendodoncia/i\\_a\\_revision34.html](http://www.javeriana.edu.co/academiapgendodoncia/i_a_revision34.html)
17. National Institute of General Medical Sciences, The Structures of Life [Página principal en internet]. Bethesda: National Institute of General Medical Sciences; 2007. Disponible en: <http://publications.nigms.nih.gov/structlife/chapter4.html>



18. WikiSER, Folleto de la SER: Los Antiinflamatorios no esteroideos (AINE) [sede web]. Sociedad Española de Reumatología; [Acceso 22 de marzo de 2009; 1:00 am]. Disponible en: [http://www.ser.es/wiki/index.php/Folleto de la SER: Los Antiinflamatorios no esteroideos %28AINE%29](http://www.ser.es/wiki/index.php/Folleto_de_la_SER:_Los_Antiinflamatorios_no_esteroideos_%28AINE%29)
19. Núñez C, López P, Martínez J. AINEs "Clásicos" e inhibidores selectivos de la COX-2. INSALUD: Boletín Farmacoterapéutico de Castilla la Mancha. [Revista en Internet] 2001 [Consultado el 2 de julio de 2007, 12:pm]; 2 (4): 1-8. Disponible en: [http://sescam.jccm.es/web/farmacia/guiaspublicaciones/II\\_4\\_AINEs.pdf](http://sescam.jccm.es/web/farmacia/guiaspublicaciones/II_4_AINEs.pdf)
20. James B, Gu H, Rodriguez L, Bonner J, Dickson J, and Rordorf C. Pharmacokinetics And Metabolism Of Lumiracoxib In Healthy Male Subjects. Drug Metabolism And Disposition (USA). 2004; 32 (5): 566-571.
21. Curran M, Lyseng-Williamson. Lumiracoxib. Adis Drug Profile. 2004; 64 (19); 2237-2246.
22. Esser R, Berry C, Zhengming D, Dawson J, Fox A, Fujimoto R. Preclinical pharmacology of lumiracoxib: a novel selective inhibitor of cyclooxygenase-2. British Journal of Pharmacology (Gran Bretaña). 2005; 144; 538-550.
23. Mysler E. Lumiracoxib (Prexige): a new selective cox-2 inhibitor. Drugs Focus (Buenos Aires Argentina). 2004;58 (6); 606-611.
24. Summary Of Product Characteristics. This SPC Was Approved by the CHMP on 23 June 2005 and is published pending formal endorsement by the European Commission.
25. Guía de Validación, Métodos Analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos S.A.C. Edición 2002
26. Avendaño C. Introducción a la química Farmacéutica. 3er reimpresión, Mc México: Grawn Hill Interamericana, 1997. Pág. 843-847
27. Guidance For industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. November 1996.



28. NORMA Oficial Mexicana. 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. NOM-177-SSA1-1998.
29. Shah P, Midha K, Dighe S, McGilveray J, Skelly P, Yacobi, et al. Analytical Methods Validation: bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1992; 81 (3):309-312).
30. Guidance For industry. Q2A Validation of Analytical Procedures: Text Validation of Analytical Procedure. March 1995.
31. Guía de Validación. Métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C. 2002.
32. Cárdenas Rodríguez H, Cortés Arroyo A. Aspectos Biofarmacéuticos de la evaluación de medicamentos. México DF: Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco; 1996.
33. Yost R, Ettre L, Colon R. Introducción a la Cromatografía Líquida Practica. Estados Unidos de America: Perkin-Elmer;1980.
34. Hanai T. HPLC a Practical Guide. Cambridge: Royal Society of chemistry;1999.
35. Reglamento de Validación de Métodos Analíticos Requeridos para el Registro Sanitario de Medicamentos ante el Ministerio de Salud. Decreto No 29968-S. Gaceta N° 231 del 30 de noviembre del 2001.
36. Waters High Performance Liquid Chromatography ( HPLC ) Primer [sede wed]; 2007 [acceso 27 de Julio de 2007]. Disponible en: <http://www.waters.com/watersdivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-5LTGBH>
37. QuimiNet.com. ¿Qué es Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC)? [sede wed]. México: QuimiNet.com; 2006 [acceso 27 de agosto de 2007: 9:28 pm]. Disponible en: [http://www.quiminet.com.mx/art/ar\\_%2518%253CH%25D0%25F2%25E89%25D9.php](http://www.quiminet.com.mx/art/ar_%2518%253CH%25D0%25F2%25E89%25D9.php)
38. Skoog D. Principios de Análisis Instrumental. 5ta ed. España: Mc Graw-Hill; 2001. Págs. 785-793.



39. Rouessac F, Rouessa A. Análisis Químico Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas. España: Mc Graw Hill; 2003.
40. Watson D. Pharmaceutical Analysis A Textbook for Pharmacy Students And Pharmaceutical Chemistry. China: Churchill Livingstone; 1999.