



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**OPTIMIZACIÓN Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICAR
PARACETAMOL EN PLASMA Y SU APLICACIÓN EN UN ESTUDIO DE
BIODISPONIBILIDAD EN POBLACIÓN MEXICANA.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

YAZMIN YURIDIA GARCÍA MARTÍNEZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Q.F.B. ALFREDO GARZÓN SERRA _____

VOCAL: DRA. HELGI HELEN JUNG COOK _____

SECRETARIO: M. EN F. LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE _____

1ER. SUPLENTE: M. EN C. LAURO MISAEL DEL RIVERO RAMÍREZ _____

2° SUPLENTE: M. EN C. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ _____

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA Y BIOFAMACÉUTICA S.A. DE C.V.(IFAB)

ASESOR DEL TEMA

M. EN F. LUIS JESÚS GARCÍA AGUIRRE

SUPERVISOR TÉCNICO

Q.F.B. JENNY FLORES REYES

SUSTENTANTE

YAZMIN YURIDIA GARCÍA MARTÍNEZ

A DIOS.

Gracias por esta familia maravillosa, que con todos sus defectos y virtudes son lo más importante en mi vida. Gracias por llenar mi vida de personas que me han enseñado grandes cosas que han hecho mi paso por esta vida algo extraordinario.

A MIS PADRES:

Por ser mi ejemplo a seguir y mis mejores consejeros, gracias por nunca dejarme caer y apoyarme siempre, por enseñarme que todo en esta vida se puede lograr si se lucha por alcanzarlo, este logro es también de ustedes. No tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí... Los amo!!!

A MIS HERMANOS

Cuando recuerdo mi niñez es inevitable no pensar en ustedes. (Nanci y Gregorio). Gracias por esos momentos maravillosos que hemos pasado juntos, por esas peleas interminables de la infancia que le dieron sabor a mi niñez, Por ser mis cómplices. Extraño mucho que ya no vivamos juntos pero son etapas de nuestras vidas que inevitablemente tenían que pasar. Gracias por creer en mí y apoyarme en todo, se que podre contar siempre con ustedes. Son una parte fundamental en mi vida.

A MIS TI@S Y PRIM@S.

Gracias por todas las vacaciones inolvidables que he pasado a lado de ustedes, por los paseos a la "plasha", al rio, al encierro etc. Pero sobre todo por el amor y la confianza que han demostrado en mí. Estoy feliz de ser parte de esta familia, "loca y escandalosa", pero maravillosa... Los quiero a Todos!!!

A MIS SOBRIN@S

A los que están, a los que vienen en camino y a los que indudablemente llegarán... Gracias por sus ocurrencias de niños, me hacen divertir mucho, con ustedes he aprendido que se puede tomar la vida más relajada, y que siempre habrá momentos para divertirse...

A MIS AMIGOS

A los que han estado desde hace muchos años en mi vida, a los que están desde mis primeros pasos por la facultad, a los que fui conociendo al paso de los años, gracias por hacer más llevaderas tantas horas de clases, por hacer de esas prácticas de laboratorio tan divertidas. No los menciono por no querer omitir a nadie pero ellos saben quiénes son. "Un amigo es la persona que nos muestra el rumbo y recorre con nosotros una parte del camino"

A SALVADOR

Gracias por la paciencia, dedicación y el apoyo que a lo largo de estos años siempre me diste cuando más los necesite, gracias por tus palabras de apoyo y por hacerme sentir que si podía. Le doy gracias a la vida por haberte puesto en mi camino.

A DANAE, que a pesar de sus problemas y pendientes le dedico tiempo a la revisión ortográfica de esta tesis, gracias.

A MIS COMPAÑEROS DE IFAB: A los que están y los que se han ido, Gracias por el excelente ambiente laboral, por sus consejos, por sus ocurrencias, y por esas fiestas de los viernes jaja, espero volver a trabajar con ustedes, sé que he ganado grandes amigos.

AL M EN F LUIS GARCÍA: Gracias, por asesorar este trabajo de tesis, por haber confiado en mí cuando nadie lo hizo, por permitirme formar parte de IFaB gracias a eso he crecido profesionalmente y he conocido excelentes personas.

A LA DRA. HELGI JUNG: Gracias por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, por las correcciones, gracias a ellas se logro un mejor trabajo de tesis.

AL Q.F.B ALFREDO GARZÓN: Gracias por nunca dejarme sola en la realización de esta tesis, por las palabras de aliento que me dio cuando más las necesite, más que como jurado, fungió como un asesor.

AL Q.F.B ABRAHAM AYALA, por darle estilo a esta tesis y por enseñarme que esta vida no es justa, y que uno debe luchar por lo que quiere y nunca quedarse callado. Sé que en ti he ganado un gran amigo.

A LA Q.F.B OLIVIA LEÓN, Gracias por tomarme en cuenta para formar parte de su equipo de trabajo, gracias por ayudarme a dar el primer paso por este largo camino de mi meta profesional.

A LA FACULTAD DE QUÍMICA, por ser mi segundo hogar durante mí paso por la carrera. Por darme todo lo que profesionalmente soy y a la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**, estoy orgullosa de pertenecer a esta gran institución.

Es complicado expresarles en palabras todo lo que siento, a todas las personas que hicieron que este sueño se hiciera realidad. Gracias a TODOS.... Este triunfo es también suyo.

“DARÍA TODO LO QUE SÉ, POR LA MITAD DE LO QUE IGNORO” .

DESCARTES

ÍNDICE

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	15
2	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	18
3	GENERALIDADES.....	21
3.1	Paracetamol.....	21
3.1.1	Propiedades Físicoquímicas	21
3.1.2	Clasificación Anatómica, Terapéutica, Química (ATC)	22
3.1.3	Clasificación Biofarmacéutica	22
3.1.4	Dosis diaria definida (DDD)	22
3.1.5	Farmacodinamia	22
3.1.6	Farmacocinética	23
3.1.7	Tratamiento para sobredosis de paracetamol.....	26
3.1.8	Contraindicaciones	26
3.1.9	Reacciones Adversas	26
3.1.10	Interacciones Medicamentosas	27
3.2	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	27
3.2.1	Instrumentos utilizados en cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	28
3.3	Cuantificación de fármacos en Fluidos Biológicos	30
3.3.1	Técnica de precipitación de proteínas	31
3.4	Validación de métodos analíticos	32
3.5	Medicamentos Combinados.....	34
4	PARTE EXPERIMENTAL.....	36
4.1	Material, equipos e instrumentos.....	36
4.1.1	Material	36
4.1.2	Equipos e instrumentos.....	36

4.1.3	Reactivos y disolventes	37
4.1.4	Sustancia de referencia	37
4.1.5	Preparación de soluciones.....	38
4.2	Optimización del método analítico	39
4.2.1	Condiciones del detector	39
4.2.2	Columna cromatográfica y fase móvil.....	40
4.2.3	Volumen de inyección y velocidad de flujo.....	40
4.3	Validación del método analítico	41
4.3.1	Preparación de la curva de calibración y puntos control en plasma.	42
4.3.2	Linealidad	42
4.3.3	Repetibilidad de la curva de calibración.....	43
4.3.4	Precisión del método	43
4.3.5	Exactitud del método	44
4.3.6	Recuperación absoluta (%Recobro).....	44
4.3.7	Límite de cuantificación	45
4.3.8	Límite de detección	45
4.3.9	Selectividad del método a la matriz biológica.....	45
4.3.10	Selectividad a fármacos de uso común y anticoagulantes	46
4.3.11	Selectividad a diclofenaco	46
4.3.12	Estabilidad	46
4.3.13	Integridad de la dilución (Concentración dentro de la curva de calibración).....	48
4.3.14	Integridad de la dilución (Concentración por encima de la curva de calibración)	48
4.3.15	Cambio de anticoagulante	48
4.3.16	Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol.....	48
4.4	Aplicación del método analítico en un estudio de biodisponibilidad	49

4.4.1	Criterios de inclusión.	49
4.4.2	Criterios de exclusión.	50
4.4.3	Retiro de voluntarios del estudio.	50
4.4.4	Evolución del estudio de biodisponibilidad.	50
4.4.5	Análisis de las muestras plasmáticas	51
4.4.6	Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos	52
4.4.7	Análisis de Varianza (ANADEVA) y Estadística de Biodisponibilidad Relativa.	54
5	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	57
5.1.1	Técnica de precipitación.....	57
5.2	Resultados de la validación.....	58
5.2.1	Selectividad inicio de corrida.....	58
5.2.2	Selectividad del método.....	58
5.2.3	Linealidad del método	62
5.2.4	Repetibilidad de la curva de calibración	64
5.2.5	Precisión y exactitud del método analítico.	65
5.2.6	Recuperación absoluta (%Recobro).....	66
5.2.7	Límite de cuantificación y detección.....	67
5.2.8	Estabilidad.....	69
5.2.9	Integridad de la dilución (Concentración dentro de la curva de calibración):.....	76
5.2.10	Integridad de la dilución (Concentración por encima de la curva de calibración):	77
5.2.11	Cambio de anticoagulante.....	78
5.2.12	Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol.....	79
5.3	Etapa Clínica.....	83
5.3.1	Estadística demográfica descriptiva	83

5.3.2	Estadística descriptiva de los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo	84
5.3.3	Concentración plasmática promedio con respecto al tiempo (escala normal y semilogarítmica).....	86
5.3.4	Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos	87
5.4	Análisis de varianza (ANADEVA) y estadística de biodisponibilidad relativa	88
5.4.1	Intervalos de confianza y pruebas límites para determinar la biodisponibilidad relativa promedio.....	89
6	CONCLUSIONES.....	92
7	ANEXOS.....	95
7.1	ANEXO I. Tabla de aleatorización.	95
7.2	ANEXO II .Datos demográficos de los participantes del estudio.....	96
7.3	ANEXO III Concentraciones plasmáticas de paracetamol para cada voluntario en los diferentes tiempos de muestreo para el tratamiento A2 (medicamento de referencia de paracetamol).....	97
7.4	ANEXO IV Concentraciones plasmáticas de paracetamol para cada voluntario en los diferentes tiempos de muestreo para el tratamiento B (Medicamento de prueba).....	104
7.5	ANEXO V Parámetros farmacocinéticos de paracetamol obtenidos para cada voluntario tratamiento A2 (Medicamento de referencia)	111
7.6	ANEXO VI Parámetros farmacocinéticos de paracetamol obtenidos para cada voluntario tratamiento B (Medicamento de prueba).....	113
7.7	ANEXO VII Perfiles farmacocinéticos comparativos de concentración plasmática en escala normal con respecto al tiempo para cada voluntario.	115
8	BIBLIOGRAFÍA.....	129

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Optimización del método analítico para cuantificar paracetamol en plasma.....	40
Tabla 2	Preparación de la curva de calibración y puntos control.	42
Tabla 3	Preparación de muestras de control de calidad en solución.....	45
Tabla 4	Condiciones cromatográficas	57
Tabla 5	Linealidad del método analítico para cuantificar paracetamol en plasma.....	62

Tabla 6	Parámetros de linealidad del método analítico para cuantificar paracetamol en plasma	63
Tabla 7	Repetibilidad de la curva de calibración para cuantificar paracetamol en plasma	64
Tabla 8	Repetibilidad del método analítico para cuantificar paracetamol en plasma	65
Tabla 9	Reproducibilidad del método analítico para cuantificar paracetamol en plasma	66
Tabla 10	Recobro absoluto de método analítico para cuantificar paracetamol en plasma	67
Tabla 11	Evaluación del límite de detección y de cuantificación de paracetamol	68
Tabla 12	Estabilidad de paracetamol en plasma (temperatura ambiente de 24-27°C)	70
Tabla 13	Estabilidad de paracetamol en plasma (refrigeración 4-8°C)	71
Tabla 14	Estabilidad de paracetamol en plasma (ciclos congelación – descongelación)	72
Tabla 15	Estabilidad de la muestra procesada de paracetamol después de 24 horas	73
Tabla 16	Estabilidad de la muestra procesada de paracetamol después de 48 horas	74
Tabla 17	Estabilidad de la muestra procesada de paracetamol después de 72 horas	75
Tabla 18	Estabilidad a largo plazo (-70°C) de paracetamol después de 387 días	76
Tabla 19	Integridad de la dilución (concentración dentro de la curva de calibración)	77
Tabla 20	Integridad de la dilución (concentración por encima de la curva de calibración)	77
Tabla 21	Evaluación de la precisión y exactitud del método al realizar un cambio de anticoagulante en la matriz biológica	78
Tabla 22	Evaluación del cambio de anticoagulante en la matriz biológica utilizando CPDA como anticoagulante	79
Tabla 23	Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol 10 µg/mL Día 1	80
Tabla 24	Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol 10 µg/mL Día 6	80
Tabla 25	Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol 100 µg/mL Día 1	81
Tabla 26	Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol 100 µg/mL Día 6	81
Tabla 27	Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol 1000 µg/mL Día 1	82
Tabla 28	Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol 1000 µg/mL Día 6	82
Tabla 29	Estadística descriptiva de las variables demográficas	83

Tabla 30 Estadística descriptiva para las concentraciones plasmáticas de paracetamol con respecto al tiempo para el tratamiento A2 (Medicamento de referencia de paracetamol)	84
Tabla 31 Estadística descriptiva para las concentraciones plasmáticas de paracetamol con respecto al tiempo para el tratamiento B (Medicamento de prueba)	85
Tabla 32 Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos de paracetamol por tratamiento (A2 Medicamento de referencia, B Medicamento de Prueba)	88
Tabla 33 Prueba de ANADEVa para paracetamol	89
Tabla 34 Intervalos de confianza y pruebas límite para los parámetros farmacocinéticos de paracetamol transformados logarítmicamente (Tratamiento A2 vs Tratamiento B)	90

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metabolismo del paracetamol a través de reacciones de oxidación por la enzima citocromo P450.....	25
Figura 2. Diagrama del método de extracción	58
Figura 3 Selectividad del método para la mezcla de plasma y los plasmas individuales	59
Figura 4 Selectividad del método para fármacos de uso común.....	60
Figura 5 Selectividad del método para diclofenaco	61
Figura 6 Gráfico de linealidad del método	63
Figura 7 Límite de detección y cuantificación	69
Figura 8 Perfil farmacocinético promedio de paracetamol \pm error estándar en escala normal (A2 medicamento de referencia, B medicamento de prueba).....	86
Figura 9 Perfil farmacocinético promedio de paracetamol \pm error estándar en escala semilogarítmica (A2 medicamento de referencia, B medicamento de prueba)	87

ABREVIATURAS

ABC _{0-t}	Área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t
ABC _{0-inf}	Área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración a tiempo infinito
ACN	Acetonitrilo
AINEs	Antiinflamatorio no esteroideos
°C	Grados centígrados
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
cm	Centímetros
C _{max}	Concentración plasmática máxima
Conc.	Concentración
C.V.	Coefficiente de variación
g	Gramos
h	Horas
HClO ₄	Ácido perclórico
H ₂ O	Agua
IMC	Índice de masa corporal
K _e	Constante de eliminación
Kg	Kilogramos
m	Metros
Max	Máximo
mg	Miligramos
MeOH	Metanol
min	minuto
Min	Mínimo
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sodio monobásico
NAPQI	N-acetil- <i>p</i> -benzoquinona-imina
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
PNO	Procedimientos normalizados de operación
r	Coefficiente de regresión
r.p.m	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SNC	Sistema nervioso central
t _{1/2}	Vida media de eliminación

Tmax	Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima
TMR	Tiempo medio de residencia
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
UV	ultravioleta

1 RESUMEN

1 RESUMEN

El presente trabajo presenta la optimización de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para la cuantificación de paracetamol en plasma humano, utilizando una técnica de precipitación de proteínas con evaporación, cuantificando el analito en un rango de de 0.1 a 40 $\mu\text{g/mL}$.

Se utilizó un detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 243 nm. La separación del analito se realizó empleando una columna X-Terra RP8 250 X 4.6 mm de diámetro interno y 5 μm de tamaño de partícula.

El método se validó con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, determinando los parámetros de selectividad, sensibilidad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección (LD), límite inferior de cuantificación (LIC), recobro absoluto y estabilidad a diferentes condiciones de almacenamiento, por lo cual el método demostró ser confiable para su aplicación en un estudio de biodisponibilidad.

El estudio de biodisponibilidad comparativa de paracetamol fue de tipo monocéntrico, abierto, tres periodos, tres tratamientos, seis secuencias, cruzado, aleatorizado de dosis única con la participación de 42 voluntarios (23 hombres y 19 mujeres), y con un periodo de eliminación de fármaco (lavado) de 7 días entre cada periodo. Se tomaron muestras sanguíneas en un periodo de 16 horas después de la administración de los medicamentos (A1: medicamento de referencia de diclofenaco, A2: medicamento de referencia de paracetamol y B: Medicamento de prueba con la combinación fija de paracetamol y diclofenaco), estas muestras fueron centrifugadas a 4500 r.p.m por 5 minutos y posteriormente se separó el plasma para ser almacenado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta ser procesadas conforme al método analítico previamente validado.,se evaluaron los parámetros farmacocinéticos de T_{max} (h), C_{max} ($\mu\text{g/mL}$), ABC_{0-t} ($\text{h}*\mu\text{g/mL}$) , $ABC_{0-\text{inf}}$ ($\text{h}*\mu\text{g/mL}$) , K_e (1/h) y $t_{1/2}$ (h)

La población mexicana mostró para paracetamol un T_{max} , C_{max} , ABC_{0-t} , $ABC_{0-\text{inf}}$, K_e , $T_{1/2}$, de 0.75 (h), 11.52 ($\mu\text{g/mL}$), 26.78 ($\text{h}*\mu\text{g/mL}$), 27.89 ($\text{h}*\mu\text{g/mL}$), 0.203 (1/h), y 3.64 (h) respectivamente para el medicamento de referencia de paracetamol (A2) y T_{max} , C_{max} ,

ABC_{0-t} , ABC_{0-inf} , K_e , $T_{1/2}$, de 0.80 (h), 12.06 ($\mu\text{g/mL}$), 26.41 ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$), 27.42 ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$), 0.214 (1/h), y 3.53 (h) respectivamente para el medicamento de prueba con la combinación fija de paracetamol y diclofenaco (B)

El comparativo de paracetamol fue realizado a través del cálculo de los intervalos de confianza al 90%, los cuales cumplieron con el criterio de 80-125% con datos transformados logarítmicamente.

Con base en lo anterior se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas en la biodisponibilidad de paracetamol al administrarlo solo y en combinación fija con diclofenaco.

2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

2 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS^(1,2,3,4,5)

El dolor es una experiencia sensorial y emocional, generalmente desagradable, es una sensación desencadenada por el sistema nervioso y es la principal causa de consultas médicas.

El paracetamol es uno de los medicamentos de venta libre ampliamente utilizado para combatir dolores musculares, dentales, de cabeza y cuadros febriles. En combinación con diclofenaco se logra un sinergismo teniendo un efecto rápido seguro y eficaz sobre el alivio del dolor y la inflamación.

Desde su introducción en el mercado en los años 50's ha aumentado su uso como analgésico y antipirético, Es el medicamento de mayor uso después del ácido acetilsalicílico, y un ingrediente importante en numerosos medicamentos para resfriado y gripe

A dosis terapéuticas el paracetamol se considera un analgésico relativamente seguro particularmente porque no aumenta la posibilidad de ocasionar hemorragias digestivas, no compromete la función renal ni aumenta la presión arterial, pero a dosis altas provoca hepatotoxicidad. El paracetamol tiene más probabilidades de causar daño hepático a las dosis recomendadas si lo toman personas que consumen alcohol, incluso si no lo toman al mismo tiempo que paracetamol.

Al igual que muchos otros fármacos, el paracetamol es metabolizado por el hígado. Si la vía de eliminación por reacciones de conjugación (vía normal) se ve saturada por una dosis elevada, empieza a actuar otra vía conocida como sistema enzimático del citocromo P450. Cuando esto sucede, se produce un metabolito tóxico llamado N-acetil-*p*-benzoquinona-imina (NAPQI) que puede causar la destrucción de células hepáticas.

El paracetamol es una de las causas principales de insuficiencia hepática aguda en los Estados Unidos, según la FDA, hay más de 50,000 visitas a centros de urgencias médicas y 100 muertes todos los años en este país por sobredosis de paracetamol, muchas de las cuales son suicidios.

Algunos de los beneficios del paracetamol se deben a que este principio activo no afecta los mecanismos de coagulación (agregación plaquetaria) ni los mecanismos de protección de la mucosa gástrica, no suele producir reacciones alérgicas y presenta escasa interacción medicamentosa con otros fármacos.

Debido a la importancia de este fármaco, el presente trabajo tiene como objetivos generales:

- Optimizar un método analítico para la cuantificación de paracetamol en plasma humano por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).
- Validar el método analítico de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.
- Aplicar el método analítico en un estudio en población mexicana para evaluar la biodisponibilidad de paracetamol de una dosis oral única de 500 mg contenida en una formulación individual y en combinación fija con diclofenaco.

3. GENERALIDADES

3 GENERALIDADES

3.1 Paracetamol

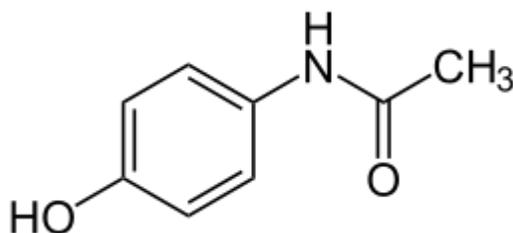
El paracetamol también conocido como acetaminofén, es un fármaco con propiedades analgésicas y antipiréticas, con ligera actividad antiinflamatoria. Está indicada en el alivio de cefaleas, mialgias, neuralgias, resfriado común dolores moderados postoperatorios, dolores dentales, puede causar daño renal y hepático. Se puede adquirir sin receta médica. Es considerado como un antiinflamatorio no esteroideo (AINES) atípico porque es un inhibidor débil de la ciclooxigenasa (COX).

3.1.1 Propiedades Fisicoquímicas ^(6,7,8)

Fórmula condensada: C₈H₉NO₂

Peso molecular: 151.17 g/mol

Estructura química de paracetamol:



Nomenclatura IUPAC: N-(4-hidroxifenil)etanamida

Apariencia: polvo blanco cristalino

Solubilidad: Soluble en agua, etanol, metanol y dimetilformamida

Pka: 9.51 a 25 °C

Estabilidad: El paracetamol es estable a la luz, humedad, temperatura y a pH entre 4 -7.

3.1.2 Clasificación Anatómica, Terapéutica, Química (ATC) ⁽¹⁰⁾

La clasificación ATC del paracetamol es N02BE01

N: Sistema nervioso

02: Analgésico

B: Otros analgésicos y antipiréticos

E: Anilinas

01: Paracetamol

3.1.3 Clasificación Biofarmacéutica ^(6,9)

En la literatura existe diferencia acerca de la clasificación Biofarmacéutica de paracetamol. En un artículo publicado por L.Kalantzi et al., en el 2006, el menciona que el paracetamol está clasificado en la Clase III (Baja permeabilidad, Alta solubilidad), aunque posee propiedades en el límite de Clase I (Alta permeabilidad, Alta solubilidad), sin embargo, la BCS (Biopharmaceutics Classification System), clasifica al paracetamol como clase IV (Baja permeabilidad, Baja solubilidad).

3.1.4 Dosis diaria definida (DDD)^(10,11)

La dosis diaria definida de paracetamol es de 3 g por vía oral.

La dosis máxima de paracetamol en adultos es de 1 g por dosis y 4 g por día, tomar más de esta dosis aumenta el riesgo de daño hepático

Si se toma más de tres bebidas alcohólicas al día no exceder la dosis de 2 g al día

3.1.5 Farmacodinamia ^(8,10,11,12)

El paracetamol es un analgésico-antipirético usado ampliamente en la clínica, ejerce su acción analgésica elevando el umbral del dolor en el SNC periférico, normaliza la hipertermia al actuar sobre el centro hipotalámico responsable de regular la temperatura corporal. El paracetamol es tan eficaz como el ácido

acetilsalicílico en su acción analgésica y antipirética, pero sin las reacciones adversas características de los salicilatos. Por estas diferencias el paracetamol puede ser usado en pacientes alérgicos al principio activo de referencia y/o a los de numerosos AINEs.

Mecanismo de acción: Se desconoce el mecanismo de acción exacto del paracetamol. Se cree que aumenta el umbral al dolor inhibiendo las ciclooxigenasas en el sistema nervioso central, enzimas que participan en la síntesis de las prostaglandinas. Sin embargo, el paracetamol no inhibe las ciclooxigenasas en los tejidos periféricos, razón por la cual carece de actividad antiinflamatoria. El paracetamol también parece inhibir la síntesis y/o los efectos de varios mediadores químicos que sensibilizan los receptores del dolor a los estímulos mecánicos o químicos.

Los efectos antipiréticos del paracetamol tienen lugar bloqueando el pirógeno endógeno en el centro hipotalámico regulador de la temperatura inhibiendo la síntesis de las prostaglandinas.

3.1.6 Farmacocinética ^(4,6,8,13,14,15)

Absorción: El paracetamol se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal, empezando su acción analgésica entre los 15 y 30 minutos después de su ingestión. Los antiácidos y los alimentos disminuyen la velocidad de absorción.

Tmax: 0.17-1.2 h

Cmax: 6.11 µg/mL (4.66 – 8 µg/mL)*

*A una dosis de 500 mg.

Distribución: Se distribuye uniformemente en los líquidos corporales de todos los tejidos, con excepción del adiposo.

Unión a proteínas: 25-50 %

Volumen de distribución: 0.69-1.36 L/Kg

Metabolismo: Aproximadamente el 85 al 90% de la dosis se metaboliza en el hígado a través de reacciones de conjugación, principalmente por glucuronidación y sulfatación. Estos metabolitos son excretados por la orina.

Aproximadamente del 5-10% es metabolizado a través de reacciones de oxidación por la enzima citocromo P450 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2E1 y CYP3A4) esta reacción da como resultado la formación del metabolito no tóxico 3-hidroxi-acetaminofen y el N-acetil-*p*-benzoquinona-imina (NAPQI), metabolito tóxico del paracetamol (Figura 1). A dosis terapéuticas este último se forma en cantidades pequeñas y se conjuga rápidamente con glutatión y finalmente es excretado en la orina como cisteína y ácido mercaptúrico conjugado.

A dosis elevadas de paracetamol, el glutatión se satura y el NAPQI libre se une a macromoléculas en los hepatocitos provocando necrosis celular. La ingesta de alcohol aumenta el riesgo de hepatotoxicidad.

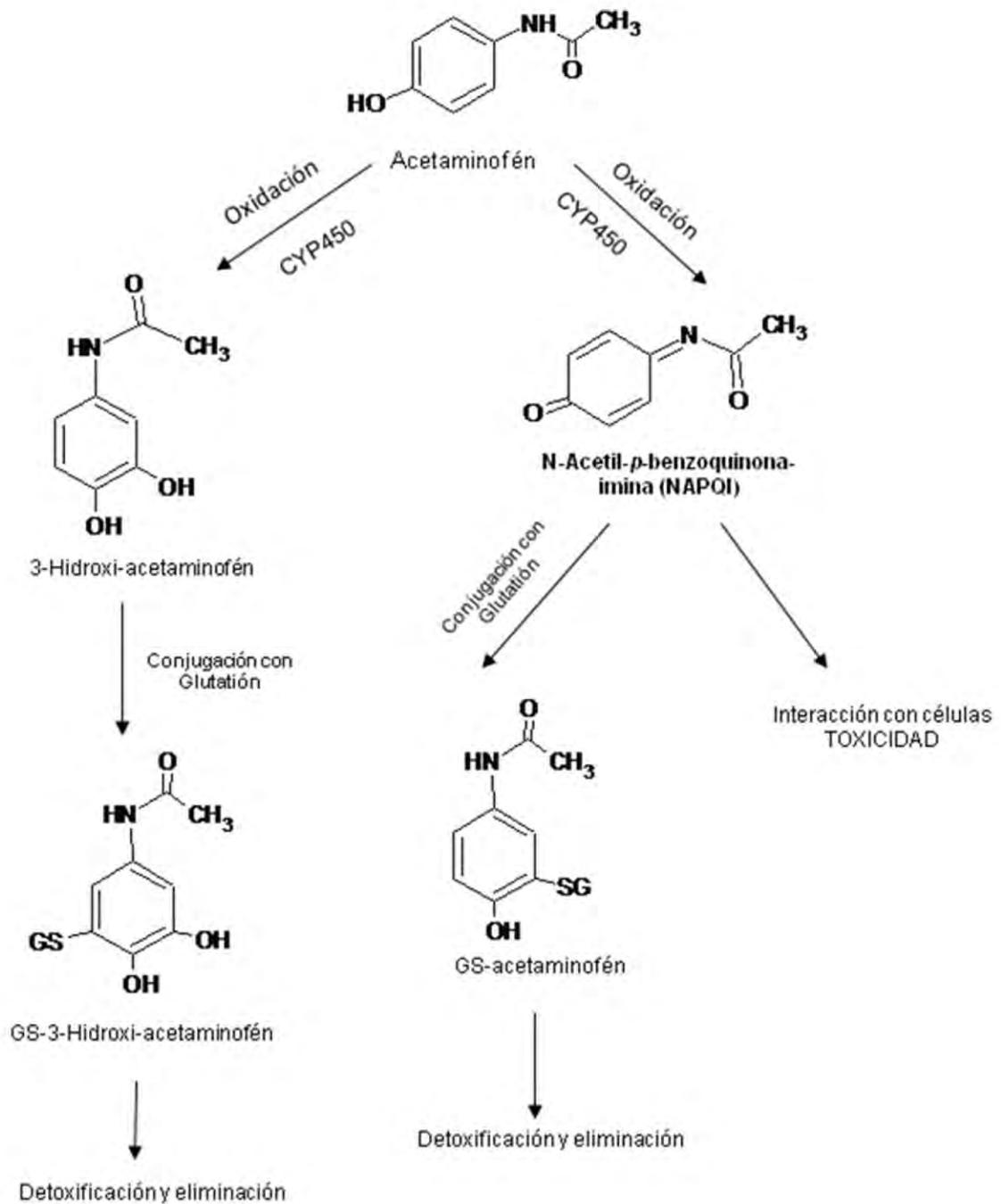


Figura 1. Metabolismo del paracetamol a través de reacciones de oxidación por la enzima citocromo P450

Eliminación: Se elimina por vía renal como metabolitos conjugados (glucoronidos y sulfatos). El 5% de la dosis puede excretarse en forma inalterada.

Vida media: 1-4 horas

3.1.7 Tratamiento para sobredosis de paracetamol

- **N-metilpirazole:** disminuye significativamente la formación del NAPQI, es utilizado en el tratamiento de alcoholismo.
- **Disulfiram:** Inhibidor específico del CYP2E, el cual a altas dosis de paracetamol es el responsable de la formación de NAPQI
- **N-acetil-cisteína + cimetidina:** La acción hepatoprotectora de la N-acetil-cisteína (NAC) se debe a que aumenta la síntesis de glutatión. Por otra parte NAC está asociada con numerosas reacciones adversas como náuseas, vómito, estomatitis eritema y urticaria. La cimetidina produce un efecto hepatoprotector inhibiendo el metabolismo oxidativo del paracetamol, por lo tanto previene la formación del metabolito hepatotóxico.

3.1.8 Contraindicaciones ^(12,8)

En paracetamol está contraindicado en los siguientes casos:

- Hipersensibilidad reconocida al paracetamol.
- Alteración de la función hepática y/o renal.
- Alcoholismo.
- Durante el periodo de lactancia.

3.1.9 Reacciones Adversas ^(12,8)

El paracetamol es hepatotóxico aunque en la mayor parte de las ocasiones esta toxicidad es el resultado de una sobredosis o de dosis excesivas administradas crónicamente.

De manera ocasional pueden aparecer erupciones cutáneas y alteraciones hematológicas como (neutropenia, leucopenia y trombocitopenia), otras reacciones

secundarias más comunes son: náusea, vómito, dolor abdominal, prurito y constipación.

3.1.10 Interacciones Medicamentosas ^(8,11,12)

Los agentes que inhiben el sistema enzimático CYP2E1 o CYP2A6 pueden, en principio, reducir el riesgo de hepatotoxicidad por el paracetamol al competir con él, reduciendo la generación del metabolito tóxico.(NAPQI). Algunos fármacos que inhiben dichas isoenzimas son la cimetidina, la claritromicina, la eritromicina, el ketoconazol, algunas quinolonas como la ciprofloxacina y la levofloxacina, el omeprazol y la paroxetina.

Salicilatos o ácido acetilsalicílico (aspirina): El uso concomitante con paracetamol puede aumentar el riesgo de nefropatía por analgésicos.

Barbitúricos y carbamazepina: Aumentan el potencial hepatotóxico del paracetamol y disminuyen su efecto, esto se debe a que aceleran el metabolismo por CYP450 por consecuencia aumenta la producción del metabolito hepatotóxico (NAPQI).

Isoniazida y rifampicina: Aceleran el metabolismo por CYP2E1 aumentando la formación del metabolito tóxico de paracetamol (NAPQI).

3.2 Cromatografía de líquidos de Alta Resolución (CLAR) ^(16,17,18)

La característica que distingue a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, es que se ponen en contacto dos fases inmiscibles. Una fase es estacionaria y la otra móvil. La separación cromatográfica es el resultado de las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra con ambas fases. Una muestra que se introduce en la fase móvil es transportada a lo largo de la columna que contiene una fase estacionaria. Al final del proceso los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria. El componente menos retardado emerge primero, el retenido más fuertemente eluye al último. El reparto entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físicas y/o químicas de los componentes de la muestra.

La Cromatografía de Líquidos de Alta resolución (CLAR), no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra, es capaz de separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular.

La CLAR ofrece una mayor variedad de fases estacionarias, lo que permite una mayor gama de estas interacciones selectivas y más posibilidades para la separación.

3.2.1 Instrumentos utilizados en cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

Para lograr velocidades de flujo razonables con las fases estacionarias habituales en cromatografía líquida, con un intervalo de tamaños de 3-10 μm , se requieren presiones de bombeo de varios centenares de atmósferas. Como consecuencia de esa presión tan alta, el equipo de HPLC tiende a ser mucho más complejo y costoso que el de otros tipos de cromatografía.

Se denomina **elución isocrática** a la elución con un único disolvente o una mezcla de disolventes de composición constante. En la **elución en gradiente**, se usan dos o más sistemas de disolventes que difieren significativamente en su polaridad. Las proporciones de los disolventes se varían de manera programada durante la separación, de forma continua o de un modo escalonado.

Sistema de bombeo: impulsa la fase móvil proveniente del reservorio del solvente hacia el inyector y desde allí hacia la columna. Los requisitos de las bombas para cromatografía líquida incluyen:

- Capacidad para generar presiones de hasta 6000 psi (lb/pulg²)
- Salida libre de pulsos para evitar generar en el detector inestabilidad de la línea base
- Velocidad de flujo de 0.1 – 10 mL
- Generar un flujo constante y reproducible
- Resistentes a la corrosión por diversos disolventes
- Ser inertes respecto a los disolventes empleados

Sistema de inyección de muestras: Es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución (si es posible disuelto en la fase móvil), sin interrumpir el caudal de disolvente a través del sistema. Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones, debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema, no debe provocar dilución importante de la solución inyectada y debe ser fácil de operar.

Columna: La columna de separación, proporciona versatilidad en los tipos de análisis que pueden realizarse. Esta característica, debida a la amplia gama de selección de materiales para la fase móvil y estacionaria, permite separar moléculas que difieren muy poco en sus propiedades físicas y químicas.

Las columnas usualmente se elaboran con tubos de acero inoxidable. La mayoría de las columnas tienen una longitud de 3-30 cm y diámetro interno de 2-5 mm. Los empaques de las columnas suelen ser de partículas de 1.7-10 μm . El empaque más común en cromatografía líquida se prepara con partículas de sílice. Otros materiales son las partículas de alúmina, partículas de polímeros porosos o resinas de intercambio iónico.

Precolumnas: Con frecuencia se coloca una precolumna pequeña previo a la columna analítica para extraer partículas y contaminantes de los disolventes y prolongar así la vida de la columna. La precolumna también sirve para saturar la fase móvil con la fase estacionaria, de modo que se minimicen las pérdidas de la fase estacionaria en la columna. La composición de la precolumna suele ser similar a la de la columna analítica, si bien el tamaño de partícula tiende a ser mayor para minimizar la caída de presión.

Termostatos para la columna: Cuando los cambios de temperatura deben evitarse, las columnas de separación deben estar alojadas en un sistema estable con variaciones de temperatura menores a 0.1 $^{\circ}\text{C}$. Muchos instrumentos comerciales modernos están equipados con hornos, que controlan la temperatura de la columna, desde temperatura casi ambiental hasta 150 $^{\circ}\text{C}$.

Variar la temperatura puede provocar cambios significativos en los tiempos de retención, dificultando el análisis cualitativo y afectando la precisión de las mediciones cuantitativas. Las temperaturas elevadas son ventajosas por que la disminución en la viscosidad de la fase móvil, el aumento en la transferencia de masa y el aumento en la solubilidad de la muestra dan como resultado en una mejor resolución o un análisis más rápido.

Detectores: Los detectores de CLAR deben tener un volumen muerto bajo para minimizar el ensanchamiento de banda adicional de la columna. El detector debe ser pequeño y compatible con el flujo del líquido. El detector usado depende de la naturaleza de la muestra.

Algunos de los detectores más usados se enumeran a continuación:

- Absorbancia
- Florescencia
- Electroquímico
- Índice de refracción
- Conductividad
- Espectrometría de masas

Los detectores más usados en cromatografía líquida se basan en la absorción de radiación ultravioleta o visible.

3.3 Cuantificación de fármacos en Fluidos Biológicos ^(17,19)

Es importante conocer cuál es la matriz biológica apropiada para poder obtener la información deseada del fármaco o del metabolito analizado. El primer problema para cuantificar fármacos en matriz biológica es separarlo de material endógeno tanto como sea posible, ya que se puede encontrar inmerso en una mezcla compleja de carbohidratos, proteínas lípidos y otros componentes, que pueden interactuar entre sí interfiriendo su determinación. La sangre, el plasma, el suero y la orina son los fluidos biológicos más comúnmente utilizados para el análisis de fármacos, a continuación se menciona la técnicas de extracción utilizada para cuantificar paracetamol en plasma.

3.3.1 Técnica de precipitación de proteínas^(17,19)

Existen diferentes métodos de desnaturalización de proteínas y precipitación. Para saber que método es el adecuado se necesita conocer, en qué condiciones es estable el fármaco que se desea cuantificar.

En cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) que la matriz biológica contenga proteínas, lípidos, sales u otro material endógeno puede causar el deterioro de la columna, por lo cual la desnaturalización de la muestra biológica es importante.

Existen dos procedimientos que difieren en su principio y pueden ser utilizados para lograr la desnaturalización y precipitación de proteínas:

- El más sencillo consiste en la adición de ácidos, sales o disolventes orgánicos tales como ácido túngstico, sulfato de amonio, ácido tricloroacético, ácido perclórico, acetonitrilo y metanol. Los problemas asociados a este procedimiento es que el fármaco de interés puede degradarse o precipitar junto con las proteínas presentes en la matriz biológica.
- Por otra parte, las proteínas pueden ser desnaturalizadas con la adición de enzimas proteolíticas como tripsina, papaína entre otras. Es un procedimiento muy eficiente para liberar los fármacos que se encuentran unidos a proteínas plasmáticas, sin embargo se necesitan condiciones de temperatura y pH extremadamente controlados.

A continuación se enlistan varios métodos utilizados para la desnaturalización y precipitación de proteínas y sus características:

Calentamiento a 90 °C durante 5-15 min: No es muy eficiente y puede degradar el analito de interés, por lo que no se recomienda para analitos termolábiles.

Saturación con sulfato de amonio: Eficiencia moderada, alta concentración de sales en el sobrenadante, pH final aproximadamente de 7.

Ácido metafosfórico: Eficiencia excelente, el reactivo necesita mantenerse frío, el pH menor a 3 puede descomponer el analito.

Ácido perclórico: Excelente eficiencia, el pH final (<3) puede descomponer al analito de interés. La mayoría de los compuestos básicos son extraídos exitosamente.

Metanol: Por cada volumen de plasma se requiere de dos volúmenes de metanol para una desnaturalización completa. Adecuado si el fármaco es inestable a pH bajos.

Acetonitrilo: Se requiere de 1.5 volúmenes para una desnaturalización completa. Particularmente conveniente para inyectar inmediatamente después al sistema cromatográfico.

Después de adicionar el reactivo apropiado para precipitar las proteínas se observa inmediatamente un precipitado blanco, algunas ocasiones la muestra se calienta para garantizar una precipitación completa. Posteriormente la muestra se centrifuga aproximadamente a 3000 rpm por 10 a 20 min. Usualmente se obtiene un sobrenadante claro.

3.4 Validación de métodos analíticos ^(20,21,22)

Un 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 de la muestra. Un analito se define como un componente específico en una muestra a medir en un análisis; por lo que un método analítico mide un componente específico (analito) en una muestra y como todo proceso de medición, este debe ser confiable para ser utilizado con un propósito definido.

Cualquier método analítico puede estar constituido por técnicas de separación, extracción etc., y por técnica de medición (espectrofotometría, volumetría, colorimetría, potenciometría, etc.) que permiten medir la respuesta del analito en la muestra.

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada; es decir con su propósito

La norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas, menciona las pruebas y criterios generales para la validación de un método analítico cuya aplicación será un estudio de biodisponibilidad y bioequivalencia.

Dentro de los parámetros a considerar en una validación se encuentra:

- **Exactitud:** Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.
- **Linealidad:** Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.
- **Limite de detección:** Mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidos
- **Limite de cuantificación:** Concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.
- **Precisión:** Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.
 - **Repetibilidad:** Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.
 - **Reproducibilidad intralaboratorio:** Precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas.

- **Recuperación absoluta:** A la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.
- **Rango:** Intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se hay demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.
- **Selectividad:** Capacidad de un método analítico para cuantificar exactamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuesto que pudieran estar presentes en la muestra.
- **Tolerancia:** Capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

3.5 Medicamentos Combinados⁽²³⁾

La Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (Cofepris) define como un medicamento combinado aquel que en su formulación contiene dos o más fármacos.

En los criterios de asignación de medicamentos de referencia de la Cofepris se menciona que se debe mostrar la evidencia de la eficacia y seguridad de la combinación resaltando las ventajas de uso de la combinación fija en contra del empleo de uno de los componentes por separado. Se debe presentar el perfil farmacocinético de los fármacos de manera individual y de la combinación fija. En el caso de no existir concordancia entre la justificación de la combinación y los resultados farmacocinéticos, se deberá realizar un segundo estudio donde se presente una biodisponibilidad comparativa entre la combinación fija y la administración por separado de cada uno de los componentes de la formula.

La comparación se realizará empleando la misma concentración, forma farmacéutica y formulación del medicamento en combinación fija.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL.

La parte experimental se llevó a cabo en dos etapas:

- Optimización y validación del método analítico por CLAR para cuantificar el fármaco en plasma.
- Aplicación del método en el análisis de muestras plasmáticas provenientes de voluntarios sanos en un estudio de biodisponibilidad en población mexicana.

4.1 Material, equipos e instrumentos.

4.1.1 Material

- Espátula.
- Guantes de nitrilo.
- Matraces volumétricos calibrados 10, 20, 50 y 100 mL.
- Pipetas Volumétricas 2, 5 y 8 mL.
- Propipeta.
- Membranas de filtración de Nylon 0.45 micras.
- Frascos de vidrio con tapa de rosca de 1000 y 2000 mL.
- Puntas de volumen variable para repetidora.
- Vasos de precipitados de vidrio 20, 100, 250 y 100 mL.
- Microtubos de 2 mL.
- Viales para automuestreador.
- Agitador barra magnética.

4.1.2 Equipos e instrumentos

- Balanza granataria marca Ohaus modelo Adventurer PRO.
- Balanza analítica marca Ohaus modelo EP214C.
- Agitador vórtex marca Thermolyne, modelo Maxi Mix II M37615.
- Ultracongelador marca REVCO modelo ULT2186-5-A36.
- Sistema de purificación de agua marca Barnstead.
- Pipeta repetidora electrónica marca Eppendorf, modelo Repeater Plus.

- Micropipeta volumen variable 100-1000µL marca Hirschmann Laborgerate, modelo Hirschmann Labopette.
- Micropipeta volumen fijo 200 µL marca Hirschmann Laborgerate, modelo Hirschmann Labopette.
- Refrigerador Torrey R.
- Centrífuga Hettich Rotanta 460.
- Potenciómetro Oakton Serie pH 1000.
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución , que consta de:
 - Módulo de separaciones WATERS 2690 N_o de serie B97SM4508 R
 - Detector de arreglo de diodos 2996, No de serie H03296554M
- Columna cromatográfica X-Terra RP8, 4.6 x 250 mm, 5 µm.

4.1.3 Reactivos y disolventes

- Agua grado cromatográfico obtenida del sistema de purificación de agua marca Barnstead.
- Fosfato monobásico de sodio, J.T. Baker, grado reactivo.
- Acetonitrilo (ACN), Mallinckrodt, grado cromatográfico.
- Ácido fosfórico, J.T. Baker, grado reactivo.
- Metanol (MeOH), J.T Baker, grado cromatográfico.
- Ácido Perclórico J.T. Baker, grado reactivo.

4.1.4 Sustancia de referencia

- Paracetamol estándar primario, COSUFAR, lote 70A1, potencia 100.25%.

4.1.5 Preparación de soluciones

Solución amortiguadora de fosfato de sodio monobásico 10 mM pH 4.5

Pesar 1.38 g de fosfato de sodio monobásico, transferir a un matraz volumétrico de 1L, disolver y llevar a volumen con agua grado cromatográfico. Ajustar el pH a 4.5 con hidróxido de sodio o ácido fosfórico diluido.

Solución de referencia de paracetamol 1000 µg/mL

Pesar con exactitud el equivalente a 10 mg de sustancia de referencia de paracetamol y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.

Solución de referencia de paracetamol 100 µg/mL

Utilizando una pipeta volumétrica, transferir 2 mL de la solución de referencia de paracetamol de concentración 1000 µg/mL y transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 20 mL, llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.

Solución de referencia de paracetamol 10 µg/mL

Utilizando una pipeta volumétrica, transferir 5 mL de la solución de referencia de paracetamol de concentración de 100 µg/mL y transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.

Fase móvil para reconstitución. Solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM, pH 4.5: Acetonitrilo (92:8 v/v)

Transferir 8 mL de acetonitrilo grado cromatográfico a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con solución amortiguadora de fosfato de sodio 10mM pH 4.5.

Solución para evaluar la adecuabilidad del sistema (paracetamol 50 µg/mL)

Transferir cuantitativamente 1000 µL de la solución de 1000 µg/mL de paracetamol a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con fase móvil para reconstitución. Dividir la solución en alícuotas de 1 mL y almacenarlas a -70°C. Descongelar una de las alícuotas cada día de trabajo a temperatura ambiente.

Solución de referencia de diclofenaco de 100 µg/mL

Pesar con exactitud el equivalente a 10 mg de sustancia de referencia de diclofenaco y transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver y llevar a volumen con MeOH:H₂O (50:50 v/v).

4.2 Optimización del método analítico

Para la optimización se tomó como referencia un método analítico que se había validado en el laboratorio de Investigación Farmacológica y Biofarmacéutica (IFaB) para cuantificar paracetamol en plasma. Se modificó el agente precipitante, fase móvil y temperatura de la columna.

Los criterios considerados en la elección de las mejores condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

- Sensibilidad.
- Resolución entre picos.
- Simetría de los picos.
- Eficiencia de la columna en la separación de los compuestos.
- Tiempo de retención del compuesto de interés con una corrida breve.

4.2.1 Condiciones del detector

El detector de arreglos de diodos utilizado durante la optimización, validación y análisis de muestras de voluntarios fue Waters modelo 2996 a una longitud de onda de 243 nm .

4.2.2 Columna cromatográfica y fase móvil

Se utilizó una columna X-Terra RP8 250 X 4.6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula. La fase móvil ideal para la cuantificación de paracetamol consistió en una solución amortiguadora de fosfato de sodio 10 mM pH 4.5: ACN bajo una proporción 92:8 v/v.

4.2.3 Volumen de inyección y velocidad de flujo

Se utilizó un volumen de inyección de 10 µL y una velocidad de flujo de 1.2 mL/min, bajo estas condiciones se obtuvo una buena resolución y simetría del pico de interés. En la siguiente tabla se resume el proceso de optimización del método analítico de paracetamol

Tabla 1 Optimización del método analítico para cuantificar paracetamol en plasma

Característica	Referencia	Modificada
Detector	UV	----
Longitud de onda(λ)	243 nm	----
Columna	X-Terra RP8, 4.6 x 250 mm, 5 µm.	----
Técnica de precipitación	Precipitación de proteínas HClO ₄ *	Precipitación de proteínas (MeOH :ACN) con evaporación **
Fase móvil	H ₂ O 100%	NaH ₂ PO ₄ 10 mM pH 4.5 :ACN proporción (90 :10 v/v) y (92:8 v/v)
µL muestra plasmática	250 µL	500 µL
Fase de lavado	MeOH : H ₂ O (50 :50 v/v)	----
Fase de reconstitución	Sin reconstitución	NaH ₂ PO ₄ 10 mM pH 4.5 :ACN (90 :10 v/v) y (92 :8 v/v)
Flujo	1.2 mL/ min	----
Volumen de inyección	10 µL	----
Temperatura de la columna	38 °C	40 y 45 °C

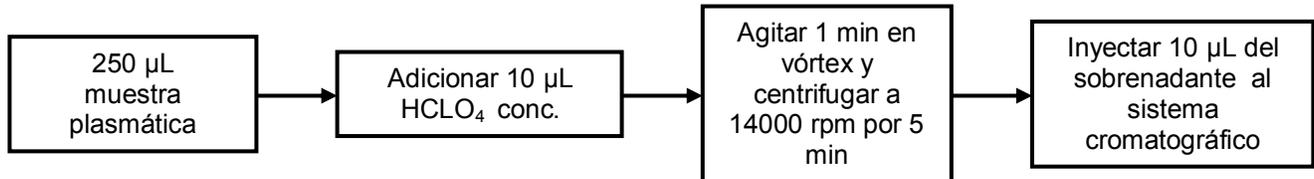
----Sin modificación

* Ver diagrama de flujo de la técnica de precipitación con HClO₄ en la siguiente página.

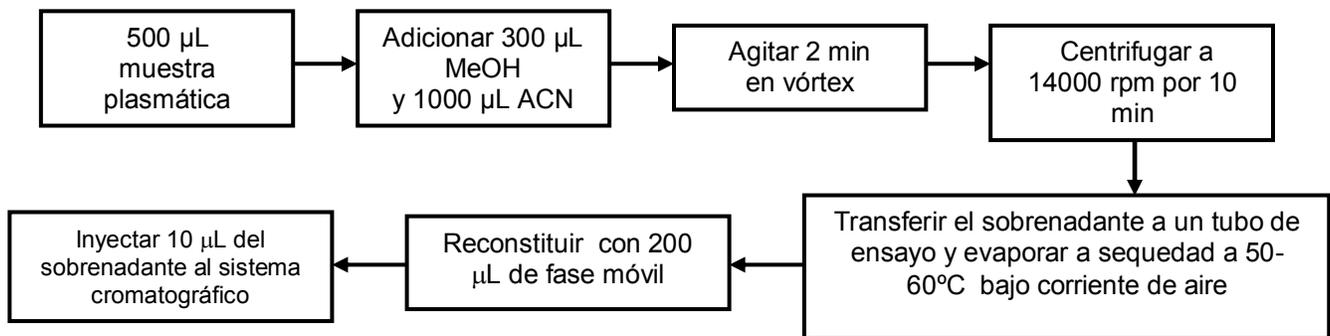
**Ver diagrama de flujo la técnica de precipitación con MeOH :ACN en la siguiente página.

A continuación se describen las dos técnicas de precipitación de proteínas utilizadas durante la optimización del método analítico

* Diagrama de flujo del Técnica de precipitación por la técnica de precipitación con HClO₄



** Diagrama de flujo del método de extracción por la técnica de precipitación con MeOH :ACN



4.3 Validación del método analítico

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

Antes de cada corrida se evaluó la selectividad, inyectando un blanco de reactivos y uno de plasma, los cuales se analizaron a las condiciones cromatográficas establecidas. El blanco de plasma y blanco de reactivos al ser comparados con la adecuabilidad no debían presentar interferencia con el pico de interés.

4.3.1 Preparación de la curva de calibración y puntos control en plasma.

Se prepararon cada uno de los puntos de la curva de calibración y puntos control tal y como se muestra en la siguiente tabla, utilizando pipeta repetidora Eppendorf electrónica con punta de 500 μL para tomar las alícuotas correspondientes.

Depositar las alícuotas de la solución de paracetamol correspondiente, en microtubos axigen de 2 mL, añadir 950 μL de plasma para completar 1 mL y agitar en vortex durante 30 segundos.

Tabla 2 Preparación de la curva de calibración y puntos control.

Volumen paracetamol (1000 $\mu\text{g/mL}$) μL	Volumen paracetamol (100 $\mu\text{g/mL}$) μL	Volumen paracetamol (10 $\mu\text{g/mL}$) μL	Volumen MeOH μL	Volumen plasma μL	Concentración Paracetamol ($\mu\text{g/mL}$)
-	-	5	45	950	0.05***
-	-	10	40	950	0.1**
-	-	20	30	950	0.2
-	-	30	20	950	0.3*
-	10	-	40	950	1
-	50	-	-	950	5
15	-	-	35	950	15
20	-	-	30	950	20*
25	-	-	25	950	25
30	-	-	20	950	30*
35	-	-	15	950	35
40	-	-	10	950	40

*Puntos control de calidad bajo, medio y alto.

** Límite de cuantificación *** Límite de detección

4.3.2 Linealidad

Se prepararon cinco curvas de calibración a partir de pesadas independientes, contemplando las concentraciones de 0.1, 0.2, 1.0, 5.0, 15.0, 25.0, 35.0 y 40.0 $\mu\text{g/mL}$ de paracetamol tal como se describe en la tabla 2, se procesaron de acuerdo a la técnica de precipitación (sección 5.1). La relación entre la respuesta cromatográfica con respecto a la concentración en cada curva de calibración, fue ajustada a través de una regresión lineal de mínimos cuadrados de la ecuación $y = mx + b$, donde la variable "y" es el área de paracetamol obtenida para la concentración nominal. Se consideró que el método cumplía con este parámetro, si

al realizar el ajuste de cada una de las cinco curvas se obtenía un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.99 y el coeficiente de variación y la desviación porcentual de la concentración recuperada (interpolada) con respecto a la nominal (adicionada) era menor o igual al 15% en todas las muestras que constituyen la curva de calibración, a excepción del límite de cuantificación que no debía ser mayor al 20%.

4.3.3 Repetibilidad de la curva de calibración.

Se prepararon tres curvas de calibración a partir de la misma pesada, con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las 3 determinaciones para cada nivel de concentración. El coeficiente de variación no debía ser mayor al 15%.

4.3.4 Precisión del método

Repetibilidad

A partir de una solución de referencia se procesó y se cuantificó por sextuplicado las muestras plasmáticas de control de calidad de paracetamol: LC, CC bajo, CC medio, CC alto y LSC, tal y como se describe en la tabla 2 (preparación de la curva de calibración y puntos control). Con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las 6 determinaciones en cada nivel. El coeficiente de variación no debía ser mayor al 15% (20% para el LC).

Reproducibilidad

Se preparó una curva de calibración de paracetamol en plasma y las muestras de control de calidad CC bajo, CC medio y CC alto por sextuplicado, de acuerdo a lo establecido en la tabla 2 (preparación de la curva de calibración y puntos control) se procesó mediante la técnica de precipitación de proteínas. Se realizó este procedimiento durante tres días, empleando cada día una solución de referencia de paracetamol preparada recientemente.

Se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de las muestras de control de calidad (concentración recuperada), tomando en cuenta las determinaciones realizadas durante los tres días. El coeficiente de variación global no debía ser mayor al 15% en cada nivel de concentración.

4.3.5 Exactitud del método

La exactitud se evaluó a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, determinando la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones obtenidas de cada nivel, con respecto a la concentración nominal de las muestras. El valor promedio en cada nivel de concentración de los puntos control durante las pruebas realizadas para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad, debían estar dentro del $\pm 15\%$ de su valor nominal correspondiente (20% para el límite de cuantificación), haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$\text{Desv Abs \%} = 100 \times \frac{|\text{Concentración nominal} - \text{Concentración Recuperada}|}{\text{Concentración nominal}}$$

4.3.6 Recuperación absoluta (%Recobro)

Se prepararon por sextuplicado las muestras plasmáticas de control de calidad de paracetamol CC bajo, CC medio y CC alto y se procesaron de acuerdo al método optimizado.

Se compararon las respuestas cromatográficas promedio (área de pico), con respecto a las obtenidas en soluciones con el analito de interés, preparadas a concentraciones equivalentes, (Tabla 3).

El recobro debía ser consistente en los niveles de concentración evaluados, además, los valores promedio individuales no debían desviarse del promedio total en más del 15%.

Tabla 3 Preparación de muestras de control de calidad en solución

Volumen paracetamol (1000 µg/mL) (µL)	Volumen paracetamol (10 µg/mL) (µL)	Fase de reconstitución (µL)	Concentración paracetamol (µg/mL)
75	-	925	75
50	-	950	50
-	75	925	0.75

4.3.7 Límite de cuantificación

La sensibilidad del método se define como la concentración mínima cuantificable ó límite de cuantificación (LC).

Se prepararon por sextuplicado, muestras plasmáticas de paracetamol a la concentración más baja del intervalo de trabajo (0.10 µg/mL) .Las cuales se procesaron con la técnica ya establecida y se inyectaron en el sistema cromatográfico. Se calculó el coeficiente de variación y el porcentaje de la desviación absoluta. El coeficiente de variación no debía desviarse más del $\pm 20\%$

4.3.8 Límite de detección

Se prepararon por sextuplicado, muestras de paracetamol en plasma a la concentración de 0.05 µg/mL. Las cuales se procesaron con la técnica ya establecido y se inyectaron en el sistema cromatográfico.

4.3.9 Selectividad del método a la matriz biológica

La selectividad del método fue determinada, analizando seis plasmas de voluntarios sanos con certificado de sangre segura, los cuales se procesaron por duplicado con la técnica de precipitación descrita en la sección 5.1

Se consideró que el método analítico era selectivo si no se presentaba interferencias en el tiempo de retención de paracetamol.

También se determinó que el método era selectivo analizando plasma lipémico y hemolizado sometiéndolos por duplicado a la técnica de precipitación ya

establecida. Se consideró que el método analítico era selectivo si no se presentaban picos de interferencia en los tiempos de retención del pico de interés. La interferencia endógena en los blancos de plasma utilizados, no debía ser mayor al 10% con respecto a la respuesta mostrada por el límite de cuantificación.

4.3.10 Selectividad a fármacos de uso común y anticoagulantes

Se analizaron muestras de fármacos de uso común a las concentraciones plasmáticas reportadas, como naproxeno (50 µg/mL), ácido salicílico (300 µg/mL), cafeína (4 µg/mL). De la misma manera se analizó el anticoagulante (Heparina 143 unidades USP). No debía presentarse interferencia en el tiempo de retención de paracetamol.

4.3.11 Selectividad a diclofenaco

Se prepararon por duplicados muestras de diclofenaco en plasma a la concentración de 3000 ng/mL (se tomó 30 µL de la solución de 100 µg/mL de diclofenaco, se añadió 20 µL de solución de MeOH: H₂O (50:50 v/v) y se llevó a 1 mL de plasma). Se aplicó la técnica de precipitación de proteínas antes descrita.

El método analítico para cuantificar paracetamol en plasma se considera selectivo a diclofenaco si al compararse las muestras plasmáticas de diclofenaco (procesadas con la técnica de precipitación de proteínas) con la muestra de adecuabilidad no presenta interferencia en el tiempo de retención de paracetamol.

4.3.12 Estabilidad

La prueba de estabilidad tiene como función determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto de interés (analito) permanece estable en solución y en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, evaluando la respuesta (concentración) del compuesto por analizar en la matriz biológica.

Se evaluó la concentración del plasma bajo las siguientes condiciones:

Estabilidad a temperatura ambiente: Se prepararon por sextuplicado las muestras de control de calidad (0.3, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$) de paracetamol y se mantuvieron a temperatura ambiente. Dicha serie se procesó a las 48 horas con la técnica de precipitación ya establecida (sección 5.1).

Estabilidad en refrigeración: Se prepararon por sextuplicado las muestras de control de calidad (0.3, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$) de paracetamol y se almacenaron en refrigeración. Dicha serie se procesó a las 48 horas con la técnica de precipitación ya establecida. (sección 5.1).

Estabilidad en ciclos congelación-descongelación: Se prepararon por sextuplicado las muestras de control de calidad (0.3, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$) de paracetamol y se almacenaron en el ultracongelador (-70°C) dejando las muestras un periodo mínimo de 12 horas a -70°C entre cada ciclo, después de su exposición a tres ciclos de congelación/descongelación, se procesó con la técnica de precipitación ya establecida (sección 5.1).

Estabilidad muestra procesada: Se prepararon por sextuplicado las muestras de control de calidad (0.3, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$), las cuales se sometieron a la técnica de precipitación, se inyectaron al sistema cromatográfico (tiempo cero). Las muestras se almacenaron en el automuestreador y se inyectaron de nuevo a las 24 y 48 horas después de su procesamiento.

Estabilidad a largo plazo: Se prepararon por sextuplicado una serie de las muestras de control de calidad (0.3, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$) de paracetamol y se almacenaron en el ultracongelador (-70°C) dejando las muestras durante un lapso de 387 días, al cumplir el lapso las muestras. Se procesaron empleando el método analítico previamente validado.

Se consideró que paracetamol fue estable bajo las condiciones evaluadas si la desviación absoluta y el C.V eran menores al $\pm 15\%$ al ser comparadas con muestras control a la misma concentración preparadas recientemente.

4.3.13 Integridad de la dilución (Concentración dentro de la curva de calibración)

Se prepararon por sextuplicado las muestras de control de calidad alto (30 µg/mL) de paracetamol en plasma. Se aplicó la técnica de precipitación empleando 100 µL de la muestra y se completó el volumen a 500 µL con plasma blanco (dilución 1:5 v/v). La concentración interpolada y multiplicada por un factor de dilución de 5 no debía desviarse más del 15% con respecto al valor nominal con un C.V menor o igual al 15%.

4.3.14 Integridad de la dilución (Concentración por encima de la curva de calibración)

Se prepararon por sextuplicado las muestras de paracetamol en plasma, a una concentración de 50 µg/mL (se tomó 50 µL de la solución de 1000 µg/mL de paracetamol y se llevó a 1 mL de plasma). Se aplicó la técnica de precipitación empleando 100 µL de la muestra y se completó el volumen a 500 µL con plasma blanco (dilución 1:5 v/v). Se determinó la concentración del analito en las muestras. La concentración interpolada multiplicada por un factor de dilución de 5 no debía desviarse más del 15% con respecto al valor nominal.

4.3.15 Cambio de anticoagulante

Se preparó por sextuplicado las muestras de control de calidad (0.3, 20 y 30 µg/mL), límite de cuantificación (LC) 0.1 µg/mL y límite Superior de cuantificación (LSC) 40 µg/mL, utilizando plasma con anticoagulante heparina, posteriormente se procesó con la técnica de precipitación ya descrita. Con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las 6 determinaciones en cada nivel. Los resultados fueron comparados contra los obtenidos utilizando CPDA como anticoagulante. El coeficiente de variación no debía ser mayor al 15% (20% para el LC).

4.3.16 Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol.

Se evaluó la estabilidad de las soluciones estándar con las que se prepararon las curvas de calibración y muestras control de calidad. Para ello se realizaron 6

inyecciones de 5 µL de las soluciones de 10, 100 y 1000 µg/mL de paracetamol. Se comparó el área del pico correspondiente a las soluciones recién preparadas y aquellas preparadas 6 días antes y que fueron almacenadas en congelación a -70°C. El porcentaje de la desviación absoluta no debía ser mayor al 15%.

4.4 Aplicación del método analítico en un estudio de biodisponibilidad

El método analítico se aplicó a un estudio de biodisponibilidad de tipo monocéntrico, abierto, tres periodos, tres tratamientos, seis secuencias, cruzado, aleatorizado de dosis oral única de 500 mg de paracetamol contenida en una formulación individual y en una combinación fija con diclofenaco. La parte clínica del estudio se realizó en el área clínica del centro de Investigación Farmacológica y Biofarmacéutica (IFaB). Se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos señalados en la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud.

4.4.1 Criterios de inclusión.

- La participación de los sujetos en el estudio de Paracetamol fue de manera voluntario.
- Se incluyeron solamente voluntarios sanos de entre 18 y 46 años de edad.
- El índice de masa corporal de los voluntarios sanos, estuvo entre 19-27 Kg/m²
- Cada voluntario contaba con un buen estado de salud determinado por los resultados de una historia clínica completa realizada por médicos capacitados.

Los exámenes de laboratorio realizados a los voluntarios fueron los siguientes:

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

- Prueba de embarazo al inicio del estudio.

En el estudio de paracetamol participaron 42 voluntarios sanos (23 hombres y 19 mujeres). Cada voluntario recibió los tratamientos bajo estudio de acuerdo a la tabla de aleatorización (Anexo I).

4.4.2 Criterios de exclusión.

- No se incluyeron los sujetos que mostraron antecedentes de drogadicción o de abuso de fármacos.
- Los sujetos que revelaron resultado positivo a la prueba de embarazo.
- Voluntarios que requirieran medicamento durante el estudio, aparte de paracetamol.
- Voluntarios que fueron hospitalizados por cualquier problema durante los cuatro meses previos al inicio del estudio.
- Voluntarios que hayan recibido fármacos en investigación dos meses antes del presente estudio.
- Sujetos que donaron o perdieron 450 mL o más de sangre dentro de los dos meses antes del presente estudio.

4.4.3 Retiro de voluntarios del estudio.

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

En caso del retiro de algún voluntario, todos los datos y muestras para biodisponibilidad, deben ser enviados a la valoración analítica y anexar la razón del porque se retiraron del estudio.

4.4.4 Evolución del estudio de biodisponibilidad.

Los voluntarios sanos fueron admitidos en la unidad clínica de IFaB, siendo hospitalizados entre las 18:00 y 19:00 hrs del día previo a la administración del fármaco. Una vez ingresado los voluntarios y asignando su lugar dentro del estudio,

se verificó su adecuado estado de hidratación, signos vitales y se realizó prueba de abuso de drogas a todos los voluntarios y a las mujeres se les realizó la prueba de embarazo. Recibieron cena y permanecieron en ayuno a partir de las 22:00 hrs. Al otro día por la mañana, los voluntarios fueron canalizados mediante un catéter en alguna de las venas del brazo y se tomó la muestra correspondiente al tiempo 0. A cada voluntario se le administró el medicamento correspondiente (A1: medicamento de referencia de diclofenaco, A2: medicamento de referencia de paracetamol o B: Medicamento de prueba con la combinación fija de paracetamol y diclofenaco) con 250 mL de agua, después de por lo menos 10 horas de ayuno y 3 horas antes del desayuno. (Anexo I tabla de aleatorización).

Las muestras sanguíneas fueron recolectadas y procesadas para obtener el plasma a los siguientes tiempos: 0.167, 0.25, 0.333, 0.5, 0.667, 0.833, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 6, 8, 10, 12 y 16 horas, después de la administración de cada medicamento. Se efectuó registro de signos vitales durante cada una de las tomas de las muestras.

Los voluntarios no tomaron ningún otro medicamento durante el tiempo que duró el estudio. Los sujetos debieron reportar al personal médico de la conducción del estudio cualquier síntoma que presentaron.

4.4.5 Análisis de las muestras plasmáticas

Se realizó el análisis de 1764 muestras correspondientes a 42 voluntarios, las cuales fueron procesadas y cuantificadas utilizando el método de cromatografía de líquidos de alta resolución previamente desarrollado y validado.

Durante cada corrida analítica se evaluó la adecuabilidad del sistema cromatográfico realizando inyecciones consecutivas de la solución de adecuabilidad.

Cada día de análisis se comprobó que no existieran interferencias en el pico de interés con la matriz biológica utilizada (blanco de plasma), al igual que el blanco de reactivos.

Las muestras del estudio se analizaron junto con la curva de calibración y puntos de control de calidad 0.3, 20 y 30 µg/mL de paracetamol. Para evaluar la validez de la corrida analítica se demostró la consistencia de las curvas de calibración con respecto a la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación en cada día de análisis, las muestras de los puntos control de calidad cumplieron con los criterios de precisión y exactitud establecidos en la validación del método.

4.4.6 Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos fueron determinados a través de métodos no compartimentales (modelo independiente), considerando los siguientes aspectos:

- **Cmax:** Concentración plasmática máxima obtenida de manera gráfica, a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.
- **Tmax:** Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima, obtenido de manera gráfica a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo
- **ABC_{0-t}:** Área bajo la curva de la concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t (último tiempo de muestreo) calculada por el método trapezoidal. El procedimiento para el cálculo de este parámetro se describe en la siguiente fórmula:

$$ABC_{0-t} = \sum_{i=1}^n \frac{(C_i + C_{i-1})(t_i - t_{i-1})}{2}$$

Donde:

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

t_i= tiempo en que se realiza la iésima toma de muestra

C_i= Concentración obtenida en el iésimo tiempo de muestreo.

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

$$ABC_{0-\text{inf}} = ABC_{0-t} + C_f/K_e$$

Donde:

C_f= Concentración de la última muestra

K_e= Constante de eliminación

- **Constante de eliminación (K_e):** se estima a partir de la porción lineal terminal del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo (en escala semilogarítmica)
- **Vida media de eliminación:** mediante el cociente de Ln(2)/K_e
- **TMR_{0-inf}:** Tiempo medio de residencia extrapolado a tiempo infinito

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

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

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

Donde:

t_f= Tiempo de la última muestra

C_f = Concentración de la última muestra

La estadística descriptiva con las cuales se pudo caracterizar la farmacocinética de paracetamol en población mexicana se muestra en la tabla 30. En el anexo IV se encuentran los resultados de los parámetros farmacocinéticos independientes para cada voluntario.

4.4.7 Análisis de Varianza (ANADEVA) y Estadística de Biodisponibilidad Relativa.

El análisis estadístico aplicado en el presente informe, da cumplimiento a los aspectos señalado en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, los cuales se citan a continuación:

Análisis de Varianza (ANADEVA).

A partir de los parámetros farmacocinéticos se aplicó un análisis de varianza al logaritmo de los parámetros farmacocinéticos: ABC y Cmax; utilizando un diseño cruzado al azar, para dos tratamientos, tres períodos y seis secuencias, para tal fin se utilizó el paquete computacional WinNonlin® versión 5.2.1, considerando la suma de cuadrados tipo III, para evaluar los siguientes efectos:

- ✓ Secuencia
- ✓ Periodo
- ✓ Formulación

Se determina que no existe efecto de la formulación, del período y de la secuencia, si el valor de la probabilidad obtenido era mayor a 0.05.

Estadística de biodisponibilidad relativa

La estadística para determinar la biodisponibilidad relativa promedio debe evaluar la diferencia entre los medicamentos administrados oralmente, mediante la comparación logarítmica de los parámetros farmacocinéticos: Cmax, ABC 0-t y ABC 0-inf.

a) Intervalos de confianza.

Se realizó el análisis estadístico para determinar la biodisponibilidad relativa de los medicamentos a partir de la construcción de intervalos de confianza Clásicos y de Westlake, los cuales concluyen a favor de la similitud si los límites calculados están incluidos en el intervalo preestablecido de 80 a 125 % para datos transformados

logarítmicamente. Estos fueron analizados con un nivel de confianza del 90% con una potencia de la prueba estadística mayor a 0.8.

b) Pruebas Límite

Las pruebas límite se basan en el rechazo de la hipótesis nula de bioequivalencia para concluir con un nivel de significancia alfa (0.05) y nivel de confianza al 90%, que los productos son bioequivalentes. Las pruebas límite que se aplicaron, son la prueba de t doble unilateral de Shuirmann y la prueba de Anderson Hauck sobre el cociente entre los promedios de los medicamentos de prueba y de referencia, para los parámetros farmacocinéticas de Cmax, ABC 0-t y ABC 0-inf

Las pruebas límite concluyen a favor de la similitud si la probabilidad de que el cociente sea inferior a 80% y superior a 125 %, es menor a 0.05.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

5 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

5.1.1 Técnica de precipitación

La técnica de precipitación se determinó en función del recobro constante en el rango de concentraciones de trabajo como a la sensibilidad del método analítico

Al utilizar el ácido perclórico como agente precipitante, no se obtenía la sensibilidad a las concentraciones más bajas de la curva de calibración (0.1 y 0.2 µg/mL), por lo que se descartó este agente precipitante, sin embargo, utilizando (MeOH:ACN) con evaporación alcanzó la sensibilidad requerida con un recobro constante de aproximadamente el 80 %.

Las condiciones cromatográficas establecidas después de realizar la optimización del método analítico fueron las que se describen a continuación:

Tabla 4 Condiciones cromatográficas

Parámetro	Descripción
Detector	UV
Longitud de onda	243 nm
Columna	X-Terra RP8, 4.6 x 250 mm, 5 µm.
Fase móvil	Solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.01 M, pH 4.5:acetonitrilo (92:8 v/v)
Velocidad de flujo	1.2 mL/min
Volumen de inyección	10 µL
Temperatura columna	45°C
Temperatura del automuestreador	15 °C
Solución de lavado del sistema	MeOH : H ₂ O (50 :50 v/v)
Tiempo de retención aproximado	Paracetamol 4.7 – 5.7 minutos

La técnica de precipitación con la que se obtuvieron mejores resultados se describe a continuación:

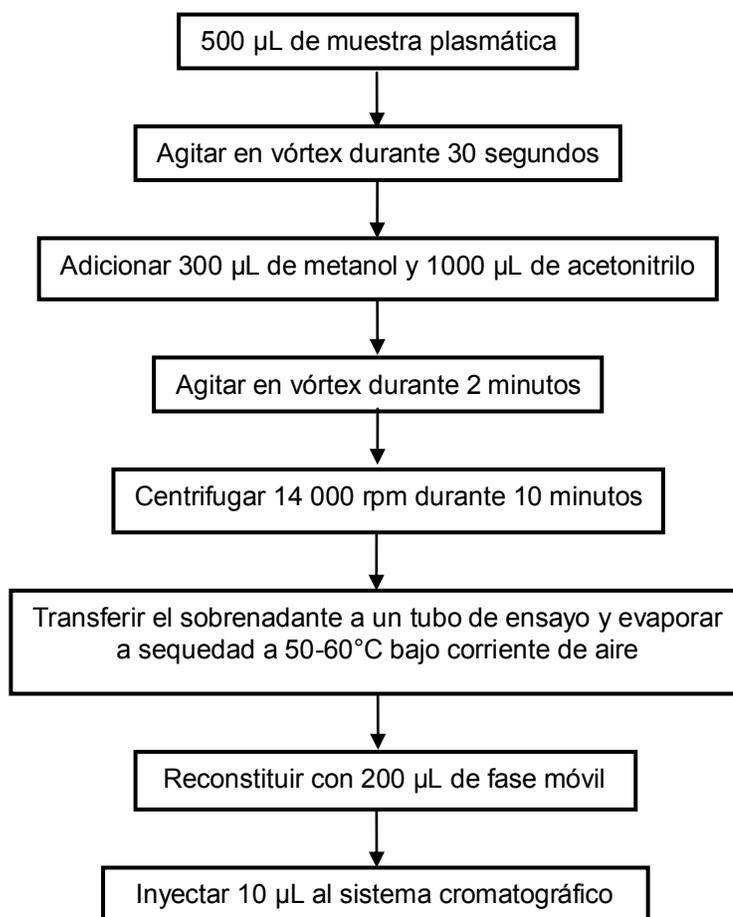


Figura 2. Diagrama del método de extracción

5.2 Resultados de la validación

5.2.1 Selectividad inicio de corrida

Durante cada día de corrida en los días de validación se evaluó la selectividad inyectando un blanco de reactivos y un blanco de plasma al ser comparados con la adecuabilidad no presentaron interferencias en el tiempo de retención de paracetamol en ninguna corrida.

5.2.2 Selectividad del método

El método mostró ser selectivo para los compuestos evaluados al no presentarse interferencias al tiempo de retención de paracetamol. A continuación se muestran

SELECTIVIDAD (INICIO DE CORRIDA)

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Muestras: ADECUABILIDAD, F_520_1, F_521_1, Inyectado por: A_SALAZAR
 Tipo de muestras: Unknown Sample set: VALIDACION D1 14_07_2009
 Volúmenes de inyección: 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, 50.0, 100.0 Método: PAROENM
 Inyecciones #: 1, 5 Fecha de inyección: 14/07/2009 07:02:55 p.m., 14/07/2009
 Tiempos de corrida: 0.0, 7.0 minutos Volumen de inyección: 10.00 ul

Los cromatogramas correspondientes a los blancos de plasma provenientes de 6 voluntarios diferentes, la prueba de selectividad hacia fármacos de uso común y la prueba de selectividad a diclofenaco.

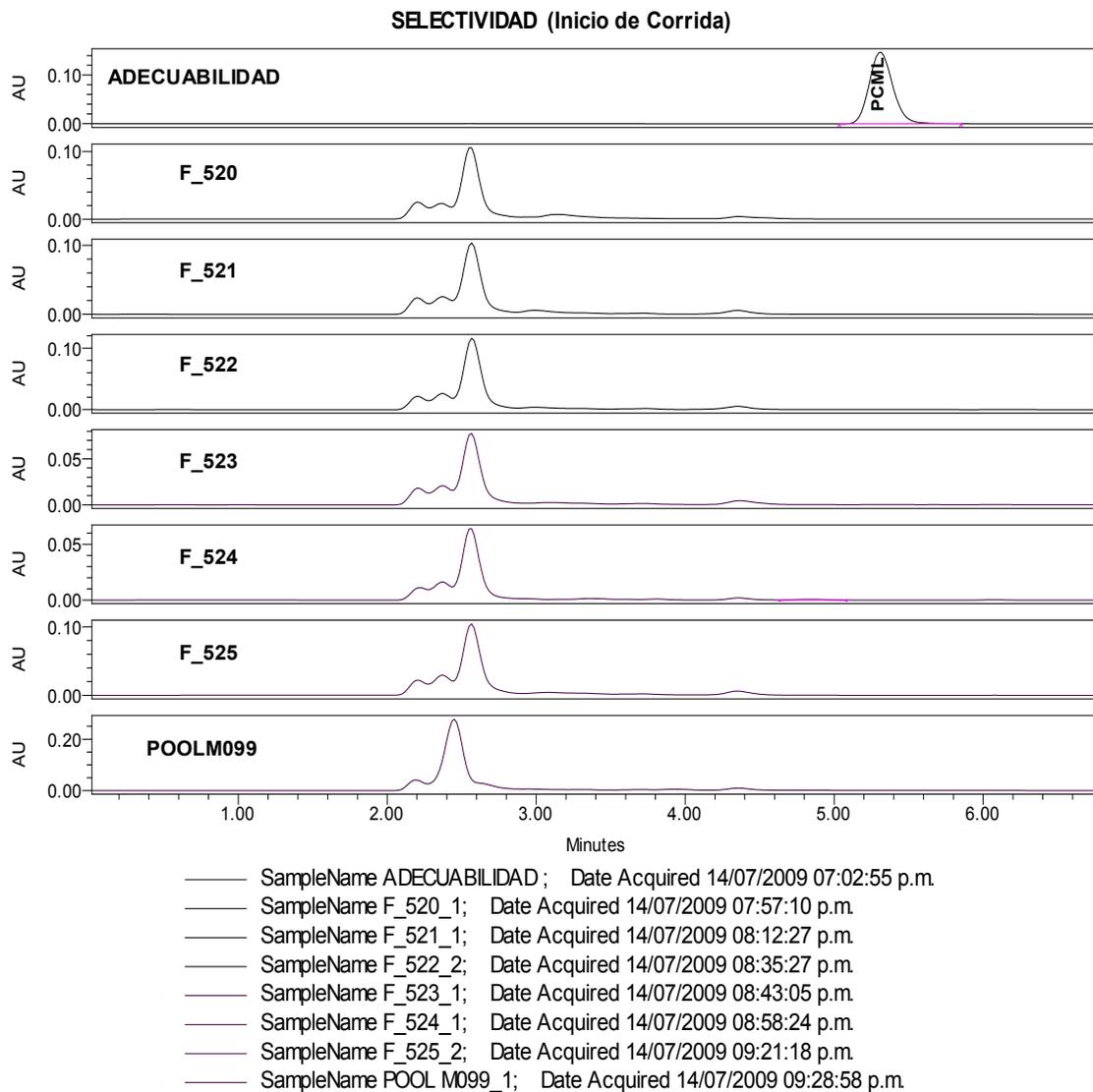


Figura 3 Selectividad del método para la mezcla de plasma y los plasmas individuales

Report Method: SELECTIVIDAD_CORRIDA

Muestras: A SALICILICO_1, ADECUABILIDAD,
Tipo de muestras: Unknown, Control
Vial: 1, 15, 66, 68, 79, 81, 83, 85
Inyecciones #: 1, 5
Tiempo de corrida: 6.8, 7.0 minutos

Inyectado por: A_SALAZAR
Sample set: VALIDACION 17_07_2009, VALIDACION
Método: PARACETAMOL
Volumen de inyección: 10.00 ul

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

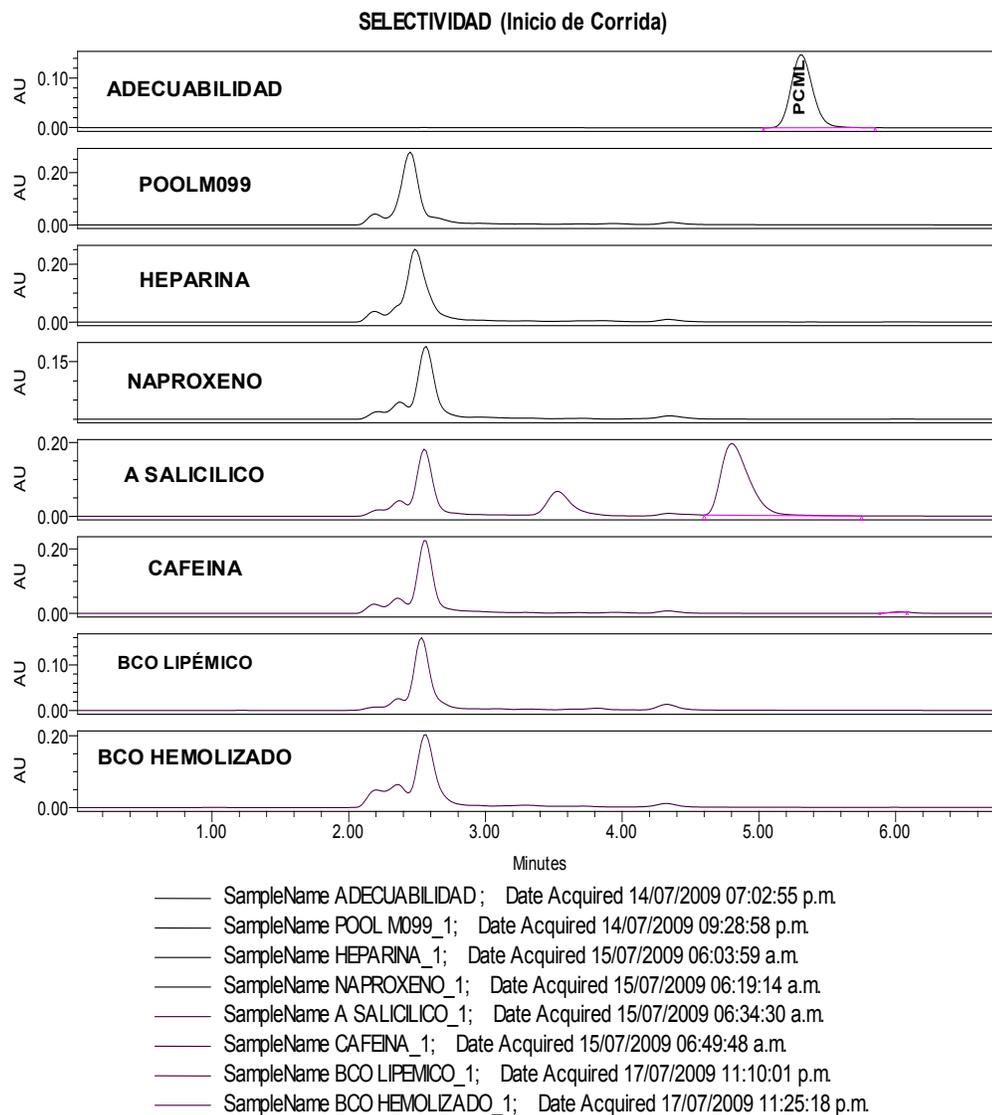


Figura 4 Selectividad del método para fármacos de uso común

Report Method: SELECTIVIDAD_CORRIDA

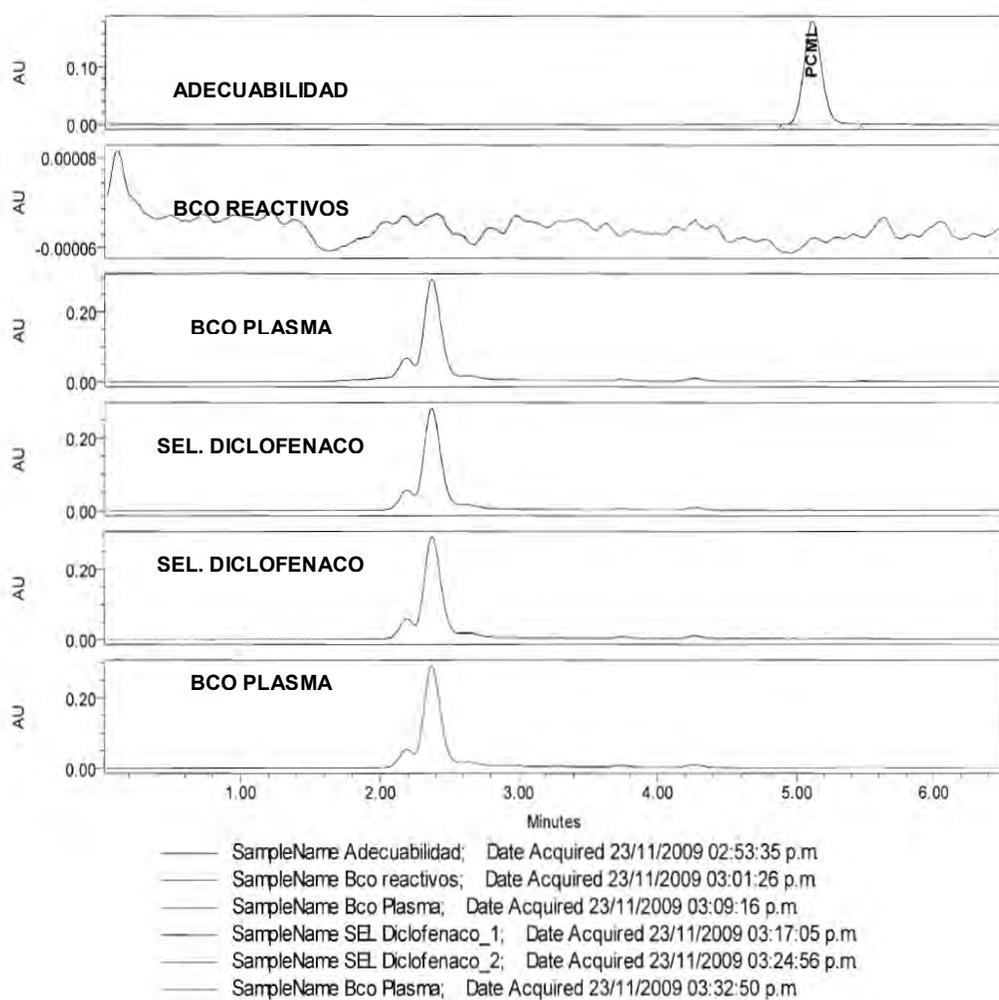


Figura 5 Selectividad del método para diclofenaco

5.2.3 Linealidad del método

En la tabla 5 se muestran los resultados de la prueba de linealidad para las cinco curvas de calibración en plasma, la relación entre la respuesta cromatográfica con respecto a la concentración en cada curva de calibración, fue ajustado a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación $y = mx + b$, con ponderación $1/x^2$ donde la variable "y" es la respuesta analítica área de paracetamol obtenida para su respectiva concentración nominal "x".

El método fue lineal en el intervalo de concentraciones de 0.1 a 40 µg/mL; todos los valores de "r" obtenidos fueron mayores a 0.99. En cada punto de la curva de calibración se dio cumplimiento a los criterios establecidos para precisión y exactitud, es decir C.V% y desviación absoluta porcentual menor o igual al 15% respectivamente y 20% para el límite de cuantificación.

Tabla 5 Linealidad del método analítico para cuantificar paracetamol en plasma

Conc. Nominal (µg/mL)	0.1	0.2	1	5	15	25	35	40
Curva 1	0.099	0.202	1.003	4.936	15.076	25.199	35.082	39.547
Curva 2	0.101	0.199	0.877	4.838	16.129	26.945	33.798	41.083
Curva 3	0.101	0.195	1.008	5.087	15.718	23.279	34.563	40.844
Curva 4	0.096	0.217	1.020	5.036	13.801	23.358	36.201	41.758
Curva 5	0.100	*	1.003	4.956	13.915	25.613	36.881	40.001
Promedio	0.099	0.203	0.982	4.971	14.928	24.879	35.305	40.647
D. E	0.002	0.010	0.059	0.096	1.047	1.564	1.241	0.879
C. V (%)	2.086	4.726	6.029	1.930	7.014	6.286	3.514	2.163
Desv. Abs. (%)	0.600	1.625	1.780	0.588	0.481	0.485	0.871	1.617
Rango de cumplimiento								
(mínimo, máximo)	(0.080 - 0.120)	(0.170 - 0.230)	(0.850 - 1.150)	(4.250 - 5.750)	(12.750 - 17.250)	(21.250 - 28.750)	(29.750 - 40.250)	(34.000 - 46.000)

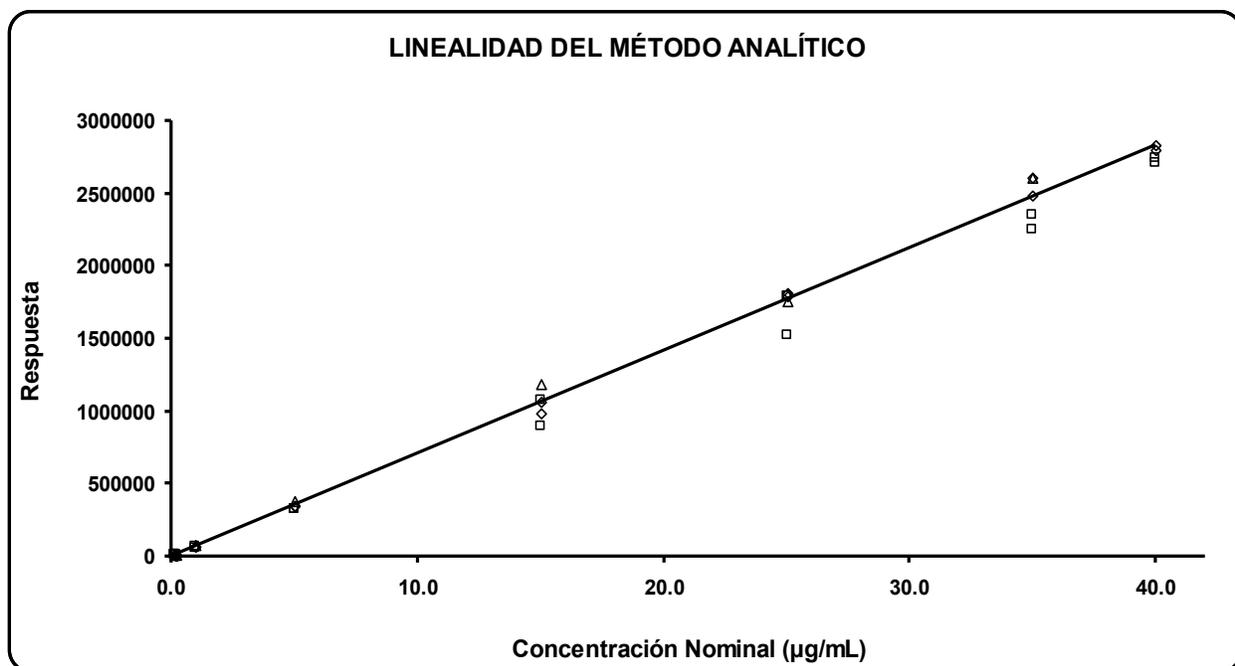


Figura 6 Gráfico de linealidad del método

Tabla 6 Parámetros de linealidad del método analítico para cuantificar paracetamol en plasma

Conc. nominal (µg/mL)	Pendiente	Ordenada	r
Curva 1	70904.757	-815.546	1.0000
Curva 2	66640.352	267.887	0.9975
Curva 3	75501.709	655.505	0.9993
Curva 4	64947.800	-1.166	0.9980
Curva 5	70763.234	1381.739	0.9992
Promedio	69751.571		
D. E	4128.356		
C. V (%)	5.919		

5.2.4 Repetibilidad de la curva de calibración

En la tabla 7 se ilustran los resultados correspondientes a la repetibilidad del método para cuantificar paracetamol en plasma.

Tabla 7 Repetibilidad de la curva de calibración para cuantificar paracetamol en plasma

Conc. Nominal (µg/mL)	0.1	0.2	1	5	15	25	35	40
Curva 1	0.101	0.195	1.008	5.087	15.718	23.279	34.563	40.844
Curva 2	0.100	*	1.004	5.202	14.026	25.850	32.111	42.816
Curva 3	0.099	0.207	0.940	4.634	14.006	25.619	36.710	44.015
Promedio	0.100	0.201	0.984	4.974	14.583	24.916	34.461	42.558
D. E	0.001	0.008	0.038	0.300	0.983	1.422	2.301	1.601
C. V (%)	1.000	4.222	3.878	6.037	6.739	5.709	6.678	3.762
Desv. Abs. (%)	0.000	0.500	1.600	0.513	2.778	0.336	1.539	6.396
Rango de cumplimiento								
(mínimo, máximo)	(0.080 - 0.120)	(0.170 - 0.230)	(0.850 - 1.150)	(4.250 - 5.750)	(12.750 - 17.250)	(21.250 - 28.750)	(29.750 - 40.250)	(34.000 - 46.000)

*Valor que esta fuera del $\pm 15\%$ de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos.

(REPETIBILIDAD DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN)			
Conc. nominal (µg/mL)	Pendiente	Ordenada	r
Curva 1	75501.709	655.505	0.9993
Curva 2	74568.106	1009.197	0.9984
Curva 3	76458.140	14.330	0.9976
Promedio	75509.318		
D. E	945.040		
C. V (%)	1.252		

El método es repetible ya que el coeficiente de variación de la concentración recuperada en las tres curvas de calibración fue menor al $\pm 15\%$.

5.2.5 Precisión y exactitud del método analítico.

Repetibilidad y exactitud del método

En la tabla 8 se ilustran los resultados correspondientes a la repetibilidad, en los cuales se puede observar que el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración evaluados fue menor al 15% y menor al 20 % para el LC

Tabla 8 Repetibilidad del método analítico para cuantificar paracetamol en plasma

Muestra	LC (0.1 µg/mL)	Control bajo (0.3 µg/mL)	Control medio (20 µg/mL)	Control alto (30 µg/mL)	LSC (40 µg/mL)
1	0.100	0.299	19.063	31.130	40.870
2	0.087	0.297	20.630	31.114	42.436
3	0.096	0.261	20.782	29.630	32.514*
4	0.110	0.247*	20.984	28.664	35.273
5	0.103	0.296	21.229	31.610	38.607
6	0.110	0.296	19.394	31.238	35.824
Promedio	0.101	0.290	20.347	30.564	38.602
D. E	0.009	0.016	0.896	1.154	3.108
C. V (%)	8.722	5.571	4.401	3.774	8.052
Desv. Abs. (%)	1.000	3.400	1.735	1.881	3.495
Rango de cumplimiento					
(mínimo, máximo)	(0.080 - 0.120)	(0.255 - 0.345)	(17.000 - 23.000)	(25.5000 - 34.500)	(34.000 - 46.000)

* Valor que esta fuera del ±15% de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos

Reproducibilidad y exactitud del método

En la tabla 9 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método y exactitud correspondiente. De acuerdo con los resultados generados, el método fue repetible, reproducible y exacto entre días al cumplir con los criterios de un coeficiente de variación y una desviación absoluta % no mayores al 15% para la concentración plasmática promedio.

Tabla 9 Reproducibilidad del método analítico para cuantificar paracetamol en plasma

Día	Concentración recuperada		
	Control bajo (0.3 µg/mL)	Control medio (20 µg/mL)	Control alto (30 µg/mL)
Día 1	0.299	19.063	31.130
	0.297	20.630	31.114
	0.261	20.782	29.630
	0.247*	20.984	28.664
	0.296	21.229	31.610
	0.296	19.394	31.238
Día 2	0.299	21.510	31.209
	0.288	20.538	32.238
	0.296	19.979	30.498
	0.297	21.435	32.984
	0.302	18.446	32.227
	0.305	20.734	32.627
Día 3	0.292	18.752	30.765
	0.258	21.098	32.574
	0.295	18.205	31.474
	0.291	21.460	31.617
	0.275	21.236	31.952
	0.286	21.561	31.699
Promedio	0.290	20.391	31.403
D. E	0.013	1.128	1.066
C. V (%)	4.621	5.534	3.395
Desv. Abs. (%)	3.275	1.954	4.676
Rango de cumplimiento			
(mínimo,	(0.255 - 0.345)	(17.000 - 23.000)	(25.5000 - 34.500)
máximo)			

* Valor que está fuera del $\pm 15\%$ de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos

5.2.6 Recuperación absoluta (%Recobro)

El recobro del método analítico para cuantificar paracetamol en plasma fue constante en las concentraciones evaluadas (puntos control bajo, medio y alto), dando como resultado un recobro global del 84.26% y una desviación de los promedios individuales con respecto al global, menor al 15%. Los resultados se muestran en la tabla 10:

Tabla 10 Recobro absoluto de método analítico para cuantificar paracetamol en plasma

Nivel de concentración	ÁREAS		Recobro	% desv
	SISTEMA	MÉTODO		
Control bajo (0.3 µg/mL)	24588	20352		
	25140	20230		
	25084	17725		
	24340	16688*		
	24424	20167		
	24311	20157		
Promedio	24647.833	19726.200	80.032	5.015
Control medio (20 µg/mL)	1661941	1350847		
	1659779	1461931		
	1655867	1472728		
	1665876	1487058		
	1658342	1504412		
	1655562	1374321		
Promedio	1659561.167	1441882.833	86.883	3.117
Control alto (30 µg/mL)	2609237	2206435		
	2509459	2205347		
	2513426	2100112		
	2513208	2031597		
	2481262	2240495		
	2512720	2214130		
Promedio	2523218.667	2166352.667	85.857	1.898
	Promedio Global		84.257	

*Valor que esta fuera del $\pm 15\%$ de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos

5.2.7 Límite de cuantificación y detección

La sensibilidad del método fue determinada a partir de la concentración mínima cuantificable ó límite de cuantificación (LC) y del límite de detección (LD). En la tabla 11 se muestran los resultados:

Tabla 11 Evaluación del límite de detección y de cuantificación de paracetamol

Muestra	Concentración recuperada	
	Límite de detección (0.05 µg/mL)	Límite de cuantificación (0.10 µg/mL)
1	0.061	0.100
2	0.060	0.087
3	0.049	0.096
4	0.060	0.110
5	0.058	0.103
6	0.061	0.110
Promedio	0.058	0.101
D. E	0.005	0.009
C. V (%)	7.947	8.722
Desv. Abs. (%)	16.333	1.000

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

En este caso $0.10 \mu\text{g/mL}$ fue considerado como el límite de cuantificación (C.V.%= 8.72 y Desv. Abs%= 1.00). La concentración de $0.05 \mu\text{g/mL}$ es considerada como el límite de detección ya que aun cuando presenta un CV% de 7.95% tiene una relación señal/ruido de 3.20 .

La figura 6 muestra el cromatograma característico de las muestras preparadas para evaluar el límite de cuantificación y de detección.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

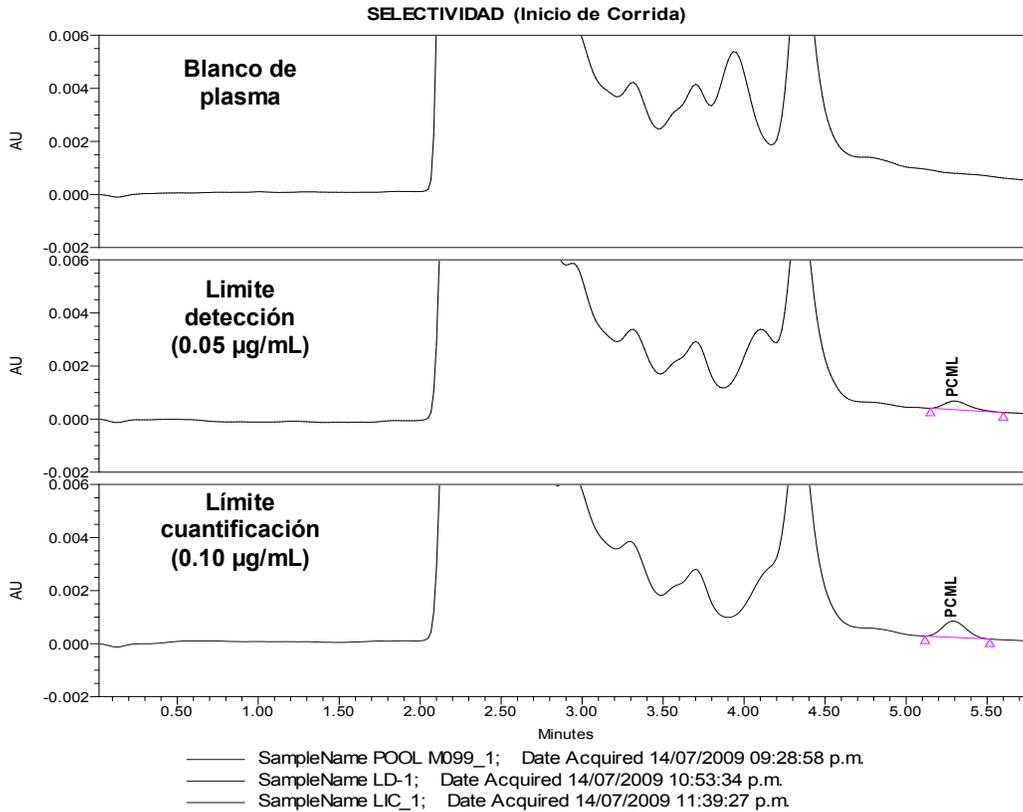


Figura 7 Límite de detección y cuantificación

Report Method: SELECTIVIDAD_CORRIDA

5.2.8 Estabilidad

Temperatura ambiente y refrigeración después de 48 hrs

En las tablas 12 y 13 se muestran los resultados del análisis de las muestras anteriores. Se puede observar que las muestras almacenadas a temperatura ambiente y en refrigeración fueron estables durante 48 horas, ya que para todos los controles se presenta una desviación absoluta menor a 15% con respecto al valor de muestras control de calidad recién preparadas.

Tabla 12 Estabilidad de paracetamol en plasma (temperatura ambiente de 24-27°C)

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (0.3 µg/mL)	Control medio (20 µg/mL)	Control alto (30 µg/mL)
1	0.277	19.852	31.347
2	0.310	20.429	24.897*
3	0.304	18.885	31.585
4	0.311	19.009	30.925
5	0.310	18.703	30.354
6	0.298	20.588	31.932
Promedio	0.302	19.578	31.229
D.E	0.013	0.823	0.611
C.V. (%)	4.331	4.205	1.956
Concentraciones plasmáticas después de 48 h			
1	0.301	21.891	32.563
2	0.339	21.302	33.187
3	0.325	21.838	31.454
4	0.320	18.967	33.047
5	0.276	19.718	33.258
6	0.319	21.791	30.510
Promedio	0.313	20.918	32.337
D.E	0.022	1.261	1.117
C.V. (%)	7.017	6.028	3.456
Desv. Abs. (%)	3.867	6.845	3.548

*Valor que está fuera del $\pm 15\%$ de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos

Tabla 13 Estabilidad de paracetamol en plasma (refrigeración 4-8°C)

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (0.3 µg/mL)	Control medio (20 µg/mL)	Control alto (30 µg/mL)
1	0.277	19.852	31.347
2	0.310	20.429	24.897*
3	0.304	18.885	31.585
4	0.311	19.009	30.925
5	0.310	18.703	30.354
6	0.298	20.588	31.932
Promedio	0.302	19.578	31.229
D.E	0.013	0.823	0.611
C.V. (%)	4.331	4.205	1.956
Concentraciones plasmáticas después de 48 h			
1	0.329	19.374	33.051
2	0.278	21.907	32.984
3	0.319	20.957	31.969
4	0.355	21.349	32.101
5	0.321	19.206	32.641
6	0.328	21.536	32.886
Promedio	0.322	20.722	32.605
D.E	0.025	1.152	0.465
C.V. (%)	7.765	5.557	1.426
Desv. Abs. (%)	6.630	5.843	4.409

*Valor que está fuera del $\pm 15\%$ de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos

Ciclos de congelación – descongelación

En la tabla 14 se muestran los resultados del análisis de las muestras después de ser sometidas a tres ciclos de congelación-descongelación ya descritos.

Tabla 14 Estabilidad de paracetamol en plasma (ciclos congelación – descongelación)

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (0.3 µg/mL)	Control medio (20 µg/mL)	Control alto (30 µg/mL)
1	0.288	19.619	29.806
2	0.296	20.756	27.865
3	0.305	18.763	27.719
4	0.282	20.228	30.488
5	0.376*	19.561	29.771
6	0.311	20.334	28.701
Promedio	0.296	19.877	29.058
D.E	0.012	0.709	1.136
C.V. (%)	4.010	3.566	3.911
Concentraciones plasmáticas después del CICLO 3			
1	0.289	19.683	28.040
2	0.300	20.033	26.344
3	0.300	20.634	29.480
4	0.289	20.124	30.611
5	0.268	20.363	30.324
6	0.326	20.573	30.853
Promedio	0.295	20.235	29.275
D.E	0.019	0.360	1.763
C.V. (%)	6.445	1.779	6.021
Desv. Abs. (%)	0.360	1.802	0.747

*Valor que esta fuera del $\pm 15\%$ de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos Como se puede observar los coeficientes de variación fueron menores al 15% y presentaron una diferencia no mayor al 15% con respecto al valor de referencia (muestras recién preparadas) por lo que se puede concluir que las muestras plasmáticas conteniendo paracetamol fueron estables después de tres ciclos congelación-descongelación a una temperatura de -70°C .

Muestra procesada

Los resultados se presentan en la tabla 15,16 y 17 se puede observar que paracetamol fue estable en la solución de inyección durante 72 horas después de su preparación.

Tabla 15 Estabilidad de la muestra procesada de paracetamol después de 24 horas

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (0.3 µg/mL)	Control medio (20 µg/mL)	Control alto (30 µg/mL)
1	0.299	21.510	31.209
2	0.288	20.538	32.238
3	0.296	19.979	30.498
4	0.297	21.435	32.984
5	0.302	18.446	32.227
6	0.305	20.734	32.627
Promedio	0.298	20.440	31.964
D.E	0.006	1.133	0.932
C.V. (%)	1.963	5.543	2.916
Concentraciones plasmáticas después de 24 h			
1	0.318	20.216	32.681
2	0.304	21.624	33.110
3	0.266	22.137	30.627
4	0.249*	22.265	31.920
5	0.301	22.846	33.441
6	0.302	20.894	33.822
Promedio	0.298	21.664	32.600
D.E	0.019	0.967	1.168
C.V. (%)	6.461	4.463	3.583
Desv. Abs. (%)	0.123	5.985	1.991

*Valor que está fuera del $\pm 15\%$ de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos

Tabla 16 Estabilidad de la muestra procesada de paracetamol después de 48 horas

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (0.3 µg/mL)	Control medio (20 µg/mL)	Control alto (30 µg/mL)
1	0.292	18.752	30.765
2	0.258	21.098	32.574
3	0.295	18.205	31.474
4	0.291	21.460	31.617
5	0.275	21.236	31.952
6	0.286	21.561	31.699
Promedio	0.283	20.385	31.680
D.E	0.014	1.496	0.593
C.V. (%)	4.967	7.339	1.871
Concentraciones plasmáticas después de 48 h			
1	0.272	18.146	29.135
2	0.270	19.291	29.361
3	0.236*	19.734	26.448
4	0.229*	19.682	29.390
5	0.267	20.086	29.431
6	0.270	18.281	27.756
Promedio	0.270	19.203	28.587
D.E	0.002	0.808	1.227
C.V. (%)	0.764	4.209	4.291
Desv. Abs. (%)	4.626	5.798	9.764

*Valor que está fuera del $\pm 15\%$ de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos

Tabla 17 Estabilidad de la muestra procesada de paracetamol después de 72 horas

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (0.3 µg/mL)	Control medio (20 µg/mL)	Control alto (30 µg/mL)
1	0.288	19.619	29.806
2	0.296	20.756	27.865
3	0.305	18.763	27.719
4	0.282	20.228	30.488
5	0.376*	19.561	29.771
6	0.311	20.334	28.701
Promedio	0.296	19.877	29.058
D.E	0.012	0.709	1.136
C.V. (%)	4.010	3.566	3.911
Concentraciones plasmáticas después de 72 h			
1	0.229	19.546	23.195*
2	0.268	17.833	29.731
3	0.280	18.254	28.936
4	0.281	17.907	29.297
5	0.279	19.148	30.803
6	0.273	19.206	29.689
Promedio	0.268	18.649	29.691
D.E	0.020	0.740	0.701
C.V. (%)	7.415	3.967	2.360
Desv. Abs. (%)	9.469	6.177	2.178

*Valor que está fuera del $\pm 15\%$ de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos

Estabilidad largo plazo (congelación -70 °C): La tabla 18 muestra los resultados de la estabilidad a largo plazo de paracetamol.

Tabla 18 Estabilidad a largo plazo (-70°C) de paracetamol después de 387 días

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
	(0.3 µg/mL)	(20 µg/mL)	(30 µg/mL)
1	0.294	19.765	30.096
2	0.296	19.777	29.310
3	0.299	18.373	30.706
4	0.290	11.042*	29.067
5	0.286	21.818	30.198
6	0.281	20.134	30.038
Promedio	0.291	19.973	29.903
D.E	0.007	1.232	0.606
C.V. (%)	2.300	6.168	2.028
Concentraciones plasmáticas después de 387 días			
Muestra	Control Bajo	Control Medio	Control Alto
	(0.3 µg/mL)	(20 µg/mL)	(30 µg/mL)
1	0.317	20.771	31.739
2	0.300	21.047	30.207
3	0.306	19.808	31.288
4	0.299	20.439	29.170
5	0.311	20.761	33.261
6	0.307	20.407	12.364*
Promedio	0.307	20.539	31.133
D.E	0.007	0.430	1.552
C.V. (%)	2.208	2.092	4.984
Desv. Abs. (%)	5.384	2.831	4.115

*Valor que esta fuera del ±15% de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos

Las muestras plasmáticas conteniendo paracetamol fueron estables después de ser almacenadas a -70°C a lo largo de 387 días ya que los coeficientes de variación fueron menores al ± 15% y la diferencia no fue mayor al ± 15% con respecto al valor de referencia (muestras recién preparadas).

5.2.9 Integridad de la dilución (Concentración dentro de la curva de calibración):

La prueba de la integridad de la dilución (1:5) realizada sobre muestras con concentración dentro de la curva de calibración dio cumplimiento con los criterios de precisión y exactitud.

Tabla 19 Integridad de la dilución (concentración dentro de la curva de calibración)

PARACETAMOL (VALOR NOMINAL DE 30 µg/mL)	
MUESTRA #	CONCENTRACIÓN INTERPOLADA CONSIDERANDO EL FACTOR DE DILUCIÓN DE 5
1	28.068
2	26.895
3	27.781
4	29.148
5	28.918
6	29.367
Promedio	28.363
D. E	0.950
C. V (%)	3.350
Desv. Abs. (%)	5.457

5.2.10 Integridad de la dilución (Concentración por encima de la curva de calibración):

Los resultados nos muestran que en caso de que alguna muestra presentara concentración por encima del punto más alto de la curva de calibración, se podría utilizar un volumen de 100 µL y añadir 400 µL de plasma para procesarla ya que el valor que se genera cumple con los parámetros de exactitud establecidos.

Tabla 20 Integridad de la dilución (concentración por encima de la curva de calibración)

PARACETAMOL (VALOR NOMINAL DE 50 µg/mL)	
MUESTRA #	CONCENTRACIÓN INTERPOLADA CONSIDERANDO EL FACTOR DE DILUCIÓN DE 5
1	47.574
2	46.782
3	46.203
4	47.685
5	47.357
6	48.323
Promedio	47.321
D. E	0.741
C. V (%)	1.565
Desv. Abs. (%)	5.359

5.2.11 Cambio de anticoagulante

En las tablas 21 y 22 se ilustran los resultados correspondientes a la evaluación del método al realizar un cambio en el anticoagulante de la matriz biológica. En la tabla 21 se puede observar que el CV% en todos los casos fue menor al 15 % (20 % para el LC). Por otro lado, al comparar los resultados de CPDA y los de heparina la desviación entre los resultados fue menor a 8.27%.

Tabla 21 Evaluación de la precisión y exactitud del método al realizar un cambio de anticoagulante en la matriz biológica

Muestra	LC (0.1 µg/mL)	Control bajo (0.3 µg/mL)	Control medio (20 µg/mL)	Control alto (30 µg/mL)	LSC (40 µg/mL)
1	0.068*	0.281	22.022	31.807	37.638
2	0.102	0.322	22.434	32.744	43.264
3	0.110	0.303	20.862	33.611	35.534
4	0.094	0.313	21.898	29.468	40.415
5	0.100	0.312	22.179	32.532	38.115
6	0.124*	0.252*	18.415	33.033	43.463
Promedio	0.102	0.306	21.302	32.199	39.738
D. E	0.007	0.016	1.513	1.464	3.209
C. V (%)	6.510	5.098	7.105	4.545	8.075
Desv. Abs. (%)	1.500	2.067	6.508	7.331	0.655
Rango de cumplimiento (mínimo, máximo)	(0.080 - 0.120)	(0.255 - 0.345)	(17.000 - 23.000)	(25.5000 - 34.500)	(34.000 - 46.000)

*Valor que esta fuera del $\pm 15\%$ de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos

Tabla 22 Evaluación del cambio de anticoagulante en la matriz biológica utilizando CPDA como anticoagulante

Muestra	Control bajo (0.3 µg/mL)	Control medio (20 µg/mL)	Control alto (30 µg/mL)
1	0.292	18.752	30.765
2	0.258	21.098	32.574
3	0.295	18.205	31.474
4	0.291	21.460	31.617
5	0.275	21.236	31.952
6	0.286	21.561	31.699
Promedio	0.283	20.385	31.680
D. E	0.014	1.496	0.593
C. V (%)	4.967	7.339	1.871
UTILIZANDO HEPARINA COMO ANTICOAGULANTE			
1	0.281	22.022	31.807
2	0.322	22.434	32.744
3	0.303	20.862	33.611
4	0.313	21.898	29.468
5	0.312	22.179	32.532
6	0.252*	18.415	33.033
Promedio	0.306	21.302	32.199
D. E	0.016	1.513	1.464
C. V (%)	5.098	7.105	4.545
Desv. Abs. (%)	8.262	4.495	1.638

* *Valor que esta fuera del $\pm 15\%$ de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos.

5.2.12 Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol

La desviación absoluta % no fue mayor al 15% en ninguno de los casos por lo tanto las soluciones estándar de paracetamol fueron estables durante 6 días. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 23-28.

Tabla 23 Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol 10 µg/mL Día 1

Muestra	Inyección	Área	T.R (min)	Simetría de Pico	Platos Teóricos
Estándar 10 µg/mL D1	1	169218	5.205	1.11	5303
Estándar 10 µg/mL D1	2	166116	5.201	1.12	5306
Estándar 10 µg/mL D1	3	167644	5.206	1.12	5326
Estándar 10 µg/mL D1	4	168479	5.204	1.11	5328
Estándar 10 µg/mL D1	5	165892	5.201	1.12	5326
Estándar 10 µg/mL D1	6	166469	5.207	1.12	5362
PROMEDIO		167303.000	5.204	5.204	5325.167
D.E.		1361.024	0.003	0.003	21.094
C.V. (%)		0.814	0.049	0.049	0.396

Tabla 24 Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol 10 µg/mL Día 6

Muestra	Inyección	Área	T.R (min)	Simetría de pico	Platos teóricos
Estándar 10 µg/mL D6	1	167144	5.203	1.12	5319
Estándar 10 µg/mL D6	2	165924	5.202	1.12	5323
Estándar 10 µg/mL D6	3	167452	5.200	1.13	5285
Estándar 10 µg/mL D6	4	166626	5.206	1.12	5329
Estándar 10 µg/mL D6	5	167335	5.203	1.11	5320
Estándar 10 µg/mL D6	6	165688	5.199	1.12	5317
PROMEDIO		166694.833	5.202	1.120	5315.500
D.E.		747.997	0.002	0.006	15.515
C.V. (%)		0.449	0.048	0.565	0.292
Desv. Abs. (%)		0.364	0.035	0.299	0.182

Tabla 25 Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol 100 µg/mL Día 1

Muestra	Inyección	Área	T.R (min)	Simetría de Pico	Platos Teóricos
Estándar 100 µg/mL D1	1	1676164	5.205	1.13	5375
Estándar 100 µg/mL D1	2	1730170	5.202	1.13	5320
Estándar 100 µg/mL D1	3	1721528	5.213	1.14	5357
Estándar 100 µg/mL D1	4	1673594	5.203	1.13	5390
Estándar 100 µg/mL D1	5	1686707	5.202	1.13	5324
Estándar 100 µg/mL D1	6	1706167	5.196	1.14	5321
PROMEDIO		1697632.600	5.205	1.133	5353.200
D.E.		26399.793	0.005	0.006	30.817
C.V. (%)		1.555	0.089	0.509	0.576

Tabla 26 Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol 100 µg/mL Día 6

Muestra	Inyección	Área	T.R (min)	Simetría de Pico	Platos Teóricos
Estándar 100 µg/mL D6	1	1725069	5.203	1.14	5336
Estándar 100 µg/mL D6	2	1711868	5.199	1.13	5302
Estándar 100 µg/mL D6	3	1700554	5.196	1.14	5354
Estándar 100 µg/mL D6	4	1705704	5.195	1.14	5331
Estándar 100 µg/mL D6	5	1709620	5.201	1.13	5311
Estándar 100 µg/mL D6	6	1700235	5.199	1.13	5306
PROMEDIO		1708841.667	5.199	1.135	5323.333
D.E.		9227.090	0.003	0.005	20.334
C.V. (%)		0.540	0.058	0.483	0.382
Desv. Abs. (%)		0.660	0.118	0.147	0.558

Tabla 27 Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol 1000 µg/mL Día 1

Muestra	Inyección	Área	T.R (min)	Simetría de Pico	Platos Teóricos
Estándar 1000 µg/mL D1	1	17056498	5.204	1.14	5324
Estándar 1000 µg/mL D1	2	17110759	5.201	1.14	5311
Estándar 1000 µg/mL D1	3	17098484	5.195	1.14	5307
Estándar 1000 µg/mL D1	4	17011127	5.193	1.14	5304
Estándar 1000 µg/mL D1	5	17157164	5.200	1.14	5282
Estándar 1000 µg/mL D1	6	17099053	5.196	1.13	5313
PROMEDIO		17088847.500	5.198	1.140	5306.833
D.E.		49862.288	0.004	0.000	13.963
C.V. (%)		0.292	0.080	0.000	0.263

Tabla 28 Estabilidad de las soluciones estándar de paracetamol 1000 µg/mL Día 6

Muestra	Inyección	Área	T.R (min)	Simetría de Pico	Platos Teóricos
Estándar 1000 µg/mL D6	1	18148513	5.202	1.15	5323
Estándar 1000 µg/mL D6	2	18092758	5.200	1.14	5294
Estándar 1000 µg/mL D6	3	18371569	5.194	1.14	5266
Estándar 1000 µg/mL D6	4	18331387	5.192	1.15	5300
Estándar 1000 µg/mL D6	5	18346647	5.197	1.14	5285
Estándar 1000 µg/mL D6	6	18284465	5.191	1.14	5268
PROMEDIO		18262556.500	5.196	1.143	5289.333
D.E.		114899.963	0.004	0.005	21.388
C.V. (%)		0.629	0.085	0.452	0.404
Desv. Abs. (%)		6.868	0.042	0.292	0.330

5.3 Etapa Clínica

5.3.1 Estadística demográfica descriptiva

De los voluntarios incluidos en este estudio se calcularon los siguientes parámetros: media, desviación estándar (Desv. Est), Mínimo (min), Mediana, Máximo (Max) y coeficiente de variación (C.V. %) de las variables demográficas de edad, peso, talla e índice de masa corporal (IMC). Los datos demográficos individuales se encuentran en el anexo II

Tabla 29 Estadística descriptiva de las variables demográficas

Variable	Género	N	Media	Desv. Est	Error Est	Min	Mediana	Max	CV%
Edad (años)	Hombres	23	29.39	6.68	1.39	19.00	28.00	46.00	22.73
	Mujeres	19	28.74	6.32	1.45	18.00	29.00	40.00	22.00
	Global	42	29.10	6.45	1.00	18.00	28.00	46.00	22.17
Peso (Kg)	Hombres	23	69.43	6.68	1.39	57.10	69.00	83.80	9.62
	Mujeres	19	57.68	4.91	1.13	50.30	56.80	71.00	8.52
	Global	42	64.12	8.34	1.29	50.30	62.75	83.80	13.01
Talla (cm)	Hombres	23	171.91	7.17	1.50	157.00	173.00	186.00	4.17
	Mujeres	19	156.79	4.84	1.11	149.00	157.00	170.00	3.09
	Global	42	165.07	9.79	1.51	149.00	163.00	186.00	5.93
IMC (Kg/m ²)	Hombres	23	23.53	2.16	0.45	19.08	23.99	26.70	9.17
	Mujeres	19	23.47	1.79	0.41	20.43	23.06	27.05	7.61
	Global	42	23.50	1.97	0.30	19.08	23.53	27.05	8.40

5.3.2 Estadística descriptiva de los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo

En la tabla 30 y 31 se presenta la estadística descriptiva para los datos promedio de concentración plasmática con respecto al tiempo de paracetamol para el tratamiento A2 (Medicamento de Referencia) y el tratamiento B (medicamento de prueba) respectivamente. Los datos individuales se presentan en el anexo III

Tabla 30 Estadística descriptiva para las concentraciones plasmáticas de paracetamol con respecto al tiempo para el tratamiento A2 (Medicamento de referencia de paracetamol)

Tiempo (h)	N	Media (µg/mL)	Desv. Est (µg/mL)	Error Est (µg/mL)	Min (µg/mL)	Mediana (µg/mL)	Max (µg/mL)	CV%
0	42	0.01	0.04	0.01	0.00	0.00	0.23	457.27
0.167	42	2.96	4.57	0.71	0.00	0.68	18.32	154.50
0.25	42	5.65	5.85	0.90	0.00	3.11	20.13	103.57
0.333	42	7.16	5.71	0.88	0.00	7.31	20.94	79.82
0.5	42	7.25	4.31	0.66	0.22	8.18	19.86	59.44
0.667	42	7.16	3.07	0.47	0.99	7.14	13.87	42.95
0.833	42	6.75	2.63	0.41	1.07	7.00	14.00	38.97
1	42	6.77	2.93	0.45	1.66	6.32	16.19	43.24
1.25	42	5.82	2.06	0.32	1.74	5.50	10.54	35.39
1.5	42	5.16	1.70	0.26	1.71	4.88	10.77	32.91
1.75	42	4.67	1.28	0.20	2.17	4.53	7.93	27.37
2	42	4.36	1.22	0.19	2.37	4.17	8.27	27.90
2.5	42	3.81	1.12	0.17	2.21	3.51	7.26	29.40
3	42	3.27	0.89	0.14	1.79	2.99	5.97	27.19
3.5	42	2.75	0.77	0.12	1.47	2.48	5.11	27.94
4	42	2.40	0.77	0.12	1.31	2.16	4.80	31.98
6	42	1.37	0.50	0.08	0.64	1.23	2.89	36.73
8	42	0.80	0.35	0.05	0.37	0.69	2.08	43.35
10	42	0.51	0.24	0.04	0.22	0.45	1.36	46.64
12	42	0.35	0.18	0.03	0.16	0.31	0.98	50.46
16	42	0.16	0.12	0.02	0.00	0.15	0.50	73.25

Tabla 31 Estadística descriptiva para las concentraciones plasmáticas de paracetamol con respecto al tiempo para el tratamiento B (Medicamento de prueba)

Tiempo (h)	N	Media (µg/mL)	Desv. Est (µg/mL)	Error Est (µg/mL)	Min (µg/mL)	Mediana (µg/mL)	Max (µg/mL)	CV%
0	42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.167	42	0.87	2.10	0.32	0.00	0.00	11.49	239.94
0.25	42	3.19	4.96	0.77	0.00	0.92	22.37	155.38
0.333	42	5.67	6.06	0.94	0.00	2.78	22.20	106.84
0.5	42	8.12	5.03	0.78	0.94	9.17	21.87	62.01
0.667	42	8.41	3.86	0.60	1.39	8.18	22.24	45.89
0.833	42	7.63	2.84	0.44	1.81	7.33	13.79	37.22
1	42	6.98	2.42	0.37	2.32	6.91	13.60	34.76
1.25	42	5.94	1.51	0.23	2.95	5.96	8.74	25.41
1.5	42	5.25	1.30	0.20	3.21	5.01	8.39	24.67
1.75	42	4.71	1.06	0.16	2.68	4.55	6.69	22.59
2	42	4.48	1.27	0.20	2.56	4.23	9.67	28.37
2.5	42	3.74	0.88	0.14	2.18	3.55	6.72	23.66
3	42	3.22	0.84	0.13	1.80	3.03	6.30	26.12
3.5	42	2.81	0.85	0.13	1.43	2.55	5.70	30.23
4	42	2.36	0.74	0.11	1.15	2.25	5.05	31.22
6	42	1.31	0.49	0.08	0.54	1.23	3.20	37.08
8	42	0.77	0.32	0.05	0.33	0.69	1.81	41.53
10	42	0.48	0.21	0.03	0.19	0.45	1.13	42.92
12	42	0.33	0.16	0.02	0.13	0.29	0.91	48.35
16	42	0.16	0.12	0.02	0.00	0.15	0.55	73.53

5.3.3 Concentración plasmática promedio con respecto al tiempo (escala normal y semilogarítmica)

Con la finalidad de visualizar las posibles diferencias entre los tratamientos se graficaron los perfiles promedios de concentración plasmática (\pm error estándar) con respecto al tiempo, obtenidos en los voluntarios participantes y en donde se puede observar que los perfiles del medicamento de referencia y prueba se superponen. En el anexo VII se presentan los perfiles farmacocinéticos comparativos para cada voluntario.

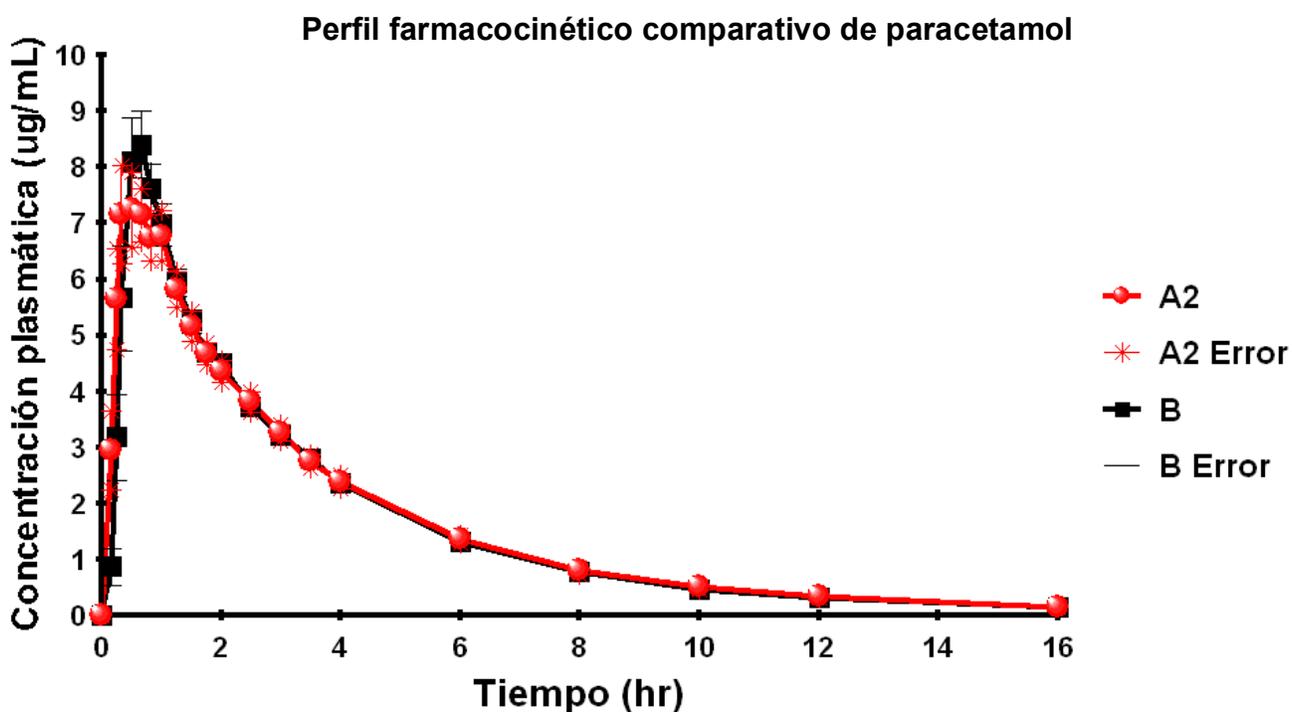


Figura 8 Perfil farmacocinético promedio de paracetamol \pm error estándar en escala normal (A2 medicamento de referencia, B medicamento de prueba)

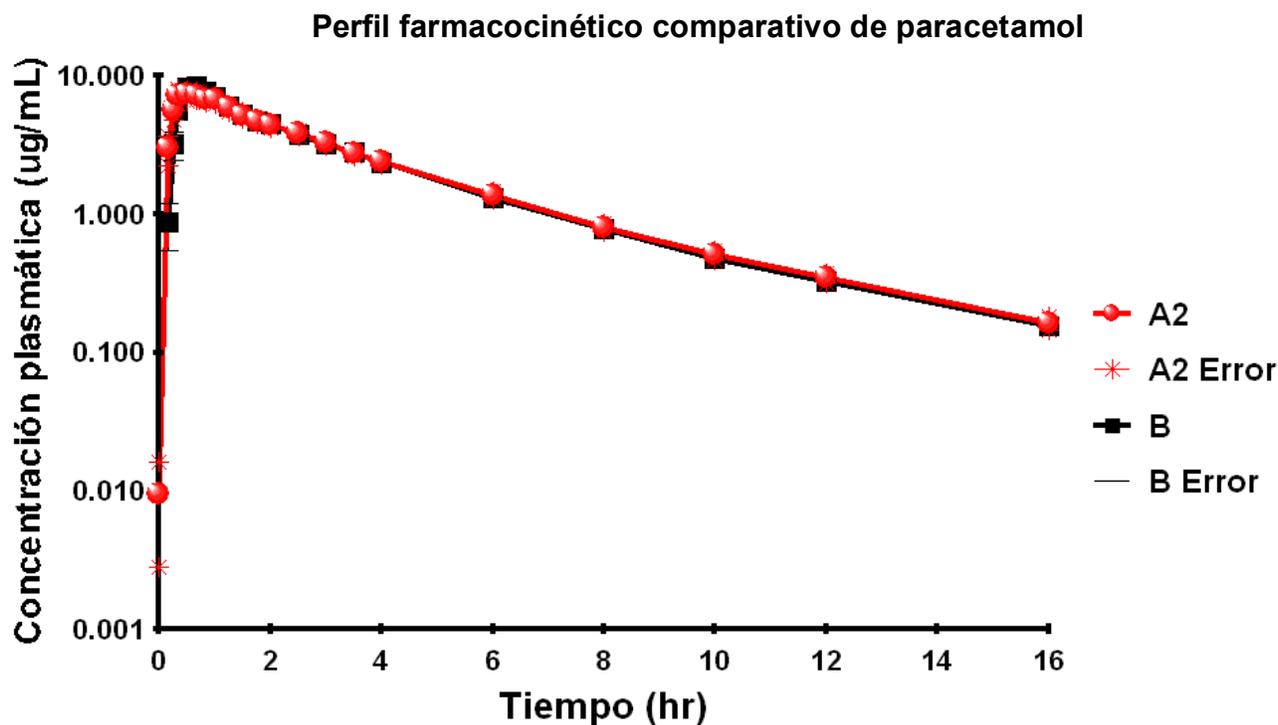


Figura 9 Perfil farmacocinético promedio de paracetamol \pm error estándar en escala semilogarítmica (A2 medicamento de referencia, B medicamento de prueba)

5.3.4 Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos fueron determinados a través de métodos no compartimentales (modelo independiente). La estadística descriptiva se presenta a continuación en la tabla 32 .en donde queda una vez más de manifiesto las similitudes en los parámetros de C_{max} y ABC promedio entre los tratamientos A2 y B.

Tabla 32 Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos de paracetamol por tratamiento (A2 Medicamento de referencia, B Medicamento de Prueba)

Variable	Tratamiento	N	Media	Desv. Est	Error Est	Min	Mediana	Max	C.V.%
Tmax (h)	A	42	0.75	0.74	0.11	0.17	0.50	4.00	98.53
	B	42	0.80	0.61	0.09	0.25	0.67	3.50	77.06
Cmax (µg/mL)	A	42	11.52	4.15	0.64	3.66	11.57	20.94	36.01
	B	42	12.06	4.58	0.71	4.50	11.65	22.37	37.93
ABCO-t (h*µg/mL)	A	42	26.78	6.15	0.95	18.37	25.26	44.54	22.98
	B	42	26.41	5.52	0.85	13.81	25.48	41.12	20.91
ABCO-inf (h*µg/mL)	A	42	27.89	6.63	1.02	18.92	26.49	47.47	23.78
	B	42	27.42	5.98	0.92	14.37	26.21	45.69	21.80
Constante de eliminación Ke (1/h)	A	42	0.203	0.050	0.008	0.111	0.203	0.289	24.55
	B	42	0.214	0.055	0.009	0.077	0.209	0.331	25.85
Vida Media de eliminación (h)	A	42	3.64	1.00	0.15	2.40	3.41	6.22	27.37
	B	42	3.53	1.28	0.20	2.10	3.31	9.04	36.18
TMR0-inf (h)	A	42	4.20	0.95	0.15	2.80	4.06	7.00	22.61
	B	42	4.13	0.91	0.14	2.82	3.93	6.75	22.16

5.4 Análisis de varianza (ANADEVA) y estadística de biodisponibilidad relativa

Para el análisis del efecto del periodo, secuencia y tratamiento, se utilizó el paquete computacional WinNonlin® versión 5.2.1. En la tabla 33 se presenta la prueba de ANADEVA para los parámetros farmacocinéticos en los que se basa la decisión de la posible similitud, es decir, ABCo-t, ABCo-inf y Cmax.

Tabla 33 Prueba de ANADEVa para paracetamol

Parámetro	Fuente de variación	Grados de libertad numerador	Grados de libertad denominador	F estadística	Valor de P
Ln(Cmax) (µg/mL)	Secuencia	5	38.4	0.56	0.7275
	Tratamiento	1	39.0	0.69	0.4109
	Periodo	2	39.0	0.99	0.3797
Ln(ABCo-t) (h*µg/mL)	Secuencia	5	36.7	1.34	0.2698
	Tratamiento	1	39.0	0.54	0.4649
	Periodo	2	39.0	0.68	0.5139
Ln(ABCo-inf) (h*µg/mL)	Secuencia	5	36.6	1.29	0.2896
	Tratamiento	1	39.0	0.93	0.3401
	Periodo	2	39.0	0.46	0.6322

Con base a la tabla anterior el análisis de varianza aplicado para la evaluación de paracetamol, no detectó efectos de la secuencia, tratamiento y periodo al evaluar los parámetros de Cmax, ABCo-t y ABCo-inf, todos ellos con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

5.4.1 Intervalos de confianza y pruebas límites para determinar la biodisponibilidad relativa promedio

En la tabla 34 se presentan los resultados de las pruebas estadísticas aplicadas a los parámetros farmacocinéticos de Cmax, ABCo-t y ABCo-inf de paracetamol, con la finalidad de evaluar las posibles diferencias entre los tratamientos, lo anterior aplicando un nivel de confianza del 90%.

Con los intervalos de confianza clásicos y de Westlake, se concluye a favor de la similitud ya que los límites calculados están incluidos en el intervalo preestablecido de 80 a 125 % para datos transformados logarítmicamente. Las pruebas límites de t doble unilateral, de Shuirmann y la prueba de Anderson Hauck concluyen a favor de la similitud ya que la probabilidad de que el cociente sea inferior a 80% y superior a 125 %, es menor a 0.05.

Tabla 34 Intervalos de confianza y pruebas límite para los parámetros farmacocinéticos de paracetamol transformados logarítmicamente (Tratamiento A2 vs Tratamiento B)

Parámetro farmacocinético	Promedio Referencia (A)*	Promedio Prueba (B)*	Relación de promedios [B/A] (%)	Intervalo de Confianza Clásico		Intervalo de Confianza de Westlake		T doble unilateral de Shuirmann		Prueba de Anderson Hauck	Potencia
				Inferior	Superior	Inferior	Superior	P < 80	P > 125		
Ln(Cmax)	10.7037	11.2310	104.93	95.18	115.67	86.81	113.19	0.0000	0.0022	0.0022	0.9820
Ln (ABCo-t)	26.1932	25.8816	98.81	96.15	101.55	96.70	103.30	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
Ln (ABCo-inf)	27.2555	26.8402	98.4895.18	95.87	101.15	96.44	103.56	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
Criterio				>80	<125	>80	<125	<0.05	<0.05	<0.05	>0.8

*Promedio geométrico por cuadrados mínimos

6. CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

Se optimizó un método analítico para cuantificar paracetamol en plasma empleando una técnica de precipitación de proteínas con evaporación, la cual es sencilla. El método analítico obtenido para cuantificar paracetamol en plasma fue validado de acuerdo a los parámetros de validación establecidos en la norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-1998 que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable

El método demostro ser:

- Lineal, preciso, exacto, repetible y reproducible en un rango de concentraciones de 0.1 a 40 µg/mL.
- Selectivo, al no presentarse interferencia al tiempo de retención de paracetamol.
- Exacto y repetible cuando se diluye la muestra utilizando un volumen de muestra de 100 µL.
- Exacto y repetible cuando se utilizan muestras plasmáticas lipemicas, hemolizadas o cambio de anticoagulante.

Las muestras plasmáticas de paracetamol demostraron ser:

- Estable a temperatura ambiente (24-27°C) en muestra plasmática durante 48 hrs.
- Estable en refrigeración (4-8 °C) en muestra plasmática durante 48 hrs.
- Estable a tres ciclos congelación-descongelación
- Estabilidad Largo Plazo durante 387 días
- La muestra procesada contenida en el automuestreador (10°C) fue estable por 72 horas.
- Recobro del 84 %.

- Estabilidad por 6 días de las soluciones estándar de paracetamol

Las pruebas estadísticas aplicadas sobre los parámetros farmacocinéticos de Cmax, ABC0-t y ABC0-inf no mostraron diferencias significativas, por lo que se concluye que la velocidad y

grado de absorción de paracetamol son semejantes, después de administrar una dosis oral única de 500 mg del medicamento de referencia de paracetamol (A2) y el Medicamento de prueba con la combinación fija de paracetamol y diclofenaco (B). Los resultados muestran que la farmacocinética del paracetamol no se ve afectada al combinarse con diclofenaco.

El método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar paracetamol en plasma que se optimizó y validó sirvió para evaluar la biodisponibilidad de paracetamol de una dosis oral única de 500 mg contenida en una formulación individual y en combinación fija con diclofenaco.

7. ANEXOS

7 ANEXOS

7.1 ANEXO I. Tabla de aleatorización.

T A B L A D E A L E A T O R I Z A C I Ó N	No. de voluntario	Fase I	Fase II	Fase III
	1	A1	A2	B
	2	A2	B	A1
	3	A2	A1	B
	4*	B	A1	A2
	5*	B	A2	A1
	6	A1	B	A2
	7	A1	B	A2
	8	A2	B	A1
	9	A1	B	A2
	10	B	A1	A2
	11*	B	A1	A2
	12	A1	A2	B
	13*	B	A1	A2
	14*	A1	A2	B
	15*	B	A2	A1
	16	A2	B	A1
	17*	B	A2	A1
	18	B	A2	A1
	19*	B	A1	A2
	20*	A1	B	A2
	21	A2	A1	B
	22	A1	B	A2
	23*	A2	A1	B
	24*	B	A2	A1
	25	A1	A2	B
	26	A2	A1	B
	27*	B	A2	A1
	28*	A2	A1	B
	29*	A1	A2	B
	30*	A1	B	A2
	31	A2	B	A1
	32	A2	B	A1
	33	A2	A1	B
	34	A2	B	A1
	35*	A2	B	A1
	36*	B	A1	A2
	37*	A1	A2	B
	38*	B	A1	A2
	39	A1	A2	B
	40	A2	A1	B
	41	B	A2	A1
42	A1	B	A2	

*Mujeres

A1 Medicamento de referencia de diclofenaco

A1 Medicamento de referencia de Paracetamol

B Medicamento de Prueba

7.2 ANEXO II .Datos demográficos de los participantes del estudio.

Sexo	Voluntario	Edad (años)	Peso (Kg)	Talla (cm)	IMC (Kg/m ²)
Hombres	1	31	65.5	164	24.35
	2	28	75.5	177	24.10
	3	19	67.7	169	23.70
	6	21	70.3	181	21.46
	7	25	71.3	180	22.01
	8	23	69.0	173	23.05
	9	33	62.0	157	25.15
	10	38	72.0	172	24.34
	12	24	70.7	174	23.35
	16	23	83.8	180	25.86
	18	28	60.0	171	20.52
	21	40	67.5	159	26.70
	22	28	57.1	173	19.08
	25	32	63.0	168	22.32
	26	46	68.8	162	26.22
	31	25	62.5	169	21.88
	32	24	61.6	168	21.83
	33	38	79.0	173	26.40
	34	25	76.0	178	23.99
	39	32	78.7	177	25.12
40	27	73.5	168	26.04	
41	32	68.0	186	19.66	
42	34	73.5	175	24.00	
Mujeres	4	29	57.2	158	22.91
	5	40	61.0	162	23.24
	11	25	55.4	155	23.06
	13	40	64.1	160	25.04
	14	35	60.1	157	24.38
	15	18	53.0	157	21.50
	17	19	51.0	158	20.43
	19	25	59.0	153	25.20
	20	21	56.8	158	22.75
	23	31	60.0	152	25.97
	24	33	63.3	170	21.90
	27	27	55.2	149	24.86
	28	30	57.5	155	23.93
	29	34	50.3	154	21.21
	30	33	55.5	158	22.23
	35	25	71.0	162	27.05
36	23	55.0	155	22.89	
37	31	54.0	157	21.91	
38	27	56.5	149	25.45	

7.3 ANEXO III Concentraciones plasmáticas de paracetamol para cada voluntario en los diferentes tiempos de muestreo para el tratamiento A2 (medicamento de referencia de paracetamol).

Tiempo Nominal (h)	Vol. 1 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 2 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 3 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 4 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 5 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 6 Conc. $\mu\text{g/mL}$
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.00	11.56	0.00	1.26	0.11	1.79
0.25	0.19	9.92	0.00	2.11	0.98	12.32
0.33	0.93	8.94	0.31	2.42	1.78	16.46
0.5	2.80	6.73	0.83	3.47	5.18	9.82
0.67	8.59	6.19	1.01	5.15	6.59	8.00
0.83	7.14	5.35	1.52	6.76	10.73	6.97
1	5.96	4.70	1.85	6.69	12.09	6.12
1.25	4.96	4.22	2.81	5.76	9.99	5.21
1.5	4.48	4.05	2.68	5.06	8.75	4.89
1.75	4.12	3.65	3.33	4.69	7.69	4.52
2	3.57	3.36	3.36	4.92	6.72	4.17
2.5	2.81	2.87	4.51	5.03	5.38	3.74
3	2.33	2.37	4.14	3.65	4.85	3.09
3.5	2.14	2.27	3.48	3.14	4.05	2.70
4	1.96	1.89	2.76	2.45	3.30	2.52
6	1.06	1.10	1.61	1.17	1.79	1.57
8	0.67	0.64	0.89	0.63	1.06	1.02
10	0.38	0.39	0.55	0.37	0.61	0.67
12	0.24	0.28	0.38	0.22	0.40	0.41
16	N.C	0.13	0.21	N.C	0.22	0.23

Tiempo Nominal (h)	Vol. 7 Conc. µg/mL	Vol. 8 Conc. µg/mL	Vol. 9 Conc. µg/mL	Vol. 10 Conc. µg/mL	Vol. 11 Conc. µg/mL	Vol. 12 Conc. µg/mL
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.00	11.65	1.68	18.32	7.67	6.03
0.25	1.76	19.32	5.92	20.13	4.74	12.52
0.33	3.26	20.94	11.72	16.47	10.64	12.70
0.5	5.34	9.99	11.70	10.98	10.35	8.54
0.67	11.59	8.11	9.90	8.39	8.63	6.37
0.83	8.94	6.37	7.95	7.06	7.35	5.57
1	6.14	5.72	6.65	6.31	6.43	4.99
1.25	5.75	4.52	5.70	5.25	5.64	4.39
1.5	5.26	3.90	5.16	4.59	5.34	3.85
1.75	5.16	3.70	4.54	4.31	4.67	3.75
2	4.60	3.19	4.19	3.95	4.23	3.27
2.5	3.64	2.83	3.71	2.85	3.56	2.98
3	3.07	2.45	3.33	2.87	3.03	2.37
3.5	2.63	1.98	2.96	2.42	2.39	2.27
4	2.15	1.69	2.51	2.09	2.37	2.04
6	1.45	1.09	1.36	1.08	1.05	1.21
8	0.79	0.63	0.83	0.70	0.62	0.78
10	0.47	0.39	0.49	0.40	0.34	0.51
12	0.43	0.32	0.30	0.26	0.26	0.35
16	0.23	0.14	0.13	0.11	0.14	0.18

Tiempo Nominal (h)	Vol. 13 Conc. µg/mL	Vol. 14 Conc. µg/mL	Vol. 15 Conc. µg/mL	Vol. 16 Conc. µg/mL	Vol. 17 Conc. µg/mL	Vol. 18 Conc. µg/mL
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.00	0.00	0.00	0.39	4.20	1.47
0.25	5.77	0.20	0.00	2.54	8.15	14.28
0.33	16.41	1.27	0.66	4.59	10.67	14.19
0.5	9.53	2.86	1.83	4.42	8.84	10.15
0.67	8.60	3.64	5.30	4.00	8.37	7.00
0.83	7.19	3.95	7.22	3.21	8.47	5.40
1	5.94	4.39	7.52	3.04	8.39	4.46
1.25	5.09	8.30	8.50	3.03	6.47	3.84
1.5	4.62	10.77	6.96	3.88	5.53	3.45
1.75	3.73	7.54	7.10	3.69	5.22	3.04
2	3.42	6.74	8.27	3.76	4.66	2.59
2.5	2.88	5.56	6.89	2.94	3.55	2.21
3	2.49	4.56	5.97	2.53	2.88	1.79
3.5	2.01	3.88	5.11	2.21	2.32	1.47
4	1.71	2.99	4.54	2.22	1.96	1.31
6	0.81	1.70	2.57	1.26	1.02	0.64
8	0.47	0.96	1.54	0.75	0.58	0.37
10	0.30	0.65	1.00	0.56	0.35	0.22
12	0.21	0.43	0.76	0.34	0.21	0.16
16	N.C	0.22	0.47	0.19	0.15	N.C

Tiempo Nominal (h)	Vol. 19 Conc. µg/mL	Vol. 20 Conc. µg/mL	Vol. 21 Conc. µg/mL	Vol. 22 Conc. µg/mL	Vol. 23 Conc. µg/mL	Vol. 24 Conc. µg/mL
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.37	5.10	0.00	0.11	0.00	11.41
0.25	2.27	9.74	0.00	0.65	0.44	14.06
0.33	3.74	12.18	0.00	1.79	2.42	11.71
0.5	9.22	11.74	0.22	3.03	4.92	8.97
0.67	11.48	10.07	1.49	3.56	7.06	7.74
0.83	7.97	8.66	1.07	6.66	7.73	6.71
1	6.83	8.21	16.19	12.74	7.03	6.32
1.25	6.34	7.35	9.94	7.81	5.19	5.37
1.5	5.40	6.46	6.20	5.68	4.99	4.83
1.75	4.70	5.94	4.72	4.27	4.60	4.53
2	4.39	5.54	4.17	3.75	4.26	4.07
2.5	3.48	4.49	3.32	2.92	3.87	3.38
3	2.96	3.84	2.87	2.73	3.37	2.90
3.5	2.32	3.41	2.38	2.44	2.53	2.47
4	2.04	2.97	2.11	2.18	2.16	1.95
6	1.07	1.87	1.33	1.26	1.03	1.07
8	0.51	1.12	0.69	0.66	0.52	0.63
10	0.32	0.75	0.46	0.38	0.29	0.41
12	0.18	0.53	0.25	0.23	0.18	0.27
16	N.C	0.26	0.13	0.10	0.12	0.14

Tiempo Nominal (h)	Vol. 25 Conc. µg/mL	Vol. 26 Conc. µg/mL	Vol. 27 Conc. µg/mL	Vol. 28 Conc. µg/mL	Vol. 29 Conc. µg/mL	Vol. 30 Conc. µg/mL
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.16	7.89	0.00	0.90	1.39	0.00
0.25	1.34	14.07	0.48	4.58	10.16	0.00
0.33	7.46	12.16	0.72	7.16	9.98	0.74
0.5	15.42	9.78	1.21	19.86	9.92	3.98
0.67	12.97	7.21	2.86	11.27	8.99	5.38
0.83	8.17	5.63	3.15	8.06	8.10	6.86
1	7.32	5.44	2.85	6.74	6.57	11.26
1.25	6.42	4.62	2.97	5.61	5.98	10.54
1.5	5.80	4.36	2.95	4.87	6.19	7.60
1.75	5.37	3.69	2.94	4.29	5.12	6.20
2	5.17	3.42	3.26	3.87	4.92	5.32
2.5	4.81	2.80	7.26	3.30	4.10	4.58
3	4.73	2.39	4.67	2.71	3.46	3.74
3.5	4.21	2.03	3.70	2.10	2.49	3.00
4	4.80	1.60	3.19	1.67	2.16	2.42
6	2.89	0.91	1.42	0.81	1.15	1.27
8	2.08	0.55	0.63	0.42	0.62	0.74
10	1.36	0.28	0.45	0.25	0.37	0.45
12	0.98	0.19	0.30	0.18	0.30	0.22
16	0.50	0.13	N.C	0.12	0.19	0.15

Tiempo Nominal (h)	Vol. 31 Conc. µg/mL	Vol. 32 Conc. µg/mL	Vol. 33 Conc. µg/mL	Vol. 34 Conc. µg/mL	Vol. 35 Conc. µg/mL	Vol. 36 Conc. µg/mL
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.68	12.70	0.00	1.07	5.38	9.13
0.25	2.69	14.63	0.64	2.53	6.93	12.83
0.33	3.18	12.37	2.36	3.68	8.97	10.42
0.5	5.62	8.75	4.43	4.03	7.71	9.34
0.67	7.47	6.63	4.85	4.13	7.92	8.54
0.83	8.83	5.11	4.22	6.08	7.04	7.84
1	9.12	5.22	4.92	5.61	7.18	6.99
1.25	7.13	4.41	4.08	5.44	5.85	5.55
1.5	4.49	4.21	3.16	4.40	5.44	5.18
1.75	4.89	3.45	3.66	3.96	5.02	4.65
2	4.60	3.63	3.31	3.80	4.52	4.41
2.5	3.43	2.93	3.90	3.14	3.77	3.39
3	3.30	2.62	3.40	2.73	3.18	2.63
3.5	2.69	2.15	2.57	2.42	2.52	2.14
4	2.36	1.84	2.21	2.04	1.90	1.80
6	1.42	1.00	1.67	1.35	1.05	0.74
8	0.84	0.58	0.79	0.84	0.56	0.46
10	0.46	0.35	0.61	0.51	0.40	0.31
12	0.31	0.24	0.52	0.37	0.31	0.20
16	0.14	N.C	0.31	0.16	0.17	N.C

Tiempo Nominal (h)	Vol. 37 Conc. µg/mL	Vol. 38 Conc. µg/mL	Vol. 39 Conc. µg/mL	Vol. 40 Conc. µg/mL	Vol. 41 Conc. µg/mL	Vol. 42 Conc. µg/mL
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.68	0.11	0.00	0.34	0.00	0.78
0.25	3.54	0.34	0.25	8.67	0.00	5.59
0.33	9.60	1.97	0.79	11.00	0.19	11.59
0.5	14.28	9.44	1.83	7.83	0.57	8.94
0.67	13.87	12.32	5.29	6.88	0.99	6.19
0.83	13.69	14.00	7.40	6.28	1.44	5.53
1	10.46	12.72	4.92	5.55	1.66	5.17
1.25	8.57	10.44	4.26	4.99	1.74	4.48
1.5	7.25	8.89	4.83	4.58	1.71	4.10
1.75	6.43	7.93	5.13	4.49	2.17	3.56
2	5.83	7.37	4.39	3.95	2.37	3.81
2.5	4.60	6.03	3.62	3.37	3.08	2.73
3	4.20	5.29	2.95	2.88	3.20	2.80
3.5	3.53	4.54	2.38	2.51	3.42	2.34
4	3.29	3.98	1.98	2.11	3.66	1.80
6	1.84	2.46	1.19	1.44	2.55	1.18
8	1.02	1.62	0.65	0.8	1.54	0.82
10	0.66	1.01	0.46	0.51	1.07	0.56
12	0.43	0.73	0.32	0.34	0.71	0.41
16	0.19	0.40	0.14	0.19	0.36	0.20

7.4 ANEXO IV Concentraciones plasmáticas de paracetamol para cada voluntario en los diferentes tiempos de muestreo para el tratamiento B (Medicamento de prueba)

Tiempo Nominal (h)	Vol. 1 Conc. µg/mL	Vol. 2 Conc. µg/mL	Vol. 3 Conc. µg/mL	Vol. 4 Conc. µg/mL	Vol. 5 Conc. µg/mL	Vol. 6 Conc. µg/mL
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.00	0.31	0.12	0.00	4.89	0.66
0.25	0.99	6.40	0.45	2.33	22.37	10.14
0.33	2.18	15.15	0.83	9.34	22.20	17.22
0.5	4.95	9.58	4.67	11.99	14.25	12.9
0.67	8.38	6.43	6.78	11.33	11.64	8.56
0.83	7.00	5.18	7.03	10.37	9.49	6.91
1	5.83	4.44	7.48	7.94	8.13	5.61
1.25	5.29	3.77	7.08	6.88	7.23	4.50
1.5	4.63	3.46	4.82	6.35	6.68	4.64
1.75	3.98	3.27	4.05	5.56	6.02	4.02
2	3.59	3.00	3.94	4.95	5.40	3.81
2.5	3.31	2.55	3.39	4.23	4.77	3.31
3	2.83	2.26	2.44	3.46	3.84	2.84
3.5	2.23	1.94	2.34	2.80	3.29	2.53
4	1.87	1.82	1.79	2.32	2.88	2.27
6	1.10	0.97	0.91	1.24	1.70	1.34
8	0.73	0.56	0.50	0.68	0.95	0.91
10	0.43	0.32	0.33	0.38	0.57	0.56
12	0.27	0.25	0.28	0.23	0.33	0.39
16	0.13	0.15	0.17	0.11	0.16	0.19

Tiempo Nominal (h)	Vol. 7 Conc. µg/mL	Vol. 8 Conc. µg/mL	Vol. 9 Conc. µg/mL	Vol. 10 Conc. µg/mL	Vol. 11 Conc. µg/mL	Vol. 12 Conc. µg/mL
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.25	0.00	2.49	0.38	0.00	0.13
0.25	0.44	0.18	4.47	5.12	0.00	15.92
0.33	0.47	0.87	7.25	9.90	0.46	13.41
0.5	1.37	2.25	12.32	19.25	2.17	9.99
0.67	5.19	2.37	8.15	11.70	4.69	7.38
0.83	4.72	3.21	7.30	9.21	3.92	5.90
1	5.77	4.07	6.58	7.24	7.87	5.22
1.25	7.39	3.90	5.70	6.08	8.66	4.68
1.5	6.52	3.49	5.20	5.25	8.39	4.06
1.75	4.87	3.31	4.83	4.62	6.63	4.02
2	4.60	9.67	4.47	4.20	5.53	3.47
2.5	3.57	4.57	3.90	3.55	4.75	3.10
3	3.14	3.40	3.50	2.94	3.70	2.70
3.5	2.58	3.16	3.09	2.42	3.17	2.44
4	2.15	2.31	2.72	2.30	2.55	2.03
6	1.25	1.40	1.62	1.31	1.19	1.22
8	0.76	0.81	1.01	0.75	0.64	0.71
10	0.49	0.45	0.55	0.54	0.30	0.44
12	0.33	0.38	0.36	0.35	0.20	0.37
16	0.15	0.14	0.14	0.13	0.17	0.28

Tiempo Nominal (h)	Vol. 13 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 14 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 15 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 16 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 17 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 18 Conc. $\mu\text{g/mL}$
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.25	0.00	0.14	0.20	1.32	0.59	0.88
0.33	0.23	0.49	0.64	5.84	2.89	2.46
0.5	1.17	1.57	2.23	3.69	6.24	4.20
0.67	1.97	1.39	3.53	6.44	7.97	5.65
0.83	8.51	1.81	3.76	4.64	7.71	6.12
1	13.60	2.32	4.69	4.11	7.17	4.71
1.25	8.24	3.64	6.15	3.74	7.48	3.83
1.5	5.88	4.29	5.90	3.64	7.37	3.21
1.75	5.12	4.58	5.97	3.66	6.69	2.68
2	4.34	4.25	6.93	3.52	5.67	2.56
2.5	3.78	4.84	6.72	3.08	4.62	2.18
3	2.69	4.85	6.30	2.87	3.90	1.80
3.5	2.26	5.38	5.70	2.58	3.13	1.43
4	1.79	4.11	5.05	2.26	2.69	1.15
6	0.79	2.04	3.20	1.27	1.52	0.54
8	0.39	1.15	1.74	0.81	0.83	0.33
10	0.25	0.69	1.13	0.53	0.48	0.19
12	0.24	0.44	0.77	0.38	0.30	0.13
16	N.C	0.21	0.53	0.21	0.16	N.C

Tiempo Nominal (h)	Vol. 19 Conc. µg/mL	Vol. 20 Conc. µg/mL	Vol. 21 Conc. µg/mL	Vol. 22 Conc. µg/mL	Vol. 23 Conc. µg/mL	Vol. 24 Conc. µg/mL
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.28
0.25	0.39	0.27	0.00	0.14	0.11	3.24
0.33	1.07	0.99	0.00	1.06	0.73	8.68
0.5	4.47	3.95	0.94	6.24	12.58	11.37
0.67	6.47	6.76	22.24	14.27	12.34	8.40
0.83	10.35	7.36	13.60	12.91	8.51	7.09
1	12.99	8.03	8.42	8.84	9.17	6.28
1.25	7.21	8.74	5.98	5.64	6.45	4.94
1.5	5.66	8.04	4.63	4.57	5.01	4.72
1.75	6.26	6.69	4.03	4.07	4.02	4.31
2	5.35	5.96	3.77	3.53	3.59	3.86
2.5	5.11	4.71	3.15	2.88	2.83	3.42
3	3.91	4.05	2.74	2.85	2.49	2.93
3.5	3.30	3.33	2.51	2.19	2.20	2.50
4	2.86	2.94	2.02	2.02	1.90	1.98
6	1.53	1.72	0.99	1.14	0.79	1.08
8	0.86	0.94	0.64	0.67	0.39	0.64
10	0.51	0.61	0.42	0.31	0.24	0.33
12	0.28	0.36	0.26	0.26	0.14	0.14
16	N.C	0.22	0.12	0.11	N.C	N.C

Tiempo Nominal (h)	Vol. 25 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 26 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 27 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 28 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 29 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 30 Conc. $\mu\text{g/mL}$
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.00	4.58	3.65	0.11	0.70	0.00
0.25	0.10	5.14	9.88	0.96	1.95	0.00
0.33	1.72	7.76	11.65	7.08	5.05	0.15
0.5	21.87	11.83	11.71	10.89	11.33	1.59
0.67	10.62	7.00	10.86	11.54	10.47	7.57
0.83	8.58	5.89	9.84	8.47	8.47	11.60
1	7.39	4.92	8.54	7.60	7.31	11.52
1.25	6.76	4.69	6.53	6.69	6.51	8.34
1.5	5.19	3.83	6.39	6.42	5.77	7.05
1.75	5.27	3.39	5.41	5.55	5.09	5.74
2	5.51	3.11	4.61	4.75	4.44	5.33
2.5	4.59	2.55	3.95	3.53	3.75	4.21
3	4.34	2.09	3.06	3.06	3.12	3.20
3.5	4.29	1.81	2.57	2.73	2.97	3.14
4	3.77	1.54	2.23	2.25	2.26	2.34
6	2.58	0.79	1.15	1.04	1.20	1.30
8	1.81	0.43	0.57	0.55	0.58	0.74
10	1.11	0.26	0.38	0.33	0.35	0.48
12	0.91	0.15	0.24	0.19	0.24	0.30
16	0.55	0.12	0.14	N.C	0.15	0.14

Tiempo Nominal (h)	Vol. 31 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 32 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 33 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 34 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 35 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 36 Conc. $\mu\text{g/mL}$
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	2.23	2.64	1.52	0.00	0.00	11.49
0.25	4.56	10.10	7.74	0.22	1.08	12.37
0.33	6.48	19.80	11.23	1.20	2.67	10.56
0.5	10.15	12.82	10.14	5.62	13.12	10.08
0.67	9.52	8.20	7.01	6.24	10.30	8.97
0.83	8.73	6.45	5.94	6.42	7.98	7.53
1	7.17	5.60	5.23	5.80	6.32	6.65
1.25	5.45	4.47	4.42	5.29	5.95	5.82
1.5	4.59	4.01	3.87	5.10	5.01	5.04
1.75	4.02	3.54	3.63	4.52	4.59	4.76
2	3.73	3.54	2.91	4.02	4.11	4.55
2.5	3.17	2.98	3.12	3.54	3.49	3.56
3	2.76	2.30	2.79	3.12	3.09	2.71
3.5	2.33	1.99	2.34	2.66	2.31	2.29
4	2.05	1.18	2.05	2.27	2.25	2.00
6	1.25	0.87	1.16	1.24	1.00	0.99
8	0.63	0.48	0.67	0.87	0.58	0.58
10	0.45	0.29	0.43	0.51	0.42	0.36
12	0.27	0.17	0.33	0.37	0.27	0.23
16	0.17	N.C	0.25	0.16	0.13	0.10

Tiempo Nominal (h)	Vol. 37 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 38 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 39 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 40 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 41 Conc. $\mu\text{g/mL}$	Vol. 42 Conc. $\mu\text{g/mL}$
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.17	0.00	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00
0.25	2.21	1.45	0.00	0.14	0.00	0.14
0.33	6.33	4.35	0.26	16.51	0.00	1.21
0.5	9.83	8.75	8.49	10.39	1.32	6.70
0.67	10.95	15.37	9.39	7.30	2.07	9.75
0.83	13.79	13.50	7.09	6.33	2.73	8.59
1	10.39	10.58	5.87	5.38	2.64	7.60
1.25	7.90	8.24	6.26	4.94	2.95	5.25
1.5	6.84	7.56	4.54	4.30	3.93	4.86
1.75	6.28	6.65	4.04	3.86	4.06	4.24
2	5.99	6.07	3.85	3.68	4.50	3.57
2.5	4.66	4.86	3.04	2.95	4.09	2.75
3	4.00	4.63	2.37	2.76	4.24	3.01
3.5	3.46	4.04	2.14	2.47	3.70	2.33
4	2.84	3.50	1.85	2.09	3.30	1.75
6	1.48	1.60	0.99	1.36	2.14	1.08
8	0.79	1.37	0.61	0.84	1.40	0.67
10	0.51	0.84	0.37	0.55	0.89	0.53
12	0.35	0.63	0.26	0.35	0.62	0.37
16	0.19	0.31	0.12	0.16	0.28	0.17

7.5 ANEXO V Parámetros farmacocinéticos de paracetamol obtenidos para cada voluntario tratamiento A2 (Medicamento de referencia)

Vol.	Tmax (h)	Cmax (µg/mL)	ABC _{0-t} (h*µg/mL)	ABC _{0-inf} (h*µg/mL)	Ke (1/h)	T _{1/2} (h)	TMR _{0-inf} (h)
1	0.67	8.59	19.74	20.67	0.26	2.67	3.89
2	0.17	11.56	23.12	23.85	0.18	3.83	3.87
3	2.50	4.51	21.58	22.92	0.16	4.41	5.80
4	0.83	6.76	23.78	24.62	0.26	2.64	3.65
5	1.00	12.09	35.51	36.78	0.17	4.07	4.27
6	0.33	16.46	30.07	31.16	0.21	3.35	4.29
7	0.67	11.59	26.42	27.42	0.23	2.98	4.41
8	0.33	20.94	26.38	27.06	0.21	3.30	3.42
9	0.33	11.72	28.56	29.13	0.22	3.10	3.68
10	0.25	20.13	28.80	29.35	0.21	3.31	3.16
11	0.33	10.64	26.41	27.31	0.15	4.58	3.73
12	0.33	12.70	24.81	25.82	0.18	3.94	4.25
13	0.33	16.41	21.83	22.84	0.21	3.36	3.26
14	1.50	10.77	31.12	32.34	0.18	3.80	4.65
15	1.25	8.50	40.89	44.60	0.13	5.49	6.14
16	0.33	4.59	20.61	21.54	0.21	3.33	4.99
17	0.33	10.67	26.22	26.75	0.28	2.51	3.31
18	0.25	14.28	18.37	18.92	0.29	2.40	2.80
19	0.67	11.48	23.56	24.24	0.26	2.63	3.19
20	0.33	12.18	35.92	37.38	0.18	3.90	4.37
21	1.00	16.19	23.52	24.04	0.25	2.80	4.05
22	1.00	12.74	23.24	23.62	0.27	2.62	3.75
23	0.83	7.73	22.41	22.81	0.29	2.40	3.60
24	0.25	14.06	26.62	27.40	0.18	3.77	3.58
25	0.50	15.42	44.49	47.47	0.17	4.14	5.74
26	0.25	14.07	22.94	23.43	0.27	2.58	3.26
27	2.50	7.26	22.46	24.06	0.19	3.70	4.70
28	0.50	19.86	24.35	25.47	0.11	6.22	3.69
29	0.25	10.16	27.61	29.28	0.11	6.11	4.45
30	1.00	11.26	27.81	28.34	0.28	2.50	3.71

Vol.	Tmax (h)	Cmax ($\mu\text{g/mL}$)	ABC_{0-t} ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$)	ABC_{0-inf} ($\text{h}\cdot\mu\text{g/mL}$)	Ke (1/h)	T_{1/2} (h)	TMR_{0-inf} (h)
31	1.00	9.12	26.45	27.18	0.20	3.53	4.08
32	0.25	14.63	23.47	24.31	0.28	2.47	3.13
33	1.00	4.92	23.59	26.23	0.12	5.96	6.59
34	0.83	6.08	22.74	23.46	0.22	3.16	4.54
35	0.40	8.97	25.82	26.96	0.15	4.69	4.07
36	0.25	12.83	24.34	25.29	0.21	3.29	3.02
37	0.50	14.28	37.51	38.40	0.21	3.29	3.81
38	0.83	14.00	44.54	47.17	0.15	4.52	5.08
39	0.83	7.40	21.56	22.25	0.20	3.45	4.45
40	0.33	11.00	25.72	26.88	0.16	4.26	4.47
41	4.00	3.66	25.78	27.77	0.18	3.82	7.00
42	0.33	11.59	23.92	25.08	0.18	3.96	4.65

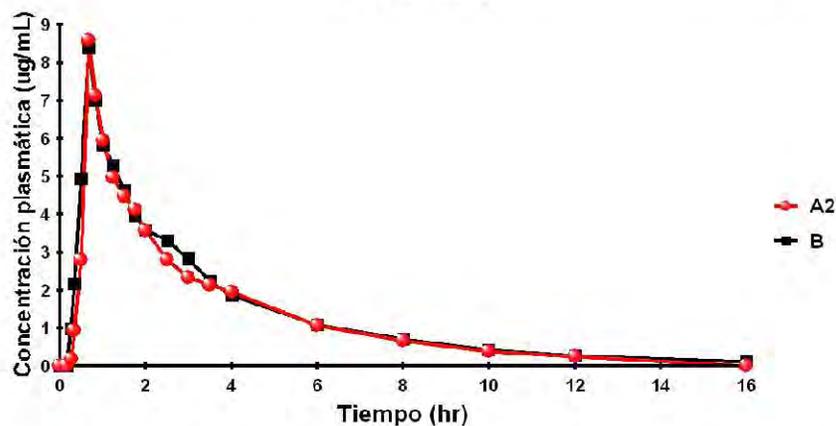
7.6 ANEXO VI Parámetros farmacocinéticos de paracetamol obtenidos para cada voluntario tratamiento B (Medicamento de prueba)

Vol.	Tmax (h)	Cmax (µg/mL)	ABC _{0-t} (h*µg/mL)	ABC _{0-inf} (h*µg/mL)	Ke (1/h)	T _{1/2} (h)	TMR _{0-inf} (h)
1	0.67	8.38	21.87	22.45	0.22	3.10	4.11
2	0.33	15.15	20.93	22.11	0.13	5.46	4.44
3	1.00	7.48	21.22	22.81	0.11	6.37	5.01
4	0.50	11.99	28.82	29.31	0.21	3.26	3.36
5	0.25	22.37	37.12	37.75	0.25	2.74	3.35
6	0.33	17.22	27.90	28.95	0.18	3.83	4.21
7	1.25	7.39	23.24	23.99	0.20	3.51	4.45
8	2.00	9.67	23.77	24.40	0.23	3.03	4.54
9	0.50	12.32	29.52	30.07	0.25	2.74	3.91
10	0.50	19.25	29.31	29.85	0.24	2.89	3.55
11	1.25	8.66	25.68	26.23	0.30	2.31	3.78
12	0.25	15.92	25.55	29.19	0.08	9.04	6.75
13	1.00	13.60	20.94	21.66	0.33	2.10	3.26
14	3.50	5.38	28.23	29.27	0.20	3.47	5.23
15	2.00	6.93	40.95	43.50	0.21	3.36	5.83
16	0.67	6.44	22.11	23.52	0.15	4.59	5.31
17	0.67	7.97	29.16	29.74	0.28	2.50	3.89
18	0.83	6.12	13.81	14.37	0.24	2.94	3.37
19	1.00	12.99	29.00	29.94	0.29	2.37	3.63
20	1.25	8.74	30.71	31.65	0.24	2.92	4.31
21	0.67	22.24	24.79	25.37	0.21	3.28	3.65
22	0.67	14.27	24.19	24.62	0.26	2.69	3.57
23	0.50	12.58	21.93	22.49	0.25	2.74	2.93
24	0.50	11.37	23.26	23.69	0.32	2.15	3.11
25	0.50	21.87	41.12	45.69	0.12	5.80	6.54
26	0.50	11.83	20.09	20.53	0.27	2.56	3.30
27	0.50	11.71	29.00	29.77	0.18	3.90	3.42
28	0.67	11.54	25.63	26.38	0.26	2.68	3.14
29	0.50	11.33	26.47	27.50	0.14	4.90	3.94
30	0.83	11.60	27.58	28.29	0.20	3.39	3.93

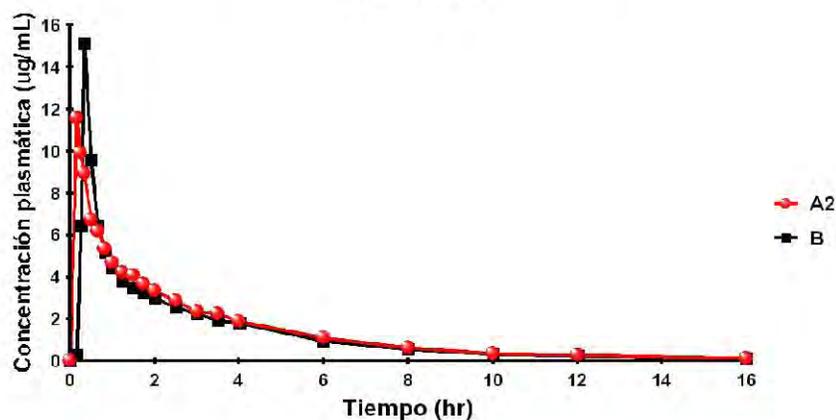
Vol.	Tmax (h)	Cmax (µg/mL)	ABC_{0-t} (h*µg/mL)	ABC_{0-inf} (h*µg/mL)	Ke (1/h)	T_{1/2} (h)	TMR_{0-inf} (h)
31	0.50	10.15	25.09	25.78	0.24	2.88	3.81
32	0.33	19.80	22.26	22.90	0.26	2.64	2.82
33	0.33	11.23	23.92	25.09	0.21	3.26	4.40
34	0.83	6.42	23.86	24.65	0.21	3.38	4.50
35	0.50	13.12	24.72	25.43	0.19	3.72	3.80
36	0.25	12.37	26.74	27.25	0.21	3.38	3.21
37	0.83	13.79	33.00	34.22	0.16	4.36	4.01
38	0.67	15.37	38.33	40.16	0.17	4.10	4.68
39	0.67	9.39	21.62	22.22	0.19	3.57	3.94
40	0.33	16.51	25.41	26.19	0.21	3.35	4.17
41	2.00	4.50	27.42	28.76	0.21	3.34	5.85
42	0.67	9.75	23.07	23.97	0.19	3.66	4.39

7.7 ANEXO VII Perfiles farmacocinéticos comparativos de concentración plasmática en escala normal con respecto al tiempo para cada voluntario.

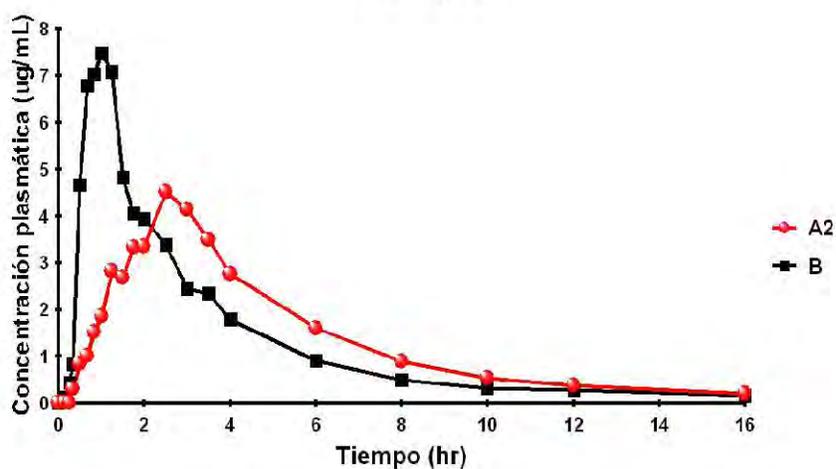
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=1



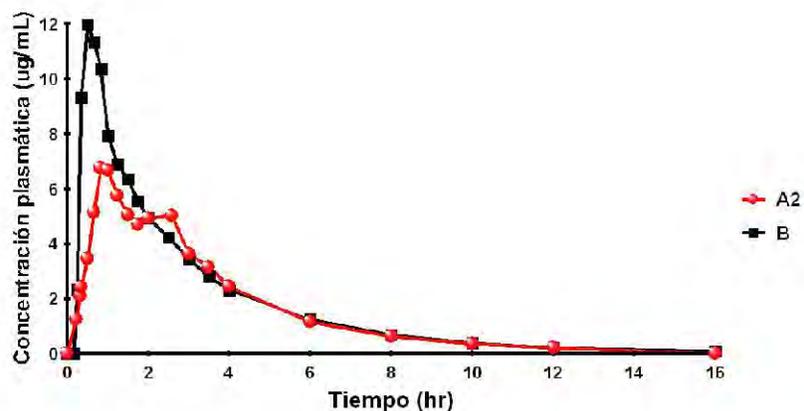
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=2



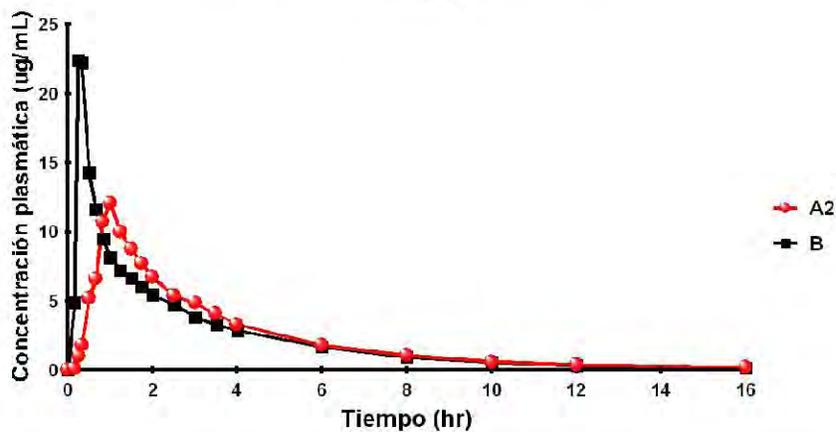
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=3



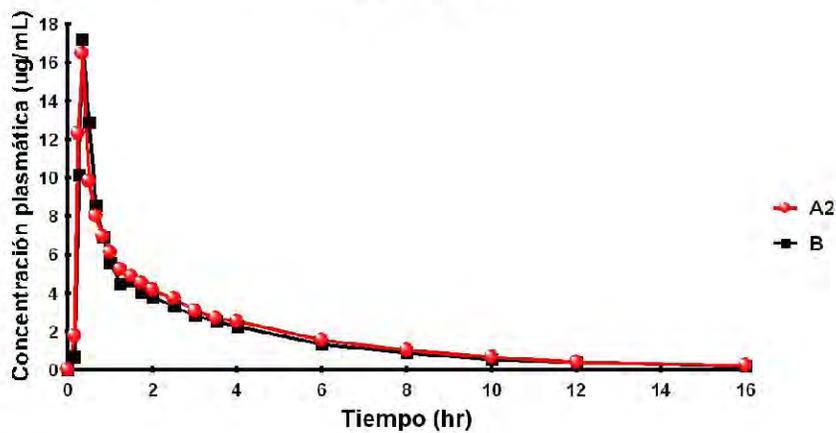
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=4



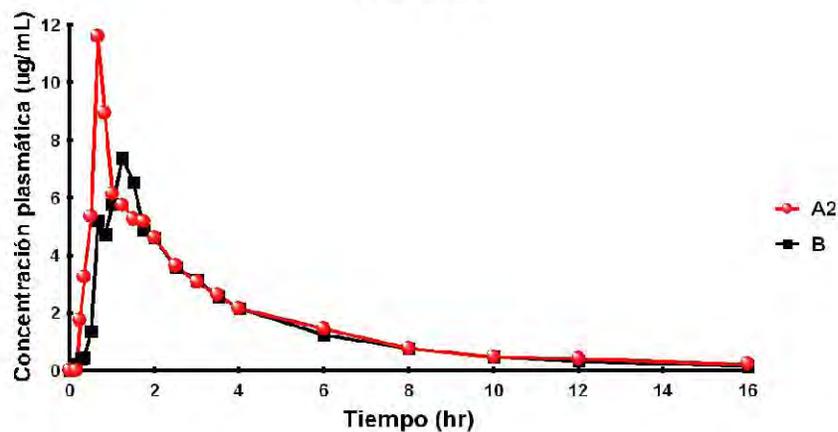
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=5



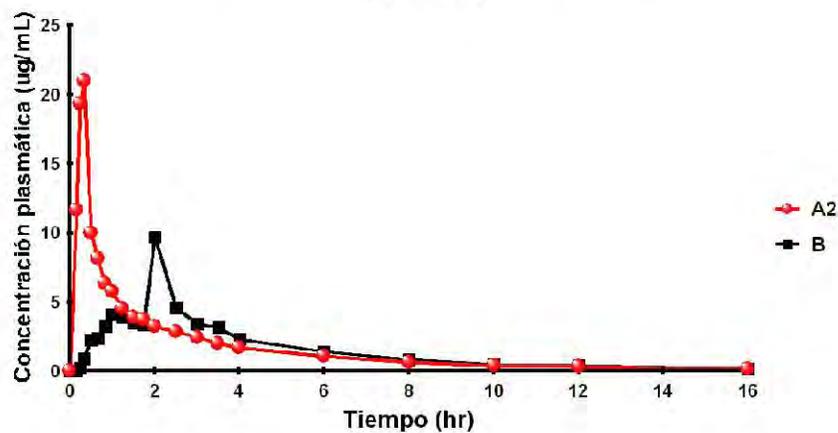
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=6



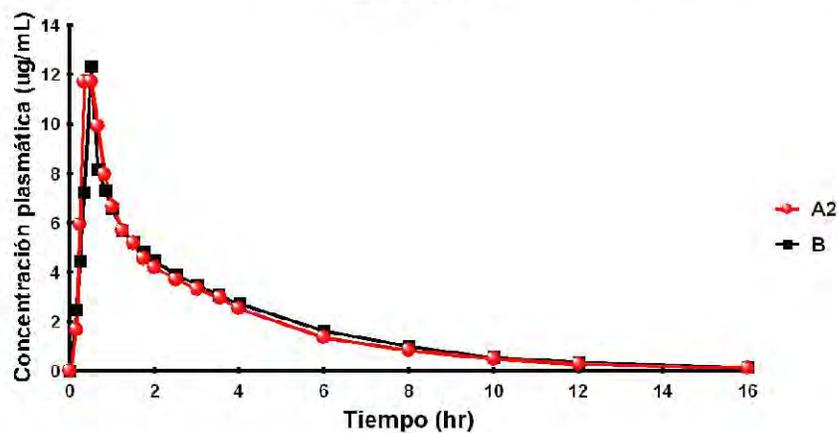
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=7



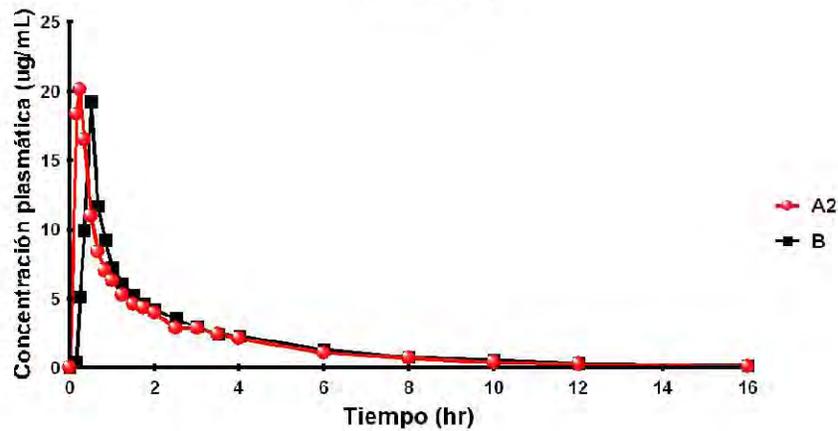
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=8



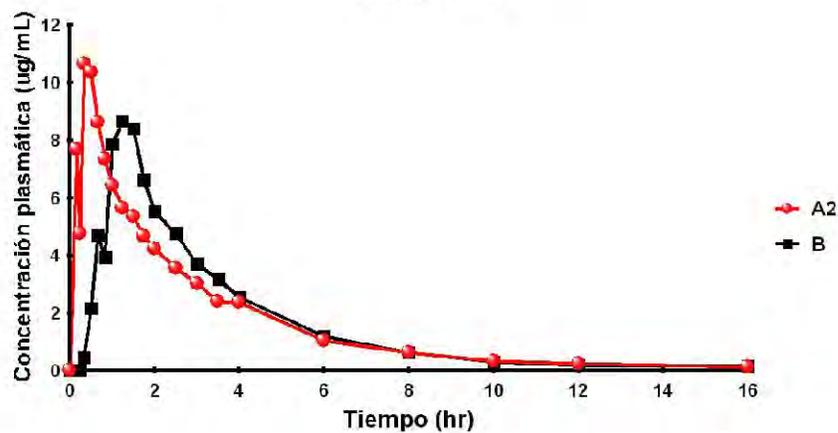
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=9



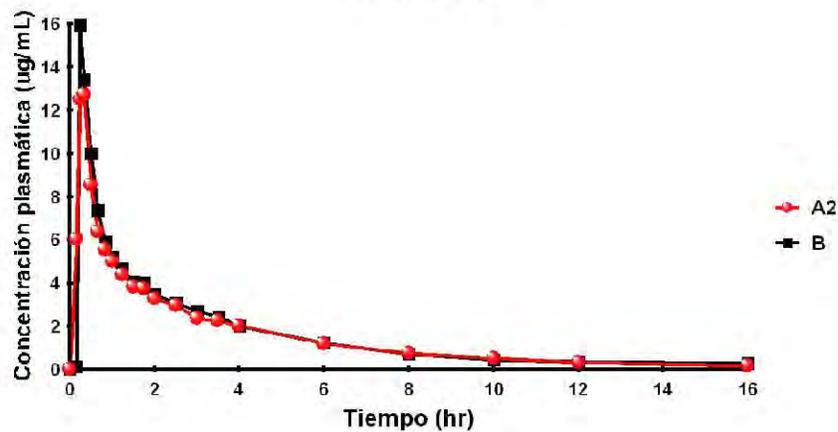
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=10



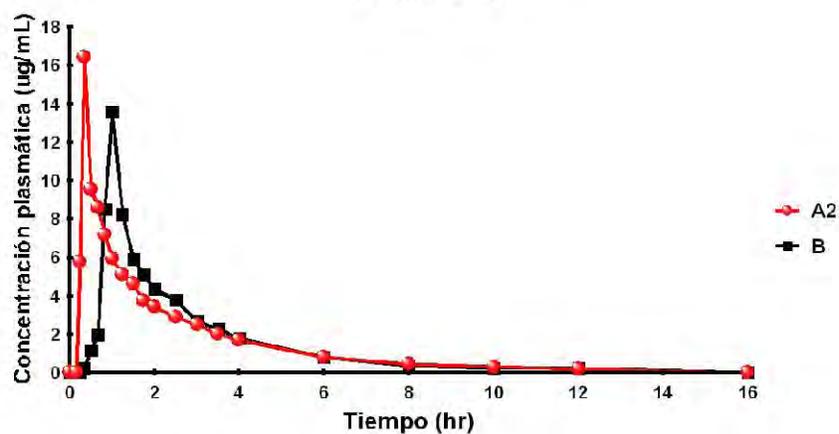
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=11



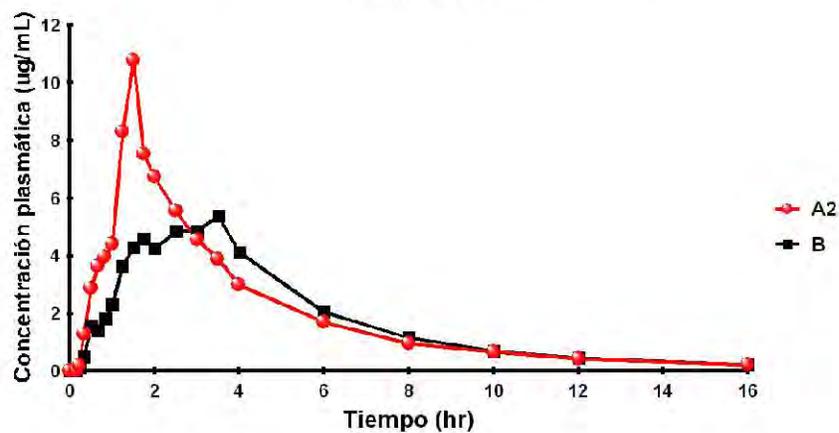
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=12



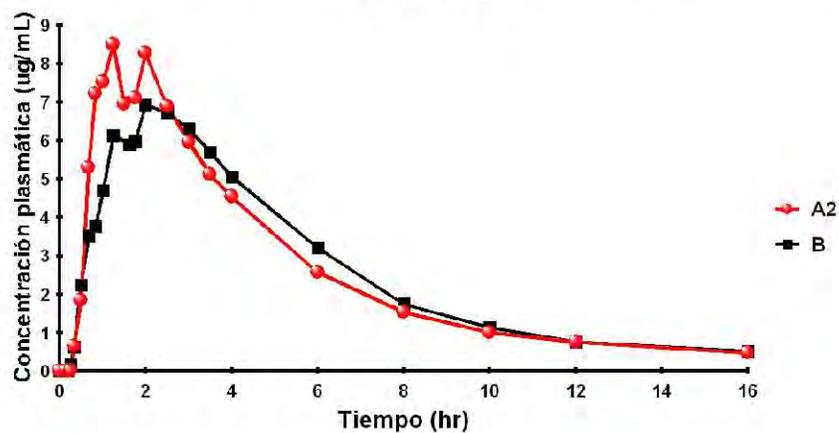
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=13



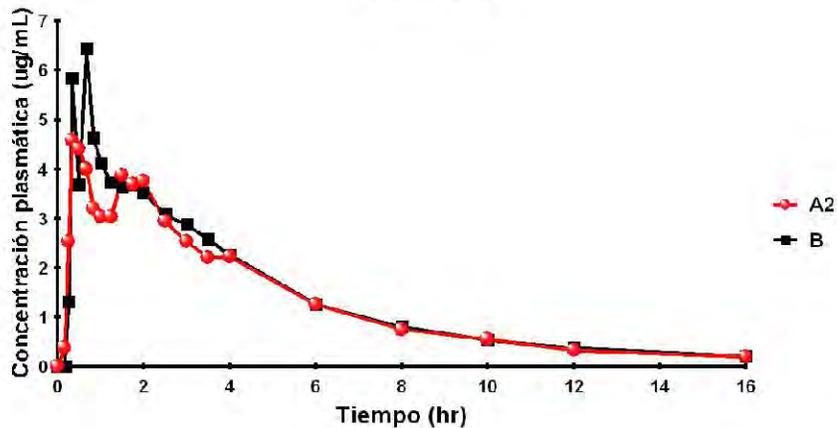
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=14



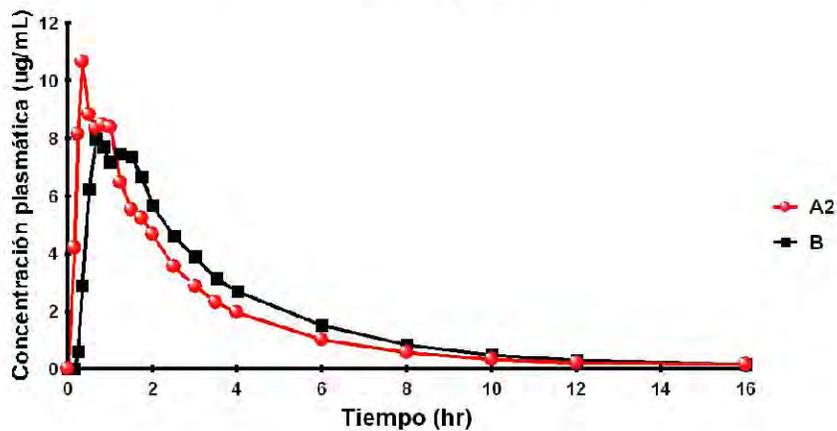
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=15



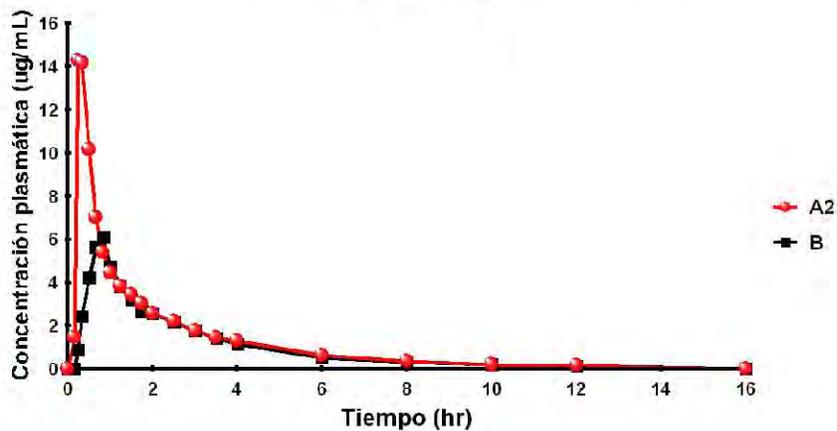
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=16



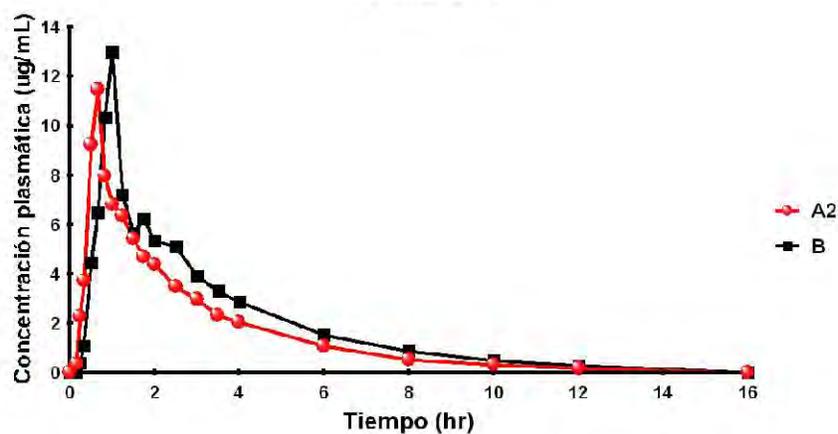
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=17



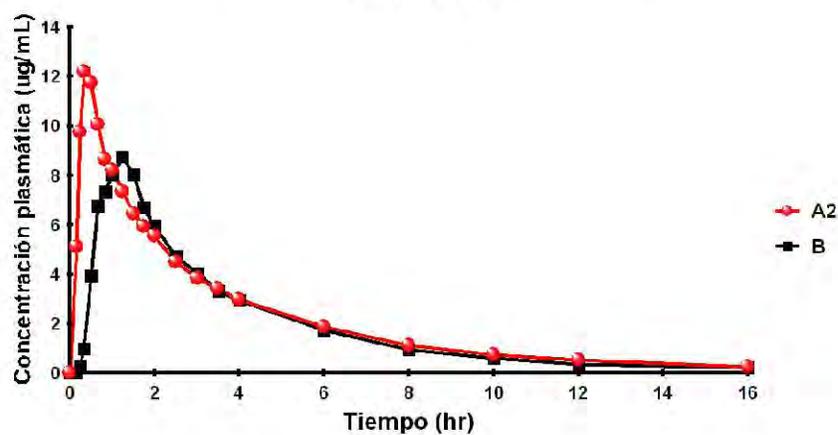
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=18



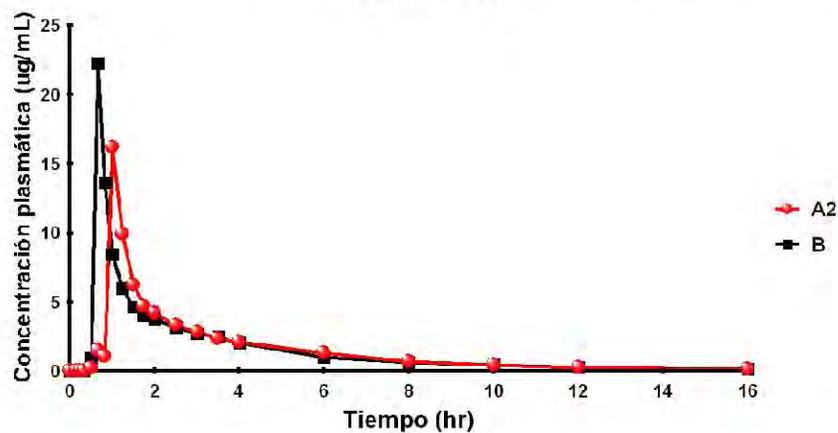
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=19



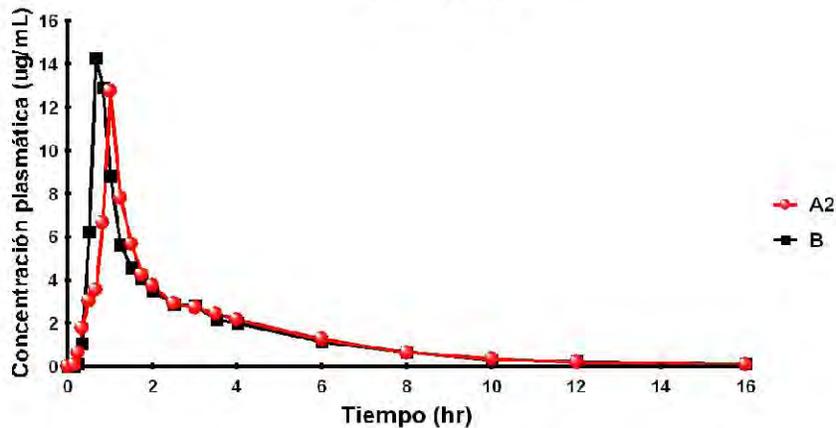
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=20



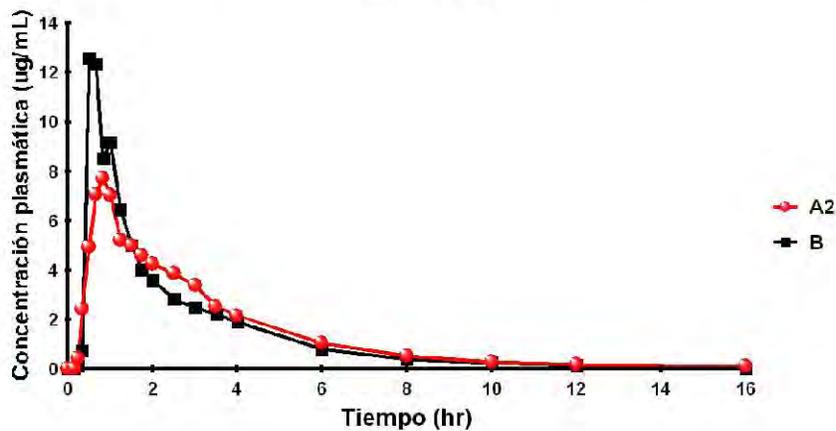
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=21



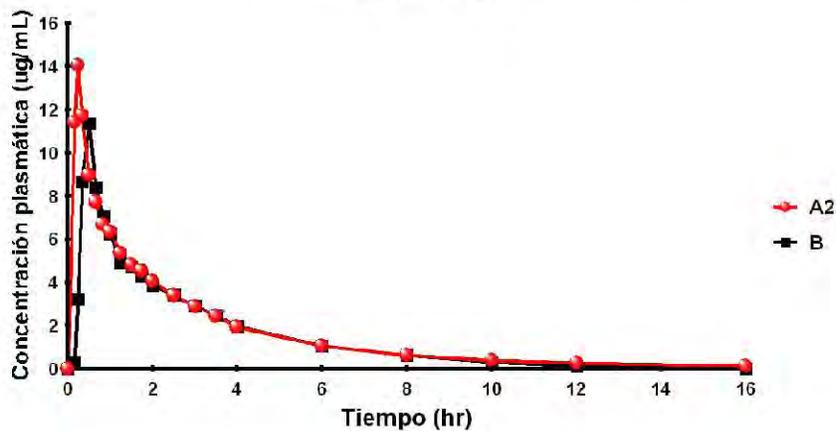
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=22



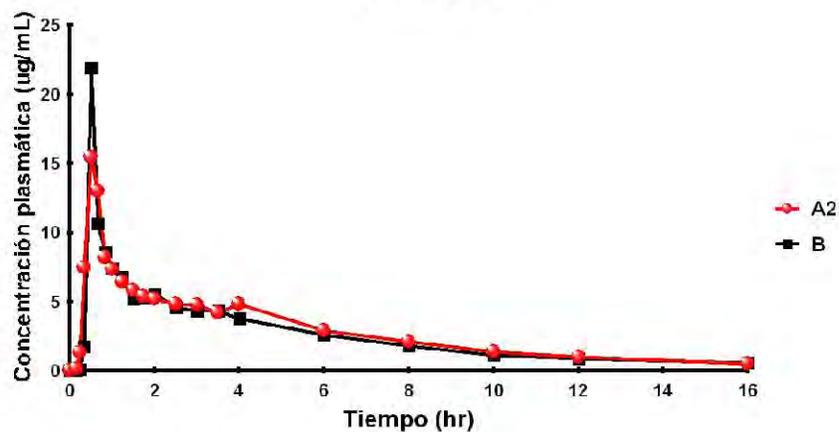
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=23



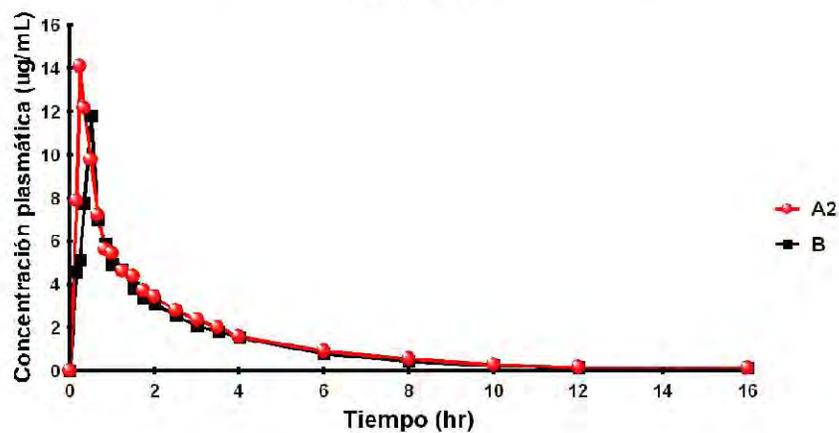
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=24



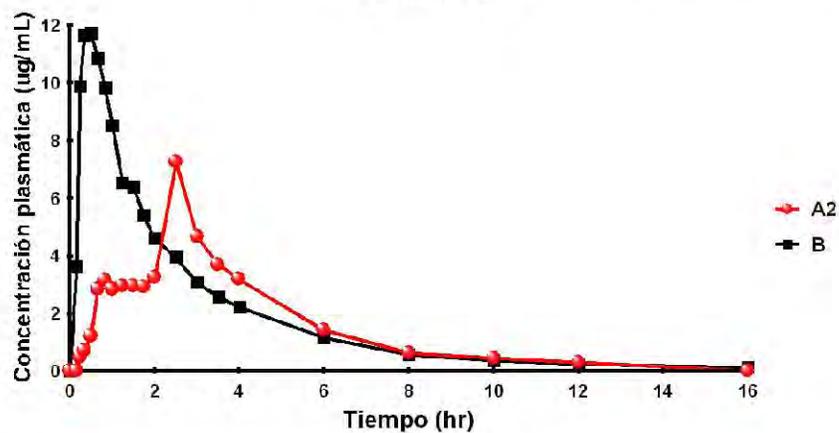
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=25



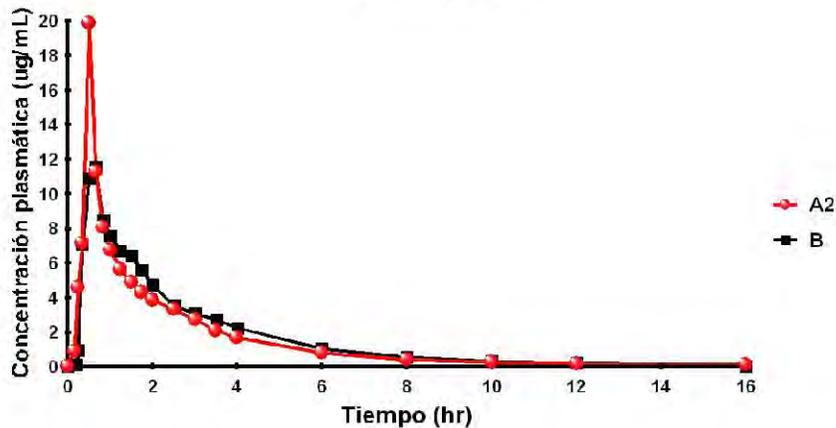
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=26



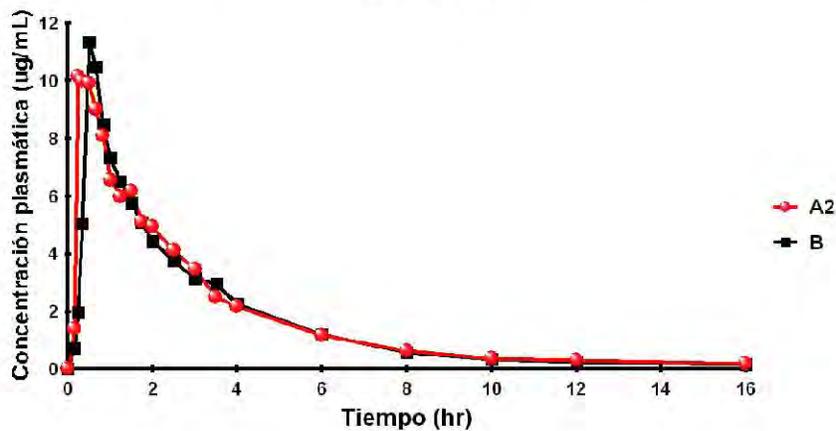
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=27



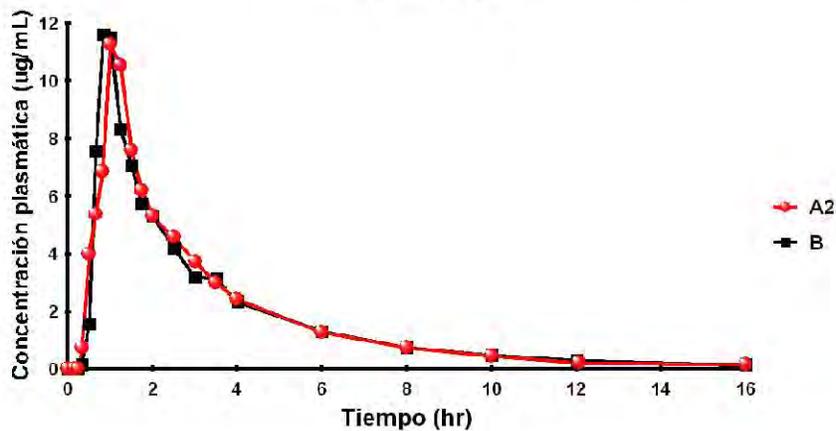
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=28



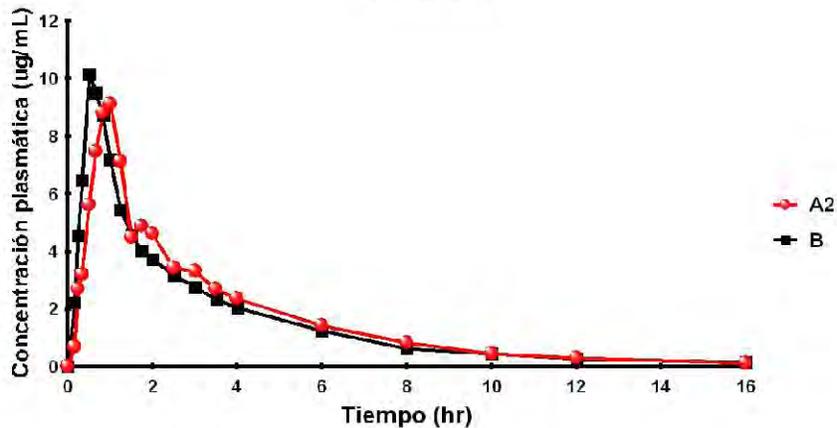
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=29



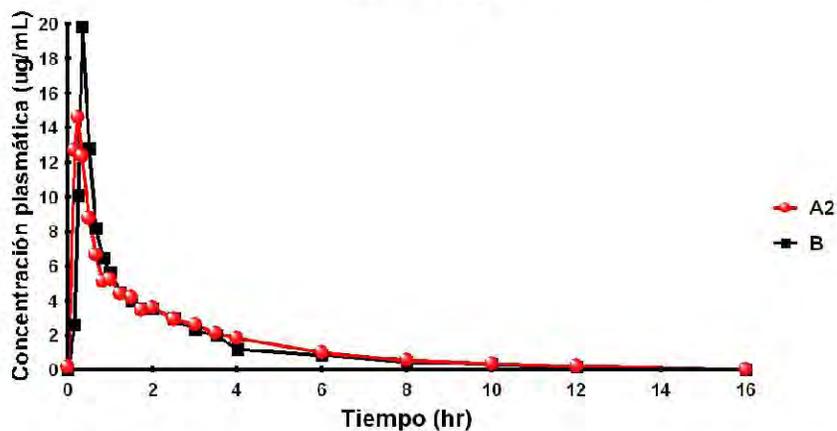
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=30



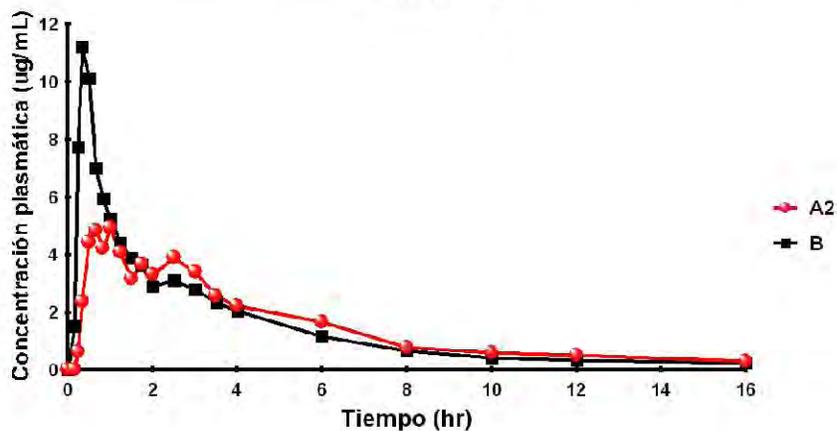
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=31



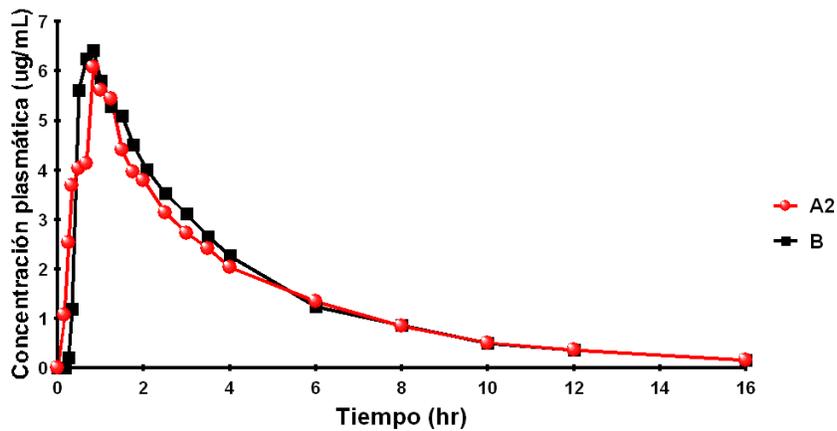
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=32



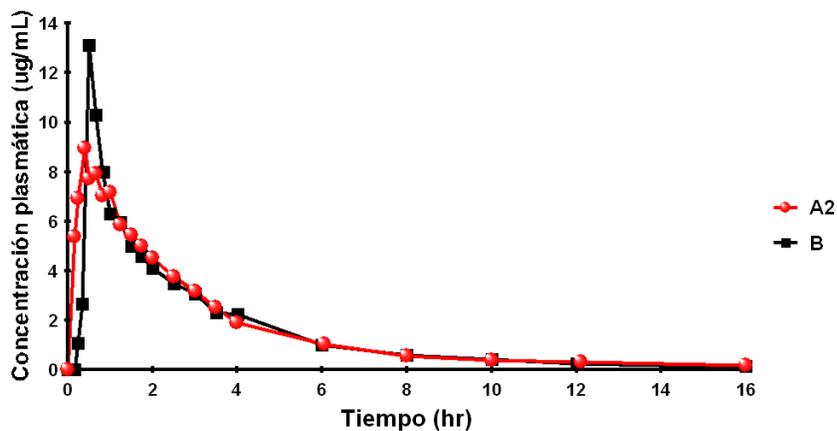
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=33



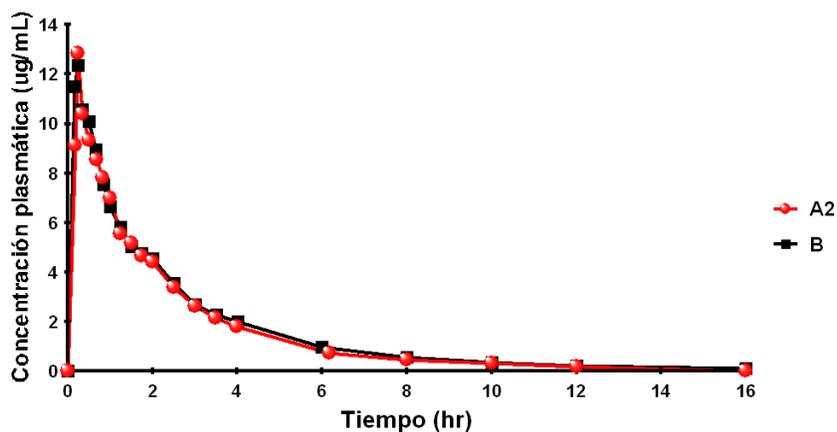
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=34



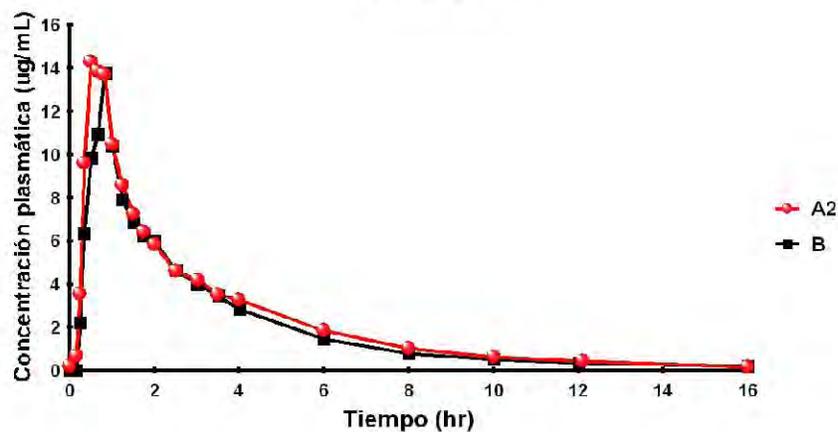
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=35



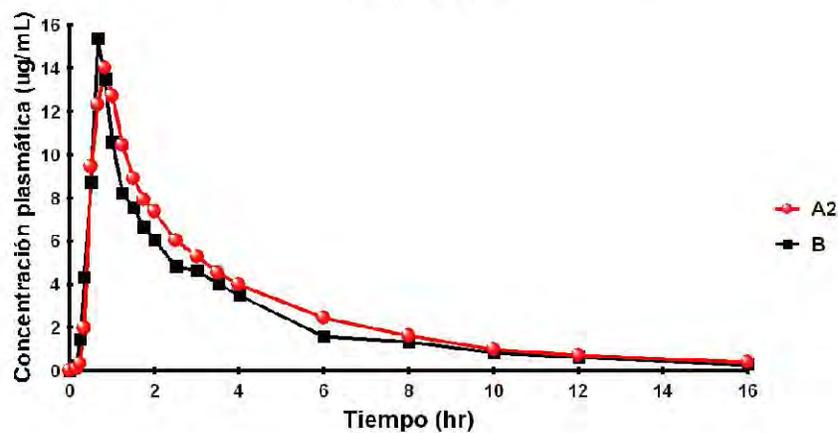
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=36



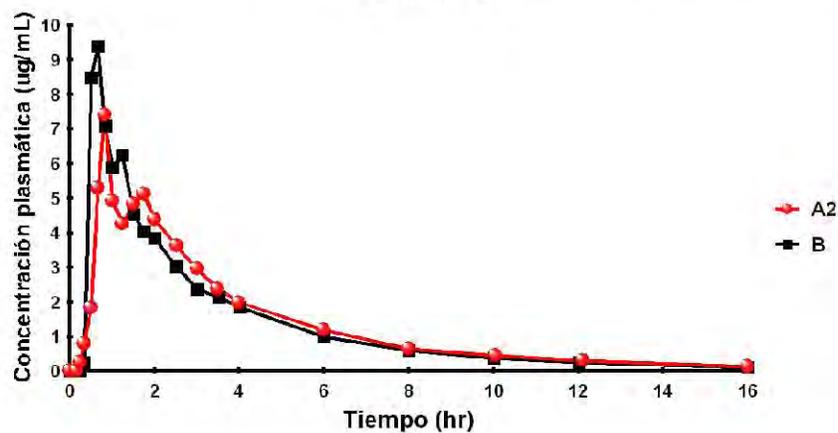
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=37



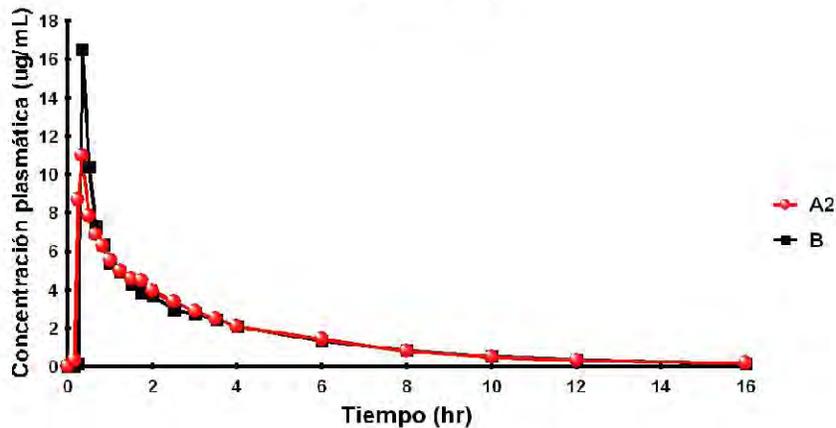
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=38



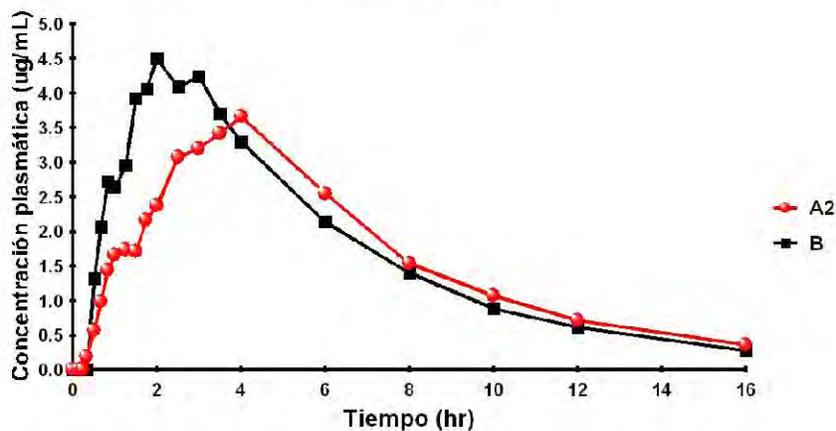
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=39



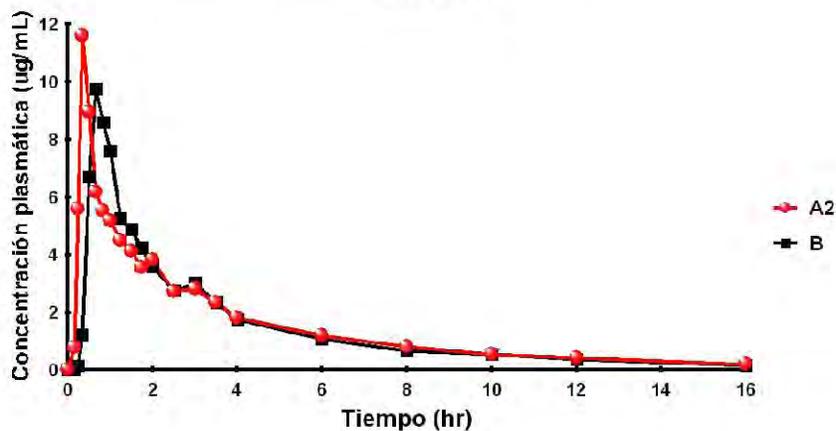
Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=40



Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=41



Perfil farmacocinético comparativo de paracetamol (escala normal)
Voluntario=42



8 BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.hcvadvocate.org/pdf/tylenol.pdf>
2. Loren Lipworth, Søren Friis, Lene Mellekjær, Lisa B. Signorello, Søren P. Johnsen, Gunnar L. Nielsen, Joseph K. McLaughlin, William J. Blot, Jørgen H. Olsen A population-based cohort study of mortality among adults prescribed paracetamol in Denmark. *Journal of Clinical Epidemiology, Volume 56, Issue 8, August 2003, Pages 796-801*
3. Espinosa Bosch, A.J. Ruiz Sánchez, F. Sánchez Rojas, C. Bosch Ojeda Determination of paracetamol: Historical evolution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 42, Issue 3, 26 September 2006, Pages 291-321 M.*
4. Eszter Hazai, László Vereczkey, Katalin Monostory Reduction of Toxic Metabolite Formation of Acetaminophen. *Biochemical and Biophysical Research Communications, Volume 291, Issue 4, 8 March 2002, Pages 1089-1094*
5. <http://www.articulosinformativos.com.mx/Paracetamol-a1126002.html>
6. L.Kalantzi,C.Reppas, J.B.Dressman, G.L. Amidon, H.E Junginger, K.K. Midha, V.P. Shah, S.A Stavchansky. Dirk M. Barends. Biowaiver Monographs for immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Acetaminophen (Paracetamol). *Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol.95,N.1, January 2006.Pages 4-14*
7. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00316>
8. <http://www.rxlist.com/tylenol-drug.htm>
9. <http://www.tsrlinc.com/services/bcs/results.cfm>
10. http://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=N02BE01
11. <http://www.drugs.com/paracetamol.html>
12. http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo_gbc.php?bib_vv=6
13. Paul I. Dargan, Alison L. Jones Management of paracetamol poisoning *Trends in Pharmacological Sciences, Volume 24, Issue 4, April 2003, Pages 154-157*
14. Zaki H Al-Mustafa, Amein K Al-Ali, Fuad S Qaw, Ziaudeen Abdul-Cader Cimetidine enhances the hepatoprotective action of N-acetylcysteine in mice treated with toxic doses of paracetamol *Toxicology, Volume 121, Issue 3, 5 September 1997, Pages 223-228*

15. José Palma-Aguirre, J. Villalpando, G. Novoa-Heckel, I. Oliva, L. Cariño, E. López V. Burke-Fraga, S. Namur. M. González-de la Parra. Bioavailability of Two Oral-Tablet and Two Oral-Suspension Formulations of Naproxen Sodium/Paracetamol (Acetaminophen): Single-Dose, Randomized, Open-Label, Two-Period Crossover Comparisons in Healthy Mexican Adults Subjects. *Clinical Therapeutics*. Volumen 31, Number 2, February 2009. Pages 399-410
16. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. "Química analítica" Ed. Thomson .Octava Edición. México 2005
17. Smith, R.V., Stewart, J.T., "Textbook of Biopharmaceutic Analysis" Ed. Lea & Febiger. Philadelphia. 1981
18. Willard, H.H., Merritt, L.L., et al. "Métodos instrumentales de análisis" Grupo Editorial Iberoamérica S.A de C.V. 1991
19. Chamberlain, J. "The Analysis of Drugs in Biological Fluids". CRC Press. Segunda Edición. USA. 1995
20. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C "Guía de Validación de métodos analíticos"
21. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados para que se realicen las pruebas.
22. <http://www.cofepris.gob.mx>
23. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. Comisión de Autorización Sanitaria. "Criterios para la designación de un medicamento de referencia".