



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

---

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR  
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA  
LA CUANTIFICACIÓN DE VALSARTÁN EN PLASMA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**ALMA TERESA GRANADOS PAREDES**



MEXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO**

<i>Presidente</i>	Inés Fuentes Noriega	_____
<i>Vocal</i>	Helgi Helene Jung Cook	_____
<i>Secretario</i>	Luis Jesús García Aguirre	_____
<i>1er. Suplente</i>	Lauro Misael Del Rivero Ramírez	_____
<i>2do. Suplente</i>	María de Lourdes Mayet Cruz	_____

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA Y BIOFARMACÉUTICA S.A DE C.V.**

ASESOR DEL TEMA

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

SUPERVISOR TÉCNICO

\_\_\_\_\_  
M. en C. Araceli Salazar Pereyra

SUSTENTANTE

\_\_\_\_\_  
Alma Teresa Granados Paredes

*Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.*

Albert Einstein (1879-1955).

*Dedicada a mis padres y a mi hermana, por su amor incondicional a lo largo de mi vida. Gracias por todo este tiempo a su lado*

### **Gracias...**

Primero que nada a mis padres por estar ahí cuando los necesite e incluso cuando no; a ti mamá por todas aquellas desveladas a mi lado, por tu preocupación cuando estaba enferma y por darme el mejor ejemplo de una mujer capaz, entregada y fuerte. A ti papá por apoyarme siempre que pudiste, por aquellos abrazos de oso, por darme una meta a seguir y por mostrarte que lo importante es no darte por vencido. A mi hermana por ser mi amiga incondicional, por esos secretos a media noche cuando no podíamos dormir, por las carcajadas de cualquier tontería, pero sobre todo por escucharme siempre y por permitirme estar a tu lado.

También a mis abuelos Modesta y David por apoyarme en cada locura que se me ocurrió, como cuando quise aprender a tejer o a usar la compresora, pero más que nada por consentirme y quererme a cada momento a pesar de lo necia que puedo llegar a ser. A mis tías Lourdes, Silvia, Ángeles, María Eugenia y Carmen, por siempre estar dispuestas a escuchar y darme uno que otro jalón de orejas, por la de veces que vinieron en mi rescate cuando no tenía ni idea de cómo cocinar algo o las veces que me dieron asilo político durante las vacaciones.

A mis tíos David, Santos, José Luis Banda, José Luis Montes de Oca y Sergio, gracias a sus consejos y jalones de orejas he llegado hasta aquí, gracias por apoyar mis locuras incluso cuando no las entendían. Así como a la pandilla de diablillos que tengo por primos (Karen, David, Lucero, Ricardo, Luis Enrique, Jacobo, Eduardo, Daniel, Sebastián), gracias por todos los momentos divertidos y por mostrarme que no importa cuánto envejezca, siempre llevare una niña por dentro.

A mis asesores las profesoras Inés Fuentes Noriega, Helgi Helene Jung Cook y María de Lourdes Mayet Cruz, así como los profesores Luis Jesús García Aguirre y Lauro Misael Del Rivero Ramírez, por tomarse el tiempo de atenderme y de revisar el presente trabajo.

Además agradezco a mis amigos y amigas, Cindy Téllez, Nelyda González, Alejandra Cervantes, Priscila Román, Juan José Polanco, Jorge Antonio Rodríguez y Alejandro Ferrusca, gracias por todo su apoyo, por estar ahí siempre que tenía un ataque de pánico o quería golpear al mundo entero, gracias por siempre estar dispuestos a escucharme y a darme un abrazo, definitivamente la vida no sería tan divertida sin ustedes.

A la M. en C. Araceli Salazar Pereyra por enseñarme todo lo que se, gracias por tener la paciencia y el tiempo, por darme un coscorrón cuando me equivoque y todos aquellos días de angustias y alegrías compartidas, espero que sepas que eres una gran persona y que te estoy profundamente agradecida, muchas gracias sensei.

---

Nuevamente al profesor Luis García por brindarme la oportunidad de trabajar en IFaB, gracias por todos los buenos y malos momentos, por todas las experiencias ganadas, así como conocer a todos mis compañeros. Gracias a Jenny, Sandra, Araceli, Alejandra, Rosa María, Adalith, Marisol, Lesli, Lupita, Karla, Nathalie, Luz, Isabel, Enrique, Jaime, Javier, Omar, Javier Medina, Alberto, Don Julio y Abraham por todas las risas compartidas, por todas esas comidas, por siempre estar dispuestos a conversar, por las muchas travesuras realizadas, sin olvidar todas esas horas esperando a que pasaran las corridas.

Al Dr. Luis Perea y la Dra. Alma, por permitirme realizar el servicio en su laboratorio, por su paciencia al enseñarme, el tiempo invertido y los múltiples cafés compartidos.

A todo el personal que conforma la Facultad de Química y la Universidad Nacional Autónoma de México, a sus profesores, investigadores, laboratoristas y personal administrativo gracias por compartir su conocimiento conmigo.

Finalmente pero no por ello menos importante a Dios por todo lo que me ha dado y por lo que no, gracias por guiar mi camino hasta aquí, espero que lo siga guiando por el resto de mi vida.

A todos gracias, es por ustedes que he llegado aquí, espero que este logro los llene de orgullo, tanto como a mí.

---

**INDICE**

1. Resumen	1
2. Introducción y objetivos	2
2.1 Generalidades	4
2.1.1 Valsartán	4
2.1.1.1 Propiedades fisicoquímicas	4
2.1.1.2 Indicaciones terapéuticas	5
2.1.1.3 Farmacodinamia	5
2.1.1.4 Farmacocinética	6
2.1.1.5 Contraindicaciones y precauciones	7
2.1.2 Métodos analíticos para la cuantificación de valsartán	7
2.2 Cromatografía de líquidos	9
2.2.1 Aspectos importantes en el análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	9
2.3 Cuantificación de fármacos en fluidos biológicos	12
2.3.1 Tratamiento de muestra biológicas	12
2.4 Validación de métodos analíticos	14
2.4.1 Análisis de muestras	16
3. Parte experimental	18
3.1 Material, equipos e instrumentos	18
3.1.1 Material	18
3.1.2 Equipos e instrumentos	19
3.1.3 Reactivos	20
3.1.3.1 Sustancias de referencia	20
3.2 Preparación de soluciones	19
3.3 Desarrollo del método analítico	21
3.3.1 Condiciones cromatográficas	22
3.3.2 Método de extracción	23
3.4 Validación del método analítico	25

3.4.1 Preparación de la curva de calibración y puntos control en plasma	26
3.4.2 Linealidad	27
3.4.3 Precisión del método	28
3.4.4 Exactitud del método	29
3.4.5 Recuperación absoluta (% Recobro)	29
3.4.6 Limite de cuantificación	30
3.4.7 Limite de detección	30
3.4.8 Selectividad del método	30
3.4.9 Estabilidad	31
3.4.10 Tolerancia	33
3.5 Aplicación del método analítico en un estudio piloto de biodisponibilidad	33
3.5.1 Criterios de inclusión	35
3.5.2 Criterios de exclusión	35
3.5.3 Retiro de voluntarios del estudio	36
3.5.4 Evolución del estudio piloto de biodisponibilidad	36
3.5.5 Análisis de las muestras plasmáticas	37
3.5.6 Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos	38
4. Resultados y análisis de resultados	40
4.1 Desarrollo del método analítico	40
4.1.1 Condiciones del detector	40
4.1.2 Columna cromatográfica y fase móvil	41
4.1.3 Volumen de inyección y velocidad de flujo	41
4.1.4 Estándar interno	41
4.1.5 Método de extracción	42
4.2 Resultados de validación	43
4.2.1 Selectividad de inicio de corrida	43
4.2.2 Selectividad del método	44
4.2.3 Linealidad del método	45
4.2.4 Precisión del método	47
4.2.5 Reproducibilidad y exactitud del método	48

---

4.2.6 Recobro	49
4.2.7 Limite de cuantificación	52
4.2.8 Limite de detección	53
4.2.9 Estabilidad	55
4.2.10 Tolerancia	67
4.3 Etapa clínica	69
4.3.1 Estadística demográfica descriptiva	69
4.3.2 Estadística descriptiva de los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo	70
4.3.3 Concentración plasmática promedio con respecto al tiempo (escala normal y semilogarítmica)	71
4.3.4 Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos	72
5. Conclusiones	74
6. Anexos	76
6.1 Anexo I. Datos demográficos de los participantes del estudio	76
6.2 Anexo II. Concentraciones plasmáticas para valsartán de cada voluntario en los diferentes tiempos de muestreo	77
6.3 Anexo III. Graficas de concentración plasmática en escala normal y semilogarítmica con respecto al tiempo para cada voluntario	78
6.4 Anexo IV. Parámetros farmacocinéticos de valsartán obtenidos para cada voluntario	82
7. Bibliografía	83

**INDICE DE FIGURAS**

Fig.1. Mecanismo de acción de valsartán.	6
Fig. 2. Esquema general de las técnicas de precipitación de proteínas	25
Fig. 3. Diagrama general de la técnica de extracción líquido-líquido	25
Fig. 4. Diagrama de la técnica de extracción empleada	43
Fig. 5. Selectividad del Método para la mezcla de plasma y plasmas individuales	44
Fig. 6. Selectividad del Método para fármacos de uso común.	45
Fig. 7. Gráfico de linealidad del método	46
Fig. 8. Límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) y blanco de plasma	54
Fig. 9. Perfil farmacocinético promedio de valsartán en escala normal.	71
Fig. 10. Perfil farmacocinético promedio de valsartán en escala semilogarítmica.	72

**INDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Métodos reportados para la cuantificación de valsartán	8
Tabla 2. Preparación de la curva de calibración y muestras control de calidad	27
Tabla 3. Condiciones del detector	41
Tabla 4. Condiciones cromatográficas finales	42
Tabla 5. Parámetros de linealidad del método para cuantificar valsartán en plasma	46
Tabla 6. Resultados de la curva de calibración para cuantificar valsartán en plasma (Concentración Recuperada).	47
Tabla 7. Repetibilidad del método analítico para cuantificar valsartán en plasma	48
Tabla 8. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar valsartán en plasma.	49
Tabla 9. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar valsartán en plasma	51
Tabla 10. Recobro absoluto de Naproxeno (E.I.) en plasma	52
Tabla 11. Evaluación del límite de cuantificación de valsartán	53
Tabla 12. Evaluación del límite de detección para valsartán	54
Tabla 13. Estabilidad de valsartán en plasma (temperatura ambiente de 23-24 C/24 h)	55
Tabla 14. Estabilidad de valsartán en plasma (temperatura ambiente de 23-24 C/48 h)	56
Tabla 15. Estabilidad de valsartán en plasma (refrigeración de 1 – 3°C)	57
Tabla 16. Estabilidad de valsartán en plasma (refrigeración de 1 – 3°C)	58
Tabla 17. Estabilidad de valsartán en plasma (ciclos congelación-descongelación)	59
Tabla 18. Estabilidad de valsartán en plasma (ciclos congelación-descongelación)	60
Tabla 19. Estabilidad de valsartán en plasma (ciclos congelación-descongelación)	61
Tabla 20. Estabilidad de valsartán en muestra procesada (automuestreador a 21°C)	62
Tabla 21. Estabilidad de valsartán en muestra procesada (automuestreador a 21°C)	63
Tabla 22. Estabilidad a largo plazo de valsartán(-70°C)	64
Tabla 23. Estabilidad de las soluciones estándar de valsartán 1.2 µg/mL	65
Tabla 24. Estabilidad de las soluciones estándar de naproxeno 4 µg/mL	66
Tabla 25. Integridad de la dilución (Concentración dentro de la curva de calibración)	67
Tabla 26. Integridad de la dilución (Concentración por encima de la curva de calibración)	68
Tabla 27. Variables demográficas	69
Tabla 28. Estadística de los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo.	70
Tabla 29. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos, para los voluntarios del estudio piloto de valsartán	73

**ABREVIATURAS**

ABC <sub>0-t</sub>	Área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t
ABC <sub>0-inf</sub>	Área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo infinito
ACN	Acetonitrilo
C	grados centígrados
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
cm	centímetros
C <sub>máx</sub>	Concentración plasmática máxima
C.V.	Coefficiente de Variación
Des. Abs.	Desviación Absoluta
D.E.	Desviación estándar
E. E.	Error Estándar
g	gramos
h	horas
IMC	Índice de masa corporal
ke	Constante de eliminación
max	Máximo
mg	miligramos
µg	microgramos
MeOH	Metanol
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetros
mM	milimolar
nm	nanómetros
PNO	Procedimiento Normalizado de Operación
r	Coefficiente de regresión
rpm	revoluciones por minuto

s	segundos
t <sub>máx</sub>	Tiempo trascurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima
t <sub>½</sub>	Vida media de eliminación
TMR	Tiempo medio de residencia
T.R	Tiempo de retención
μL	microlitros
μm	micrómetros
λ <sub>em</sub>	longitud de onda de emisión
λ <sub>ex</sub>	longitud de onda de excitación

## 1. RESUMEN

En este trabajo se presenta el desarrollo y la validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de valsartán en plasma humano, realizando una precipitación de proteínas, utilizando naproxeno como estándar interno, cuantificando el analito en un rango de 0.12 a 6.00 µg/mL.

Se utilizó un detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 256 nm y una longitud de emisión de 385 nm. La separación del analito se realizó utilizando una columna Zorbax SB-CN, con 4.6 mm de diámetro interno, 150 mm de longitud y 3.5 µm de tamaño de partícula.

El método se validó con base a 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 de cuantificación (LC), recobro absoluto y estabilidad a diferentes condiciones de almacenamiento, por lo cual el método analítico demostró ser confiable para la aplicación en un estudio de biodisponibilidad.

Se realizó un estudio piloto de biodisponibilidad para valsartán, evaluando los parámetros farmacocinéticos de  $T_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $ABC_{0-t}$ ,  $ABC_{0-inf}$ ,  $K_e$  y  $t_{1/2}$ , en 10 voluntarios sanos, después de la administración de una dosis oral única de 320 mg, tomando muestras sanguíneas en un periodo de 36 horas después de la administración, las muestras fueron centrifugadas a 4500 rpm por 5 minutos y posteriormente se separó el plasma para ser almacenado a -70° C hasta ser procesadas conforme al método analítico previamente validado. Encontrándose valores de  $t_{max}$ ,  $C_{max}$ ,  $ABC_{0-t}$ ,  $ABC_{0-inf}$ ,  $k_e$ ,  $t_{1/2}$  de  $3.7 \pm 0.9775$  (h),  $6.746 \pm 3.322$  (µg/mL),  $34.373 \pm 16.347$  (h\*ng/mL),  $35.469 \pm 16.655$  (h\*ng/mL),  $0.1652 \pm 0.0336$  (1/h) y  $4.345 \pm 0.8326$  (h) respectivamente.

## 2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS<sup>1,2</sup>

La hipertensión arterial (HTA) es una prioridad en la cobertura y atención de salud pública, debido a que se estima que entre 15 y 20 millones de mexicanos la padecen. Es una enfermedad que causa daño vascular sistémico, disminuye la calidad de vida y es uno de los factores de riesgo más importantes que derivan en padecimientos cardiovasculares y cerebrovasculares, convirtiéndola en una de las principales causas de muerte en México y el mundo.

La hipertensión se define como un aumento anormal de la presión arterial de forma persistente. La presión arterial es controlada por el sistema renina-angiotensina del organismo, que regula la presión ejercida en el interior de las arterias a medida que el corazón bombea la sangre a todo el organismo. La presión arterial tiende a aumentar con la edad al hacerse las arterias menos flexibles y debido a la presencia de alguna enfermedad coexistente como diabetes mellitus y factores de riesgo como el tabaco y la hipercolesterolemia. Por lo general, la hipertensión solo provoca síntomas tras un largo periodo de tiempo, en algunos casos, los primeros síntomas pueden ser un accidente vascular cerebral o un ataque cardíaco.

Uno de los fármacos que se utilizan para el tratamiento de la hipertensión arterial leve a moderada de diferentes etiologías, enfermedad congestiva y post infarto agudo de miocardio es Valsartán.

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

En los estudios para caracterizar la biodisponibilidad de los fármacos, la metodología analítica tiene un papel fundamental, considerando que la obtención de datos confiables repercutirá en la decisión de si un medicamento es bioequivalente o no. Una herramienta dentro de los estudios de biodisponibilidad para poder cuantificar una gran variedad de principios activos en fluidos biológicos es la cromatografía de líquidos de alta resolución.

De esta manera, el presente trabajo tiene como objetivos generales:

- Desarrollo de un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con detección por fluorescencia para cuantificar valsartán en plasma humano.
- Validar el método analítico de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.
- Utilizar el método en un estudio piloto para determinar la biodisponibilidad de una formulación de valsartán después de la administración de una dosis oral única de 320 mg.

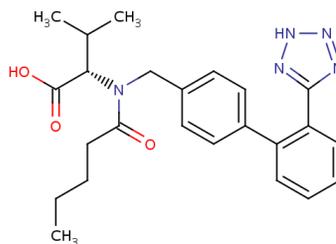
## 2.1 GENERALIDADES

### 2.1.1 Valsartán<sup>3,4</sup>

Valsartán es un antagonista de los receptores de angiotensina II, actuando sobre los receptores AT<sub>1</sub>.

#### 2.1.1.1 Propiedades fisicoquímicas.<sup>3,4</sup>

- Estructura química:



- Nombre químico:

Ácido (2S)-3-metil-2-[N-({4-[2-(2H-1,2,3,4-tetrazol-5'íl)fenil]fenil}metil)pentanamido]butanoico

- Nombre Genérico: Valsartán
- Fórmula Condensada: C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>
- Peso Molecular: 435.519 g/mol
- Solubilidad: Muy soluble en disolventes orgánicos como: acetonitrilo y metanol; soluble en agua.
- pKa: 3.9 y 4.7
- Unión a proteínas: 94-97% (plasmáticas, principalmente a albúmina)
- Clasificación biofarmacéutica: Clase III

### **2.1.1.2 Indicaciones Terapéuticas<sup>5</sup>**

Valsartán está indicado para los casos de hipertensión arterial esencial, insuficiencia cardiaca y disfunción ventricular izquierda secundaria a infarto de miocardio reciente.

### **2.1.1.3 Farmacodinamia<sup>6,7</sup>**

Valsartán reduce la presión arterial mediante la inhibición selectiva y específica de los efectos cardiovasculares de la angiotensina II. Se han identificado dos clases de receptores de angiotensina II AT<sub>1</sub> y AT<sub>2</sub>. El receptor del tipo AT<sub>1</sub> es el responsable de la mayor parte de los efectos conocidos de la angiotensina II. Dicho receptor se encuentra en los vasos sanguíneos, el corazón, los riñones, el cerebro, los pulmones y la corteza suprarrenal. Las principales funciones del receptor AT<sub>1</sub> son: vasoconstricción, liberación de hormonas y regulación de líquidos.

Valsartán es un antagonista competitivo específico del receptor AT<sub>1</sub>. El bloqueo selectivo de este receptor da lugar a una respuesta antihipertensiva efectiva. La figura 1 esquematiza este proceso, en donde podemos observar que la molécula de valsartán bloquea al receptor AT<sub>1</sub>, impidiendo que se una la Angiotensina II, provocando una disminución de la presión arterial.

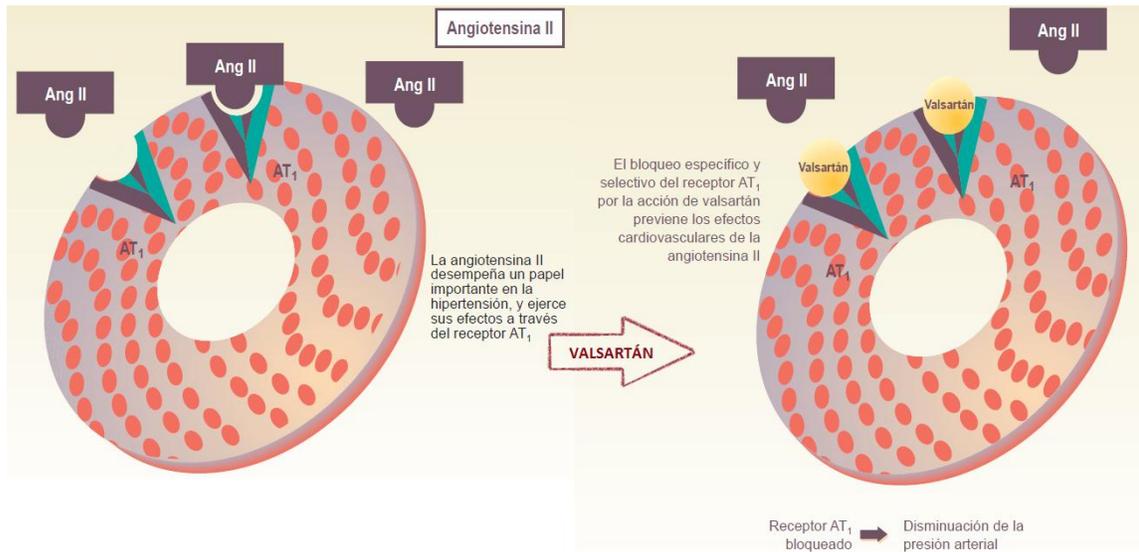


Figura 1. Mecanismo de acción de valsartán. La fijación de la angiotensina II en el receptor  $AT_1$ , produce un aumento de la presión arterial. Al administrar valsartán los receptores  $AT_1$  son bloqueados por el fármaco, dando como resultado una disminución de la presión arterial

#### 2.1.1.4 Farmacocinética<sup>6,7</sup>

Valsartán se absorbe en el tubo digestivo en forma inalterada, se metaboliza muy poco y se excreta en gran parte sin modificar. La absorción en el tubo digestivo es rápida y las concentraciones máximas del fármaco se producen aproximadamente de dos a cuatro horas después de su administración. La vida media de distribución es inferior a una hora y la vida media terminal es de 6 a 9 horas. La cinética de valsartán no se modifica con la administración sostenida del fármaco durante el día. Este fármaco presenta una cinética bi-exponencial después de la administración intravenosa. La biodisponibilidad es de aproximadamente un 25% de la dosis (en un rango que va de 10 a 35%). Los valores de  $C_{max}$  y ABC se incrementan de manera lineal.

El volumen de distribución de valsartán es pequeño (17L), indicando que valsartán no se distribuye ampliamente en los tejidos. Esto tal vez debido a que posee una alta unión a proteínas (95%), principalmente a la albúmina. Tras la administración oral aproximadamente solo el 20% de

la dosis, siendo el principal metabolito el valeril 4-hidroxi valsartán, la enzima responsable de este cambio no se encuentra identificado, sin embargo parece ser una forma de la CYP450 isoenzima. La eliminación de valsartán se realiza por dos vías: un 30% de la dosis aproximadamente se excreta por la orina y un 70% por heces.

#### **2.1.1.5 Contraindicaciones y precauciones<sup>5,7</sup>**

Entre los principales efectos adversos se encuentran casos de hipotensión en pacientes con hipovolemia o tratados con diuréticos, así como mareos, cefalea, astenia e insomnio. Se pueden presentar casos de hiperpotasemia, en pacientes con insuficiencia renal crónica, insuficiencia cardíaca congestiva o que toman amiloridina, suplementos de potasio, eplerenona, o bencilpenicilina potásica. De igual manera valsartán se encuentra contraindicado durante el embarazo y lactancia, en caso de hiperaldosteronismo, insuficiencia hepática grave, cirrosis biliar y colestasis, insuficiencia renal grave o diálisis.

#### **2.1.2 Métodos analíticos para la cuantificación de valsartán.<sup>(8-18)</sup>**

En la revisión bibliográfica encontramos varios métodos para la cuantificación de valsartán en diferentes matrices biológicas, de los cuales, las principales características se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Métodos reportados para la cuantificación de valsartán

Matriz biológica	Detección	Columna	Fase Móvil	Técnica de extracción	Rango de trabajo	Estándar Interno
<i>Plasma humano</i>	Masas	Gemini C18 2x50 mm	Ácido fórmico 0.05 mM pH 3.5: ACN (50:50 v/v) Flujo 1.2 mL/min	Precipitación con acetonitrilo conteniendo el EI.	1-2000 ng/mL	Clorhidrato de tamsulina
<i>Higado de ratas</i>	UV ( $\lambda=240\text{nm}$ )	Nucleosil 100-5 C18 4.6x250 mm	Fosfato monobásico de potasio 10mM pH3.6:ACN: MeOH (50:40:10 v/v) Flujo:1.0mL/min	Perfusión de muestras, llevando a 1mL con fase móvil.	0.05-60 $\mu\text{g/mL}$	NA
<i>Plasma humano</i>	Masas	Zorbax SB-Aq C18 4.6x150 mm	Acetato de amonio 10mM pH4.5: ACN (60:40 v/v) Flujo 1.2 mL/min	Precipitación con acetonitrilo.	4-3600 ng/mL	NA
<i>Plasma humano</i>	Masas	XTerra MS C18 2.1x50 mm 3 $\mu\text{m}$	Ácido trifluoroacético: MeOH: ACN (45:30:25 v/v)	Extracción sólido – líquido cartuchos con resina	2-2000 ng/mL	CGP48791
<i>Plasma humano</i>	Fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}}=265\text{nm}$ ; $\lambda_{\text{em}}=378\text{nm}$ )	Phenomenex ODS C18 4.6x100 mm	Fosfato monobásico de potasio 10mM pH 2.8 :ACN (70:30 v/v) Flujo:1.3mL/min	Extracción líquido-líquido utilizando metil-tert-butileter	10- 2000 ng/mL	NA
<i>Orina</i>	UV ( $\lambda=265\text{nm}$ )	Cromolith Performance RP-18e 4.6x100mm	Fosfato monobásico de potasio 10mM pH2.0:ACN (45:55 v/v) Flujo: 0.8 mL/min	Inyección directa de la muestra en el sistema cromatográfico, acoplado a una extracción sólido líquido empleando cartuchos con fase sólida C8	0.001-25 $\mu\text{g/mL}$	Losartán
<i>Plasma</i>	Fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}}=254\text{nm}$ ; $\lambda_{\text{em}}=378\text{nm}$ ) UV ( $\lambda=254\text{nm}$ )	Atlantis C18 3.9x100mm	Acetonitrilo con ácido fórmico al 0.01%: Formiato de amonio 10mM pH4.1 (gradiente de proporción de 25:75 a 75:25 v/v)	Precipitación, seguida con una extracción sólido-líquido	10-5000 $\mu\text{g/mL}$	NA

∞

Generalidades

## 2.2 Cromatografía de Líquidos.<sup>19,20,21</sup>

La cromatografía es un método físico de separación en donde los componentes de una muestra pasan a través de una fase estacionaria mediante el flujo de una fase móvil.

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica que realiza la separación física de una mezcla de compuestos a través de la interacción selectiva entre los solutos haciendo uso de instrumentación automatizada de alta eficiencia; emplea una fase móvil líquida y una fase estacionaria finamente dividida, contenida en una columna, la técnica se lleva a cabo forzando el paso del disolvente a través de la columna, generando una presión muy elevada, consiguiendo así separaciones de gran resolución. Sus principales ventajas son las siguientes:

- Automatización en el análisis cuantitativo.
- Variedad de mecanismos de operación, debido a la tecnología en instrumentación.
- Alta sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión de los resultados.
- Potencial en investigación y desarrollo, ya que posee aplicaciones en sustancias de interés general (industria, salud, medioambiente).
- Determinaciones cuantitativas exactas.

### 2.2.1 Aspectos importantes en el análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)<sup>19,20,21</sup>

En la cromatografía de líquidos de alta resolución se ha convertido en una herramienta importante en el análisis químico, debido por una parte su capacidad para separar mezclas orgánicas complejas, compuestos organometálicos y sistemas bioquímicos. Su otra aplicación es como método para determinar cuantitativa y cualitativamente los componentes de la muestra. Para el análisis cualitativo se suele emplear el tiempo de retención, que es único para cada compuesto bajodeterminadas condiciones. En aplicaciones cuantitativas, integrando las áreas de

cada compuesto o midiendo su altura, con los calibrados adecuados, se obtiene la concentración o cantidad presente de cada analito.

Algunos de los aspectos importantes que se deben considerar para la cromatografía de líquidos de alta resolución son los siguientes:

**a) Recipientes de la fase móvil.** Los recipientes para almacenar la fase móvil tienen que ser inertes, es decir, el disolvente no deberá extraer especie alguna del material con el que estén contruidos y deben contar con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas ambientales al sistema. Suelen ser botellas de vidrio, están provistos de unos filtros, indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que pueda contener la fase móvil.

**b) Fase móvil.** Los disolventes empleados como fase móvil deben poseer las siguientes propiedades:

- Alto poder solubilizante de las muestras.
- Baja reactividad.
- Baja viscosidad.
- Alto grado de pureza.
- Seguridad.

La fase móvil debe filtrarse en filtros de 0.45 o 0.22 micras ya que las partículas presentes pueden bloquear filtros y tuberías del instrumento, acelerar desgaste de sellos, rotores del inyector y afectar el movimiento normal de válvulas de entrada y salida de bombas. Posteriormente debe desgasificarse ya que los gases disueltos en ella pueden provocar liberación y formación de burbujas en la celda del detector y provocar oscilación en la línea base y aparición de picos fantasma.

**c) Bomba.** Impulsa la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector y desde allí hacia la columna, deben cubrir los siguientes requisitos:

- Generar presiones de más de 6000 psi (lb/pulg<sup>2</sup>).
- Proporcionar velocidades de flujo de 0.1 a 10 mL/min de manera constante y reproducible.
- Ser inertes y resistentes a la corrosión por diversos disolventes.

**d) Sistema de inyección de muestras.** Es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente 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 y debe ser fácil de operar.

**e) Tuberías.** Conectan al reservorio de la fase móvil con la bomba, deben ser inertes y resistentes a altas presiones.

**f) Uniones.** Permiten conectar las tuberías y con ellas, los distintos componentes del sistema cromatográfico. Estas deben ser inertes a fases móviles y muestras, deben cerrar herméticamente evitando la fuga de fase móvil y la introducción o formación de burbujas.

**g) Columna.** En las columnas cromatográficas es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación, el material externo de las columnas cromatográficas suele ser de acero inoxidable cuya longitud varía de 2 a 25 cm y un diámetro de 1 a 46 mm, mientras que el material interno suele variar proporcionándole las características propias de cada columna. El costo de las columnas es elevado y se pueden dañar con facilidad, por eso, en algunos casos se protege la entrada de la columna con otra más corta, la pre-columna o guarda-columna, que retiene por adsorción las impurezas de forma irreversible.

**h) Detector.** Es la parte del equipo cromatográfico que indica los momentos de aparición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir las siguientes características:

- Tener un rango amplio de respuesta, que posea una sensibilidad apropiada.

- Poseer una respuesta lineal (el detector debe medir alguna propiedad del analito que se incremente proporcionalmente al aumentar su concentración) y reproducible.
- No afectarse por cambios de temperatura.

En el caso del presente trabajo el detector a emplearse se trata de uno de fluorescencia, este detector se utiliza para el análisis de sustancias que presentan fluorescencia natural o conferida por una derivatización de un reactivo fluorogénico. Estos detectores poseen una alta sensibilidad y selectividad, lo que los hace adecuados para el análisis de trazas. Es importante mencionar que se utilizan dos longitudes de onda, una de excitación y otra de emisión.

### **2.3 Cuantificación de fármacos en fluidos biológicos<sup>19,20,21</sup>**

En los fluidos biológicos el fármaco de interés se encuentra inmerso en una mezcla compleja de carbohidratos, proteínas, lípidos y otros componentes, que pueden interactuar entre sí interfiriendo su determinación. Es por ello que la selección de la matriz biológica en la que se realizará la cuantificación de fármacos, se vuelve un factor importante durante el desarrollo de un método analítico, generalmente depende directamente de la vía de eliminación y farmacocinética del analito. En algunos casos la selección de limita a depender de los alcances del método. La sangre, el plasma, el suero y la orina son los fluidos biológicos más comúnmente utilizados para el análisis de fármacos.

#### **2.3.1 Tratamiento de muestras biológicas<sup>19,20</sup>**

El procesamiento de una muestra biológica, es un paso crítico en la cuantificación de fármacos, ya que se prefiere que sea de aplicación fácil, rápida y de bajo costo, por lo que es deseable que el procesamiento de la muestra biológica sea lo más sencillo posible y con la menor manipulación de la muestra, para tener métodos rápidos, económicos y reproducibles.

Las principales técnicas empleadas en el procesamiento de muestras son las siguientes:

**a) Filtración.** Los principales problemas que se presentan al utilizar esta técnica son la adsorción del analito al filtro, la aparición de picos adicionales causados por los componentes del filtro, y la obtención de una cantidad de muestra pequeña.

**b) Ultrafiltración.** Esta técnica se utiliza cuando los fármacos presentan baja unión a proteínas, la separación se realiza basada en la diferencia existente en los tamaños moleculares y la aplicación de una centrifugación a altas velocidades. Esta técnica presenta la ventaja de ser sencilla y rápida de aplicar ya que representa poca manipulación de la muestra. Sin embargo para su realización se requieren equipos especiales, lo que la hace costosa; además si el fármaco presenta una alta unión a proteínas la extracción se vuelve errática y poco reproducible.

**c) Precipitación de proteínas.** Existen dos procedimientos que difieren en su principio y pueden ser utilizados para lograr la desnaturalización y precipitación de proteínas. El primero y más sencillo consiste en la adición de ácidos, sales o disolventes orgánicos para precipitar las proteínas. Los problemas asociados a este proceso es que el fármaco de interés puede degradarse o precipitar junto con las proteínas presentes en la matriz biológica. Con el uso de disolventes orgánicos, se puede contrarrestar ese problema. El segundo método consiste en la adición de enzimas proteolíticas como tripsina, proteínasa, papaina, sutilisina y ketodasa. Es un procedimiento muy eficiente para liberar los fármacos que se encuentran unidos a proteínas plasmáticas, sin embargo al utilizar dichas proteínas se necesitan condiciones de temperatura y pH extremadamente controlados además de que las enzimas proteolíticas son específicas para ciertas proteínas.

**d) Extracción.** Consiste en aplicar la muestra en estado líquido a un sistema de disolventes (extracción líquido-líquido) o a un medio de adsorción (extracción en fase sólida):

1. Extracción Líquido-líquido. Es la transferencia del analito desde una fase acuosa a una fase orgánica, el principio básico consiste en que el fármaco al encontrarse en su forma no ionizada, es más afín a la fase orgánica. La extracción de

fármacos en fluidos biológicos se puede llevar a cabo en medio ácido ( $\text{pH} \leq 3$ ) o en medio básico ( $\text{pH} \geq 8$ ). La completa remoción de un fármaco de interés hacia la fase orgánica depende de varios factores, como el porcentaje de ionización dependiente del pH del medio, y del pka del fármaco, el volumen de las dos fases en la extracción y el número de extracciones utilizadas.

2. Extracción en fase sólida. Se basa en la separación de los componentes de una mezcla por la diferencia en la velocidad de migración de las moléculas de los componentes a través de la fase estacionaria. En esta técnica el adsorbente debe ser primeramente acondicionado con un disolvente apropiado, después del acondicionamiento, se pasa la muestra a través del adsorbente y las impurezas son eliminadas con un disolvente de lavado y finalmente, el analito se eluye con el disolvente apropiado.

#### 2.4 Validación de métodos analíticos<sup>22</sup>

Una vez que se ha desarrollado un método analítico para la cuantificación de un fármaco es necesario probar que es exacto y reproducible, para ello se somete a una validación.

La palabra validación se refiere a la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado. Para llevar a cabo la validación, una vez establecidas las condiciones analíticas, es necesario incluir como mínimo los siguientes parámetros:

- a) **Blanco.** Muestra de matriz biológica procesada, que no contiene el analito de interés, pero si estándar interno
- b) **Calibración.** Conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medición material y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.

- c) **Corrida analítica.** Conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales.
- d) **Curva de calibración.** Se refiere al conjunto de concentraciones que describen el rango en el cual se cuantifica el compuesto por analizar.
- e) **Doble blanco.** Muestra procesada de matriz biológica que no contiene el analito de interés, ni estándar interno.
- f) **Estabilidad de la muestra.** Se refiere a la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.
- g) **Exactitud.** Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.
- h) **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.
- i) **Límite de cuantificación.** Concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.
- j) **Límite de detección.** Mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.
- k) **Matriz biológica.** Es el material de origen biológico en el cual se encuentra la sustancia de interés.
- l) **Muestras control.** Muestras de concentración conocida que se cuantifican durante la corrida analítica para corroborar la validez del método, estas no forman parte de la curva de calibración, sin embargo, están dentro del rango de trabajo.
- m) **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.
- n) **Rango.** Intervalo de un método analítico definido, se puede caracterizar por uno o más intervalos constituidos al menos por cinco concentraciones distintas cada uno sin incluir las

muestras blanco, siempre y cuando contengan puntos intermedios en común e incluyan el límite de cuantificación y concentración máxima del rango.

- o) Recuperación absoluta.** Eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.
- p) Repetibilidad.** Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes bajo las mismas condiciones.
- q) 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.
- r) Selectividad.** Capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos presentes en la muestra.
- s) Tolerancia.** Capacidad de un método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

La Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998<sup>22</sup>, menciona las pruebas y criterios generales para la validación de un método analítico cuya aplicación será un estudio de biodisponibilidad y bioequivalencia. En ella se describen todos los conceptos mencionados anteriormente.

#### **2.4.1 Análisis de muestras<sup>22</sup>**

Durante el análisis de muestras, es necesario tomar en consideración varios puntos con el propósito de asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos:

- a) Equipo.** Todo el equipo que se utilice para el transporte, el almacenamiento y el análisis de las muestras debe de estar dentro de un programa de verificación, mantenimiento y calibración. En cada análisis, se debe verificar que el funcionamiento del equipo es

adecuado, siendo necesario que exista una evidencia documentada de que el equipo se verificó periódicamente y de que se utilizó un equipo determinado.

- b) Procedimientos normalizados de operación.** Este documento debe contener las instrucciones necesarias para llevar a cabo de manera reproducible una operación, el laboratorio donde se realice el análisis de las muestras debe contar con dichos procedimientos los cuales deben estar revisados, aprobados, firmados y fechados por personas autorizadas, además de ser actualizados regularmente.
- c) Sustancia de referencia.** Sustancia de uniformidad reconocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas, físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con las sustancias en evaluación, esta debe contar con un certificado que avale su pureza y su identidad.
- d) Reactivos y estándares.** Los estándares que se utilicen para llevar a cabo la cuantificación deben estar bien caracterizados.

Es importante que en cada análisis de muestras se incluya, una curva de calibración, muestras control de calidad, además de blancos del fluido biológico (tanto blanco como doble blanco). El análisis de las muestras control de calidad será indispensable para determinar si el análisis de muestras es confiable.

### **3. PARTE EXPERIMENTAL**

La parte experimental se llevó a cabo en dos etapas; primero el desarrollo y validación del método analítico, seguido de la aplicación del método en el análisis de muestras plasmáticas provenientes de voluntarios sanos; en un estudio piloto de biodisponibilidad en población mexicana. A continuación se hace una descripción detallada acerca de los materiales, equipos y sustancias empleadas durante estas etapas, así como de los procedimientos empleados.

#### **3.1 Material, equipos e instrumentos**

##### **3.1.1 Material**

- Agitador
- Barra Magnética
- Espátula
- Frascos de vidrio con tapa rosca: 1000 y 2000 mL
- Frascos de polipropileno con tapa de rosca: 30 y 60 mL
- Guantes de nitrilo
- Matraces volumétricos calibrados: 20, 50, 100 y 1000 mL
- Membranas de filtración de Nylon de 0.45 micras
- Micropipeta de volumen fijo de 200  $\mu$ L
- Micropipetas de volumen variable de 100 y 1000  $\mu$ L
- Microtubos de 2 mL
- Pipetas Pasteur con bulbos
- Pipetas volumétricas calibradas: 1, 2, 4 y 10 mL
- Probeta graduada: 10 y 500 mL.
- Propipeta
- Puntas de volumen variable para repetidora
- Puntas de plástico para micropipetas.

- Vasos de precipitados de vidrio: 20, 100, 250 y 1000 mL.
- Viales para autromuestreador
- Columna Spherisorb CN RP 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m.
- Columna XTerra MS C8 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m
- Columna Zorbax SB C<sub>18</sub> 4.6 x 150 mm 5  $\mu$ m.
- Columna Zorbax SB-CN, 4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ m.

### 3.1.2 Equipos e instrumentos

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, que consta de un módulo de separaciones modelo WATERS 2695 y un detector de fluorescencia
- Balanza analítica marca Ohaus
- Balanza granataria marca Ohaus modelo Adventurer Pro
- Agitador vórtex marca Thermolyne, modelo Maxi Mix II
- Ultracongelador marca REVCO
- Sistema de purificación de agua marca Barnstead
- Pipeta repetidora electrónica marca Eppendorf modelo Repeater Plus
- Micropipeta volumen variable 100-1000 $\mu$ L marca Hirschmann Laborgerate
- Micropipeta volumen fijo 200  $\mu$ L marca Hirschmann Laborgerate
- Refrigerador Torrey R-16
- Centrífuga Hettich Rotanta 460R
- Centrífuga Eppendorf 5424
- Centrífuga Centra CL5
- Potenciómetro
- Sistema de procesamiento de datos

En los casos en los que así se requería los instrumentos se encontraban con fecha de calibración y/o verificación vigente.

### 3.1.3 Reactivos

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

#### 3.1.3.1 Sustancias de referencia

- Valsartán. Estándar primario, USP, lote JOI020, potencia 99.6%.
- Naproxeno. Estándar primario, COSUFAR, lote 31A0, potencia 99.9%.

### 3.2 Preparación de soluciones

- a) Solución amortiguadora de fosfato de sodio monobásico 10 mM pH 2.5** Pesar 1.38 g de fosfato monobásico de sodio y transferirlos a un matraz volumétrico de 1L, disolver con agua grado CLAR y llevarlo a volumen con el mismo disolvente. Posteriormente ajustar el pH a 2.50 con ácido fosfórico concentrado.
- b) Solución de referencia de valsartán 120 µg/mL (solución A).** Pesar con exactitud el equivalente a 12 mg del estándar de referencia de valsartán y transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.
- c) Solución de referencia de valsartán 60 µg/mL (solución B).** Utilizando una pipeta volumétrica, transferir 10 mL de la solución A de valsartán (120 µg/mL) a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.

- d) Solución de referencia de valsartán 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (solución C).** Utilizando una pipeta volumétrica, transferir 4 mL de la solución de referencia B de valsartán (60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.
- e) Solución de referencia de valsartán 1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Solución D).** Utilizando una pipeta volumétrica, transferir 1 mL de la solución de referencia de valsartán, solución C (12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.
- f) Solución de referencia de naproxeno 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (solución I).** Pesar con exactitud el equivalente a 10 mg del estándar de referencia de valsartán y transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.
- g) Solución de referencia de naproxeno 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (solución II).** Utilizando una pipeta volumétrica, transferir 8 mL de la solución I de naproxeno (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.
- h) Solución de referencia de naproxeno 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (solución III).** Utilizando una pipeta volumétrica, transferir 1 mL de la solución II de naproxeno (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.
- i) Solución de adecuabilidad del sistema (valsartán 1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$  y naproxeno 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).** Utilizando una pipeta repetidora, transferir 200 $\mu\text{L}$  de la solución A de valsartán (120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a un matraz volumétrico de 20 mL, agregar 300  $\mu\text{L}$  de la solución I de naproxeno (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y llevar a volumen con agua: acetonitrilo (1:2 v/v) ambos de grado cromatográfico.

### 3.3 Desarrollo del método analítico

Las premisa en el desarrollo de cualquier método analítico, consta en identificar el tipo y condiciones del detector, condiciones cromatográficas y un método de extracción para las muestras en plasma. Antes de comenzar con la parte experimental se revisaron las propiedades fisicoquímicas del analito: solubilidad, pka y características de la molécula así como la concentración plasmática máxima esperada para poder proponer un intervalo de trabajo.

Se decidió el emplear plasma en la cuantificación de valsartán, ya que se consideró de más fácil obtención que la orina y las heces, además de que valsartán, posee una alta afinidad hacia proteínas plasmáticas. Debido a que el plasma humano es una matriz biológica que contiene elevadas cantidades de sustancias endógenas como proteínas, lípidos, carbohidratos, etc., es necesario establecer un método de procesamiento de la muestra que permita la limpieza de la muestra para evitar posibles interferencias al tiempo de retención del analito de interés, bajo una metodología reproducible.

### 3.3.1 Condiciones cromatográficas

**a) Condiciones del detector.** Se utilizó un detector de fluorescencia con dos diferentes longitudes de onda de excitación, ( $\lambda_{ex}$  a 265 nm y 256 nm) y dos longitudes de onda de emisión ( $\lambda_{em}$  de 378 nm y 385 nm), así como los diferentes valores de ganancia (10, 100 y 1000); atenuación (16, 32, 64) y respuesta (3s, 5s)

**b) Elección de la columna cromatográfica.** Se probaron las siguientes columnas cromatográficas:

- Spherisorb CN RP 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m.
- XTerra MS C8 4.6 x 250 mm, 5  $\mu$ m
- Zorbax SB C<sub>18</sub> 4.6 x 150 mm 5  $\mu$ m.
- Zorbax SB-CN, 4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ m.

**c) Elección de la fase móvil.** Se probó la solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 2.50: ACN, modificando la proporción de acetonitrilo en un rango de 25 a 50%. También se probó la solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 3.0; 2.0 y 4.0. La elección de la fase móvil se enfocó en aquella que nos proporcionara una resolución aceptable entre el pico de interés y las interferencias, así como los mejores parámetros cromatográficos de simetría y menor tiempo de retención posible además de presentar valores adecuados de simetría de pico y platos teóricos, con el menor tiempo de corrida posible.

- d) Volumen de inyección y velocidad de flujo.** Se evaluaron volúmenes de inyección de 10 a 20  $\mu\text{L}$  y un rango en la velocidad de flujo de 0.8 a 1.2 mL/min. La elección de estos parámetros fueron establecidos eligiendo aquél que no provocara un cambio elevado en la presión y una buena resolución entre picos.
- e) Elección del estándar interno.** Un estándar interno toma gran importancia, pues minimiza los errores que se pueden presentar en el procesamiento de la muestra y sirve como referencia interna para cuantificar con exactitud las concentraciones del fármaco estudiado. Para ello primeramente se prueban en condiciones de sistema y posteriormente en plasma. Se probaron como estándar interno los siguientes analitos: losartán, cefalexina y naproxeno, debido a que presentan fluorescencia en longitudes de onda similares a valsartán.

### 3.3.2 Método de extracción

Para el procesamiento de extracción de valsartán en plasma, se encontraron diversos métodos de extracción reportados como la extracción líquido- líquido, precipitación de proteínas y extracción solido-líquida. Sin embargo durante el desarrollo se probaron únicamente las técnicas de precipitación de proteínas y de extracción líquido-líquido.

Se procedió a probar la técnica de precipitación de proteínas. En la figura 2 se presenta un esquema general de la forma en que se abordó dicha técnica. Es conveniente aclarar que los estándares internos probados para esta técnica fueron: losartán y naproxeno; mientras que como agentes precipitantes se probaron acetonitrilo (100%), metanol (100%) y una mezcla de acetonitrilo: metanol (50:50 v/v).

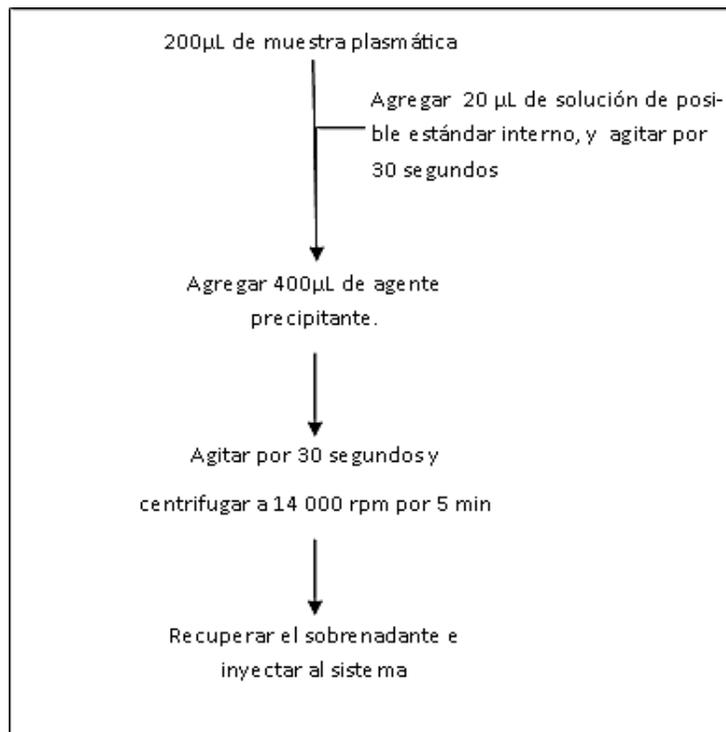


Figura 2. Esquema general de las técnicas por precipitación de proteínas.

Además de la técnica de precipitación se evaluó la técnica de extracción líquido- líquido, utilizando como disolvente orgánico metil-terbutil-eter y hexano: acetato de etilo (70:30 v/v). En la figura 3 se muestra el esquema general del manejo de la técnica.

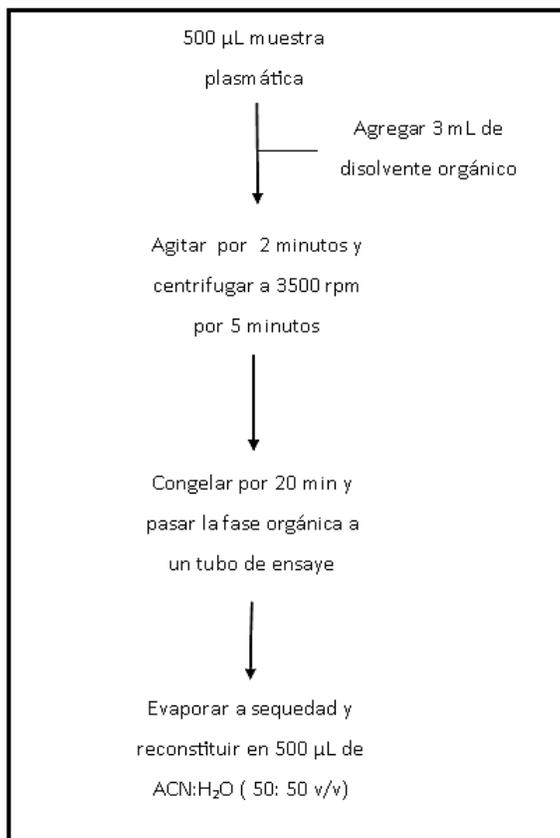


Figura 3. Diagrama general de la técnica de extracción líquido-líquido

### 3.4 Validación del método analítico

Con el propósito de contar con un método analítico confiable para la cuantificación de valsartán en plasma, éste se validó siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana 177-SSA1-1998, en el apartado que se refiere a la validación de métodos analíticos para el análisis químico de muestras biológicas en pruebas de bioequivalencia. Es importante mencionar el hecho de que antes de cada corrida se evaluó la selectividad, inyectando un blanco de reactivos, un doble blanco de plasma y un blanco de plasma, los cuales se analizaron a las condiciones cromatográficas establecidas. En todos los casos, los blancos no deben presentar interferencias con el pico de interés, ni en el tiempo de retención del estándar interno.

### **3.4.1 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 tabla 2, utilizando pipeta repetidora eppendorf y puntas de diferentes volúmenes para tomar las alícuotas correspondientes. Las alícuotas indicadas en la tabla 2 (50  $\mu$ L de volumen final), se depositaron en microtubos de 2 mL a estas se les agregaron 950  $\mu$ L de plasma a cada tubo para completar el volumen de 1 mL y se agitaron en vórtex durante 30 segundos. El rango para el desarrollo y validación del método bioanalítico fue de 0.12  $\mu$ g/mL a 6  $\mu$ g/mL.

Tabla 2. Preparación de la curva de calibración y muestras control de calidad					
Solución A Valsartán (120µg/mL) µL	Solución B Valsartán (60µg/mL) µL	Solución C Valsartán (12µg/mL) µL	MeOH µL	Volumen de plasma µL	Concentración Valsartán (µg/mL)
50			-	950	<b>6.00</b>
45			5	950	<b>5.40</b>
40			10	950	<b>4.80*</b>
35			15	950	<b>4.20</b>
30			20	950	<b>3.60</b>
	50		-	950	<b>3.00*</b>
	25		25	950	<b>1.50</b>
		50	-	950	<b>0.60</b>
		30	20	950	<b>0.36*</b>
		20	30	950	<b>0.24</b>
		10	40	950	<b>0.12**</b>
		5	45	950	<b>0.06***</b>

\* Muestras control de calidad

\*\* Límite de cuantificación

\*\*\* Límite de detección

### 3.4.2 Linealidad

Se prepararon cinco curvas de calibración a partir de pesadas independientes en cinco días diferentes, contemplando las concentraciones de 0.12, 0.24, 0.60, 1.50, 3.60, 4.20, 5.40, 6.00 µg/mL, tal y como se describe en la tabla 2 y posteriormente se procesaron de acuerdo al método de extracción desarrollado (sección 4.1.5 “Método de extracción”). 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 de la ecuación  $y = mx + b$ , donde la variable “y” es la relación de áreas entre valsartán y el estándar interno obtenida para la concentración nominal.

Se consideró que el método cumplía con este parámetro, si al realizar el ajuste en cada una de las cinco curvas se obtenía un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.99 y la desviación porcentual de la concentración recuperada (interpolada) con respecto a la nominal (adicionada) era menor o igual al  $\pm 15\%$  en todos los puntos que constituyen la curva de calibración, a excepción del límite de cuantificación cuya desviación no debía superar al  $\pm 20\%$ .

### **3.4.3 Precisión del método**

#### **a) Repetibilidad**

A partir de una solución de referencia se prepararon y cuantificaron por sextuplicado, muestras plasmáticas con valsartán a las concentraciones de 0.36, 3.00 y 4.80  $\mu\text{g/mL}$ , éstas se procesaron con el método ya establecido (sección 4.1.5 "Método de extracción"), estas muestras no pertenecen a la curva, pero se encuentran dentro del intervalo de concentraciones establecido. Con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las determinaciones de cada concentración. El coeficiente de variación no debe ser mayor al  $\pm 15\%$ .

#### **b) Reproducibilidad**

Se evaluó únicamente la reproducibilidad entre días del método. Para evaluar la reproducibilidad entre días se preparó una curva de calibración con muestras control de calidad (0.36, 3.00 y 4.80  $\mu\text{g/mL}$ ) por sextuplicado, durante tres días diferentes, empleando cada día una solución de referencia recién preparada.

Se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los puntos de control de calidad empleando la concentración recuperada, para cada día. El coeficiente de variación global no debe ser mayor al  $\pm 15\%$  en cada nivel de concentración.

### **3.4.4 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 en cada nivel, con respecto a la concentración nominal de la muestra. El valor promedio en cada nivel de concentración de las muestras control de calidad durante las pruebas realizadas para evaluar repetibilidad y reproducibilidad, debieron estar dentro del  $\pm 15\%$  de su valor nominal correspondiente, utilizando la siguiente ecuación:

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

#### **3.4.5 Recuperación absoluta (% recobro)**

Se prepararon por sextuplicado las muestras control de calidad de valsartán en plasma (0.36, 3.00 y 4.80  $\mu\text{g/mL}$ ), se compararon sus respuestas cromatográficas (área de pico) promedio obtenidas después de aplicar la técnica de extracción en el fluido biológico contra la respuesta obtenida en muestras en solución preparadas a concentraciones equivalentes, las cuales no fueron sometidas al proceso de extracción (muestras para evaluación del sistema). Esta comparación también se llevó a cabo con el estándar interno

El recobro no necesariamente debía ser del 100%, pero si debe ser constante en los tres niveles de concentración evaluados, así como para el estándar interno.

#### **3.4.6 Límite de cuantificación**

Se prepararon por sextuplicado, muestras de valsartán en plasma a la concentración más baja del intervalo de trabajo (0.12 µg/mL), las cuales fueron procesadas con el método ya establecido. Se calculó el coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta. El límite de cuantificación (LC) es la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor promedio no debe desviarse más del  $\pm 20\%$  del valor nominal, con un  $CV \leq 20\%$ .

#### **3.4.7 Límite de detección**

El límite de detección es la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica se distingue del nivel del ruido (aproximadamente tres veces mayor).

Se prepararon por sextuplicado, muestras de valsartán en plasma a la concentración de 0.06 µg/mL las cuales fueron procesadas con el método ya establecido (sección 4.1.5 “Método de extracción”).

#### **3.4.8 Selectividad del método**

La selectividad del método fue determinada, analizando las muestras de plasma provenientes de seis voluntarios sanos diferentes (de forma individual y en mezcla) sometiénolas por duplicado al método de extracción (sección 4.1.5 “Método de extracción”). Se consideró que el método analítico era selectivo si en las muestras plasmáticas no se presentaba interferencia alguna en el tiempo de retención de valsartán o del estándar interno; en caso de presentarse estas no deben poseer una respuesta mayor al 20 % del límite de cuantificación de valsartán y no mayor al 5% de la respuesta del estándar interno

Se evaluó la selectividad del método en muestras plasmáticas conteniendo fármacos de uso común como ácido acetilsalicílico, paracetamol, hidroclorotiazida y el anticoagulante heparina

(143 unidades USP). Evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de valsartán.

Además se realizó una prueba para el caso en el que durante el estudio se presentaran muestras con plasma hemolizado y/o lipémico, para ello se prepararon por duplicado blancos con plasma hemolizado y lipémico, sometiéndose a la técnica de extracción, estas no debían presentar interferencia en los tiempos de retención de Valsartán o del estándar interno; en caso de presentarse estas no deben poseer una respuesta mayor al 20 % del límite de cuantificación de valsartán y no mayor al 5% de la respuesta del estándar interno.

#### 3.4.9 Estabilidad

Se realizó esta prueba para determinar las condiciones de temperatura y tiempo, bajo las cuales valsartán es estable en plasma, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, esta prueba se realizó evaluando la concentración recuperada del compuesto por analizar en la matriz biológica.

Se evaluó la estabilidad en plasma bajo las siguientes condiciones:

- a) **Estabilidad temperatura ambiente.** Se prepararon por sextuplicado una serie de muestras plasmáticas correspondientes a los puntos de control de calidad (0.36, 3.00 y 4.80  $\mu\text{g/mL}$ ) de valsartán, almacenándose a temperatura ambiente. Dicha serie se procesó a las 24 y 48 h con el método ya establecido (sección 4.1.5 “Método de extracción”).
- b) **Estabilidad en refrigeración.** Se prepararon por sextuplicado una serie de muestras plasmáticas correspondientes a los puntos de control de calidad (0.36, 3.00 y 4.80  $\mu\text{g/mL}$ ) de valsartán, y se almacenaron en refrigeración. Dicha serie se procesó al transcurrir 24 y 48 h con el método ya establecido (sección 4.1.5 “Método de extracción”).
- c) **Estabilidad ciclos congelación-descongelación.** Se prepararon por sextuplicado tres series de muestras plasmáticas correspondientes a los puntos de control de (0.36, 3.00 y 4.80  $\mu\text{g/mL}$ ) de valsartán, y se almacenaron en el ultracongelador (-70°C) dejando las muestras

un periodo mínimo de 12 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$  entre cada ciclo. Todas las fracciones se descongelaron a las 24, 48 y 72 h posteriores a su preparación y en cada uno de los tiempos tres muestras de cada nivel de concentración fueron cuantificadas y el resto se congelaron nuevamente a  $-70^{\circ}\text{C}$ ; de esta manera se cumplen los tres ciclos con diferencias de por lo menos 24 h entre las descongelaciones. Se procesó una serie cada día con el fin de evaluar tres ciclos de congelación-descongelación con el método establecido (sección 4.1.5 “Método de extracción”).

- d) Estabilidad muestra procesada.** Para determinar la estabilidad de la muestra procesada, se prepararon por triplicado los puntos de control de calidad (0.36, 3.00 y 4.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de valsartán en plasma, las cuales se sometieron al procedimiento de extracción y se inyectaron al sistema cromatográfico (tiempo cero). Las muestras se almacenaron en el automuestreador y se inyectaron de nuevo a las 24 y 48 h después de su preparación.
- e) Estabilidad largo plazo.** Se prepararon por triplicado dos series de muestras plasmáticas correspondientes a los puntos de control de calidad (0.36, 3.00 y 4.80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de valsartán y se almacenaron en el ultracongelador ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) dejando las muestras durante un lapso de 164 días. Se procesó una serie al cumplir el lapso de los días anteriormente mencionados con el fin de evaluar la estabilidad a largo plazo con el método ya establecido (sección 4.1.5 “Método de extracción”).
- f) Estabilidad de las soluciones estándar en refrigeración ( $0-4^{\circ}\text{C}$ ).** Se evaluó la estabilidad de las soluciones estándar con las que se preparan las curvas de calibración y muestras control de calidad. Para ello se realizaron 6 inyecciones de 5  $\mu\text{L}$  cada una, de las soluciones de 1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de valsartán y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de naproxeno (E.I.). Se comparó el área del pico correspondiente a las soluciones recién preparadas y aquellas preparadas 7 días antes y que fueron almacenadas en refrigeración a  $0-4^{\circ}\text{C}$ . La desviación absoluta % no debe ser mayor al 15% en ninguno de los casos para poder concluir acerca de la estabilidad de las soluciones durante ese periodo.

En todos los casos las muestras debían presentar un C.V. menor al  $\pm 15\%$  y se considera que el compuesto de interés es estable bajo la condición evaluada si la desviación absoluta es menor al

$\pm 15\%$  al ser comparadas con muestras control a la misma concentración preparadas recientemente.

#### 3.4.10 Tolerancia

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

- a) Prueba de Integridad de la dilución (concentración dentro de la curva de calibración).** Se preparó por sextuplicado una muestra del analito en plasma a una concentración dentro del rango de cuantificación ( $4.80 \mu\text{g/mL}$ ). Se aplicó el proceso de extracción empleando la mitad de la muestra establecida en la metodología ( $100 \mu\text{L}$ ) y completando el volumen a  $200 \mu\text{L}$  con plasma y posteriormente se determinó la concentración del analito. La concentración interpolada y multiplicada por un factor de dilución de 2 no debe desviarse más del  $\pm 15\%$  con respecto al valor nominal con un C.V. menor o igual al  $\pm 15\%$ .
- b) Prueba de Integridad de la dilución (concentración por encima de la curva de calibración).** Se realizó esta prueba para el caso en el que durante el estudio se presentaran muestras que superen el límite superior de la curva de calibración, para ello se prepararon por sextuplicado muestras del analito en plasma con una concentración de ( $15 \mu\text{g/mL}$ ). Se aplicó el proceso de extracción empleando la mitad de la muestra establecida en la metodología ( $100 \mu\text{L}$ ) y completando el volumen a  $200 \mu\text{L}$  con plasma y posteriormente se determinó la concentración del analito. La concentración interpolada y multiplicada por un factor de dilución de 2 no debe desviarse más del  $\pm 15\%$  con respecto al valor nominal con un C.V. menor o igual al  $\pm 15\%$ .

### **3.5 Aplicación del método analítico en un estudio piloto de biodisponibilidad**

La parte clínica del estudio se realizó en el área clínica del centro de Investigación Farmacológica y Biofarmacéutica. Se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos señalados en la Ley General de Salud y el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, todos los sujetos participaron de manera voluntaria en el estudio para lo cual firmaron una carta de aceptación y una carta de consentimiento donde fueron informados de la naturaleza y fines del estudio, de los efectos secundarios del fármaco y las indicaciones a seguir durante la realización del mismo.

Las muestras plasmáticas fueron obtenidas de seres humanos clínicamente sanos, a los cuales se les realizaron las siguientes pruebas:

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

En el estudio piloto de valsartán participaron 10 voluntarios sanos (5 hombres y 5 mujeres), a los que se les administró una dosis de 320 mg de valsartán. El medicamento utilizado cuenta con las siguientes características:

- Nombre Comercial: DIOVAN®
- Forma Farmacéutica: Comprimidos recubiertos
- Formula: Cada comprimido contiene 320 mg de valsartán
- Dosis administrada: 1 comprimido
- Lote: Z0026
- Fecha de caducidad: JUL 11
- Fabricante: Hecho en Suiza por NOVARTIS PHARMA STEIN AG, acondicionado por NOVARTIS BIOCIENICAS S.A. y distribuido por NOVARTIS FARMACEUTICA S.A. DE C.V.

### 3.5.1 Criterios de inclusión

- La participación de los sujetos en el estudio fue de manera voluntaria.
- Se incluyeron voluntarios de entre 18 a 40 años de edad.
- El índice de masa corporal mantuvo valores entre 18 a 27(Kg/m<sup>2</sup>).
- Cada voluntario contaba con un buen estado de salud determinado por los resultados de una historia clínica completa realizada por médicos capacitados y los estudios de laboratorio realizados en laboratorios clínicos certificados.
- Los límites de variación permitidos dentro de la normalidad en la visita de selección fueron: tensión arterial (sentado) de 90 a 130 mmHg la sistólica y de 60 a 90 mmHg la diastólica, frecuencia cardiaca entre 55 y 100 latidos por minuto y frecuencia respiratoria entre 14 y 20 respiraciones por minuto.

### 3.5.2 Criterios de exclusión

- Se eliminó del estudio a todo voluntario que no cumplió con los criterios de inclusión propuestos.
- Voluntarios que requirieran de cualquier medicamento durante el estudio, aparte del medicamento que se encontraba en estudio.

- A los individuos que se les encontró alguna alteración en sus signos vitales registrados en la selección de voluntarios se les excluyó del estudio.
- Sujetos que mostraron antecedentes de drogadicción o de abuso de fármacos.
- Los sujetos con resultados positivos a la prueba de embarazo.
- Voluntarios que fueron hospitalizados por cualquier problema durante los cuatro meses previos al inicio del estudio.
- Voluntarios que hubieran recibido fármacos en investigación dos meses antes del presente estudio.
- Sujetos que donaron o perdieron 450 mL o más de sangre dentro de los 2 meses previos al inicio del estudio.

### **3.5.3 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), los voluntarios retirados no pueden ser reemplazados. Cualquier sujeto pudo dejar de participar en el estudio si así lo deseaba en cualquier momento. En caso del retiro, todos los datos y muestras para biodisponibilidad, deben ser enviados a la valoración analítica y anexar la razón del porqué se retiró del estudio.

### **3.5.4 Evolución del estudio piloto de biodisponibilidad**

Los voluntarios sanos fueron admitidos en la unidad clínica de IFaB, siendo hospitalizados entre las 18:00 y 19:00 horas del día previo a la administración del fármaco. Una vez ingresados los voluntarios y asignado su lugar dentro del estudio, se verificó su adecuado estado de hidratación, signos vitales y se realizó prueba de abuso de drogas a todos los voluntarios, así como de embarazo en el caso de las mujeres. Recibieron cena y permanecieron en ayuno a partir de las 22:00 h. 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 una tableta conteniendo 320mg de valsartán, después de por lo menos 10 horas de ayuno y 3 h antes del desayuno con 250 mL de agua.

Las muestras sanguíneas fueron recolectadas y procesadas para obtener el plasma a los siguientes tiempos: 0.00, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 17, 22 y 36 h, después de la administración. Se efectuó registro de signos vitales durante cada una de las tomas de las muestras. No se tomó ningún otro medicamento durante el tiempo que duró el estudio.

### **3.5.5 Análisis de las muestras plasmáticas**

Se realizó el análisis de 190 muestras correspondientes a 10 voluntarios, las cuales fueron procesadas y cuantificadas utilizando el método de cromatografía de líquidos de alta resolución con detector por fluorescencia 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 una curva de calibración y puntos control de calidad (0.36, 3.00 y 4.80  $\mu\text{g/mL}$ ) de valsartán, 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 deben cumplir con los criterios de precisión y exactitud establecidos en la validación del método.

### 3.5.6 Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos

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

- a) **C<sub>max</sub>**: Concentración plasmática máxima obtenida de manera gráfica, a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.
- b) **T<sub>max</sub>**: Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima, obtenido de manera gráfica a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.
- c) **ABC<sub>0-t</sub>**: Área bajo la curva de la concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t (último tiempo de muestreo) calculada por el método trapezoidal. El procedimiento para el cálculo de este parámetro se describe en la siguiente fórmula:

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

Dónde:

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

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

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

- d) **ABC<sub>0-inf</sub>**: Área bajo la curva de la concentración plasmática desde la administración al tiempo extrapolado al infinito.

$$ABC_{0-inf} = ABC_{0-t} + C_f/Ke$$

Dónde:

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

Ke= Constante de eliminación

- e) **Ke**: Constante de eliminación, se estima a partir de la porción lineal terminal del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo (en escala semilogarítmica).
- f) **Vida media de eliminación**: Mediante el cociente de  $\ln(2) / K_e$
- g) **TMR<sub>0-inf</sub>**: Tiempo medio de residencia extrapolado a tiempo infinito

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

- g) **ABCM<sub>0-inf</sub>**: Área bajo la curva del primer momento extrapolado a tiempo infinito

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

Dónde:

$t_f$  = Tiempo de la última muestra

$C_f$  = Concentración de la última muestra

La estadística descriptiva con la cual se pudo caracterizar la farmacocinética de valsartán en los voluntarios analizados.

#### 4. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se realizó una búsqueda de las condiciones cromatográficas óptimas para la cuantificación de valsartán en plasma, probando distintas columnas cromatográficas, cambiando la proporción de fase móvil, composición de fase móvil, velocidad de flujo, volumen de inyección y condiciones de detección. Se tomaron en cuenta diferentes criterios para la elección de las mejores condiciones cromatográficas estos fueron:

- 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 dando por resultado una corrida breve.

##### 4.1 Desarrollo del método analítico

###### 4.1.1 Condiciones del detector

El detector de fluorescencia utilizado durante el desarrollo, validación y análisis de muestras de voluntarios fue Waters modelo 474e bajo las condiciones establecidas en la tabla 3; ya que bajo estas condiciones se obtiene una respuesta apropiada para valsartán que no satura el sistema, además de tener una sensibilidad suficiente para la cuantificación del límite inferior. En estas condiciones además se presenta una menor cantidad de interferencias provenientes de la matriz biológica.

**Tabla 3. Condiciones del detector**

Tabla 3. Condiciones del detector	
Longitud onda	$\lambda_{\text{ex}}$ : 256 nm $\lambda_{\text{em}}$ : 385 nm
Ganancia	10
Atenuación	32
Respuesta	3s

#### 4.1.2 Columna cromatográfica y fase móvil

De las columnas utilizadas se obtuvieron mejores resultados con la columna Zorbax SB-CN, 4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, ya que esta columna permitió obtener picos con buena simetría lo cual nos asegura una adecuada integración y con ello una cuantificación confiable, la temperatura de columna utilizada fue de 50°C; la fase móvil para la cuantificación de valsartán en plasma consistió en solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.01 M, pH 2.5:acetonitrilo en una proporción de 62:38 v/v.

#### 4.1.3 Volumen de inyección y velocidad de flujo

Se evaluaron volúmenes de inyección de 10 a 20  $\mu\text{L}$  y un rango en la velocidad de flujo de 0.8 a 1.2 mL/min, sin embargo las condiciones en donde se obtuvieron mejores resultados fue utilizando un volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$  y una velocidad de flujo de 1.0 mL/min, ya que bajo estas condiciones se obtuvo una buena resolución y simetría de los picos de interés, además de un tiempo de retención apropiada para el analito y el estándar interno.

#### 4.1.4 Estándar interno

Tras realizar diferentes pruebas con los candidatos a estándar interno se determinó que naproxeno cumplía con las características deseadas para ello. Por lo tanto las condiciones cromatográficas establecidas se muestran en la tabla 4.

<b>Tabla 4. Condiciones cromatográficas finales</b>	
Detector	Fluorescencia
Longitud onda	$\lambda_{\text{ex}}$ : 256 nm $\lambda_{\text{em}}$ : 385 nm
Ganancia	10
Atenuación	32
Respuesta	3s
Columna	Zorbax SB-CN, 4.6 x 150 mm, 3.5 $\mu\text{m}$ .
Fase móvil	Solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.01 M, pH 2.5:acetonitrilo (62:38 v/v)
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Volumen de inyección	10 $\mu\text{L}$
Temperatura columna	50°C
Tiempo de retención aproximado	Valsartán 6.2 – 7.2 minutos Naproxeno (E.I.) 4.3 – 5.3 minutos

#### 4.1.5 Método de extracción

Para el procesamiento de extracción de valsartán en plasma, se evaluaron algunos de los métodos de extracción reportados como fue la extracción líquido- líquido y precipitación de proteínas.

Al evaluar la técnica de extracción líquido- líquido, utilizando como disolvente orgánico metil-terbutil-éter y hexano: acetato de etilo (70:30 v/v), se observa una mayor cantidad de interferencias en los cromatogramas, además de un recobro bajo para el analito.

En cuanto a la técnica de precipitación de proteínas, la cual se realizó utilizando los siguientes agentes precipitantes: acetonitrilo (100%), metanol (100%) y una mezcla de acetonitrilo: metanol (50:50 v/v), se observó que el mejor agente precipitante a utilizar fue el acetonitrilo (100%), gracias a que presento menor cantidad de interferencias provenientes de la matriz biológica,

además de tener un recobro mayor al 80% para el analito y el estándar interno. El método de extracción completo se muestra en la figura 4.

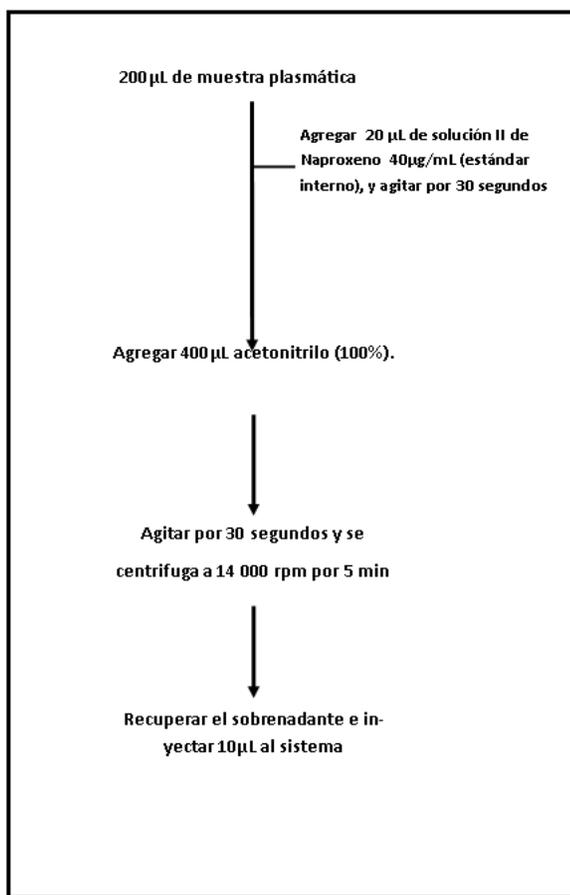


Figura 4. Diagrama de la técnica de extracción empleada

## 4.2 Resultados de validación

### 4.2.1 Selectividad de 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, en ninguna corrida se presentaron interferencias en el tiempo de retención de valsartán ni del estándar interno.

#### 4.2.2 Selectividad del método

La selectividad del método fue determinada, analizando la muestra blanco de la matriz biológica (muestras de plasma de seis donadores y su mezcla) y muestras de plasma conteniendo fármacos de uso común, como ácido salicílico (300  $\mu\text{g/mL}$ ), hidroclorotiazida (150  $\text{ng/mL}$ ), paracetamol (20  $\mu\text{g/mL}$ ) y el anticoagulante (Heparina 143 unidades USP), evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de valsartán y naproxeno (E.I.). Se evaluó también la posible interferencia de muestras hemolizadas y lipémicas. Las sustancias evaluadas no mostraron interferencia con el pico de interés.

El método mostró ser selectivo para los compuestos evaluados al no presentarse interferencias al tiempo de retención tanto de valsartán como de naproxeno. A continuación se muestran los cromatogramas correspondientes a los blancos de plasma provenientes de 6 voluntarios diferentes y la prueba de selectividad hacia fármacos de uso común:

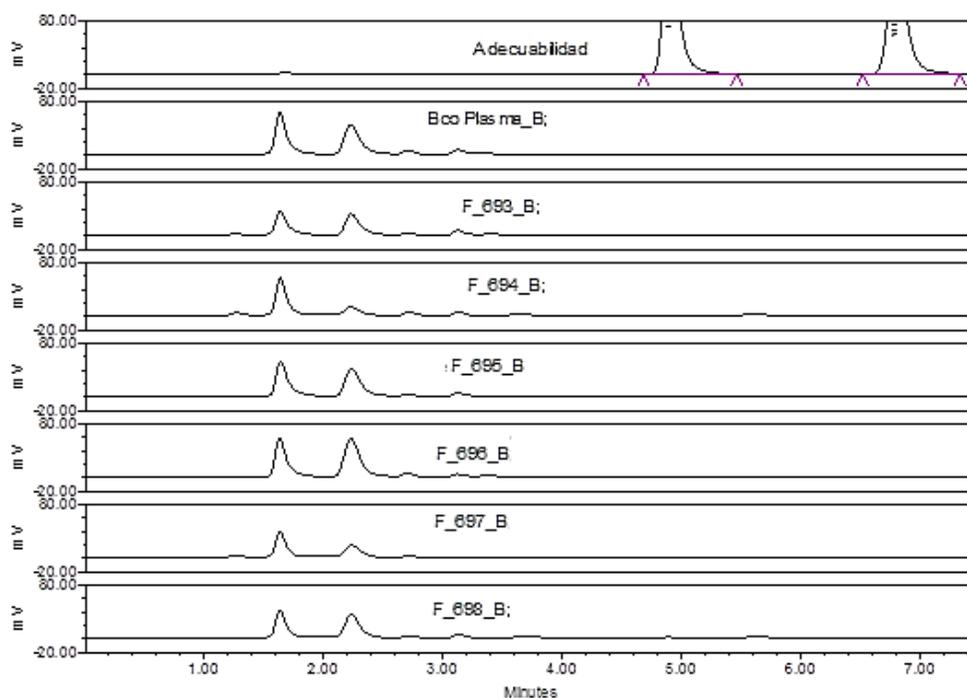


Figura 5. Selectividad del Método para la mezcla de plasma y plasmas individuales

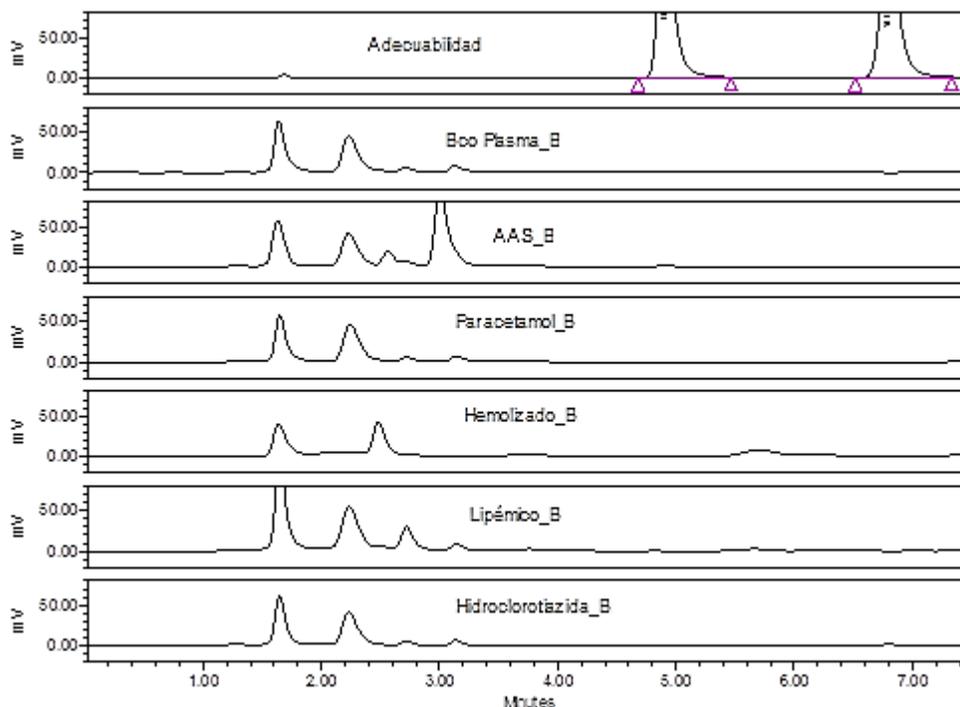


Figura 6. Selectividad del Método para fármacos de uso común.

#### 4.2.3 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 (relación de áreas de valsartán/naproxeno) obtenida para su respectiva concentración nominal “x” de valsartán.

La linealidad del método fue definida a partir del coeficiente de correlación (r), cuyo valor de cumplimiento para cada curva de calibración fue de 0.99 o mayor, considerándose para esta evaluación las primeras 5 curvas de la validación del método analítico. Los valores de pendiente ordenada y r se encuentran en la tabla 5.

<b>Tabla 5. Parámetros de linealidad del método para cuantificar valsartán en plasma</b>			
	<b>Pendiente</b>	<b>Ordenada</b>	<b>r</b>
<b>Curva 1</b>	0.376	-0.0048	0.99981
<b>Curva 2</b>	0.349	-0.0067	0.99994
<b>Curva 3</b>	0.389	-0.0058	0.99992
<b>Curva 4</b>	0.373	0.0071	0.99960
<b>Curva 5</b>	0.358	-0.0109	0.99976
<b>Promedio</b>	<b>0.369</b>		
<b>D. E</b>	<b>0.016</b>		
<b>C. V (%)</b>	<b>4.279</b>		

Todos los resultados reportados en la tablas anteriores se copiaron íntegramente de las curvas de calibración generadas por el paquete computacional Empower®, con un ajuste  $1/x^2$ .

En la figura 7 se reportan los datos de pendiente (b), ordenada al origen (a) y coeficiente de correlación para las 5 curvas de calibración graficando concentración nominal vs respuesta relación de áreas valsartán/naproxeno (E.I.).

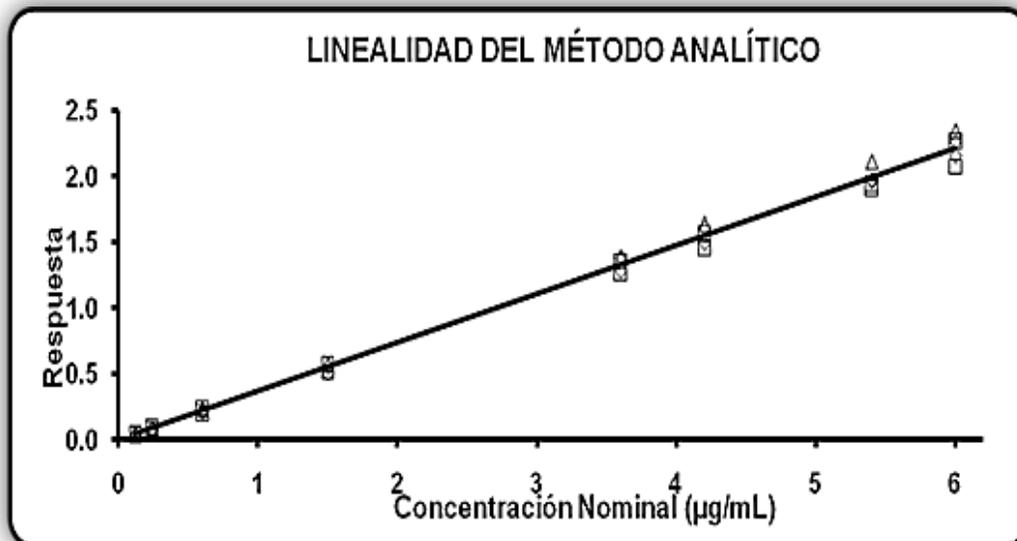


Figura 7. Gráfico de linealidad del método

Debido a la saturación de la señal en el detector y sensibilidad requerida para la caracterización de los perfiles farmacocinéticos de valsartán, el método analítico fue validado en el rango de 0.12 a 6 µg/mL.

La curva de calibración fue repetible en el intervalo de concentraciones de 0.12 a 6.00 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. La siguiente tabla muestra los resultados de la repetibilidad de la curva de calibración para la cuantificación de valsartán en plasma

<b>Tabla 6. Resultados de la repetibilidad para la curva de calibración para cuantificar valsartán en plasma (Concentración Recuperada)</b>								
<b>Conc. nominal (µg/mL)</b>	<b>0.12</b>	<b>0.24</b>	<b>0.60</b>	<b>1.50</b>	<b>3.60</b>	<b>4.20</b>	<b>5.40</b>	<b>6.00</b>
<b>Curva 1</b>	0.121	0.238	0.592	1.484	3.689	4.283	5.269	6.030
<b>Curva 2</b>	0.120	0.241	0.598	1.480	3.623	4.193	5.492	5.947
<b>Curva 3</b>	0.121	0.235	0.608	1.487	3.569	4.227	5.427	6.026
<b>Curva 4</b>	0.120	0.236	0.626	1.522	3.593	4.168	5.182	6.050
<b>Curva 5</b>	0.120	0.241	0.597	1.436	3.619	4.216	5.526	6.065
<b>Promedio</b>	<b>0.120</b>	<b>0.238</b>	<b>0.604</b>	<b>1.482</b>	<b>3.619</b>	<b>4.217</b>	<b>5.379</b>	<b>6.024</b>
<b>D. E</b>	<b>0.001</b>	<b>0.003</b>	<b>0.013</b>	<b>0.031</b>	<b>0.045</b>	<b>0.043</b>	<b>0.148</b>	<b>0.046</b>
<b>C. V (%)</b>	<b>0.455</b>	<b>1.165</b>	<b>2.234</b>	<b>2.066</b>	<b>1.243</b>	<b>1.022</b>	<b>2.751</b>	<b>0.757</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>0.333</b>	<b>0.750</b>	<b>0.700</b>	<b>1.213</b>	<b>0.517</b>	<b>0.414</b>	<b>0.385</b>	<b>0.393</b>

Todos los resultados reportados en la tablas anteriores se copiaron íntegramente de las curvas de calibración generadas por el paquete computacional Empower<sup>®</sup>, con un ajuste  $1/x^2$ .

#### 4.2.4 Precisión del método

En la tabla 7 se ilustran los resultados correspondientes a la repetibilidad del método para cuantificar valsartán en plasma, en los cuales se puede observar que el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración evaluados fue menor o igual que 3.428%, mientras que la desviación absoluta (Desv. Abs %) fue menor o igual que 5.906%.

<b>Tabla 7. Repetibilidad del método analítico para cuantificar valsartán en plasma</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Control Bajo (0.36 µg/mL)</b>	<b>Control Medio (3.00 µg/mL)</b>	<b>Control Alto (4.80 µg/mL)</b>
<b>1</b>	0.357	2.943	4.473
<b>2</b>	0.359	2.900	4.596
<b>3</b>	0.350	2.859	4.563
<b>4</b>	0.340	2.938	4.579
<b>5</b>	0.354	2.898	4.482
<b>6</b>	0.359	2.845	4.406
<b>Promedio</b>	<b>0.353</b>	<b>2.897</b>	<b>4.517</b>
<b>D. E</b>	<b>0.007</b>	<b>0.040</b>	<b>0.074</b>
<b>C. V (%)</b>	<b>2.068</b>	<b>1.377</b>	<b>1.647</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>1.898</b>	<b>3.428</b>	<b>5.906</b>

El método es repetible ya que el coeficiente de variación obtenido de las cinco concentraciones recuperadas en cada nivel de concentración es menor al  $\pm 15\%$  lo cual indica que hay poca variabilidad en los resultados obtenidos al aplicar el método repetidas veces, bajo las mismas condiciones analíticas (mismo analista, mismo día de trabajo, equipo y laboratorio).

#### 4.2.5 Reproducibilidad y exactitud del método

La tabla 8 muestra los resultados de la reproducibilidad del método y exactitud inter día correspondiente, en donde se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de

trabajo fue de 2.847 a 3.562%, mientras que la desviación absoluta (%) fue igual o menor a 2.436%, en las diferentes concentraciones evaluadas.

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.

<b>Tabla 8. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar valsartán en plasma.</b>			
<b>Día</b>	<b>Concentración recuperada</b>		
	<b>Control Bajo (0.36 µg/mL)</b>	<b>Control Medio (3.00 µg/mL)</b>	<b>Control Alto (4.80 µg/mL)</b>
<b>Día 1</b>	0.357	2.943	4.473
	0.359	2.900	4.596
	0.350	2.859	4.563
	0.340	2.938	4.579
	0.354	2.898	4.482
	0.359	2.845	4.406
<b>Día 2</b>	0.366	3.648*	4.659
	0.427*	3.157	4.716
	0.370	3.061	4.804
	0.358	3.071	5.020
	0.378	2.960	4.925
	0.393	2.953	4.954
<b>Día 3</b>	0.356	3.020	4.748
	0.371	3.033	4.748
	0.359	3.042	4.665
	0.355	2.928	4.691
	0.347	2.890	4.673
	0.360	2.941	4.593
<b>Promedio</b>	<b>0.361</b>	<b>2.967</b>	<b>4.683</b>
<b>D. E</b>	<b>0.012</b>	<b>0.084</b>	<b>0.167</b>
<b>C. V (%)</b>	<b>3.412</b>	<b>2.847</b>	<b>3.562</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>0.196</b>	<b>1.100</b>	<b>2.436</b>

\* Valor que excede el 15% de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos

#### **4.2.6 Recobro**

El recobro fue definido como el cociente de la respuesta del analito (área de valsartán obtenida después de aplicar la técnica de extracción en el fluido biológico, entre la respuesta obtenida en muestras en solución a concentraciones equivalentes, las cuales no fueron sometidas al proceso de extracción (muestras para evaluación del sistema).

El recobro del método analítico para cuantificar valsartán en plasma fue constante en las concentraciones evaluadas (puntos control bajo, medio y alto), dando como resultado un recobro global del 96.827% y una desviación de los promedios individuales con respecto al global, menor al 15%. Los resultados se muestran en la tabla 9.

<b>Tabla 9. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar valsartán en plasma</b>				
<b>Nivel de concentración</b>	<b>ÁREAS</b>		<b>Recobro</b>	<b>% desv</b>
	<b>SISTEMA</b>	<b>MÉTODO</b>		
<b>Control bajo (0.36 µg/mL)</b>	196235	191993		
	180948	184940		
	194001	181724		
	196941	177627		
	195804	185261		
	193867	187648		
<b>Promedio</b>	<b>192966</b>	<b>184866</b>	<b>95.802</b>	<b>1.059</b>
<b>Control medio (3.00 µg/mL)</b>	1604914	1515780		
	1675294	1625614		
	1544559	1619006		
	1656635	1555387		
	1637084	1542266		
	1548396	1608911		
<b>Promedio</b>	<b>1611147</b>	<b>1577827</b>	<b>97.932</b>	<b>1.141</b>
<b>Control alto (4.80 µg/mL)</b>	2604256	2596467		
	2587902	2502598		
	2604106	2455825		
	2658722	2380036		
	2358027	2416863		
	2584376	2544881		
<b>Promedio</b>	<b>2566232</b>	<b>2482778</b>	<b>96.748</b>	<b>0.082</b>
<b>Promedio Global</b>			<b>96.827</b>	<b>0.761</b>

Por otro lado el recobro absoluto del E.I. (Naproxeno) fue del 75.747%. Los resultados se muestran en la tabla 10.

<b>Tabla 10. Recobro absoluto de Naproxeno (E.I.) en plasma</b>			
<b>Concentración</b>	<b>ÁREAS</b>		<b>Recobro</b>
	<b>Sistema</b>	<b>Método</b>	
<b>1.33 µg/mL</b>	1960022	1482109	
	1832839	1421760	
	1953779	1434422	
	1966763	1445065	
	1922131	1445248	
	1962957	1441718	
	1894764	1376353	
	1984573	1498457	
	1845486	1513671	
	1955458	1414813	
	1944368	1422437	
	1842798	1511664	
	1950623	1549097	
	1969276	1453143	
	1976825	1436256	
	1951637	1386995	
	1750328	1439210	
	1942371	1541358	
<b>Promedio</b>	<b>1922611</b>	<b>1456321</b>	<b>75.747</b>

#### 4.2.7 Límite de cuantificación

La sensibilidad del método fue determinada a partir de la concentración mínima cuantificable o límite de cuantificación (LC), el valor considerado como tal fue de 0.12µg/mL (C.V. %= 3.687 y Desv. Abs%= 8.750). En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos.

<b>Tabla 11. Evaluación del límite de cuantificación de valsartán</b>	
<b>Muestra</b>	<b>Concentración recuperada</b>
	<b>Concentración (0.12 µg/mL)</b>
<b>1</b>	0.109
<b>2</b>	0.104
<b>3</b>	0.107
<b>4</b>	0.110
<b>5</b>	0.116
<b>6</b>	0.111
<b>Promedio</b>	<b>0.110</b>
<b>D. E</b>	<b>0.004</b>
<b>C. V (%)</b>	<b>3.687</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>8.750</b>

La Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, indica que el LC es la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor promedio no se desvía más del  $\pm 20\%$  del valor nominal (concentración adicionada), con un coeficiente de variación menor o igual que 20%.

#### 4.2.8 Límite de detección

Se consideró como límite de detección la concentración de 0.06 µg/mL ya que a pesar de que cumple con los criterios para considerarse límite de cuantificación, presenta una relación señal/ruido de 3.58. Lo anterior de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, indica 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%. Los resultados se muestran en la tabla 12

<b>Tabla 12. Evaluación del límite de detección para valsartán</b>	
<b>Muestra</b>	<b>Concentración recuperada</b>
	<b>Concentración (0.06 µg/mL)</b>
<b>1</b>	0.062
<b>2</b>	0.059
<b>3</b>	0.056
<b>4</b>	0.055
<b>5</b>	0.056
<b>6</b>	0.051
<b>Promedio</b>	<b>0.057</b>
<b>D. E</b>	<b>0.004</b>
<b>C. V (%)</b>	<b>6.599</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>5.833</b>

Aunque la desviación absoluta es menor al 20%. La señal respuesta/ ruido es solo de 3.48

La siguiente figura muestra el cromatograma característico de las muestras pertenecientes al límite de cuantificación y de detección.

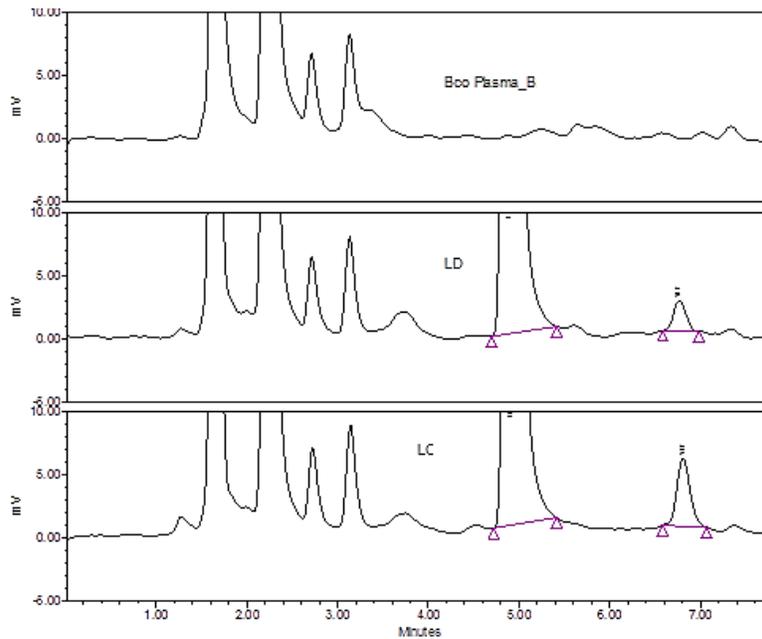


Figura 8. Límite de detección (LD) con una concentración de 0.06 µg/mL de valsartán, límite de cuantificación (LC) a una concentración de 0.12 µg/mL y blanco de plasma

#### 4.2.9 Estabilidad

Los resultados de la prueba de estabilidad para valsartán se obtuvieron evaluando la concentración recuperada del compuesto en la matriz biológica. En base a ello se tienen.

a) **Temperatura ambiente (23-24°C) después de 48 horas.** En las tablas 13 y 14 se muestran los resultados del análisis de las muestras mantenidas a temperatura ambiente. Se puede observar que las muestras son estables hasta 48 horas, ya que las muestras presentan una desviación absoluta menor a 15%.

<b>Tabla 13. Estabilidad de valsartán en plasma (temperatura ambiente de 23-24 C/ 24 h)</b>			
<b>Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Control bajo (0.36 µg/mL)</b>	<b>Control medio (3.00 µg/mL)</b>	<b>Control alto (4.80 µg/mL)</b>
1	0.356	3.020	4.748
2	0.371	3.033	4.748
3	0.359	3.042	4.665
4	0.355	2.928	4.691
5	0.347	2.890	4.673
6	0.360	2.941	4.593
<b>Promedio</b>	<b>0.358</b>	<b>2.976</b>	<b>4.686</b>
<b>D.E</b>	<b>0.008</b>	<b>0.064</b>	<b>0.058</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>2.192</b>	<b>2.150</b>	<b>1.243</b>
<b>Concentraciones plasmáticas después de 24h</b>			
1	0.346	2.699	4.435
2	0.346	2.717	4.811
3	0.336	2.734	4.448
4	0.331	2.775	4.387
5	0.345	2.842	4.327
6	0.313	2.880	4.335
<b>Promedio</b>	<b>0.336</b>	<b>2.775</b>	<b>4.457</b>
<b>D.E</b>	<b>0.013</b>	<b>0.073</b>	<b>0.180</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>3.844</b>	<b>2.616</b>	<b>4.045</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>6.099</b>	<b>6.760</b>	<b>4.890</b>

<b>Tabla 14. Estabilidad de valsartán en plasma (temperatura ambiente de 23-24C /48 h)</b>			
<b>Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Control bajo (0.36 µg/mL)</b>	<b>Control medio (3.00 µg/mL)</b>	<b>Control alto (4.80 µg/mL)</b>
1	0.356	3.020	4.748
2	0.371	3.033	4.748
3	0.359	3.042	4.665
4	0.355	2.928	4.691
5	0.347	2.890	4.673
6	0.360	2.941	4.593
<b>Promedio</b>	<b>0.358</b>	<b>2.976</b>	<b>4.686</b>
<b>D.E</b>	<b>0.008</b>	<b>0.064</b>	<b>0.058</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>2.192</b>	<b>2.150</b>	<b>1.243</b>
<b>Concentraciones plasmáticas después de 48 h</b>			
1	0.323	2.799	4.445
2	0.306	2.840	4.508
3	0.299*	2.803	4.552
4	0.308	2.665	4.497
5	0.373	2.638	4.516
6	0.361	2.694	4.372
<b>Promedio</b>	<b>0.334</b>	<b>2.740</b>	<b>4.482</b>
<b>D.E</b>	<b>0.031</b>	<b>0.084</b>	<b>0.064</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>9.260</b>	<b>3.080</b>	<b>1.426</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>6.648</b>	<b>7.925</b>	<b>4.367</b>

\* Valor que excede el 15% de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos.

**b) Estabilidad en refrigeración (1-3°C) después de 48 horas.** En las tablas 15 y 16 se muestran los resultados del análisis de las muestras conservadas en refrigeración. Se puede observar que las muestras almacenadas en refrigeración son 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

<b>Tabla 15. Estabilidad de valsartán en plasma (refrigeración de 1 – 3°C)</b>			
<b>Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Control bajo (0.36 µg/mL)</b>	<b>Control medio (3.00 µg/mL)</b>	<b>Control alto (4.80 µg/mL)</b>
1	0.366	3.648*	4.659
2	0.427*	3.157	4.716
3	0.370	3.061	4.804
4	0.358	3.071	5.020
5	0.378	2.960	4.925
6	0.393	2.953	4.954
<b>Promedio</b>	<b>0.373</b>	<b>3.040</b>	<b>4.846</b>
<b>D.E</b>	<b>0.013</b>	<b>0.085</b>	<b>0.143</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>3.567</b>	<b>2.803</b>	<b>2.944</b>
<b>Concentraciones plasmáticas después de 24 h</b>			
1	0.400	3.289	4.777
2	0.410	3.218	5.133
3	0.404	3.194	5.104
4	0.403	3.292	5.132
5	0.412	3.202	4.973
6	0.411	3.153	4.860
<b>Promedio</b>	<b>0.407</b>	<b>3.225</b>	<b>4.997</b>
<b>D.E</b>	<b>0.005</b>	<b>0.055</b>	<b>0.152</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>1.221</b>	<b>1.716</b>	<b>3.047</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>9.026</b>	<b>6.061</b>	<b>3.099</b>

\* Valor que excede el 15% de su concentración nominal y que no fue tomado en cuenta para los cálculos.

<b>Tabla 16. Estabilidad de valsartán en plasma (refrigeración de 1 – 3°C)</b>			
<b>Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Control bajo (0.36 µg/mL)</b>	<b>Control medio (3.00 µg/mL)</b>	<b>Control alto (4.80 µg/mL)</b>
1	0.356	3.020	4.748
2	0.371	3.033	4.748
3	0.359	3.042	4.665
4	0.355	2.928	4.691
5	0.347	2.890	4.673
6	0.360	2.941	4.593
<b>Promedio</b>	<b>0.358</b>	<b>2.976</b>	<b>4.686</b>
<b>D.E</b>	<b>0.008</b>	<b>0.064</b>	<b>0.058</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>2.192</b>	<b>2.150</b>	<b>1.243</b>
<b>Concentraciones plasmáticas después de 48 h</b>			
1	0.347	2.860	4.276
2	0.390	2.802	4.490
3	0.377	2.742	4.403
4	0.360	2.874	4.500
5	0.373	2.808	4.479
6	0.382	2.740	4.226
<b>Promedio</b>	<b>0.372</b>	<b>2.804</b>	<b>4.396</b>
<b>D.E</b>	<b>0.016</b>	<b>0.057</b>	<b>0.118</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>4.200</b>	<b>2.017</b>	<b>2.690</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>3.771</b>	<b>5.758</b>	<b>6.202</b>

c) **Estabilidad ciclos congelación-descongelación (-70C).** En las tablas 17 a 19 se muestran los resultados del análisis de las muestras sometidas después de tres ciclos de congelación-descongelación.

<b>Tabla 17. Estabilidad de valsartán en plasma (ciclos congelación-descongelación)</b>			
<b>Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Control bajo (0.36 µg/mL)</b>	<b>Control medio (3.00 µg/mL)</b>	<b>Control alto (4.80 µg/mL)</b>
1	0.366	3.648*	4.659
2	0.427*	3.157	4.716
3	0.370	3.061	4.804
4	0.358	3.071	5.020
5	0.378	2.960	4.925
6	0.393	2.953	4.954
<b>Promedio</b>	<b>0.373</b>	<b>3.040</b>	<b>4.846</b>
<b>D.E</b>	<b>0.013</b>	<b>0.085</b>	<b>0.143</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>3.567</b>	<b>2.803</b>	<b>2.944</b>
<b>Concentraciones plasmáticas después del CICLO 1</b>			
1	0.407	3.424	4.345
2	0.401	3.336	4.603
3	0.380	3.180	4.560
4	0.414	2.944	4.252
5	0.413	3.117	4.447
6	0.391	3.119	4.517
<b>Promedio</b>	<b>0.401</b>	<b>3.187</b>	<b>4.454</b>
<b>D.E</b>	<b>0.013</b>	<b>0.171</b>	<b>0.134</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>3.327</b>	<b>5.381</b>	<b>3.015</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>7.507</b>	<b>4.811</b>	<b>8.095</b>

\* Valor que excede el 15 % de su concentración nominal por lo que no se toman en cuenta para los cálculos

<b>Tabla 18. Estabilidad de valsartán en plasma (ciclos congelación-descongelación)</b>			
<b>Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Control bajo (0.36 µg/mL)</b>	<b>Control medio (3.00 µg/mL)</b>	<b>Control alto (4.80 µg/mL)</b>
1	0.364	3.001	4.362
2	0.352	2.918	4.708
3	0.365	2.678	4.704
4	0.355	2.992	4.700
5	0.359	2.923	4.615
6	0.351	2.992	4.473
<b>Promedio</b>	<b>0.358</b>	<b>2.917</b>	<b>4.594</b>
<b>D.E</b>	<b>0.006</b>	<b>0.123</b>	<b>0.145</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>1.674</b>	<b>4.211</b>	<b>3.158</b>
<b>Concentraciones plasmáticas después del CICLO 2</b>			
1	0.346	2.909	4.745
2	0.316	2.580	4.006*
3	0.335	2.699	4.415
4	0.331	2.839	4.865
5	0.337	2.644	4.398
6	0.313	2.818	4.556
<b>Promedio</b>	<b>0.330</b>	<b>2.748</b>	<b>4.596</b>
<b>D.E</b>	<b>0.013</b>	<b>0.127</b>	<b>0.205</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>3.874</b>	<b>4.618</b>	<b>4.461</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>7.829</b>	<b>5.799</b>	<b>0.046</b>

\* Valor que excede el 15 % de su concentración nominal por lo que no se toman en cuenta para los cálculos

<b>Tabla 19. Estabilidad de valsartán en plasma (ciclos congelación-descongelación)</b>			
<b>Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Control bajo (0.36 µg/mL)</b>	<b>Control medio (3.00 µg/mL)</b>	<b>Control alto (4.80 µg/mL)</b>
1	0.332	2.713	4.303
2	0.328	2.755	4.443
3	0.335	2.678	4.521
4	0.314	2.637	4.354
5	0.302*	2.815	4.261
6	0.312	2.701	4.290
<b>Promedio</b>	<b>0.324</b>	<b>2.717</b>	<b>4.362</b>
<b>D.E</b>	<b>0.011</b>	<b>0.062</b>	<b>0.101</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>3.253</b>	<b>2.284</b>	<b>2.310</b>
<b>Concentraciones plasmáticas después del CICLO 3</b>			
1	0.329	2.823	4.137
2	0.320	2.817	4.200
3	0.311	2.702	4.155
4	0.305*	2.774	4.183
5	0.318	2.576	4.496
6	0.319	2.536*	4.456
<b>Promedio</b>	<b>0.319</b>	<b>2.738</b>	<b>4.271</b>
<b>D.E</b>	<b>0.006</b>	<b>0.103</b>	<b>0.161</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>2.012</b>	<b>3.755</b>	<b>3.761</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>1.481</b>	<b>0.806</b>	<b>2.082</b>

\* Valor que excede el 15 % de su concentración nominal por lo que no se toman en cuenta para los cálculos

Como se puede observar la prueba cumple 3 ciclos de congelación/descongelación al presentarse coeficientes de variación menores al 15% y presentar una diferencia no mayor al 15% con respecto al valor de referencia (muestras recién preparadas).

d) **Estabilidad de la muestra procesada.** Los resultados la estabilidad de la muestra procesada se presentan en las tablas 20 y 21s, en las cuales se puede observar que valsartán fue estable en la solución de inyección durante 48 horas después de su preparación.

<b>Tabla 20. Estabilidad de valsartán en muestra procesada (automuestreador a 21°C)</b>			
<b>Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Control bajo (0.36 µg/mL)</b>	<b>Control medio (3.00 µg/mL)</b>	<b>Control alto (4.80 µg/mL)</b>
1	0.366	3.648*	4.659
2	0.427*	3.157	4.716
3	0.370	3.061	4.804
4	0.358	3.071	5.020
5	0.378	2.960	4.925
6	0.393	2.953	4.954
<b>Promedio</b>	<b>0.373</b>	<b>3.040</b>	<b>4.846</b>
<b>D.E</b>	<b>0.013</b>	<b>0.085</b>	<b>0.143</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>3.567</b>	<b>2.803</b>	<b>2.944</b>
<b>Concentraciones plasmáticas después de 24 h</b>			
1	0.400	3.289	4.777
2	0.410	3.218	5.133
3	0.404	3.194	5.104
4	0.403	3.292	5.132
5	0.412	3.202	4.973
6	0.411	3.153	4.860
<b>Promedio</b>	<b>0.407</b>	<b>3.225</b>	<b>4.997</b>
<b>D.E</b>	<b>0.005</b>	<b>0.055</b>	<b>0.152</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>1.221</b>	<b>1.716</b>	<b>3.047</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>9.026</b>	<b>6.061</b>	<b>3.099</b>

\* Valor que excede el 15 % de su concentración nominal por lo que no se toman en cuenta para los cálculos.

<b>Tabla 21. Estabilidad de valsartán en muestra procesada (automuestreador a 21°C)</b>			
<b>Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Control bajo (0.36 µg/mL)</b>	<b>Control medio (3.00 µg/mL)</b>	<b>Control alto (4.80 µg/mL)</b>
1	0.356	3.020	4.748
2	0.371	3.033	4.748
3	0.359	3.042	4.665
4	0.355	2.928	4.691
5	0.347	2.890	4.673
6	0.360	2.941	4.593
<b>Promedio</b>	<b>0.358</b>	<b>2.976</b>	<b>4.686</b>
<b>D.E</b>	<b>0.008</b>	<b>0.064</b>	<b>0.058</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>2.192</b>	<b>2.150</b>	<b>1.243</b>
<b>Concentraciones plasmáticas después de 48h</b>			
1	0.347	2.860	4.276
2	0.373	2.802	4.490
3	0.390	2.742	4.403
4	0.377	2.874	4.500
5	0.360	2.808	4.479
6	0.382	2.740	4.226
<b>Promedio</b>	<b>0.372</b>	<b>2.804</b>	<b>4.396</b>
<b>D.E</b>	<b>0.016</b>	<b>0.057</b>	<b>0.118</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>4.200</b>	<b>2.017</b>	<b>2.690</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>3.771</b>	<b>5.758</b>	<b>6.202</b>

- e) **Estabilidad largo plazo (congelación -70C).** Los resultados de la estabilidad a largo plazo por 164 días a -70 C para las muestras de valsartán se muestran a continuación. (Tabla 22)

<b>Tabla 22. Estabilidad a largo plazo de valsartán(-70°C)</b>			
<b>Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Control Bajo (0.36 µg/mL)</b>	<b>Control Medio (0.3 µg/mL)</b>	<b>Control Alto (4.8 µg/mL)</b>
1	0.360	2.940	4.492
2	0.359	2.926	4.698
3	0.363	2.977	4.579
4	0.313	2.975	4.582
5	0.363	2.966	4.563
6	0.372	3.007	4.777
<b>Promedio</b>	<b>0.355</b>	<b>2.965</b>	<b>4.615</b>
<b>D.E.</b>	<b>0.021</b>	<b>0.029</b>	<b>0.103</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>5.938</b>	<b>0.972</b>	<b>2.238</b>
<b>Concentraciones plasmáticas después de 164 días</b>			
1	0.373	2.596	4.223
2	0.355	2.694	4.350
3	0.325	2.644	4.378
4	0.324	2.742	4.391
5	0.336	2.675	4.315
6	0.325	2.790	4.194
<b>Promedio</b>	<b>0.340</b>	<b>2.690</b>	<b>4.309</b>
<b>D.E.</b>	<b>0.020</b>	<b>0.069</b>	<b>0.082</b>
<b>C.V. (%)</b>	<b>5.940</b>	<b>2.570</b>	<b>1.909</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>4.319</b>	<b>9.274</b>	<b>6.645</b>

- f) **Estabilidad de las soluciones estándar** en refrigeración (0-4°C). Para evaluar la estabilidad de las soluciones estándar con las que se preparan las curvas de calibración y muestras control de calidad, se comparó el área promedio del pico correspondiente a las soluciones recién preparadas y aquellas preparadas 7 días antes y que fueron almacenadas en refrigeración a 0-4°C. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 23 y 24

<b>Tabla 23. Estabilidad de las soluciones estándar de valsartán 1.2 µg/mL</b>					
<b>Muestra</b>	<b>Inyección</b>	<b>Área</b>	<b>T.R (min)</b>	<b>Simetría de Pico</b>	<b>Platos Teóricos</b>
Estándar 1.2 µg/mL D1	1	835730	6.670	1.320	12577
Estándar 1.2 µg/mL D1	2	830800	6.677	1.313	12455
Estándar 1.2 µg/mL D1	3	838561	6.680	1.316	12519
Estándar 1.2 µg/mL D1	4	833253	6.669	1.326	12455
Estándar 1.2 µg/mL D1	5	837077	6.671	1.324	12399
Estándar 1.2 µg/mL D1	6	837145	6.673	1.319	12269
<b>PROMEDIO</b>		<b>835427.66 7</b>	<b>6.673</b>	<b>1.320</b>	<b>12445.667</b>
<b>D.E.</b>		<b>2888.709</b>	<b>0.004</b>	<b>0.005</b>	<b>106.009</b>
<b>C.V. (%)</b>		<b>0.346</b>	<b>0.065</b>	<b>0.367</b>	<b>0.852</b>
<b>Muestra</b>	<b>Inyección</b>	<b>Área</b>	<b>T.R (min)</b>	<b>Simetría de pico</b>	<b>Platos teóricos</b>
Estándar 1.2 µg/mL D7	1	832403	6.677	1.300	12413
Estándar 1.2 µg/mL D7	2	843530	6.686	1.329	12668
Estándar 1.2 µg/mL D7	3	845996	6.690	1.321	12355
Estándar 1.2 µg/mL D7	4	837502	6.681	1.313	12570
Estándar 1.2 µg/mL D7	5	845073	6.682	1.323	12553
Estándar 1.2 µg/mL D7	6	854524	6.690	1.336	12332
<b>PROMEDIO</b>		<b>843171.33</b>	<b>6.68</b>	<b>1.32</b>	<b>12481.83</b>
<b>D.E.</b>		<b>7598.751</b>	<b>0.005</b>	<b>0.013</b>	<b>134.737</b>
<b>C.V. (%)</b>		<b>0.901</b>	<b>0.078</b>	<b>0.955</b>	<b>1.079</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>		<b>0.927</b>	<b>0.165</b>	<b>0.051</b>	<b>0.291</b>

D1 Muestras recién preparadas

D7 Muestras almacenadas en refrigeración por 7 días

<b>Tabla 24. Estabilidad de las soluciones estándar de naproxeno 4 µg/mL</b>					
<b>Muestra</b>	<b>Inyección</b>	<b>Área</b>	<b>T.R (min)</b>	<b>Simetría de Pico</b>	<b>Platos Teóricos</b>
Estándar 4 µg/mL D1	1	2530531	4.849	1.414	9121
Estándar 4 µg/mL D1	2	2587122	4.853	1.420	9195
Estándar 4 µg/mL D1	3	2592848	4.843	1.401	9206
Estándar 4 µg/mL D1	4	2541784	4.852	1.415	9176
Estándar 4 µg/mL D1	5	2535635	4.852	1.395	9236
Estándar 4 µg/mL D1	6	2539943	4.847	1.407	9141
<b>PROMEDIO</b>		<b>2554643.833</b>	<b>4.849</b>	<b>1.409</b>	<b>9179.167</b>
<b>D.E.</b>		<b>27707.919</b>	<b>0.004</b>	<b>0.009</b>	<b>42.546</b>
<b>C.V. (%)</b>		<b>1.085</b>	<b>0.079</b>	<b>0.670</b>	<b>0.464</b>
<b>Muestra</b>	<b>Inyección</b>	<b>Área</b>	<b>T.R (min)</b>	<b>Simetría de pico</b>	<b>Platos teóricos</b>
Estándar 4 µg/mL D7	1	2530205	4.845	1.418	9274
Estándar 4 µg/mL D7	2	2585129	4.850	1.393	9184
Estándar 4 µg/mL D7	3	2552522	4.849	1.410	9136
Estándar 4 µg/mL D7	4	2553710	4.849	1.413	9075
Estándar 4 µg/mL D7	5	2530151	4.849	1.396	9136
Estándar 4 µg/mL D7	6	2527834	4.851	1.416	9158
<b>PROMEDIO</b>		<b>2546591.833</b>	<b>4.849</b>	<b>1.408</b>	<b>9160.500</b>
<b>D.E.</b>		<b>22188.438</b>	<b>0.002</b>	<b>0.011</b>	<b>66.259</b>
<b>C.V. (%)</b>		<b>0.871</b>	<b>0.042</b>	<b>0.753</b>	<b>0.723</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>		<b>0.315</b>	<b>0.010</b>	<b>0.071</b>	<b>0.203</b>

D1 Muestras recién preparadas

D7 Muestras almacenadas en refrigeración por 7 días

#### 4.2.10 Tolerancia

a) **Prueba de Integridad de la dilución (concentración dentro de la curva de calibración).** Se evaluó la capacidad del método para cuantificar muestras empleando una dilución 1:2 de la muestra. Se consideró que la prueba era aceptable si la diferencia de concentraciones entre las muestras extraídas con el volumen normal y la concentración calculada multiplicando por un factor de dilución de 2 no excedía el 15% del promedio del valor nominal. Los resultados se muestran en la siguiente tabla. (Tabla 25)

<b>Tabla 25. Integridad de la dilución (Concentración dentro de la curva de calibración)</b>	
<b>Valsartán (valor nominal de 4.80 µg/mL)</b>	
<b>Muestra #</b>	<b>Concentración interpolada considerando el factor de dilución de 2</b>
<b>1</b>	4.956
<b>2</b>	4.942
<b>3</b>	4.860
<b>4</b>	4.784
<b>5</b>	4.500
<b>6</b>	4.534
<b>Promedio</b>	<b>4.763</b>
<b>D. E</b>	<b>0.200</b>
<b>C. V (%)</b>	<b>4.207</b>
<b>Desv. Abs. (%)</b>	<b>0.778</b>

Los resultados muestran que se podría realizar una dilución 1:2 sin afectar la precisión y exactitud al cuantificar valsartán en muestras plasmáticas.

**b) Prueba de Integridad de la dilución (concentración por encima de la curva de calibración).** Se realizó esta prueba para el caso en el que durante el estudio se presentaran muestras que superen el límite superior de la curva de calibración. La concentración interpolada y multiplicada por un factor de dilución de 2 no debe desviarse más del  $\pm 15\%$  con respecto al valor nominal con un C.V. menor o igual al  $\pm 15\%$ . Los resultados de la integridad de la dilución para las muestras de valsartán se muestran en la tabla 26.

<b>Tabla 26. Integridad de la dilución (Concentración por encima de la curva de calibración)</b>	
<b>Valsartán (valor nominal de 15.0 <math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	
<b>Muestra #</b>	<b>Concentración interpolada considerando el factor de dilución de 4</b>
<b>1</b>	13.030
<b>2</b>	13.908
<b>3</b>	15.037
<b>4</b>	14.298
<b>5</b>	13.343
<b>6</b>	13.754
<b>Promedio</b>	13.895
<b>D. E</b>	0.713
<b>C. V (%)</b>	5.129
<b>Desv. Abs. (%)</b>	7.367

### 4.3 Etapa clínica

En el estudio clínico participaron 10 voluntarios (5 hombres y 5 mujeres) clínicamente sanos demostrado a través de exámenes de laboratorio.

#### 4.3.1 Estadística demográfica descriptiva

De los voluntarios incluidos en el estudio se calcularon los siguientes parámetros: media, desviación estándar (Desv. Est), error estándar (E. E.) 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) para los voluntarios que ingresaron al estudio (tabla 27). Los datos demográficos individuales se encuentran en el anexo I.

<b>Tabla 27. Variables demográficas</b>								
Variable	Genero	Media	D. E.	E. E.	Min	Mediana	Max	CV%
Edad (años)	Mujeres	29.8	8.758	3.917	22	29	43	29.389
	Hombres	26.6	5.367	2.400	21	27	35	20.175
	Global	28.2	7.052	2.230	21	28	43	25.008
Peso (Kg)	Mujeres	55.68	5.046	2.257	52	52.2	62.5	9.063
	Hombres	65.56	5.976	2.673	59	62.5	72.5	9.116
	Global	60.62	7.369	2.330	52	61.1	72.5	12.157
Talla (cm)	Mujeres	155.0	7.382	3.302	147	154	164	4.763
	Hombres	168.2	4.147	1.855	163	168	174	2.466
	Global	161.6	8.959	2.833	147	163.5	174	5.544
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	Mujeres	23.206	1.873	0.838	20.14	23.42	25.17	8.072
	Hombres	23.13	1.126	0.504	22.14	22.68	24.67	4.869
	Global	23.168	1.458	0.461	20.14	23.33	25.17	6.291

### 4.3.2 Estadística descriptiva de los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo

En la tabla 28 se muestran los resultados obtenidos en la estadística descriptiva para los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo de valsartán, el número de voluntarios considerado para el análisis estadístico fue de 10. Los datos individuales se muestran en el anexo II.

**Tabla 28. Estadística de los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo.**

Tiempo (h)	N	Promedio	D.E.	E.E	Min	Mediana	Max	Rango	C.V.%
0	10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-
0.25	10	0.093	0.179	0.057	0.000	0.000	0.550	0.550	51.95
0.5	10	0.752	0.693	0.219	0.000	0.595	2.220	2.220	108.47
0.75	10	1.752	1.204	0.381	0.390	1.48	4.100	3.710	145.56
1	10	2.657	1.379	0.436	0.730	2.505	4.970	4.240	192.67
1.5	10	3.776	1.905	0.602	1.150	3.595	7.490	6.340	198.20
2	10	4.099	2.094	0.662	1.510	3.795	8.340	6.830	195.73
2.5	10	4.163	2.058	0.651	1.990	3.835	8.480	6.490	202.30
3	10	4.483	2.493	0.789	1.90	3.755	9.590	7.690	179.78
3.5	10	4.917	2.869	0.907	2.190	4.045	11.140	8.950	171.37
4	10	6.227	3.736	1.182	2.500	5.475	12.120	9.620	166.65
5	10	4.556	2.481	0.785	1.830	4.84	8.480	6.650	183.63
6	10	2.671	1.342	0.425	1.010	2.605	5.090	4.080	198.96
8	10	1.586	0.850	0.269	0.540	1.455	3.590	3.050	186.51
10	10	0.949	0.434	0.137	0.350	0.915	1.900	1.550	218.58
12	10	0.613	0.275	0.087	0.220	0.595	1.230	1.010	223.17
17	10	0.249	0.132	0.042	0.000	0.250	0.540	0.540	189.31
22	10	0.153	0.071	0.023	0.000	0.160	0.290	0.290	213.98
36	10	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-

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

Con la finalidad de visualizar el comportamiento farmacocinético de valsartán, se presentan las gráficas de concentración plasmática promedio con respecto al tiempo (figuras 9 y 10). En el anexo III, se presentan los perfiles farmacocinéticos para cada voluntario.

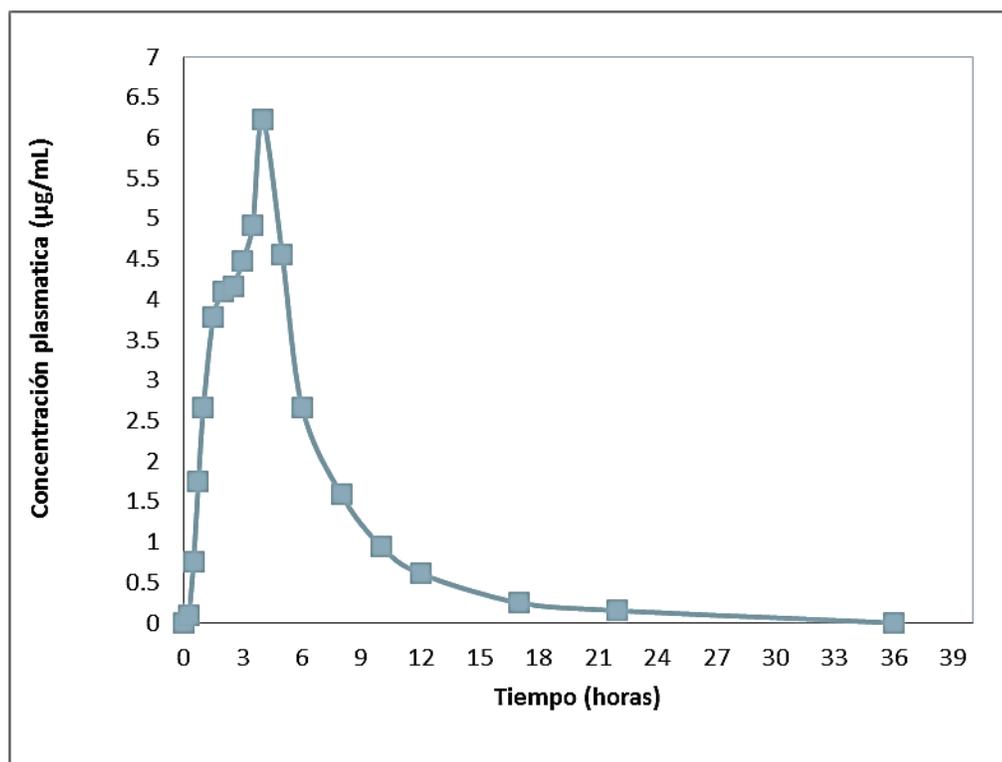


Figura 9. Perfil farmacocinético promedio de valsartán en escala normal.

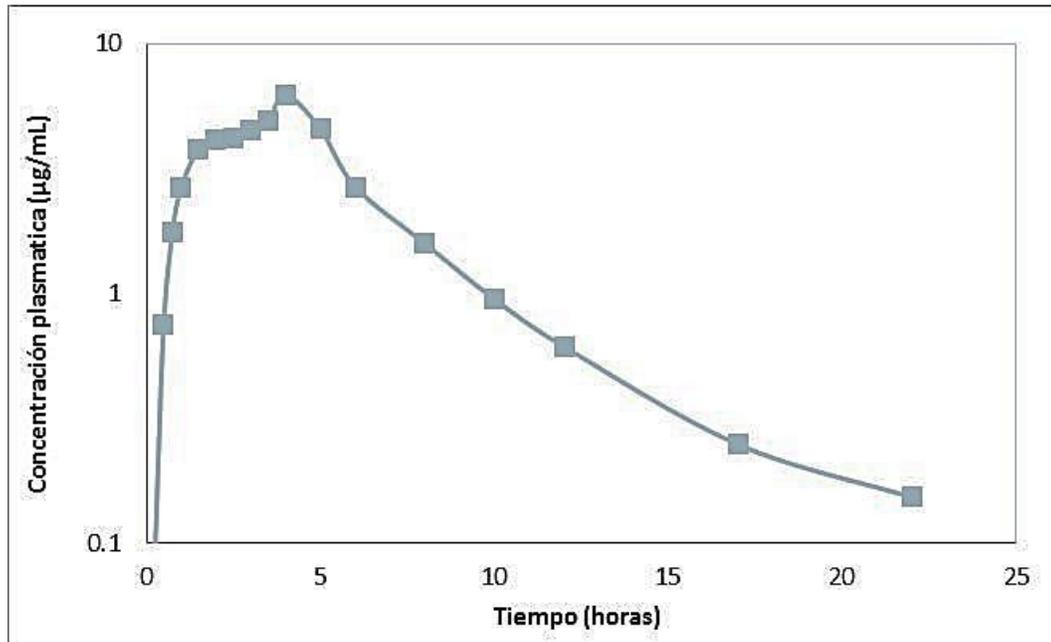


Figura 10. Perfil farmacocinético promedio de valsartán en escala semilogarítmica.

#### 4.3.4 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 29. Los datos individuales se incluyen en el anexo IV.

<b>Tabla 29. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos, para los voluntarios del estudio piloto de valsartán</b>								
	<b>Promedio</b>	<b>D.E.</b>	<b>E.E</b>	<b>Min</b>	<b>Mediana</b>	<b>Max</b>	<b>Rango</b>	<b>C.V.%</b>
Cmax (µg/mL)	6.746	3.322	1.051	2.5	6.41	12.12	9.62	49.247
ABC 0-t (h*µg/mL)	34.373	16.347	5.170	13.67	31.455	69.05	55.38	47.559
ABC 0-inf (h*µg/mL)	35.469	16.655	5.267	14.63	32.565	71.11	56.48	46.958
% ABC extrapolada	3.455	1.438	0.455	2.04	2.96	6.52	4.48	41.624
Vd/F (L)	20.01075	17.275	5.463	3.455	20.5595	35.469	32.014	86.329
Cl/F (L/h)	10.964	5.202	1.645	4.5	10.055	21.88	17.38	47.445
ABCM 0-t (h*h*µg/mL)	193.315	92.658	29.301	59.12	193.775	393.28	334.16	47.931
ABCM 0-inf (h*h*µg/mL)	223.533	103.963	32.876	74.73	225.57	452.99	378.26	46.509
TMR 0-t (h)	5.607	0.748	0.236	4.32	5.57	7.15	2.83	13.336
TMR 0-inf (h)	6.325	0.856	0.271	5.11	6.175	7.97	2.86	13.539
Ke (1/h)	0.1652	0.0336	0.011	0.124	0.1595	0.229	0.105	20.312
Vida media de Ke (h)	4.345	0.8326	0.263	3.03	4.38	5.57	2.54	19.162

## 5. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico para cuantificar valsartán en plasma humano empleando una técnica por precipitación de proteínas, la cual es sencilla y rápida. El método analítico desarrollado para cuantificar valsartán en plasma fue validado de acuerdo a los parámetros de validación establecidos en la norma oficial NOM-177-SSA1-1998 demostrando ser:

- Lineal, preciso y exacto en un rango de concentraciones de 0.6 a 6 µg/mL.
- Selectivo, al no presentarse interferencias al tiempo de retención de valsartán ni de su estándar interno (naproxeno)
- Estable a temperatura ambiente (23-24 C) en muestra plasmática durante 48 horas.
- Estable en refrigeración (1-3 C) en muestra plasmática durante 48 horas.
- Estable a tres ciclos de congelación-descongelación.
- La muestra plasmática fue estable en congelación (-70C) durante 164 días.
- La muestra procesada almacenada en el automuestreador (20C) fue estable por 48 horas.
- Las soluciones estándar poseen una estabilidad de 7 días.
- Exacto y repetible cuando se diluye la muestra utilizando un volumen de muestra de 50µL por arriba de la curva y de 100µL dentro del rango de la curva.
- Exacto y repetible cuando se utilizan muestras plasmáticas lipémicas y hemolizadas.
- Recobro del 96% para valsartán y de 76% para naproxeno.

Por lo tanto, se empleó el método en un estudio piloto, cuya aplicación nos permitió una adecuada caracterización de los parámetros farmacocinéticos principales en población mexicana, obteniéndose los siguientes valores:  $T_{máx} 3.7 \pm 0.9775$  (h),  $C_{máx} 6.746 \pm 3.322$  (µg/mL),  $ABC_{0-}$   $34.373 \pm 16.347$  (h\*ng/mL),  $ABC_{0-inf} 35.469 \pm 16.655$  (h\*ng/mL),  $ke 0.1652 \pm 0.0336$  (1/h), y  $t_{1/2} 4.345 \pm 0.8326$  (h).

Una vez que se analizan estos resultados se considera que pese a que el método demostró ser confiable es necesario que se ajuste el rango de cuantificación desde  $0.6 \mu\text{g/mL}$  hasta  $12 \mu\text{g/mL}$ , esto debido a que el valor de  $C_{\text{max}}$  encontrado es mayor al límite superior de cuantificación haciendo necesaria una dilución de la muestra.

De manera práctica, la modificación más sencilla e inicial sería el adicionar un volumen mayor de acetonitrilo a la muestra, menor volumen de muestra plasmática o una combinación de ambas, evitando así, la saturación del detector.

---

**6. ANEXOS****6.1 ANEXO I. Datos demográficos de los participantes del estudio.**

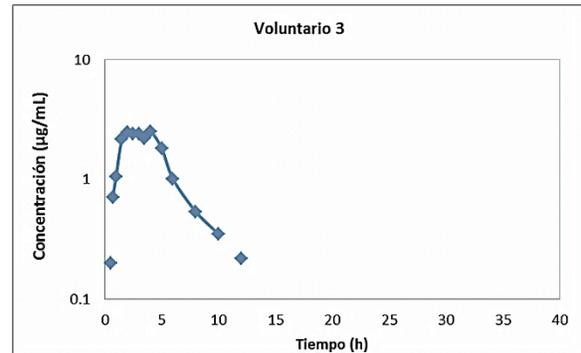
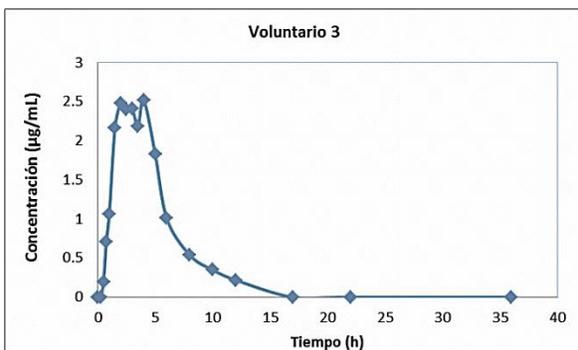
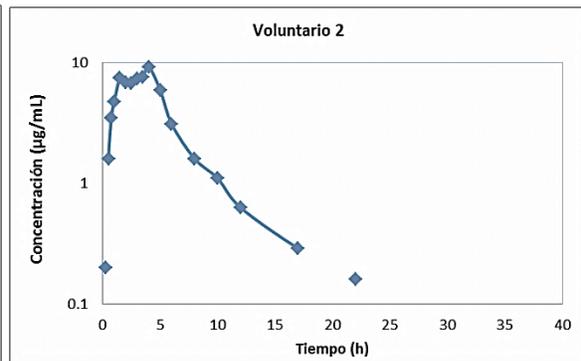
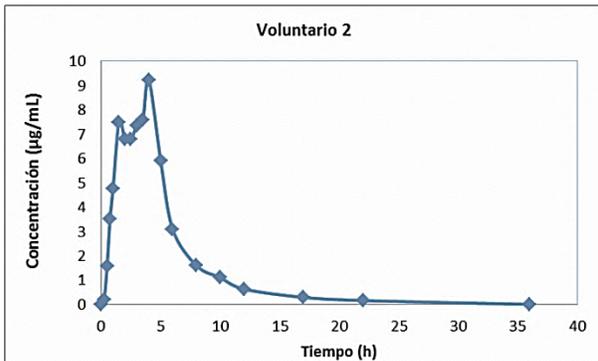
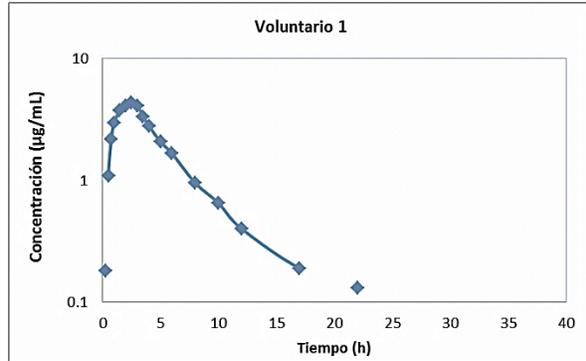
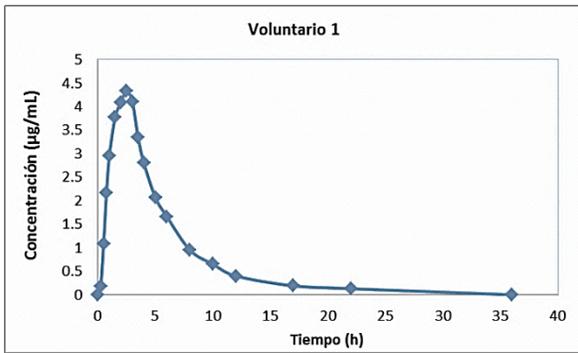
<b>Datos individuales de los participantes en el estudio piloto de valsartán.</b>					
<b>Sexo</b>	<b>Voluntario</b>	<b>Edad (años)</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Talla (cm)</b>	<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>
<b>Mujeres</b>	1	22	62.5	164	23.24
	2	33	52.0	149	23.42
	3	43	59.7	154	25.17
	4	29	52.0	147	24.06
	5	22	52.2	161	20.14
<b>Hombres</b>	6	35	71.3	170	24.67
	7	21	62.5	168	22.14
	8	23	62.5	166	22.68
	9	27	72.5	174	23.95
	10	27	59.0	163	22.21

**6.2 ANEXO II. Concentraciones plasmáticas para Valsartán de cada voluntario a los diferentes tiempos de muestreo.**

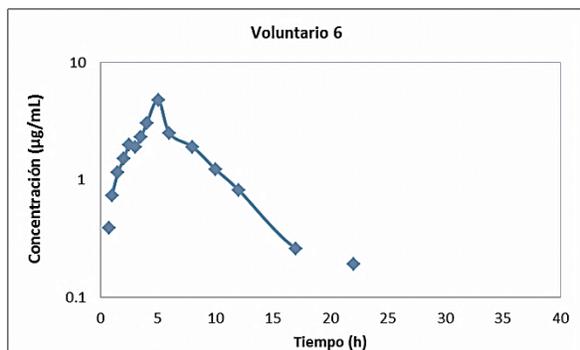
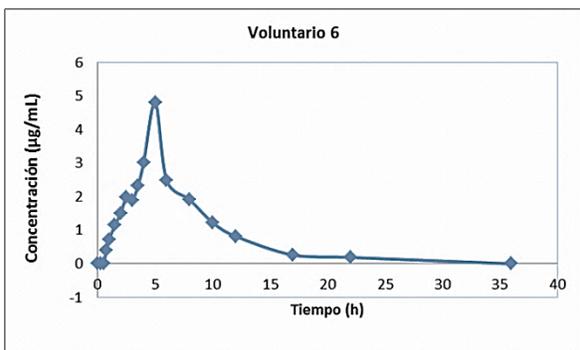
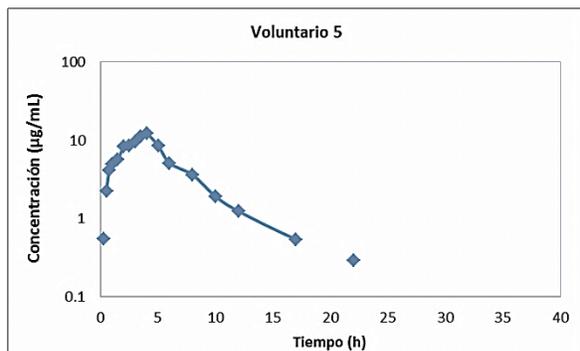
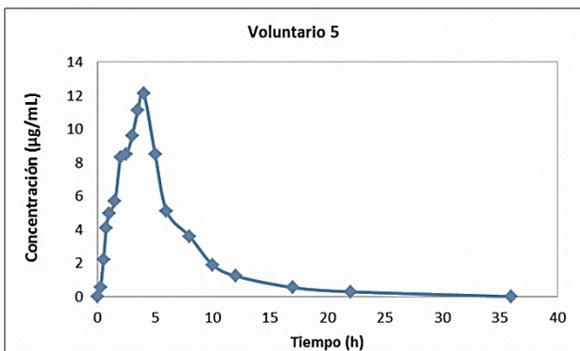
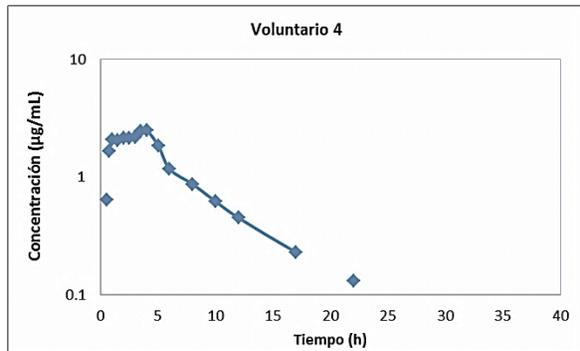
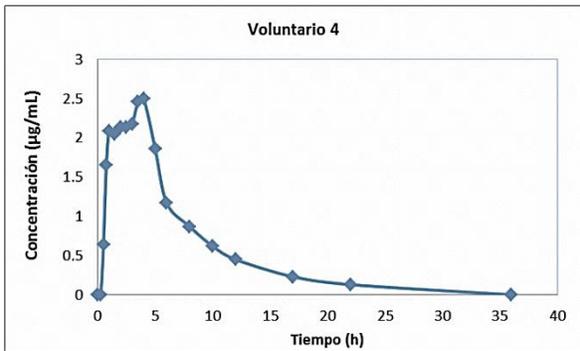
Tiempo (h)	Concentración por voluntario (µg/mL)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<b>0</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>0.25</b>	0.18	0.20	0.00	0.00	0.55	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<b>0.5</b>	1.09	1.59	0.20	0.64	2.22	0.00	0.34	0.25	0.58	0.61
<b>0.75</b>	2.17	3.50	0.71	1.65	4.10	0.39	1.12	0.89	1.31	1.68
<b>1</b>	2.96	4.76	1.06	2.09	4.97	0.73	2.31	2.99	2.00	2.70
<b>1.5</b>	3.77	7.49	2.17	2.05	5.69	1.15	3.62	5.23	3.02	3.57
<b>2</b>	4.09	6.81	2.48	2.14	8.34	1.51	3.89	4.63	3.70	3.40
<b>2.5</b>	4.34	6.78	2.4	2.14	8.48	1.99	4.32	3.79	3.88	3.51
<b>3</b>	4.10	7.36	2.41	2.18	9.59	1.90	5.94	3.41	4.80	3.14
<b>3.5</b>	3.34	7.58	2.19	2.46	11.14	2.32	6.69	3.45	5.36	4.64
<b>4</b>	2.80	9.22	2.52	2.50	12.12	3.03	7.59	3.36	9.61	9.52
<b>5</b>	2.07	5.92	1.83	1.86	8.48	4.81	5.34	2.39	7.99	4.87
<b>6</b>	1.66	3.10	1.01	1.17	5.09	2.49	2.72	1.84	4.45	3.18
<b>8</b>	0.95	1.60	0.54	0.87	3.59	1.91	1.31	1.30	2.01	1.78
<b>10</b>	0.65	1.10	0.35	0.62	1.90	1.23	0.80	0.68	1.13	1.03
<b>12</b>	0.40	0.63	0.22	0.45	1.23	0.82	0.56	0.48	0.70	0.64
<b>17</b>	0.19	0.29	0.00	0.23	0.54	0.26	0.25	0.20	0.25	0.28
<b>22</b>	0.13	0.16	0.00	0.13	0.29	0.19	0.16	0.13	0.16	0.18
<b>36</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

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

**Voluntarios 1 a 3**  
 ( a la izquierda se muestra las tablas en escala normal, mientras que a la derecha en escala semilogarítmica)

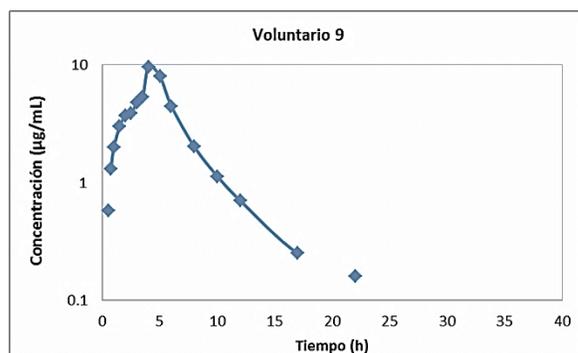
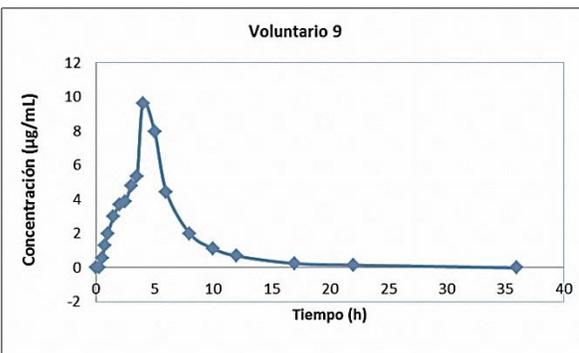
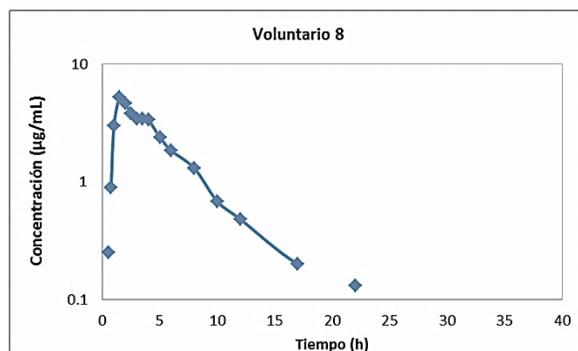
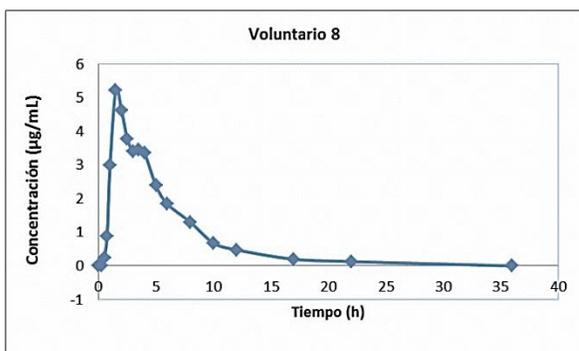
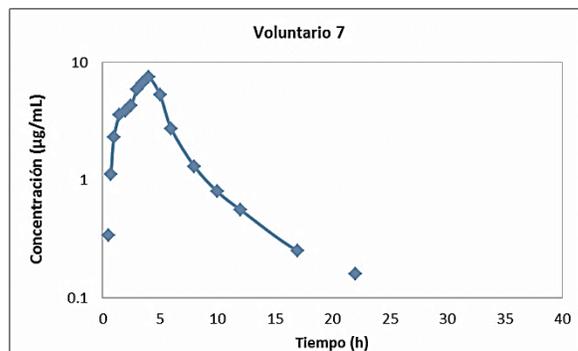
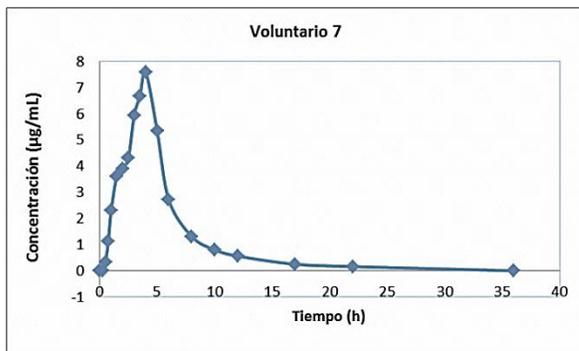


**Voluntarios 4 a 6**  
 ( a la izquierda se muestra las tablas en escala normal, mientras que a la derecha en escala semilogarítmica)



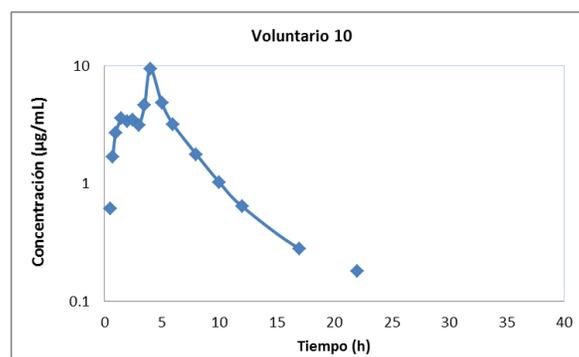
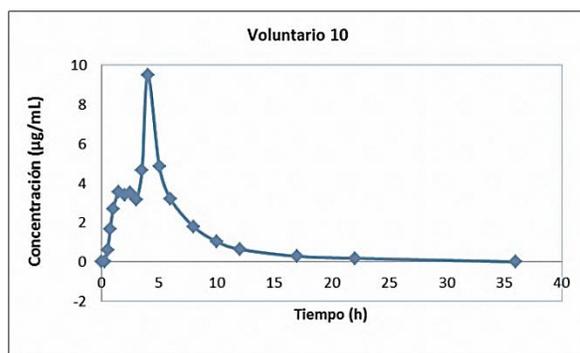
**Voluntarios 7 a 9**

( a la izquierda se muestra las tablas en escala normal, mientras que a la derecha en escala semilogarítmica)



**Voluntario 10**

( a la izquierda se muestra las tablas en escala normal, mientras que a la derecha en escala semilogarítmica)



**ANEXO IV: Parámetros farmacocinéticos de valsartán**

Parámetros farmacocinéticos de valsartán												
Voluntario	C <sub>max</sub> (µg/mL)	ABC 0-t (hµg/mL)	ABC 0-inf (hµg/mL)	% ABC extrapolada	V <sub>d</sub> /F (L)	Cl/F (L/h)	ABCM 0-t (h <sup>2</sup> µg/mL)	ABCM 0-inf (h <sup>2</sup> µg/mL)	TMR 0-t (h)	TMR 0-inf (h)	Ke (1/h)	T <sub>max</sub> (h)
1	4.34	24.32	24.97	2.6	66.45	12.82	127.76	145.38	5.25	5.82	0.193	2.5
2	9.22	48.06	49.26	2.44	47.98	6.5	240.58	275.99	5.01	5.6	0.135	4
3	2.52	13.67	14.63	6.52	95.69	21.88	59.12	74.73	4.32	5.11	0.229	4
4	2.5	18.36	19.41	5.38	132.55	16.49	114.46	145.85	6.23	7.52	0.124	4
5	12.12	69.05	71.11	2.9	31.51	4.5	393.28	452.99	5.7	6.37	0.143	4
6	4.81	26.54	27.63	3.97	66.82	11.58	189.67	220.11	7.15	7.97	0.173	5
7	7.59	36.37	37.5	3.02	62.3	8.53	197.88	231.03	5.44	6.16	0.137	4
8	5.23	26.28	26.96	2.5	61.61	11.87	142.81	161.16	5.43	5.98	0.193	1.5
9	9.61	43.88	44.8	2.04	39.84	7.14	252	277.22	5.74	6.19	0.179	4
10	9.52	37.2	38.42	3.18	57.19	8.33	215.59	250.87	5.8	6.53	0.146	4

---

## 7. Bibliografía

1. [http://journalmex.wordpress.com/2009/01/11/en-mexico-15-millones-de-personas-padecen-hipertension-arterial/\(14-04-2011\)](http://journalmex.wordpress.com/2009/01/11/en-mexico-15-millones-de-personas-padecen-hipertension-arterial/(14-04-2011))
2. MENDOZA GONZALEZ, Celso. Guidelines of the National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez" for the treatment of systemic arterial hypertension. *Arch. Cardiol. Méx.* [Online]. 2006, vol.76, suppl.2 [citado 2011-04-14], pp. 279-284.
3. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00177>
4. <http://www.chemaxon.com/marvin/help/applications/molconvert.html>
5. <http://www.sergas.es/docs/Farmacia/VALSARTÁN.pdf>
6. Carretero, Marián; *Medicamentos de vanguardia: Valsartán*; OFFARM; Noviembre 2001; pág. 154-156
7. <http://www.pharma.us.novartis.com/product/pi/pdf/diovan.pdf>
8. P. Senthamil Selvan, K. Veeran Gowda, U. Mandal, W.D. Sam Solomon, T.K. Pal; *Simultaneous determination of fixed dose combination of nebivolol and valsartán in human plasma by liquid chromatographic-tandem mass spectrometry and its application to pharmacokinetic study* ; *Journal of Chromatography B*, 858 (2007) 143–150
9. Çelebier, Mustafa; Kaynak, Mustafa Sinan; Altınöz, Sacide; *Validated HPLC Method Development: The Simultaneous Analysis of Amlodipine and Valsartán in Samples for Liver Perfusion Studies*; *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy* Volume 28 / Number 1 / January 2008 / pp. 15-30
10. Li, Hao; Wang, Yingwu; Jiang, Yao; *A liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of valsartán and hydrochlorothiazide in human plasma*; *Journal of Chromatography B*, 852 (2007) 436–442
11. Koseki, Nozomu; Kawashita, Hiroto; Hara, Hisanori; *Development and validation of a method for quantitative determination of valsartán in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43 (2007) 1769–1774
12. Daneshtalab, Noriko; Lewanczuk, Richard Z.; Jamali, Fakhreddin; *High-performance liquid chromatographic analysis of angiotensin II receptor antagonist valsartán using a liquid extraction method* ; *Journal of Chromatography B*, 766 (2002) 345–349

13. Gonzalez, Oskar; Iriarte, Gorka; Ferreirós, Nerea; *Optimization and validation of a SPE-HPLC-PDA-fluorescence method for the simultaneous determination of drugs used in combined cardiovascular therapy in human plasma*; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 50 (2009) 630–639
14. Pérez, Milena; Ramírez, Gloria; Pérez, Mauricio; *Validación del método analítico para la determinación de valsartán en plasma humano por HPLC/UV con adición de estándar empleando losartán como estándar interno*; Colombia Médica Vol.38 Nº1, 2007(13-20)
15. Levi, Mikaël; Wuerzne, Grégoire; Ezan, Eric; *Direct analysis of valsartán or candesartan in human plasma and urines by on-line solid phase extraction coupled to electrospray tandem mass spectrometry*; Journal of Chromatography B, 877 (2009) 919–926
16. Brunetto, María del Rosario; Contreras, Yaritza; Clavijo, Sabrina; *Determination of losartan, telmisartan, and valsartán by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatographic system with fluorescence detection*; Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 50 (2009) 194–199
17. Zarghi, Afshin; Shafaati, Alireza; *Rapid Quantification of Valsartán in Human Plasma by Liquid Chromatography using a Monolithic Column and a Fluorescence Detection: Application for Pharmacokinetic Studies*; Sci Pharm. 2008; 76: 439–450; doi:10.3797/scipharm.0808-01
18. Macek J., Klíma J., *Rapid determination of valsartán in human plasma by protein precipitation and high-performance liquid chromatography*; Journal of Chromatography B, 832 (2006) 169–172
19. Wilfried M.A. Niessen; *Liquid Chromatography- Mass Spectrometry*; Chromatography Science Series; Volume 97; Third Edition; Taylor & Francis Group; USA 2006 (pág 3-21)
20. Robards K.; Haddad P.R.; *Principles and practice of modern chromatography method*; Elsevier Ed, 2004 (228-260; 433-452)
21. Skoog Douglas A.; West Donald M.; *Química Analítica*; Séptima edición; Editorial Mc. Graw-Hill; Mexico 2001 (636-714)
22. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados para que realicen las prueba