



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES.
ZARAGOZA

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR
CROMATOGRFIA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA
EL ANÁLISIS DE IDOMETACINA EN PLASMA HUMANO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

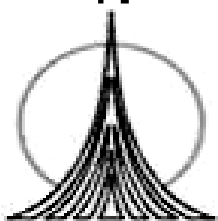
MORALES SIERRA ALEJANDRO RENE

DIRECTOR DE TESIS

M. en C. VICENTE J. HERNÁNDEZ ABAD

ASESOR

M. en C. ELIZABETH G. SÁNCHEZ GONZÁLEZ





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue apoyado con recursos del proyecto PAPIME EN215403: Implementación de técnicas de microescala en la enseñanza experimental de la química en los laboratorios de docencia de la FES Zaragoza.

DEDICATORIA

- *Le dedico esta tesis a mis padres, que siempre me apoyaron y motivaron a seguir adelante a pesar de las dificultades que se presentaran, por ser las personas a las que mas admiro por su ejemplo de lucha y superación. Gracias por ayudarme a alcázar mis metas.*
- *A mis hermanos; Lorena, Fernando, Rodrigo, Gabriel por apoyarme en mi carrera y ser una parte muy importante en mi vida y a mis sobrinos; Ingrid, Miguel Ángel y Axin por ser la alegría de la familia.*
- *A esa persona especial que todo mundo tiene o que esta en busca de ella, que siempre estuvo a mi lado compartiendo tantos momentos buenos y malos, gracias IBETT por tu apoyo incondicional.*
- *A esas personas que se encuentran en un lugar mejor pero que fueron de gran importancia en mi vida, se que algún día nos volveremos a ver. Gracias por todo; Pablo y Carlos.*

AGRADECIMIENTOS.

- *A los sinodales; Q.F.B. José Oscar Gonzáles Moreno, M. en C. Vicente J. Hernández Abad, M. en C. Elizabeth G. Sánchez González, Q.F.B. Ma. Isabel Garduño Pozadas y Q.F.B. Leticia Cecilia Juárez que apoyaron este trabajo.*
- *A los profesores de la carrera los cuales me ayudaron compartiendo sus conocimientos y experiencias así como sus consejos.*
- *A mis buenos amigos: Bernardo, Alan, Poli, Janeth, Selene, Adrián, Alfonso, Paola, Otto, Jessica, Rogelio, Miguel, Carlos, Verónica y Jonathan que me ayudaron a lograr mis metas.*
- *A el profesor Regla que me permitió trabajar en con su equipó de cromatografía de líquidos de alta resolución.*
- *A la UNAM, la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y al Laboratorio de Investigación Farmacéutica, que me permitieron ser parte de esta institución y apoyaron este proyecto. Gracias.*

INDICE.

Resumen	4
1. Introducción.	5
2. Fundamentos.	6
2.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).	6
2.2. Tipos de CLAR.	6
2.2.1. Cromatografía Quiral.	6
2.2.2. Cromatografía de Intercambio Iónico.	6
2.2.3. Cromatografía de Afinidad.	7
2.2.4. Cromatografía de Fase Normal.	7
2.2.5. Cromatografía de Fase Reversa.	7
2.2.6. Cromatografía de Exclusión Molecular.	7
2.3. Soportes de Silica Gel.	8
2.4. Equipo.	8
2.4.1 Sistema de bombeo.	9
2.4.2 Inyectores.	9
2.4.3 Columnas.	10
2.4.4 Detectores.	10
2.5. Estándares de Referencia.	10
2.5.1 Método del estándar externo.	10
2.5.2 Método del estándar interno.	11
2.6. Fase Móvil.	11
2.6.1 Compatibilidad del sistema.	11
2.6.2 Solubilidad de la muestra.	11
2.6.3 Calidad del disolvente.	12
2.6.4 Agua.	12
2.6.5 Preparación de la fase móvil.	12
2.6.6 Desgasificación.	13
2.7. Validación de Métodos Analíticos.	13
2.8. Parámetros de Métodos Analíticos.	14
2.8.1 Selectividad.	14
2.8.2 Limite de detección.	14
2.8.3 Rango.	14
2.8.4 Linealidad.	14
2.8.5 Limite de cuantificación.	14
2.8.6 Precisión.	15
2.8.6.1 Repetibilidad.	15
2.8.6.2 Reproducibilidad intralaboratorio.	15
2.8.7 Exactitud.	15
2.8.8 Recuperación absoluta.	15
2.8.9 Estabilidad.	15
2.8.9.1 Condiciones de almacenamiento.	15
2.8.9.2 Ciclos de congelación – descongelación.	16

2.8.9.3 Otros	16
2.8.10 Tolerancia.	16
2.9. Indometacina.	17
2.9.1. Propiedades Físicas.	17
2.9.2. Indicaciones Terapéuticas.	17
2.9.3. Farmacocinética y Farmacodinamia.	18
2.9.4. Contraindicaciones.	20
2.9.5. Restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia.	20
2.9.6. Reacciones Secundarias y Adversas.	21
2.9.7. Interacciones Medicamentosas.	22
2.9.8. Alteraciones en los resultados de pruebas de laboratorio.	24
2.9.9. Precauciones en la relación con efecto de carcinogenesis, mutagenesis, teratogenesis y fertilidad.	25
2.9.10. Dosis y Vía de Administración.	28
2.9.11. Manifestaciones y manejo de la sobre dosificación o ingesta accidental.	28
2.9.12. Información Complementaria.	29
3. Planteamiento del Problema.	30
4. Objetivos.	31
5. Hipótesis.	32
6. Desarrollo Experimental.	33
6.1. Material y Reactivos.	33
6.2 Metodología.	34
6.2.1 Desarrollo del método Analítico	34
6.2.2 Validación del sistema.	34
6.2.2.1 Linealidad y Precisión del sistema.	34
6.2.3 Validación del método.	35
6.2.3.1 Tratamiento de las muestras.	35
6.2.3.2 Selectividad.	35
6.2.3.3 Rango.	36
6.2.3.4 Limite de detección.	36
6.2.3.5 Linealidad.	36
6.2.3.6 Limite de cuantificación.	36
6.2.3.7 Precisión.	37
6.2.3.7.1 Repetibilidad.	37
6.2.3.7.2 Reproducibilidad intralaboratorio.	37
6.2.3.8 Exactitud.	37
6.2.3.9 Estabilidad.	37
6.2.3.10 Tolerancia.	37
38	
7. Resultados y Análisis de Resultados.	39
7.1. Desarrollo del Método Analítico.	39

7.2. Validación del sistema.	43
7.3 Validación del método.	45
8. Conclusiones.	54
9. Aplicaciones del Proyecto.	55
10. Bibliografía.	56

RESUMEN.

En este trabajo se describe el desarrollo de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa para la cuantificación de indometacina en plasma humano con tiempos de retención menores a 5 minutos, para el desarrollo del método se realizó un barrido de la muestra en metanol para determinar la longitud de onda a la cual tiene su máximo de absorbancia. Se prepararon dos fases móviles, una de metanol – buffer y la otra de acetonitrilo - buffer a tres diferentes proporciones de los disolventes la solución buffer fue de acetatos a un pH de 3.5 con una concentración de 0.01 M y se prepararon soluciones de indometacina y naproxeno sódico como estándar interno a una concentración de 100 µg/ml, se inyectaron las muestras al cromatógrafo con un volumen de 50 µL, a una velocidad de flujo de la fase móvil de 1 mL/min. Con los resultados obtenidos se eligieron las condiciones de trabajo donde los tiempos de retención fueron menores a 5 minutos. Se validó el método dando como resultado que es selectivo, preciso, exacto y reproducible en el intervalo de concentración de indometacina, cumpliendo con los parámetros de la NOM-177-SSA1-1998 para la validación de métodos bioanalíticos.

1. INTRODUCCIÓN.

Los fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos de tipo no esteroidal incluyen muy diversos compuestos que casi nunca tienen relación en su estructura química, pero comparten algunas actividades terapéuticas y efectos colaterales. La salicilina fue el primer ingrediente activo que se aisló de la corteza del sauce en 1829 por Leroux, la corteza del árbol de sauce era utilizada desde hace siglos en varias culturas por los efectos medicinales contra la fiebre. Tiempo después un químico al servicio de la firma Bayer llamado Hoffman prepara el ácido acetilsalicílico el cual tenía efectos antiinflamatorios, y en 1899 se empieza a utilizar dicho compuesto en la medicina con el nombre de aspirina

Los antiinflamatorios no esteroides (AINE) se utilizan para el tratamiento de artritis reumatoide, osteoartritis y dolor; su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX), la cual se encarga de la biosíntesis de prostaglandinas (PGs), prostaciclina y tromboxanos. Esta enzima se encuentra en la mayoría de los tejidos del cuerpo humano y su inhibición da por resultado la inhibición de la biosíntesis de PGs y con ello la inhibición de los efectos benéficos (protección de la pared estomacal, inhibición de la agregación plaquetaria, etc.) así como los no benéficos (dolor, inflamación, etc.) de estas sustancias.

Se requiere del desarrollo de un método analítico que permita determinar la cantidad del componente activo en un medio acuoso, en primera instancia, pero si se trata de una mezcla de sustancias activas, entonces se requiere una técnica de análisis que, además de separar, permita la cuantificación de los principales componentes de la misma; la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), con detección por espectrofotometría ultravioleta-visible (UV), se presenta como una opción adecuada, ya que permite la separación de componentes en una mezcla compleja.

La funcionalidad del método analítico debe garantizarse; para ello, se requiere la validación del mismo. En la Ley General de la Salud, la NOM 177-SSA1-1998, en el punto numero 9 se establece los criterios y requisitos para el análisis químico de muestras biológicas de una prueba de bioequivalencia, se marcan los parámetros mínimos para la validación del método analítico el cual debe cumplir con los parámetros de linealidad, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, estabilidad de la muestra, limite cuantificación y detección, selectividad, y tolerancia obteniéndose información sobre la confiabilidad del método analítico que se emplea en el análisis del principio activo en una forma farmacéutica.

2. FUNDAMENTOS.

2.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)^{1,2,10}

La CLAR es una técnica de separación que se fundamenta en la interacción de un soluto con una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida. La separación se lleva a cabo por partición, adsorción o procesos de intercambio iónico, dependiendo del tipo de fase estacionaria usada. Esta técnica tiene distintas ventajas sobre la cromatografía de gases para el análisis de compuestos orgánicos. Los compuestos a ser analizados son disueltos en un líquido orgánico, y la mayor parte de las separaciones se llevan a cabo a temperatura ambiente. Dado que la mayoría de los fármacos son compuestos no volátiles o térmicamente estables, pueden ser separados sin descomposición o sin la necesidad de sintetizar derivados volátiles. La mayor parte de los análisis farmacéuticos están basados en cromatografía de partición y son completados en un tiempo menor a 30 minutos.

El tiempo de elusión de un compuesto puede ser descrito por el factor de capacidad, k' , que depende de la naturaleza química del analito, la composición y la velocidad de flujo de la fase móvil, además de la composición y el área de la superficie de la fase estacionaria. La longitud de la columna es determinante de la resolución. Sólo compuestos con diferentes factores de capacidad pueden ser separados por CLAR.

2.2. Tipos de CLAR^{10,11}

Los métodos cromatográficos comúnmente utilizados pueden ser divididos en:

2.2.1. Cromatografía quiral.

La separación de enantiómeros puede hacerse sobre una fase estacionaria quiral, por formación de diastereómeros vía agentes derivativos o aditivos de la fase móvil que actúan sobre la fase estacionaria. Cuando se usa como un método de prueba de impurezas, la sensibilidad es mejorada si la impureza enantiomérica eluye antes que el fármaco enantiómero.

2.2.2. Cromatografía de intercambio iónico.

La separación está basada en la carga de los grupos funcionales, intercambio aniónico para una muestra con carga negativa o intercambio catiónico para una muestra con iones positivos. El gradiente de elusión por pH es común.

2.2.3. Cromatografía de afinidad.

La separación está basada en la interacción química específica de las especies destino. La modalidad más popular usa un amortiguador y una cantidad adicionada de carga positiva a la muestra con separación influenciada por pH, fuerza iónica, temperatura, concentración y tipo de disolvente orgánico. La cromatografía de afinidad, común para macromoléculas, emplea un ligando (molécula biológicamente activa unida covalentemente a la matriz sólida), la cual interactúa con su antígeno (analito) homólogo como un complejo reversible que puede ser eluido por cambios en las condiciones del amortiguador.

2.2.4. Cromatografía de fase normal.

Es una técnica cromatográfica que usa solventes orgánicos para la fase móvil y una fase estacionaria polar. Aquí, los componentes menos polares eluyen más rápido que los componentes más polares.

2.2.5. Cromatografía de fase reversa.

En la cromatografía de fase reversa, una técnica cromatografía de fase ligada, utiliza agua como el solvente base. La separación está basada en la fuerza y selectividad del solvente, también puede ser afectada por la temperatura de la columna y el pH. En general, el componente más polar eluye más rápido que los componentes menos polares.

2.2.6. Cromatografía de exclusión molecular.

También conocida como filtración o permeación en gel, la separación está basada en el tamaño de las moléculas o el volumen hidrodinámico de los componentes. Las moléculas que son más grandes que los poros del material de empaque de la columna, eluyen primero, las moléculas pequeñas que entran en los poros eluyen al final y la velocidad de elución de el resto depende de sus tamaños relativos.

2.3. Soportes de silica gel⁹⁻¹¹

La silica gel y sus fases unidas son los materiales de empaque de columnas más comunes. La silica gel optimizada para cromatografía debe tener las características en listadas en la tabla I.

Tabla I. Características de la silica gel optimizada.		
	Valores típicos	Valor ideal
Área superficial específica (m ² /g)	150-400	200
Diámetro de poro (nm)	6-10 o 30	<10
Volumen específico de poro (ml/g)	0.2-1	0.7
Contenido de metales traza (ppm)	<1000	<1000
pH de la superficie	Ácido a básico	Neutral
Tamaño de partícula (μm)	3.5 o 10	-
Densidad aparente	0.4-0.6	0.45
Suavidad de la partícula	-	Suave

Las propiedades ácidas y básicas de la silica ejercen influencia en las características de las fases ligadas preparadas para ella.

Las partículas de 3 μm son las de mayor calidad disponibles comercialmente. Se han notado varios efectos adversos para partículas menores a este tamaño. Para adsorbentes usados en procedimientos preparativos, son comunes partículas mayores a los 10 μm. Las partículas de 15 μm presentan problemas de resolución y de capacidad de retención para procedimientos preparativos.

La densidad aparente se encuentra relacionada con el volumen específico de poro y puede ser medida con facilidad. La sílica gél con densidad aparente baja no tiene la fuerza estructural necesaria para soportar las altas presiones generadas durante el empaque de la columna. Las partículas caracterizadas como suaves son importantes para una compresión estable al empacar.

2.4. Equipo.^{9-12,14,16.}

El cromatógrafo de líquidos consiste principalmente en un recipiente que contiene la fase móvil, una bomba que empuja la fase móvil a través del sistema a alta presión, un inyector que introduce la muestra en la fase móvil, una columna

cromatográfica, un detector y un dispositivo de salida para la recolección de datos, como una computadora o integrador.

2.4.1 Sistema de bombeo.

Las micropartículas de las columnas comunes desarrollan una alta resistencia a la presión durante la operación. Esto requiere de una bomba capaz de operar a altas presiones para hacer pasar la fase móvil a través de la columna. Un límite de presión superior de 6000 psi es usualmente adecuado para las columnas disponibles comercialmente. En la tabla II se presentan las condiciones óptimas para una ejecución satisfactoria de la bomba.

Tabla II. Características de uso de la bomba.
Liberación de flujo constante (0.1-45 mL/min) Presión máxima alta Liberación de flujo poco variable Mínimas fluctuaciones de presión Bajo nivel de ruido Simplicidad de operación Químicamente inerte a los solventes usados comúnmente

Para el análisis de fármacos, se prefieren los métodos isocráticos a los de gradiente. La instrumentación de un método isocrático es tecnológicamente más simple, dado que no requiere una bomba múltiple y la reproducibilidad de laboratorio en laboratorio es mayor. No obstante, la elución por gradientes es preferida en el caso de análisis de mezclas potencialmente complejas.

2.4.2 Inyectores.

Existen dos diseños de inyectores: los de desplazamiento y los de aguja. Ambos pueden ser incorporados a un sistema de inyección manual o automático. Los inyectores de desplazamiento forzan la muestra hasta un loop pero presentan baja reproducibilidad cuando están parcialmente llenos. En consecuencia, es necesario cambiar físicamente el loop para cambiar los volúmenes de inyección. Los inyectores de tipo aguja conducen la muestra a través del loop. Este mecanismo puede operar con precisión con un "loop" parcialmente lleno y es, por lo tanto, más versátil. Puede ser más difícil mantener inyecciones reproducibles con un inyector de aguja que con uno de desplazamiento. Bajo la mayoría de las circunstancias, la reproducibilidad no es un problema.

2.4.3 Columnas.

Para la mayoría de los análisis farmacéuticos, la separación de los compuestos se lleva a cabo por partición. Los sistemas contienen una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar, el arreglo opuesto es conocido como cromatografía de fase reversa. La cromatografía de partición es usada casi siempre para los hidrocarburos solubles con peso molecular menor a 1000. La afinidad de un compuesto por la fase estacionaria y el tiempo de retención de la columna, está controlada por la polaridad de la fase móvil. La polaridad de la fase móvil puede ser modificada por la adición de un segundo y algunas veces, tercer o cuarto componente.

El acero inoxidable ha llegado a ser el material estándar de las columnas y otros componentes del cromatógrafo, debido que es inerte, su relativo bajo costo y su capacidad de soportar altas presiones. No obstante, bajo ciertas circunstancias, el acero inoxidable presenta interacciones con la muestra y con la fase móvil.

Las columnas usadas para separaciones analíticas usualmente tienen diámetros internos de 2 a 5 mm; las columnas de diámetro mayor son usadas para cromatografía preparativa. Las columnas pueden ser calentadas para dar separaciones más eficientes, pero raramente son usadas a temperaturas mayores a 60°C, debido a la degradación potencial de la fase estacionaria o la volatilización de la fase móvil.

2.4.4 Detectores.

El sistema de detección empleado para CLAR está basado en un diseño instrumental que responde a una propiedad física o química particular del componente de la muestra a eluir. La mayoría de los análisis por CLAR se han diseñado para usar detectores espectrofotométricos. Tales detectores consisten de una celda, montada al final de la columna. Un haz de radiación ultravioleta pasa a través de la celda perpendicular a la dirección de flujo y dentro del detector. Después de que el compuesto eluye a través de la columna, pasa hacia la celda y absorbe la radiación, resultando en cambios de niveles de energía medibles.

2.5. Estándar de referencia.

Un estándar de referencia es un compuesto altamente purificado que está bien caracterizado. Los métodos cromatográficos se basan en los estándares para proveer datos precisos. Por lo tanto, la calidad y pureza de los mismos son importantes. Los métodos de prueba cromatográficos utilizan estándares externos e internos para la cuantificación.

2.5.1 Método del estándar externo.

Se utiliza cuando el estándar es analizado en un cromatograma por separado de la muestra. La cuantificación está basada en una comparación del

área bajo la curva o de las alturas de los picos de la muestra con respecto al estándar del analito de interés.

Este método es adecuado en los siguientes casos:

- Muestra con una sola concentración y estrecho intervalo de concentraciones.
- Procedimiento simple de preparación de la muestra.
- Tiempo de línea base largo para la detección de potenciales picos extraños.
- Cuando hay repetibilidad en los sistemas de medición e inyección.

2.5.2 Método del estándar interno.

Se utiliza un compuesto de pureza alta y conocida, con estructura semejante a la del analito, de esta forma, al adicionarse a la mezcla de la muestra, no causa interferencia en el análisis. La cuantificación está basada en la relación de la respuesta del compuesto de interés con respecto al estándar interno en comparación con la respuesta de una preparación similar del estándar de referencia. Se utiliza en los siguientes casos:

- Procedimientos de preparación de muestra complejos.
- Baja concentración de la muestra.
- Amplio intervalo de concentraciones esperados en la muestra de análisis.
- Cuando no hay repetibilidad en el sistema de medición.

2.6. Fase móvil.

En todas las formas de cromatografía, la calidad y manipulación de la fase móvil es tan crítica como cualquier parte del sistema cromatográfico. Existe una serie de factores que deben tomarse en cuenta a fin de evitar problemas durante la ejecución de la técnica.

2.6.1 Compatibilidad del sistema.

Es necesario considerar las necesidades del equipo de CLAR cuando se selecciona la fase móvil. Se recomienda que la mezcla de disolventes sea miscible con la usada previamente en el equipo, de lo contrario, es necesario usar un disolvente intermediario que sea miscible en la fase previa y en la nueva. Esto requerirá purgar el sistema e introducir el nuevo disolvente, lo cual tomará alrededor de 30 minutos. Si las fases son miscibles, se necesitará de un tiempo de enjuague, pero significativamente menor, de 5 a 15 minutos.

2.6.2 Solubilidad de la muestra.

Cuando los componentes de la muestra son insolubles en la fase móvil puede ocurrir precipitación, bloqueo de la jeringa o de la válvula. Dependiendo del tipo de muestra, puede actuar como un grano de arena y rayar el sistema. Estas partículas pueden bloquear la cabeza de la columna, restringir el flujo de la fase

móvil e incrementar la presión interna. La muestra debe ser soluble en la fase móvil, en el rango de concentración de trabajo.

2.6.3 Calidad del disolvente.

La diferencia en el contenido de agua e impurezas orgánicas son los problemas más comunes. El conocer el tipo y cantidad de estabilizadores es muy importante. El uso de un disolvente con estabilizador contra uno sin él puede revertir el orden de elución de dos solutos. Todos los disolventes utilizados deben ser grado CLAR, incluyendo el agua.

2.6.4 Agua.

La necesidad de monitorear la calidad del agua es más notoria en el caso de la cromatografía de fase reversa, donde se efectúan análisis sensibles y los contaminantes orgánicos provocan variación de la línea base. Regularmente el agua para cromatografía se obtiene de destiladores de los laboratorios de trabajo. Uno de los problemas con este tipo de agua es la contaminación microbiológica que se genera en los contenedores. Las colonias de bacterias, mohos y levaduras bloquean los espacios intersticiales de las columnas de los sistemas de fase reversa, exclusión molecular e intercambio iónico.

2.6.5 Preparación de la fase móvil.

La primera rutina que se debe llevar a cabo con la fase móvil es la filtración de sus constituyentes. Los solventes comerciales para CLAR pueden contener partículas. No obstante, éstas no son visibles debido al índice de refracción del disolvente, o bien, a su tamaño. Tal contaminación ocasiona varios problemas debido a la acumulación en la cabeza de la columna:

- Cambios en la velocidad de elución.
- Cambios en el factor de capacidad.
- Disminución de la selectividad.
- Picos fantasma.
- Absorción irreversible y disminución de la vida de la columna.

Es posible que las partículas se queden en el sistema de bombeo dañándolo y provocando fluctuaciones en la velocidad de flujo. Este tipo de contaminación también invade las válvulas afectando el tiempo de vida de ellas.

La forma más fácil de evitar los problemas anteriores es filtrar el disolvente. Se utilizan comúnmente filtros de ésteres de celulosa con tamaño de poro de 0.22 micras para medios acuosos, y de politetrafluoroetileno con 0.2 micras para medios orgánicos.

2.6.6 Desgasificación.

Es importante en el caso de los disolvente acuosos y no siempre esencial con los orgánicos, sin embargo es una buena práctica de laboratorio. Si el procedimiento no se realiza, se pueden producir burbujas debido a la desgasificación en la salida del sistema. Bajo presión, la solubilidad del oxígeno y el nitrógeno aumenta. Esto causa frecuentes problemas en el detector, donde la presión baja dramáticamente hasta 100 psi o a condiciones atmosféricas, por lo que el gas se libera y forma burbujas que causan resultados erróneos y daños en el detector.

Una cuestión altamente importante es el grado de sofisticación de la metodología necesaria en la ejecución de un procedimiento analítico para constituyentes de productos farmacéuticos. Un método apropiadamente validado que utilice instrumentos ampliamente disponibles es preferible para el control de calidad diario.

2.7. Validación de métodos analíticos.^{3,4,7.}

El término método analítico se refiere a la forma de ejecutar un análisis, este debe describir en detalle los pasos necesarios para desarrollar cada prueba analítica. Puede incluir, pero no se limita, a la muestra, el estándar de referencia y la preparación de reactivos, el uso del aparato, generación de la curva de calibración, uso de fórmulas para el cálculo. En la tabla III se muestran algunos de los métodos analíticos más utilizados.

Tabla III. Métodos analíticos comunes.
Pruebas de identificación Pruebas para cuantificar el contenido de impurezas Pruebas límite de control de impurezas Pruebas cuantitativas del grupo activo en muestras de fármacos o productos u otros componentes seleccionados del mismo. Prueba de disolución Métodos bioanalíticos

Se entiende por validación a la evidencia documentada establecida que provee un alto grado de aseguramiento que de un proceso específico se obtendrá consistentemente un producto con las especificaciones y atributos de calidad predeterminados.

El objetivo principal de la validación de un método analítico es demostrar que el procedimiento es adecuado para su propósito principal. Se deben utilizar, en el estudio de validación, materiales de referencia bien caracterizados, con pureza documentada.

2.8 Parámetros de validación de métodos analíticos. ³⁻⁷

De acuerdo con la NOM-177-SSA1-1998, en el punto numero 9, los criterios y requisitos para la validación del método analítico para el análisis químico de muestras biológicas son los siguientes:

2.8.1 Selectividad.

Establecer la selectividad del método al analizar muestras blanco de la matriz biológica proveniente de por lo menos seis voluntarios. Evaluar el método contra posibles interferencias (p. ej. metabolitos, productos de degradación del compuesto de interés y cualquier otro fármaco administrado de manera concomitante). No deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar.

2.8.2 Límite de detección.

Determinar la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés. Se debe sustentar científicamente el criterio empleado para establecerlo.

2.8.3 Rango.

Establecer el intervalo en función de las concentraciones esperadas del compuesto por analizar. 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.

2.8.4 Linealidad

Definir un modelo que describa la relación matemática entre concentración y respuesta. Esta relación debe ser continua y reproducible a lo largo del rango.

2.8.5 Límite de cuantificación

Analizar por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo. Se considera que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20%.

2.8.6 Precisión.

2.8.6.1 Repetibilidad.

Analizar en un mismo día por quintuplicado, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15%.

2.8.6.2 Reproducibilidad intralaboratorio.

Analizar por duplicado durante tres días, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica. Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15 %.

2.8.7 Exactitud.

El valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

2.8.8 Recuperación absoluta.

Analizar al menos por triplicado un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta del o los compuestos por analizar en la matriz biológica, dentro del rango. Comparar estos resultados con las respuestas de soluciones del mismo compuesto en las mismas concentraciones y en los mismos disolventes. El porcentaje de esta(s) razón(es) no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango.

2.8.9 Estabilidad.

Determinar las condiciones de temperatura y tiempo entre otros, en las que el compuesto permanezca estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, al evaluar la respuesta de la concentración del compuesto por analizar en la matriz biológica, en muestras preparadas al menos por duplicado, a tres niveles de concentración dentro del rango, considerando al menos lo siguiente:

2.8.9.1 Condiciones de almacenamiento.

Evaluar la estabilidad del o los compuestos en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un

periodo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.

2.8.9.2 Ciclos de congelación-descongelación.

Evaluar la estabilidad del o los compuestos por analizar al congelar y descongelar a temperatura ambiente muestras de concentración conocida del o los compuestos en la matriz biológica; esto constituye un ciclo de congelación-descongelación. Se deben evaluar al menos dos ciclos de congelación-descongelación antes de analizar las muestras.

2.8.9.3 Otros.

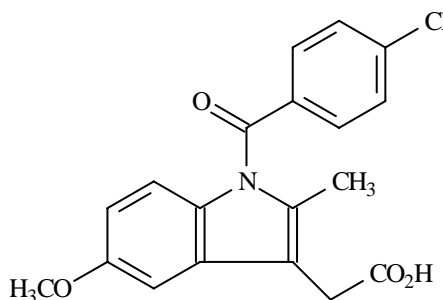
Evaluar otros factores a los cuales pueden estar sometidas las muestras hasta su análisis.

Para que el o los compuestos de interés se consideren estables en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados obtenidos deben cumplir los criterios de exactitud y repetibilidad.

2.8.10 Tolerancia.

Evaluar la tolerancia del método analítico a pequeñas, pero deliberadas modificaciones (por ejemplo pH, disolventes, fase móvil, longitud de onda, temperatura, tiempo de incubación), al analizar muestras adicionadas de concentración conocida en la matriz biológica. Las modificaciones que se consideren, deben ser las que cumplan con los criterios de exactitud y precisión.

2.9. Indometacina.



1H-indol-3-ácido acético.

Formula condensada: C₁₉H₁₆ClNO₄.

P.M. 357.79

2.9.1. Propiedades físicas. ^{20, 21.}

Es un polvo blanco amarillento, cristales polimorfos, punto de fusión para una forma aprox. 156° a 160°C, para otra forma aprox. 162 °C. UV máx. (etanol) 230, 260, y 319 nm. pKa 4.5. Es insoluble en agua y en hidrocarburos. Muy ligeramente soluble en cloroformo y acetona. Soluble en etanol, dicloruro de etileno, acetonitrilo, éter, aceite de ricino. Estable en medios neutros o ligeramente ácidos, inestable en medios básicos fuertes. Es inestable en soluciones alcalinas. Con los alcoholes forma solvatos cristalinos estables. Sales de sodio trihidratadas, polvo cristalino amarillo, pH en solución al 1% es 8.4. Muy soluble en metanol. Soluble en agua y etanol. Tanto la forma sólida como sus soluciones se deben proteger de la luz solar. La sal sódica en estado seco es bastante estable.

2.9.2. Indicaciones terapéuticas. ^{17-19, 22.}

Está indicado en las etapas activas de:

- Artritis reumatoide.
- Artritis reumatoide juvenil moderada o intensa.
- Osteoartritis.
- Artropatía degenerativa de la cadera.
- Espondilitis anquilosante.
- Artritis gotosa aguda.

También está indicado en:

- Trastornos músculo esqueléticos agudos, como bursitis, tendinitis, sinovitis, tenosinovitis, capsulitis del hombro, esguinces y distensiones.
- Dolor lumbosacro (comúnmente denominado lumbago).
- Inflamación, dolor y tumefacción consecutivos a operaciones ortopédicas o a maniobras de reducción e inmovilización de fracturas o luxaciones.

La indometacina, es un medicamento antiinflamatorio no esteroide eficaz, con marcadas propiedades analgésicas y antipiréticas. La indometacina es un potente inhibidor de la síntesis de las prostaglandinas *in vitro*, y durante el tratamiento alcanza concentraciones que han demostrado tener ese mismo efecto *in vivo*. Se ha comprobado que la indometacina es un agente antiinflamatorio eficaz, adecuado para su empleo prolongado en la artritis reumatoide, la espondilitis anquilosante y la osteoartritis. La indometacina alivia los síntomas, pero no se ha mostrado que altere la progresión de la enfermedad subyacente. Ha resultado eficaz para aliviar el dolor y disminuir la fiebre, la tumefacción, el enrojecimiento y la hiperestesia de la artritis gotosa aguda.

2.9.3. Farmacínética y farmacodinamia.

Tras la administración de dosis orales únicas de 25 mg o 50 mg de indometacina se absorbe fácilmente y alcanza concentraciones plasmáticas máximas de aproximadamente 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente, unas dos horas después de la administración, tiene una biodisponibilidad de prácticamente 100%, y a las cuatro horas se ha absorbido 90% de la dosis administrada. Las cápsulas de liberación prolongada con 75 mg de indometacina están formuladas para liberar 25 mg del medicamento inicialmente y los 50 mg restantes en el transcurso de unas doce horas, al cabo de las cuales se ha absorbido 90% de la dosis. En un periodo de 24 horas, la cantidad acumulada y la curva respecto al tiempo de la indometacina absorbida de una sola cápsula de liberación prolongada.

Las concentraciones plasmáticas de indometacina fluctúan menos y son más sostenidas administrando una cápsula de liberación prolongada de 75 mg que tres cápsulas de 25 mg, con intervalos de cuatro a seis horas. Los estudios clínicos controlados en pacientes con osteoartritis mostraron que los efectos de una cápsula de liberación prolongada eran clínicamente semejantes a los de una cápsula de 25 mg tres veces al día; y en estudios clínicos controlados en pacientes con artritis reumatoide, los efectos de una cápsula de liberación prolongada por la mañana y otra por la tarde fueron clínicamente indistinguibles de los de una cápsula de 50 mg tres veces al día.

La indometacina es eliminada por excreción renal, transformación metabólica y excreción biliar, y experimenta una considerable circulación entero hepática. Se ha calculado que su semivida media es de alrededor de 4.5 horas. Con un régimen terapéutico típico de 25 ó 50 mg tres veces al día, las concentraciones plasmáticas de indometacina en estado de equilibrio son en promedio 1.4 veces mayores que las producidas por la primera dosis.

La indometacina se absorbe más rápidamente por la vía rectal que por la vía oral. La porción de indometacina que se absorbe finalmente es la misma administrándola por vía intramuscular o por vía oral, pero la absorción es significativamente más rápida tras la administración intramuscular, con la cual se obtienen concentraciones plasmáticas máximas una hora antes que por vía oral. La indometacina existe en el plasma en forma del compuesto original y de sus metabolitos desmetil, desbenzoil, todos ellos en forma no conjugada. Alrededor de 60% de una dosis oral se recupera de la orina en su forma original y como metabolitos (26% como indometacina y su glucurónido), y 33% se recupera de las heces (1.5% como indometacina). Dentro de los límites de variación de las concentraciones plasmáticas terapéuticas, alrededor de 99% de la indometacina se une a las proteínas plasmáticas. Se han encontrado que la indometacina atraviesa la barrera hematoencefálica y la placenta. En un estudio gastroscópico de 45 sujetos sanos, el número de anomalías de la mucosa gástrica fue significativamente mayor en el grupo que se administró por la vía oral que en el que recibió por vía rectal.

Acción antiinflamatoria: La actividad antiinflamatoria de la indometacina fue demostrada por primera vez en animales, midiendo su capacidad para inhibir la formación de granuloma o el edema inducidos por la inyección subplantar de carragenina en ratas. Esta última acción parece concordar con su actividad antirreumática en el hombre. Las pruebas comparativas de potencia indicaron que la indometacina era más potente que el ácido acetilsalicílico, la fenilbutazona o la hidrocortisona; las proporciones entre las potencias variaron según la prueba empleada. La inhibición que ejerce la indometacina sobre el edema provocado por carragenina es específica; el compuesto no logró inhibir el edema provocado por otras sustancias ni lo disminuyó cuando ya estaba establecido. Como sucede con otros agentes antiinflamatorios, se desconoce el mecanismo de acción de la indometacina. Esta conserva toda su actividad en ausencia de las glándulas suprarrenales y se puede demostrar fácilmente su acción aplicándola directamente sobre la región en estudio. En animales intactos la indometacina, a diferencia de los esteroides antiinflamatorios, no modificó el tamaño de las suprarrenales o del timo ni retrasó el aumento del peso corporal, que son índices sensibles de activación suprarrenal. La actividad antiinflamatoria de combinaciones de indometacina y un esteroide fue igual a la de dosis comparables de uno u otro medicamento por separado. Los experimentos han mostrado que la indometacina ejerce un efecto favorable sobre la poliartritis provocada mediante adyuvante en ratas y fue más activa que la fenilbutazona o el ácido acetilsalicílico en la supresión de las manifestaciones tardías de la artritis diseminada. Se considera que esta respuesta concuerda con su actividad antiartrítica clínica.

Actividad antipirética: La actividad antipirética de la indometacina ha sido demostrada en conejos y ratas a los que se inyectaron pirógenos bacterianos, así como en la prueba clásica de la fiebre inducida por levadura en ratas. Una comparación directa de la actividad antipirética máxima en la prueba de la fiebre por levadura mostró que la indometacina es aproximadamente nueve veces más potente que la aminopirina, 24 veces más potente que la fenilbutazona y 43 veces más potente que el ácido acetilsalicílico. La actividad antipirética de la indometacina ha sido confirmada clínicamente en pacientes con diversos padecimientos febriles. Actividad analgésica: La indometacina es activa en las pruebas con animales empleadas para ensayar la actividad de los analgésicos no narcóticos. Dosis moderadas de indometacina elevan el umbral de respuesta en la rata a la presión aplicada sobre la pata inflamada por levadura, pero no modifican las respuestas a los estímulos térmicos o a la presión sobre una pata no inflamada. Cualitativamente, la indometacina actúa como un analgésico del tipo antiinflamatorio-antipirético representado por los salicilatos y no del tipo narcótico representado por la morfina. Cuando se ensayaron dosis orales únicas de indometacina en la prueba de la pata inflamada, se encontró que es unas 28 veces más potente que el ácido acetilsalicílico y unas 14 veces más potente que la fenilbutazona.

2.9.4. Contraindicaciones.

No se debe administrar indometacina a: Pacientes hipersensibles a la indometacina. Pacientes que hayan presentado ataques asmáticos agudos, urticaria o rinitis precipitados por ácido acetilsalicílico u otros medicamentos antiinflamatorios no esteroideos. Como otros agentes antiinflamatorios, la indometacina puede ocultar los síntomas y signos de la úlcera péptica. Dado que la propia indometacina puede causar úlcera péptica o irritación gastrointestinal, no debe ser administrada a pacientes con úlcera péptica activa o con antecedentes de ulceración gastrointestinal recurrente.

2.9.5. Restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia.

Empleo durante el embarazo: Durante los dos primeros trimestres del embarazo sólo se debe usar si el beneficio potencial justifica el riesgo potencial para el feto. Los efectos conocidos de la indometacina y de otros medicamentos de esa clase sobre el feto humano durante el tercer trimestre del embarazo incluyen: constricción del conducto arterioso antes del nacimiento, insuficiencia tricuspídea e hipertensión pulmonar; persistencia del conducto arterioso después del nacimiento, que puede ser refractaria al tratamiento médico; cambios degenerativos del miocardio, disfunción plaquetaria y sangrado, hemorragia intracraneal, disfunción o insuficiencia renal, lesión o disgenesia renal que puede ocasionar insuficiencia renal prolongada o permanente, oligohidramnios, sangrado o perforación gastrointestinal y aumento del riesgo de enterocolitis necrosante. Madres lactantes: No se recomienda administrar indometacina a madres lactantes. La indometacina es excretada con la leche materna.

2.9.6. Reacciones secundarias y adversas.

Sistema nervioso central: Los efectos colaterales neurológicos asociados con el uso de indometacina son cefalea, mareo, aturdimiento, depresión, vértigo y fatiga (incluyendo malestar general y apatía). También se han observado, con poca frecuencia, confusión mental, ansiedad, síncope, somnolencia, convulsiones, coma, neuropatía periférica, debilidad muscular, contracciones musculares involuntarias, insomnio, trastornos psíquicos como despersonalización, episodios psicóticos y, raramente, parestesias, disartria, agravamiento de la epilepsia y parkinsonismo. A menudo, estas reacciones son transitorias y desaparecen al continuar el tratamiento o al disminuir la dosificación. Sin embargo, en algunos casos su intensidad puede obligar a interrumpir el tratamiento.

Gastrointestinales: Las reacciones gastrointestinales que ocurren con mayor frecuencia son náuseas, anorexia, vómito, malestar epigástrico, dolor abdominal, estreñimiento y diarrea. Pueden aparecer también ulceraciones únicas o múltiples en el esófago, el estómago, el duodeno, el intestino delgado o el intestino grueso, incluso con perforación y hemorragia que han causado la muerte en unos cuantos casos; hemorragia gastrointestinal sin signos de úlcera, y aumento de dolor abdominal en pacientes con colitis ulcerosa preexistente. Ocurren con poca frecuencia estomatitis, gastritis, flatulencia, hemorragia del sigmoides (oculta o de un divertículo), y perforación de lesiones preexistentes del sigmoides (divertículos, carcinoma). En raros casos, se han reportado estrechamientos intestinales (diafragmas) y ulceración intestinal seguida de estenosis y obstrucción. Otros efectos colaterales gastrointestinales que pueden o no ser causados por la indometacina son colitis ulcerosa e ileítis regional. Estudios realizados en seres humanos con eritrocitos marcados con cromato radiactivo indican que la mayor dosificación recomendada de indometacina por vía oral (50 mg cuatro veces al día) provoca menos pérdida de sangre en las heces que las dosis medias de ácido acetilsalicílico (600 mg 4 veces al día).

Reacciones hepáticas: En raras ocasiones se han observado ictericia y hepatitis relacionadas con la administración de indometacina; ha habido algunos casos mortales.

Cardiovasculares y renales: En asociación con el tratamiento con indometacina pueden ocurrir con poca frecuencia edema, aumento de la presión arterial, taquicardia, dolor precordial, arritmia cardíaca, palpitaciones, hipotensión, insuficiencia cardíaca congestiva, aumento del nitrógeno ureico en sangre y hematuria.

Reacciones de hipersensibilidad: Se han observado en pocos casos prurito, urticaria, angitis, eritema nudoso, erupciones cutáneas, dermatitis exfoliativa, síndrome de Stevens-Johnson, eritema multiforme, necrólisis epidérmica tóxica, caída del cabello, trastornos respiratorios agudos, disminución rápida de la presión arterial como en el estado de choque, anafilaxis aguda, edema angioneurótico, disnea súbita, asma y edema pulmonar.

Hematológicos: Durante el tratamiento con indometacina pueden presentarse con poca frecuencia leucopenia, petequias o equimosis, púrpura, anemia aplásica, anemia hemolítica, trombocitopenia y coagulación intra vascular diseminada. En raros casos se han observado agranulocitosis y depresión de la médula ósea, pero no se ha encontrado una relación definida entre éstas y la indometacina. Algunos pacientes pueden presentar anemia secundaria a hemorragia gastrointestinal manifiesta u oculta, por lo que se recomienda realizar los exámenes sanguíneos adecuados.

Oculares: Pueden ocurrir con poca frecuencia visión borrosa, diplopía y dolor orbitario y periorbitario. En algunos pacientes con artritis reumatoide bajo tratamiento prolongado con indometacina se han encontrado depósitos en la córnea y trastornos retinianos, incluso de la mácula. Se han observado alteraciones oculares semejantes en algunos enfermos de artritis reumatoide que no han recibido indometacina.

Auditivos: Se han observado *tinnitus*, trastornos de la audición y, en raros casos, sordera.

Genitourinarios: Ha habido raros casos de proteinuria, síndrome nefrótico, nefritis intersticial, y deterioro o insuficiencia renal.

Otros: Otras reacciones adversas observadas rara vez en relación con la administración de indometacina han sido hemorragia vaginal, hiperglucemia y glucosuria; hiperpotasemia, bochornos y sudación; epistaxis, estomatitis ulcerosa, y trastornos mamarios como hipertrofia, hiperestesia o ginecomastia. Se han observado las siguientes reacciones adversas locales asociadas con el uso de indometacina administrada por vía rectal: Tenesmo, proctitis, sangrado, ardor, dolor, malestar y prurito rectales.

2.9.7. Interacciones medicamentosas.

Ácido acetilsalicílico: No se recomienda el empleo simultáneo de indometacina y ácido acetilsalicílico o salicilatos. Estudios clínicos controlados han mostrado que el efecto terapéutico de esa combinación no es mayor que la de indometacina que solo. Además, en uno de esos estudios clínicos la frecuencia de los efectos colaterales gastrointestinales aumentó significativamente con el tratamiento combinado. En un estudio en voluntarios sanos se encontró que la coadministración de 3.6 g de ácido acetilsalicílico al día por tiempo prolongado disminuye 20% aproximadamente las concentraciones sanguíneas de indometacina.

Diflunisal: El uso simultáneo de indometacina y diflunisal se ha asociado con hemorragia gastrointestinal mortal. La coadministración de diflunisal e indometacina aumenta aproximadamente 30-35% la concentración plasmática de indometacina y disminuye la depuración renal de ésta y de su conjugado. Por consiguiente, no se deben emplear indometacina y diflunisal al mismo tiempo.

Otros antiinflamatorios no esteroides: No se recomienda el uso concomitante de indometacina con otros antiinflamatorios no esteroides, debido a que puede aumentar la toxicidad gastrointestinal, con poco o ningún aumento de la eficacia.

Anticoagulantes: En estudios clínicos, la indometacina no modificó la hipoprotrombinemia producida por anticoagulantes en enfermos y en sujetos sanos. Sin embargo, cuando se añade cualquier medicamento al tratamiento de un paciente que está recibiendo anticoagulantes, se debe vigilar cuidadosamente cualquier modificación del tiempo de protrombina.

Probenecid: Cuando se administra indometacina a pacientes que están recibiendo probenecid es probable que aumenten las concentraciones plasmáticas de indometacina, por lo que quizá se obtenga un efecto terapéutico satisfactorio con una dosificación diaria menor de indometacina. En estos casos, los aumentos de la dosificación de indometacina se deben hacer con precaución y poco a poco.

Metotrexato: Se debe tener precaución si se emplea indometacina al mismo tiempo que metotrexato, pues se ha informado que la indometacina disminuye la secreción tubular y potencia la toxicidad del metotrexato.

Ciclosporina: La administración concomitante de antiinflamatorios no esteroides y ciclosporina se ha asociado con un aumento de la toxicidad de esta última, debido posiblemente a una disminución de la síntesis de prostaciclina renal. En los pacientes que están recibiendo ciclosporina, los antiinflamatorios no esteroides se deben usar con precaución y vigilando cuidadosamente la función renal.

Litio: La administración de 50 mg de indometacina tres veces al día ocasionó un aumento clínicamente importante de la concentración plasmática y una disminución de la depuración renal de litio en pacientes psiquiátricos y sujetos normales con concentraciones plasmáticas estables de litio. Este efecto ha sido atribuido a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Por consiguiente, cuando se administran al mismo tiempo indometacina y litio se debe vigilar cuidadosamente la aparición de signos de toxicidad del litio (léanse las instrucciones de empleo de los preparados de litio antes de administrar ese tratamiento concomitante). Además, al iniciar ese tratamiento combinado se debe aumentar la frecuencia de las determinaciones de la concentración de litio en el suero.

Diuréticos: En algunos pacientes la administración de indometacina puede disminuir los efectos diurético, natriurético y antihipertensivo de los diuréticos del asa, ahorradores de potasio o tiacídicos. Por consiguiente, cuando se usen al mismo tiempo indometacina y diuréticos se debe vigilar cuidadosamente si se obtiene el efecto deseado del diurético. La indometacina reduce la actividad basal de la renina plasmática, así como el aumento de esa actividad inducido por la administración de furosemida o por la pérdida de sal o de volumen plasmático. Se

deben tener en cuenta estos hechos al valorar la actividad de la renina plasmática en pacientes hipertensos que reciban indometacina. Se ha informado que la adición de triamtereno a un tratamiento de mantenimiento con indometacina ocasionó insuficiencia renal aguda reversible en dos de cuatro voluntarios sanos. No se deben emplear al mismo tiempo indometacina y triamtereno. Tanto la indometacina como los diuréticos ahorradores de potasio pueden ocasionar aumentos de la concentración sérica de potasio. Cuando se utilizan ambos medicamentos al mismo tiempo, se deben tener en cuenta los efectos potenciales de la indometacina y de los diuréticos ahorradores de potasio sobre la cinética del potasio y sobre la función renal. La mayoría de los efectos anteriores relativos a los diuréticos han sido atribuidos, al menos en parte, a mecanismos relacionados con la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por la indometacina.

Digoxina: Se ha informado que la administración concomitante de indometacina y digoxina aumenta la concentración sérica y prolonga la semivida de esta última. Por lo tanto, cuando se empleen al mismo tiempo indometacina y digoxina deben vigilarse estrechamente las concentraciones séricas de digoxina.

Medicamentos antihipertensivos: La coadministración de indometacina y algunos agentes antihipertensivos ha atenuado el efecto antihipertensivo agudo de estos últimos, debido por lo menos en parte a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas por la indometacina. Por lo tanto, el médico debe tener precaución si piensa añadir indometacina al tratamiento de un paciente que está tomando alguno de los siguientes agentes antihipertensivos: un bloqueador alfa-adrenérgico (como prazosin), un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina (como captopril o lisinopril), un bloqueador beta-adrenérgico, un diurético, o hidralacina.

Fenilpropanolamina: Se han observado crisis hipertensivas causadas por la administración oral de fenilpropanolamina sola o, en raros casos, asociada con indometacina. Este efecto aditivo es debido probablemente, al menos en parte, a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas ejercida por la indometacina. Se debe tener precaución durante el uso concomitante de indometacina y fenilpropanolamina.

2.9.8. Alteraciones en los resultados de pruebas de laboratorio.

Como sucede con otros antiinflamatorios no esteroides, la indometacina puede ocasionar aumentos limítrofes de una o más pruebas de funcionamiento hepático. En ensayos clínicos controlados, hubo aumentos significativos (al triple de los valores normales máximos) de las transaminasas glutamicopirúvica (alanina-aminotransferasa, ALAT) o glutámico-oxalacética (aspartato-aminotransferasa, ASAT) del suero en menos del 1% de los pacientes tratados con medicamentos antiinflamatorios no esteroides. Si un paciente presenta síntomas y/o signos que sugieran disfunción hepática o ha tenido valores anormales en una prueba de funcionamiento hepático, durante el tratamiento con indometacina se debe investigar si se está produciendo una reacción hepática más intensa. Si las anomalías de las pruebas del funcionamiento hepático

persisten o empeoran, o si aparecen signos y síntomas de trastorno hepático o manifestaciones sistémicas (por ejemplo, eosinofilia, erupción cutánea, etcétera), debe suspenderse el tratamiento con indometacina. Se han encontrado resultados falsos-negativos de la prueba de supresión con dexametasona en pacientes bajo tratamiento con indometacina, por lo que en estos pacientes se deben interpretar con precaución los resultados de esa prueba.

2.9.9. Precauciones en la relación con efectos de carcinogenesis, mutagenesis, teratogenesis y fertilidad.

Como el paso de los años parece aumentar la posibilidad de sufrir efectos colaterales, la indometacina debe ser empleado con mayor cuidado en los pacientes de edad avanzada. No se han determinado las condiciones de seguridad para el empleo de indometacina en niños menores de dos años. Los niños tratados con indometacina deben ser vigilados cuidadosamente, y en ellos se deben hacer estudios periódicos de la función hepática a intervalos apropiados. Ha habido casos de hepatotoxicidad, en algunos de los cuales ha fallecido el paciente.

Efectos sobre el sistema nervioso central: Puede aparecer cefalea, a veces acompañada de mareo o aturdimiento, usualmente al principio del tratamiento. Aunque la intensidad de estos efectos rara vez hace necesario interrumpir el tratamiento, si la cefalea persiste a pesar de haber reducido la dosificación, se debe suspender la administración de indometacina. Se debe advertir a los pacientes que pueden experimentar mareos, y que en ese caso no deben conducir vehículos de motor ni realizar actividades peligrosas que requieran estar alerta. La indometacina debe ser empleada con precaución en pacientes con trastornos psiquiátricos, epilepsia o parkinsonismo, pues en algunos casos puede agravar esos padecimientos.

Efectos gastrointestinales: Debido a que pueden ocurrir reacciones gastrointestinales, a veces graves, en cada caso se deben comparar los riesgos de continuar el tratamiento con indometacina en presencia de tales reacciones con los posibles beneficios para el paciente. Durante el tratamiento con indometacina se han observado ulceraciones únicas o múltiples, inclusive con perforación y hemorragia, del esófago, el estómago, el duodeno, el intestino delgado o el intestino grueso. En algunos casos ha fallecido el paciente. En raras ocasiones, la ulceración intestinal se ha acompañado de estenosis y obstrucción. Ha habido casos de hemorragia gastrointestinal sin ulceración apreciable y de perforación de lesiones preexistentes del sigmoide (divertículo, carcinoma, etc.). En raras ocasiones, ha aumentado el dolor abdominal en pacientes con colitis ulcerosa o han aparecido colitis ulcerosa o ileítis regional. Los efectos gastrointestinales pueden ser menores si se administra la forma oral de indometacina inmediatamente después de las comidas, con alimentos, o con antiácidos.

Efectos cardiovasculares: Algunos pacientes tratados con indometacina han presentado retención de líquidos y edema periférico. Por consiguiente, como otros

antiinflamatorios no esteroides, la indometacina debe ser empleado con precaución en pacientes con disfunción cardiaca, hipertensión arterial u otros trastornos que favorezcan la retención de líquidos.

Supositorios: Se ha observado ocasionalmente tenesmo e irritación de la mucosa rectal tras el empleo de indometacina en supositorios.

Infecciones: Como otros medicamentos antiinflamatorios, analgésicos, antipiréticos, la indometacina puede ocultar los síntomas y signos usuales de las enfermedades infecciosas.

El médico debe tener en mente esa posibilidad para no retardar indebidamente el tratamiento apropiado de una infección. La indometacina debe ser empleada con precaución en pacientes con infecciones controladas.

Efectos oculares: En algunos pacientes bajo tratamiento prolongado con indometacina se han observado depósitos en la córnea y trastornos retinianos, incluso de la mácula. El médico debe tener en cuenta la posible asociación entre esas alteraciones y el tratamiento con indometacina, aunque se han observado cambios oculares similares en enfermos de artritis reumatoide que no habían recibido indometacina. Si aparecen dichas alteraciones, es recomendable suspender la administración de indometacina. La visión borrosa puede ser un síntoma significativo y hace necesario un examen oftalmológico completo. Como esas alteraciones pueden ser asintomáticas, es conveniente hacer exámenes oftalmológicos periódicos a los pacientes bajo tratamiento prolongado.

Agregación plaquetaria: Como otros agentes antiinflamatorios no esteroides, la indometacina puede inhibir la agregación plaquetaria. Este efecto es de menor duración que el que se observa con el ácido acetilsalicílico y generalmente cesa en un término de 24 horas al suspender la administración de indometacina. Se ha observado que la indometacina prolonga el tiempo de sangrado (aunque dentro de los límites normales) en sujetos sanos. Como este efecto puede ser mayor en pacientes con defectos de la coagulación sanguínea, la indometacina debe ser usada con precaución en esos pacientes.

Función renal: Como con otros antiinflamatorios no esteroides, ha habido casos de nefritis intersticial aguda con hematuria, proteinuria y, ocasionalmente, síndrome nefrótico en pacientes bajo tratamiento prolongado con indometacina. En pacientes con disminución del flujo sanguíneo renal, en los cuales las prostaglandinas renales tienen un papel importante para mantener la perfusión renal, la administración de un agente antiinflamatorio no esteroide puede precipitar una descompensación renal manifiesta. Los pacientes que se hallan en mayor riesgo de sufrir esta reacción son los que tienen disfunción renal o hepática, diabetes mellitus, edad avanzada, disminución del volumen extracelular, insuficiencia cardiaca congestiva, septicemia, o tratamiento concomitante con cualquier medicamento nefrotóxico. En todo paciente que puede tener disminuida la reserva renal es necesario tener precaución y vigilar la función renal cuando se

le administra un antiinflamatorio no esteroide. Generalmente, cuando se suspende la administración del antiinflamatorio no esteroide se recupera el estado anterior a ese tratamiento. Se han observado aumentos de la concentración sérica de potasio, e incluso hiperpotasemia, aun en algunos pacientes con función renal normal. En estos casos, ese efecto ha sido atribuido a un estado de hipoaldosteronismo hiporreninémico (véase Interacciones medicamentosas y de otro género). Como la indometacina es eliminada principalmente por los riñones se debe vigilar cuidadosamente a los pacientes con deterioro significativo de la función renal y emplear en ellos una dosificación diaria menor, para evitar una acumulación excesiva del medicamento.

Carcinogénesis, mutagénesis, efecto sobre la fertilidad: En un estudio de 81 semanas de duración sobre toxicidad crónica por vía oral en la rata a dosificaciones de hasta 1 mg/kg/día, la indometacina no tuvo ningún efecto tumorigénico. A dosificaciones de hasta 1.5 mg/kg/día la indometacina no provocó ningún cambio neoplásico ni hiperplásico en estudios sobre carcinogenicidad durante toda la vida de la rata (periodo de dosificación, de 73 a 110 semanas) y del ratón (periodo de dosificación, de 62 a 88 semanas). A dosificaciones de hasta 0.5 mg/kg/día, la indometacina no tuvo ningún efecto mutágeno en pruebas bacterianas *in vitro* (prueba de Ames y en *E. coli* con o sin activación metabólica) ni en una serie de pruebas *in vivo* que incluyeron el ensayo mediado por el huésped, las mutaciones mortales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila*, y la prueba de los micronúcleos en el ratón. La indometacina no tuvo ningún efecto sobre la fertilidad en estudios de reproducción sobre dos generaciones de ratones y sobre dos camadas de ratas.

Efectos teratógenos: Se hicieron estudios teratológicos en ratones y en ratas a las dosificaciones de 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mg/kg/día. Excepto por un retardo de la osificación fetal con 4 mg/kg/día, que se consideró secundario a la disminución del promedio de peso de los fetos, no se observó ningún aumento de las malformaciones fetales en comparación con los grupos testigos. Otros estudios en ratones reportados en la literatura, en los que se usaron dosis más altas (5 a 15 mg/kg/día), han descrito toxicidad y mortalidad maternas, aumento de las reabsorciones fetales y malformaciones fetales. Estudios comparables en roedores con dosis altas de ácido acetilsalicílico han mostrado efectos maternos y fetales similares. Como sucede con otros agentes antiinflamatorios no esteroides que inhiben la síntesis de prostaglandinas, se ha encontrado que la indometacina retarda el parto en las ratas. En ratas y ratonas, la administración de 4.0 mg/kg/día durante los tres últimos días de la gestación disminuyó el aumento de peso de las madres y causó algunas muertes maternas y fetales, y en las crías que nacieron vivas se observó un aumento de la incidencia de necrosis neuronal en el diencéfalo. Con 2.0 mg/kg/día no se observó ese aumento de la necrosis neuronal en comparación con los grupos testigos. La administración de 0.5 ó 4.0 mg/kg/día durante los tres primeros días de vida no causó ningún aumento de la necrosis neuronal.

2.9.10. Dosis y vía de administración.

La dosificación recomendada de indometacina es de 50 mg a 200 mg diarios distribuidos en varias dosis, y debe ser ajustada individualmente según la respuesta y la tolerancia de cada paciente. A diferencia de lo que ocurre con algunos otros antirreumáticos potentes, con indometacina no es necesario administrar una dosis inicial de ataque elevada. En los padecimientos reumáticos crónicos se obtendrá un beneficio máximo y se reducirán las reacciones adversas iniciando el tratamiento con dosis bajas, aumentando éstas gradualmente cuando sea necesario, y prolongando el tratamiento el tiempo adecuado (se recomienda hasta un mes). En los casos de dolor nocturno persistente y/o rigidez matutina puede ser útil administrar una dosis de hasta 100 mg al acostarse para proporcionar alivio. Rara vez es necesario administrar más de 200 mg al día. En la artritis gotosa aguda, la dosificación recomendada es de 150 a 200 mg diarios distribuidos en varias dosis, hasta que cedan todos los síntomas y signos. En la dismenorrea primaria la dosificación recomendada es de 75 mg diarios, en una sola toma o distribuidos en varias dosis, a partir de la aparición del dolor y de la menstruación y durante todo el tiempo que suelen durar los síntomas. Para reducir la posibilidad de trastornos gastrointestinales cuando se administra indometacina por vía oral, se recomienda tomarlo con alimentos o con un antiácido.

Artritis reumatoide juvenil (empleo en niños): En niños con artritis reumatoide juvenil, se puede iniciar la administración de indometacina a una dosificación de 2 mg/kg/día distribuidos en dos o tres dosis al día, y aumentarla después según sea necesario, a intervalos de una semana, hasta un máximo de 4 mg/kg/día. La dosificación diaria máxima no debe ser mayor de 200 mg o de 4 mg/kg (la que resulte menor). A medida que cedan los síntomas, se debe disminuir la dosificación total diaria hasta la mínima necesaria para controlarlos, o se debe suspender la administración del medicamento.

2.9.11. Manifestaciones y manejo de la sobredosificación o ingesta accidental.

La sobredosificación de indometacina puede ocasionar los siguientes síntomas: náuseas, vómito, cefalea intensa, mareo, confusión mental, desorientación o letargo. También se han observado parestesias, entumecimiento y convulsiones. El tratamiento es sintomático y de sostén. Si la ingestión del producto es reciente, se debe vaciar el estómago lo más pronto posible. Si el paciente no ha vomitado espontáneamente, se debe inducir el vómito con jarabe de ipecacuana. Si el paciente no logra vomitar, se debe hacer lavado gástrico. Una vez vaciado el estómago se le pueden administrar 25 ó 50 g de carbón activado. Según el estado del paciente, puede ser necesario someterlo a estrecha observación médica y cuidados generales. Se le debe seguir vigilando durante varios días, porque se han observado ulceración y hemorragia gastrointestinales como reacciones adversas a la indometacina. Puede resultar útil administrar antiácidos.

2.9.12. Información complementaria.

Efectos colaterales de relación causal desconocida: Se han observado los siguientes efectos colaterales adicionales, pero no se les ha encontrado una relación causal con el tratamiento con indometacina:

Cardiovasculares: Tromboflebitis.

Hematológicos: Aunque ha habido varios reportes de leucemia, la información de apoyo es débil.

Genitourinarios: Micción frecuente.

Diversos: En personas tratadas con agentes antiinflamatorios no esteroides se han descrito raros casos de fascitis necrosante fulminante, particularmente en asociación con estreptococos β -hemolíticos del grupo A, que a veces han causado la muerte del paciente.

Farmacología clínica: Las prostaglandinas sensibilizan a los nervios aferentes y potencian la acción de la bradicinina en la producción de dolor en los animales de experimentación, y se sabe que son sustancias mediadoras de la inflamación. Dado que la indometacina es un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, su mecanismo de acción puede consistir en la disminución de éstas en los tejidos periféricos. Se ha informado que la administración aguda de indometacina por vía oral o intravenosa a voluntarios sanos disminuye el flujo sanguíneo cerebral basal o estimulado por CO₂. En un estudio, el efecto sobre el flujo sanguíneo cerebral basal había desaparecido al cabo de una semana de tratamiento con indometacina por vía oral. No se ha determinado la importancia clínica de ese efecto.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En nuestros días con el desarrollo y descubrimiento de nuevas moléculas con posible actividad biológica y la generación de nuevos fármacos, resulta cada vez más necesario el contar con métodos bioanalíticos que cumplan con las características de calidad deseadas en los estudios farmacocinéticos, toxicológicos, de biodisponibilidad y bioequivalencia.

Un método bioanalítico es aquel que se utiliza para la cuantificación de fármacos y sus metabolitos en fluidos biológicos y tejidos corporales (matrices biológicas) dentro de los estudios preclínicos y clínicos de evaluación de fármacos. Este método debe cumplir con una serie de requisitos que permita obtener con su aplicación resultados confiables. La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es una de las técnicas más utilizada dentro de los métodos bioanalíticos debido a su alta selectividad, sensibilidad y precisión. Dadas las especificaciones que deben cumplir los métodos bioanalíticos por CLAR, resulta indispensable proponer estrategias de desarrollo que permitan, asegurar la calidad del desempeño de los métodos y la obtención de resultados analíticos confiables. Por tal motivo, se propone desarrollar y validar un método de análisis para indometacina en plasma humano, utilizando la CLAR en fase reversa y detección por espectrofotometría ultravioleta, útil para una gran cantidad de aplicaciones en los estudios biofarmacéuticos, pero principalmente en el área de decencia dentro del laboratorio de biofarmacia de 9º semestre de la carrera de Q.F.B. en microescala.

4. OBJETIVOS.

- Desarrollar un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para separar y analizar indometacina en plasma humano, cuyos tiempos de retención no sean mayores a 5 minutos.

- Validar el método desarrollado para que los datos obtenidos sean precisos, exactos y reproducibles dando una confiabilidad para la cuantificación de la muestra.

5. HIPÓTESIS.

El manejo correcto de los parámetros cromatográficos permitirá desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución en micro escala, que cumpla con los parámetros de validación para analizar una muestra plasmática que contenga indometacina. Dicho método podrá ser utilizado en proyectos de docencia dentro del módulo de biofarmacia de la carrera de Q.F.B.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

6.1 Material y reactivos.

Reactivos	Matriz biológica.
➤ Agua desionizada (grado HPLC)	- Plasma humano
➤ Metanol (grado HPLC)	
➤ Acetonitrilo (grado HPLC)	
➤ Acetato de sodio	
➤ Ácido acético glacial	
➤ Indometacina	
➤ Naproxen sodico	

Material de vidrio

- Vasos de precipitados de 100, 500 mL
- Matraces aforados de 10, 50, 100, 500 mL
- Matraz Erlenmeyer de 500 ml
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5 mL
- Probeta de 5,10, 100, 200 mL
- Microtubos de 2, 3 mL
- Gradilla
- Tubos de vidrio
- Micro pipetas 1000 μ L
- Puntas para micropipeta

Equipo

- Cromatógrafo de líquidos WATERS
 - Multisolvant Delivery System Controller Waters 600E
 - Tunable Absorbance Detector Waters 486
 - Integrador Data Module Waters 746
 - Bomba Binaria
 - Gas: Nitrógeno
 - Columna Symmetry C₁₈, 5 μ m, 3.9 mm x150 mm
 - Serie: W30371L035 Part No. WAT046980.
- Microbalanza: METTLER Toledo PM400.
- Equipo de filtración.
- Vortex
- Microcentrifuga
- Sonicador
- Refrigerador

6.2. Metodología

6.2.1 Desarrollo del método analítico.

Se preparó una solución de indometacina y naproxeno sódico con una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ en metanol HPLC y se determinó la longitud de onda a la cual se obtenía el máximo de absorbancia.

Se prepararon dos fases móviles, una con metanol – buffer de acetatos y la otra con acetonitrilo – buffer de acetatos en cantidades de 300 ml de volumen total, y en diferentes proporciones como indica en el siguiente cuadro.

Fase móvil.	Proporción de disolventes.		
Metanol – Buffer*	50:50	60:40	70:30
Acetonitrilo – Buffer*	50:50	60:40	70:30

* La solución buffer utilizada fue de acetatos a un pH de 3.5 con una concentración de 0.01 M

Con las diferentes proporciones de cada fase móvil y con la solución de los analitos antes mencionados se hicieron pruebas en el cromatógrafo de líquidos, con una velocidad de flujo de 1 mL/min y un volumen de inyección de muestra de 50 μL a la longitud de onda determinada al inicio.

Con los resultados obtenidos en las diferentes proporciones de las dos fases móviles se eligieron las condiciones de trabajo para después validar el método analítico.

6.2.2 Validación del sistema.

La metodología que a continuación se describe se realizó en las condiciones que se encontraron durante el desarrollo del método analítico.

6.2.2.1 Linealidad y precisión del sistema.

De una solución Stock con una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ se prepararon por sextuplicado seis niveles de concentración de indometacina en metanol HPLC a concentraciones de: 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5 $\mu\text{g/mL}$.

Se preparó la solución del estándar interno (naproxeno sódico) en metanol HPLC a una concentración de 1.25 $\mu\text{g/mL}$.

Se adicionó el estándar interno a las soluciones de indometacina en una cantidad de 1 mL de indometacina y 4 mL de naproxeno sódico para tener una concentración final de cada analito de 1 $\mu\text{g/mL}$ en la concentración más alta. Las soluciones se mezclaron en Vortex por 5 min.

Se inyectaron las soluciones preparadas en el mismo día, en las condiciones señaladas en la metodología especificada en el desarrollo del método analítico.

Una vez obtenidos los cromatogramas, se calculó la respuesta para cada uno de ellos, la cual es el resultado del área bajo la curva del fármaco entre el área bajo la curva del estándar interno.

Se llevó a cabo la correlación de la respuesta vs. la concentración del analito y se obtuvo el coeficiente de determinación, pendiente y ordenada al origen de la curva.

Los criterios de aceptación que se tomaron para esta prueba fue una r^2 mayor o igual a 0.98, así como la precisión con un coeficiente de variación en cada nivel de concentración menor o igual a 3%. Con los resultados, se determinó si todo el sistema (instrumento) analítico funcionaba correctamente.

6.2.3 Validación del método.

6.2.3.1 Tratamiento de las muestras.

El tratamiento de las muestras y la adición del estándar interno se realizó de la siguiente manera: se tomaron 0.5 mL de la muestra de indometacina en plasma ya preparada a la concentración deseada en un microtubo con capacidad para 3 ml y se le adicionaron 2 ml de una solución de estándar interno a una concentración de 1.25 $\mu\text{g/mL}$ (La solución de estándar interno se preparó con una mezcla de metanol – Ácido acético glacial de 99:1), después se mezcló con ayuda de un Vortex por un minuto, por ultimo se centrifugaron las muestras por 10 minutos a 5000 rpm, el sobrenadante se inyectó al cromatógrafo. Este tratamiento general se aplicó a todas las muestras preparadas para la validación del método analítico con excepción de la selectividad.

6.2.3.2 Selectividad.

Se estableció la selectividad del método al analizar muestras blanco de la matriz biológica. Se evaluó el método contra posibles interferencias. El criterio que se tomó para la prueba fue que no deben existir interferencias en la cuantificación del compuesto por analizar. Las muestras utilizadas se prepararon de la siguiente manera:

Plasma + estándar interno (conc. 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$)

Plasma + Metanol - ac. Acético (99:1)

Plasma + indometacina (5 $\mu\text{g} / \text{mL}$)

Plasma + estándar interno + indometacina (5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ambos)

La proporción de las muestras fue de 1 ml de plasma y 4 ml de estándar interno o disolvente, posteriormente se agitó en Vortex por 5 minutos y se centrifugó a 5000 rpm durante 10 minutos y se inyectó el sobrenadante al cromatógrafo.

6.2.3.3 Rango.

El rango que se estableció fue en función de las concentraciones esperadas del compuesto por analizar, el cual se tiene reportado niveles máximos en plasma de 2 $\mu\text{g/mL}$. El intervalo se constituyó por seis niveles de concentración sin incluir la muestra blanco, con puntos intermedios en común e incluyendo el límite de cuantificación y concentración máxima del rango.

Concentraciones establecidas: 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5 ($\mu\text{g} / \text{mL}$).

6.2.3.4 Límite de detección.

Se determinó la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica puede distinguirse de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés.

Se preparó una solución de indometacina en la matriz biológica a la concentración del último nivel de trabajo (0.5 $\mu\text{g/mL}$), se le realizaron una serie de diluciones para determinar el límite de detección del analito.

6.2.3.5 Linealidad.

Se prepararon seis niveles de concentración por sextuplicado a las concentraciones establecidas en el rango. La linealidad se determinó por un modelo matemático de regresión lineal que describe la relación matemática entre concentración y respuesta del analito. Con los resultados se calculó la ecuación de la recta, el coeficiente de regresión (r^2) lineal que debe ser mayor o igual de 0.98 y se determinó el coeficiente de variación en cada nivel donde no debe ser mayor al 15 %

6.2.3.6 Límite de cuantificación.

Se preparó por quintuplicado una solución de indometacina a una concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$. Se consideró que el punto tiene validez como límite de cuantificación, si su valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor que 20%.

6.2.3.7 Precisión.

6.2.3.7.1 Repetibilidad.

Se preparó y analizó una solución de indometacina en un mismo día por quintuplicado tres concentraciones conocidas: baja, media y alta en la matriz biológica. Estas concentraciones fueron diferentes a las del rango, pero deberán estar dentro del mismo. El coeficiente de variación no deberá ser mayor que el 15%.

Los niveles de concentración que se determinaron dentro del rango fueron: 0.75, 2.5, 4 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

6.2.3.7.2 Reproducibilidad intralaboratorio.

Se preparó y analizó una solución de indometacina por duplicado durante tres días, un mínimo de tres concentraciones conocidas: baja, media y alta en la matriz biológica. Estas concentraciones fueron diferentes a las del rango, pero deben estar dentro del mismo. El coeficiente de variación no deberá ser mayor que el 15 %.

Los niveles de concentración que se determinaron dentro del rango fueron: 0.75, 2.5, 4 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

6.2.3.8 Exactitud.

Se calculó el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad los cuales deberá estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

6.2.3.9 Estabilidad.

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo en las que el compuesto permanecerá estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, y se prepararon soluciones de indometacina en la matriz biológica por duplicado, a tres niveles de concentración dentro del rango.

Los niveles de concentración que se determinaron dentro del rango fueron: 0.75, 2.5, 4 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

a). Condiciones de almacenamiento: Se evaluó la estabilidad de la muestra en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantuvieron las muestras, por un periodo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis. En congelación 24 horas.

b). Ciclos de congelación-descongelación: Se evaluó la estabilidad del o los compuestos por analizar al congelar y descongelar a temperatura ambiente las muestras en la matriz biológica; esto constituye un ciclo de congelación-descongelación. Se evaluó durante un periodo de 1 y 2 semanas. No se consideró someter a la luz la muestra ya que se sabe que se almacenan las muestras en congelación y lugares oscuros. Para que las muestras se consideren estables en las diferentes condiciones evaluadas, los resultados obtenidos deben cumplir los criterios de exactitud y repetibilidad.

6.2.3.10 Tolerancia.

Se evaluó la tolerancia del método analítico a modificaciones de pH de la fase móvil, al analizar las muestras por triplicado de indometacina a una concentración de 4 μ g/mL en la matriz biológica. Deberá cumplir con los criterios de exactitud y precisión. Los cambios establecidos en el pH de la fase móvil fueron de 3.3, 3.5, 3.83.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

7.1 Desarrollo del método analítico.

En este proyecto se propuso como primer objetivo desarrollar un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para el análisis de indometacina en plasma y que el tiempo de retención de la misma fuera menor a 5 minutos. Haciendo una investigación sobre las propiedades físicas y químicas de la indometacina y del naproxeno sódico como estándar interno se planteó un método, el cual se desarrolló preparando la fase móvil con metanol y una solución buffer de acetatos con una concentración de 0.01 M y un pH de 3.5 en proporciones de 50:50, 60:40 y 70:30 con un flujo de 1 mL/min a una longitud de onda de 258 nm con un volumen de inyección de 50 μ L, las muestras se prepararían a una concentración de 100 μ g/ml en metanol. Se eligió una solución buffer de acetatos y no una solución buffer de fosfatos, debido a la solubilidad que tienen el acetato de sodio (usada para preparar el buffer) sobre las sales de fosfato. Las sales de fosfato que se utilizan para preparar la solución buffer son muy solubles en agua pero son insolubles en alcoholes, esta propiedad puede causar un daño a largo plazo en la columna cromatográfica, porque se pueden precipitar pequeñas cantidades de las sales dentro del sistema y columna provocando una obstrucción parcial de la columna disminuyendo la eficiencia de la columna y la vida media de uso de la misma, además de alterar la resolución de los picos y los tiempos de retención, así como un aumento de la presión del sistema, al trabajar con buffer de fosfatos se debe tener algunos cuidados como pasar mucha agua para lavar la columna lo mejor posible y no queden residuos de las sales de fosfatos. A diferencia de las sales de fosfatos, la sal de acetato de sodio es soluble en agua y alcoholes. Esta propiedad es benéfica para la columna, la posibilidad de que se precipiten las sales en la columna o el sistema es mínima por lo tanto los cuidados para la columna y el sistema es menor.

Los resultados que se obtuvieron con las proporciones de metanol – buffer de 50:50 y 60:40 no fueron buenos, ya que los tiempos de retención fueron mayores a 20 minutos y no se obtuvieron registros de las corridas debido a la programación del integrador fijando un tiempo de 20 minutos. La única proporción que se obtuvieron resultados fue la de 70:30 de metanol – buffer y se obtuvo como resultado el siguiente cromatograma:

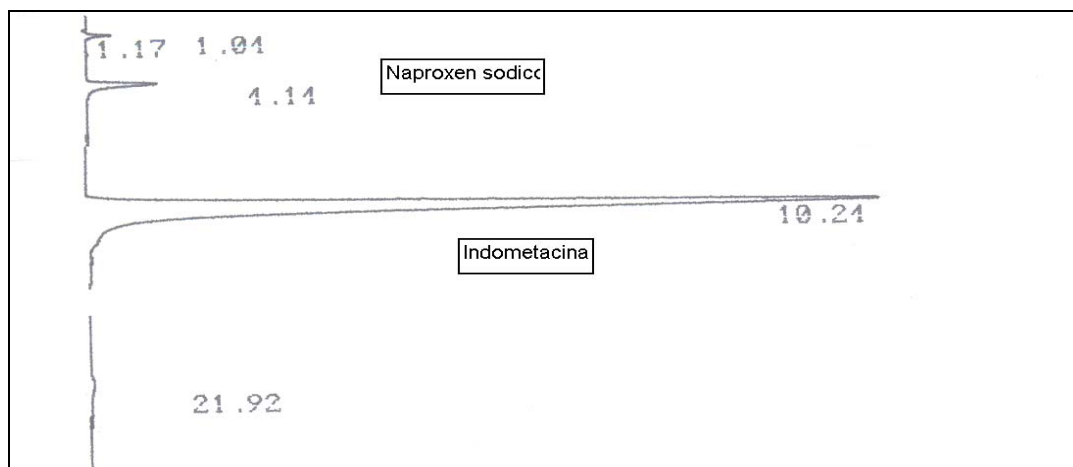


Figura 1. Cromatograma de indometacina y naproxeno sódico, fase móvil de metanol y buffer de acetatos pH 3.5 en una proporción de 70:30.

Se puede observar en la figura 1 que la indometacina tiene un tiempo de retención mayor a lo esperado (10.24 min.) y el estándar interno (naproxeno sódico) tiene un tiempo de retención de 4.14 min., con un pico o área bajo la curva muy pequeño, debido a que el estándar interno y la muestra se prepararon a la misma concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ pero se mezclaron en una proporción de 4 mL de muestra por 1 mL de estándar interno, diluyendo este último a una quinta parte de la concentración original, por esta razón el cromatograma del naproxeno sódico es mucho menor que la indometacina. En este cromatograma (figura 1) se pueden analizar los tiempos de retención los cuales son el primer objetivo del proyecto, estos tiempos de retención se obtuvieron debido a que la fase móvil tenía menor fuerza electropica en comparación con la fase estacionaria (columna empacada con silica C18), la polaridad de la fase móvil se debe a los solventes que la componen, donde el metanol es un solvente poco polar, en consecuencia los dos analitos son retenidos un mayor tiempo en la columna obteniendo tiempos de retención mayores a los esperados, pero en comparación con las proporciones de 50:50 y 60:40 de la misma mezcla donde el metanol se encontraba en menor cantidad, la proporción de 70:30 tiene mayor fuerza electropica produciendo que los tiempos de retención sean menores a los 20 minutos. Con estos resultados se observa que entre mayor es la cantidad de metanol la polaridad aumenta gradualmente pero no lo suficiente como para reducir las corridas de la indometacina en menos de 5 minutos.

Se probó otra fase móvil, donde se cambió el metanol por acetonitrilo en las mismas proporciones antes mencionadas, los demás parámetros se mantuvieron igual y las muestras se prepararon a la misma concentración, los resultados obtenidos con las diferentes proporciones fueron mejores, la proporción de 50:50 acetonitrilo – buffer dio como resultado que los tiempos de retención de la indometacina fue menor a 10 minutos pero mayor a 5 minutos y la proporción 70:30 de la misma mezcla redujeron los tiempos de retención en menos de 5 minutos pero los picos de los analitos se encimaban, no permitiendo una buena

resolución de picos de los analitos, por lo cual solo se muestra el cromatógrama de la mezcla de acetonitrilo – buffer en proporción de 60:40 que fue la ideal y con la que se obtuvieron los resultados deseados. Con esta nueva fase móvil se obtuvo el siguiente cromatograma:

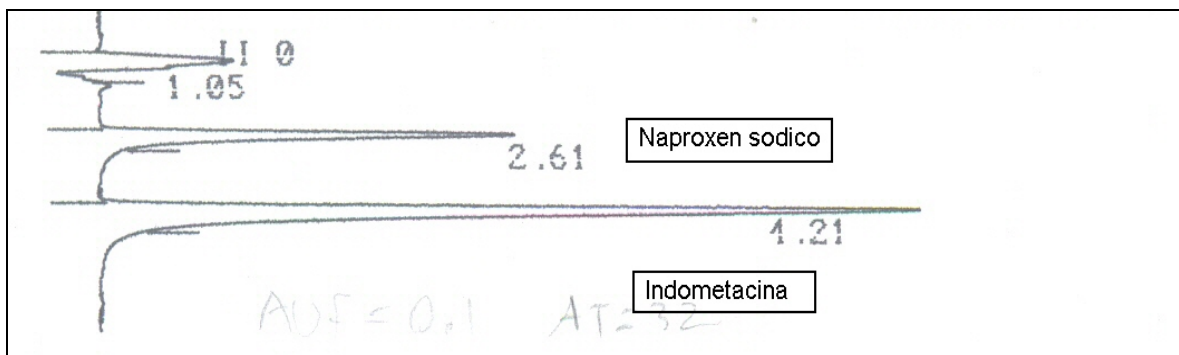


Figura 2. Cromatógrama de indometacina y naproxeno sódico, fase móvil de acetonitrilo y buffer de acetatos pH 3.5 en una proporción de 60:40.

En este cromatógrama se puede observar una diferencia en los tiempos de retención, estos son menores a 5 minutos que era el objetivo principal, al cambiar el metanol por acetonitrilo se obtuvo una fase móvil con una polaridad mayor en comparación con la primera fase móvil, las fuerzas intramoleculares entre las dos fases provocan la distribución de los analitos entre las dos fases (fase móvil y fase estacionaria) alcanzando un equilibrio entre las dos fases, pero al haber una mayor polaridad en la fase móvil las muestras serán arrastradas a través de la fase estacionaria mas rápido disminuyendo los tiempos de retención en menos de 5 minutos. En esta fase móvil también se observa que al aumentar la cantidad de acetonitrilo la polaridad aumenta gradualmente y obteniendo los resultados esperados. Al hacer una comparación entre las dos fases móvil, se decidió usar el acetonitrilo por dar mejores resultados, además de usar una menor cantidad del disolvente, ser menos volátil y tener una mayor polaridad que el metanol, además de dar una buena separación y resolución de los picos de cada muestra.

Una vez que se logro cumplir con el primer objetivo se determinó si el método era selectivo para los analitos y si al usar plasma humano no causaba problemas como ruido en la línea base, cambios en los tiempos de retención, así como una mala resolución de los cromatógramas ó se pudieran encimar los picos de los analitos con los de las proteínas del plasma. Para comprobar la selectividad se corrieron las muestras por separado y por último se mezclaron, donde se obtuvieron los siguientes cromatógramas:

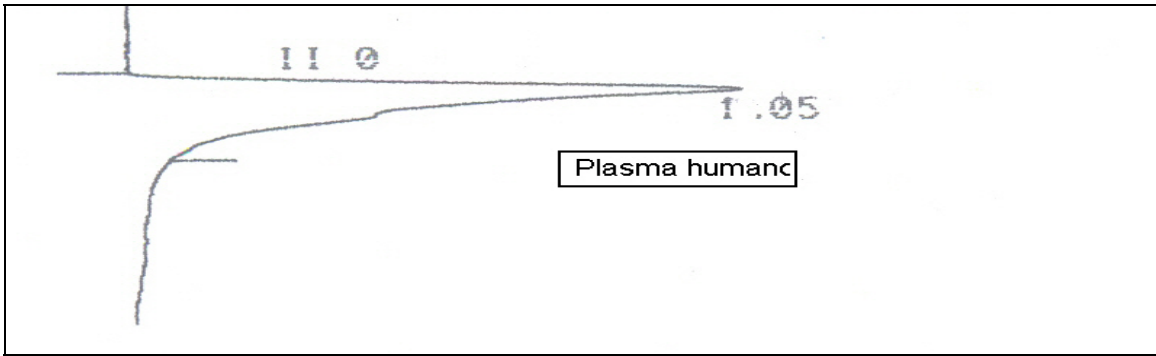


Figura 3. Cromatograma de proteínas de plasma humano, fase móvil de acetonitrilo y buffer de acetatos pH 3.5 en una proporción de 60:40.

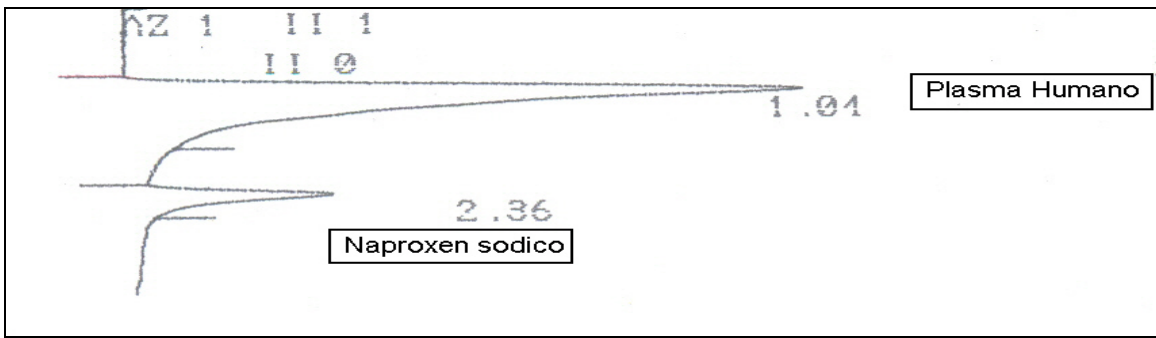


Figura 4. Cromatograma de plasma y naproxeno sódico, fase móvil de acetonitrilo y buffer de acetatos pH 3.5 en una proporción de 60:40.

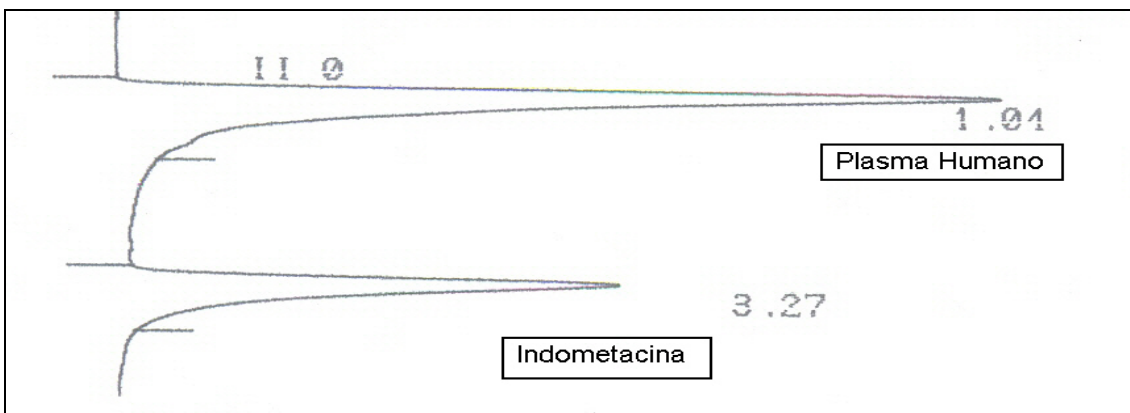


Figura 5. Cromatograma de plasma humano e indometacina, fase móvil de acetonitrilo y buffer de acetatos pH 3.5 en una proporción de 60:40.

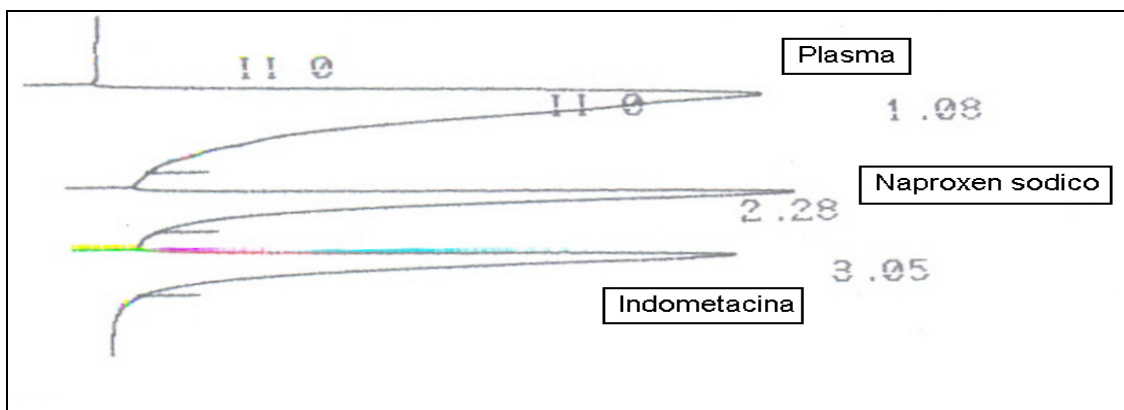


Figura 6. Cromatograma de plasma humano, indometacina y naproxeno sódico, fase móvil de acetonitrilo y buffer de acetatos pH 3.5 en una proporción de 60:40.

En los cromatogramas se puede observar que las proteínas plasmáticas no interfiere con los analitos debido a que tiene un tiempo de retención diferente a los analitos, también se puede observar que la resolución de los picos de las muestras se separan correctamente, debido a que las proteínas son moléculas muy polares, estas interactúan con mayor fuerza con la fase móvil que con la fase estacionaria eluyendo a través del sistema con mayor rapidez que los analitos, por lo tanto la matriz biológica no interviene con la cuantificación de las muestras.

7.2. Validación del Sistema.

Linealidad y Precisión del sistema.

En la tabla 4 se muestran los resultados de la prueba de precisión del sistema, en esta tabla se observan las seis relaciones de las áreas bajo la curva que resultan de la muestra de indometacina entre el estándar interno del naproxeno sódico, a estos resultados se les determinó el coeficiente de variación.

Precisión del Sistema	
Conc. $\mu\text{g/ml}$	ABC _{MTR/STD}
3	0.4769
3	0.4771
3	0.4760
3	0.4991
3	0.4766
3	0.4802
Promedio	0.4810
Desv. STD	0.0090
C.V.	1.8733

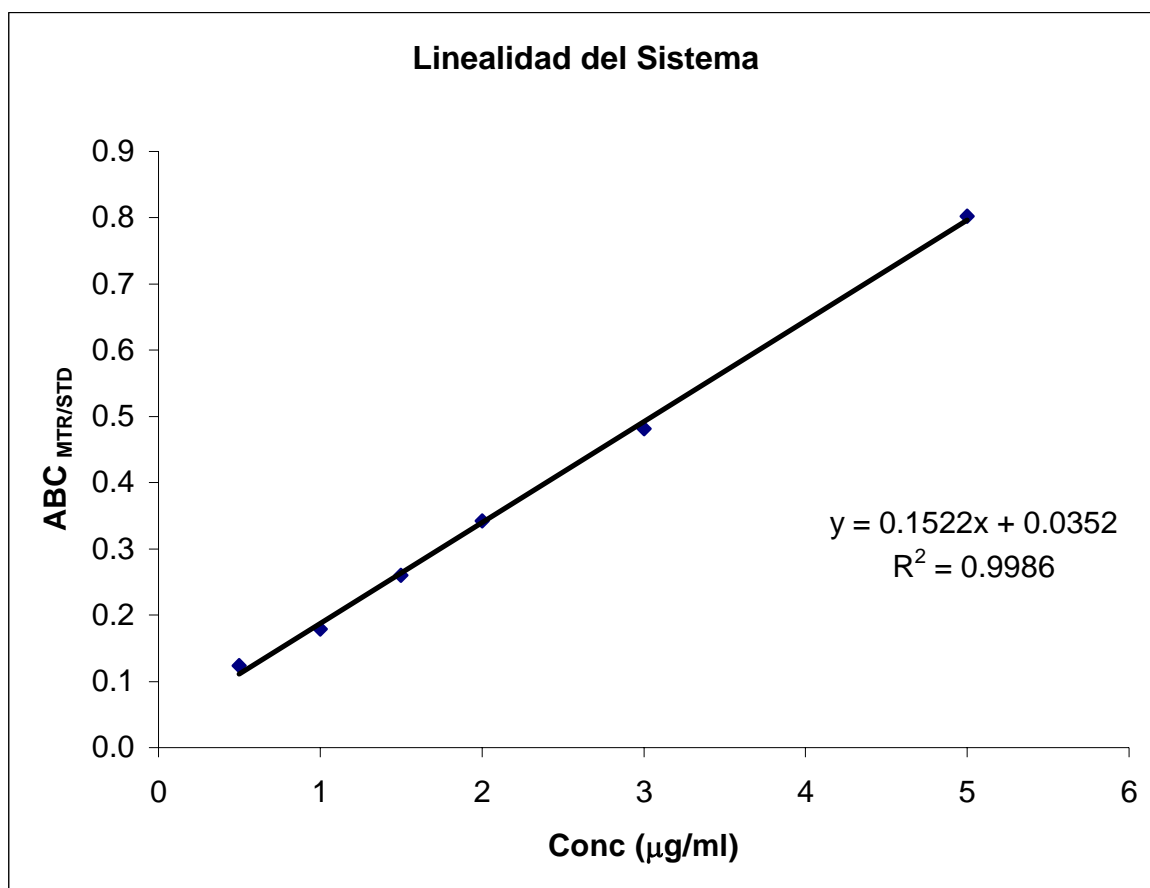
Tabla 4 Precisión del Sistema.

En la tabla 5 se muestran los resultados (relación entre las áreas bajo la curva) obtenidos en la linealidad del sistema de seis concentraciones del rango de trabajo, con estos resultados se determino el coeficiente de determinación (r^2), y la ecuación de la recta.

X Conc. $\mu\text{g/ml}$	ABC _{MTR/STD}						Y
	1	2	3	4	5	6	Promedio
0.5	0.1137	0.1344	0.1202	0.1331	0.1173	0.1261	0.1242
1	0.1757	0.1765	0.1778	0.1811	0.1813	0.1800	0.1787
1.5	0.2656	0.2697	0.2416	0.2673	0.2712	0.2472	0.2604
2	0.3308	0.3519	0.3605	0.3376	0.3361	0.3381	0.3425
3	0.4769	0.4771	0.4760	0.4991	0.4766	0.4802	0.4810
5	0.8099	0.7984	0.7963	0.8064	0.8051	0.8003	0.8027

Tabla 5. Linealidad del Sistema.

Con los datos de la linealidad se construyó la grafica de la linealidad del sistema relacionando la concentración de la muestra contra la respuesta del equipo.



Grafica 1. Linealidad del Sistema.

Estas dos pruebas se realizaron para evaluar que el equipo este en las mejores condiciones de uso. En la precisión del sistema se determino un coeficiente de variación entre las muestras de 1.87 % el cual es menor de 3 % que se establece como criterio de aceptación. En la linealidad del sistema se obtuvo una ecuación de la recta igual a $y = 0.1522x + 0.0352$ que es del tipo $y = mx + b$ con un coeficiente de determinación (r^2) de 0.9986, el criterio de aceptación indica que el valor de r^2 debe ser mayor a 0.98.

El cumplimiento de las pruebas realizadas, indican que la respuesta medida por el equipo (áreas bajo la curva) para la cuantificación de indometacina son precisas y existe una relación lineal entre la concentración de la muestra y la respuesta medida por el equipo dando un comportamiento lineal en el rango de concentración de 0.5 a 5 $\mu\text{g/ml}$, por lo tanto el equipo se encontró en buenas condiciones de uso.

7.3 Validación del método.

Linealidad del Método.

En la tabla 6 y 7 se observa la relación de las áreas bajo la curva de la muestra y el estándar interno en la matriz biológica (plasma humano) de la linealidad del método con los que se calculo el r^2 y la recuperación absoluta por cada nivel de concentración

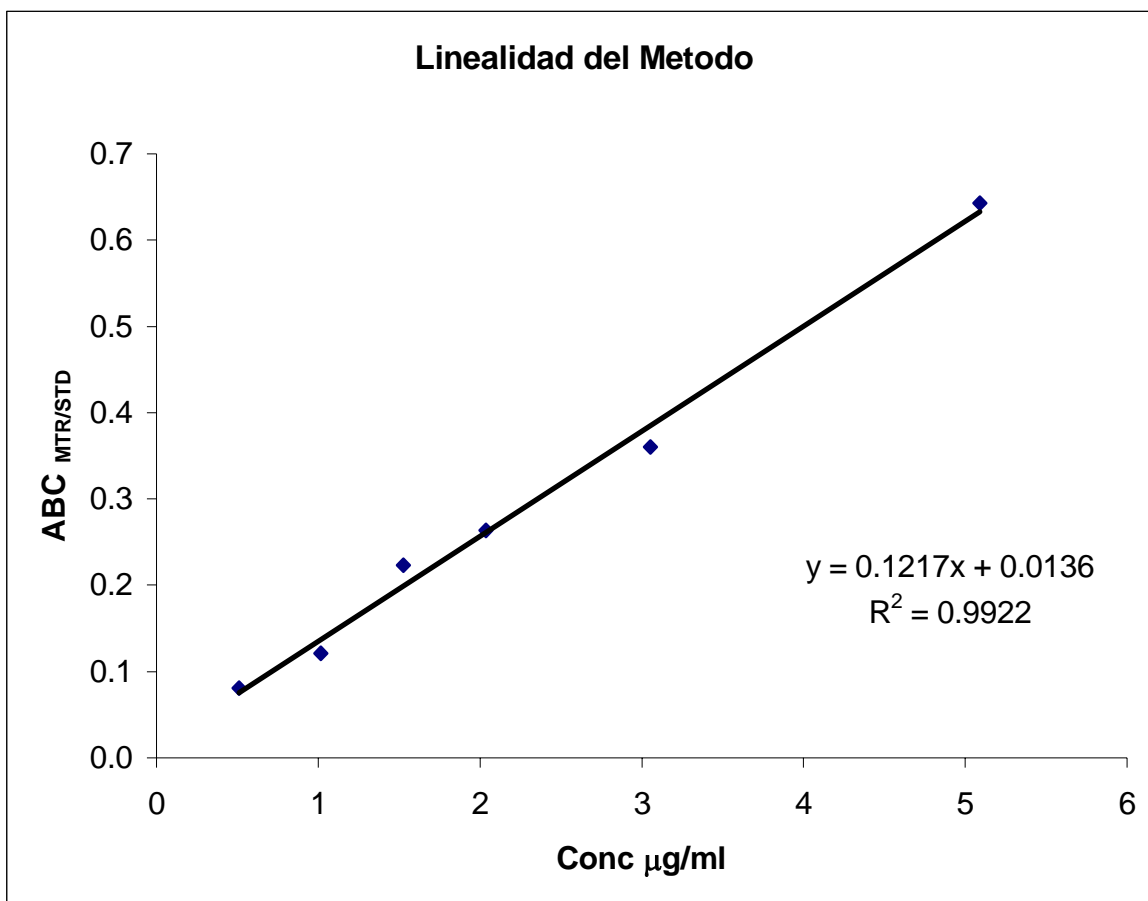
X	ABC _{MTR/STD}						Y
Conc. $\mu\text{g/ml}$	1	2	3	4	5	6	Promedio
0.509	0.0859	0.0806	0.0791	0.0857	0.0791	0.0759	0.0810
1.018	0.1181	0.1192	0.1288	0.1224	0.1166	0.1223	0.1212
1.527	0.2284	0.2122	0.2270	0.2616	0.2117	0.1996	0.2234
2.036	0.2682	0.2748	0.2608	0.2531	0.2613	0.2612	0.2633
3.054	0.3487	0.3696	0.3602	0.3612	0.3600	0.3603	0.3600
5.09	0.6447	0.6426	0.6462	0.6334	0.6425	0.6462	0.6426

Tabla 6. Linealidad del Método.

X	Y		
Conc. mg/ml	Promedio	Cant. Recup.	% Recobro
0.509	0.0810	0.5541	108.8684
1.018	0.1212	0.8844	86.8782
1.527	0.2234	1.7242	112.9149
2.036	0.2633	2.0514	100.7566
3.054	0.3600	2.8463	93.1977
5.09	0.6426	5.1683	101.5384

Tabla 7. Recuperación Absoluta y exactitud.

Con los datos obtenidos se determinó la ecuación de la recta y se construyó la gráfica de la linealidad del método relacionando la concentración de la muestra en la matriz biológica y la respuesta del equipo.



Grafica 2. Linealidad del Método.

La linealidad del método es un parámetro que indica la relación entre la concentración de la muestra en la matriz biológica y la respuesta del equipo, esta prueba se realiza determinando la respuesta de seis niveles de concentración por sextuplicado, a los datos que se muestran en la tabla 6 se les aplicó un modelo matemático de regresión lineal para determinar el r^2 y la ecuación de la recta ($y = mx + b$). El coeficiente de determinación que se obtuvo fue de 0.9922, este valor es mayor al establecido en el criterio de aceptación el cual debe ser mayor o igual de 0.98, con este resultado se puede decir que la respuesta del equipo es directamente proporcional a la concentración del analito con un comportamiento lineal donde la matriz biológica no causa problemas en el equipo, la ecuación de la recta que describe esta relación es la siguiente:

$$y = 0.1217x + 0.0136.$$

En la tabla 7 se observan la recuperación absoluta calculado mediante la ecuación de la recta para cada nivel de concentración obteniendo un rango de 86.87 a 112.91 % cumpliendo con el criterio para este parámetro (los valores deben estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal), indicando que la matriz biológica no interfiere en la cuantificación del analito y que el método de extracción es bueno para el tratamiento de las muestras biológicas.

Precisión del Método.

Repetibilidad.

En la tabla 8 se muestran los resultados de la precisión del método en términos de repetibilidad a tres niveles de concentración por sextuplicado, donde se determino el coeficiente de variación y el porcentaje de recobro por cada nivel de concentración para esta prueba.

x	ABC _{MTR/STD}						y
Conc $\mu\text{g/ml}$	1	2	3	4	5	6	Promedio
0.7515	0.0908	0.0910	0.0906	0.0903	0.0908	0.1003	0.0923
2.515	0.3041	0.3118	0.3042	0.3135	0.3061	0.3120	0.3086
4.024	0.4886	0.4912	0.4937	0.4867	0.4943	0.4979	0.4921

Desv. Std	C.V.	Cant. Recup.	% Recobro
0.0039	4.2672	0.6467	86.0537
0.0043	1.3888	2.4241	96.3859
0.0041	0.8307	3.9316	97.7029

Tabla 8 Repetibilidad

Al analizar los datos de repetibilidad se puede observar que la variación entre las muestras por cada nivel de concentración es muy baja, estos resultados están por debajo del criterio de aceptación que nos dice que el coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15 % en cada nivel de concentración, indicando que el método es muy preciso en términos de repetibilidad y se pudieron controlar adecuadamente los errores que pudiera presentarse en el desarrollo del método analítico.

Reproducibilidad intralaboratorio.

En las tablas 9, 10 Y 11. Se observan los resultados del parámetro de precisión en términos de reproducibilidad intralaboratorio a tres niveles de concentración por duplicado durante tres días con los que se determino el coeficiente de variación y el porcentaje de recobro por cada día para cada nivel de concentración.

x	ABC _{MTR/STD}		y	Desv. Std	C.V:	Cant. Recup.	% Recobro
conc. $\mu\text{g/ml}$	1	2	Promedio				
0.751	0.0908	0.0985	0.0947	0.0054	5.7525	0.6660	88.6794
2.505	0.3175	0.3211	0.3193	0.0025	0.7972	2.5119	100.2760
4.008	0.4943	0.4979	0.4961	0.0025	0.5131	3.9647	98.9188

Tabla 9. Reproducibilidad intralaboratorio Día 1

x	ABC _{MTR/STD}		y	Desv. Std	C.V:	Cant. Recup.	% Recobro
conc. $\mu\text{g/ml}$	1	2	Promedio				
0.7575	0.1032	0.1106	0.1069	0.0052	4.8997	0.7668	101.2315
2.525	0.2938	0.3105	0.3022	0.0118	3.9017	2.3713	93.9120
4.04	0.4408	0.4507	0.4457	0.0070	1.5722	3.5506	87.8869

Tabla 10. Reproducibilidad intralaboratorio Día 2

x	ABC _{MTR/STD}		y	Desv. Std	C.V:	Cant. Recup.	% Recobro
conc. $\mu\text{g/ml}$	1	2	Promedio				
0.753	0.1024	0.1003	0.1014	0.0015	1.4651	0.7210	95.7550
2.51	0.3293	0.3215	0.3254	0.0055	1.6950	2.5620	102.0732
4.016	0.4979	0.5073	0.5026	0.0066	1.3225	4.0181	100.0517

Tabla 11. Reproducibilidad intralaboratorio Día 3

Los resultados de esta prueba reflejan que el método tiene la capacidad de ser reproducible al obtener resultados con una variación muy baja entre muestras independientes, al someterse durante tres días bajo las mismas condiciones de trabajo establecidas para el método. El criterio de aceptación para este parámetro es que el coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15 %, notándose que en los tres días y en los tres niveles de concentración los C.V. están por debajo del criterio de aceptación.

Exactitud.

Para este parámetro la NOM-177 indica que con los datos de la repetibilidad y la reproducibilidad de la precisión del método se debe determinar el valor promedio de concentración para cada nivel y el criterio de aceptación es que los valores obtenidos por cada nivel de concentración deben estar dentro del ± 15 % de su valor nominal de concentración. Para determinar estos valores se calculó la cantidad recuperada y el porcentaje de recobro por cada nivel de concentración, mostrándose en las tablas 9, 10 y 11 que corresponden a cada día de trabajo, donde los valores están dentro del criterio de aceptación por lo tanto el método también es exacto en las determinaciones de las muestras.

Estabilidad

Condiciones de almacenamiento.

En la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos de la estabilidad de la muestra almacenada durante 24 hrs. en congelamiento y se le determino el coeficiente de variación y el porcentaje de recobro para cada nivel de concentración.

x	ABC _{MTR/STD}			y				
Conc. $\mu\text{g/ml}$	1	2	3	Promedio	Desv. Std	CV	Cant. Recup.	% Recobro
0.75	0.0985	0.0908	0.0910	0.0935	0.0044	4.6885	0.6561	87.4839
2.5	0.3211	0.3175	0.3153	0.3180	0.0029	0.9256	2.5011	100.0452
4	0.4943	0.4979	0.4937	0.4953	0.0023	0.4584	3.9581	98.9536

Tabla 12. Estabilidad de la muestra congelada durante 24 hrs.

La estabilidad de la muestra es muy importante debido a que no siempre se puede analizar al mismo tiempo en el que se toma la muestra, para esto se debe almacenar por lo menos un periodo de 24 hrs. en estado de congelación cuando se trabaja con muestras biológicas, para que la muestra se considere estable, debe cumplir con los criterios de aceptación de exactitud y repetibilidad ($C.V. \leq 15$ % y el ± 15 % del valor nominal de concentración por cada nivel), al analizar los resultados obtenidos en la tabla 12 para esta prueba se demostró que cumple con este criterio donde el C.V. no fue mayor al 5 % y el valor nominal que se obtuvo fue del 87.48 a 100.04 % con esto se puede saber que la muestra si es estable durante un periodo de 24 hrs. obteniéndose resultados exactos y precisos.

Ciclos de congelación – descongelación.

En las tablas 13 y 14 se muestran los resultados de la estabilidad de la muestra sometida a ciclos de congelación y descongelación durante dos semanas y con los cuales se determinó el coeficiente de variación y el porcentaje de recobro.

x	ABC _{MTR/STD}			y				
Conc. µg/ml	1	2	3	Promedio	Desv. Std	CV	Cant. Recup.	% Recobro
0.75	0.1135	0.1114	0.1153	0.1134	0.0020	1.7381	0.8198	109.3080
2.5	0.3270	0.3288	0.3160	0.3239	0.0069	2.1391	2.5499	101.9946
4	0.5132	0.4968	0.4976	0.5025	0.0092	1.8397	4.0175	100.4373

Tabla 13. Estabilidad de la muestra durante una semana sometida a ciclos de congelación y descongelación.

x	ABC _{MTR/STD}			y				
Conc. µg/ml	1	2	3	Promedio	Desv. Std	CV	Cant. Recup.	% Recobro
0.75	0.1200	0.1138	0.1166	0.1168	0.0031	2.6570	0.8479	113.0580
2.5	0.3322	0.3226	0.3255	0.3268	0.0049	1.5042	2.5732	102.9284
4	0.6666	0.5060	0.6740	0.6155	0.0949	15.4242	4.9457	123.6436

Tabla 14. Estabilidad de la muestra durante dos semanas sometida a ciclos de congelación y descongelación.

El someter a las muestras a ciclos de congelación y descongelación es con el propósito de demostrar que la matriz biológica (plasma humano) y el analito son estables a los cambios de temperatura conservando sus características iniciales, las muestras se analizaron al término de tres ciclos de congelación y descongelación (1 semana) y a los 6 ciclos (2 semanas), se consideran estables si cumplen con el criterio de exactitud y repetibilidad ($C.V. \leq 15\%$ y el $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración por cada nivel) después de someter la muestra a por lo menos 2 ciclos. Se obtuvieron los resultados a la primera semana que se muestra en la tabla 9 donde el C.V. no fue mayor al 3% en los tres niveles de concentración y el porcentaje de recobro fue 100.43 a 109.30%, en la tabla 14 se muestran los valores de la segunda semana, se obtuvo un C.V. mayor al 15% en el nivel más alto de concentración y un porcentaje de recobro de 102.92 a 123.64%. La muestra a la primera semana se consideran estables por que cumplen con los criterio de aceptación teniendo la confiabilidad que al analizar la muestra se tendrán resultados exactos y precisos, pero en la segunda semana las muestras ya no se pueden considerar estables debido a que el nivel más alto de concentración esta por arriba del criterio de aceptación, este valor se pudo deber a que tanto el analito o la muestra biológica sometidas a los cambios de temperatura tuvieron un cambio en sus características iniciales, el analito y la matriz biológica sufrieron degradación en sus componentes (proteínas en el plasma humano) o su

estructura molecular (molécula de la indometacina) y estos influyeron en la respuesta del equipo al ser medida. Por lo tanto las muestras son estables de acuerdo a el criterio establecido por la NOM – 177, pero con el análisis de los datos obtenidos durante un tiempo mas prolongado se puede decir que la muestra no es estable a las dos semanas.

Limite de cuantificación.

En la tabla 15 se observan los resultados del limite de cuantificación los cuales consisten en medir la respuesta de la concentración mas baja por quintuplicado como mínimo para determinar el coeficiente de variación y el porcentaje de recobro.

Conc. µg/mL	ABC _{MTR/STD}
0.509	0.0859
0.509	0.0806
0.509	0.0791
0.509	0.0857
0.509	0.0791
0.509	0.0759
Promedio	0.0810
Desv. Std.	0.0040
C.V.	4.9171
Cant. Recup.	0.5541
% Recobro	108.8684

Tabla 15. Limite de Cuantificación.

La norma establece que se debe tomar el punto mas bajo del rango de trabajo (0.5 µg/ml) y para que se considere como limite de cuantificación su valor promedio debe estar dentro de $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación de no mayor del 20 %, el C.V. que se obtuvo es de 4.9 % con un porcentaje de recobro igual a 108.86 % indicando que cumple con el criterio de aceptación donde el limite de cuantificación para indometacina en plasma humano es de 0.5 µg/ml.

Limite de detección.

En este parámetro se debe determinar la concentración a la cual la señal del compuesto en la matriz biológica se puede distinguir de los niveles de ruido que se generen en el equipo. En la figura 7 se puede observar que a una concentración de 0.1 µg/ml la señal de la indometacina apenas se puede distinguir de la línea base del cromatograma por lo tanto este es el limite de detección para la indometacina en plasma humano.

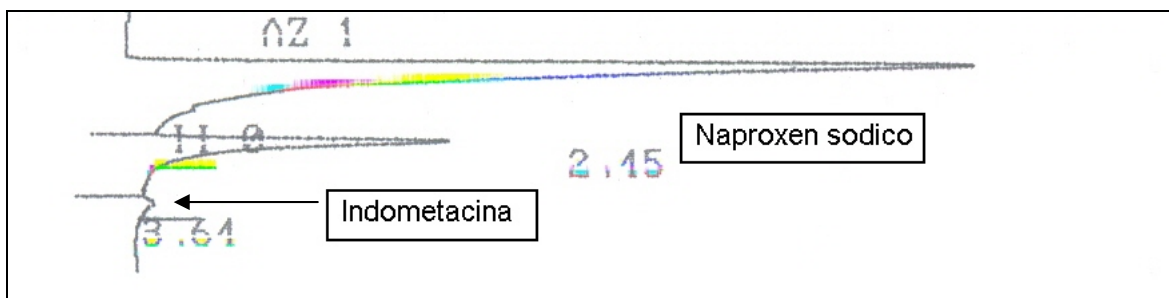


Figura 7. limite de detección a una concentración de 0.1 µg/ml.

Selectividad.

La finalidad de este parámetro es el comprobar que el método es selectivo para el analito que se va a analizar y que no hay interferencia de la matriz biológica, metabolito, productos de degradación, etc. Se pudo comprobar que el método es selectivo al analizar por separado y después combinados entre si a la matriz biológica, la indometacina y el estándar interno (figuras 3, 4, 5 y 6) donde se puede observar que estos tres compuestos tienen diferentes tiempos de retención en los cromatogramas y al combinarse no se enciman entre si, además de que la matriz biológica no provoca ningún tipo de interferencia permitiendo que se pueda cuantificar la indometacina y el estándar interno

Tolerancia.

En la tabla 16 se observan los datos obtenidos de la tolerancia del método a tres diferentes pH a una concentración de 4 µg/ml.

pH	x	ABC _{MTR/STD}			y	Desv. Std	CV	Cant. Recup.	%Recobro
	Conc. µg/ml	1	2	3	Promedio				
3.3	4	0.4720	0.4932	0.4341	0.4664	0.0300	6.4257	3.7208	93.0205
3.5	4	0.4748	0.4793	0.4718	0.4753	0.0038	0.7902	3.7937	94.8433
3.83	4	0.4248	0.4675	0.4382	0.4435	0.0218	4.9241	3.5324	88.3111

Tabla 16. tolerancia al cambio de pH a una concentración de 4 µg/ml.

La tolerancia del método analítico a pequeños pero deliberados cambios es de suma importancia para determinar si el método puede resistir estos cambios y seguir siendo preciso y exacto para que los datos sean confiables. En este caso se determinó que el pH es un factor en el que se debe tener cuidado en controlarlo debido a que el pH influye directamente en la estabilidad del analito en la matriz biológica y se puede modificar la cuantificación del analito por el equipo. Para la tolerancia el criterio de aceptación es que debe cumplir con los criterios de precisión y exactitud ($C.V. \leq 15\%$ y $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración)

por cada nivel), los C.V. que se determinaron fueron menores del 7 % y el porcentaje de recobro estuvieron dentro del rango del 85 a 115 %. Además de estos resultados se hizo un análisis de varianza de un factor para los diferentes pH donde se propuso que la H_0 es que las medias de los tratamientos son iguales y la H_1 es que las medias de los tratamientos son diferentes y los resultados se observan en la tabla 17 donde se determino que la F calculada fue menor a la F teórica indicando que las medias entre los tratamientos son iguales.

ANDEVA	
Fcalc	Fteorica
1.7443	5.1432

Tabla 17. ANDEVA de un factor (tres pH)

Con estos resultados se puede establecer que el método es tolerante a pequeños cambios de pH garantizando que los datos que se obtenga son precisos y exactos para la cuantificación de indometacina en plasma humano.

8. CONCLUSIONES.

- Con el método analítico que se desarrollo se logro reducir los tiempos de retención en menos de 5 minutos para el análisis químico de indometacina en plasma humano HPLC.
- La separación de los analitos fue muy buena, obteniendo una buena resolución de los cromatogramas, permitiendo la cuantificación de indometacina y el estándar interno.
- Se demostró que la matriz biológica (plasma humano) no causa interferencia en el método analítico desarrollado por lo tanto se considera selectivo para el análisis de indometacina en plasma humano.
- La indometacina se mantiene estable en la matriz biológica hasta por una semana en condiciones de congelación conservando sus características iniciales.
- El método analítico propuesto cumple con los parámetros de validación establecidos en la NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
- Este proyecto puede ser aplicado en el modulo de biofarmacia, en las practicas de laboratorio, para que el alumno pueda observar experimentalmente la farmacocinética (etapas de absorción distribución y excreción) de la indometacina en el cuerpo humano.

9. APLICACIONES DEL PROYECTO.

Este método se desarrollo para que pueda ser usado para estudios de biodisponibilidad o farmacocinética (absorción, distribución y excreción) de indometacina en el aprendizaje de alumnos en las practicas del módulo de biofarmacia de la carrera de Q.F.B. en el Laboratorio de Investigación Farmacéutica de la F.E.S. Zaragoza, donde no necesariamente se requiere de la extracción de mucha sangre vía intravenosa sino que se pueden usar volúmenes de sangre pequeños, como de 1 a 2 mL con solo la sangre que sale de pinchar un dedo es suficiente para cuantificar indometacina por CLAR, además se puede aplicar con otros fármacos cuyas características sean parecidas a las de la indometacina, como el de absorber a la misma longitud de onda o muy cercana, tener una estructura molecular parecida, ser soluble en la fase móvil y en la solución de extracción (metanol y Ac. Acético), etc. El método se puede aplicar para cuantificar indometacina en otra matriz biológica como la orina, donde al haber un cambio de matriz biológica se tiene que hacer una revalidación del método para poder cuantificar indometacina. El método no necesariamente puede ser usado en humanos, puede ser usado en animales de laboratorio como ratas o monos. El método analítico puede ser utilizado en la industria en el departamento de control de calidad, como método alternativo de valoración de indometacina como materia prima o productos farmacéuticos, facilitando y ahorrando tiempo de análisis del producto.

10. BIBLIOGRAFÍA.

- 1.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. (2000). 7ª ed. México. SSA: 820-821, 877-878, 901-903, 1380-1382, 1526-1527, 1646-1648.
- 2.- USP 23 The United States Pharmacopeia. NF 18 The national Formulary. (1995). United States Pharmacopeial Convention. Unites States. Rand Macnally:: 16-21, 552-555, 884-885, 904-905, 978-979, 1190-1195, 1634-1635, 1982-1995.
- 3.-Center for Drug Evaluation and Research. (2001). Guidance for industry: Bioanalytical Method Validation. United States Department of Health and Human Services. Rockville, Maryland.
- 4.- Center for Drug Evaluation and Research. (2002). Guidance for industry: Validation of chromatographic methods. United States Department of Health and Human Services. Rockville, Maryland.
- 5.- Center for Drug Evaluation and Research. (2002). Guidance for industry: Bioavailability and Bioequivalence studies for orally administered drug products- General considerations. United States Department of Health and Human Services. Rockville, Maryland.
- 6.- Secretaría de Salud (1999). NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. México D.F.
- 7.- Michael. E. Swartz. Analytical Meted Development and Validation.Edith. Marcel Dekker. USA 1997: 53-74.
- 8.- Pradeau D. Análisis Químicos Farmacéuticos de Medicamentos. Limusa-Noriega Editores. México, D.F. 1998.
- 9.- Giddings Calvin J. Advances in Chromatography. Vol. 31., Edith. Marcel Dekker. U.S.A. 1992.
- 10.- Lunn George. HPLC Methods for Pharmaceutical Análisis. Edith. John Wiley and Sons. U.S.A. 1997.: 1, 486, 741, 819, 929.
- 11.- Raymond P.W. Scott. Liquid Chromatography for the Analyst. Vol. 67, Edith. Marcel Dekker. USA 1994: 4-115.
- 12.- T. Hanai. HPLC A Practical Guide. Edith. R.S.C. British, Cambridge. 1999: 64-81.

- 13.- Paul C. Sa de K. The HPLC Solvent Guide. Edith. John Wiley and Sons. USA. 1996: 1-39, 91-93, 205-273.
- 14.- John A. Adamovics. Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals. Vol. 49., Edith Marcel Dekker. U.S.A. 1990: 9, 167-205.
- 15.- Quanyun A. Xu. Stability-Indicating HPLC Methods for Drug Analysis. Edith Apha and Php. U.S.A. 1999: 1-2, 206,211.
- 16.- Satinder Ahuja. Chromatography of Pharmaceuticals. Edith. American Chemical Society. U.S.A. 1992: 40-65.
- 17.- Ramón S. E. Guía de Farmacología para Farmacéuticos y Médicos. Ed. Madrid. España 1993: 75-82
- 18.- Goodman Gilman A. Las bases Farmacológicas de la terapéutica. 9ª edición., Vol. I., ed. McGraw-Hill. México 1996: 619-661.
- 19.- Bertran G. Katzung. Farmacología Básica y Clínica. 7ª edición., ed. El manual moderno. México 1999: 316-321, 1189.
- 20.- The Merk Index. 11 ed. Merk and CO. Rahway, N. J., U.S.A., 1991.
- 21.- Kennet A. Connors. Chemical Stability of Pharmaceuticals A HanbookK for Pharmacists. 2ª edic. Edith. John Wiley and Sons. USA. 1999: 509-516.
- 22.- PLM. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Ed. 48 México 2002 Martindale. The Extra Pharmacopoeia 2ª ed. Edith. James E. F. Reynolds. London 1989.
- 23.- Florey Klaus. Analytical Profiles of Drug Substances. Edith Academic Press. U.S.A. 1991: 3(1), 13(211), 13(573).