



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Desarrollo y validación de un método analítico por
CLAR para cuantificar CITALOPRAM en plasma y
su aplicación en un estudio de biodisponibilidad en
población mexicana**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
P R E S E N T A :
ARACELI CRUZ MORENO



México, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	Q.F.B. Alfredo Garzón Serra	_____
Vocal	M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado	_____
Secretario	M. en F. Luis Jesús García Aguirre	_____
1er. Suplente	M en C. María de Lourdes Mayet Cruz	_____
2do. Suplente	Q.F.B. Roberto Carlos Cañas Alonso	_____

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

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

ASESOR DEL TEMA

M. en F. Luis Jesús García Aguirre

SUPERVISOR TÉCNICO

Q.F.B. Jorge Abraham Ayala Bautista

SUSTENTANTE

Cruz Moreno Araceli

A mi madre, Yolanda Moreno Rubio. Agradezco el cariño, la comprensión, el apoyo, el sacrificio y las enseñanzas dadas. Gracias por ser mi madre y guía en este sendero llamado vida.

A mi hermano Jorge; por su apoyo incondicional, confianza, cariño y comprensión, Ese lazo creado, espero jamás se rompa. “Tatoe haruka touku hanareba nara ni nattemo tsunagari au omoi”.

Al M. en F. Luis Jesús García Aguirre; por la confianza, el apoyo y paciencia otorgados. Gracias por la oportunidad de permitirme conocerlo, su amistad y consejos.

Al Q.F.B. Jorge Abraham Ayala Bautista; gracias por su amistad y compañerismo. Por el apoyo y la confianza.

Al Q.F.B. Alfredo Garzón Serra y a la M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado; por el tiempo y la asesoría brindada para el presente trabajo.

A mis compañeros de la unidad analítica de IFaB; gracias por el apoyo, los consejos, los ánimos cuando todo parecía incierto y las horas de amena compañía. Gracias por permitirme conocerlos y compartir con ustedes esta etapa de mi vida.

A mis amigos,

Al trío fantástico: Jesús, Ara y Rocío, gracias por estos 5 años (y los que faltan) de amistad incondicional, apoyo, comprensión, desvelos, consejos y buenos momentos. Mi cariño y mis mejores deseos para la etapa que estamos por comenzar.

A los “niños del pilar” por su amistad. Gracias por compartir conmigo mi paso por la Facultad.

A mis compañeros de la carrera y de la generación, por su apoyo.

A mis profesores, por ayudarme en mi formación, su consejo, su observación oportuna., su ayuda, guía y amistad brindada.

A mi *Alma Mater*, la Universidad Nacional Autónoma de México. Gracias por mi formación como profesionista y como persona. Gracias por todo lo que me ha dado.

¡México, Pumas, Universidad!

*“El hombre encuentra a Dios detrás de cada
puerta que la ciencia logra abrir.”*

Albert Einstein

INDICE

1.	RESUMEN.....	14
2.	INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	17
3.	GENERALIDADES	19
3.1.	Trastornos depresivos ¹	19
3.1.1.	Síntomas ¹	19
3.1.2.	Causas ¹	20
3.2.	La depresión en México ^{2,3}	20
3.3.	Diagnóstico y tratamiento ^{1,4}	21
3.4.	Propiedades fisicoquímicas del Citalopram ⁵	22
3.5.	Indicaciones terapéuticas ^{7,8}	24
3.6.	Farmacodinamia ⁶	24
3.7.	Farmacocinética ^{7,8}	25
3.8.	Precauciones generales ^{7,8}	26
3.8.1.	Contraindicaciones ^{7,8}	26
3.8.2.	Reacciones secundarias y adversas ^{7,8}	27
3.8.3.	Interacciones medicamentosas y de otro género ^{7,8}	27
3.8.4.	Restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia ^{7,8}	27
3.9.	Dosis y vía de administración ^{7,8}	28
3.10.	Manifestaciones y manejo de sobredosis o ingesta accidental ^{7,8}	29
3.11.	Presentaciones y recomendaciones sobre almacenamiento. ^{7,8}	29
3.11.1.	Fabricantes en México.....	29
3.12.	Métodos utilizados para cuantificar principios activos ^{9,10,11}	30
3.12.1.	Cromatografía de líquidos ^{9,10}	30
3.12.1.1.	Detectores de fluorescencia ¹¹	31
3.12.2.	Métodos analíticos por CLAR para cuantificar Citalopram en sangre total y en plasma. ¹²⁻¹⁷	33
3.13.	Validación de métodos bioanalíticos ^{19,20, 21,22}	36
4.	PARTE EXPERIMENTAL.....	40
4.1.	Material, reactivos, equipos e instrumentos.....	40
4.1.1.	Material.....	40
4.1.2.	Equipos e instrumentos.....	40
4.1.3.	Reactivos y disolventes.....	42
4.1.4.	Sustancias de referencia.....	42
4.2.	Desarrollo del método.....	42
4.2.1.	Columnas.....	42
4.2.2.	pH de la fase móvil.....	42
4.2.3.	Métodos de extracción evaluados.....	43
4.2.4.	Sólido-líquido.....	43
4.2.5.	Volumen de inyección.....	44
4.2.6.	Estándar Interno.....	44
4.3.	Validación del método.....	44
4.3.1.	Curva de calibración.....	44

4.3.1.1.	Preparación de soluciones.....	45
4.3.2.	Linealidad.....	47
4.3.3.	Selectividad del método	48
4.3.4.	Precisión del método.....	48
4.3.4.1.	Repetibilidad.....	48
4.3.4.2.	Reproducibilidad.....	49
4.3.5.	Exactitud del método.....	49
4.3.6.	Recobro.....	49
4.3.7.	Límite de detección y cuantificación.....	49
4.3.8.	Estabilidad.....	50
4.3.8.1.	Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación en matriz biológica.....	50
4.3.8.2.	Estabilidad a temperatura ambiente (21 °C) y refrigeración (3 °C) en matriz biológica.....	50
4.3.8.3.	Estabilidad de la muestra procesada.....	51
4.3.8.4.	Estabilidad a largo plazo (78 días).....	51
4.3.8.5.	Estabilidad de la muestra procesada en el automuestreador. ...	51
4.3.9.	Tolerancia.....	52
4.4.	Etapa clínica.....	52
4.4.1.	Criterios de inclusión	52
4.4.2.	Criterios de exclusión	53
4.4.3.	Cuantificación de Citalopram en plasma	54
4.4.4.	Determinación de parámetros farmacocinéticos	54
4.4.4.1.	Análisis estadístico	55
4.5.	Estadística comparativa entre tres poblaciones ^{17,18}	56
5.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	58
5.1.	Desarrollo del método analítico	58
5.2.	Condiciones cromatográficas.	58
5.2.1.	Método de extracción	59
5.3.	Validación del método analítico.....	62
5.3.1.	Linealidad.....	62
5.3.2.	Precisión del método.....	64
5.3.2.1.	Repetibilidad.....	64
5.3.2.2.	Reproducibilidad.....	64
5.3.2.3.	Recobro.....	66
5.3.2.4.	Límite de detección y cuantificación.....	67
5.3.2.5.	Selectividad	70
5.3.3.	Estabilidad.....	72
5.3.3.1.	Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación en matriz biológica.	72
5.3.3.2.	Estabilidad a temperatura ambiente (21 °C) y refrigeración (3 °C) en matriz biológica.....	73
5.3.3.3.	Estabilidad de la muestra procesada.....	75
5.3.3.4.	Estabilidad a largo plazo.....	76
5.4.	Etapa clínica.....	78
5.4.1.	Estadística descriptiva.....	78

5.4.2.	Estadística de los datos de concentración de Citalopram en plasma (ng/mL) con respecto al tiempo (h).....	79
5.4.3.	Perfiles farmacocinéticos.....	80
5.4.4.	Estadística de los parámetros farmacocinéticos.....	82
5.4.5.	Estadística comparativa entre tres poblaciones.	83
6.	CONCLUSIONES.....	85
7.	ANEXOS.....	86
7.1.	ANEXO I Datos demográficos de los voluntarios. (Mujeres) participantes en el estudio.	86
7.2.	ANEXO II Datos de concentración para cada voluntaria a los diferentes tiempos de muestreo.	87
7.3.	ANEXO III Perfiles farmacocinéticos de cada voluntaria, en escala normal y semilogarítmica.	91
7.4.	ANEXO III Parámetros farmacocinéticos de cada voluntaria.	103
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	105

Índice de Tablas

Tabla 1. Fármacos utilizados en trastornos del SNC. ⁴	22
Tabla 2. Métodos de extracción y cuantificación de Citalopram en plasma y sangre.	34
Tabla 3. Legislación vigente sobre biodisponibilidad/bioequivalencia en países de América Latina	37
Tabla 4. Soluciones estándar para la preparación de la curva de calibración.....	46
Tabla 5. Soluciones de trabajo para la preparación de la curva de calibración en plasma.....	47
Tabla 6. Condiciones cromatográficas utilizadas en el estudio.	58
Tabla 7. Resultados de la linealidad del método para las corridas de validación. Concentración recuperada*.....	62
Tabla 8. Parámetros de linealidad del método para las corridas de validación.	62
Tabla 9. Repetibilidad del método analítico.....	64
Tabla 10. Resultados de reproducibilidad del método analítico.	65
Tabla 11. Recobro absoluto del método analítico.	66
Tabla 12. Límite de detección y cuantificación del método analítico.	67
Tabla 13. Estabilidad de Citalopram en plasma en ciclos de congelación-descongelación.	73
Tabla 14. Estabilidad a temperatura ambiente de Citalopram en plasma. (21 °C). 74	
Tabla 15. Estabilidad de Citalopram en refrigeración (3 °C)	75
Tabla 16. Estabilidad de muestras procesadas de Citalopram.....	76
Tabla 17. Estabilidad a largo plazo de Citalopram.	77
Tabla 18. Estadística descriptiva de las variables demográficas.....	78
Tabla 19. Estadística descriptiva de concentración plasmática de Citalopram con respecto al tiempo.	79
Tabla 20. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos de Citalopram.....	82
Tabla 21. Parámetros farmacocinéticos de tres poblaciones (dosis única de 40 mg). ^{17,18}	83
Tabla 22. Prueba de t entre las tres poblaciones.	83

Índice de Figuras

Figura 1. Citalopram.....	23
Figura 2. Bromhidrato de Citalopram	23
Figura 3. Esquema de la liberación de serotonina al espacio intersináptico. ⁶	25
Figura 4. Instrumentación de un equipo de CLAR. ⁹	33
Figura 5. Diagrama del método de extracción.....	60
Figura 6. Cromatograma de una muestra de plasma t_0 (blanco de plasma).	61
Figura 7. Cromatograma de una muestra de plasma de una voluntaria t_n	61
Figura 8. Gráfico de linealidad del método.....	63
Figura 9. Cromatograma que muestra el límite de detección y cuantificación.....	69
Figura 10. Selectividad del método.	71
Figura 11. Perfil farmacocinético de Citalopram (promedio) + error estándar. Escala normal.	80
Figura 12 Perfil farmacocinético de Citalopram (promedio) + error estándar. Escala semilogarítmica.	81

ABREVIATURAS

Para efecto de esta tesis se entiende por:

5-HT	5-hidroxitriptamina (Serotonina)
ABC _{0-∞}	Área bajo la curva de concentración plasmática extrapolada a tiempo infinito.
ABC _{0-t}	Área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t.
ABC % Extrap	Área bajo la curva porcentaje extrapolado. Compara el ABC obtenido del estudio con ABC determinado a tiempo infinito.
ACN	Acetonitrilo
AINEs	Antiinflamatorios no esteroidales.
APCI	Ionización química con presión atmosférica.
API	Ionización a presión atmosférica.
ATF	Ácido trifluoroacético
β	Beta, receptores adrenérgicos beta.
BET	Brunauer, Emmett, and Teller, los tres científicos que optimizaron la medición de áreas.
c.b.p.	Cuanto baste para.
CLAR (o LC)	Cromatografía de líquidos de alta resolución.
C _{máx}	Concentración plasmática máxima.
CP	Concentración plasmática.
C.V.	Coefficiente de variación.
D.E.	Desviación estándar

EPT	Trastorno de estrés post traumático.
E.E.	Error estándar
ESI	Ionización con electrospray.
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos vigente.
g	Gramos.
GABA	Ácido gamma-aminobutírico.
h	Horas.
IMAO	Inhibidores de la monoamina oxidasa
IMC	Índice de masa corporal.
ISRS	Inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina
Ke	Constante de eliminación
kg	Kilogramos
µg	Microgramos
MAO	Monoamina oxidasa
Max	Máxima
MeOH	Metanol
min	Minuto o minutos
Min	Mínima
mg	Miligramos
mm	Milímetros.
MS	Espectrometría de masas.
ng	Nanogramos

r	Coeficiente de correlación
rpm	Revoluciones por minuto.
s	Segundos.
SNC	Sistema nervioso central
t $\frac{1}{2}$	Vida media de eliminación.
THF	Tetrahidrofurano
T _{máx}	Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima.
TMR	Tiempo medio de residencia
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Detector UV-Visible.
V	Volts.
Vs	Contra.

RESUMEN

La biodisponibilidad es la medida de la cantidad relativa del fármaco que llega a la circulación general y la velocidad a la que esto ocurre. También puede entenderse como la fracción inalterada de un fármaco que llega a la circulación sistémica, luego de su administración por cualquier vía. La máxima biodisponibilidad de un fármaco se puede alcanzar cuando es administrado por vía intravenosa, donde la biodisponibilidad tiene un valor de 1 ($f = 100\%$).

Los estudios de biodisponibilidad permiten obtener información acerca del comportamiento farmacocinético del principio activo de un medicamento en el organismo. Para realizar estudios de biodisponibilidad, se desarrollan métodos analíticos que permitan la cuantificación de este principio en fluidos biológicos. Al realizar este tipo de estudios en diferentes poblaciones, se observa que hay diferencias significativas entre los parámetros evaluados, indicando que la dosis terapéutica administrada en una población, puede no ser la dosis terapéutica para otra o causar reacciones adversas exacerbadas.

Uno de los trastornos mentales que más incapacita a las personas y se prevé que para el 2020 sea una de las primeras causas de mortalidad en el mundo, es la depresión. En México, casi 40 por ciento de los mexicanos han padecido alguna vez depresión, la cual se ha convertido en un problema de salud pública. Cuando el mal es grave, las personas piensan en el suicidio, duermen mucho y modifican sus hábitos. A escala mundial, se estima que un millón de personas terminan con su vida cada año.

En el presente proyecto, se caracterizó la biodisponibilidad de Citalopram que es un inhibidor de la recaptura de serotonina (ISRS) relacionado estructuralmente a otros IRSS tricíclicos así como a otros agentes antidepresivos. Para lograr lo anterior, se desarrollo y valido un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia, para su cuantificación en plasma.

La validación del método analítico correspondiente tuvo como base la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998. La norma establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, las cuales solo son realizadas por terceros autorizados.

Dentro de la validación del método se evaluaron: selectividad, linealidad, precisión, recobro, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y estabilidad a diferentes condiciones de almacenamiento.

El método resultó ser confiable, lineal, exacto y preciso para Citalopram en el intervalo de 2-160 ng/mL, con un recobro total de 98.79%. El límite de detección fue de 1 ng/mL y de cuantificación de 2 ng/mL.

Las muestras plasmáticas de Citalopram fueron estables bajo condiciones de congelación a -70°C durante 78 días; en refrigeración a 3°C durante 48 horas; estable después de tres ciclos de congelación-descongelación, temperatura ambiente a 21°C durante 48 horas y como muestra procesada durante 48 horas.

Una vez validado el método, se realizó el análisis de las muestras plasmáticas de los voluntarios.

Las muestras plasmáticas fueron obtenidas de población mexicana en 12 voluntarios sanos, a los cuales se les administró una dosis de 40 mg de Citalopram, recolectando 22 muestras sanguíneas durante un periodo de 96 horas, las cuales fueron almacenadas a -70°C hasta su análisis. Estas muestras fueron procesadas de acuerdo al método analítico desarrollado y validado previamente, los resultados obtenidos fueron analizados para determinar los parámetros farmacocinéticos principales de Citalopram, obteniéndose valores promedio \pm D.E. para T_{max} de 2.67 ± 1.09 h, C_{max} de 62.12 ± 14.78 ng/mL, ABC_{0-t} 1755.75 ± 279.71 h*ng/mL, ABC_{0-inf} 2150.98 ± 379.40 h*ng/mL, $t_{1/2}$ 38.31 ± 7.12 h, TMR_{0-inf} 52.66 ± 8.52 hr.

Asimismo, se mostró que existen diferencias estadísticamente significativas al comparar los parámetros farmacocinéticos de Citalopram entre diferentes poblaciones.

Los resultados obtenidos muestran que el método analítico desarrollado es confiable para ser utilizado en la cuantificación de Citalopram en plasma y su aplicación en estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia.

INTRODUCCIÓN

Los trastornos depresivos interfieren con la vida normal de las personas, causando dolor y sufrimiento, no solamente a quien la padece, también a quienes le rodean. La mayoría de las personas que padecen algún trastorno depresivo no buscan atención médica, a pesar de que, aun aquellos pacientes con depresión severa pueden recibir tratamiento y mejorar su calidad de vida.

Algunas enfermedades pueden llevar al paciente a un estado depresivo como son: un ataque cardíaco, cáncer, mal de parkinson, desórdenes hormonales. Otras situaciones como la pérdida de un ser querido, problemas económicos, relaciones personales difíciles, o situaciones estresantes así como cambios drásticos en el estilo de vida tienen la misma consecuencia. En la mayoría de los casos, el desarrollo de la enfermedad es una combinación de factores genéticos, psicológicos y ambientales. El tratamiento generalmente consiste en recetar antidepresivos y complementar con terapia psicológica. Uno de los fármacos recetados es el Citalopram, un furanocarbononitrilo que inhibe la recaptura de serotonina, efectivo también en la reducción de la ingesta de alcohol y utilizado en pacientes con discinesia tardía.

Dentro de las pruebas que se realizan con los nuevos fármacos, se encuentran los estudios de biodisponibilidad, los cuales generan una serie de parámetros que brindan información acerca de la farmacocinética del fármaco para una población en específico, en este caso población mexicana, y así determinar los factores propios de cada población que influyen en este comportamiento. Para lograr lo anterior, es necesario cuantificar al fármaco en un fluido biológico, desarrollando un método analítico con base en sus propiedades fisicoquímicas. Una vez desarrollado el método analítico, se procede a realizar la validación del mismo. El método analítico debe ser confiable y para ello debe demostrar su linealidad, exactitud y precisión en el intervalo de trabajo establecido.

GENERALIDADES

Depresión, palabra derivada del latín *depressus* que significa abatido. Enfermedad que no solo afecta el estado de ánimo de la persona, también su comportamiento y percepción de lo que le rodea. Si no se trata, los síntomas pueden durar semanas, meses o años.

Trastornos depresivos¹

Los trastornos depresivos más comunes son:

Depresión severa: también conocida como depresión clínica o depresión unipolar, puede causar serios problemas en el comportamiento, estado anímico, actividades laborales o escolares, cambios en el patrón de sueño. Afecta a cualquier persona, sin importar su edad, género, nivel económico o grupo étnico. Suele presentarse varias veces en la vida de una persona.

Distimia: forma crónica de depresión; las personas que la padecen tienen bajo estado de ánimo permanentemente. Sin embargo no suele llegar a incapacitar a la persona como en otros tipos de depresión. Estos pacientes llegan a presentar episodios de depresión severa.

Trastorno bipolar: se caracteriza por cambios cíclicos en el estado de ánimo; de modo que la persona puede tener fases de ánimo excesivamente elevado o eufórico (manía) y fases de ánimo extremadamente bajo (depresión). Estos cambios pueden ser repentinos y dramáticos, pero generalmente son graduales. Durante el ciclo, la persona puede llegar a manifestar de uno a varios síntomas de un trastorno depresivo. Si la manía se deja sin tratar, puede empeorar a una psicosis.

Síntomas¹

En la depresión se presentan diferentes síntomas a los que se ven en la manía:

Depresión: ansiedad, melancolía, pesimismo, desesperanza, sentimiento de culpa, sensación de inutilidad, pérdida del interés por la vida y/o actividades que antes representaban disfrute o placer. Fatiga, cansancio, respuesta lenta a estímulos,

falta de concentración, insomnio, pereza, pérdida del apetito, irritabilidad, pensamientos suicidas. Físicamente se manifiesta dolor de cabeza, desórdenes digestivos, dolor crónico.

Manía: irritabilidad espontánea o en demasía, falta de sueño, necesidad de hablar constantemente, aumento de la libido, hiperactividad, presentan un comportamiento social extraño e inaceptable.

Causas¹

Se presume que en el caso del trastorno bipolar puede ser hereditario de acuerdo a resultados obtenidos de estudios genéticos realizados en familias de pacientes con la enfermedad. En el caso de la depresión severa, su desarrollo se asocia con cambios en la estructura cerebral o su funcionamiento.

La depresión en México^{2,3}

En México, se estima que los trastornos neuropsiquiátricos ocupan el quinto lugar como carga de enfermedad, que considera indicadores de muerte prematura y días vividos con discapacidad. Según estos criterios, 4 de las 10 enfermedades más discapacitantes son neuropsiquiátricas: esquizofrenia, depresión, trastorno obsesivo-compulsivo y alcoholismo. La depresión se integra en el conglomerado de trastornos mentales que cada día cobran mayor importancia y se estima que en 2020 será la segunda causa de años de vida saludable perdidos a escala mundial y la primera en países desarrollados. En México se han llevado a cabo algunos estudios epidemiológicos para estimar la prevalencia de trastornos mentales, incluidos los trastornos y episodios depresivos, identificando además, el proceso de búsqueda de ayuda.

La Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica, llevada a cabo en 2002 y 2003 entre población urbana de 18 a 65 años de edad, concluyó que los trastornos afectivos –dentro de los que se incluyen los trastornos depresivos–, se ubican, respecto al resto de los trastornos investigados, en tercer lugar con una prevalencia alguna vez en la vida (9.1%), después de los trastornos de ansiedad (14.3%) y los trastornos por uso de sustancias (9.2%). Al analizar los trastornos individualmente, el episodio depresivo pasa a un quinto lugar (luego de las fobias

específicas, los trastornos de conducta, la dependencia al alcohol y la fobia social), con una prevalencia de 3.3% alguna vez en la vida. Entre las mujeres, la depresión mayor ocupa el segundo lugar.

La alta prevalencia asociada a los niveles más bajos de escolaridad, a las edades más avanzadas, al sexo femenino y al hecho de vivir en zonas rurales puede interpretarse como la manifestación de una mayor vulnerabilidad de estos grupos a los diversos factores que pueden condicionar el desarrollo de un episodio depresivo. Una variable adicional que ha sido referida como disparador de este tipo de episodios, y que en la encuesta realizada mostró asociación sólo en el caso de los hombres, es el desempleo.

Los datos obtenidos en la encuesta apoyan la necesidad de incrementar los esfuerzos orientados a hacer más disponibles los servicios y de acercar a la población a ellos.

Diagnóstico y tratamiento^{1,4}

Se necesita de una revisión médica y pruebas de laboratorio, ya que algunas infecciones virales pueden causar los mismos síntomas. La historia clínica del paciente, el seguimiento de los síntomas y el tratamiento dado para cada uno de ellos puede ayudar a un buen diagnóstico. Al paciente se le debe realizar una revisión de su estado mental para determinar si el habla, los patrones de pensamiento o la memoria se han visto modificados como ocurre en pacientes maniaco-depresivos.

El tratamiento generalmente consiste en recetar antidepresivos y complementar con terapia psicológica: el medicamento para poder aliviar los síntomas y la psicoterapia para aprender de diferentes maneras a enfrentar los problemas y situaciones cotidianas.

Los medicamentos recetados más comúnmente para tratar estos trastornos incluyen a los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) con pocos efectos secundarios, los antidepresivos tricíclicos y los inhibidores de la monoamina oxidasa (IMAO). El médico recurre a probar varios tratamientos antes de encontrar el tipo de antidepresivo o la combinación de ellos que resulte más

efectiva para el paciente. Para poder observar alguna mejora en el estado del paciente se debe esperar un periodo de 3 a 4 meses de haber comenzado el tratamiento y después continuar por 4 o 9 meses para evitar una recaída. En el caso de las personas con trastorno bipolar se debe continuar con el tratamiento de manera indefinida.

Tabla 1. Fármacos utilizados en trastornos del SNC.⁴		
FÁRMACO	MECANISMO DE ACCIÓN	EMPLEO
Ansiolíticos		
Benzodiacepinas (diazepam, alprazolam)	Actúan sobre el receptor GABA _A	Tratamiento de corta duración de la ansiedad.
Azapironas (Buspirona)	Actúan sobre el receptor 5-HT _{1A}	Eficaz para tratar ansiedad generalizada.
Depresión Autónoma		
Propranolol	Inhibe los receptores β-adrenérgicos (β ₁ ,β ₂)	Trastornos de comportamiento social y ansiedad, pánico escénico.
Antidepresivos		
Imipramina	Antidepresivo tricíclico	Tratamiento del trastorno del pánico.
Fenelcina, meclobemida	Inhibidores de la MAO	Fobia social, manía y trastornos de estrés postraumático EPT (PTSD)
Fluoxetina (uso pediátrico), Sertralina, Citalopram	ISRS	En trastornos Obsesivo-Compulsivo TOC (OCD) y de pánico.

Propiedades fisicoquímicas del Citalopram⁵

Creado en 1989 por la compañía farmacéutica Lundbeck, el Citalopram es una mezcla racémica, cuyo efecto farmacológico reside principalmente en el enantiómero S-(+). Es metabolizado en hígado por el sistema citocromo P450 (CYP).

Estructura química:

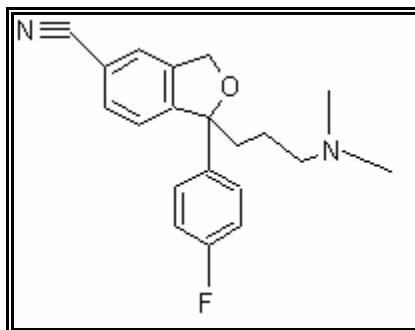


Figura 1. Citalopram

Nombre IUPAC :1-(3-dimetilaminopropil)-1-(4-fluorofenil)-1,3-dihidroisobenzofurano-5-carbonitrilo.

Número CAS: 59729-33-8

Código ATC: NO6AB04 NO6AB10

Fórmula condensada: C₂₀H₂₁FN₂O

Peso molecular: 324.392 g/mol

Punto de fusión: 182-183° C

Solubilidad en agua: 31 mg/L

Log P: 4.222

pKa: no está reportado

Máximo UV: 294 nm

En el caso del bromhidrato de Citalopram,

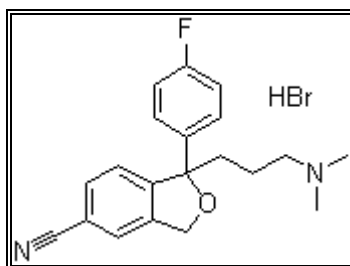


Figura 2. Bromhidrato de Citalopram

Nombre IUPAC: Bromhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-1-(4-fluorofenil)-1,3-dihidroisobenzofurano-5-carbonitrilo.

Número CAS: 59729-32-7

Fórmula condensada: $C_{20}H_{21}FN_2O \cdot HBr$, $C_{20}H_{22}BrFN_2O$

Peso molecular: 405.31 g/mol

Punto de fusión: 182-188° C

Y se conoce como: Celexa, hidrobromuro de Citalopram, Nitalapram, Cipramil, Elopram, Seropram (disponible en México).

Citalopram es un medicamento utilizado en el tratamiento de la depresión, pertenece al grupo conocido como ISRS. Es útil en el control de los cambios de ánimo, desorden dismórfico y ansiedad. La acción antidepresiva, antiobsesiva compulsiva y antibulímica se cree que está asociada a la inhibición que ejerce en la recaptura de serotonina del sistema nervioso central. Los estudios *in vitro* han demostrado que tiene un efecto casi nulo en la recaptura de norepinefrina y dopamina. Citalopram no tiene una afinidad significativa por los receptores α_1 , α_2 , β adrenérgicos, colinérgicos, GABA, dopaminérgicos, histaminérgicos 5HT1A, 5HT1B, 5HT2, y de benzodiazepinas. Una administración crónica de Citalopram desregula la actividad del receptor norepinefrina, no inhibe a la monoamino oxidasa.

Indicaciones terapéuticas^{7,8}

Antidepresivo (inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina). Tratamiento de la depresión y prevención de la recurrencia o recaída, trastorno de pánico con y sin agorafobia, así como trastorno obsesivo-compulsivo.

Farmacodinamia⁶

Los estudios farmacológicos indican que R y S-Citalopram interaccionan a nivel del sitio alostérico del transportador de la serotonina, mediante un mecanismo diferente a la simple ocupación antagonista del lugar primario de fijación. Los estudios bioquímicos han demostrado que al menos hay dos lugares de unión para el Citalopram en el transportador de la serotonina: un receptor primario de alta afinidad que media la inhibición de la recaptura de serotonina y un receptor alostérico de menor afinidad, que modula la unión de los ligandos al receptor

primario. Un estudio demuestra que los dos enantiómeros de Citalopram se unen al receptor alostérico, disminuyendo la constante de disociación de 3H-S-Citalopram del transportador de la serotonina, siendo la potencia de *R*-Citalopram tres veces menor que la de *S*-Citalopram.

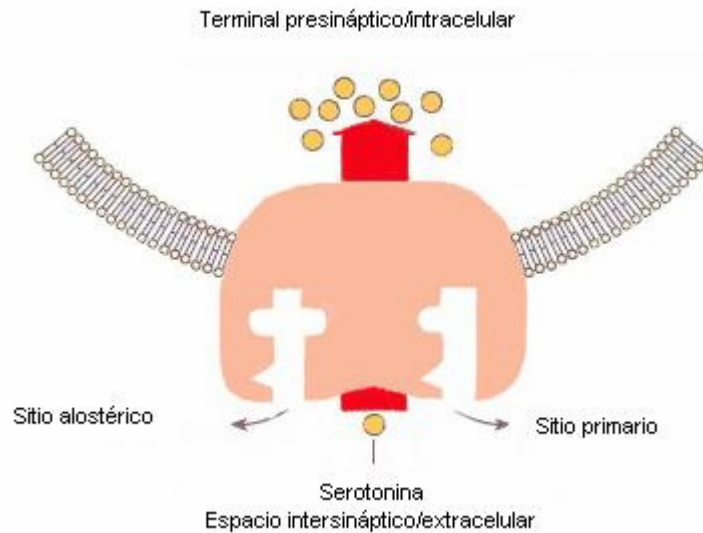


Figura 3. Esquema de la liberación de serotonina al espacio intersináptico.⁶

Farmacocinética^{7,8}

Después de la administración oral de Citalopram, su biodisponibilidad es cercana a 80%. Los niveles máximos de Citalopram en plasma se alcanzan de 2 a 4 horas después de la dosis. La unión a proteínas es de 50%.

La enzima Citocromo P450 2C19 (CYP2C19) junto con el CYP3A4, metabolizan el Citalopram a *N*-desmetilcitalopram, todo esto ocurre en hígado. El Citalopram sin cambios es el compuesto predominante en plasma. La cinética es lineal. Las concentraciones estables se logran en 1 a 2 semanas. La vida media biológica es de alrededor de un día y medio (aproximadamente 35 horas). La excreción es vía urinaria y por heces.

El Citalopram tiene muy baja o nula afinidad por diversos receptores, incluyendo los receptores colinérgicos a la muscarina, los receptores de histamina y los alfa adrenoreceptores. Esta ausencia de efectos sobre los receptores puede explicar la

cualidad por la que el Citalopram tiene una menor incidencia de efectos adversos tradicionales de los antidepresivos tricíclicos, como sequedad de boca, visión borrosa, sedación, cardiotoxicidad e hipotensión ortostática. Cuando estos efectos llegan a presentarse son leves y transitorios. A diferencia de otros antidepresivos inhibidores de la recaptura de serotonina, Citalopram es sólo un inhibidor muy débil de la ruta metabólica del citocromo P450 II D6, con una consecuente reducción del potencial para producir efectos adversos e interacciones. Por lo general, el efecto antidepresivo se establece después de 2 a 4 semanas. La baja frecuencia de efectos secundarios y propiedades sedativas mínimas de Citalopram lo hacen especialmente útil en el tratamiento a largo plazo. Se debe estar alerta a la manifestación de uno o varios de los siguientes síntomas: ansiedad, ataques de pánico, insomnio, irritabilidad, hostilidad, agresividad, manía o cualquier cambio en la conducta del paciente, especialmente al inicio del tratamiento y cada vez que se haga un ajuste de dosis. El monitoreo debe hacerse diario ya que algunos cambios pueden aparecer de manera abrupta y deben reportarse inmediatamente al médico ya que podrían indicar un cambio necesario en el tratamiento.

Precauciones generales^{7,8}

No debe ser administrado a pacientes que reciben inhibidores de la monoaminoxidasa o por lo menos 14 días después de su discontinuación. El tratamiento con IMAOs puede ser introducido luego de 7 días de la discontinuación de Citalopram. Si el paciente entrara en una fase maniaca durante el tratamiento con Citalopram, éste debe ser discontinuado y habrá de instaurarse un tratamiento con un antipsicótico. No altera la función intelectual y psicomotora.

Contraindicaciones^{7,8}

Hipersensibilidad al Citalopram y administración concomitante con inhibidores de la MAO.

Reacciones secundarias y adversas^{7,8}

Las reacciones adversas observadas son en general leves y transitorias. Son más notables durante la primera o segunda semana de tratamiento y por lo general se

atenúan cuando se mejora el estado depresivo. Las reacciones secundarias observadas más comúnmente se relacionan con el uso de Citalopram y consisten en sequedad de boca, náusea, somnolencia, incremento de la sudación, diarrea y temblores. En casos excepcionales, se han presentado convulsiones. Puede causar una pequeña reducción en la frecuencia cardíaca, la cual no es de importancia clínica.

Interacciones medicamentosas y de otro género ^{7,8}

La administración simultánea de Citalopram e inhibidores de la MAO puede causar crisis hipertensivas (síndrome serotoninérgico). La cimetidina causa un incremento moderado de los niveles de estado-estable de Citalopram. No hay interacción con litio o alcohol y no hay interacciones farmacocinéticas de importancia clínica con fenotiacinas o antidepresivos tricíclicos. Los estudios han demostrado que Citalopram parece no tener ningún efecto en la farmacocinética de la carbamazepina y su metabolito carbamazepina-peroxidasa. No se han encontrado farmacodinámicas en estudios clínicos en los cuales se ha dado concomitantemente con benzodiazepinas, neurolépticos, analgésicos, antihistamínicos, antihipertensivos, betabloqueadores, digoxina y otros fármacos cardiovasculares. No se recomienda administrar Citalopram junto con sumatriptán ya que se sospecha que los efectos serotoninérgicos de éste aumentan con inhibidores de la recaptura de serotonina. El uso de Citalopram con aspirina u otros AINE's que afecten la coagulación puede incrementar el riesgo de hemorragias.

No ingerir la hierba de San Juan, debido al efecto inhibitorio que esta hierba ejerce sobre el conjunto de enzimas Citocromo CYP450.

Restricciones de uso durante el embarazo y la lactancia ^{7,8}

La seguridad durante el embarazo y la lactancia no está establecida. Por lo tanto, es recomendable que durante el embarazo o la lactancia la mujer no sea tratada con Citalopram a menos que los beneficios clínicos sobrepasen a los de los riesgos teóricos.

Precauciones en relación con efectos de carcinogénesis, mutagénesis y teratogénesis.

No han sido reportados efectos carcinogénicos con el uso de Citalopram. Estudios en animales no han mostrado evidencia de potencial mutagénico o teratogénico. No afecta la función reproductora o las condiciones perinatales.

Dosis y vía de administración ^{7,8}

Oral. Se administra en una sola dosis al día. Las tabletas pueden tomarse a cualquier hora, independientemente de la ingesta de alimentos.

Adultos:

Tratamiento de depresión: debe administrarse en una sola dosis oral de 20 mg al día. Dependiendo de la respuesta individual del paciente, ésta puede incrementarse a un máximo de 60 mg al día.

Tratamiento de trastorno de pánico: Una sola dosis de 10 mg se recomienda en la primera semana y después aumentar la dosis a 20 mg al día. La dosis podrá ser aumentada posteriormente, hasta un máximo de 60 mg al día, dependiendo de la respuesta individual del paciente.

Tratamiento de trastorno obsesivo-compulsivo: Se recomienda una dosis inicial de 20 mg al día. La dosis puede aumentarse hasta 60 mg diarios, si es necesario, basado en un juicio clínico.

Insuficiencia renal: No se requiere de ajustar las dosis en pacientes con insuficiencia renal leve a moderada. No se tienen datos sobre pacientes con insuficiencia renal severa (depuración de creatinina < 20 ml/min). Insuficiencia hepática: No se debe exceder de 30 mg al día.

En los ancianos mayores de 65 años: La dosis diaria recomendada es de 20 mg al día. Dependiendo de la respuesta individual del paciente, ésta puede incrementarse a un máximo de 40 mg al día. No es recomendable el empleo en niños, ya que la seguridad y eficacia no han sido establecidas en esta población. Un periodo de tratamiento de por lo menos 6 meses es usualmente necesario para minimizar el potencial de recaídas.

Manifestaciones y manejo de sobredosis o ingesta accidental ^{7,8}

En caso de sobredosificación, los signos y síntomas son somnolencia, coma, convulsiones, taquicardia sinusal, ritmo nodal ocasional, sudación, náusea, vómito, cianosis, hiperventilación. No existe un antídoto específico. El tratamiento es sintomático y de apoyo. El lavado gástrico debe ser realizado tan pronto como sea posible.

Presentaciones y recomendaciones sobre almacenamiento. ^{7,8}

Caja con tabletas de 40 y 20 mg.

Consérvese a temperatura ambiente a no más de 30 °C.

Fabricantes en México

SEROPRAM® LUNDBECK México S.A. de C.V. Dosis de 20 y 40 mg.

CITOX® SUN PHARMA DE MÉXICO S.A. de C.V. Dosis de 20 mg.

XYLORANE® RANBAXY DE MÉXICO S.A. de C.V. Dosis de 10, 20 y 40 mg.

Métodos utilizados para cuantificar principios activos ^{9,10,11}

Un método analítico es un procedimiento que permite descomponer un proceso o fenómeno en cada una de sus partes para poder analizarlo y así lograr comprenderlo.

Dentro del método analítico se encuentra la parte instrumental que va a permitir realizar la medición cuantitativa y cualitativa del principio activo de interés.

De forma general y dependiendo de las actividades de cada empresa, se utilizan los siguientes métodos en la industria farmacéutica:

- CLAR con detección por UV, PDA y MS
- Cromatografía iónica con detección por ICP-MS o amperométrica
- Cromatografía de gases con detección por TCD y MS
- Cromatografía de gases de espacio de cabeza
- Espectrofotometría por UV-VIS
- Electrodo de ion específico
- Química húmeda
- Área superficial por adsorción de gas BET

Cromatografía de líquidos^{9,10}

La cromatografía es un procedimiento mediante el cual se separan solutos por un proceso dinámico de migración diferencial en un sistema que consta de dos o más fases, una de las cuales se mueve continuamente en una dirección dada y en la que las sustancias individuales presentan diferentes movilidades a causa de diferencias de adsorción, partición, solubilidad, presión de vapor, tamaño molecular o densidad de carga iónica.

La técnica general requiere que un soluto se distribuya entre dos fases, una fija (fase estacionaria) y otra móvil (fase móvil). La fase móvil transfiere el soluto a través del medio, hasta que se obtiene separado de otros solutos que eluyen antes o después del compuesto de interés.

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), es la técnica de separación de sustancias más utilizada para la separación de una mezcla de componentes para análisis cualitativo y cuantitativo. La separación se logra por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, dependiendo de la fase estacionaria empleada. Las ventajas que tiene son: sensibilidad, la posibilidad de realizar determinaciones cuantitativas exactas, capacidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles, la mayoría de las separaciones se realizan a temperatura ambiente. Una gran mayoría de compuestos dentro de los análisis farmacéuticos se realizan mediante el fenómeno de partición.

La afinidad de un compuesto por la fase estacionaria y su tiempo de retención en la columna, se controla mediante una fase móvil relativamente polar. La polaridad de la fase móvil se puede variar agregando un segundo y hasta un cuarto componente. Generalmente las columnas utilizadas en separaciones analíticas tienen diámetros internos desde 2 mm hasta 5 mm.

Existen detectores de fluorescencia, detector diferencial de índice de refracción, electroquímicos, potenciométricos, voltamétricos o polarográficos y otros de carácter universal como el detector de UV-VIS, arreglo de diodos y espectrometría de masas. El detector a utilizar en cada método, dependerá de las características del compuesto a analizar

Detectores de fluorescencia¹¹

Además de los detectores de UV-VIS, hay otro tipo que es muy popular para la detección de compuestos: el detector de fluorescencia. Estos detectores son sensibles a compuestos inherentemente fluorescentes o que pueden convertirse en derivados fluorescentes mediante la transformación química del compuesto o mediante el acoplamiento de reactivos fluorescentes con grupos funcionales específicos.

Cuando una luz es emitida por moléculas que fueron excitadas por radiación electromagnética, el fenómeno se denomina fotoluminiscencia. Si la liberación de la energía electromagnética es inmediata, la molécula es fluorescente. Por el

contrario, si la liberación de energía es retardada o continua después de haber retirado la fuente de radiación, la molécula es fosforescente.

Al absorber luz una molécula, se da una transición de un estado energético a otro de mayor nivel, siendo la absorción más específica para las moléculas afectadas; la radiación energética solo se absorbe por una estructura molecular en específico. Si los electrones son excitados a un nivel energético superior debido a la absorción de luz, y el exceso de energía no se libera de manera inmediata debido a las colisiones que suceden con otras moléculas, la luz es emitida a una frecuencia mas baja y al mismo tiempo los electrones regresan a su estado basal, la sustancia fluoresce. Debido a que se pierde energía antes de que ocurra la emisión de la misma, la onda de fluorescencia siempre es mayor que la onda de incidencia.

La técnica de detección de fluorescencia presenta una mayor sensibilidad al analito pero una menor sensibilidad a la inestabilidad debida a la instrumentación. Esto se debe a que la luz fluorescente se mide en contraste con un fondo bajo en luz o un nivel bajo de ruido. Algunos compuestos farmacéuticos, alimenticios, colorantes presentan la cualidad de fluorescer y otros más pueden hacerse fluorescentes al sintetizar derivados de estos.

Un detector de fluorescencia se compone de un espectrómetro fluorescente acoplado a una celda de absorción de un tamaño pequeño de manera que no se vea afectada la resolución de la columna del cromatógrafo. Se tienen dos longitud de onda: la longitud máxima de emisión y la máxima de absorción.

Pueden ser simples o complejos:

Simple: una sola fuente luminosa de excitación y un sensor que monitorea las emisiones fluorescentes provenientes de todas las longitudes de onda. En algunos casos, este tipo de detector puede ser muy sensible, pero no permite un amplio margen de sustancias a analizar.

Complejos: Esta acoplado a una pequeña celda que sirve como sensor, pueden seleccionarse tanto la onda de emisión como de excitación.

El equipo utilizado en este trabajo fue un cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector de fluorescencia, teniendo los siguientes componentes:

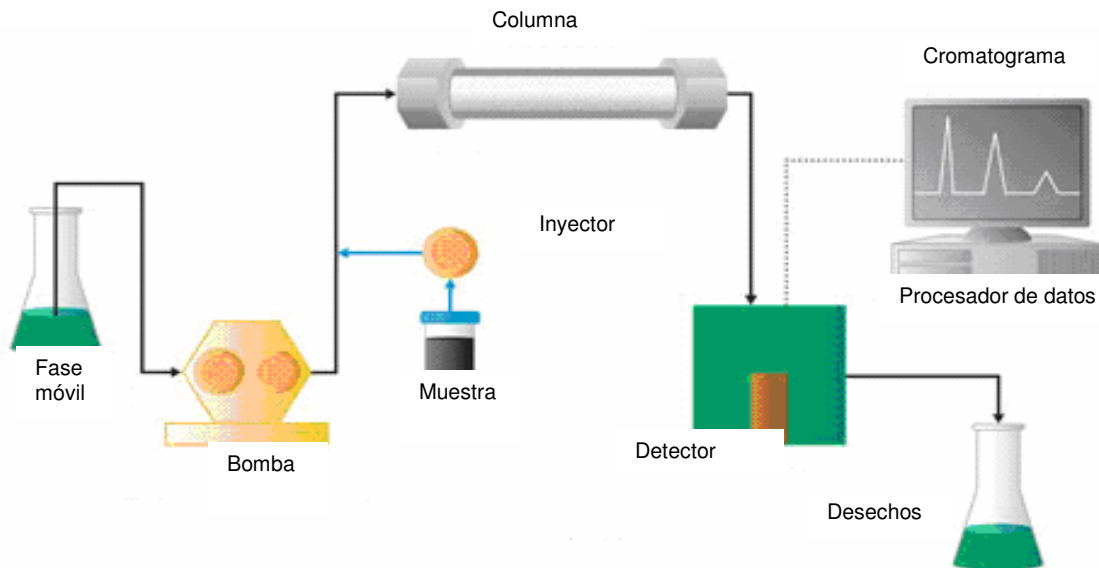


Figura 4. Instrumentación de un equipo de CLAR. ⁹

Métodos analíticos por CLAR para cuantificar Citalopram en sangre total y en plasma. ¹²⁻¹⁷

En la siguiente tabla se presentan los diversos métodos encontrados en la revisión bibliográfica para extraer y cuantificar Citalopram en matrices biológicas.

ng/mL

Tabla 2. Métodos de extracción y cuantificación de Citalopram en plasma y sangre.

Método	Preparación de la Muestra	Estándar Interno	Columna de Extracción	Columna Analítica	Fase Móvil	λ detector	Instrumentos	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
Método 1 ¹² Extracción en fase sólida. Determinación de Citalopram en plasma por CLAR con detección fluorescente.	* 0.5 mL de plasma + 0.5 mL de ACN * Volumen de Inyección: 30 µL	Protriptilina 1 µg/mL	BondElut C ₁₈ , Varian	Ultrasphere C ₁₈ fase reversa (4.6 mm * 150 mm, 5 µm tamaño de partícula). Filtro: C ₁₈ , sílica (15 * 3.2 mm, tamaño de partícula 7 µm)	KH ₂ PO ₄ 10 mM pH 4 /ACN (2:1 v/v) Flujo: 0.7 mL/min. Tiempo de corrida: 11.0 min	Fluorescencia: cia: 250 nm λexc: 325 nm UV λ: 240 nm	CLAR: LC-6A Shimadzu Fluorescencia: detector SIL-9A Shimadzu	RECOBRO: 104 ± 3%, LINEALIDAD: (12-1600 ng/mL), R ² = 0.9997
Método 2 ¹³ Extracción líquido-líquido. Determinación de Citalopram en plasma por CLAR y detección fluorescente.	+ 100 µL NaOH 1 M/4 mL hexano-alcohol isoamílico (98:2 v/v). *Centrifugación. Fase orgánica + 100 µL HCl 0.02 M + 30 µL KH ₂ PO ₄ 0.1 M (pH 7.0) * Volumen de	Verapamil hidrocloreto o hidrocloreto de verapamil 6025 ng/mL	No fue utilizada	Ultrasphere Cyano fase estacionaria (4.6 mm * 45 mm, 5 µm tamaño de partícula) Temperatura de columna: 35°C	Isocrático: ACN/KH ₂ PO ₄ 30 mM (pH 6.0) (50:50 v/v) Flujo: 2.0 mL/min. Tiempo de corrida: 1.5 min	Fluorescencia: cia: 236 nm λexc: 306 nm	CLAR: AS 3000 detector FL2000	LINEALIDAD: (0.955-81.60 ng/mL), R ² : 0.9997
Método 3 ¹⁴ Extracción líquido-líquido. Determinación de Citalopram en plasma por cromatografía de líquidos de tipo quiral.	100 µL NaOH/heptano-alcohol isoamílico (98.5:1.5 v/v) * Centrifugación. Extracción con alcohol isoamílico-tolueno. Centrifugación.	S-alprenolol 2 ng/µL	No fue utilizada	Chirobiotic V (4.6 mm * 150 mm, 5 µm tamaño de partícula).	Isocrático: MeOH/CH ₃ COOH/NCH ₃ (99.9:0.055:0.060 v/v) Flujo: 1.0 mL/min. Tiempo de corrida: 15.0 min	Fluorescencia: cia: 240 nm λexc: 296 nm	CLAR: HP 1100 Detector de fluorescencia Perkin-Elmer LC 240	RECOBRO: >75 %, LINEALIDAD: (5.0-250 ng/mL), R ² : 0.991

Método	Preparación de la Muestra	Estándar Interno	Columna de Extracción	Columna Analítica	Fase Móvil	λ detector	Instrumentos	RESULTADOS DE VALIDACIÓN
Método 4 ¹⁵ Extracción en fase sólida. Determinación de Citalopram en plasma por CLAR y detección fluorescente.	(pH 11.5) + 1 mL plasma + 1 mL ACN/PO ₄ 25 mmol/L. Lavado 1 mL agua + 1 mL ACN . Elución: 2 mL CH ₃ COOH 1% en MeOH. Volumen de inyección: 15 µL	Lu 10-202-0	Estación de procesamiento WacMaster-20 (IST) con agujas de acero inoxidable.	Nova Pak fenólica RCM (10 cm * 8 mm, 4 µm tamaño de partícula) Temperatura de columna : ambiente. Filtro: Nova Pak fenólica Waters, 4 µm	Isocrática: ACN/PO ₄ 70 mmol/L (40:60 v/v) Flujo: 3 mL/min. Tiempo de corrida < 6 min.	Fluorescencia: λexc: 235 nm λem: 290 nm	CLAR : bomba Varian 2510. Detector de fluorescencia Perkin-elmer LS-40 Automuestreador: Waters 717	RECOBRO: 98 %, LINEALIDAD (60-620 nmol/L), R ² : 0.9965
Método 5 ¹⁶ Extracción en fase sólida. Determinación de Citalopram en sangre total y plasma por CLAR con detección ultravioleta y fluorescente.	+ 5.0 mL KH ₂ PO ₄ 0.1 M (pH 7.0)/MeOH (90:10 v/v). Centrifugación. Extracción sólida. Elución: ATF en MeOH 2 % (v/v). Redisover en 100 µL de fase móvil. Volumen de inyección: 15 µL	Protriptilina hidroclorada o hidrocloreuro de protriptilina 2500 µmol/L.	Columna C ₈ (IST).	Symmetry C ₁₈ de Waters (150 * 3.9 mm tamaño de partícula 5 µm), protegida por una precolumna sentir de Waters (20 * 3.9 mm).	Formiato de amonio 45 mM (pH 4.0)/ACN (70:30 v/v). Flujo: 1.2 mL/min. Temperatura de la columna: 45 ± 0.1 °C.	Fluorescencia: λexc: 245 nm λem: 295 nm	válvula de gradiente FCV-10AL, inyector automático SIL-10AXL, horno de columna CTO-10 st . Detector espectrofotométrico SPD-10A, Detector espectrofluoro	RECOBRO: >100%, LINEALIDAD: (0.050-5.0 µmol/L) R ² : >0.999
Método 6 ¹⁷ Extracción en fase sólida. Determinación de Citalopram en plasma por CLAR con detección fluorescente.	MeOH (85:15 v/v) Mezclado con vortex, centrifugación. Extracción en fase sólida. Volumen de inyección: 15 µL	Verapamil 100 µL/mL	No se especifica.	Symmetry C ₁₈ (150 * 3.9 mm, tamaño de partícula 5 µm, de Waters).	isocrático. ACN/formiato de amonio 45 mmol/L (pH 4.0) (78:28 v/v) Flujo: 0.8 mL/min. Tiempo de corrida: 19.0 min	Fluorescencia: λexc: 249 nm λem: 302 nm	CLAR: Agilent 1100.	RECOBRO: ~90 %, LINEALIDAD: (5-400 µg/L), R ² : 0.999

Validación de métodos bioanalíticos ^{19,20, 21,22}

En el ámbito internacional hay una gran variedad de organismos que establecen parámetros y/o características con las que debe cumplir un método analítico que se considere validado. La validación de estos métodos es crítica para poder llevar a cabo de manera exitosa los estudios preclínicos y/o biofarmacéuticos y farmacológicos. La validación de métodos bioanalíticos incluye todos aquellos procedimientos que demuestren que este método es confiable y reproducible en una matriz biológica como puede ser: sangre, plasma, orina o suero. Es común que métodos reportados en diversas publicaciones sean modificados de acuerdo a los requerimientos del laboratorio que realiza el ensayo. Todos los cambios deben ser validados incluso cuando son realizados a métodos anteriormente validados por el laboratorio.

La ICH (INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE), es la conferencia que determina los parámetros base para ser aplicados en las legislaciones de cada país. Las pruebas son: especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación.

Las pruebas se basan en que el equipo, los instrumentos, las operaciones analíticas y las muestras son parte integral del sistema a evaluar. Los parámetros se establecen para el procedimiento en particular.

En Estados Unidos el organismo que establece los parámetros a considerar en un estudio biofarmacéutico y por tanto los criterios de validación de los métodos analíticos es la FDA (Food and Drug Administration) establecida en 1906 aunque sus inicios datan de 1901 como Buró de Química. Los principales parámetros para una validación de acuerdo a la FDA son: (1) exactitud, (2) precisión, (3)selectividad, (4)sensibilidad, (5)reproducibilidad y (6)estabilidad. En la Unión Europea esta la EMEA (European Medicines Agency) establecida en 1995. De acuerdo a este organismo las características con las que debe cumplir un método analítico son: (1)estabilidad de las soluciones de referencia y del analito,

(2)especificidad, (3)exactitud, (4)precisión, (5)límite de cuantificación y (6)función/factor de respuesta.

Como puede verse, las diferencias entre los requerimientos de ambos organismos son mínimas.

En la mayoría de los países de América Latina se tienen reglamentos o normas individuales para la validación de un método analítico y la realización de estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia. En la siguiente tabla se muestra la legislación vigente para cada país.

Tabla 3. Legislación vigente sobre biodisponibilidad/bioequivalencia en países de América Latina	
País	Legislación vigente
Argentina	ANMAT 3185/99
Brasil	ANVISA 987/99
Colombia	Decreto 677/95 Res. 1400/2001–1890/2001
Costa Rica	Reg. 28466-S
México	NOM-177-SSA1-1998
Venezuela	Ley 37.006 (por aprobar)

En México, las pruebas y criterios generales para la validación de un método analítico son:

Validación: Evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado. Dentro de los parámetros a considerar en una validación se encuentran:

Exactitud: Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

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

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

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

Precisión: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.

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

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

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

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

Selectividad: Capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

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

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

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

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

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




Matriz biológica: Material de origen biológico en el cual se encuentra la sustancia de interés.

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

Corrida analítica: Conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales.

OBJETIVOS

En este trabajo se desarrollo y valido una metodología analítica, aplicada en muestras de voluntarios sanos (mujeres). Los objetivos del presente estudio fueron:

-  Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar Citalopram en plasma.
-  Aplicar el método en un estudio de biodisponibilidad en población mexicana.
-  Comparar y determinar posibles diferencias entre distintas poblaciones.

PARTE EXPERIMENTAL











La parte experimental se divide en dos fases:

Fase 1: Desarrollo y validación del método analítico por CLAR para cuantificar el fármaco en plasma.


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

Material, reactivos, equipos e instrumentos

Material

-  Matracas volumétricos calibrados: 20, 25, 50, 100 y 1000 mL.
-  Frascos de vidrio con tapa rosca de: 500 y 1000 mL.
-  Vasos de precipitados de vidrio: 20, 100 y 250 mL
-  Puntas para pipeta repetidora 200, 1000, 2500 y 5000 μ L.
-  Viales para automuestreador 2695.
-  Pipetas volumétricas: 1 y 5 mL.
-  Gradillas para microtubos.
-  Probeta graduada de 1 L.
-  Guantes de nitrilo
-  Microtubos de polipropileno.

Equipos e instrumentos

-  Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, que consta de:
 - Sistema de bombeo marca Jasco modelo PU-2080 Plus No. de serie C329860860
 - Detector ultravioleta marca Jasco modelo XLC-3075-UV No. de serie A004961089

Automuestreador marca Jasco modelo AS-2057 Plus No. de serie B059160878

Sistema de control de temperatura para columnas marca Jasco modelo C0-2067 Plus No. de serie B016961013


Válvula selectora de disolventes marca Jasco modelo LV-2080-03 No. de serie B007360883


Interfase marca Jasco modelo LC-NETII/ADC No. de serie B105661095


Desgasificador en línea marca Jasco modelo XLC-3080-DG No. de serie A000661091

Mezclador de alta presión marca Jasco modelo XLC-3080-MX No. de serie A001261093


Detector de fluorescencia marca Jasco modelo XLC-3120-FP No. de serie A002061214

 Balanza analítica marca Ohaus modelo EP214C No de serie 1239 1125333712P.


 Agitador vórtex marca Thermolyne, modelo Maxi Mix II M37615 No de serie 871980379619.

 Ultracongelador marca REVCO modelo ULT2186-5-A36 No de serie S200-208914-S0

 Sistema de purificación de agua marca Barnstead

 Pipeta repetidora electrónica marca Eppendorf modelo Multipette plus No. de serie 3270096.

 Micropipeta volumen fijo 200 μ L marca Hirschmann Laborgeräte modelo Hirschmann Labopette No de serie 6051860.

 Micropipeta volumen variable 100-1000 marca Hirschmann Laborgeräte modelo Labopette No de serie 6057184.

- Microcentrifuga Eppendorf Modelo 5424.
- Refrigerador Torrey R-16 No de serie k04-02209.
- Potenciómetro Oakton.

Reactivos y disolventes

- Metanol grado cromatográfico J.T. Baker
- Acetonitrilo grado cromatográfico, Mallinckrodt
- Ácido trifluoroacético J. T. Baker
- Fosfato de amonio dibásico, J. T. Baker

Sustancias de referencia

- CITALOPRAM. Estándar secundario, APOTEX INC. Potencia 100%. Vigencia 15-11-2008.

Desarrollo del método

Columnas

Se probaron las columnas: ZORBAX SB-C18 3.5 μm 2.1*100 mm, ZirChrom BBD 3 μm 4.6*150 mm, Pursuit xRs 5 μm 4.6*150 mm y Water Spherisorb 5 μm 4.6*250 mm CNRP. Los parámetros utilizados para definir la columna de trabajo fueron tiempo de corrida, condiciones de la fase móvil (pH, disolventes y proporciones de los mismos), flujo, sensibilidad y especificidad al analito.

pH de la fase móvil

El pH, la proporción y los componentes están relacionados con las propiedades fisicoquímicas de la molécula. Se estudiaron diversas fases:

ACN 100%, ACN/ PO_4^- 55:45, ACN/ PO_4^- 10:90, ACN/ PO_4^- 15:85, ACN/ PO_4^- 77:23, ACN/ PO_4^- 60:40, ACN/ PO_4^- 50:50, ACN/Agua 70:30, ACN/Agua 60:40, ACN/Agua 80:20, ACN/Agua 50:50, ATF/ACN 50:50, ATF/ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 50:50, ATF 1%,

ATF/ACN 40:60. Todas las proporciones están en una relación volumen/volumen. Los pH aprobados van de 3.00 hasta 6.50.

Métodos de extracción evaluados

Se evaluaron diversos métodos de extracción en función de la prueba de recobro y la linealidad del método. En principio se eligió la extracción por precipitación- evaporación, sin embargo no cumplía con un recobro mayor a 50% y la linealidad era variable entre días. Posteriormente se procedió a probar la extracción líquido-líquido, en la cual no era posible extraer el analito a analizar y por tanto no se obtenía respuesta alguna en el detector. Finalmente se probó la extracción sólido-sólido. Las diversas modificaciones realizadas al método se describen a continuación.

Sólido-líquido

Método 1: Extracción sólido-líquido con cartuchos MCX. Activación de los cartuchos: 2 ml de ACN, 1 ml agua, se colocó 0.5 mL de plasma en el cartucho, lavado con 1 mL de agua. Elución con 2 mL de ACN.

Método 2. Cartuchos HLB. Activación de cartuchos con 2 ml de ACN, 1 ml agua. Se colocó 0.5 mL de plasma en el cartucho, lavado con 1 mL de agua. Elución con 2 mL de ACN.

Método 3. Extracción en condiciones ácidas. Activación de los cartuchos con 2 ml de ACN, 1 ml agua, 1mL de HCl 0.1 N. Se adicionó 0.5 mL de plasma en el cartucho, lavado con 1 mL de agua. Elución con 2 mL de ACN.

Método 4. Extracción en condiciones básicas. Los cartuchos se activaron con 2 ml de ACN, 1 ml agua, 1mL de (NH₄)₂HPO₄ 20 mM pH 6.5. Se adicionó 0.5 mL de plasma en el cartucho, lavado con 1 mL de agua. Elución con 2 mL de ACN.

Método 5. Extracción en condiciones básicas, con cartuchos Bond Elute.

Método 6. Extracción en condiciones básicas con cartuchos Bond Elute junior.

Método 7. Extracción en condiciones básicas. Cartuchos HLB. Se activaron con 2 ml de ACN, 1 ml agua, 1mL de (NH₄)₂HPO₄ 20 mM pH 6.5. Se adicionó 0.5 mL

de plasma en el cartucho, el cual se lavo con 0.5 mL de agua. La elución se realizó con 2 mL de MeOH.

Volumen de inyección

El volumen a inyectar fue de 30 μ L debido a que a un mayor volumen se presentaba deformación de los picos en el cromatograma. La velocidad de flujo fue de 1 mL/min.

Estándar Interno

El desarrollo de un método analítico implica conocer las propiedades fisicoquímicas del fármaco de interés y las condiciones del detector, condiciones cromatográficas y elección de un estándar interno. Los estándares que se probaron se enlistan a continuación:

*Fluoxetina

*Paroxetina

*Glibenclamida

*Cisaprida

*Piroxicam

La selección de los analitos candidatos a estándar interno, se baso en su característica de ser fluorescentes, como nuestro primer criterio de elección, la obtención de un tiempo de corrida breve y sin interferencias endógenas del fluido biológico utilizado, aunado a lo anterior, el número de platos teóricos pretendido fue mayor a 2000 con una resolución mayor a 1.5.

Validación del método

Una vez establecidas las condiciones óptimas del método analítico se procedió a la validación del mismo; dicha validación se realizó de acuerdo a los requisitos y parámetros establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.

A continuación se enumeran las condiciones y pruebas mediante las cuales se llevó a cabo la validación:

Curva de calibración.

Se prepararon las soluciones de trabajo de acuerdo a la siguiente tabla, utilizando una pipeta repetidora Eppendorf con puntas de 2.5 mL y 5 mL para tomar las alícuotas correspondientes. Depositar cada alícuota a un matraz volumétrico de 10 mL y cada solución llevar a volumen con metanol grado cromatográfico. De cada solución transferir 25 µL a microtubos de polipropileno.

Los puntos control de calidad para sistema se realizaron colocando los 25 µL de las soluciones correspondientes en microtubos y agregando 475 µL de ACN/ATF 1% pH 4.0, 60:40 v/v.

Preparación de soluciones

Solución amortiguadora de fosfato de amonio 20 mM pH 6.5

Pesar 2.64 g de fosfato dibásico de amonio y transferirlos a un matraz volumétrico de 1 L, ajustar el pH a 6.5 con ácido fosfórico concentrado.

- Solución de ácido trifluoroacético 0.1 % pH 4.0

Tomar 1 mL de ácido trifluoroacético con pipeta volumétrica y transferir a un matraz volumétrico de 1 L, llevar a volumen con agua grado CLAR previamente filtrada a través de membrana de 0.2 µm. Ajustar el pH de la solución a 4.0 con hidróxido de potasio diluido.

- Solución de referencia de CITALOPRAM 100 µg/mL (Solución A).

Pesar el equivalente a 10 mg de Citalopram y transferirlos a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con MeOH grado cromatográfico.

- Dilución de la solución de referencia de CITALOPRAM 40 µg/mL (Solución B).

Transferir 10 mL de la solución de referencia (A) a un matraz volumétrico de 25 mL y completar el volumen con MeOH grado cromatográfico.

- Dilución de la solución de referencia de CITALOPRAM 2 µg/mL (Solución C).

Transferir 1 mL de la solución de referencia B a un matraz volumétrico de 20 mL, llevar a volumen con MeOH grado cromatográfico.

- Preparación de la solución de Citalopram para evaluar la adecuabilidad del sistema.

Transferir 5 mL de la solución de referencia C a un matraz volumétrico de 20 mL, llevar a volumen con fase de reconstitución (ácido trifluoroacético 1% pH 4.0 : acetonitrilo 40:60 v/v), esta solución tiene una concentración de 0.5 µg/mL.

Tabla 1. Soluciones estándar para la preparación de la curva de calibración.				
VOLUMEN SOLUCIÓN DE REFERENCIA DE CITALOPRAM 2 µg/mL (µL)	VOLUMEN SOLUCIÓN DE REFERENCIA DE CITALOPRAM 40 µg/mL (µL)	VOLUMEN FINAL (METANOL) (mL)	CONCENTRACIÓN FINAL (ng/mL)	# SOLUCIÓN
100	-	10	20	1
200	-	10	40	2
400	-	10	80	3
600	-	10	120	4
800	-	10	160	5
1000	-	10	200	6
-	100	10	400	7
-	200	10	800	8
-	300	10	1200	9
-	400	10	1600	10
-	500	10	2000	11
-	600	10	2400	12
-	700	10	2800	13
-	800	10	3200	14

# SOLUCIÓN	ALÍCUOTA DE CADA SOLUCIÓN ESTÁNDAR (µL)	ALÍCUOTA DE PLASMA (µL)	CONCENTRACIÓN FINAL CITALOPRAM (ng/mL)
1	25	475	1***
2	25	475	2**
3	25	475	4
4	25	475	6*
5	25	475	8
6	25	475	10
7	25	475	20
8	25	475	40
9	25	475	60
10	25	475	80*
11	25	475	100
12	25	475	120
13	25	475	140*
14	25	475	160

*Puntos control de calidad bajo, medio y alto. **Límite de cuantificación; ***Límite de detección

Linealidad

Se prepararon cinco curvas de calibración a partir de pesadas independientes, las concentraciones fueron 2, 4, 8, 10, 20, 40, 60, 100, 120, 160 ng/mL.

La relación entre la respuesta cromatográfica con respecto a la concentración en cada curva de calibración, fue ajustada a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados a la ecuación $y = mx + b$, donde la variable “y” es el área obtenida para Citalopram y “x” es la concentración nominal del mismo. La linealidad del método se definió a partir del coeficiente de correlación (r), cuyo valor para cada curva de calibración fue igual o mayor a 0.99. Para evaluar la linealidad, se consideraron 5 curvas de la validación del método analítico, así como la desviación porcentual de la concentración recuperada (interpolada) con respecto a la nominal (adicionada) y si era menor o igual al 15% en todos los puntos que constituyen la curva de calibración, a excepción del límite de cuantificación cuya desviación no debía ser mayor al 20%.

Selectividad del método

Se evaluó la selectividad del método inyectando un blanco de plasma (mezcla de las muestras de plasma de 6 donadores) y una muestra de plasma conteniendo cada una, uno de los siguientes fármacos: paracetamol 20 µg/mL, naproxeno 100 µg/mL, cafeína 10 µg/mL, ácido acetilsalicílico 300 µg/mL, heparina 143 unidades USP. Todos se analizaron a las condiciones cromatográficas establecidas.

Precisión del método.

La precisión del método se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad. Se definen como:

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

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

Repetibilidad

A partir de las soluciones de referencia preparadas para los puntos control se prepararon y cuantificaron por quintuplicado, muestras con Citalopram 6, 80 y 140 ng/mL, las cuales se procesaron con el método establecido. Con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las 5 determinaciones de cada nivel. El coeficiente de variación no debía ser mayor al 15%.

Reproducibilidad

Se preparó una curva en plasma con controles de calidad (6, 80 y 140 ng/mL) por quintuplicado, durante tres días, empleando cada día soluciones de referencia preparadas recientemente.

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

Exactitud del método.

Se tomó en cuenta el valor promedio en cada nivel de concentración de los puntos control durante las pruebas realizadas para evaluar repetibilidad y reproducibilidad, cada nivel de concentración debía estar dentro del 15% de su valor nominal correspondiente. Se utilizó la siguiente ecuación:

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

Recobro

Se prepararon y procesaron por quintuplicado los puntos de control de calidad de Citalopram en plasma, concentraciones de 6, 80 y 140 ng/mL. Las respuestas cromatográficas (área de pico) promedio obtenidas de cada muestra se compararon contra las respuestas promedio obtenidas de Citalopram en la fase de reconstitución a las mismas concentraciones, las cuales no fueron sometidas al proceso de extracción.

El recobro no necesariamente debió ser del 100%, pero si tuvo que ser constante en los niveles de concentración evaluados y poder utilizarse para poder cuantificar el nivel más bajo de concentración en la curva de calibración; por lo que se recomienda sea mayor al 50%.

Para Citalopram, los valores promedio individuales no deben desviarse del promedio total en más del 15%.

Límite de detección y cuantificación.

Por quintuplicado se prepararon muestras de Citalopram en plasma a las concentraciones de 1.0 y 2.0 ng/mL, estas muestras fueron procesadas e inyectadas en el sistema cromatográfico correspondiente. El límite de cuantificación (LC) se define como la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor promedio no se desvía más del $\pm 20\%$ del valor nominal (concentración

adicionada), con un C.V. < 20%; mientras que el límite de detección (LD) como la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica se distingue del nivel de ruido (aproximadamente tres veces mayor) y el C.V. de la concentración recuperada (precisión) y/o la desviación absoluta por ciento (exactitud) no son mayores al 20%.

Estabilidad

Su evaluación permitió determinar si hubo algún efecto de los cambios en las condiciones de temperatura y tiempo, a las que Citalopram en plasma fue sometido durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, y si se mantuvo estable. Esta determinación se logró al evaluar la concentración de Citalopram en plasma.

Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación en matriz biológica.

Se prepararon por triplicado, muestras de Citalopram en plasma a las concentraciones de: 5, 50 y 80 ng/mL. Una serie recién preparada se analizó de acuerdo al método analítico, estas muestras correspondieron a tiempo cero. Los controles restantes se sometieron a tres ciclos de congelación-descongelación a -70 °C, dejando entre cada ciclo un periodo de 24 horas. Se analizó una serie de muestras control al final del tercer ciclo de congelación-descongelación y sus concentraciones interpoladas se compararon contra aquellas de controles recientemente preparados.

Estabilidad a temperatura ambiente (21 °C) y refrigeración (3 °C) en matriz biológica.

Se prepararon dos series de muestras por triplicado: 6, 80 y 140 ng/mL de Citalopram, las cuales se analizaron para cada condición a las 48 horas posteriores a su preparación. Las concentraciones interpoladas se compararon

contra las concentraciones obtenidas a partir de muestras control recién preparadas.

Estabilidad de la muestra procesada

Se prepararon por triplicado muestras de Citalopram en plasma, a tres niveles de concentración (6, 80, 140 ng/mL), estas se sometieron al procedimiento de extracción establecido para después inyectarlas en el sistema cromatográfico. Las muestras procesadas permanecieron en el automuestreador a 10°C y fueron inyectadas 48 horas después de su procesamiento. Estas muestras fueron comparadas con controles de reciente preparación.

Estabilidad a largo plazo (78 días)

Se prepararon muestras de Citalopram en plasma a tres niveles de concentración (6, 80, 140 ng/mL, cada una por triplicado y se colocaron en refrigeración a -70°C durante 78 días. Una vez transcurrido el periodo de tiempo se procesaron de acuerdo al método de extracción y se inyectaron en el sistema cromatográfico. Las muestras fueron comparadas con muestras control recién preparadas.

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

Estabilidad de la muestra procesada en el automuestreador.

Para determinar la estabilidad de la muestra procesada, se prepararon por triplicado las muestras de control de calidad de Citalopram en plasma (6, 80 y 140 ng/mL), las muestras se sometieron al procedimiento de extracción y se inyectaron al sistema cromatográfico (tiempo cero). Las muestras se almacenaron en el automuestreador y se inyectaron de nuevo a las 24 y 48 horas después de

su preparación. Se compararon con muestras de control de calidad recién preparadas.

Para considerar al fármaco estable a la condición evaluada, los resultados de concentración interpolada promedio para cada nivel de concentración deben estar dentro del $\pm 15\%$ del valor promedio obtenido al tiempo cero.

Tolerancia

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

Se utilizaron 250 μL de una muestra de 80 ng/mL de Citalopram. El volumen se completó con 250 μL de plasma y se sometió al método de extracción establecido. La prueba fue aceptada si la diferencia de concentraciones entre las muestras extraídas con el volumen normal y la concentración calculada de las muestras a la mitad del volumen, multiplicando por un factor de dilución de 2, no excedía el 15% del promedio del valor original



Etapas clínicas








Se realizó de acuerdo a los lineamientos establecidos en la Ley General de Salud y en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación para la Salud.

Criterios de inclusión

Participaron 12 mujeres de manera voluntaria con un intervalo de edad entre 19 y 35 años, con un índice de masa corporal (IMC) entre 20 y 26.61 kg/m^2 .

Los voluntarios fueron declarados clínicamente sanos de acuerdo a su historia clínica completa y a los resultados de los siguientes exámenes de laboratorio y gabinete:

-  Historia clínica completa
-  Biometría hemática completa

-  Química sanguínea de 27 elementos
-  Examen general de orina
-  Marcadores para hepatitis B y C.
-  Detección de VIH.
-  Prueba de embarazo
-  Prueba de abuso de drogas.
-  Electrocardiograma.

Criterios de exclusión

- a) Sujetos con alguna alteración en sus constantes vitales registradas en la selección de voluntarios.
- b) Voluntarios que no cumplieron con los criterios de inclusión propuestos.
- c) Voluntarios que requirieron de cualquier medicamento durante el curso del estudio, aparte del medicamento que se encontraba en estudio.
- d) Voluntarios que recibieron cualquier medicamento, durante 14 días o 5 vidas medias (cualquiera que sea más largo) previos al inicio del estudio.
- e) Sujetos que hayan recibido fármacos en investigación 2 meses antes del presente estudio.
- f) Sujetos que donaron o perdieron 450 mL o más de sangre dentro de los 2 meses previos al inicio del estudio.
- g) Sujetos con antecedentes de abuso de drogas y alcoholismo.

A cada voluntario se le administraron 2 tabletas de bromohidrato de Citalopram 20 mg (equivalentes a 40 mg de Citalopram). Las muestras sanguíneas, fueron recolectadas y procesadas para obtener el plasma, antes de cada administración y a los siguientes tiempos: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 24, 48, 72 y 96 horas, después de la administración del medicamento.

No se tomó ningún otro medicamento durante el tiempo que duró el estudio a menos que fuera necesario ante la presencia de reacciones adversas y autorizado

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

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

Cuantificación de Citalopram en plasma

Fueron recibidas 525 muestras para su procesamiento correspondiente procedentes de 12 voluntarios. Las muestras se separaron de acuerdo a los tiempos de muestreo y se almacenaron a -70°C en el ultracongelador hasta el momento de su análisis de acuerdo a la metodología establecida.

Determinación de parámetros farmacocinéticos

C_{max}: Concentración plasmática máxima obtenida de manera gráfica, a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.

T_{max}: Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima, obtenido de manera gráfica a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.

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

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

Donde:

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

t_i= tiempo en que se realiza la i-ésima toma de muestra

C_i = Concentración obtenida en el i -ésimo tiempo de muestreo.

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

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

Donde:

C_f = Concentración de la última muestra

K_e = Constante de eliminación

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

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

TMR_{0-inf}: Tiempo medio de residencia extrapolado a tiempo infinito

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

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

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

Donde:

t_f = Tiempo de la última muestra

C_f = Concentración de la última muestra

Análisis estadístico

Se realizó el análisis de los datos obtenidos, calculándose las siguientes variables:

N: número de voluntarios que participaron en el estudio.

Promedio: Cantidad o valor medio que resulta de dividir la suma de todos los valores entre el número de estos.

D.E. Desviación estándar de cada variable analizada.

E.E. Error estándar de cada variable analizada.

Min: Valor mínimo de los datos obtenidos para cada variable.

Mediana: valor de la variable que deja el mismo número de datos antes y después que él. De acuerdo con esta definición el conjunto de datos menores o iguales que la misma, representarán el 50% de los datos, y los que sean mayores que esta, representarán el otro 50% del total de datos de la muestra.

Máxima: valor máximo de los presentados para una variable.

C.V. %: permite comparar la dispersión entre dos poblaciones distintas e incluso, comparar la variación producto de dos variables diferentes (que pueden provenir de una misma población).

Estadística comparativa entre tres poblaciones^{17,18}

Se realizó un estudio comparativo entre población mexicana, española y checa.

En el artículo denominado “Ensayo clínico cruzado y aleatorizado de bioequivalencia de dos formulaciones de Citalopram comprimidos, tras su administración en una dosis única a voluntarios sanos.”, se describió el estudio de biodisponibilidad realizado en España para Citalopram Bayvit comprimidos. Fue llevado a cabo en el Hospital Universitario de la Princesa de Madrid. Las características del estudio fueron las siguientes:

Voluntarios sanos : 24.

Estudio abierto, cruzado, aleatorizado, 2 periodos y dosis única. Con un tiempo de muestreo de 120 h, obteniéndose 16 muestras por voluntario.

Mendoza Luis, Hadjuch Marian, et.al. del laboratorio de medicina experimental ubicado en la República checa, condujeron un estudio en 26 voluntarios de género masculino, entre 18 y 50 años y un peso entre 55 y 77 kg. El estudio fue cruzado, aleatorizado con 2 periodos y dosis única de 40 mg de Citalopram.

Ambos estudios contaban con los siguientes parámetros farmacocinéticos:

ABC_{0-t} (ng*h/mL), ABC_{0-inf} (ng*h/mL), $C_{m\acute{a}x}$ (ng/mL) y $T_{m\acute{a}x}$ (h). Cada parámetro registraba la media y D.E, lo que permitió realizar la prueba de t. Esta prueba de t de Student, compara las medias de dos poblaciones basándose en el número de observaciones (voluntarios), la media y la D.E. de cada grupo. Se realizó el estudio comparativo entre estas poblaciones para poder determinar si existían diferencias significativas entre ellas.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Desarrollo del método analítico

Se determinaron las condiciones necesarias para realizar el método. La columna a utilizar se eligió en base al tiempo de corrida, la sensibilidad y el funcionamiento con la fase móvil, la cual se determinó en relación a las propiedades de la molécula y la resolución de los picos obtenidos, siendo el mismo caso para el volumen de inyección. En el caso del estándar interno, ninguna de las sustancias probadas presento una buena separación de picos con respecto al de Citalopram, observándose picos encimados que no pudieron separarse con las condiciones establecidas. Se utilizó un cromatógrafo CLAR marca Jasco y un detector de fluorescencia marca Jasco modelo XLC-3120-FP No de serie A002061214.

Condiciones cromatográficas.

En la siguiente tabla se resumen las condiciones cromatográficas encontradas como óptimas para el método.

Tabla 6. Condiciones cromatográficas utilizadas en el estudio.	
CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	
Detector:	Fluorescencia
Longitud de excitación y emisión:	λ_{em} 240 λ_{exc} 296
Columna:	Spherisorb CN RP 5 μ m 4.6 x 250 mm
Fase Móvil:	Ácido trifluoroacético 0.1% pH 4.0:Acetonitrilo (45:55 v/v)
Velocidad de Flujo:	1 mL/min
Volumen de inyección	30 μ L
Temperatura columna	40 °C
Temperatura automuestreador	10 °C
Solución de lavado del sistema	Acetonitrilo:Agua 70:30 (V/V)
Tiempo de retención aproximado: CITALOPRAM	7-9 min

Método de extracción

En el estudio se utilizó aquel con el que se obtuvieron mejores resultados.

1.- Se tomaron 500 μL de plasma con pipeta repetidora punta de 1000 μL y se colocaron en un microtubo.

2.- Se agitaron en vortex durante 1 minuto y se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 minutos.

3.- Mientras se centrifugaban las muestras se procedió a la activación de cartuchos:

3 mL de ACN

1 mL de agua grado cromatográfico.

1 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 20 mM pH 6.5

4.- Una vez activados los cartuchos, con micropipeta de 1000 μL se paso el plasma de cada muestra a los cartuchos. Una vez que la muestra paso por el cartucho se procedió a la fase de lavado con 0.5 mL de agua grado cromatográfico.

5.- Los cartuchos se dejaron secar por 2 minutos antes de realizar la elución con 2 mL de MeOH, los cuales son colocados en tubos de ensaye para su evaporación a 50°C bajo corriente de aire.

6.- La muestra evaporada se reconstituyó con 200 μL de ACN/ATF 1% H 4.0 60:40 v/v. Se tomaron 30 μL para inyectarlos al sistema cromatográfico.

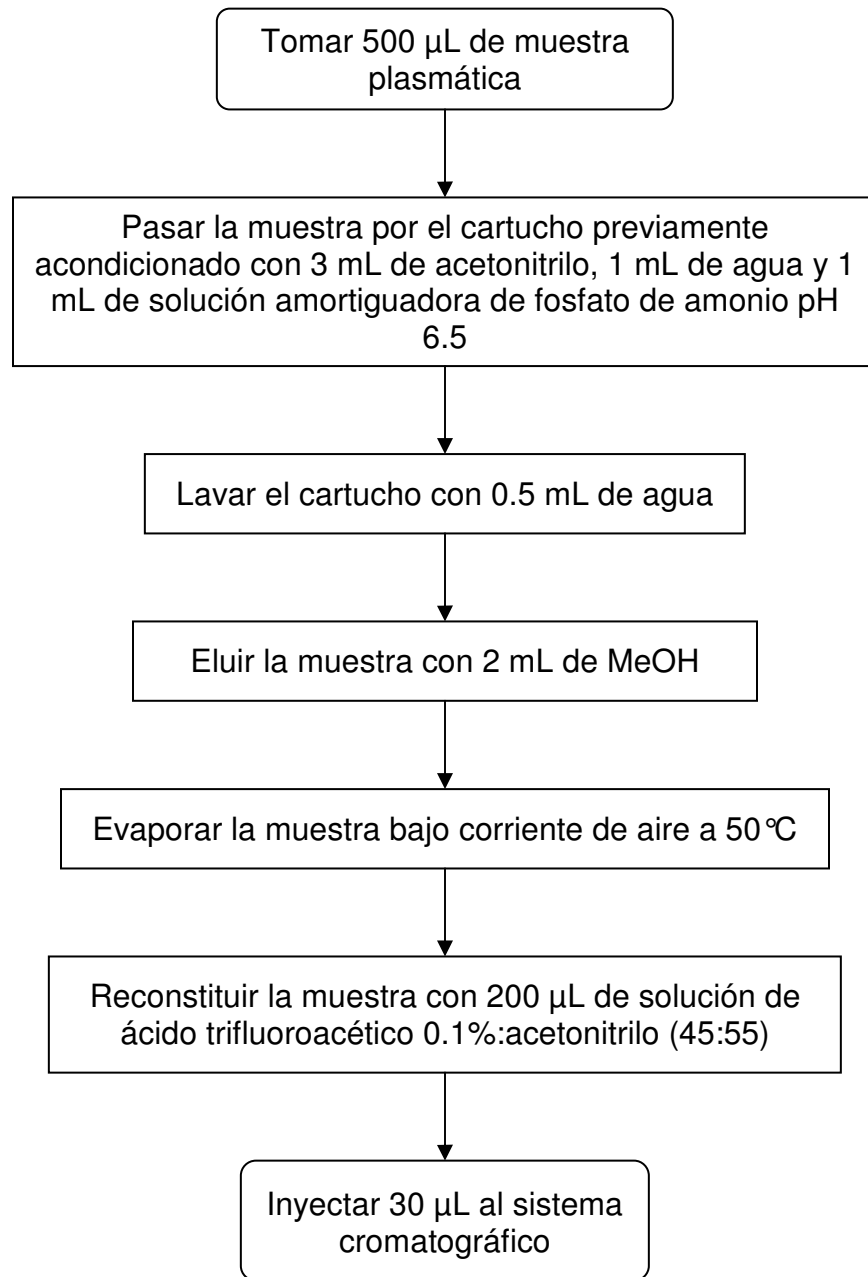


Figura 5. Diagrama del método de extracción.

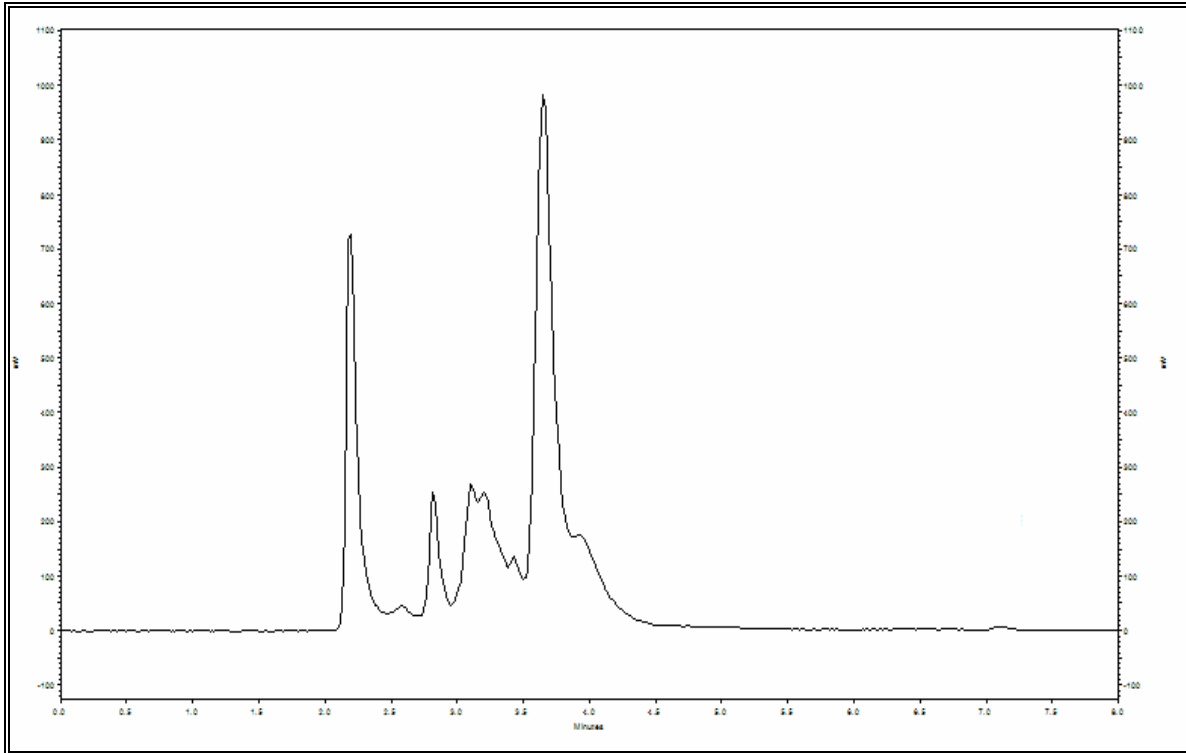


Figura 6. Cromatograma de una muestra de plasma t_0 (blanco de plasma).

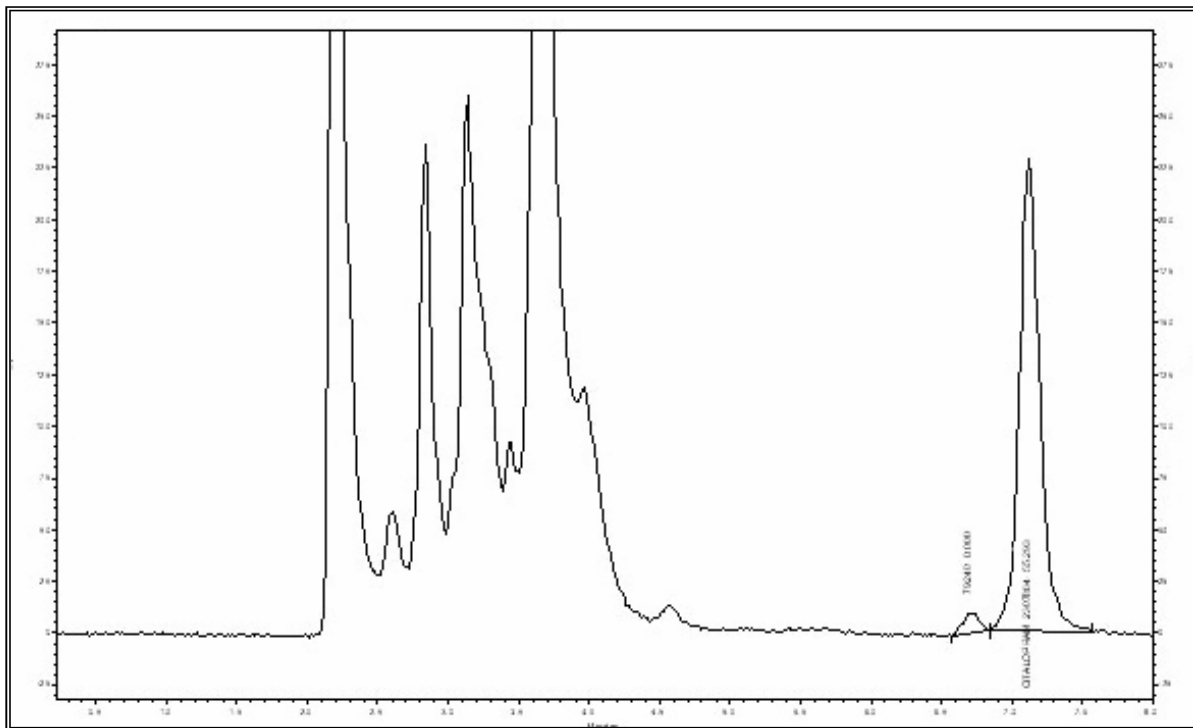


Figura 7. Cromatograma de una muestra de plasma de una voluntaria t_n .

Validación del método analítico

Linealidad

Se muestran los resultados obtenidos de la prueba de linealidad a partir de cinco curvas de calibración en plasma, Las curvas fueron ajustadas a través de un arreglo lineal con ponderación $1/x^2$, obteniéndose un valor de r de 0.999.

Tabla 7. Resultados de la linealidad del método para las corridas de validación.										
Concentración recuperada*										
Conc. Nominal (ng/mL)	2	4	8	10	20	40	60	100	120	160
Curva 1	2.16	3.49	7.98	9.21	19.41	39.80	59.94	101.80	125.37	175.95
Curva 2	1.97	*	8.22	10.29	24.60	42.72	58.04	97.01	118.11	154.78
Curva 3	2.07	3.76	*	9.59	19.21	42.29	65.19	98.23	*	156.36
Curva 4	1.98	3.97	8.29	10.24	20.13	38.80	61.87	99.60	114.37	160.13
Curva 5	2.11	3.83	7.10	9.66	19.50	39.79	61.97	104.65	125.15	166.66
Promedio	2.06	3.76	7.89	9.79	20.57	40.68	61.40	100.26	120.75	162.78
D. E	0.08	0.19	0.55	0.46	2.28	1.72	2.66	3.03	5.43	8.67
C. V (%)	3.97	5.27	6.94	4.69	11.07	4.23	4.34	3.02	4.49	5.33
Desv. Abs. (%)	3.01	5.94	1.26	2.02	2.84	1.69	2.34	0.26	0.62	1.73

*puntos que excedieron el límite de aceptación para exactitud

Tabla 8. Parámetros de linealidad del método para las corridas de validación.			
Conc. Nominal (ng/mL)	Pendiente	Ordenada	r
Curva 1	49122.00	60071.50	0.996
Curva 2	47118.60	54258.60	0.999
Curva 3	46999.00	1555128.00	0.999
Curva 4	44945.70	63344.40	0.999
Curva 5	42447.90	32165.20	0.998
Promedio	46126.64		
D. E	2532.04		
C. V (%)	5.49		

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

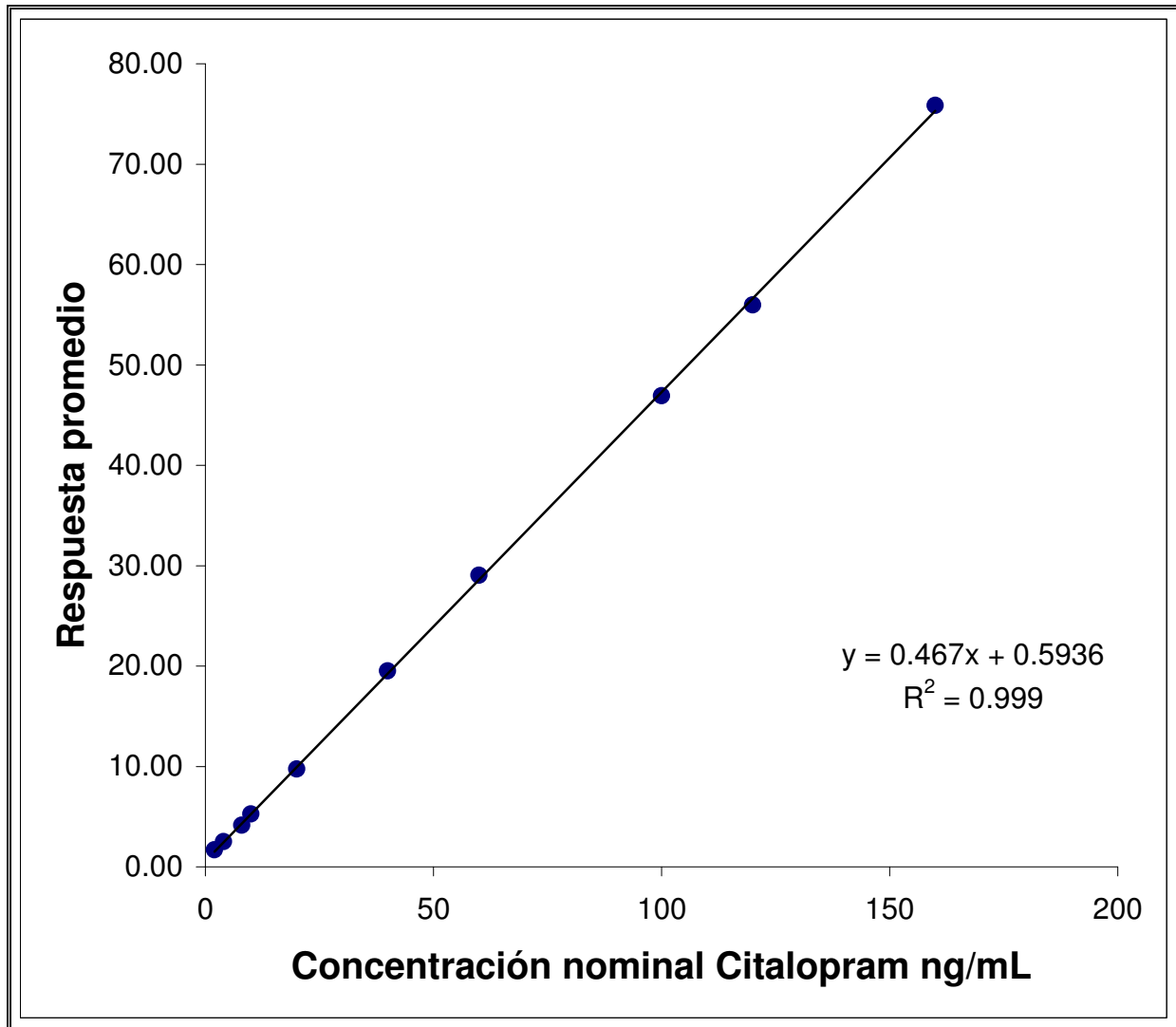


Figura 8. Gráfico de linealidad del método.

Precisión del método

Repetibilidad

A continuación se presentan los resultados correspondientes a la repetibilidad y a la exactitud intradía, el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración evaluados fue menor o igual que 3.05%, mientras que la desviación absoluta (Desv. Abs %) fue menor o igual que 4.10 %.

Tabla 9. Repetibilidad del método analítico.			
Muestra	Control Bajo (6 ng/mL)	Control Medio (80 ng/mL)	Control Alto (140 ng/mL)
1	5.60	81.79	143.32
2	5.74	83.10	144.26
3	5.47	86.95	145.00
4	6.19	87.04	137.10
5	6.01	82.23	146.63
Promedio	5.80	84.22	143.26
D. E.	0.30	2.57	3.65
C. V. (%)	5.10	3.06	2.55
Conc. Nominal	6.0	80.0	140.0
Desv. Abs. (%)	3.31	5.28	2.33

Reproducibilidad

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la reproducibilidad del método y exactitud interdía, se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de trabajo fue de 3.43 a 6.86 %, mientras que la desviación absoluta % fue igual o menor a 4.75 %, en las diferentes concentraciones evaluadas.

Tabla 10. Resultados de reproducibilidad del método analítico.			
Día	Concentración		
	Control Bajo (6 ng/mL)	Control Medio (80 ng/mL)	Control Alto (140 ng/mL)
Día 1	5.60	81.79	143.32
	5.74	83.10	144.26
	5.47	86.95	145.00
	6.19	87.04	137.10
	6.32	80.44	146.63
Día 2	5.64	82.79	147.41
	5.96	83.02	142.30
	6.27	78.66	147.49
	5.56	82.63	147.79
	6.01	82.32	155.49
Día 3	6.63	81.01	152.85
	6.01	80.40	150.64
	6.83	79.56	153.18
	6.08	89.94	142.50
	5.06*	81.85	144.26
Promedio	6.02	82.76	146.60
D. E.	0.40	3.05	5.03
C. V. (%)	6.72	3.69	3.43
Conc. Nominal (ng/mL)	6.0	80.0	140.0
Desv. Abs. (%)	0.35	3.45	4.71

El método fue repetible, reproducible y exacto al cumplir con los criterios: un coeficiente de variación y una desviación absoluta % no mayores al 15% para la concentración en plasma promedio.

Recobro

El recobro fue definido como el cociente de la respuesta de Citalopram, obtenida después de someterse al método de extracción en plasma, entre la respuesta obtenida en muestras en solución a concentraciones equivalentes, las cuales no fueron sometidas al proceso de extracción (muestras para evaluación del sistema).

Tabla 11. Recobro absoluto del método analítico.				
Nivel de concentración	Áreas		Recobro	Desv. Abs. (%)
	SISTEMA*	MÉTODO		
Control Bajo (6 ng/mL)	264638	303387		
	296351	306404		
	289015	303448		
	285595	290811		
	266363	312054		
Promedio	280392	303221	108.14	9.47
Control Medio (80 ng/mL)	3804883	3630333		
	3951434	3604744		
	3690353	3483354		
	3457935	3511926		
	3699535	3555761		
Promedio	3720828	3557224	95.60	3.23
Control Alto (140 ng/mL)	6436847	6028717		
	6458422	6030552		
	6184988	6015144		
	6515584	6028370		
	6684162	5796660		
Promedio	6456001	5979889	92.63	6.24
	Promedio Global		98.79	6.31

* Las soluciones de sistema, fueron los puntos de control de calidad preparados de acuerdo a la tabla 5. Las alícuotas fueron de 25 μ L y se añadieron 475 μ L de ATF 0.1% pH 4.0 : ACN (45:55 v/v).

El recobro fue constante en las concentraciones evaluadas (puntos control bajo, medio y alto), obteniéndose un recobro global del 98.79% y una desviación de los promedios individuales con respecto al global, menor al 15%.

Límite de detección y cuantificación.

Se determinó la sensibilidad del método a partir del límite de detección (LD) y la concentración mínima cuantificable ó límite de cuantificación (LC).

Tabla 12. Límite de detección y cuantificación del método analítico.		
Muestra	Concentración	
	Límite de detección (1 ng/mL)	Límite de cuantificación (2 ng/mL)
1	0.95	1.91
2	1.00	1.91
3	1.05	2.02
4	1.03	1.78
5	0.92	1.82
Promedio	0.99	1.89
D. E.	0.05	0.09
C. V. (%)	5.48	4.87
Conc. Nominal	1.00	2.00
Desv. Abs. (%)	1.00	5.61

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

El límite de cuantificación establecido para esta metodología fue de 2 ng/mL (C.V.= 4.87% y Desv. Abs%= 5.61). La concentración de 1 ng/mL se consideró como el límite de detección, debido a que la relación señal/ruido que se presenta a este nivel es cercana a 3. (Figura 9).

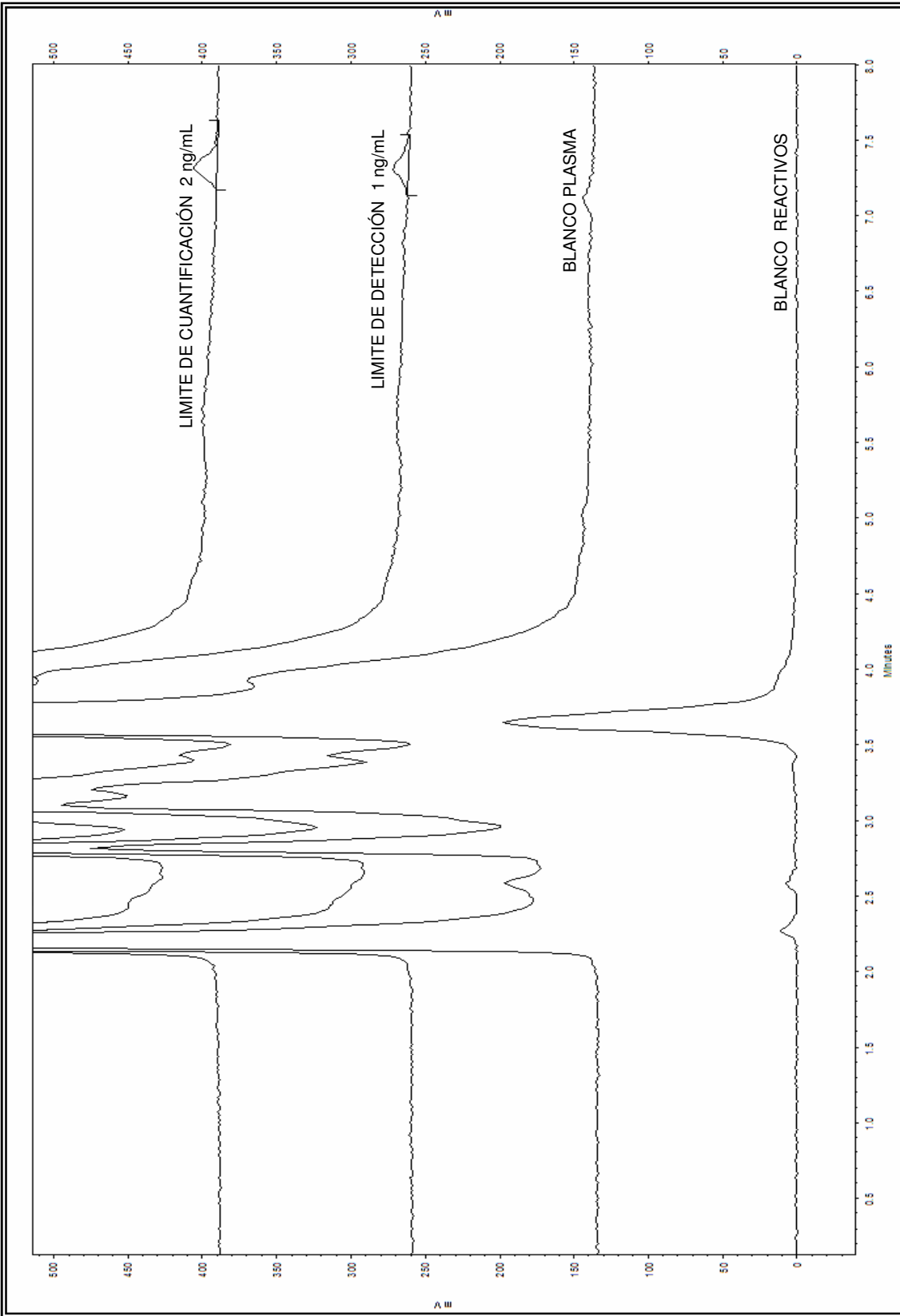


Fig. 9. Cromatograma que muestra el límite de detección y cuantificación

Selectividad

La selectividad del método fue determinada, analizando el blanco de plasma y muestras de plasma conteniendo los siguientes fármacos: ácido acetilsalicílico, paracetamol, cafeína, naproxeno y heparina. Se evaluó el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de Citalopram. El método mostró ser selectivo para los compuestos evaluados al no presentarse interferencias con el pico cromatográfico de Citalopram.

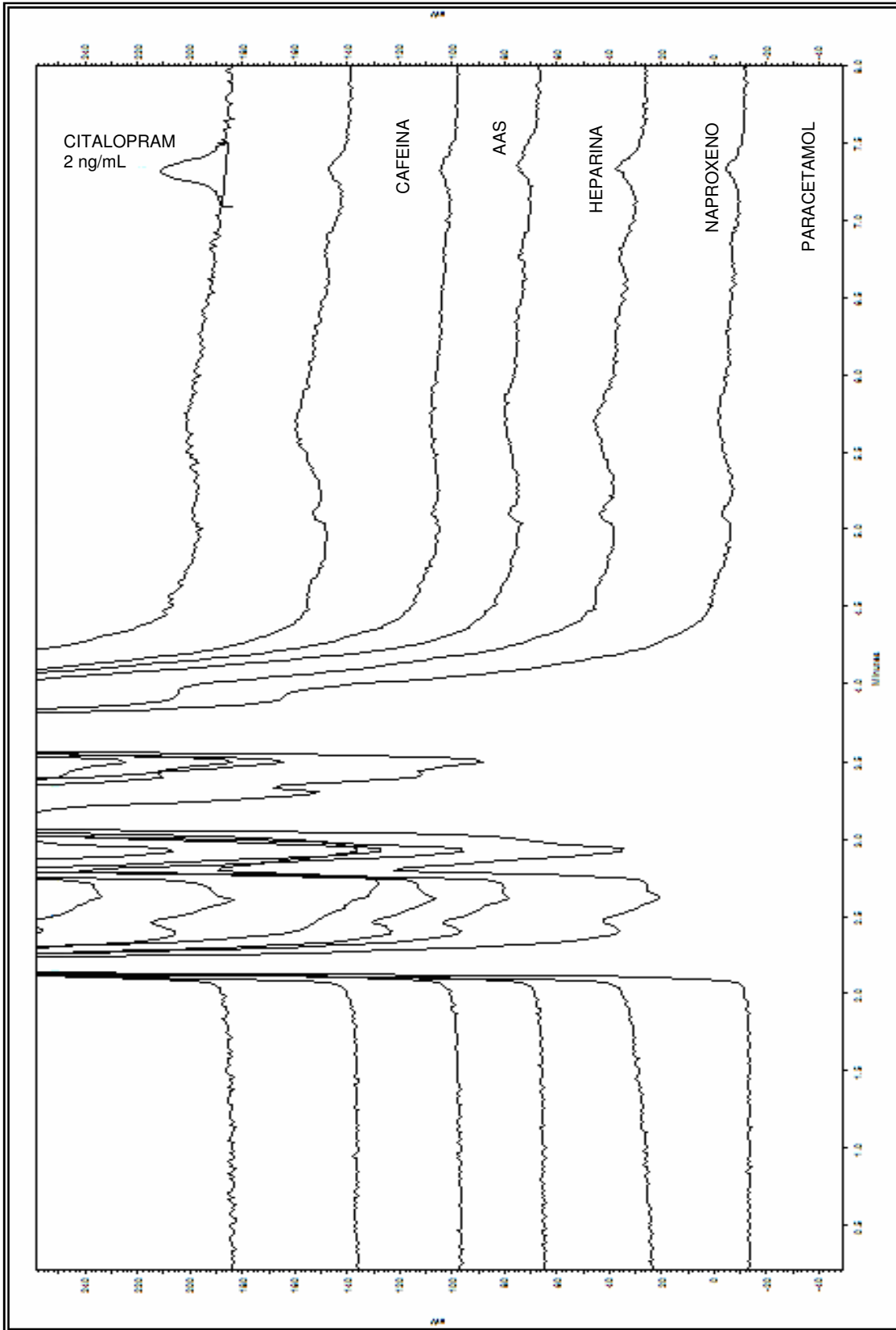


Fig. 10. Selectividad del método

Estabilidad

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

Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación en matriz biológica.

Se analizaron muestras control (6, 80 y 140 ng/mL) al final de cada uno de los tres ciclos de congelación-descongelación y sus concentraciones interpoladas se compararon contra aquellas de controles recientemente preparados; Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 13. Estabilidad de Citalopram en plasma en ciclos de congelación-descongelación.			
Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
MUESTRA	Control Bajo (6 ng/mL)	Control Medio (80 ng/mL)	Control Alto (140 ng/mL)
1	6.39	84.77	141.27
2	6.46	84.16	141.31
3	6.39	81.30	140.95
Promedio	6.41	83.41	141.18
D.E.	0.04	1.85	0.20
C.V. (%)	0.63	2.22	0.14
Concentraciones plasmáticas después del CICLO 3			
MUESTRA	Control Bajo (6 ng/mL)	Control Medio (80 ng/mL)	Control Alto (140 ng/mL)
1	6.13	82.28	141.61
2	5.95	80.28	132.50
3	5.73	82.57	140.99
Promedio	5.93	81.71	138.37
D.E.	0.20	1.25	5.09
C.V. (%)	3.34	1.53	3.68
Desv. Abs. (%)	7.48	2.04	1.99

Las muestras sometidas a los tres ciclos de congelación-descongelación cumplen con un C.V.% < 15% y una diferencia no mayor al 15% con respecto al valor de referencia (muestras recién preparadas). Las muestras plasmáticas con Citalopram son estables después de tres ciclos de congelación-descongelación a -70 °C.

Estabilidad a temperatura ambiente (21 °C) y refrigeración (3 °C) en matriz biológica.

Se analizaron dos series de muestras por triplicado: 6, 80 y 140 ng/mL de Citalopram para cada condición a las 48 horas posteriores a su preparación. Las concentraciones interpoladas se compararon contra las concentraciones obtenidas a partir de muestras control recién preparadas.

Las muestras almacenadas a temperatura ambiente y en refrigeración resultaron estables durante 48 horas, en ambos casos se presenta una desviación absoluta menor a 15% con respecto al valor de muestras control de calidad recién preparadas.

Tabla 14. Estabilidad a temperatura ambiente de Citalopram en plasma. (21 °C)			
Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (6 ng/mL)	Control Medio (80 ng/mL)	Control Alto (140 ng/mL)
1	5.67	76.93	131.64
2	6.26	84.86	143.12
3	5.27	79.04	142.08
Promedio	5.73	80.28	138.95
D.E.	0.50	4.11	6.35
C.V. (%)	8.73	5.12	4.57
Concentraciones plasmáticas a las 48 h			
Muestra	Control Bajo (6 ng/mL)	Control Medio (80 ng/mL)	Control Alto (140 ng/mL)
1	5.93	83.83	148.23
2	5.46	80.85	153.66
3	5.54	81.32	146.80
Promedio	5.64	82.00	149.56
D.E.	0.25	1.60	3.62
C.V. (%)	4.46	1.96	2.42
Desv. Abs. (%)	1.62	2.15	7.64

Tabla 15. Estabilidad de Citalopram en refrigeración (3 °C)			
Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (6 ng/mL)	Control Medio (80 ng/mL)	Control Alto (140 ng/mL)
1	5.67	76.93	131.64
2	6.26	84.86	143.12
3	5.27	79.04	142.08
Promedio	5.73	80.28	138.95
D.E	0.50	4.11	6.35
C.V. (%)	8.73	5.12	4.57
Concentraciones plasmáticas después de 48 h			
Muestra	Control Bajo (6 ng/mL)	Control Medio (80 ng/mL)	Control Alto (140 ng/mL)
1	6.26	80.76	136.34
2	5.54	80.89	136.95
3	5.87	78.75	144.09
Promedio	5.89	80.13	139.13
D.E	0.36	1.20	4.31
C.V. (%)	6.18	1.50	3.10
Desv. Abs. (%)	2.75	0.18	0.13

Estabilidad de la muestra procesada

Las muestras procesadas permanecieron en el automuestreador a 10°C y fueron inyectadas 48 horas después de su procesamiento. Los resultados fueron comparados con controles de reciente preparación.

Tabla 16. Estabilidad de muestras procesadas de Citalopram			
Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (6 ng/mL)	Control Medio (80 ng/mL)	Control Alto (140 ng/mL)
1	5.50	84.17	150.10
2	5.58	83.85	146.23
3	5.91	84.46	144.71
Promedio	5.67	84.16	147.01
D.E.	0.22	0.31	2.78
C.V. (%)	3.84	0.36	1.89
Concentraciones plasmáticas después de 48 h			
Muestra	Control Bajo (6 ng/mL)	Control Medio (80 ng/mL)	Control Alto (140 ng/mL)
1	5.64	96.653*	152.63
2	5.32	81.49	141.75
3	5.61	84.30	139.26
Promedio	5.52	82.90	144.55
D.E.	0.18	1.98	7.11
C.V. (%)	3.23	2.39	4.92
Desv. Abs. (%)	2.57	1.50	1.68

Las muestras fueron estables en solución para inyección por un periodo de 48 horas posteriores a su preparación.

Estabilidad a largo plazo

Después de permanecer un periodo de 78 días a una temperatura de -70°C , las muestras se procesaron de acuerdo al método de extracción y se inyectaron en el sistema cromatográfico. Los resultados obtenidos se compararon con los correspondientes a muestras recién preparadas.

Tabla 17. Estabilidad a largo plazo de Citalopram.			
Concentraciones muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (6 ng/mL)	Control Medio (80 ng/mL)	Control Alto (140 ng/mL)
1	5.74	81.56	143.44
2	6.31	72.78	158.37
3	5.46	79.07	141.81
Promedio	5.84	77.80	147.87
D.E.	0.43	4.52	9.13
C.V. (%)	7.40	5.81	6.17
Concentraciones plasmáticas en muestras a largo plazo (78 días)			
Muestra	Control Bajo (6 ng/mL)	Control Medio (80 ng/mL)	Control Alto (140 ng/mL)
1	5.75	92.28*	149.13
2	5.29	80.25	132.09
3	5.80	76.49	134.16
Promedio	5.61	78.37	138.46
D.E.	0.28	2.66	9.30
C.V. (%)	5.06	3.39	6.72
Desv. Abs. (%)	3.79	0.73	6.37

Las muestras almacenadas en refrigeración y analizadas 78 días después, fueron estables, se presenta una desviación absoluta menor a 15% con respecto al valor de muestras control de calidad recién preparadas.

Etapa clínica

Estadística descriptiva

Se calcularon los siguientes parámetros: media, desviación estándar (D.E.), error estándar (E.E.), mínimo (Min), mediana, máximo (Max.) y coeficiente de variación (CV%). de las variables demográficas edad, peso, talla e índice de masa corporal (IMC) de las voluntarias participantes en el estudio. Los datos demográficos por individuo se encuentran en el **Anexo I**

Tabla 18. Estadística descriptiva de las variables demográficas.								
Variable	N	Promedio	D.E.	E.E.	Min	Mediana	Max	C.V.%
Edad (años)	12	26.250	5.101	1.473	19	27	35	19.43
Peso (kg)	12	58.442	5.619	1.622	49.3	61.45	69.5	9.61
Talla (cm)	12	158.166	5.556	1.604	150	152	171	3.51
IMC (kg/m²)	12	23.3766	2.139	0.618	20	26.595	26.61	9.15

Estadística de los datos de concentración de Citalopram en plasma (ng/mL) con respecto al tiempo (h)

Se muestra la estadística descriptiva de los datos obtenidos de concentración plasmática de Citalopram con respecto al tiempo en horas. Los datos individuales se encuentran en el **Anexo II**.

Tabla 19. Estadística descriptiva de concentración plasmática de Citalopram con respecto al tiempo.								
Tiempo nominal h	Tiempo (h)	Promedio	D.E.	E.E.	Min.	Mediana	Máx.	C.V.%
0	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.25	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
0.5	0.5	1.99	4.52	1.31	0.00	0.00	15.82	227.00
0.75	0.75	10.94	16.07	4.64	0.00	4.52	53.13	146.88
1	1	25.73	27.03	7.80	2.25	16.23	91.14	105.03
1.5	1.5	42.57	25.45	7.35	8.44	35.68	84.44	59.78
2	2	52.56	17.73	5.12	25.56	50.40	77.66	33.74
2.5	2.5	50.97	14.32	4.13	24.94	52.03	72.29	28.09
3	3	51.33	9.09	2.62	34.07	52.49	64.10	17.71
3.5	3.5	52.00	6.42	1.85	42.99	51.37	65.62	12.35
4	4	49.02	8.02	2.31	32.27	49.74	63.47	16.36
4.5	4.5	50.50	7.88	2.27	39.31	50.72	67.40	15.60
5	5	49.26	6.50	1.88	41.60	47.42	63.68	13.20
6	6	44.55	4.96	1.43	38.74	44.04	53.04	11.14
7	7	40.42	2.81	0.81	37.30	39.84	46.14	6.96
8	8	39.95	3.50	1.01	35.15	39.28	46.40	8.77
10	10	36.22	4.74	1.37	29.43	34.09	45.44	13.09
12	12	33.16	4.65	1.34	27.32	33.11	41.99	14.02
24	22	24.86	4.28	1.24	20.98	22.56	33.21	17.22
48	46.33	14.87	2.83	0.82	11.37	13.90	20.32	19.05
72	70.08	10.13	2.64	0.79	6.65	9.71	14.05	26.02
96	94.08	6.80	1.74	0.52	4.15	6.87	9.46	25.52

Perfiles farmacocinéticos

A continuación se presentan los gráficos, de concentración en plasma, de Citalopram con respecto al tiempo, tanto en escala normal como semilogarítmica. En el **Anexo III** se presentan en ambas escalas los perfiles farmacocinéticos de cada individuo.

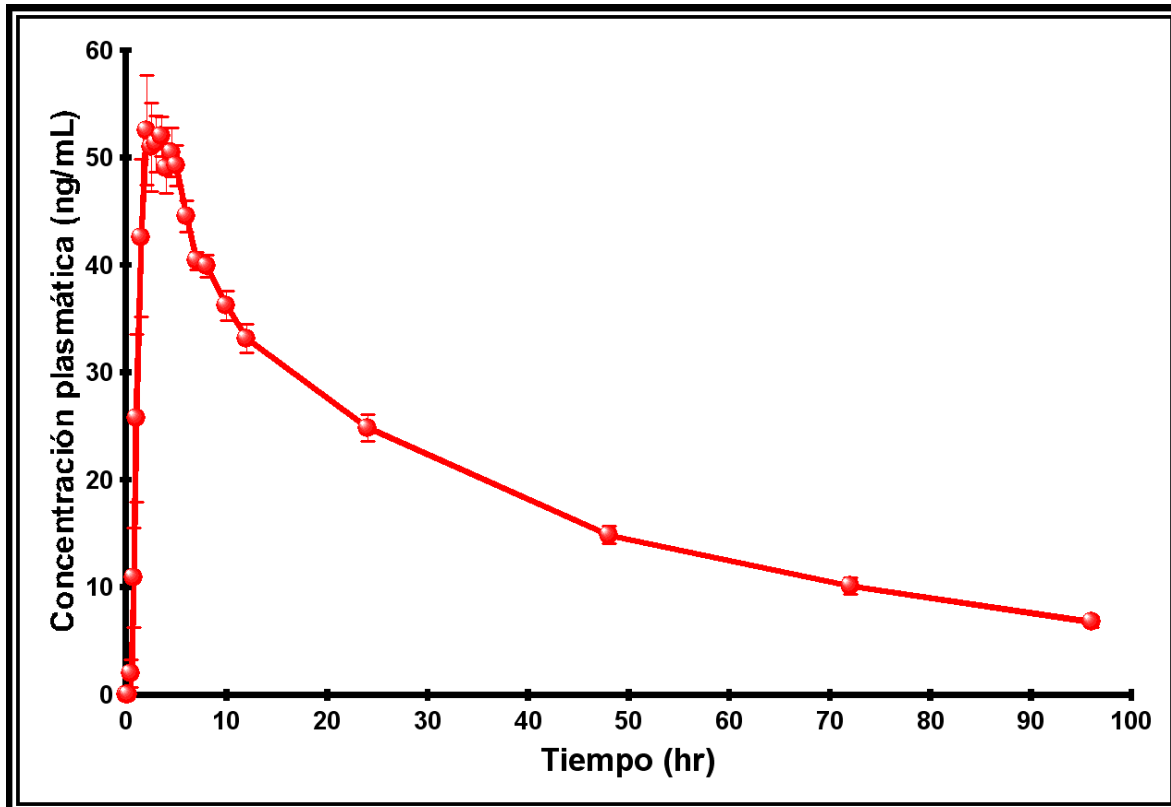


Figura 11. Perfil farmacocinético de Citalopram (promedio) + error estándar. Escala normal.

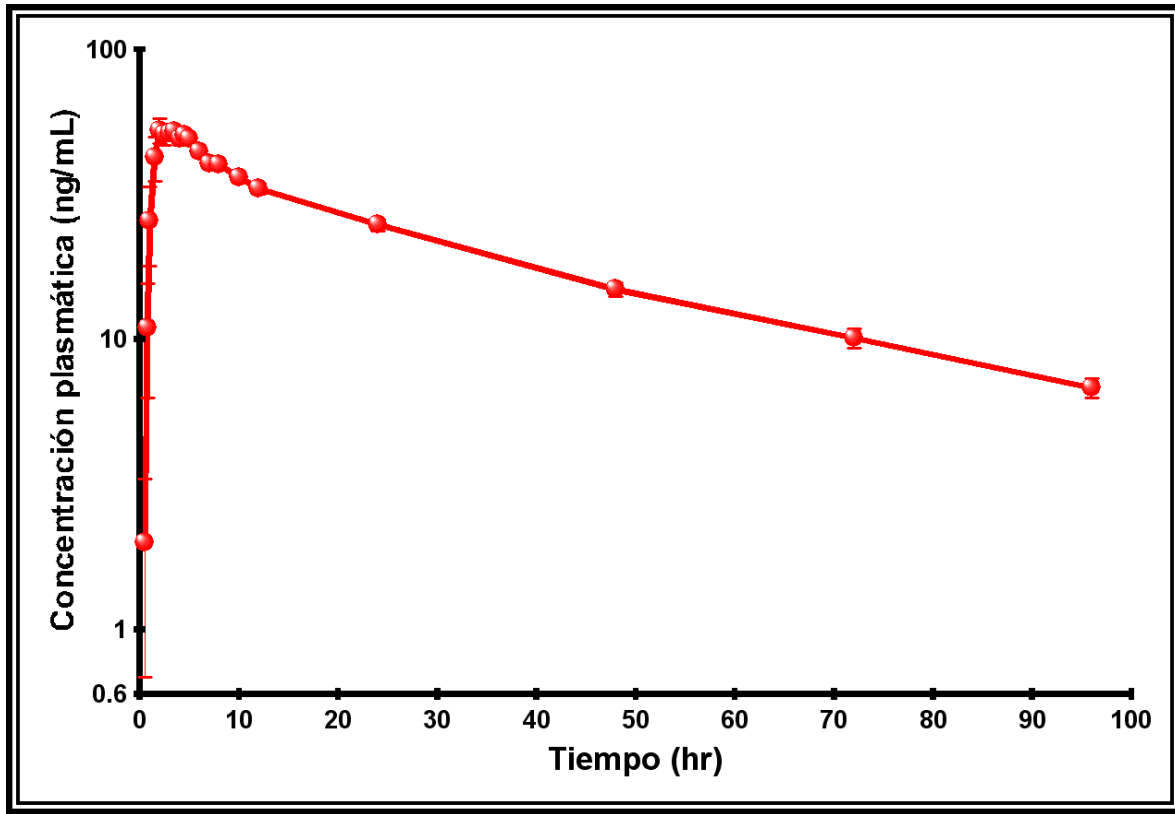


Figura 12 Perfil farmacocinético de Citalopram (promedio) + error estándar. Escala semilogarítmica.

Estadística de los parámetros farmacocinéticos.

.Los parámetros farmacocinéticos se determinaron a través de una técnica modelo independiente (modelos no compartimentales). En la tabla 19 se presenta la estadística descriptiva de los datos obtenidos de los voluntarios. En el **Anexo III** se presentan de manera individual los parámetros farmacocinéticos.

Tabla 20. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos de Citalopram								
Variable	N	Promedio	D.E.	E.E.	Min	Mediana	Max	CV%
Tmax	12	2.67	1.09	0.32	1.00	2.75	4.50	41.03
Cmax	12	62.12	14.78	4.27	45.84	55.42	91.14	23.79
	12	1755.75	279.71	80.74	1435.63	1681.85	2240.99	15.93
ABC 0-inf	12	2150.98	379.40	109.52	1707.62	2013.11	2801.08	17.64
Ke	12	0.0198	0.0031	0.0003	0.0157	0.0193	0.0247	17.60
T 1/2	12	38.31	7.12	2.05	30.34	37.86	51.41	18.58
TMR 0-inf	12	52.66	8.52	2.46	40.25	52.90	64.88	16.18

Estadística comparativa entre tres poblaciones.

Comparando la t_0 con la t_{tablas} para cada uno de los parámetros farmacocinéticos se puede determinar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre las poblaciones.

Tabla 21. Parámetros farmacocinéticos de tres poblaciones (dosis única de 40 mg).^{17,18}

Variable	MÉXICO (N=12)		ESPAÑA (N = 24)		REPÚBLICA CHECA (N=26)	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
Tmax (h)	2.8	1.2	3	2	2.1	0.6
Cmax (ng/mL)	62.1	14.8	35.6	7.9	50.3	13.6
ABC0-t (h*ng/mL)	1775.9	289.3	1199.8	266.7	649.5	165.6
ABC0-inf (h*ng/mL)	2055.5	379.5	1321.4	307.8	1246.4	359.7
Constante de eliminación Ke (1/h)	0.0198	0.0031	-	-	0.0370	0.0081
Vida Media de eliminación (h)	35.8	5.5	-	-	19.6	4.2

Tabla 22. Prueba de t entre las tres poblaciones.

Variable	t_0 República Checa	t_0 España	t tablas
Tmax (h)	1.944	5.811	2.031
Cmax (ng/mL)	2.346	0.377	2.031
ABC0-t (h*ng/mL)	12.571	5.779	2.031
ABC0-inf (h*ng/mL)	6.209	5.812	2.031
Constante de eliminación Ke (1/h)	9.550	-	2.031
Vida Media de eliminación (h)	9.101	-	2.031

* $\alpha = 0.05$, 95% de confianza.

En el caso de el T max (h) para las poblaciones mexicana y checa, no hay una diferencia significativa entre los datos obtenidos. Al comparar la población mexicana con la población española, t calculada es mayor que la t tablas, con lo que se concluye que la diferencia entre ambas es estadísticamente significativa.

En la comparación realizada entre la población mexicana y la proveniente de la República checa, para el resto de los parámetros farmacocinéticos, la t_0 calculada es mayor que la t_{tablas} encontrada para 36 grados de libertad (en tablas el valor más próximo es 35), por lo que se deduce que con un 95% de confianza, si hay diferencia significativa entre las dos poblaciones.

Para la población española, se observa que únicamente la t calculada para el parámetro $C_{\text{máx}}$ es menor a la t tablas, lo que indica que la diferencia existente entre los mexicanos y los españoles no es significativa desde el punto de vista estadístico. En los parámetros $T_{\text{máx}}$, ABC 0-t y ABC 0-inf, si hay una diferencia significativa.

Este tipo de pruebas estadísticas nos permiten en un momento dado determinar la dosis a administrar para una población en específico y evitar que se presenten efectos secundarios o reacciones adversas de manera exacerbada.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico para cuantificar Citalopram en plasma por CLAR, el cual fue validado y resultó lineal en un intervalo de concentraciones de 2.00 a 160.00 ng/mL. Así mismo fue preciso, selectivo, exacto en las condiciones experimentales con las cuales se trabajó. El método de extracción desarrollado presentó un menor tiempo de corrida con respecto a los reportados, así mismo la fase móvil utilizada resultó ser mucho más fácil de preparar que las reportadas.

El fármaco fue estable a las diferentes condiciones experimentales y de temperatura evaluadas. Por todo lo anterior, el método cumple con los parámetros establecidos en la norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-1998 para la validación de métodos analíticos y es confiable para su utilización tanto en estudios de biodisponibilidad como para la cuantificación de Citalopram en plasma.

Se determinaron los siguientes parámetros farmacocinéticos a partir de los datos provenientes de las muestras de las voluntarias: $T_{m\acute{a}x.}$, $C_{m\acute{a}x.}$, ABC_{0-t} , ABC_{0-inf} , k_e , $t_{1/2}$. El $C_{m\acute{a}x.}$ encontrado fue de 62.1 ng/mL y el $t_{m\acute{a}x.}$ de 2.75 h.

Se realizó una prueba de t para comparar los parámetros farmacocinéticos de tres poblaciones: voluntarios españoles, mexicanos y de la república checa. En todos los casos, se administró la misma dosis, obteniéndose para la población mexicana $C_{m\acute{a}x.}$: 62.1 ng/mL y $t_{m\acute{a}x.}$ de 2.75 h; para la población de la república checa: 50.3 ng/mL y $T_{m\acute{a}x.}$ de 2.1 h. Al comparar la población española con la mexicana, se observan diferencias en cuanto al $T_{m\acute{a}x.}$ de 35.6 h, bastante menor al reportado para la población mexicana, siendo el único parámetro que no presenta una diferencia estadísticamente significativa. El $C_{m\acute{a}x.}$ fue de 7.9 ng/mL, alrededor de la mitad del valor presentado por la población mexicana. A pesar de que para ambas poblaciones los valores de ABC_{0-t} y ABC_{0-inf} son muy parecidos, al realizar la prueba se indica que si hay una diferencia desde el punto de vista estadístico. Por medio de esta prueba se pudo observar que si hay diferencias significativas entre estas poblaciones, lo que puede ayudar a determinar la dosis apropiada para una población en especial.

ANEXOS**ANEXO I Datos demográficos de los voluntarios. (Mujeres) participantes en el estudio.**

No. Voluntaria	Edad (años)	Peso (kg)	Talla (cm)	IMC (kg/m ²)
1	26.0	62.0	157.0	25.2
2	28.0	59.5	158.0	23.8
3	21.0	61.0	167.0	21.9
4	35.0	63.1	154.0	26.6
5	21.0	51.5	157.0	20.9
6	31.0	57.0	156.0	23.4
7	27.0	52.0	157.0	21.1
8	23.0	69.5	171.0	23.8
9	22.0	56.6	157.0	23.0
10	32.0	60.0	157.0	24.3
11	30.0	49.3	157.0	20.0
12	19.0	59.8	150.0	26.6

ANEXO II Datos de concentración para cada voluntaria a los diferentes tiempos de muestreo.

VOLUNTARIA 1		VOLUNTARIA 2	
Tiempo Nominal (h)	Concentración (ng/mL)	Tiempo Nominal (h)	Concentración (ng/mL)
0	0.00	0	0.000
0.25	0.00	0.25	0.000
0.5	0.00	0.5	0.000
0.75	0.00	0.75	2.534
1	5.34	1	13.662
1.5	26.72	1.5	29.540
2	42.29	2	44.526
2.5	45.72	2.5	39.479
3	50.23	3	47.634
3.5	48.74	3.5	42.994
4	52.99	4	32.270
4.5	50.94	4.5	41.200
5	46.64	5	43.763
6	39.35	6	41.945
7	38.34	7	37.841
8	39.09	8	39.459
10	33.28	10	38.788
12	27.69	12	34.729
24	22.63	24	30.840
48	16.04	48	17.194
72	10.89	72	14.049
96	6.87	96	9.459

VOLUNTARIA 3		VOLUNTARIA 4	
Tiempo Nominal (h)	Concentración (ng/mL)	Tiempo Nominal (h)	Concentración (ng/mL)
0	0.000	0	0.000
0.25	0.000	0.25	0.000
0.5	2.253	0.5	0.000
0.75	13.217	0.75	0.000
1	38.455	1	2.962
1.5	75.304	1.5	14.353
2	59.948	2	32.226
2.5	57.074	2.5	24.935
3	56.710	3	34.066
3.5	55.330	3.5	48.143
4	50.015	4	43.970
4.5	47.611	4.5	43.989
5	47.885	5	41.595
6	44.013	6	39.618
7	39.432	7	37.296
8	40.365	8	37.241
10	34.020	10	34.152
12	33.410	12	29.615
24	21.363	24	21.787
48	11.371	48	13.299
72	6.645	72	No se tomo
96	4.155	96	4.152

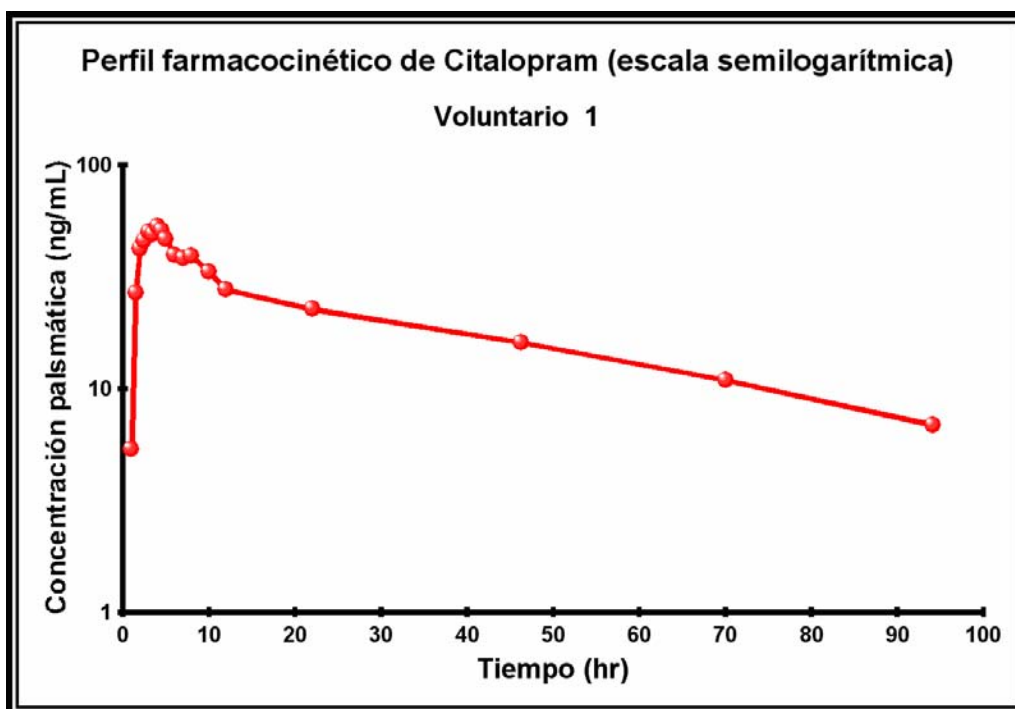
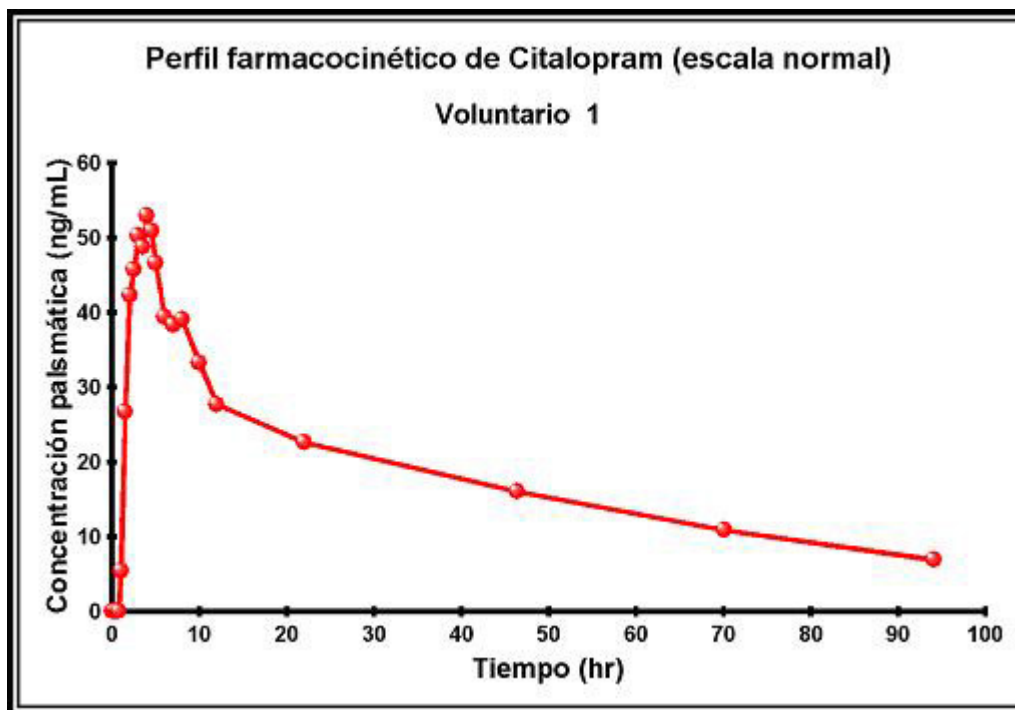
VOLUNTARIA 5		VOLUNTARIA 6	
Tiempo Nominal (h)	Concentración (ng/mL)	Tiempo Nominal (h)	Concentración (ng/mL)
0	0.000	0	0.000
0.25	0.000	0.25	0.000
0.5	0.000	0.5	0.000
0.75	8.602	0.75	2.865
1	20.107	1	12.005
1.5	51.375	1.5	28.698
2	70.951	2	39.743
2.5	72.293	2.5	36.480
3	64.104	3	38.796
3.5	65.619	3.5	45.837
4	63.471	4	41.313
4.5	67.399	4.5	39.314
5	63.683	5	44.167
6	53.039	6	38.738
7	44.435	7	38.448
8	46.399	8	43.507
10	41.401	10	37.338
12	41.989	12	35.051
24	29.709	24	27.677
48	20.321	48	18.359
72	12.798	72	12.789
96	8.107	96	8.052

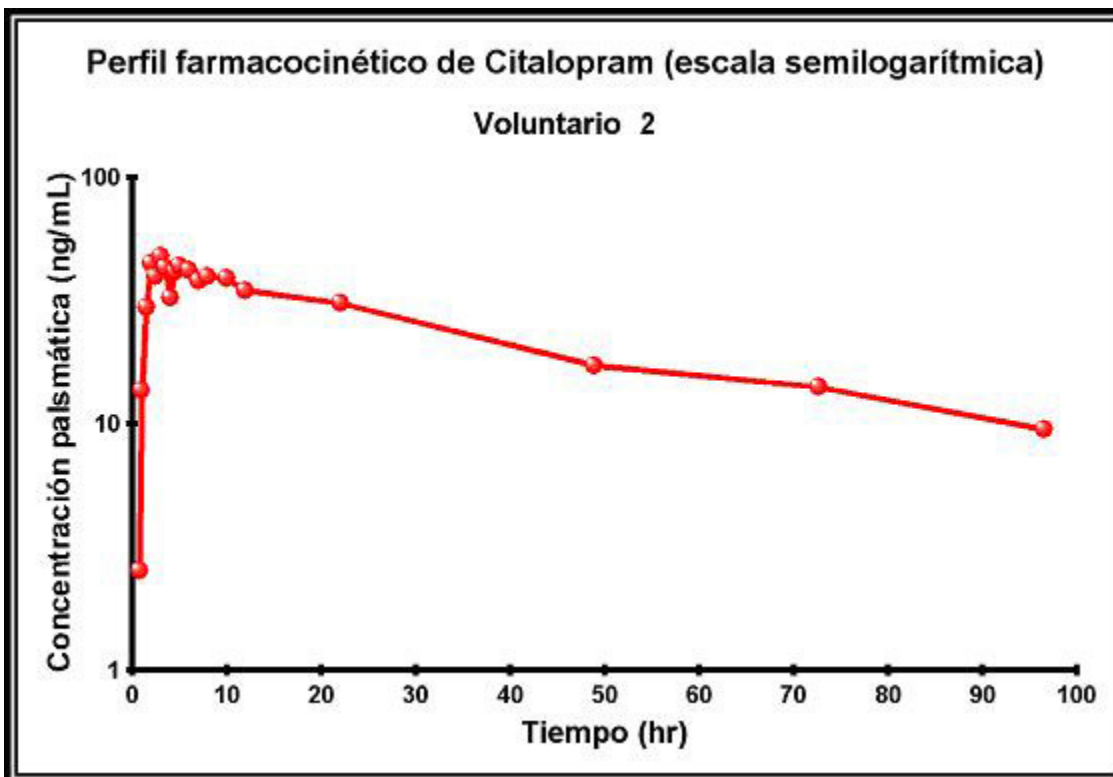
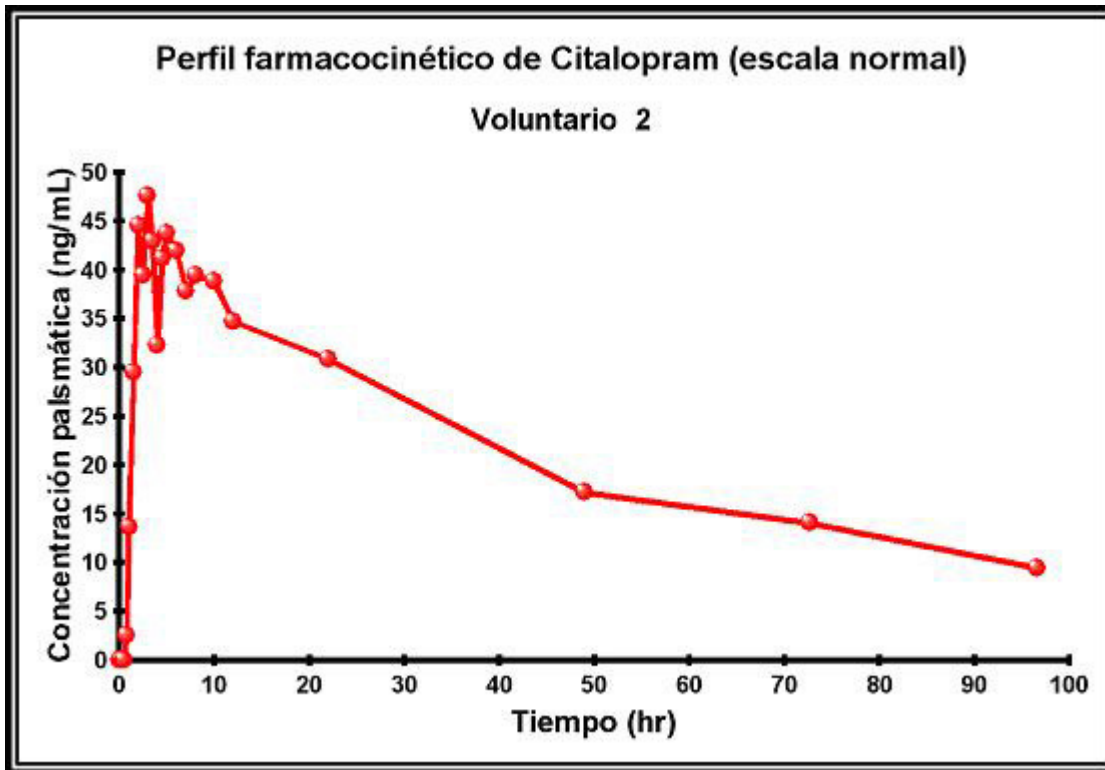
VOLUNTARIA 7		VOLUNTARIA 8	
Tiempo Nominal (h)	Concentración (ng/mL)	Tiempo Nominal (h)	Concentración (ng/mL)
0	0.000	0	0.000
0.25	0.000	0.25	0.000
0.5	0.000	0.5	0.000
0.75	9.329	0.75	3.563
1	34.127	1	7.997
1.5	44.444	1.5	26.125
2	68.815	2	38.303
2.5	61.364	2.5	48.588
3	59.475	3	52.777
3.5	61.412	3.5	52.139
4	58.859	4	51.830
4.5	59.078	4.5	50.497
5	55.756	5	47.217
6	52.887	6	44.063
7	46.138	7	41.301
8	44.914	8	35.861
10	45.441	10	29.428
12	41.061	12	27.320
24	33.213	24	20.984
48	16.900	48	12.253
72	12.561	72	8.779
96	8.590	96	6.432

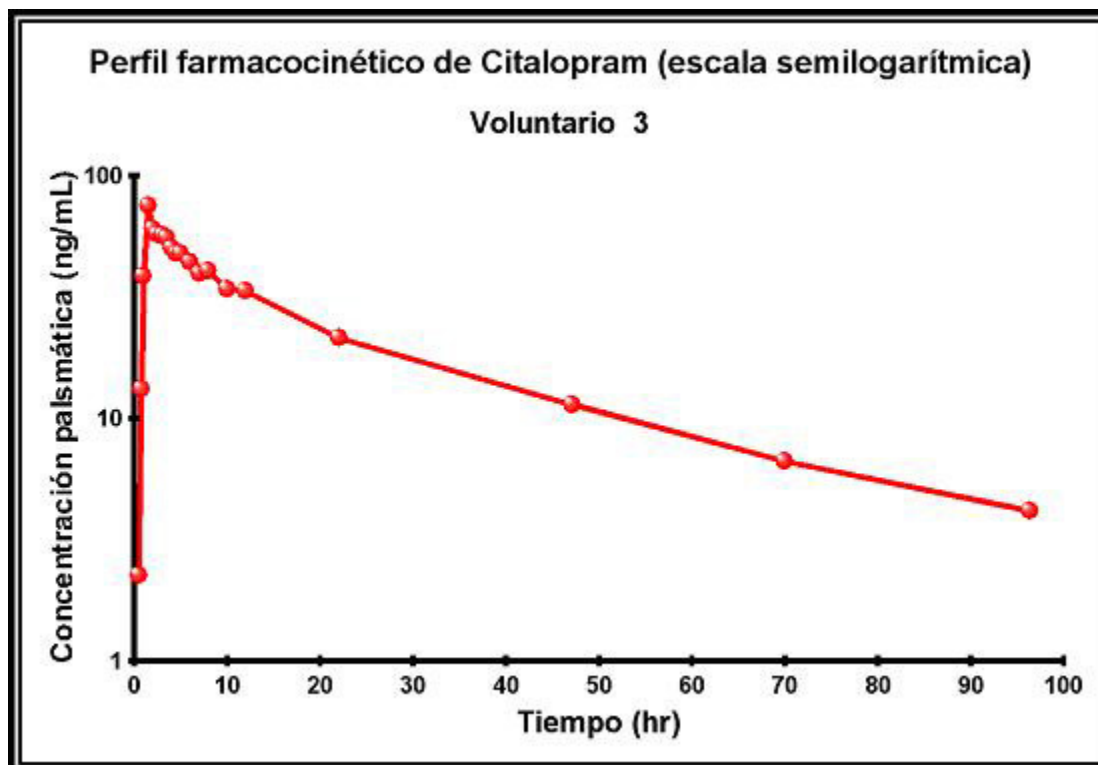
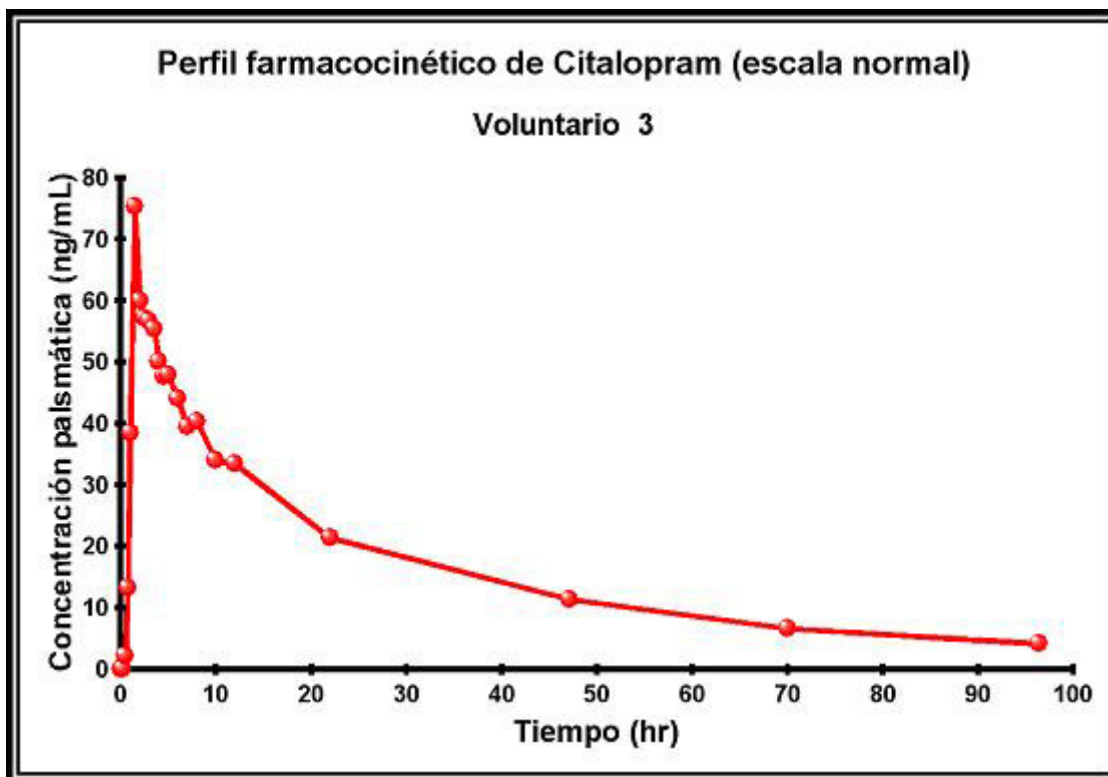
VOLUNTARIA 9		VOLUNTARIA 10	
Tiempo Nominal (h)	Concentración (ng/mL)	Tiempo Nominal (h)	Concentración (ng/mL)
0	0.000	0	0.000
0.25	0.000	0.25	0.000
0.5	15.822	0.5	0.000
0.75	53.127	0.75	0.000
1	91.144	1	2.248
1.5	84.441	1.5	8.438
2	77.655	2	25.560
2.5	67.801	2.5	38.998
3	60.495	3	43.097
3.5	51.659	3.5	47.483
4	49.463	4	47.360
4.5	54.937	4.5	54.565
5	55.396	5	53.508
6	49.525	6	45.526
7	42.940	7	40.246
8	40.933	8	35.150
10	41.845	10	33.323
12	30.450	12	30.425
24	22.487	24	22.315
48	13.932	48	13.862
72	6.867	72	8.884
96	5.411	96	6.291

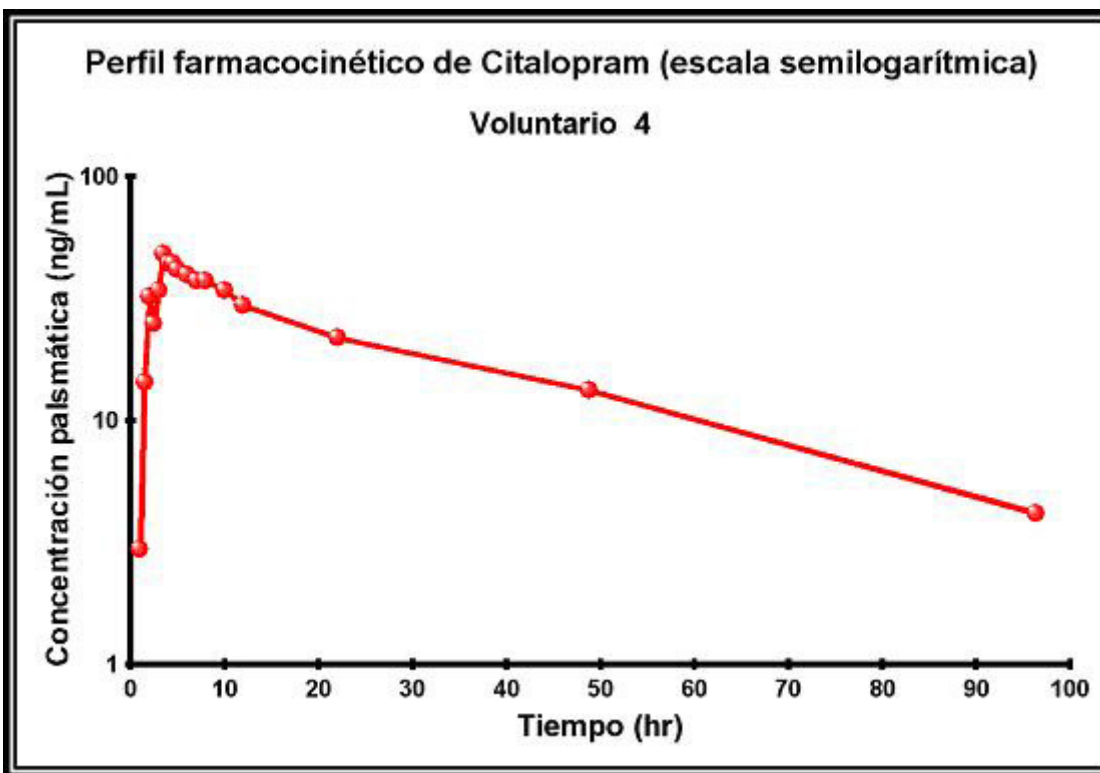
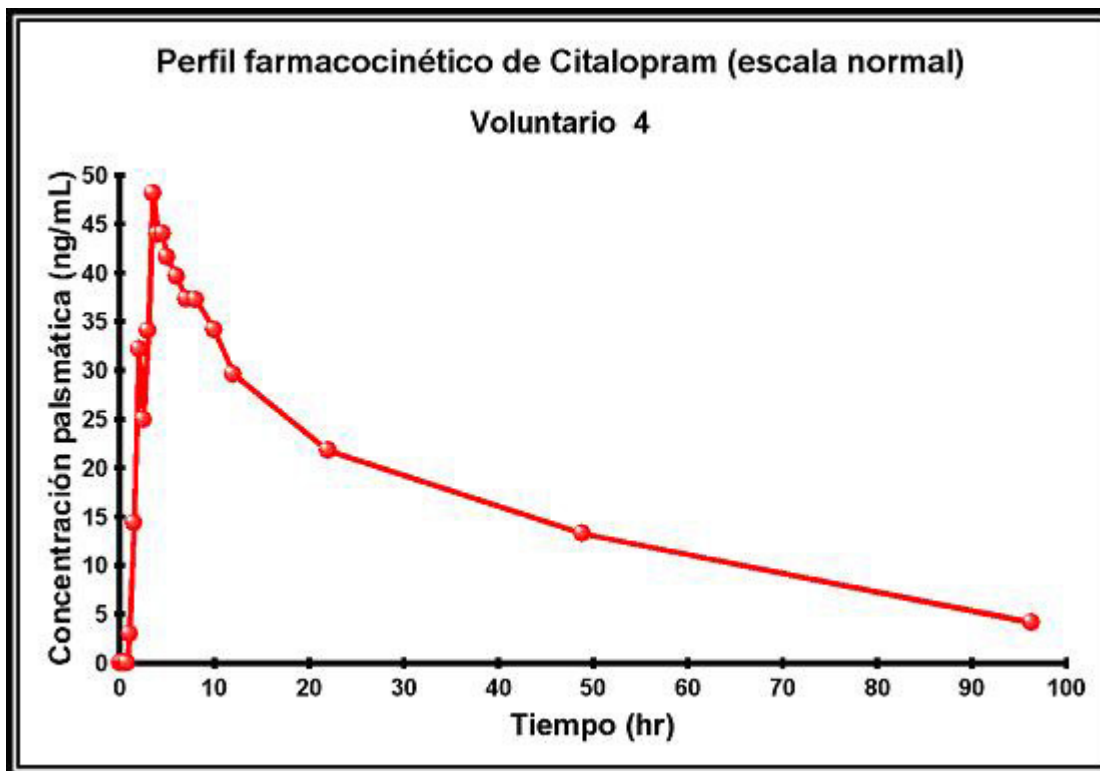
VOLUNTARIA 11		VOLUNTARIA 12	
Tiempo Nominal (h)	Concentración (ng/mL)	Tiempo Nominal (h)	Concentración (ng/mL)
0	0.000	0	0.000
0.25	0.000	0.25	0.000
0.5	3.352	0.5	2.491
0.75	32.550	0.75	5.471
1	61.917	1	18.802
1.5	79.616	1.5	41.829
2	74.432	2	56.270
2.5	63.438	2.5	55.474
3	56.371	3	52.196
3.5	53.538	3.5	51.074
4	50.319	4	46.398
4.5	50.958	4.5	45.526
5	47.619	5	43.914
6	44.702	6	41.171
7	40.485	7	38.085
8	37.569	8	38.847
10	32.705	10	32.872
12	33.154	12	33.058
24	23.412	24	21.919
48	12.894	48	12.019
72	7.466	72	9.712
96	7.310	96	No se tomo

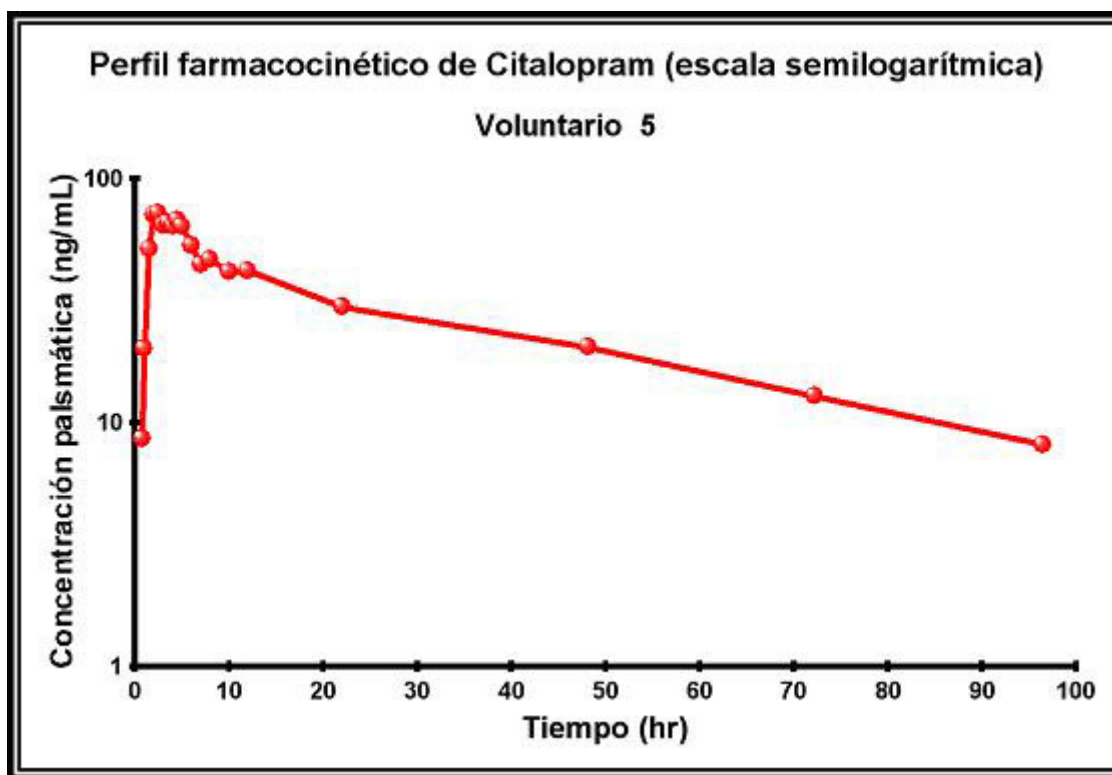
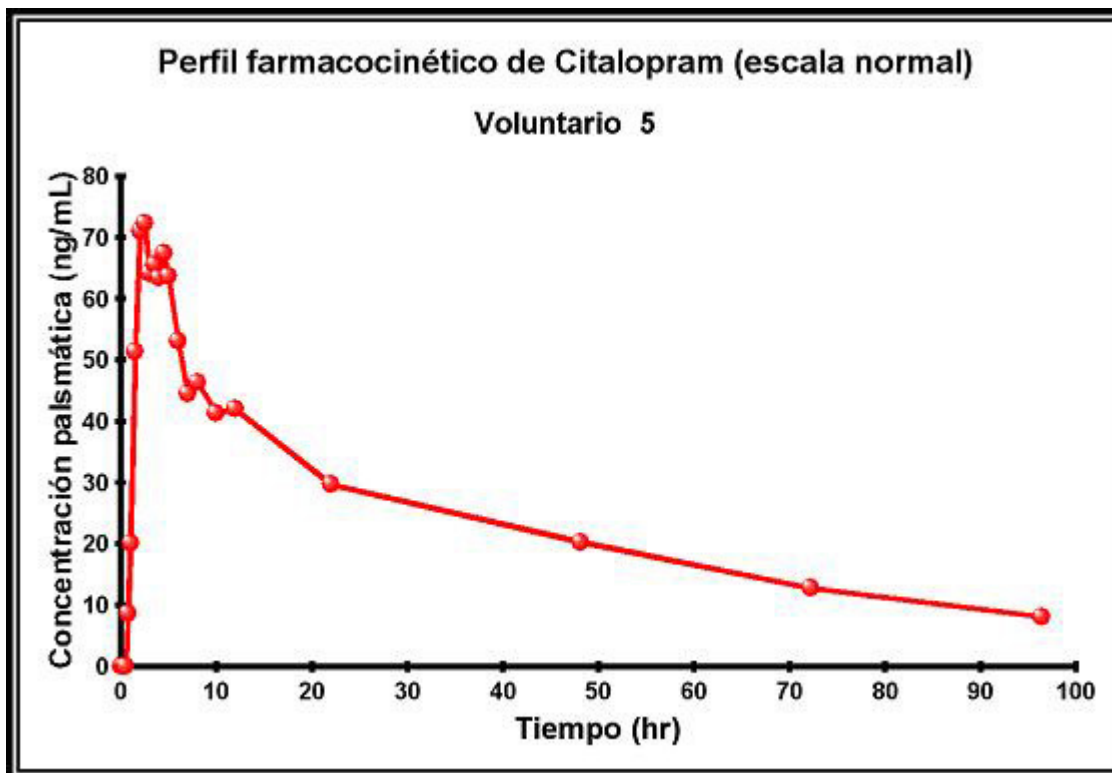
ANEXO III Perfiles farmacocinéticos de cada voluntaria, en escala normal y semilogarítmica.

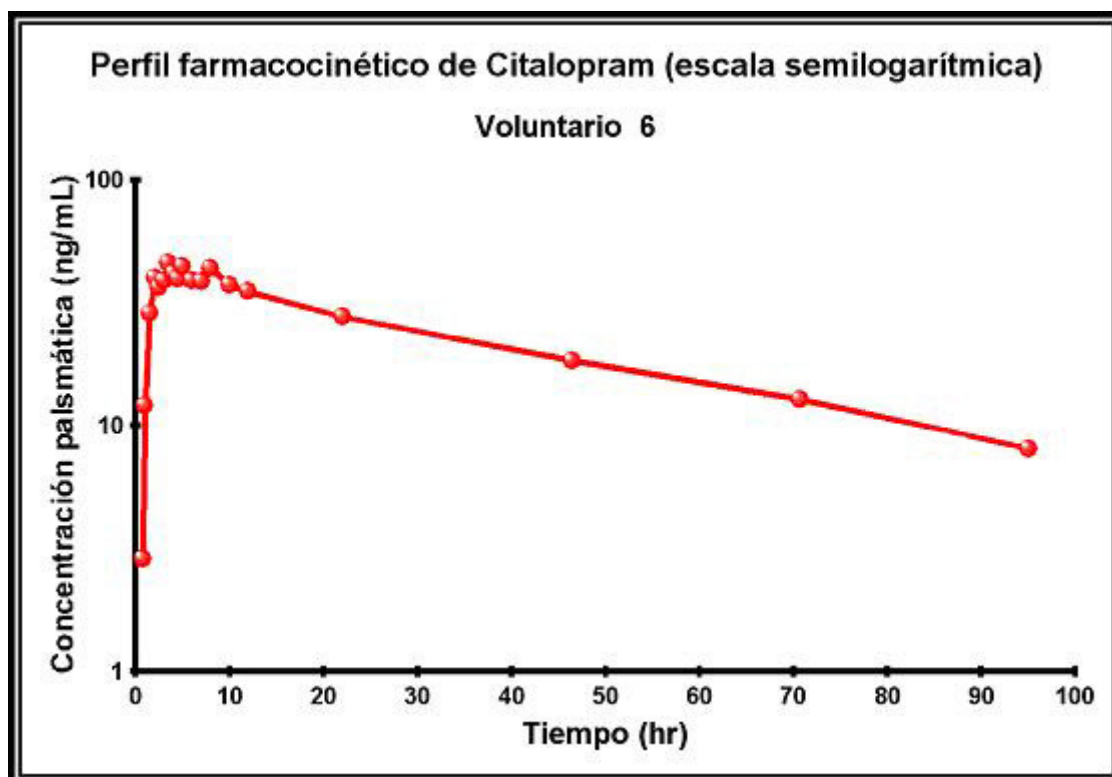
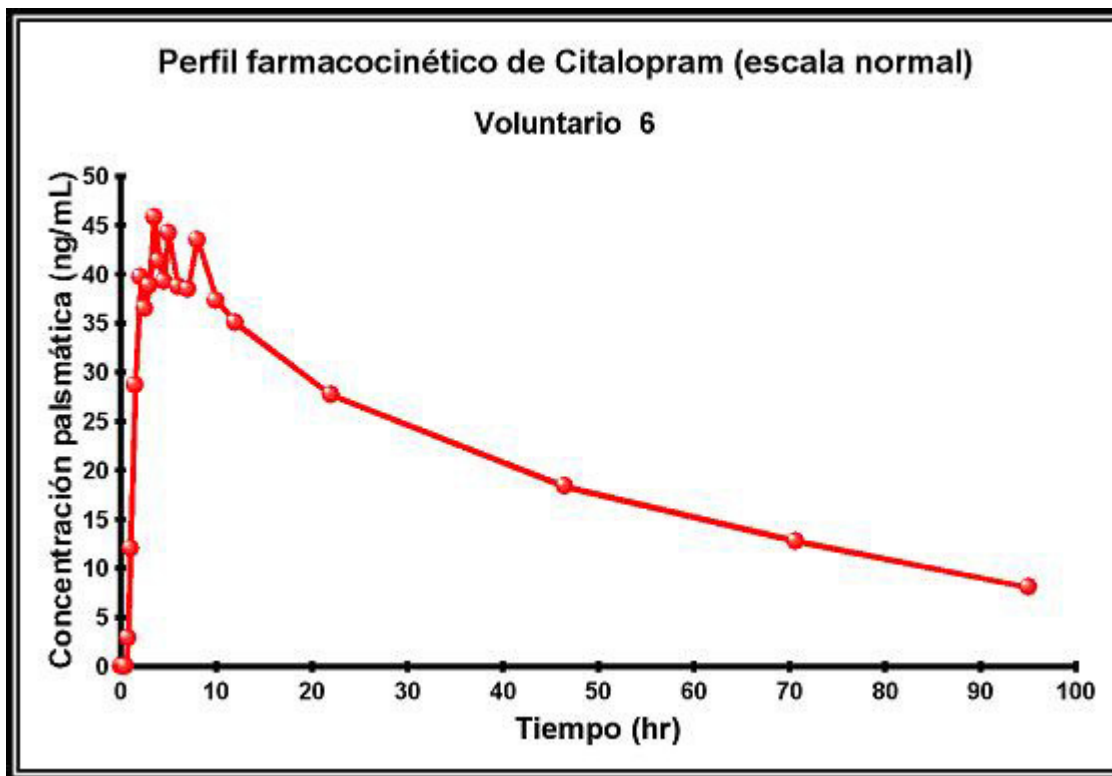


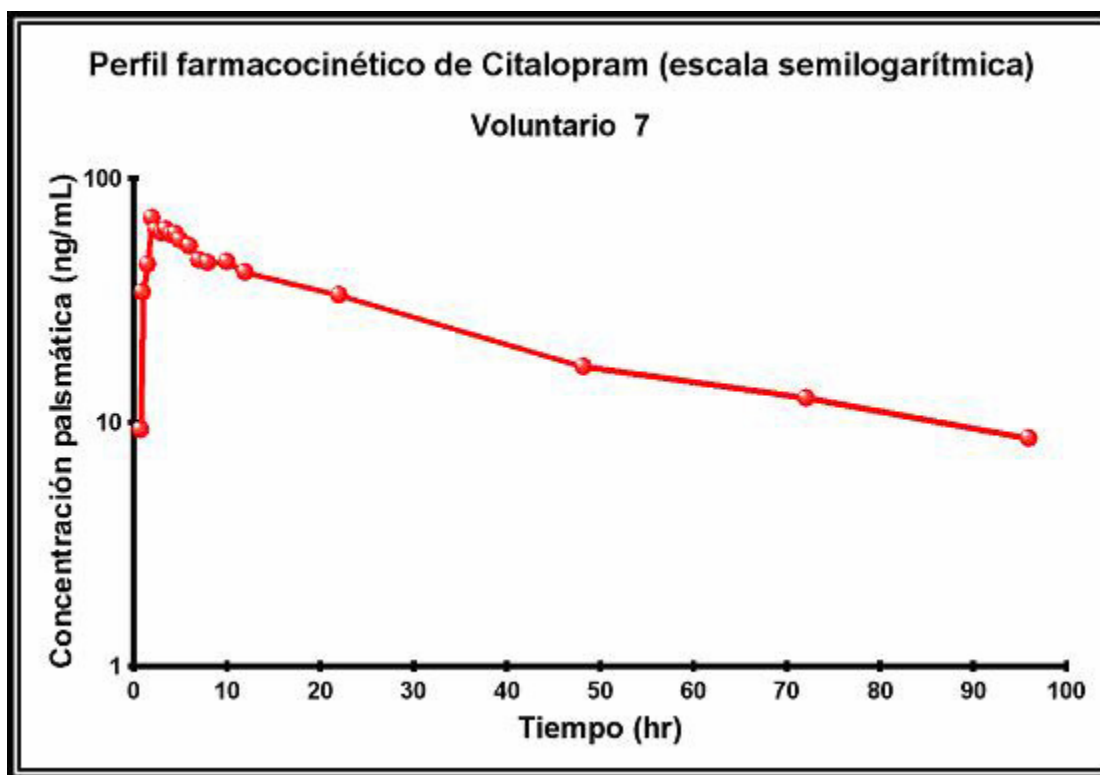
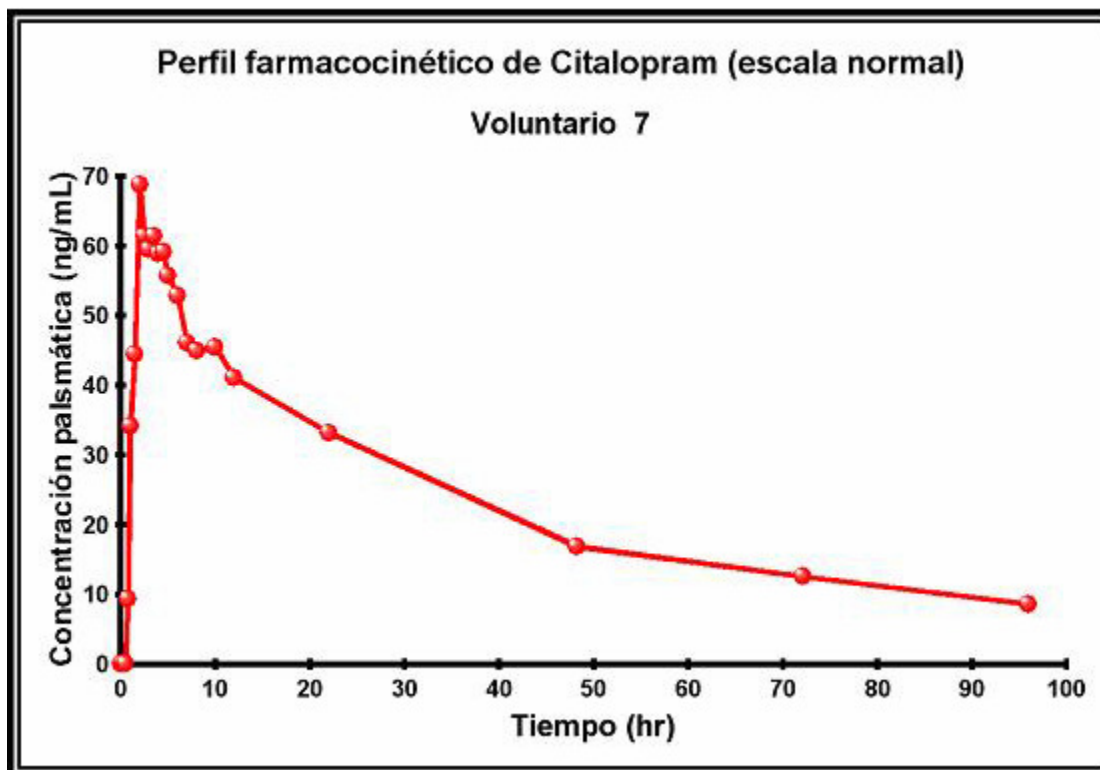


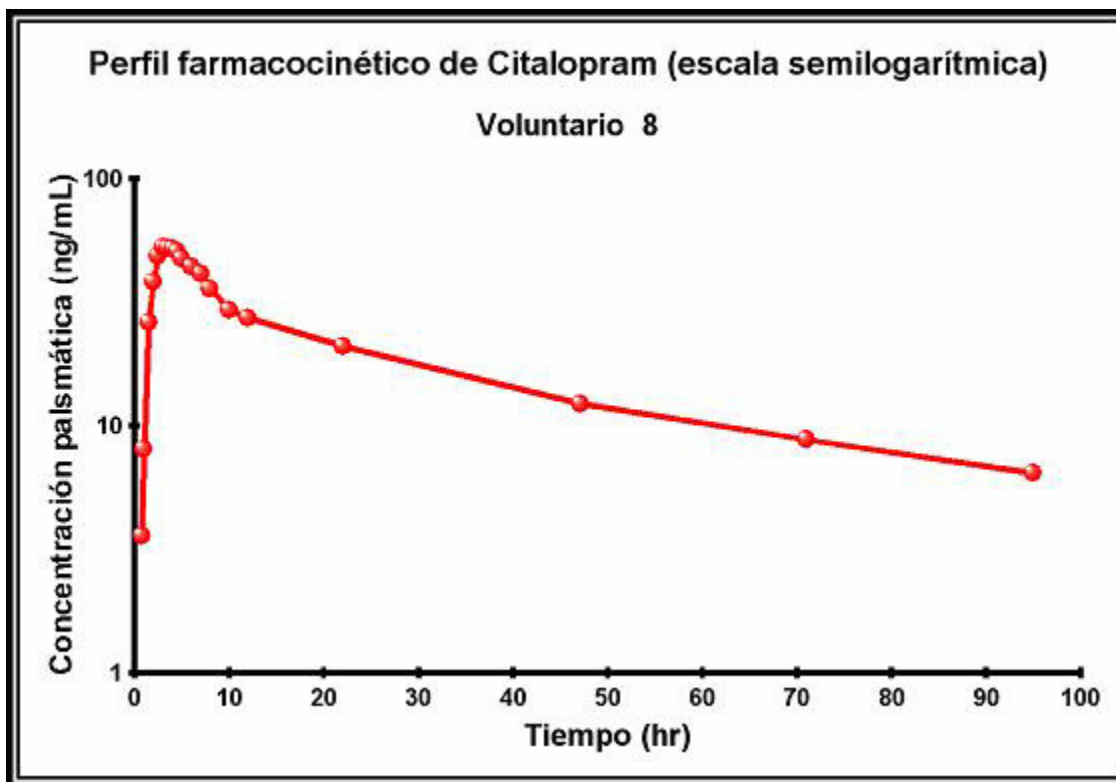
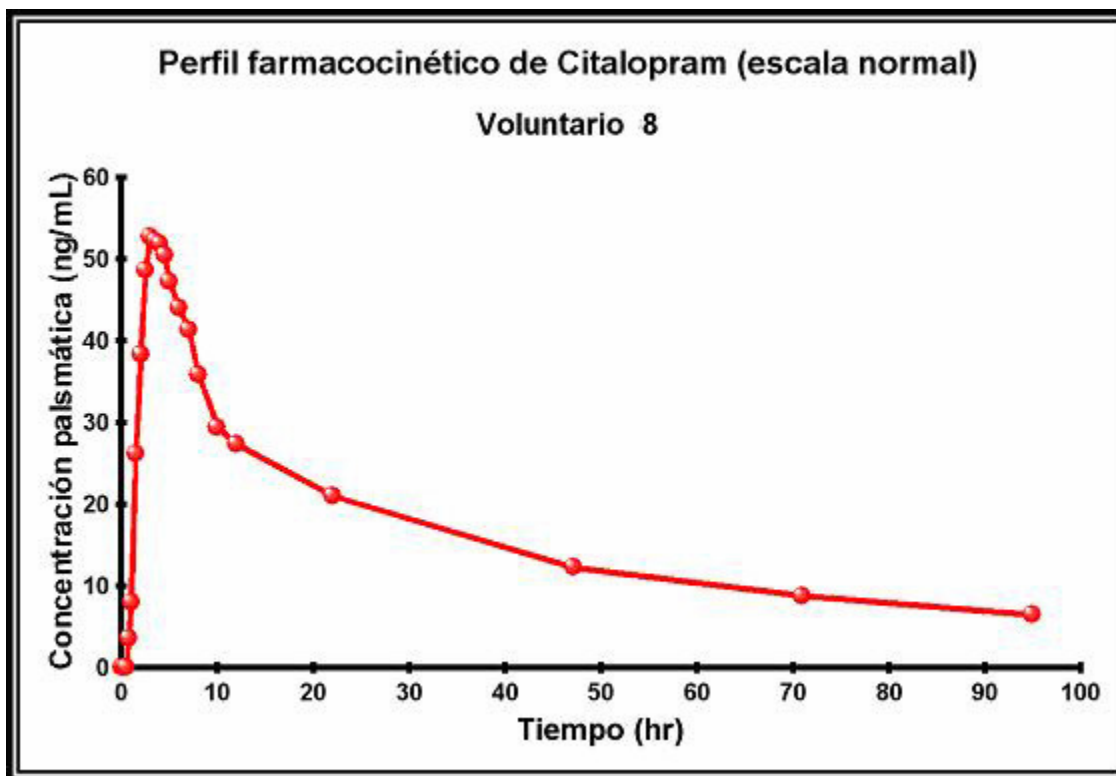


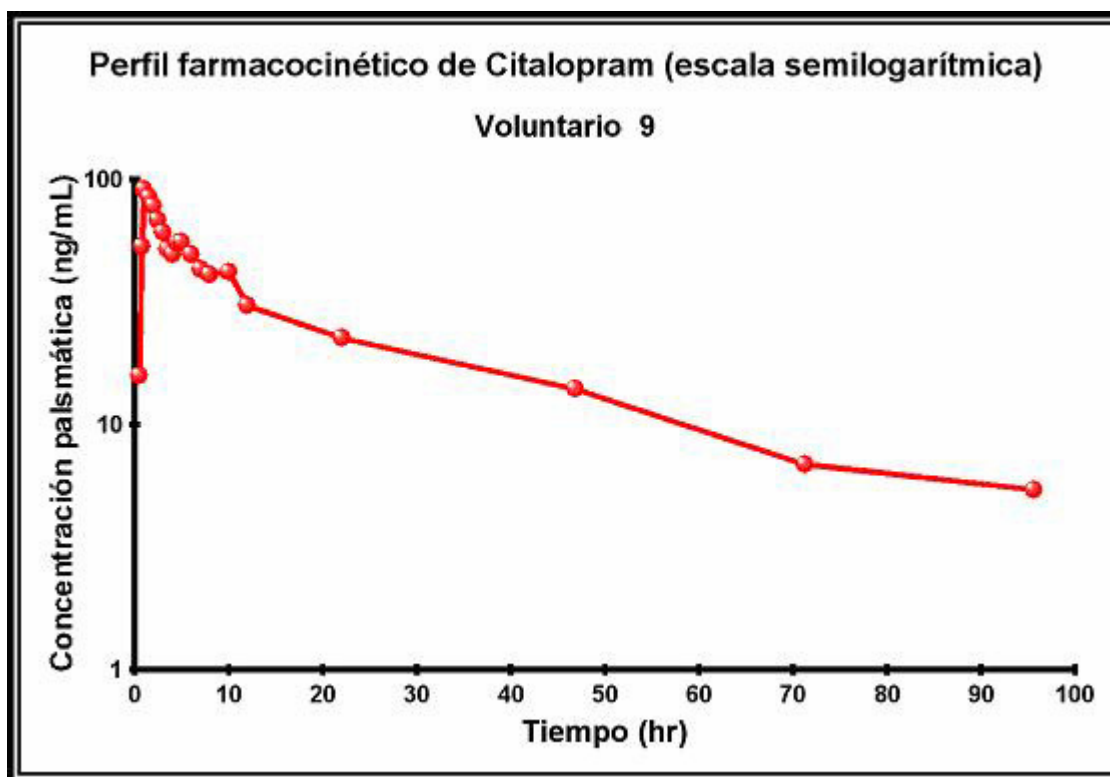
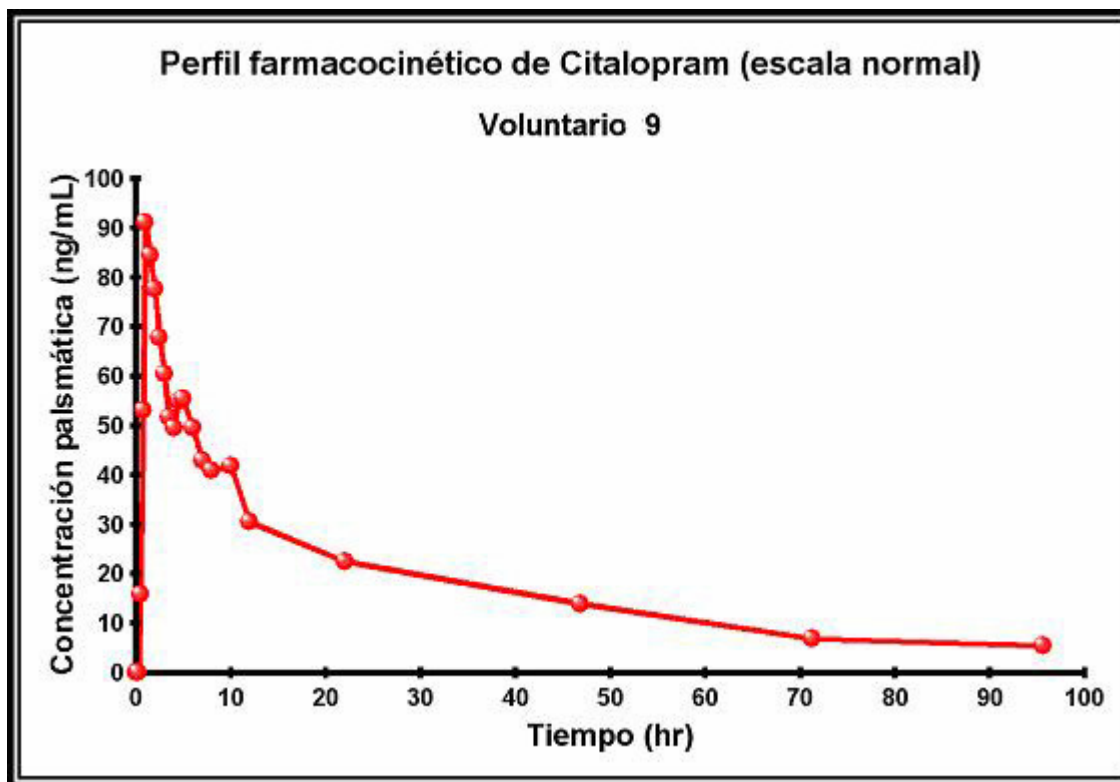


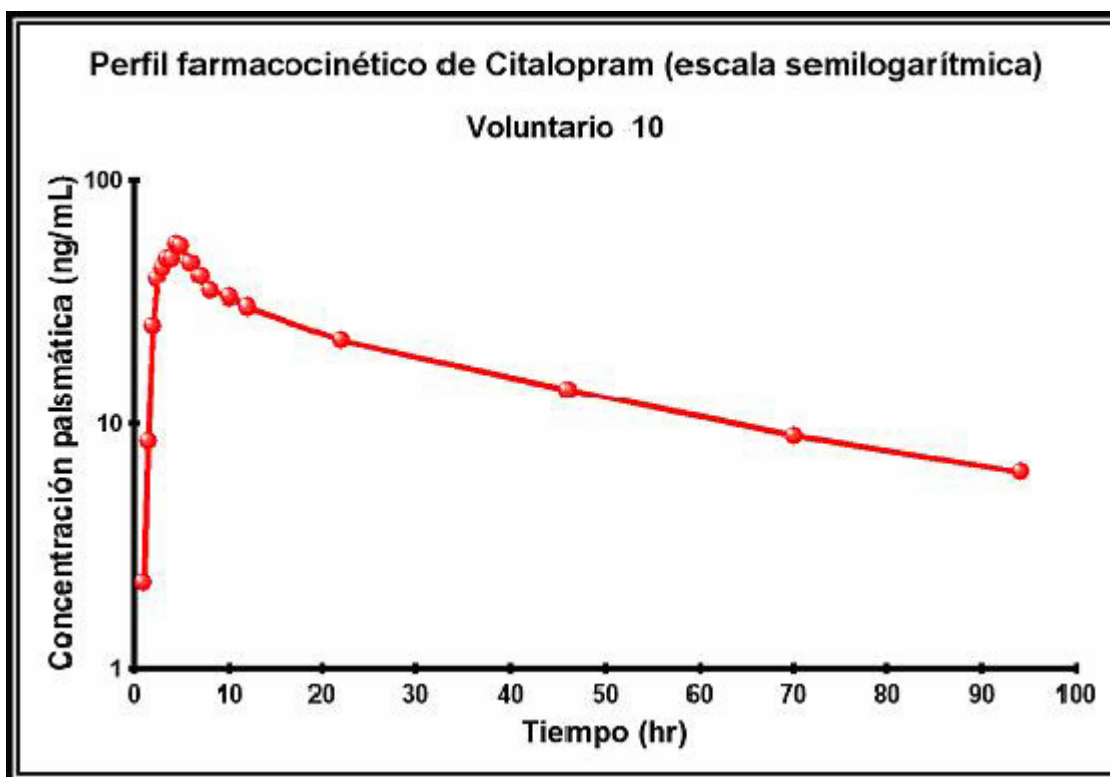
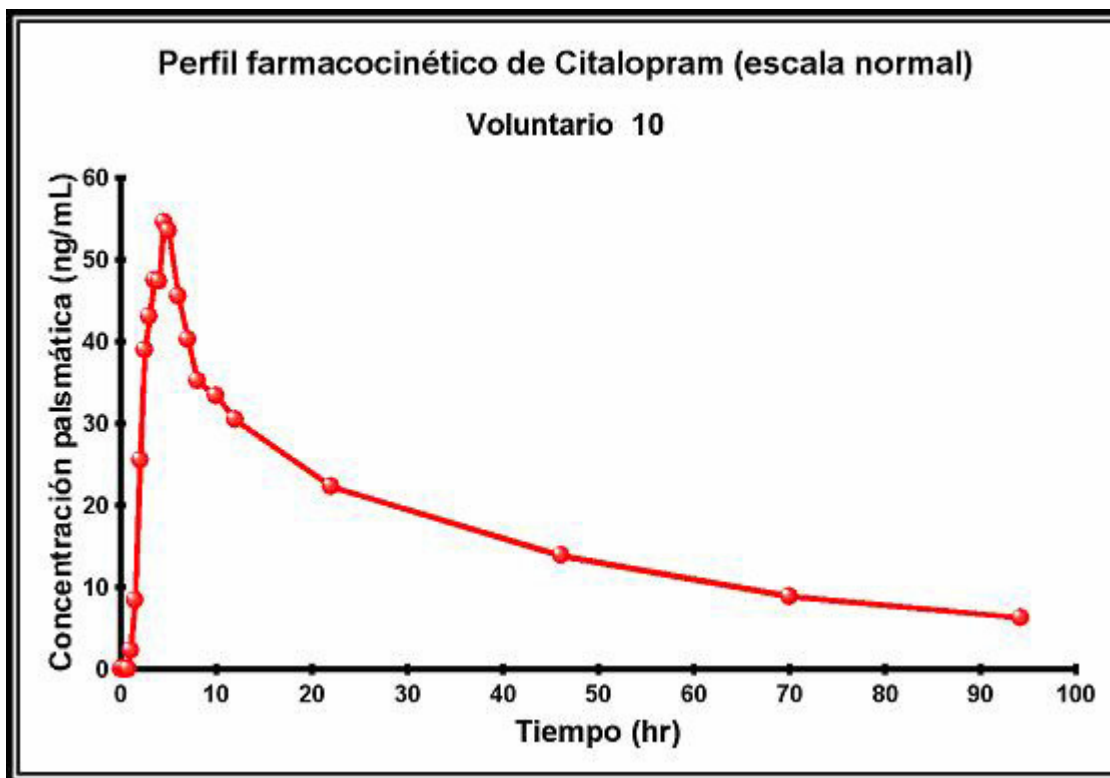


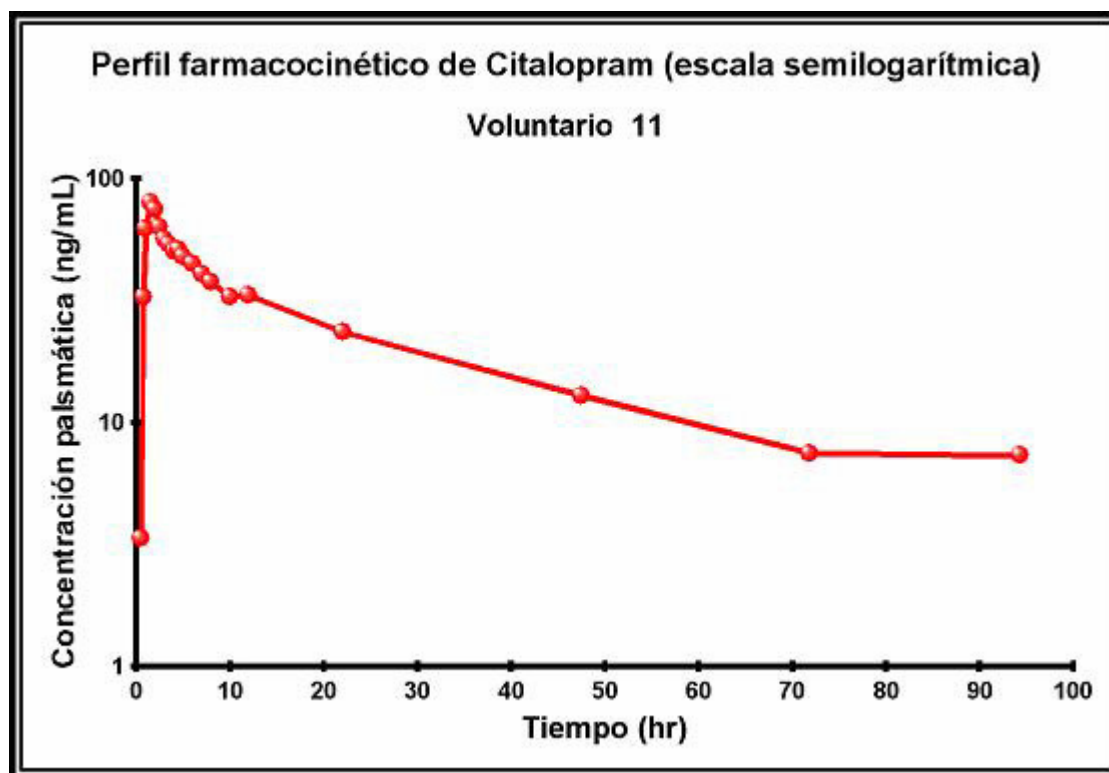
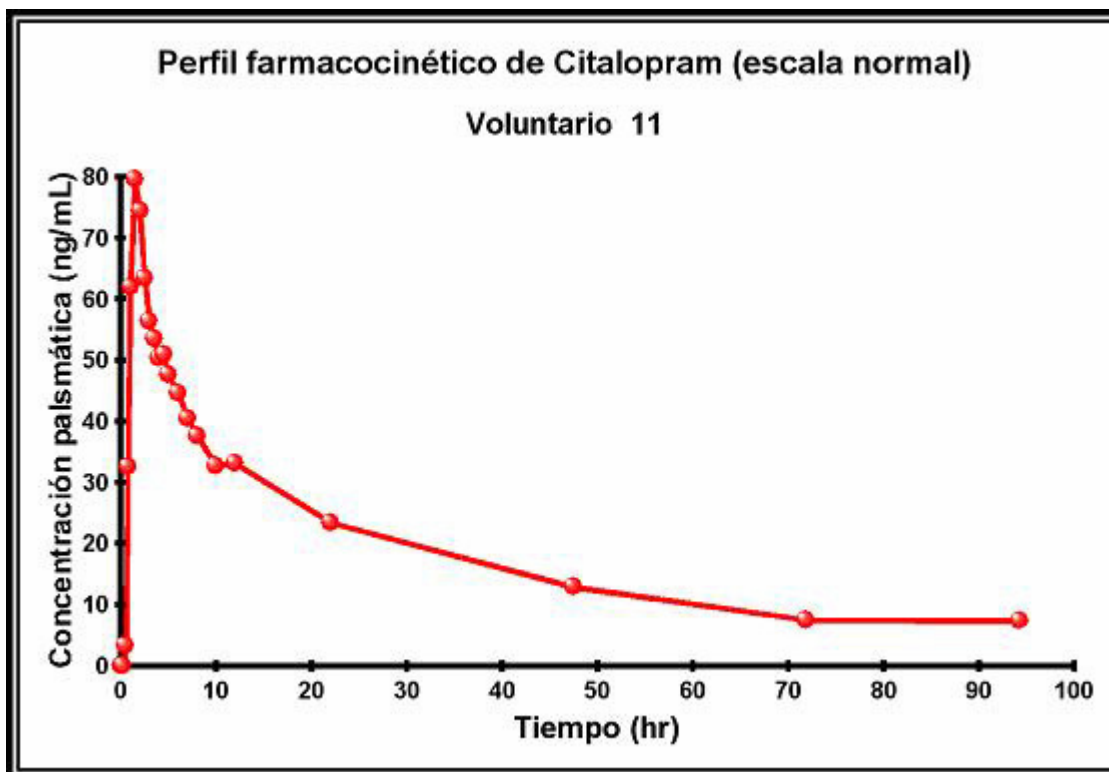


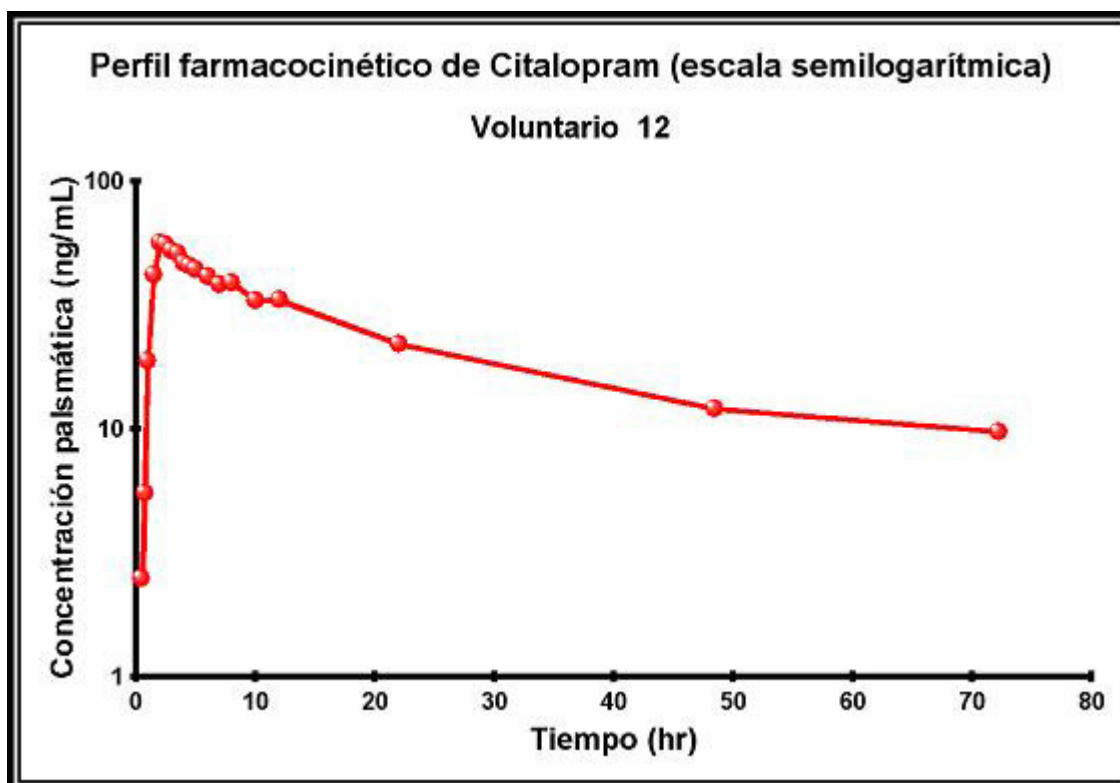
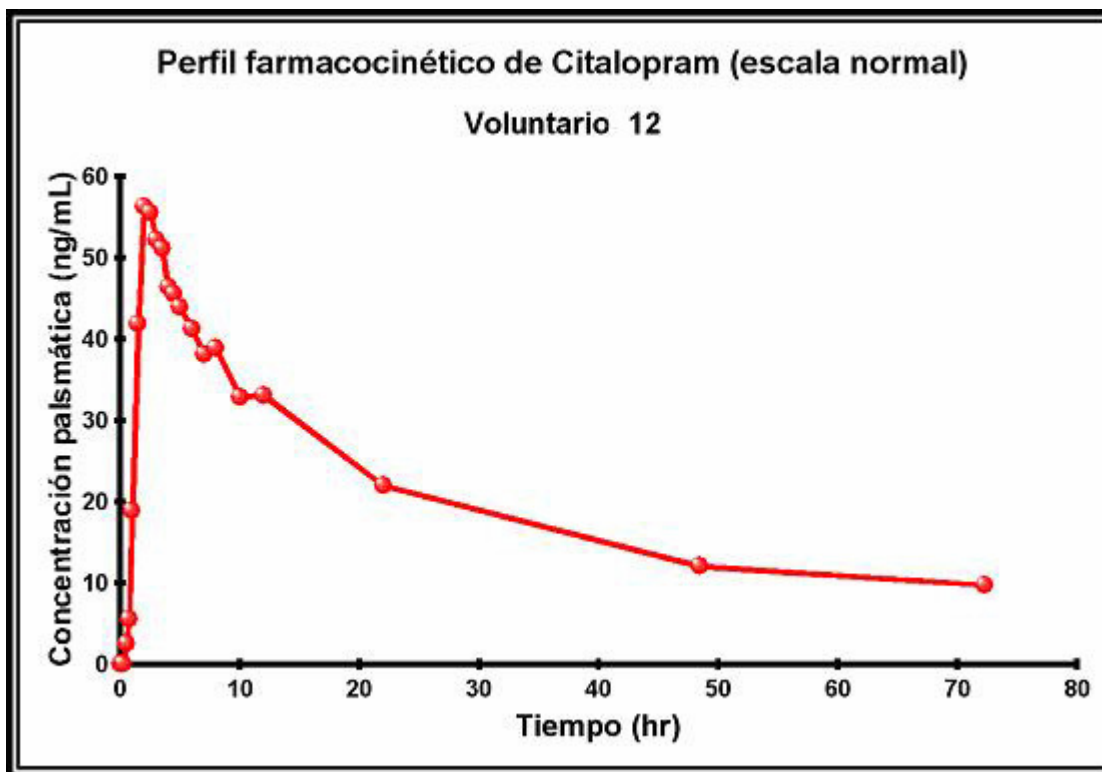












ANEXO III Parámetros farmacocinéticos de cada voluntaria.

Voluntario	Ke	t 1/2	Tmax (h)	Cmax (ng/mL)	ABC 0-t (hr*ng/mL)	ABC 0-inf (hr*ng/mL)	ABC %Extrap (%)
1	0.017	41.86	4.00	53.00	1681.63	2096.71	19.80
2	0.016	42.23	3.00	47.63	2055.11	2631.38	21.90
3	0.022	31.33	1.50	75.30	1534.22	1722.02	10.91
4	0.023	30.34	3.50	48.14	1525.90	1707.62	10.64
5	0.019	36.45	2.50	72.29	2240.99	2667.29	15.98
6	0.017	41.47	3.50	45.84	1932.86	2414.63	19.95
7	0.014	48.94	2.00	68.82	2194.54	2801.08	21.65
8	0.013	51.41	3.00	52.78	1517.05	1994.12	23.92
9	0.021	32.58	1.00	91.14	1704.87	1959.22	12.98
10	0.018	39.28	4.50	54.57	1564.07	1920.58	18.56
11	0.021	33.19	1.50	79.62	1682.07	2032.10	17.23
12	0.023	30.65	2.00	56.27	1435.63	1865.04	23.02

Voluntario	Vd (L)	Cl (L/hr)	ABCM 0-t (hr*hr*ng/mL)	ABCM 0-inf (hr*hr*ng/mL)	TMR 0-t (h)	TMR 0-inf (h)
1	1151.98	19.08	56718.95	120834.43	33.73	57.63
2	926.10	15.20	73941.28	164705.05	35.98	62.59
3	1049.91	23.23	42732.73	69319.92	27.85	40.25
4	1025.21	23.42	46769.42	72227.67	30.65	42.30
5	788.57	15.00	74127.84	137660.70	33.08	51.61
6	991.17	16.57	67391.14	141994.42	34.87	58.81
7	1008.32	14.28	71010.91	172053.34	32.36	61.42
8	1487.81	20.06	48695.06	129378.40	32.10	64.88
9	959.71	20.42	47937.49	84215.48	28.12	42.98
10	1180.26	20.83	50294.09	104069.69	32.16	54.19
11	942.56	19.68	49567.57	99337.05	29.47	48.88
12	948.27	21.45	36512.06	86535.22	25.43	46.40

BIBLIOGRAFÍA

1. <http://www.nimh.nih.gov/publicat/index.cfm> National Institute of Mental Health. Depression Publicación No.20, Septiembre 2002, versión electrónica.
2. Prevalencia de trastornos mentales y uso de servicios: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. Salud Menta, Vol. 26, No. 4, agosto 2003.
3. Prevalencia y diagnóstico de depresión en población adulta en México. Salud pública de México. Vol. 47, suplemento 1 del 2005
4. Page, Curtis et al Farmacología integrada. "Fármacos y sistema nervioso central". Ed. Harcourt Brace. España 1998 p. 114-116
5. <http://www.drugbank.ca/cgi-bin/getCard.cgi?CARD=DB00215> Wishart DS et al., DrugBank: a knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets. Nucleic Acids Res. 2007 Dec 11. Dirección electrónica.
6. Marián Carretero Colomer. Escitalopram, nuevo ISRS para el tratamiento antidepressivo. OFFARM Vol. 24 No. 8 Septiembre 2005.
7. Mosby's GenRx. A comprehensive reference for generic for generic and brand prescription drugs. 11 Edición, Editorial Mosby pp. III 553- III 558.
8. http://www.facmed.unam.mx/bmnd/dirijo.php?bib_vv=6 PLM® Diccionario de Especialidades Farmacéuticas 2007. Versión electrónica.
9. <http://www.waters.com/WatersDivision/ContentD.asp?watersit=JDRS-6VRHBW&WT.sv1=1> HPLC Primer. Biblioteca electrónica de Waters.
10. <http://www.jascofrance.fr/pdf/hplc.pdf> HPLC seminar Jasco Internacional Co. LTd.
11. <http://www.chromatography-online.org/HPLC-Detectors/Fluorescence> Journal of Chromatographic Science. Liquid chromatographic detectors.
12. Mendoza, Luis. Hadjuch, Marián. Et.al. Bioequivalence of two brands of Citalopram 40 mg tablets after single oral administration to healthy volunteers. Biomed. Papers 149 (I), 169-172, 2005.

13. Macek, J. Ptáčêk, P. Klima, J. Rapid determination of citalopram in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 755. pp. 279-285. 2001.
14. Kosel, M. Eap, C.B. Et.al. Analysis of the enantiomers of citalopram and its demethylated metabolites using chiral liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 719. pp. 234-238. 1998.
15. Meng, Qing. Gauthier, Donna. Simultaneous analysis of citalopram and desmethylcitalopram by liquid chromatography with fluorescence detection after solid-phase extraction. *Clinical Biochemistry* 38. pp. 282-285. 2005.
16. Kristoffersen, L. Dugge, A. Lundanes, E. Slordal, L. Simultaneous determination of Citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma and whole blood by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 734. pp. 229-246. 1999.
17. Carlsson, Björn. Norlander, Björn. Solid-phase extraction with end-capped C2 columns for the routine measurement of racemic citalopram and metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 702. pp. 234-239. 1997.
18. Ensayo clínico cruzado y aleatorizado de bioequivalencia de dos formulaciones de Citalopram comprimidos, tras su administración en una dosis única a voluntarios sanos. España.
19. <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf> International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICHQ2a/ICHQ2b.
20. Food Drug Administration. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Mayo 2001.
21. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/qwp/140198en.pdf>

22. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados para que realicen las pruebas.