



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRFÍA
DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICAR CARVEDIOL 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

PRESENTA:

MIREYA NOEMI AMADOR CABRERA



MEXICO, D.F.

2009



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	Dra. Inés Fuentes Noriega	_____
Vocal	Dra. Helgi Helen Jung Cook	_____
Secretario	M. en F. Luis Jesús García Aguirre	_____
1er. Suplente	M. en C. Sofía Margarita Rodríguez Alvarado	_____
2do. Suplente	M en C. María de Lourdes Mayet Cruz	_____

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

Mireya Noemi Amador Cabrera

AGRADECIMIENTOS

Dedico este logro en mí vida a aquella chica hippie que a los 24 años decidió cambiar su vida y tenerme a su lado para cuidarme y protegerme por siempre, a ti mamá por regalarme la mejor infancia que puede haber tenido, por levantarte temprano y apoyarme durante toda mi vida, por preocuparte por mi bienestar, por tú compañía y tus consejos, por escucharme, por amarme sin medida y demostrarme siempre que eres una gran mujer.

A ti papá, por estar conmigo siempre y apoyarme, pero sobre todo por confiar en mí, eres la persona que más admiró en la vida.

A mis hermanos Jonathan y Junior, por ser mis compañeros durante toda mi infancia, por hacerme reír y a veces enojar, a ti Jona, por ser emprendedor y entusiasta me siento muy orgullosa de ti, y a ti Junior por vivir tu vida de la forma que tu quieres, admiro que seas así y que al mismo tiempo seas responsable pero a tu manera. Espero que se sientan orgullosos de mí, así como yo me siento de ustedes.

A mis abuelos Coco y Lucy, por preocuparse por mi y estar conmigo siempre.

A mí tía Niche por sus consejos y demostrarme que ante cualquier adversidad siempre hay que levantarse y salir adelante, te quiero.

A mis tíos Néstor y May porque se que aunque estén lejos me quieren igual que yo a ustedes.

Al Q.F.B. Juan Manuel Jiménez Vargas por ser mi sensei y enseñarme sus conocimientos con toda la paciencia del mundo, pero sobre todo por su amistad, por escucharme siempre, por hacerme reír y siempre ver la forma de solucionar los problemas, por ser tierno conmigo y ser mi mejor amigo, por creer en mí y hacerme sentir bien con su compañía y optimismo.

A la M. en C. Araceli Salazar Pereyra por ser una excelente profesionalista y darme la oportunidad de haber trabajado a su lado.

A mis amigos y compañeros de trabajo: Omar, Jenny, David, Ara III, Liz, Mayra, Elisa, Norma, Oly, Chio, Abraham, y en especial a Yadis, por su amistad pero sobre todo por crear un ambiente de trabajo sumamente agradable.

Al M. en F. Luis Jesús García Aguirre por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo.

A la Facultad de Química y a todos sus profesores que la conforman por haberme formado y darme las herramientas para ser un profesionista más de la ciencia química.

A mis tíos José y Paulina por su cariño desde el primer momento de mí existencia.

A mis compañeros durante toda la carrera Rocio Rivera Nápoles, Nancy Munguía Vaquera, Peter, Liz, Karina, Juan Carlos, Lety Donis, Manuel Orozco, Ricardo Juárez, Gabriela Serrano.

A mí poder superior por darme la fortaleza de enfrentar la adversidad de la vida, por darme una hermosa familia, señor mí camino esta trazado, en tus manos encomiendo mi espíritu.

También dedico de manera especial a aquella chica solitaria que en un momento de su vida estuvo a punto de rendirse pero que al final del camino a base de mucho esfuerzo y dedicación logró obtener su 100% de créditos.

Bástale a cada día su propio afán, ¿Por qué te preocupas por tantas cosas?, por que llevas el peso de un ayer que lamentas si ya no esta en tú mano, ¿por que te angustia el temor de un mañana que quizá no vas a ver?

El ayer paso... el mañana no ha llegado... llena bien el hacer que tienes en tu mano, aprovéchalo, ¡llénalo! Piensa que hay en este día valor para luchar, para vencer, para reparar y para amar....

INDICE

1. RESUMEN.....	9
2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	10
3. GENERALIDADES.....	12
3.1. Carvedilol.....	12
3.1.1. Propiedades fisicoquímicas.....	12
3.1.2. Farmacodinamia.....	13
3.1.3. Farmacocinética.....	15
3.1.4. Indicaciones terapéuticas.....	17
3.1.5. Contraindicaciones e interacciones con otras drogas.....	18
3.1.6. Métodos analíticos.....	18
3.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	20
3.2.1. Instrumentos utilizados en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).....	20
3.3 Cuantificación de fármacos en fluidos biológicos.....	24
3.3.1. Técnicas empleadas en el procesamiento de muestras biológicas.....	25
3.3.2 Desarrollo de métodos analíticos.....	29
3.3.3 Validación de métodos analíticos.....	30
3.3.4 Validación durante el análisis.....	32
3.3.5 Análisis de muestras biológicas.....	33
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	35
4.1. Material, equipos e instrumentos.....	35
4.1.1. Material.....	36
4.1.2. Equipos e instrumentos.....	36
4.1.3. Reactivos.....	37
4.1.4. Sustancia de referencia.....	37
4.1.5. Preparación de soluciones.....	37
4.2. Desarrollo del método analítico.....	38
4.2.1. Condiciones cromatográficas.....	39
4.2.2. Método de extracción.....	40
4.3. Validación del método analítico.....	41
4.3.1. Preparación de la curva de calibración y puntos control de calidad.....	41
4.3.2. Linealidad.....	42
4.3.3. Precisión del método.....	43

4.3.4. Exactitud del método	44
4.3.5. Recuperación absoluta (% recobro).....	45
4.3.6. Límite de cuantificación.....	45
4.3.7. Límite de detección.....	45
4.3.8 Selectividad del método analítico.....	45
4.3.9 Estabilidad.....	46
4.3.10 Tolerancia.....	47
4.4. Aplicación del método analítico en un estudio de biodisponibilidad.....	49
4.4.1. Criterios de inclusión.....	50
4.4.2. Criterios de exclusión.....	50
4.4.3. Retiro de voluntarios del estudio.....	51
4.4.4. Evolución del estudio de biodisponibilidad.....	51
4.4.5. Análisis de las muestras plasmáticas.....	52
4.4.6 Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticas.....	53
5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	55
5.1. Desarrollo del método analítico.....	55
5.1.1. Condiciones del detector.....	55
5.1.2. Columna cromatográfica y fase móvil.....	55
5.1.3. Volumen de inyección y velocidad de flujo.....	56
5.1.4. Estándar interno.....	56
5.1.5. Método de extracción.....	57
5.2. Resultados de validación.....	58
5.2.1. Selectividad del sistema.....	58
5.2.2. Selectividad del método analítico.....	58
5.2.3. Linealidad del método analítico.....	60
5.2.4. Precisión del método analítico.....	62
5.2.5. Recobro.....	66
5.2.6. Límite de cuantificación.....	67
5.2.7. Límite de detección.....	68
5.2.8. Estabilidad.....	70
5.2.9. Tolerancia.....	79
5.3. Etapa clínica.....	85
5.3.1. Estadística demográfica descriptiva.....	85
5.3.2. Estadística descriptiva de los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo...85	
5.3.3. Concentración plasmática promedio con respecto al tiempo (escala normal y semilogaritmica).....	87

5.3.4. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos.....	88
5.3.5. Estadística comparativa entre poblaciones.....	89
6. CONCLUSIONES.....	93
7. ANEXOS.....	95
7.1. ANEXO I. Datos demográficos de los participantes del estudio.....	95
7.2. ANEXO II. Concentraciones plasmáticas de carvedilol para cada voluntario en los diferentes tiempos de muestreo.....	96
7.3. ANEXO III. Gráficas de concentración plasmática en escala normal y semilogarítmica con respecto al tiempo para cada voluntario.....	98
7.4. ANEXO IV. Parámetros farmacocinéticos de carvedilol obtenidos para cada voluntario....	110
8. BIBLIOGRAFÍA.....	111

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos analíticos reportados para la extracción de carvedilol.....	19
Tabla 2. Métodos utilizados para desnaturalizar proteínas.....	27
Tabla 3. Preparación de curva de calibración y puntos control.....	42
Tabla 4. Condiciones cromatográficas.....	56
Tabla 5. Linealidad del método analítico para cuantificar Carvedilol en plasma.....	61
Tabla 6. Parámetros de linealidad del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma.....	61
Tabla 7. Repetibilidad del método analítico para cuantificar Carvedilol en plasma.....	63
Tabla 8. Reproducibilidad método analítico para cuantificar Carvedilol en plasma investigador 1.....	64
Tabla 9. Reproducibilidad método analítico para cuantificar Carvedilol en plasma investigador 2.....	65
Tabla 10. Reproducibilidad entre investigadores.....	66
Tabla 11. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar Carvedilol en plasma.....	67
Tabla 12. Límite de cuantificación del método analítico para cuantificar Carvedilol en plasma.....	68
Tabla 13. Límite de detección del método analítico para cuantificar Carvedilol en plasma.....	69
Tabla 14. Estabilidad temperatura ambiente (27°C) de carvedilol en plasma después de 48 horas.....	70
Tabla 15. Estabilidad refrigeración (3°C) de carvedilol en plasma después de 48 horas.....	71
Tabla 16. Estabilidad ciclos congelación-descongelación carvedilol ciclo 1.....	73
Tabla 17. Estabilidad ciclos congelación-descongelación carvedilol ciclo 2.....	74
Tabla 18. Estabilidad ciclos congelación-descongelación carvedilol ciclo 3.....	75
Tabla 19. Estabilidad de la muestra procesada de carvedilol después de 48 horas.....	76
Tabla 20. Estabilidad de la muestra procesada de carvedilol después de 72 horas.....	77
Tabla 21. Estabilidad largo plazo (-70 °C) de carvedilol después de 16 días.....	78
Tabla 22. Estabilidad largo plazo (-70 °C) de carvedilol después de 32 días.....	79
Tabla 23. Tolerancia del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma al cambio de proporción de la fase móvil.....	80
Tabla 24. Tolerancia del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma con volumen parcial de la muestra (concentración dentro de la curva de calibración).....	81
Tabla 25. Tolerancia del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma con volumen parcial de la muestra (concentración por encima de la curva de calibración).....	82
Tabla 26. Tolerancia del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma hacia muestras lipémicas.....	83
Tabla 27. Tolerancia del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma hacia muestras bemozadas.....	84
Tabla 28. Estadística descriptiva de las variables demográficas.....	85
Tabla 29. Estadística descriptiva para las concentraciones plasmáticas de Carvedilol con respecto al tiempo.....	86

Tabla 30. Estadística descriptiva de Carvedilol de los parámetros farmacocinéticos de Carvedilol.....	89
Tabla 31. Parámetros farmacocinéticos entre distintas poblaciones.....	90
Tabla 32. Comparación entre población mexicana y brasileña.....	91
Tabla 33. Comparación entre población mexicana y coreana.....	92

INDICE DE FIGURAS.

Fig. 1 Diagrama de los pasos a seguir durante el desarrollo de un método analítico.....	29
Fig. 2 Técnica de extracción por precipitación de proteínas.....	40
Fig. 3 Técnicas de extracción líquido-líquido.....	41
Fig. 4 Diagrama del método de extracción.....	58
Fig. 5 Selectividad del método analítico hacia mezcla de plasma y plasmas individuales	59
Fig. 6 Selectividad del método analítico hacia fármacos de uso común.....	60
Fig. 7 Gráfico de linealidad del método.....	62
Fig. 8 Límite de detección y cuantificación.....	69
Fig. 9 Perfil farmacocinética promedio de Carvedilol en escala normal.....	87
Fig. 10 Perfil farmacocinética promedio de Carvedilol en escala semilogarítmica.....	88

ABREVIATURAS

ABC _{0-t}	Área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t
ABC _{0-inf}	Área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t
ACN	Acetonitrilo
°C	Grados centígrados
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
cm	Centímetros
C _{máx}	Concentración plasmática máxima
C.V.	Coefficiente de Variación
G	Gramos
hrs.	Horas
IMC	Índice de masa corporal
Ke	Constante de eliminación
Max	Máximo
mg	miligramos
MeOH	Metanol
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
nm	Nanómetros
PNO	Procedimiento Normalizado de Operación.
r	Coefficiente de regresión.
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
T _{máx}	Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima.
t _½	Vida media de eliminación.
TMR	Tiempo medio de residencia
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
UV-VIS	Detector UV-Visible

1. RESUMEN

El presente trabajo muestra el desarrollo de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación de carvedilol en plasma humano, realizando una extracción por precipitación de proteínas, cuantificando al analito en un rango de trabajo de 1 a 100 ng /mL.

Se utilizó un detector de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 240 nm y una longitud de onda de emisión de 340 nm. La separación del analito se realizó empleando una columna Spherisorb CN-RP 250 x 4.6 mm de diámetro interno y 5 µm de tamaño de partícula.

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

El estudio de biodisponibilidad de carvedilol, se realizó evaluando los parámetros farmacocinéticos de T_{max} (h), C_{max} (ng/mL), ABC_{0-t} (h*ng/mL), ABC_{0-inf} (h*ng/mL), K_e (1/h) y $t_{1/2}$ (h), en 12 voluntarios sanos (6 hombres y 6 mujeres), después de la administración de una dosis oral de 25 mg, tomando muestras sanguíneas en un periodo de 48 horas después de la administración, estas muestras fueron centrifugadas a 4500 r.p.m. por 5 minutos y posteriormente se separó el plasma para ser almacenado a -70° C hasta ser procesadas conforme al método analítico previamente validado.

La población mexicana mostró un T_{max} , C_{max} , ABC_{0-t} , ABC_{0-inf} , k_e , $t_{1/2}$ de 1.04 (h), 83.53 (ng/mL), 225.76 (h*ng/mL), 242.34 (h*ng/mL), 0.14 (1/h) y 6.49 (h) respectivamente, los resultados obtenidos muestran una coincidencia con los valores reportados en la literatura en otras poblaciones.

2. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS ⁽¹⁻³⁾

La eficacia de una forma farmacéutica para liberar el principio activo en condiciones aprovechables para el organismo está relacionada con su capacidad para lograr concentraciones apropiadas en el sitio de acción. Para ello se dispone una tecnología que permite tomar decisiones objetivas basadas en la evidencia, lo cual puede determinarse mediante los estudios de biodisponibilidad.

La biodisponibilidad se refiere a la cantidad y velocidad con que un fármaco alcanza la circulación sistémica después de su administración. La absorción de un fármaco depende además de los aspectos fisiológicos, de aquellos relacionados con la forma farmacéutica y su manufactura, como por ejemplo:

- Sitio de administración y de las propiedades del medicamento.
- Calidad y cantidad de los excipientes.
- Calidad de las materias primas.
- Tecnología empleada en la fabricación.

Una herramienta dentro de los estudios de biodisponibilidad para poder cuantificar una gran variedad de principios activos en fluidos biológicos es la cromatografía de líquidos de alta resolución.

Siguiendo la regulación de la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, este trabajo presenta el desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para cuantificar carvedilol en plasma humano y su aplicación en un estudio de biodisponibilidad en población mexicana.

El carvedilol es un fármaco utilizado en la hipertensión y en insuficiencia cardíaca. Posee propiedades vasodilatadoras y antioxidantes, provee beneficios hemodinámicos a través de un balance en el bloqueo de los receptores beta, que tienen un efecto dual, por un lado

reducen el trabajo cardíaco y por el otro producen una vasodilatación periférica, por lo que el medicamento asegura una protección cardiovascular.

De la misma manera, carvedilol presenta potentes efectos antioxidantes, disminución del metabolismo lipídico, modulación de los factores neurohormonales y modulación de las propiedades electrofisiológicas cardíacas. Al reducir la frecuencia cardíaca disminuye el metabolismo miocárdico, prolonga el llenado diastólico y de esa manera el tiempo de perfusión, aumentando el flujo coronario efectivo, y también se hace más eficiente la relación fuerza-frecuencia del músculo cardíaco, por lo que contribuye a la reducción de riesgo de un infarto.

Éste fármaco es una mezcla racémica de dos estereoisómeros en la cual el S (-) enantiómero presenta actividad bloqueante de los receptores β -adrenérgicos y ambos enantiómeros R (+) y S (-) presentan actividad α -adrenérgica.

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

- Desarrollar un método analítico para la cuantificación de carvedilol en plasma humano mediante la cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por fluorescencia.
- Validar el método analítico de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.
- Aplicar el método analítico en un estudio piloto para evaluar la biodisponibilidad de una formulación de carvedilol en población mexicana, después de la administración por vía oral de una dosis única de 25 mg.

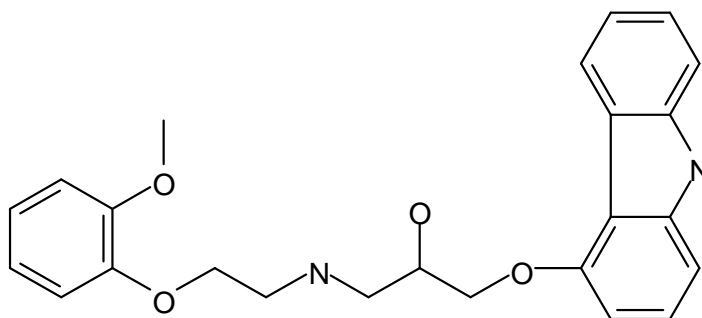
3. GENERALIDADES

1.1. Carvedilol

Carvedilol es un bloqueante alfa y beta-adrenérgico no selectivo, que posee propiedades vasodilatadoras y antioxidantes.

1.1.1. Propiedades fisicoquímicas ⁽⁴⁾

- **Fórmula condensada:** $C_{24}H_{26}N_2O_4$
- **Peso molecular:** 406.474 g/mol
- **Estructura química:**



- **Nombre IUPAC:** 1 - (9H - carbazol - 4 - yloxy) - 3 - [2 - (2 - metoxifenoxi) etil amino] - 2 - propanol.
- **Nombre común:** Carpidas (India), Coreg (Canadá), Dilatrend (Austria, Colombia, Ecuador, Alemania, Hong Kong, Corea) Kredex (Australia y Francia), en México es conocido como Dilatrend, Coreg y Coropres en comprimidos de 25 mg y 6.25 mg.
- **Descripción:** Polvo blanco grisáceo.

- **Solubilidad:** Muy soluble en dimetil-sulfóxido, soluble en cloruro de metileno y metanol, escasamente soluble en etanol e isopropanol, ligeramente soluble en éter etílico e insoluble en agua.
- **pka:** No reportado.
- **Clasificación biofarmacéutica:** Clase II (baja solubilidad-alta permeabilidad).

1.1.2. Farmacodinamia ⁽⁵⁻⁷⁾

Se compone de una mezcla racémica de dos estereoisómeros en la cual el S (-) enantiómero presenta actividad bloqueante de los receptores β -adrenérgicos y ambos enantiómeros R (+) y S (-) presentan actividad α -adrenérgica. El carvedilol reduce la resistencia vascular periférica mediante vasodilatación.

Carvedilol es un beta-bloqueante no selectivo vasodilatador que reduce la resistencia vascular periférica, mediante el bloqueo selectivo de los receptores alfa 1 y suprime el sistema renina-angiotensina mediante bloqueo beta no selectivo. Los betabloqueadores son agentes de primera elección para el tratamiento de la presión arterial, el equilibrio entre la vasodilatación y el beta-bloqueo que proporciona carvedilol produce los siguientes efectos:

Inhibe los efectos de la adrenalina sobre los receptores beta del cuerpo, lo cual retarda los impulsos nerviosos que viajan hacia el corazón.

Como resultado, el corazón no tiene que trabajar más fuerte debido a que necesita menos sangre y oxígeno. Esto reduce el ritmo cardíaco y la presión arterial. Los betabloqueadores también obstruyen los impulsos que pueden provocar una arritmia (latidos anormales).

Los betabloqueadores generalmente funcionan al afectar la respuesta a algunos impulsos nerviosos, el cuerpo tiene dos receptores beta principales: beta 1 y beta 2, algunos

betabloqueadores son selectivos, lo que significa que obstruyen a los receptores beta 1 más que a los beta 2.

Los receptores beta 1 son responsables del ritmo cardíaco y la fuerza de su latido, por otra parte los receptores beta 2 son responsables de la función de los músculos lisos (músculos que controlan las funciones corporales pero uno no tiene control sobre ellos).

Los betabloqueadores disminuyen el flujo simpático del sistema nervioso central y/o suprimen la liberación de renina (una sustancia que está elevada en algunos pacientes con presión arterial alta y está involucrada en muchos eventos que conllevan a la obstrucción de los vasos sanguíneos). Además, podrían tener posibles efectos antioxidantes y reducir el colesterol. Pueden dividirse en tres grupos distintos. El primer grupo se compone de los betabloqueadores no selectivos sin propiedades adicionales e incluye fármacos tales como propranolol y timolol.

El segundo grupo se compone de los betabloqueadores selectivos sin propiedades adicionales, este grupo incluye metoprolol y atenolol.

El tercer grupo se compone de los betabloqueadores no selectivos que tienen la propiedad adicional de vasodilatación, incluidos en este grupo están el labetalol, carvedilol y bucindolol.

El bucindolol y el carvedilol producen menos agonismo inverso que la mayoría de los otros betabloqueadores. Agonismo inverso es la habilidad de un beta bloqueante para inactivar receptores en estado activo, de este modo el bucindolol y el carvedilol producen relativamente menos efectos cronotrópicos (sustancia o fármaco capaz de modificar la frecuencia cardíaca) e inotrópicos (cualquier tipo de agente que afecte la fuerza de contracción muscular, especialmente la fuerza de la contracción cardíaca) cuando son comparados con los otros betabloqueantes como propranolol.

1.1.3. Farmacocinética⁽⁵⁻⁶⁾

Absorción. Carvedilol se absorbe rápidamente después de su administración oral, alcanzando la concentración sérica máxima en aproximadamente 1-2 horas. La biodisponibilidad absoluta del carvedilol en humanos es de 25% a 35% debido a un grado significativo del metabolismo del primer paso. Cuando se administra con alimento, la velocidad de absorción es más lenta, evidenciándose mediante la demora en alcanzar la concentración máxima plasmática sin modificación significativa de la biodisponibilidad.

Distribución. El carvedilol es un compuesto altamente liposoluble. Se distribuye ampliamente y se metaboliza casi en su totalidad en el hígado. Se encuentra unido a proteínas plasmáticas en un 98% y tiene un volumen de distribución de 115 L.

Metabolismo. En los humanos, carvedilol es extensamente metabolizado en una variedad de metabolitos que son eliminados principalmente en la bilis. Presenta un efecto del primer paso del 25 al 35%.

La desmetilación e hidroxilación del anillo fenólico produce tres metabolitos con actividad bloqueadora de los receptores β -adrenérgicos.

En comparación al carvedilol, los tres metabolitos muestran una débil actividad vasodilatadora, en los humanos, las concentraciones de los tres metabolitos activos alcanzan concentraciones de aproximadamente la décima parte de las alcanzadas por carvedilol. Dos de los metabolitos hidroxicarbazol del carvedilol son antioxidantes extremadamente potentes, demostrando una potencia de 30 a 80 veces mayor a la del carvedilol.

Las principales enzimas pertenecientes al citocromo P450 responsables del metabolismo hepático de ambos enantiómeros son: CYP3A4, 2C19, 1A2, 2E1 y 2D6.

Eliminación. La vida media de eliminación es de 5-9 horas. Su eliminación es primordialmente por vía biliar. El resto del proceso se realiza a través de la excreción renal de los metabolitos. Menos del 2% de la dosis es excretada inalterada por la orina.

Los metabolitos obtenidos por oxidación aromática son posteriormente conjugados vía glucuronidación o sulfatación y excretados principalmente a través de la bilis por las heces.

De la desmetilación e hidroxilación del grupo fenólico se producen tres metabolitos con actividad β -bloqueante.

Los tres metabolitos que resultan de su degradación son los siguientes:

- Desmetil-carvedilol. Tiene poco efecto beta bloqueador, pero no presenta actividad vasodilatadora. Este metabolito es recuperado solamente en pequeña cantidad por orina.
- 1-Hidroxi-carbazol. Este derivado es 50 a 80 veces más potente antioxidante que el carvedilol.
- 3-Hidroxi-carbazol. Similar al anterior es 50 a 80 veces más potente antioxidante que el carvedilol.

Efecto de la edad. La farmacocinética de carvedilol se ve afectada por la edad, en comparación con los sujetos jóvenes, los pacientes de edad avanzada presentan niveles plasmáticos aproximadamente 50% más elevados.

Efecto del género. No hay efecto del género reportado.

Diferencias poblacionales: Polimorfismo genético CYP2D6 para los metabolizadores pobres, los niveles de R (+) carvedilol son 2 o 3 veces más altos en comparación a los metabolizadores extensos.

1.1.4. Indicaciones terapéuticas ⁽⁵⁻⁶⁾

El carvedilol es eficaz para el tratamiento de las siguientes enfermedades:

- Hipertensión arterial
- Angina de pecho

- Insuficiencia cardíaca
- Falla ventricular izquierda
- Tratamiento prolongado de la cardiopatía isquémica

1.1.5. Contraindicaciones e interacciones con otros fármacos ⁽⁵⁻⁶⁾

No debe usarse en pacientes con: hipersensibilidad conocida al carvedilol o a cualquiera de los componentes del producto, insuficiencia cardíaca descompensada que requiera tratamiento inotrópico intravenoso, insuficiencia hepática clínicamente manifestada.

No debe ser usado en pacientes con asma de los bronquios o con enfermedad pulmonar obstructiva crónica como componente de espasmos bronquiales.

A causa de que el carvedilol presenta metabolismo hepático puede interactuar con muchos fármacos. La rifampicina, que es un inductor de enzimas hepáticas, puede disminuir las concentraciones plasmáticas de carvedilol si se les administra conjuntamente.

Los inhibidores de enzimas hepáticas como la cimetidina, fluoxetina y paroxetina, pueden aumentar las concentraciones de carvedilol.

Los pacientes que toman carvedilol pueden aumentar las concentraciones de digoxina si se les administra conjuntamente, por lo que es necesaria una monitorización periódica del paciente.

1.1.6. Métodos analíticos ⁽⁸⁻¹⁴⁾

En la revisión bibliográfica encontramos varios métodos para la extracción de carvedilol, los cuales se muestran a continuación en la tabla 1.

Tabla 1. Métodos analíticos reportados para la extracción de carvedilol

MATRIZ BIOLÓGICA	COLUMNA	FASE MÓVIL	TÉCNICA DE EXTRACCIÓN	DETECTOR	RANGO DE TRABAJO	ESTÁNDAR INTERNO
Plasma humano ⁽⁸⁾	Lichrosphere R CN	Acetato de Amonio 20 mM pH 4.50 con 0.1 % trietilamina:ACN (60:40 v/v)	Extracción líquido-líquido utilizando diclorometano	Fluorescencia λ exc = 282 nm. λ emis = 340 nm	1 – 128 ng/mL	Domperidone
Plasma humano ⁽⁹⁾	Monolithic RP- 18 e, 100mm x 4.6 mm.	Na ₂ HPO ₄ 10 mM pH 3.5:ACN (40:60 v/v) Flujo: 2 mL/min	Pp de proteínas: 450 μ L plasma + 50 μ L E.I + 500 μ L ACN, agitar por 30 seg y centrifugar a 8000 rpm por 10 min, e inyectar 20 μ L	Fluorescencia λ exc = 240 nm λ emis = 340 nm	1 – 80 ng/mL	Letrozole
Plasma humano ⁽¹⁰⁾	Develosil 100 x 4.6 mm, 3 μ m Temp. Columna = 35°C	K ₂ HPO ₄ 30 mM pH 2.0:ACN (70:30 v/v) Flujo: 1.5 mL/min	Pp de proteínas: 250 μ L plasma + 10 μ L E.I. + 1 mL metanol, evaporar la fase orgánica y reconstituir con 500 μ L de fase móvil e inyectar 25 μ L	Fluorometría λ exc = 238 nm λ emis = 350 nm	1.303 – 142 ng/mL	Dihydroergo cristine mesylate
Plasma humano ⁽¹¹⁾	Altech Prevail C 18 150mm x 4.6 mm, 5 μ m	ACN:H ₂ O (80:20 v/v) Flujo: 1.8 mL/min	Extracción liq- liq: 200 μ L plasma + 50 μ L E.I + 4 mL eter dietílico, agitar por 40 seg, separar fase orgánica, evaporar y reconstituir con 200 μ L ACN:H ₂ O (50:50 v/v)	HPLC MS/MS	0.1 – 200 ng/mL	Metoprolol
Plasma humano ⁽¹²⁾	Atlantics HILIC silica 50 mm x 3mm, 5 μ m Temp. Columna = 40°C	ACN:Formiato de amonio 50 mM pH 4.5 (90:10 v/v) Flujo: 0.5mL/min	Extracción liq-liq: 50 μ L plasma + 10 μ L E.I + 300 μ L bufer fosfatos 0.5 M pH 9.0 + 1 mL metil-terbutil-eter, agitar y evaporar fase orgánica, reconstituir con 40 μ L ACN, inyectar 10 μ L	HILIC- MS/MS	0.1 – 200 ng/mL	Cisapride

1.2. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) ⁽¹⁵⁻¹⁶⁾

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

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una técnica que realiza la separación física de una mezcla de compuestos a través de la interacción selectiva entre los solutos haciendo uso de instrumentación automatizada de alta eficiencia, emplea una fase móvil líquida y una fase estacionaria finamente dividida, utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución.

Algunas de las ventajas que tiene el usar la cromatografía de líquidos de alta resolución como método de separación son las siguientes:

- Rapidez y adaptabilidad al análisis cuantitativo.
- Variedad de mecanismos de operación.
- Alta sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión de los resultados.
- Tecnología en instrumentación.
- Potencial en investigación y desarrollo.
- Determinaciones cuantitativas exactas.
- Aplicabilidad a sustancias de interés general (industria, salud, medioambiente).

1.2.1. Instrumentos utilizados en Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) ⁽¹⁷⁻¹⁸⁾

En la cromatografía de líquidos de alta resolución es necesario aplicar presiones elevadas y alcanzar velocidades de flujo adecuadas para la cuantificación del analito de interés. Debido a estas presiones tan altas, el equipo para CLAR es mucho más elaborado y costoso que el que se emplea en otros tipos de cromatografía.

Dentro de los instrumentos que se requieren para la cromatografía de líquidos de alta resolución se encuentran los siguientes:

Recipientes de la fase móvil. El recipiente que contiene la fase móvil debe contar con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas ambientales al sistema.

Los recipientes para almacenar la fase móvil tienen que ser inertes, es decir, el disolvente no deberá extraer especie alguna del material con el que estén contruidos. Suelen ser botellas de vidrio, están provistos de unos filtros, indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que pueda contener la fase móvil.

Propiedades de los disolventes:

- Alto poder solubilizante de las muestras.
- Baja reactividad, ya que pueden reaccionar con la muestra, fase estacionaria, o componentes del sistema cromatográfico.
- Baja viscosidad (el aumento de la viscosidad reduce la permeabilidad de la columna y aumenta la presión).
- Alto grado de pureza, ya que las impurezas pueden introducir modificaciones de la selectividad de la fase móvil y contribuir a una señal de base importante en el detector.
- Seguridad, evitar solventes que por sus características de inflamabilidad y toxicidad representen un riesgo para la seguridad del operador.

Durante la preparación de la fase móvil deben cuidarse ciertos aspectos como el empleo de materiales volumétricos limpios, ajustar el pH correctamente, ya que este es un parámetro crítico en la retención de solutos ionizables. La fase móvil debe filtrarse en filtros de 0.45 o 0.22 micras ya que las partículas presentes pueden bloquear filtros y tuberías del instrumento, acelerar desgaste de sellos, rotores del inyector y afectar el movimiento normal de válvulas de entrada y salida de bombas.

Después de filtrarse la fase móvil debe desgasificarse ya que los gases disueltos en ella pueden provocar liberación y formación de burbujas en la celda del detector, y provocar oscilación en la línea base y aparición de picos fantasma.

Bomba. Impulsa la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector y desde allí hacia la columna. Las bombas para cromatografía de líquidos deben cubrir los siguientes requisitos:

- Generar presiones de más de 6000 psi (lb/pulg²).
- Proporcionar velocidades de flujo de 0.1 a 10 mL/min.
- Ser resistentes a la corrosión por diversos disolventes.
- Ser inertes respecto a los disolventes empleados.
- Generar un flujo constante y ser reproducible.

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

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

Uniones. Permiten conectar las tuberías y con ellas, los distintos componentes del sistema cromatográfico. Estas deben ser inertes a fases móviles y muestras, deben cerrar herméticamente.

Columna. En las columnas cromatográficas es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación, el material de las columnas cromatográficas suele ser de acero inoxidable cuya longitud varía de 2 a 25 cm y un diámetro de 1 a 46 mm.

La eficacia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria (a menor tamaño de partícula, mayor área superficial).

Las columnas son caras y se degradan con facilidad, por eso, se protege la entrada de la columna con otra más corta, la precolumna, que retiene por adsorción las impurezas de forma irreversible.

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

- Tener un amplio rango de respuesta.
- Poseer una respuesta lineal (el detector debe medir alguna propiedad del analito que se incremente linealmente al aumentar su concentración) y reproducible.
- Tener la sensibilidad apropiada.
- No afectarse por cambios de temperatura.
- No destruir la muestra.

Detector de fluorescencia. Se utiliza para el análisis de sustancias que presentan fluorescencia natural o conferida por una derivatización de un reactivo fluorogénico. Dentro de las características de estos detectores se encuentran:

- Alta sensibilidad y selectividad.
- Adecuado para el análisis de trazas.
- Se utilizan dos longitudes de onda, una de excitación y otra de emisión.
- También existen detectores de índice de refracción, arreglo de diodos y otros de carácter universal como el detector de UV-VIS.

1.3. Cuantificación de fármacos en fluidos biológicos ⁽¹⁹⁾

En los fluidos biológicos el fármaco de interés se puede encontrar inmerso en una mezcla compleja de carbohidratos, proteínas, lípidos y otros componentes, que pueden interactuar entre sí interfiriendo su determinación.

La selección de la matriz biológica en la que se realizará la cuantificación de fármacos depende directamente de la farmacocinética del analito, vía de eliminación, capacidad para unirse a proteínas y de los alcances del método.

La sangre, el plasma, el suero y la orina son los fluidos biológicos más comúnmente utilizados para el análisis de fármacos:

Sangre. Es el fluido biológico más usado para la identificación y cuantificación de fármacos que presentan alta afinidad o permeabilidad a las membranas celulares de eritrocitos y linfocitos. Consiste de un líquido con proteínas solubilizadas, grasas, sales disueltas y células suspendidas. Los eritrocitos son el principal componente de la sangre y pueden separarse del componente líquido por centrifugación.

Suero. Se deriva de la sangre a partir de la coagulación y posterior centrifugación, eliminando de esta forma las células y factores de coagulación presentes. El suero es comúnmente empleado para la cuantificación de fármacos cuando el analito no presenta afinidad por células ni por proteínas.

Plasma. Es obtenido a partir de la centrifugación de la sangre a la que se le ha adicionado un anticoagulante. El plasma es suero que contiene fibrinógeno y factores de coagulación. En la cuantificación de fármacos, el plasma se utiliza cuando el analito presenta alta afinidad por proteínas.

Orina. Es una mezcla constituida por sustancias solubles en agua. Generalmente se encuentra libre de proteínas y lípidos. El pH depende en gran medida de la dieta. Dadas las grandes diferencias en volumen de orina que se puede excretar en un intervalo de tiempo fijo, es importante la cantidad de fármaco excretada y no la concentración.

Es comúnmente utilizado en estudios de farmacocinética y bioequivalencia, cuando la eliminación renal del fármaco inalterado es de cuando menos el 50%.

1.3.1. Técnicas empleadas en el procesamiento de muestras biológicas ⁽¹⁹⁻²⁰⁾

El procesamiento de una muestra biológica, es un paso crítico en la cuantificación de fármacos, ya que debe ser de aplicación fácil, rápida y de bajo costo.

Por esta razón es deseable que el procesamiento de la muestra biológica sea lo más sencillo posible y con la menor manipulación de la muestra, para tener métodos rápidos, económicos y reproducibles.

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

Filtración. Algunos de los problemas que se presentan al utilizar esta técnica son los siguientes:

- Adsorción del analito al filtro.
- Picos adicionales de los componentes del filtro.
- Cantidad de muestra pequeña.

Ultrafiltración. Esta técnica se utiliza cuando los fármacos presentan baja unión a proteínas, la separación se realiza basada en la diferencia existente en los tamaños moleculares y la aplicación de una centrifugación a altas velocidades. Algunas de las ventajas y desventajas de esta técnica son las siguientes:

Ventajas:

- Técnica sencilla y rápida de aplicar.
- Presenta poca manipulación en comparación con las de otras técnicas.

Desventajas:

- Se requiere de equipos especiales.
- Es una técnica costosa.
- Extracción errática por unión del fármaco a proteínas plasmáticas.

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

Tabla 2. Métodos utilizados para desnaturalizar proteínas

Método	Comentario
Calentamiento a 90°C durante 5-15 min.	No es muy eficiente y puede degradar el compuesto, por lo que no se recomienda para analitos termolábiles.
Ciclos de congelación – descongelación	No es muy eficiente y consume mucho tiempo.
Saturación con sulfato de amonio	Eficiencia moderada, alta concentración de sales en el sobrenadante, pH al final de la precipitación de aproximadamente 7.
Ácido metafosfórico	Excelente eficiencia, el pH ácido (< 3.0) puede descomponer el analito.
Ácido perclórico	Excelente eficiencia, el pH puede descomponer al analito de interés. La mayoría de los compuestos básicos son extraídos exitosamente.
Etanol	Se requiere de dos volúmenes de etanol para una desnaturalización completa.
Acetonitrilo	Se requiere de 1.5 volúmenes para desnaturalización completa. Particularmente conveniente para inyectar inmediatamente al sistema cromatográfico.
Cloruro de amonio	Es mejor que el sulfato de amonio para compuestos básicos.

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

Extracción Líquido-líquido. Es la transferencia del analito desde una fase acuosa a una fase orgánica, el principio básico consiste en que el fármaco al encontrarse en su forma no ionizada, es más afín a la fase orgánica. La extracción de fármacos en fluidos biológicos se puede llevar a cabo en medio ácido ($\text{pH} \leq 3$) o en medio básico ($\text{pH} \geq 8$). La completa remoción de un fármaco de interés hacia la fase orgánica depende de varios factores, como el porcentaje de ionización dependiente del pH del medio, y del pKa del fármaco, el volumen de las dos fases en la extracción y el número de extracciones utilizadas.

Ventajas de la extracción líquido-líquido:

- Es una técnica económica.
- Existe menor supresión iónica si se remueve la fase acuosa.
- Permite la concentración del analito de interés.

Desventajas de la extracción líquido-líquido:

- Operación lenta y tediosa.
- Dependiente de la habilidad del operador.
- Formación de emulsiones.
- Manipulación de grandes cantidades de disolventes tóxicos e inflamables.

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

Para una extracción completa son necesarios 4 pasos de operación: acondicionamiento de los cartuchos, aplicación de la muestra, lavado y por último la elusión y recuperación del analito.

Dentro de las ventajas de este tipo de extracción se encuentran las siguientes:

- Poco consumo de disolventes orgánicos
- No presenta problemas de emulsiones
- Posibilidad de automatización total.
- Selectividad por la variabilidad del material de empaque.

Desventajas de la extracción sólido-líquido:

- Control en la velocidad de flujo de elusión
- Dependiente de la habilidad del operador.
- El cartucho puede obstruirse debido al volumen de muestra utilizado.
- Instalaciones y equipo especializado

1.3.2. Desarrollo de métodos analíticos

Antes de iniciar el desarrollo de un método analítico, se debe definir si es necesario analizar el fármaco y/o sus metabolito(s), o ambos, para establecer el intervalo de concentraciones que debe cumplir el método analítico debe conocerse la dosis que se administrará durante el estudio y su concentración plasmática máxima esperada.

Para establecer una metodología analítica que permita la cuantificación de un analito en una matriz biológica para ser empleada en un estudio de biodisponibilidad, generalmente se siguen los siguientes pasos:

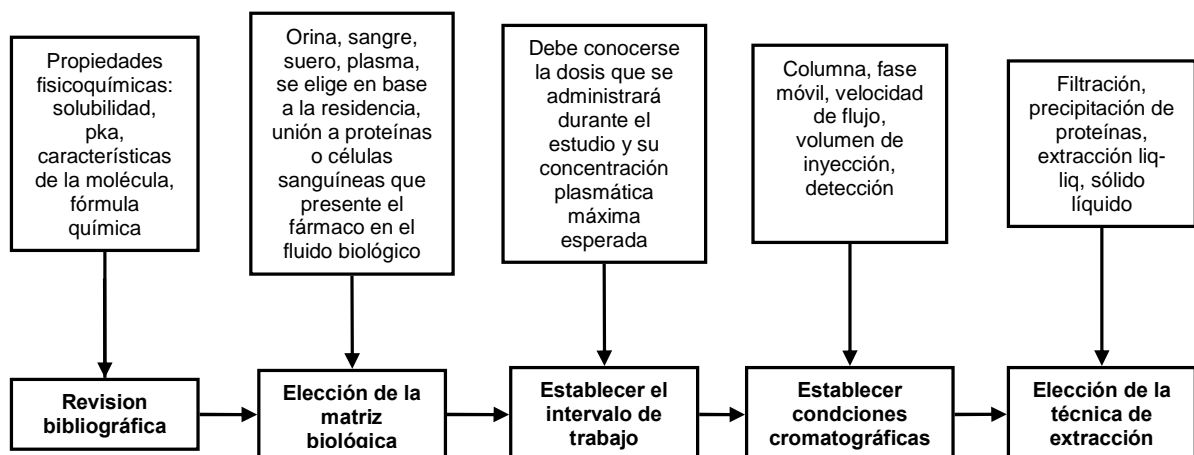


Figura 1. Diagrama de los pasos a seguir durante el desarrollo de un método analítico

1.3.3. Validación de métodos analíticos ⁽²¹⁾

Una vez que se ha desarrollado un método analítico para la cuantificación de un fármaco es necesario someterlo a una validación.

La validación de un método analítico es el proceso mediante el cual se demuestra que el método es adecuado para la determinación cuantitativa del analito en una matriz biológica en particular.

La validación se realiza llevando a cabo una serie de procedimientos que evalúan parámetros esenciales que aseguran la aceptabilidad en el desempeño del método.

La Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, menciona las pruebas y criterios generales para la validación de un método analítico cuya aplicación será un estudio de biodisponibilidad y bioequivalencia.

La palabra validación se refiere a la 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. Se refiere a la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.

Curva de calibración. Se refiere 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. Es el 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.

1.3.4. Validación durante el análisis

Durante el análisis de muestras, es necesario tomar en cuenta varios puntos que aseguren la confiabilidad de los resultados obtenidos:

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.

Reactivos y estándares. Los estándares que se utilicen para llevar a cabo la cuantificación deben estar bien caracterizados. Debe existir un registro de la marca, el número de lote, y grado de pureza de todos los reactivos utilizados durante el análisis de muestras.

Equipo. Todo el equipo que se utilice para el transporte, el almacenamiento y el análisis de las muestras debe de estar dentro de un programa de verificación, mantenimiento y calibración.

En cada análisis, se debe verificar que el funcionamiento del equipo es adecuado. Es necesario que exista una evidencia documentada de que el equipo se verificó periódicamente y de que se utilizó un equipo determinado.

Procedimientos normalizados de operación. Es un documento que contiene las instrucciones necesarias para llevar a cabo de manera reproducible una operación, el laboratorio donde se realice el análisis de las muestras debe contar con dichos procedimientos los cuales deben estar revisados, aprobados, firmados y fechados por personas autorizadas, además de que deben ser actualizados regularmente.

Dentro de la importancia de los procedimientos normalizados de operación se encuentran:

- Proveen información completa y exacta para todos los procesos.
- Ayudan a asegurar que todos los procesos se lleven a cabo de manera homogénea.
- Sirven como herramienta de inducción y capacitación para personal de nuevo ingreso.

1.3.5. Análisis de muestras biológicas

En cada análisis de muestras se debe incluir:

- Una curva de calibración.
- Muestras control de calidad.
- Blancos del fluido biológico.

El análisis de las muestras control de calidad será indispensable para determinar si el análisis de muestras es confiable.

Se debe contar con procedimientos normalizados de operación que indiquen:

- Los criterios de aceptación y rechazo de una corrida analítica.

- Los lineamientos a seguir en caso de que las muestras requieran ser reanalizadas.
- Las acciones a seguir en caso de encontrar muestras fuera del intervalo de trabajo.

Los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para su finalidad o propósito ya que muchas decisiones que se toman están basadas en la información que estos resultados proporcionan. La validación de la metodología, junto con otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables.

4. PARTE EXPERIMENTAL

La parte experimental se llevó a cabo en dos etapas:

- Desarrollo y validación del método analítico
- Aplicación del método en el análisis de muestras plasmáticas provenientes de voluntarios sanos en un estudio piloto de biodisponibilidad en población mexicana.

4.1. Material, equipos e instrumentos

4.1.1. Material

- Pesa filtro
- Espátula
- Guantes de nitrilo
- Matraces volumétricos calibrados: 20, 50, 100 y 1000 mL.
- Pipetas volumétricas: 2 y 5 mL.
- Propipeta
- Membranas de filtración de Nylon de 0.45 micras
- Frascos de vidrio con tapa rosca: 1000 y 2000 mL.
- Puntas de volumen variable para repetidora
- Vasos de precipitados de vidrio: 20, 100, 250 y 1000 mL.
- Frascos de polipropileno con tapa de rosca: 30 y 60 mL.
- Probeta graduada: 10 y 500 mL.

- Microtubos de 2 mL
- Viales para autromuestreador 2690
- Agitador barra magnética

4.1.2. Equipos e instrumentos

- Balanza analítica marca Ohaus modelo EP214C
- Potenciómetro Oakton serie pH 1000
- Sistema de purificación de agua marca Barnstead
- Baño ultrasonico Branson marca Bransonic modelo 3510R-MT
- Agitador vórtex marca Thermolyne, modelo Maxi Mix
- Refrigerador Torrey R-16
- Ultracongelador marca REVCO modelo ULT2186-5-A36
- Pipeta repetidora electrónica marca Eppendorf modelo Multipette plus
- Micropipeta volumen fijo 200 μ L marca Hirschmann Laborgeräte modelo Hirschmann Labopette
- Micropipeta volumen variable 100-1000 marca Hirschmann Laborgeräte modelo Labopette
- Microcentrifuga Eppendorf Modelo 5424
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución , que consta de:
- Módulos de separaciones marca Waters modelo 2690D
- Detector de fluorescencia Waters modelo 474
- Columna cromatografica Spherisorb CNRP 4.6 x 250mm, 5 μ m

- Columna cromatografica Zorbax SB C₁₈, 4.6 x 50 mm, 1.8 µm
- Columna cromatografica Synergi max RP 4.6 x 150 mm, 4 µm

4.1.3. Reactivos

- Agua grado cromatográfico obtenida del sistema de purificación de agua marca Barnstead
- Acetonitrilo grado cromatográfico J.T. Baker
- Metanol grado cromatográfico J. T. Baker
- Fosfato monobásico de potasio, 99.3% J.T. Baker

4.1.4. Sustancia de referencia

- Carvedilol. Estándar secundario, lote C195/7/02, potencia 100.4%. Proveedor: Torrent.

4.1.5. Preparación de soluciones

Solución amortiguadora de fosfato de potasio monobásico 10 mM pH 2.50. Pesar 1.36 g de fosfato monobásico de potasio y transferirlos a un matraz volumétrico de 1 L, disolver con agua grado CLAR y llevarlo a volumen con el mismo disolvente. Posteriormente ajustar el pH a 2.50 con ácido fosfórico concentrado.

Solución de referencia de carvedilol 100 µg/mL. Pesar con exactitud el equivalente a 10 mg del estándar de referencia de carvedilol y transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.

Solución de referencia de carvedilol 2 µg/mL. Utilizando una pipeta volumétrica, transferir 2 mL de la solución de referencia de carvedilol de concentración de 100 µg/mL a un matraz volumétrico de 100 mL y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.

Solución de referencia de carvedilol 0.5 µg/mL. Utilizando una pipeta volumétrica, transferir 5 mL de la solución de referencia de carvedilol de concentración de 2 µg/mL a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.

Solución de referencia de carvedilol 0.05 µg/mL. Utilizando una pipeta volumétrica, transferir 2 mL de la solución de referencia de carvedilol de concentración de 0.5 µg/mL a un matraz volumétrico de 20 mL y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico.

4.2. Desarrollo del método analítico

Para establecer una metodología analítica que permita la cuantificación de un analito en una matriz biológica para ser empleada en un estudio de biodisponibilidad, generalmente se siguen los siguientes pasos:

Revisión bibliográfica. Se revisaron las propiedades fisicoquímicas del analito: solubilidad, pka, fórmula molecular y características de la molécula así como la concentración plasmática máxima esperada para poder proponer un intervalo de trabajo.

Elección de la matriz biológica. Los más comúnmente empleados son plasma, orina, sangre total, y suero, en el caso de carvedilol se empleó plasma debido a su alta afinidad hacia proteínas plasmáticas.

Elección del intervalo de trabajo. Debe conocerse la dosis que se administrará durante el estudio y su concentración plasmática máxima esperada, para poder establecer un rango de trabajo. En nuestro caso el $C_{\text{máx}}$ reportado es de 47.8 ± 28.6 ng/mL para una dosis de 25 mg, por lo que nuestro rango de trabajo establecido fue de 1-100 ng/mL.

Elección de la técnica analítica. Se debe establecer la técnica analítica a emplear para cuantificar al analito en la matriz e intervalo de trabajo. En nuestro caso se encontró que empleando cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia, se alcanzaba la sensibilidad óptima.

Por lo cual fue necesario establecer las condiciones cromatográficas, como la elección de la longitud de onda de detección, elección de la columna cromatográfica y de la fase móvil que resulte más adecuada en la cuantificación de la carvedilol en la matriz biológica (plasma).

Procesamiento de la muestra. Debido a que el plasma humano es una matriz biológica que contiene elevadas cantidades de sustancias endógenas como proteínas, lípidos, carbohidratos, etc., es necesario establecer un método de procesamiento de la muestra que permita la limpieza de la muestra para evitar posibles interferencias al tiempo de retención del analito de interés, además de alcanzar la sensibilidad necesaria que permita la correcta cuantificación de carvedilol, bajo una metodología reproducible.

4.2.1. Condiciones cromatográficas

Condiciones del detector. Se utilizó un detector de fluorescencia con una longitud de onda de λ excitación a 240 nm y una λ de emisión de 340 nm.

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

- Spherisorb CN RP 4.6 x 250 mm, 5 μ m.
- Zorbax SB C₁₈ 4.6 x 50 mm 1.8, μ m.
- Synergi max RP 150 x 4.6 mm, 4 μ m.

Elección de la fase móvil. Se probó la solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 2.50: ACN, modificando la proporción de acetonitrilo en un rango de 25 a 50%. También se probó la solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 2.50:MeOH (60:40 v/v). La elección de la fase móvil se enfocó en aquella que nos proporcionara una resolución aceptable entre el pico de interés y las interferencias presentes, con el menor tiempo de corrida posible.

Volumen de inyección y velocidad de flujo. Se evaluaron volúmenes de inyección de 10 a 30 μ L y un rango en la velocidad de flujo de 1 a 1.5 mL/min. La elección de estos parámetros fueron establecidos eligiendo aquél que no provocara un cambio elevado en la presión y una buena resolución entre picos.

Elección del estándar interno. Un estándar interno toma gran importancia, pues minimiza los errores que se pueden presentar en el procesamiento de la muestra y sirve como referencia interna para cuantificar con exactitud las concentraciones del fármaco

estudiado. Se probaron como estándar interno los siguientes analitos: losartan, letrozol, cefalexina, ofloxacina, y ciprofloxacina.

4.2.2. Método de extracción

Para el procesamiento de extracción de carvedilol en plasma, se encuentran diversos métodos de extracción reportados como lo es la extracción líquido- líquido, sin embargo este es un método que involucra etapas que consumen gran cantidad de disolventes orgánicos y tiempo, también se encuentra reportado la extracción por precipitación de proteínas.

Se probaron las siguientes técnicas de extracción:

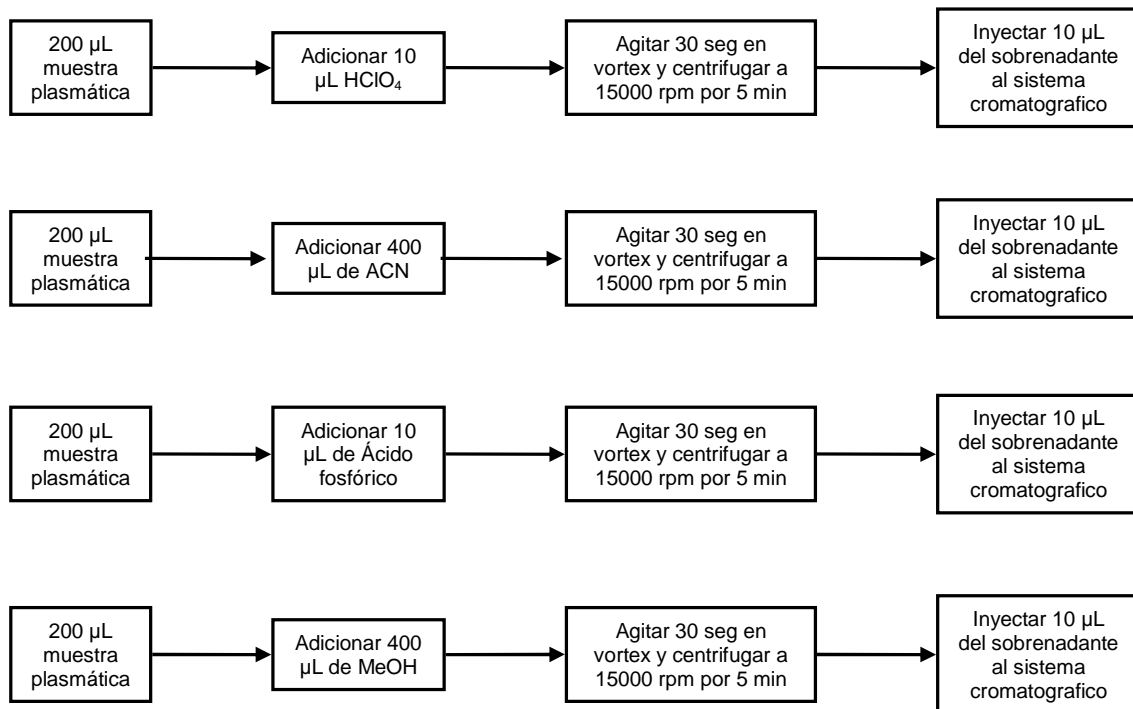


Figura 1. Técnicas de extracción por precipitación de proteínas.

Se evaluó la siguiente técnica de extracción líquido- líquido:

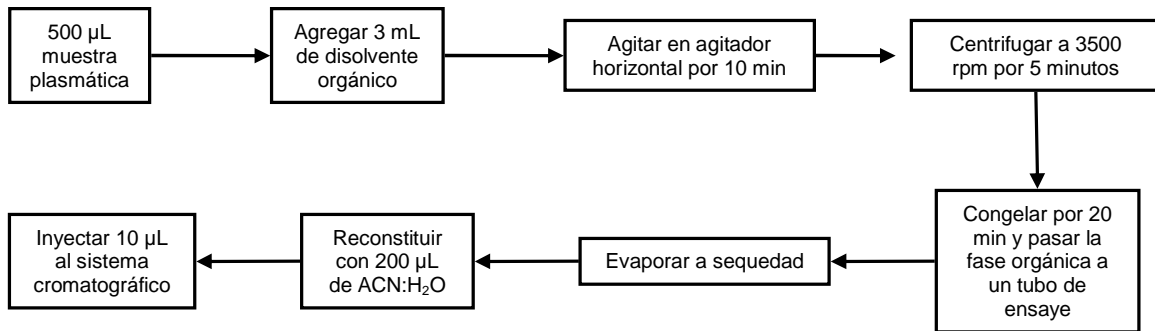


Figura 2. Técnica de extracción líquido-líquido

En la técnica de extracción líquido-líquido anteriormente descrita se utilizaron como disolventes orgánicos: diclorometano, éter y metil-terbutil-éter .

4.3. Validación del método analítico

Con el propósito de contar con un método analítico confiable para la cuantificación de carvedilol en plasma, éste se validó siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana 177-SSA1-1998, en el apartado que se refiere a la validación de métodos analíticos para el análisis químico de muestras biológicas en pruebas de bioequivalencia.

Antes de cada corrida se evaluó la selectividad, inyectando un blanco de reactivos y uno de plasma, los cuales se analizaron a las condiciones cromatográficas establecidas. En ninguno de los casos se deben presentar interferencias con el pico de interés

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

Se prepararon cada uno de los puntos de la curva de calibración y puntos control tal y como se muestra en la siguiente tabla, utilizando pipeta repetidora eppendorf y puntas de diferentes volúmenes para tomar las alícuotas correspondientes. Depositar las alícuotas anteriores (50 µL de volumen final) en microtubos de 2 mL. Añadir 950 µL de plasma a cada tubo para completar 1 mL y agitar en vórtex durante 30 segundos.

Tabla 1. Preparación de la curva de calibración y puntos control

Volumen carvedilol (0.05 µg/mL) µL	Volumen carvedilol (0.5 µg/mL) µL	Volumen carvedilol (2 µg/mL) µL	Volumen MeOH µL	Volumen plasma µL	Concentración carvedilol (ng/mL)
10	-	-	40	950	0.5***
20	-	-	30	950	1**
40	-	-	10	950	2
50	-	-	0	950	2.5*
-	10	-	40	950	5
-	20	-	30	950	10
-	40	-	10	950	20
-	-	15	35	950	30
-	-	25	25	950	50*
-	-	35	15	950	70
-	-	45	5	950	90*
-	-	50	0	950	100

*Puntos control de calidad bajo, medio y alto.

Límite de cuantificación; *Límite de detección

4.3.2. Linealidad

Se prepararon cinco curvas de calibración a partir de pesadas independientes en cinco días diferentes, contemplando las concentraciones de 1, 2, 5, 10, 20, 30, 70 y 100 ng/mL, tal y como se describe en la tabla anterior y posteriormente se procesaron de acuerdo al método de extracción desarrollado (sección 5.1.5 "Método de extracción") La relación entre la respuesta cromatográfica con respecto a la concentración en cada curva de calibración, fue ajustado a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados de la ecuación $y = mx + b$, donde la variable "y" es el área de carvedilol obtenida para la concentración nominal. Se consideró que el método cumplía con este parámetro, si al realizar el ajuste en cada una de las cinco curvas se obtenía un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.99 y la desviación porcentual de la concentración recuperada

(interpolada) con respecto a la nominal (adicionada) era menor o igual al $\pm 15\%$ en todos los puntos que constituyen la curva de calibración, a excepción del límite de cuantificación cuya desviación no debía ser mayor al $\pm 20\%$.

4.3.3. Precisión del método

Repetibilidad

A partir de una solución de referencia se prepararon y cuantificaron por quintuplicado, muestras plasmáticas con carvedilol de 2.5, 50 y 90 ng/mL, éstas se procesaron con el método ya establecido (sección 5.1.5 "Método de extracción"), estas muestras no pertenecen a la curva, pero se encuentran dentro del intervalo de concentraciones establecido. Con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las 5 determinaciones de cada nivel. El coeficiente de variación no debe ser mayor al $\pm 15\%$.

Reproducibilidad

Se evaluó la reproducibilidad entre días y entre investigadores

- **Reproducibilidad entre días**

Para evaluar la reproducibilidad entre días se preparó una curva de calibración con controles de calidad (2.5, 50 y 90 ng/mL) por quintuplicado, durante tres días diferentes, empleando cada día una solución de referencia preparada 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 debe ser mayor al $\pm 15\%$ en cada nivel de concentración.

- **Reproducibilidad entre analistas**

Analista 1 y analista 2. Cada analista preparó una curva de calibración de carvedilol con controles de calidad (2.5, 50, y 90 ng/mL) por quintuplicado, se procesaron con el método ya establecido (sección 5.1.5 “Método de extracción”), este proceso se realizó durante tres días empleando cada día una solución de referencia preparada recientemente.

Se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los puntos control de calidad (concentración recuperada), para cada analista y en conjunto (entre analistas), tomando en cuenta las determinaciones realizadas durante los tres días. El coeficiente de variación global no debe ser mayor al $\pm 15\%$ en cada nivel de concentración.

4.3.4. Exactitud del método

La exactitud se evaluó a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, determinando la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones obtenidas en cada nivel, con respecto a la concentración nominal de la muestra. El valor promedio en cada nivel de concentración de los puntos control durante las pruebas realizadas para evaluar repetibilidad y reproducibilidad, debieron estar dentro del $\pm 15\%$ de su valor nominal correspondiente, utilizando la siguiente ecuación:

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

4.3.5. Recuperación absoluta (% recobro)

Se prepararon por quintuplicado los puntos control de calidad de carvedilol en plasma (2.5, 50 y 90 ng/mL) se compararon sus respuestas cromatográficas (área de pico) promedio obtenidas después de aplicar la técnica de extracción en el fluido biológico contra la respuesta obtenida en muestras en solución preparadas a concentraciones equivalentes, las cuales no fueron sometidas al proceso de extracción (muestras para evaluación del sistema).

El recobro no necesariamente debe ser del 100%, pero tuvo que ser constante en los tres niveles de concentración evaluados.

4.3.6. Límite de cuantificación

Se prepararon por quintuplicado, muestras de carvedilol en plasma a la concentración más baja del intervalo de trabajo (1ng/mL), las cuales fueron procesadas con el método ya establecido. Se calculó el coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta. El límite de cuantificación (LC) es la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor promedio no debe desviarse más del $\pm 20\%$ del valor nominal, con un $CV \leq 20\%$.

4.3.7. Límite de detección

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

Se prepararon por quintuplicado, muestras de carvedilol en plasma a la concentración de 0.5 ng/mL las cuales fueron procesadas con el método ya establecido (sección 5.1.5 "Método de extracción").

4.3.8. Selectividad del método

La selectividad del método fue determinada, analizando las muestras de plasma provenientes de seis voluntarios sanos diferentes (de forma individual y en mezcla) sometiéndolas por duplicado al método de extracción (sección 5.1.5 "Método de extracción"). Se consideró que el método analítico era selectivo si en las seis muestras plasmáticas no se presentaba interferencia alguna en el tiempo de retención de carvedilol.

Se evaluó la selectividad del método en muestras plasmáticas conteniendo fármacos de uso común como ácido acetilsalicílico, naproxeno, paracetamol, cafeína y anticoagulante heparina 143 unidades USP. Evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de carvedilol.

4.3.9. Estabilidad

Se realizó esta prueba para determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que carvedilol es estable en plasma, durante su manejo, almacenamiento y

procesamiento, evaluando la concentración recuperada del compuesto por analizar en la matriz biológica.

Se evaluó la estabilidad en plasma bajo las siguientes condiciones:

Estabilidad temperatura ambiente. Se prepararon por triplicado una serie de muestras plasmáticas correspondientes a los puntos de control de calidad (2.5, 50 y 90 ng/mL) de carvedilol y se mantuvieron a temperatura ambiente. Dicha serie se procesó a las 48 hrs con el método ya establecido (sección 5.1.5 “Método de extracción”).

Estabilidad en refrigeración. Se prepararon por triplicado una serie de muestras plasmáticas correspondientes a los puntos de control de calidad (2.5, 50 y 90 ng/mL) de carvedilol y se almacenaron en refrigeración. Dicha serie se procesó al transcurrir 48 hrs con el método ya establecido (sección 5.1.5 “Método de extracción”).

Estabilidad ciclos congelación-descongelación. Se prepararon por triplicado tres series de muestras plasmáticas correspondientes a los puntos de control de calidad (2.5, 50 y 90 ng/mL) de carvedilol y se almacenaron en el ultracongelador (-70°C) dejando las muestras un periodo mínimo de 12 horas a -70°C entre cada ciclo. Se procesó una serie cada día con el fin de evaluar tres ciclos de congelación-descongelación con el método ya establecido (sección 5.1.5 “Método de extracción”).

Estabilidad muestra procesada. Para determinar la estabilidad de la muestra procesada, se prepararon por triplicado los puntos de control de calidad (2.5, 50 y 90 ng/mL) de carvedilol en plasma, las cuales se sometieron al procedimiento de extracción y se inyectaron al sistema cromatográfico (tiempo cero). Las muestras se almacenaron en el automuestreador y se inyectaron de nuevo a las 24, 48 y 72 horas después de su preparación.

Estabilidad largo plazo. Se prepararon por triplicado dos series de muestras plasmáticas correspondientes a los puntos de control de calidad (2.5, 50 y 90 ng/mL) de carvedilol y se almacenaron en el ultracongelador (-70°C) dejando las muestras durante un lapso de 16 días y 32 días. Se procesó una serie al cumplir el lapso de los días anteriormente

mencionados con el fin de evaluar la estabilidad a largo plazo con el método ya establecido (sección 5.1.5 "Método de extracción").

Las muestras deben presentar un C.V. menor al $\pm 15\%$ y se considera que el compuesto de interés es estable bajo la condición evaluada si la desviación absoluta es menor al $\pm 15\%$ al ser comparadas con muestras control a la misma concentración preparadas recientemente.

4.3.10. Tolerancia

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

Cambio en la proporción de los componentes de la fase móvil a (65:35 v/v). Se prepararon por triplicado, muestras de carvedilol en plasma a las concentraciones de 2.5, 50 y 90 ng/mL, las cuales se procesaron e inyectaron a las condiciones del método originales. Se evaluó la tolerancia del método inyectando las mismas muestras modificando la proporción de la fase móvil de solución amortiguadora de fosfato monobásico de potasio 10 mM pH 2.50: ACN (50:50 v/v) a (65:35 v/v). El coeficiente de variación y desviación absoluta con respecto al valor original deben ser menores o iguales al $\pm 15\%$ en todas las concentraciones evaluadas.

Prueba de Integridad de la dilución (concentración dentro de la curva de calibración). Se preparó por triplicado una muestra del analito en plasma a una concentración dentro del rango de cuantificación (50 ng/mL). Se aplicó el proceso de extracción empleando la mitad de la muestra establecida en la metodología (100 μL) y completando el volumen a 200 μL con plasma y posteriormente se determinó la concentración del analito. La concentración interpolada y multiplicada por un factor de dilución de 2 no debe desviarse más del $\pm 15\%$ con respecto al valor nominal con un C.V. menor o igual al $\pm 15\%$.

Prueba de Integridad de la dilución (concentración por encima de la curva de calibración). Se realizó esta prueba para el caso en el que durante el estudio se presentaran muestras que superen el límite superior de la curva de calibración, para ello se prepararon por triplicado muestras del analito en plasma con una concentración de (150 ng/mL). Se aplicó el proceso de extracción empleando la mitad de la muestra establecida en la metodología (100 μ L) y completando el volumen a 200 μ L con plasma y posteriormente se determinó la concentración del analito. La concentración interpolada y multiplicada por un factor de dilución de 2 no debe desviarse más del $\pm 15\%$ con respecto al valor nominal con un C.V. menor o igual al $\pm 15\%$.

Tolerancia con muestras hemolizadas y lipémicas. Se realizó esta prueba para el caso en el que durante el estudio se presentaran muestras con plasma hemolizado y/o lipémico, para ello se prepararon por triplicado muestras con plasma hemolizado y lipémico a las concentraciones de 2.5, 50 y 90 ng/mL de carvedilol.

Las muestras deben presentar un C.V. menor al $\pm 15\%$ y se considera que este tipo de muestras no afecta la cuantificación de carvedilol si la desviación absoluta es menor $\pm 15\%$ al ser comparadas con muestras control a la misma concentración preparadas recientemente.

4.4. Aplicación del método analítico en un estudio de biodisponibilidad

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

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

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

En el estudio de carvedilol participaron 12 voluntarios sanos (6 hombres y 6 mujeres), a los que se les administró una dosis de 25 mg de carvedilol.

4.4.1. Criterios de inclusión

- La participación de los sujetos en el estudio de carvedilol fue de manera voluntaria.
- Se incluyeron solamente voluntarios sanos, de entre 18 a 40 años de edad.
- El índice de masa corporal de los voluntarios sanos estuvo entre 18 a 27(Kg/m²).
- Cada voluntario contaba con un buen estado de salud determinado por los resultados de una historia clínica completa realizada por médicos capacitados y los estudios de laboratorio realizados en laboratorios clínicos certificados.

- Los límites de variación permitidos dentro de la normalidad en la visita de selección fueron: tensión arterial (sentado) de 90 a 130 mmHg la sistólica y de 60 a 90 mmHg la diastólica, frecuencia cardíaca entre 55 y 100 latidos por minuto y frecuencia respiratoria entre 14 y 20 respiraciones por minuto.

4.4.2. Criterios de exclusión

- Se eliminó del estudio a todo aquel voluntario que no cumplió con los criterios de inclusión propuestos.
- A los individuos que se les encontró alguna alteración en sus signos vitales registrados en la selección de voluntarios se les excluyó del estudio.
- No se incluyeron los sujetos que mostraron antecedentes de drogadicción o de abuso de fármacos.
- Los sujetos que revelaron resultados positivos a la prueba de embarazo.
- Voluntarios que requirieran de cualquier medicamento durante el estudio, aparte del medicamento que se encontraba en estudio.
- Voluntarios que fueron hospitalizados por cualquier problema durante los cuatro meses previos al inicio del estudio.
- Voluntarios que hayan recibido fármacos en investigación dos meses antes del presente estudio.
- Sujetos que donaron o perdieron 450 mL o más de sangre dentro de los 2 meses previos al inicio del estudio.
- Voluntarios que no cumplieron con los criterios de inclusión propuestos.

4.4.3. Retiro de voluntarios del estudio

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

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

4.4.4. Evolución del estudio de biodisponibilidad

Los voluntarios sanos fueron admitidos en la unidad clínica de IFaB, siendo hospitalizados entre las 18:00 y 19:00 horas del día previo a la administración del fármaco. Una vez ingresados los voluntarios y asignado su lugar dentro del estudio, se verificó su adecuado estado de hidratación, signos vitales y se realizó prueba de abuso de drogas a todos los voluntarios. Recibieron cena y permanecieron en ayuno a partir de las 22:00 horas. Al otro día por la mañana, los voluntarios fueron canalizados mediante un catéter en alguna de las venas del brazo y se tomó la muestra correspondiente al tiempo 0. A cada voluntario se le administró una tableta conteniendo 25 mg de carvedilol, después de por lo menos 10 horas de ayuno y 3 horas antes del desayuno con 250 mL de agua.

Las muestras sanguíneas fueron recolectadas y procesadas para obtener el plasma a los siguientes tiempos: 0.167, 0.333, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.25, 2.5, 3, 4, 6, 9, 12, 18, 24, 36 y 48 horas después de la administración. Se efectuó registro de signos vitales durante cada una de las tomas de las muestras.

No se tomó ningún otro medicamento durante el tiempo que duró el estudio a menos que sea necesario ante la presencia de reacciones adversas y autorizado por el médico responsable. Los sujetos debieron reportar al personal médico 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.

4.4.5. Análisis de las muestras plasmáticas

Se realizó el análisis de 252 muestras correspondientes a 12 voluntarios, las cuales fueron procesadas y cuantificadas utilizando el método de cromatografía de líquidos de alta resolución con detector por fluorescencia previamente desarrollado y validado.

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

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

Las muestras del estudio se analizaron junto con una curva de calibración y puntos control de calidad 2.5, 50 y 90 ng/mL de carvedilol, para evaluar la validez de la corrida analítica se demostró la consistencia de las curvas de calibración con respecto a la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación en cada día de análisis, las muestras de los puntos control de calidad deben cumplir con los criterios de precisión y exactitud establecidos en la validación del método.

4.4.6. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos

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

Cálculo 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.

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

Donde:

C_f = Concentración de la última muestra

Ke = Constante de eliminación

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

Vida media de eliminación: Mediante el cociente de $\ln(2) / Ke$

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

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

Donde:

t_f = Tiempo de la última muestra

C_f = Concentración de la última muestra

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

BIBLIOGRAFIA

5. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Se buscaron las condiciones cromatográficas óptimas para la cuantificación de carvedilol en plasma, probando distintas columnas cromatográficas, cambiando la proporción de fase móvil, composición de fase móvil, velocidad de flujo y volumen de inyección.

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

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

5.1. Desarrollo del método analítico

5.1.1. Condiciones del detector

El detector de fluorescencia utilizado durante el desarrollo, validación y análisis de muestras de voluntarios fue Waters modelo 474e a una longitud de onda de λ excitación a 240 nm y una λ de emisión de 340 nm ya que bajo estas condiciones se obtiene una mayor altura para el pico de interés carvedilol y una menor interferencia de los compuestos endógenos del plasma.

5.1.2. Columna cromatográfica y fase móvil

De las columnas que se probaron se obtuvo mejores resultados con la columna spherisorb CNRP 250 x 4.6 mm de diámetro interno y 5 μ m de tamaño de partícula, ya que esta columna permitió obtener picos de buena forma lo cual nos asegura una adecuada integración y con ello una cuantificación confiable, la fase móvil ideal para la

cuantificación de carvedilol en plasma consistió en solución amortiguadora de fosfatos 10mM pH 2.50:ACN bajo una proporción (50:50 v/v).

5.1.3. Volumen de inyección y velocidad de flujo

Se probó el rango de volumen de inyección de 10 a 30 μ L y un rango de velocidad de flujo de 1 a 1.5 mL/min, sin embargo las condiciones en donde se obtuvieron mejores resultados fue utilizando un volumen de inyección de 10 μ L y una velocidad de flujo de 1.5 mL/min, ya que bajo estas condiciones se obtuvo una buena resolución y simetría del pico de interés.

5.1.4. Estándar interno

No se utilizó ninguno de los analitos probados como estándar interno ya que no se logro una buena resolución entre los picos de interés, ni un tiempo de corrida adecuado, por lo que al final se decidió no utilizar algún estándar interno ya que al aplicar la técnica de extracción el método perdía reproducibilidad.

Por lo tanto las condiciones cromatográficas establecidas después de realizar diferentes pruebas fueron las que se describen a continuación en la siguiente tabla:

Tabla 1. Condiciones cromatográficas

Parámetro	Descripción
Detector	Fluorescencia
Longitud de excitación y emisión	λ_{ex} 240m λ_{em} 340m
Columna	Spherisorb CN RP 5 μ m 4.6 x 250 mm
Fase Móvil:	Solución amortiguadora de fosfatos 10 mM pH 2.50:ACN (50:50 v/v)
Velocidad de Flujo	1.5 mL/min
Volumen de inyección	10 μ L
Temperatura columna	30°C
Temperatura automuestreador	20°C
Solución de lavado del sistema	Acetonitrilo:agua (50:50 v/v)
Tiempo de retención aproximado: Carvedilol	7-8 minutos

5.1.5. Método de extracción

El método de extracción se determinó en función de un recobro constante en el rango de concentraciones de trabajo, así como la selectividad del método hacia algunas interferencias que pudiesen presentarse al tiempo de retención del carvedilol.

Al utilizar el ácido perclórico como agente precipitante, el recobro obtenido era muy bajo (30%) por lo tanto se descarto utilizar dicho ácido en la técnica de extracción.

Al utilizar metanol como agente precipitante se obtenían picos asimétricos, por lo que se descarto utilizarlo como agente precipitante.

También se descarto el utilizar el ácido fosfórico ya que dañaba las columnas cromatográficas en muy poco tiempo.

Al probar la técnica de extracción liquido-liquido se emplearon diferentes disolventes orgánicos, los utilizados fueron diclorometano, éter y metil-terbutil-éter, sin embargo en todos los casos se obtiene un recobro muy bajo (40%), por lo tanto se descarto utilizar esta técnica de extracción.

Se decidió utilizar acetonitrilo como agente precipitante ya que se obtuvo un recobro del 100 % y el método demostró ser constante en cada nivel de concentración evaluado, además de que el método fue selectivo y la técnica de extracción es sencilla y requiere de poco tiempo de trabajo.

El método de extracción con el que obtuvimos mejores resultados se describe a continuación:

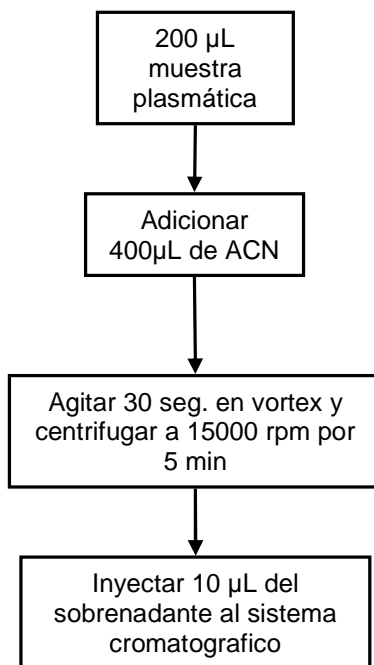


Figura 1. Diagrama del método de extracción

5.2. Resultados de validación

5.2.1. Selectividad de Inicio de Corrida

Durante cada día de corrida en los días de validación se evaluó la selectividad inyectando un blanco de reactivos y un blanco de plasma, en ninguna corrida se presentaron interferencias en el tiempo de retención de carvedilol.

5.2.2. Selectividad del método

Para comprobar que los componentes del plasma no interfieren con la señal del analito de interés se analizaron seis blancos de plasma obtenidos de diferentes donadores sanos y una muestra con la mezcla de los seis plasmas.

También se evaluó la posible interferencia hacia muestras conteniendo fármacos de uso común como ácido acetilsalicílico, naproxeno, paracetamol y el anticoagulante (heparina 143 unidades USP).

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

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

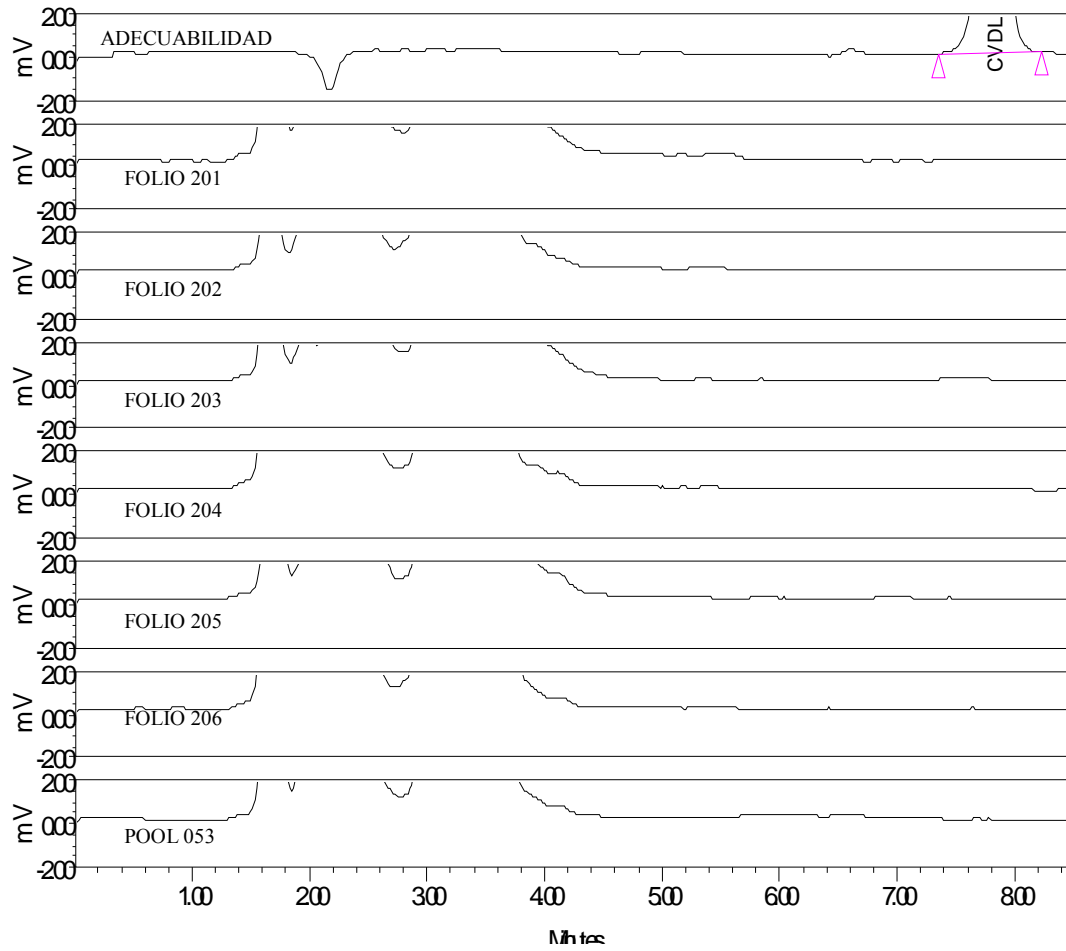


Figura 2. Selectividad del Método para la mezcla de plasma y plasmas individuales

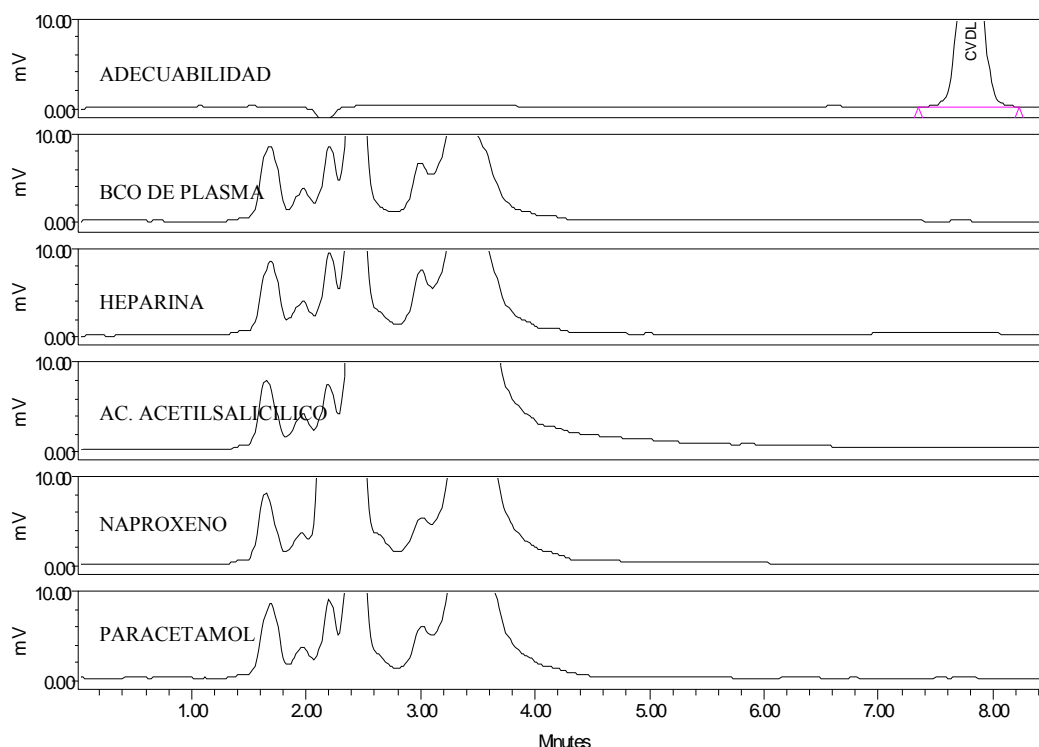


Figura 3. Selectividad del Método para fármacos de uso común

5.2.3. Linealidad del método

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

El método fue lineal en un intervalo de concentraciones de 1 a 100 ng/mL, todos los valores correspondientes al coeficiente de correlación "r" obtenidos fueron mayores a 0.99, además de que en cada punto de la curva de calibración se dio cumplimiento a los criterios establecidos para precisión y exactitud, mostrando un C.V% y desviación absoluta porcentual menor o igual al $\pm 15\%$ incluso para el límite de cuantificación.

La siguiente tabla muestra los resultados de la linealidad del método para la cuantificación de carvedilol en plasma.

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

Tabla 2. Linealidad del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma

Concentración nominal	Día	Área	Concentración Inerpolada	%Desv	% C.V	% Desv. Promedio
CP 1	1	3542.00	0.98	1.63	2.63	1.55
	2	3158.50	1.05	4.90		
	3	4688.00	1.01	0.70		
	4	4687.00	1.04	3.72		
	5	4633.00	1.00	0.06		
CP 2	1	7677.50	2.07	3.39	5.48	-2.19
	2	5907.00	1.79	10.59		
	3	8444.00	1.97	1.34		
	4	7971.00	1.93	3.48		
	5	8437.50	2.02	1.05		
CP 5	1	19074.00	5.06	1.10	5.86	-2.92
	2	18245.00	5.11	2.12		
	3	20229.00	5.01	0.09		
	4	17290.50	4.47	10.69		
	5	18203.00	4.64	7.20		
CP 10	1	37082.50	9.78	2.25	4.81	0.28
	2	35861.00	9.84	1.56		
	3	39301.00	9.91	0.90		
	4	36634.00	9.73	2.73		
	5	41476.00	10.88	8.82		
CP 20	1	75247.00	19.78	1.11	1.98	1.58
	2	75298.00	20.45	2.25		
	3	79000.50	20.12	0.61		
	4	77592.00	20.87	4.34		
	5	76809.00	20.36	1.80		
CP 30	1	113826.50	29.89	0.36	2.80	0.24
	2	109873.50	29.75	0.84		
	3	117728.50	30.08	0.28		
	4	116510.00	31.45	4.84		
	5	109701.00	29.18	2.73		
CP 70	1	265507.00	69.65	0.50	1.34	-0.06
	2	260856.00	70.35	0.50		
	3	271571.00	69.66	0.49		
	4	263104.00	71.33	1.90		
	5	257462.00	68.81	1.70		
CP 100	1	386471.00	101.36	1.36	1.22	1.52
	2	383069.00	103.22	3.22		
	3	393584.00	101.04	1.04		
	4	376228.00	102.10	2.10		
	5	373346.00	99.89	0.11		

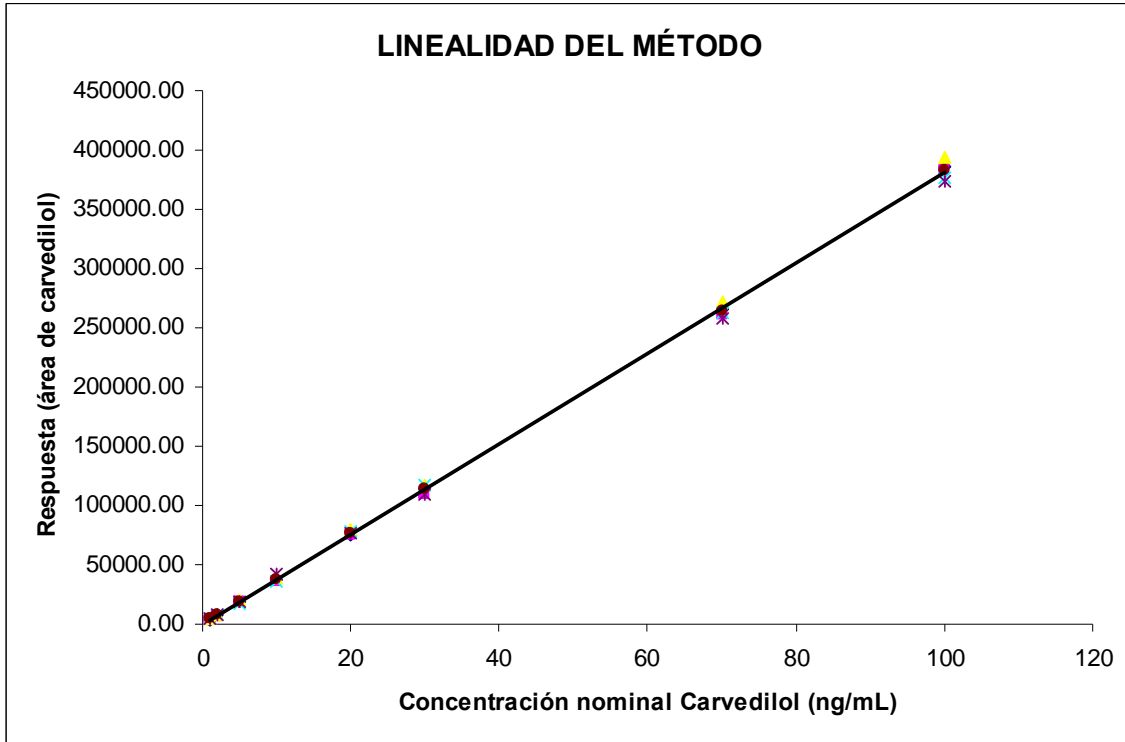


Figura 4. Gráfico de linealidad del método

Tabla 3. Parámetros de linealidad del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma

Parámetros de linealidad del método para las corridas de validación			
Curva	Pendiente	Ordenada	r
1	3815.06	-210.98	1.000
2	3718.45	-742.28	0.998
3	3887.57	773.26	1.000
4	3676.44	873.69	0.998
5	3728.38	902.44	0.999
Promedio	3765.182	319.226	0.999

5.2.4. Precisión del método

En la siguiente tabla se ilustran los resultados correspondientes a la repetibilidad del método para cuantificar carvedilol en plasma:

Tabla 4. Repetibilidad del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma

Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.61	47.84	89.52
2	2.53	50.97	87.94
3	2.55	48.21	89.11
4	2.30	48.81	86.92
5	2.62	49.16	88.51
Promedio	2.53	49.00	88.40
D. E	0.13	1.22	1.02
C. V (%)	5.16	2.48	1.16
Desv. Abs. (%)	1.05	1.99	1.77

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

- **Reproducibilidad analista 1 y exactitud interdía**

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la reproducibilidad del método y exactitud interdía del analista 1 en donde se observa que el método es reproducible porque el coeficiente de variación obtenido de las concentraciones recuperadas de

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

muestras analizadas en tres días de trabajo fue menor al $\pm 15\%$ en las diferentes concentraciones evaluadas.

Tabla 5. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma investigador 1

Inv / Día	Concentración		
	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
Inv 1 Día 1	2.62	47.85	89.53
	2.54	50.98	87.94
	2.55	48.22	89.12
	2.30	48.82	86.92
	2.62	49.17	88.51
Inv 1 Día 2	2.55	48.79	90.92
	2.65	49.77	92.00
	2.68	51.11	91.32
	2.61	50.37	90.24
	2.68	49.51	91.35
Inv 1 Día 3	2.59	48.28	86.89
	2.75	46.61	85.57
	2.76	47.48	85.52
	2.67	49.24	86.33
	2.51	47.89	88.92
Promedio	2.60	48.94	88.74
D. E	0.11	1.28	2.16
C. V (%)	4.27	2.61	2.44
Conc. Nominal (ng/mL)	2.50	50.00	90.00
Desv. Abs. (%)	4.18	2.12	1.40

- **Reproducibilidad analista 2 y exactitud interdía**

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la reproducibilidad del método y exactitud interdía del investigador 2, en donde se observa que el método es reproducible porque el coeficiente de variación obtenido de las concentraciones recuperadas de muestras analizadas en tres días de trabajo fue menor al $\pm 15\%$ en las diferentes concentraciones evaluadas.

Tabla 6. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar carvedilol investigador 2

Inv / Día	Concentración		
	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
Inv 2 Día 1	2.43	50.53	89.90
	2.32	50.49	91.38
	2.65	50.44	102.68
	2.57	48.90	93.54
	2.59	51.39	91.42
Inv 2 Día 2	2.47	53.98	90.27
	2.44	54.19	88.86
	2.43	54.57	89.04
	2.27	55.45	89.99
	2.33	54.84	88.24
Inv 2 Día 3	2.61	50.33	94.67
	2.52	51.65	93.42
	2.84	51.58	92.23
	2.55	50.44	91.55
	2.51	50.50	90.96
Promedio	2.50	52.05	91.88
D. E	0.15	2.11	3.50
C. V (%)	5.82	4.05	3.81
Conc. Nominal (ng/mL)	2.50	50.00	90.00
Desv. Abs. (%)	0.09	4.11	2.08

De acuerdo a los resultados anteriormente analizados podemos decir que al aplicar el método repetidas veces, bajo diferentes condiciones de trabajo (diferentes días) obtendremos resultados con poca variabilidad entre ellos.

- **Reproducibilidad y exactitud entre investigadores**

En la siguiente tabla se muestran los resultados de la reproducibilidad del método y exactitud entre investigadores, en donde se observa que el coeficiente de variación global entre ambos investigadores fue de 3.63 a 5.39%, mientras que la desviación absoluta % fue de 2.13%, en las diferentes concentraciones evaluadas.

Tabla 7. Reproducibilidad del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma entre investigadores

Concentración nominal	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
Promedio global	2.55	50.44	90.31
D. E. global	0.14	2.32	3.27
C. V (%)	5.39	4.60	3.63
Conc. Nominal	2.50	50.00	90.00
Desv. Abs. (%)	2.13	0.88	0.34

De acuerdo con los resultados generados, el método es reproducible entre investigadores al presentar un coeficiente de variación global y una desviación absoluta % no mayores al $\pm 15\%$ para la concentración plasmática promedio.

5.2.5. Recobro

El recobro del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma fue constante en las concentraciones evaluadas de los puntos control bajo, medio y alto (2.5, 50, 90 ng/mL), dando como resultado un recobro global de 101.39 % y una desviación de los promedios individuales con respecto al global, menor al $\pm 15\%$, por lo tanto se demostró que el recobro fue reproducible.

Tabla 8. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma

Nivel de concentración	ÁREAS		Recobro	% desv
	SISTEMA	MÉTODO		
Control Bajo (2.5 ng/mL)	9996	10284		
	10813	10369		
	9046	10793		
	11331	10543		
	10179	10572		
Promedio	10273	10512	102.33	0.92
Control Medio (50 ng/mL)	180987	184148		
	181350	183312		
	182638	183701		
	180708	183752		
	181094	181744		
Promedio	181355	183331	101.09	0.30
Control Alto (90 ng/mL)	326280	337659		
	326870	332539		
	327723	331949		
	338434	324361		
	327211	332563		
Promedio	329304	331814	100.76	0.62
	Promedio Global		101.39	0.61

5.2.6. Límite de cuantificación

Se consideró como límite de cuantificación la concentración de 1 ng/mL de carvedilol, debido a que a esta concentración el coeficiente de variación al igual que el porcentaje de desviación absoluta, fueron menores al $\pm 20\%$.

Tabla 9. Límite de cuantificación del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma

Muestra	Límite de cuantificación (1ng/mL)
1	1.09
2	1.10
3	0.93
4	1.13
5	0.89
Promedio	1.03
D.E	0.11
C.V (%)	10.86
Desv. Abs. (%)	2.90

5.2.7. Límite de detección

Se consideró como límite de detección la concentración de 0.5 ng/mL ya que con esta concentración la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica se distingue del nivel de ruido (aproximadamente 3 veces mayor) y la desv. Abs % es mayor al $\pm 20\%$. La relación señal ruido obtenida fue de 4.75.

Tabla 10. Límite de detección del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma

Muestra	Límite de detección (0.5ng/mL)
1	0.68
2	0.51
3	0.68
4	0.48
5	0.69
Promedio	0.61
D.E	0.10
C.V (%)	16.98
Desv. Abs. (%)	21.00

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

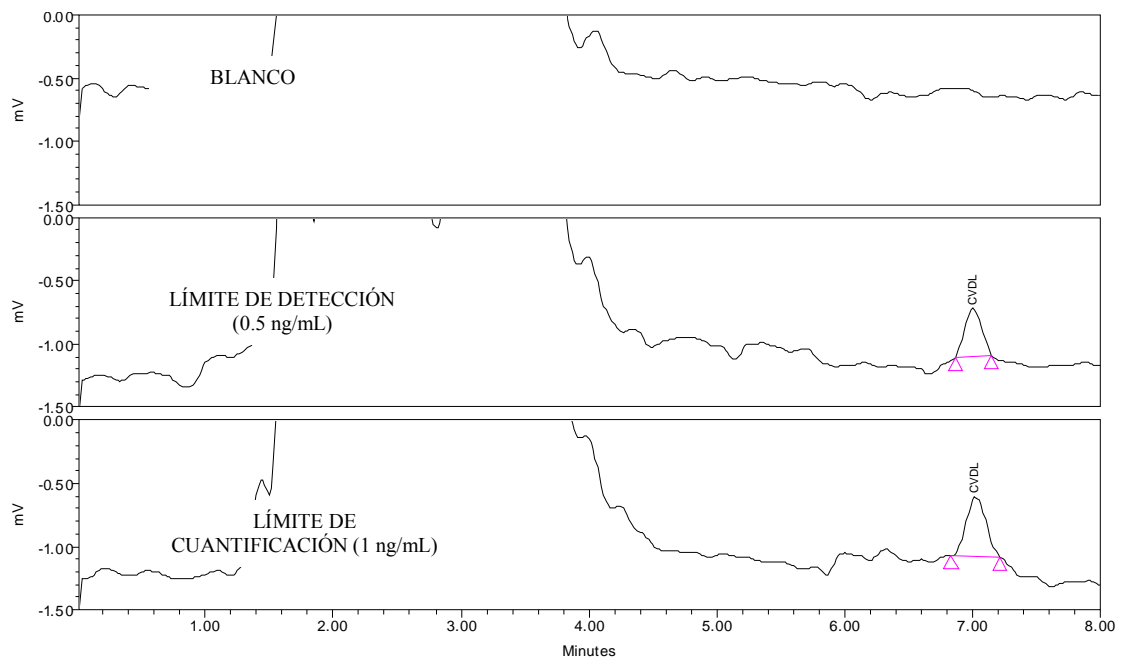


Figura 5. Límite de detección y cuantificación

5.2.8. Estabilidad

Las pruebas de estabilidad se realizan para determinar las condiciones a las cuales carvedilol permanece estable durante su manejo y procesamiento.

Temperatura ambiente (27°C) después de 48 horas. La estabilidad a temperatura ambiente se analizó evaluando una serie de controles por triplicado a las 48 horas posteriores a su preparación, las concentraciones obtenidas se comparan contra las concentraciones obtenidas en muestras control preparadas recientemente. En la siguiente tabla se presentan los resultados de estabilidad de muestras plasmáticas conteniendo carvedilol almacenadas a temperatura ambiente (27°C) evaluado en un lapso de 48 horas.

Tabla 11. Estabilidad temperatura ambiente (27°C) de carvedilol en plasma después de 48 horas

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.72	47.90	87.18
2	2.33	49.17	89.67
3	2.31	49.34	88.17
Promedio	2.46	48.80	88.34
D.E	0.23	0.79	1.25
C.V. (%)	9.37	1.61	1.42
Concentraciones plasmáticas después de 48 horas			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.77	51.18	92.85
2	2.41	49.86	93.72
3	2.40	51.60	94.70
Promedio	2.53	50.88	93.76
D.E	0.21	0.91	0.93
C.V. (%)	8.30	1.79	0.99
Desv. Abs. (%)	2.93	4.26	6.14

RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

De acuerdo a los valores de concentración interpolada promedio obtenidas de las determinaciones en cada nivel de concentración, se obtiene una desviación absoluta menor al $\pm 15\%$ del valor de referencia (muestras recién preparadas), por lo tanto las muestras plasmáticas de carvedilol son estables a temperatura ambiente por 48 horas.

Estabilidad en refrigeración (3°C) después de 48 horas. La estabilidad en refrigeración de carvedilol (3°C) se analizó evaluando una serie de controles por triplicado a las 48 horas posteriores a su preparación, las concentraciones obtenidas se comparan contra las concentraciones obtenidas en muestras control preparadas recientemente. En la siguiente tabla se presentan los resultados de estabilidad de muestras plasmáticas conteniendo carvedilol almacenadas en refrigeración (3°C) evaluadas en un lapso después de 48 horas.

Tabla 12. Estabilidad en refrigeración (3°C) de carvedilol en plasma después de 48 horas

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.72	47.90	87.18
2	2.33	49.17	89.67
3	2.31	49.34	88.17
Promedio	2.46	48.80	88.34
D.E	0.23	0.79	1.25
C.V. (%)	9.37	1.61	1.42
Concentraciones plasmáticas después de 48 h			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.25	51.21	91.89
2	2.13	51.51	94.37
3	2.42	49.16	90.70
Promedio	2.27	50.63	92.32
D.E	0.15	1.28	1.87
C.V. (%)	6.42	2.53	2.03
Desv. Abs. (%)	7.67	3.74	4.51

De acuerdo a los valores de concentración interpolada promedio obtenidas de las determinaciones en cada nivel de concentración, se obtiene una desviación absoluta menor al ± 15 % del valor de referencia (muestras recién preparadas), por lo tanto las muestras plasmáticas de carvedilol son estables al ser almacenadas en refrigeración por 48 horas.

Estabilidad ciclos congelación-descongelación (-70°C). La estabilidad en ciclos de congelación descongelación de carvedilol (-70°C) se analizó evaluando una serie de controles por triplicado para cada ciclo de congelación-descongelación, considerando que entre cada ciclo existieran no menos de 12 horas para poder procesar la serie correspondiente.

Las concentraciones obtenidas se comparan contra las concentraciones obtenidas en muestras control preparadas recientemente. En la siguiente tabla se presentan los resultados de estabilidad de muestras plasmáticas conteniendo carvedilol almacenadas en congelación (-70 °C).

Tabla 13. Estabilidad ciclos congelación descongelación carvedilol ciclo 1

Ciclo 1			
Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.52	49.15	90.32
2	2.54	48.93	88.95
3	2.65	49.03	88.79
Promedio	2.57	49.03	89.35
D.E	0.07	0.11	0.84
C.V. (%)	2.86	0.23	0.94
Concentraciones plasmáticas después del Ciclo 1			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.42	49.23	91.93
2	2.68	49.88	93.28
3	2.10	51.24	90.11
Promedio	2.40	50.12	91.77
D.E	0.29	1.03	1.59
C.V. (%)	11.99	2.05	1.73
Desv. Abs. (%)	6.59	2.21	2.71

Tabla 14. Estabilidad ciclos congelación descongelación carvedilol ciclo 2

Ciclo 2			
Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.72	47.90	87.18
2	2.33	49.17	89.67
3	2.31	49.34	88.17
Promedio	2.46	48.80	88.34
D.E	0.23	0.79	1.25
C.V. (%)	9.37	1.61	1.42
Concentraciones plasmáticas después del Ciclo 2			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.35	51.15	89.79
2	2.30	50.50	92.39
3	2.47	49.02	91.89
Promedio	2.37	50.22	91.36
D.E	0.08	1.09	1.38
C.V. (%)	3.56	2.18	1.51
Desv. Abs. (%)	3.31	2.91	3.42

Tabla 15. Estabilidad ciclos congelación descongelación carvedilol ciclo 3

Ciclo 3			
Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.16	49.15	88.98
2	2.50	48.87	88.20
3	2.44	45.11	88.64
Promedio	2.37	47.71	88.61
D.E	0.18	2.26	0.39
C.V. (%)	7.65	4.74	0.44
Concentraciones plasmáticas después del Ciclo 3			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.44	49.76	92.48
2	2.36	51.19	92.72
3	2.54	48.24	88.75
Promedio	2.45	49.73	91.31
D.E	0.09	1.47	2.23
C.V. (%)	3.72	2.96	2.44
Desv. Abs. (%)	3.38	4.24	3.05

Las muestras plasmáticas conteniendo carvedilol son estables después de ser sometidas a tres ciclos de congelación-descongelación al presentarse coeficientes de variación menores al 15% y presentar una diferencia no mayor al $\pm 15\%$ con respecto al valor de referencia (muestras recién preparadas).

Estabilidad de la muestra procesada. Las muestras procesadas permanecieron en el automuestreador a 20°C y fueron inyectadas al sistema cromatográfico a las 48 y 72 horas posteriores a su procesamiento, las cuales fueron comparadas con muestras control preparadas recientemente.

Tabla 16. Estabilidad de la muestra procesada de carvedilol después de 48 horas

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.55	48.79	90.92
2	2.65	49.77	92.00
3	2.68	51.11	91.32
Promedio	2.63	49.89	91.41
D.E	0.07	1.16	0.54
C.V. (%)	2.64	2.33	0.59
Concentraciones plasmáticas después de 48 horas			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.75	54.98	96.20
2	2.74	51.74	95.45
3	2.73	54.37	99.62
Promedio	2.74	53.69	97.09
D.E	0.01	1.72	2.22
C.V. (%)	0.40	3.21	2.29
Desv. Abs. (%)	4.47	7.62	6.21

Tabla 17. Estabilidad de la muestra procesada de carvedilol después de 72 horas

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.59	48.28	86.89
2	2.75	46.61	85.57
3	2.76	47.48	85.52
Promedio	2.70	47.46	86.00
D.E	0.09	0.84	0.78
C.V. (%)	3.44	1.77	0.90
Concentraciones plasmáticas después de 72 horas			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.26	56.64	93.00
2	2.34	50.90	94.24
3	2.20	56.46	100.27
Promedio	2.27	54.67	95.84
D.E	0.07	3.27	3.89
C.V. (%)	3.18	5.97	4.06
Desv. Abs. (%)	15.98	15.20	11.44

De acuerdo a los resultados presentados en la tabla anterior se puede observar que carvedilol fue estable en la solución de inyección a 20°C hasta 48 horas posteriores a su preparación, ya que la concentración recuperada promedio mostró una desviación absoluta % respecto al valor original menor al $\pm 15\%$.

Estabilidad largo plazo (congelación -70°C). La estabilidad de la muestra plasmática conteniendo carvedilol bajo condiciones de almacenamiento a largo plazo se evaluó procesando y analizando una serie de controles por triplicado a los 16 y 32 días.

Tabla 18. Estabilidad a largo plazo (-70°C) de carvedilol después de 16 días

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.38	49.01	92.19
2	2.50	49.12	89.79
3	2.38	49.14	88.74
Promedio	2.42	49.09	90.24
D.E	0.07	0.07	1.77
C.V. (%)	2.91	0.14	1.96
Concentraciones plasmáticas después de 16 días			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.60	53.51	100.14
2	2.59	56.84	96.21
3	2.41	55.89	99.44
Promedio	2.53	55.41	98.60
D.E	0.11	1.72	2.10
C.V. (%)	4.26	3.10	2.13
Desv. Abs. (%)	4.61	12.88	9.26

Tabla 19. Estabilidad a largo plazo (-70°C) de carvedilol después de 32 días

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.23	49.69	90.30
2	2.53	49.26	91.08
3	2.58	50.12	92.52
Promedio	2.45	49.69	91.30
D.E	0.18	0.43	1.12
C.V. (%)	7.66	0.86	2.36
Concentraciones plasmáticas después de 32 días			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.17	51.70	96.31
2	2.22	49.41	96.04
3	2.20	53.12	96.83
Promedio	2.20	51.41	94.39
D.E	0.02	1.87	3.08
C.V. (%)	1.25	3.64	3.27
Desv. Abs. (%)	10.24	3.46	3.38

Las muestras plasmáticas conteniendo carvedilol son estables después de ser almacenadas a -70°C a lo largo de 32 días, al presentarse coeficientes de variación menores al $\pm 15\%$ y presentar una diferencia no mayor al $\pm 15\%$ con respecto al valor de referencia (muestras recién preparadas).

5.2.9. Tolerancia

A continuación se muestran los resultados de las muestras de concentraciones de 2.5, 50 y 90 ng/mL de carvedilol en plasma, las cuales se inyectaron en las condiciones originales del método y posteriormente se inyectaron modificando las condiciones del instrumento.

Cambio en proporción fase móvil (65:35 v/v). En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos modificando la proporción de la fase móvil de una condición original de (50:50 v/v) de solución amortiguadora y acetonitrilo respectivamente a una proporción de (65:35 v/v).

Tabla 20. Tolerancia del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma cambio de proporción fase móvil

Muestras de referencia			
Proporción de fase móvil (50:50 v/v) condición original			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.16	49.15	88.98
2	2.50	48.87	88.20
3	2.44	45.11	88.64
Promedio	2.37	47.71	88.61
D. E	0.18	2.26	0.39
C. V (%)	7.65	4.74	0.44
Desv. Abs. (%)	5.36	4.58	1.55
Muestras inyectadas con las condiciones modificadas			
Proporción de fase móvil (65:35 v/v)			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.61	51.95	89.09
2	2.13	49.43	89.67
3	2.20	48.96	89.59
Promedio	2.31	50.11	89.45
D. E	0.26	1.61	0.31
C. V (%)	11.09	3.21	0.35
Desv. Abs. (%)	9.99	2.20	0.11

Por lo tanto el método fue tolerante hacia el cambio de proporción de fase móvil, ya que al comparar las concentraciones interpoladas de las muestras control a las condiciones modificadas con respecto a su concentración nominal presentan una desviación absoluta menor al 15%.

Volumen parcial de muestra (concentración dentro de la curva de calibración). La prueba se realizó cuantificando tres muestras de 50 ng/mL empleando la mitad del volumen 100 µL, completando a 200 µL con una mezcla de plasma y sometiéndolas a las condiciones establecidas para la extracción. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 21. Tolerancia del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma con volumen parcial de muestra (concentración dentro de la curva de calibración).

MUESTRA DE 50 ng/mL		
MUESTRA	Concentración de muestra diluida (ng/mL)	Concentración de muestra multiplicada por factor de dilución de 2 (ng/mL)
1	25.639	51.278
2	23.292	46.584
3	22.875	45.750
PROMEDIO	23.935	47.871
DESV EST	1.490	2.980
C.V. (%)	6.225	6.225
Concentración Nominal (ng/mL)	25.0	50.0
Desv. Abs. (%)	6.832	6.832

Los resultados muestran que en caso de que no hubiera muestra suficiente para tomar 200 µL se puede tomar una alícuota menor y completar el volumen a 200 µL con plasma, sin que los resultados se vean afectados.

Volumen parcial de muestra (concentración por encima de la curva de calibración). Esta prueba se realiza para el caso de que alguna muestra presente una concentración por encima del punto más alto de la curva de calibración y pueda emplearse un volumen menor de muestra (100 µL), el cual debe completarse a 200 µL con un mezcla de plasma, logrando así que la concentración quede dentro de la curva de calibración.

Tabla 22. Tolerancia del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma con volumen parcial de muestra (concentración por encima de la curva de calibración).

MUESTRA DE 150 ng/mL		
MUESTRA	Concentración de muestra diluida (ng/mL)	Concentración de muestra multiplicada por factor de dilución de 2 (ng/mL)
1	72.164	144.328
2	72.003	144.006
3	76.282	152.564
PROMEDIO	73.483	146.966
DESV EST	2.425	4.851
C.V. (%)	3.301	3.301
Concentración Nominal (ng/mL)	75.0	150.0
Desv. Abs. (%)	3.996	3.996

Los resultados obtenidos señalan que en caso de que alguna muestra presente una concentración por encima del punto más alto de la curva de calibración al utilizar un volumen menor (100 µL), el que debe completarse a 200 µL, puede lograrse que la concentración quede dentro de la curva de calibración.

Muestras lipémicas y hemolizadas. Esta prueba se realiza para evaluar si las muestras con plasma lipémico y hemolizado afectan la cuantificación de carvedilol cuando la matriz biológica se encuentra bajo estas condiciones.

Tabla 23. Tolerancia del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma hacia muestras lipémicas.

Muestras de referencia			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.52	49.15	90.32
2	2.54	48.93	88.95
3	2.65	49.03	88.79
Promedio	2.57	49.03	89.35
D. E	0.07	0.11	0.84
C. V (%)	2.86	0.23	0.94
Desv. Abs. (%)	2.77	1.93	0.72
Muestras lipémicas			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.47	48.47	92.14
2	2.67	48.72	87.58
3	2.33	49.38	91.55
Promedio	2.49	48.86	90.42
D. E	0.17	0.47	2.48
C. V (%)	6.96	0.96	2.74
Desv. Abs. (%)	3.10	0.36	1.19

Tabla 24. Tolerancia del método analítico para cuantificar carvedilol en plasma con muestras hemolizadas.

Muestras de referencia			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.52	49.15	90.32
2	2.54	48.93	88.95
3	2.65	49.03	88.79
Promedio	2.57	49.03	89.35
D. E	0.07	0.11	0.84
C. V (%)	2.86	0.23	0.94
Desv. Abs. (%)	2.77	1.93	0.72
Muestras hemolizadas			
Muestra	Control Bajo (2.5 ng/mL)	Control Medio (50 ng/mL)	Control Alto (90 ng/mL)
1	2.61	51.95	89.09
2	2.13	49.43	89.67
3	2.20	48.96	89.59
Promedio	2.31	50.11	89.45
D. E	0.26	1.61	0.31
C. V (%)	11.09	3.21	0.35
Desv. Abs. (%)	9.99	2.20	0.11

Por lo tanto el método no se ve afectado al utilizar plasma lipémico o hemolizado.

5.3. Etapa clínica

En el estudio clínico participaron 12 voluntarios (6 hombres y 6 mujeres) clínicamente sanos demostrado a través de exámenes de laboratorio.

5.3.1. Estadística demográfica descriptiva

De los voluntarios incluidos en el estudio se calcularon los siguientes parámetros: media, desviación estándar (Desv. Est), Mínimo (Min), Mediana, Máximo (Max) y Coeficiente de Variación (C.V.%) de las variables demográficas de edad, peso, talla e índice de masa corporal (IMC) para los voluntarios que ingresaron al estudio (tabla 28). Los datos demográficos individuales se encuentran en el anexo I.

Tabla 25. Estadística descriptiva de las variables demográficas

Variable	N	Media	Desv. Est	Min.	Mediana	Max	CV%
Edad (años)	12.00	25.50	5.26	19.00	25.00	37.00	20.65
Peso (Kg)	12.00	64.50	14.29	44.00	68.50	84.50	21.16
Talla (cm)	12.00	163.00	9.67	150.00	163.50	179.00	5.93
IMC (Kg/m ²)	12.00	23.64	2.86	18.80	23.66	28.98	12.09

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

En la tabla 29 se muestran los resultados obtenidos en la estadística descriptiva para los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo de carvedilol, el número de voluntarios considerado para el análisis estadístico fue de 12. Los datos individuales se muestran en el anexo II.

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

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

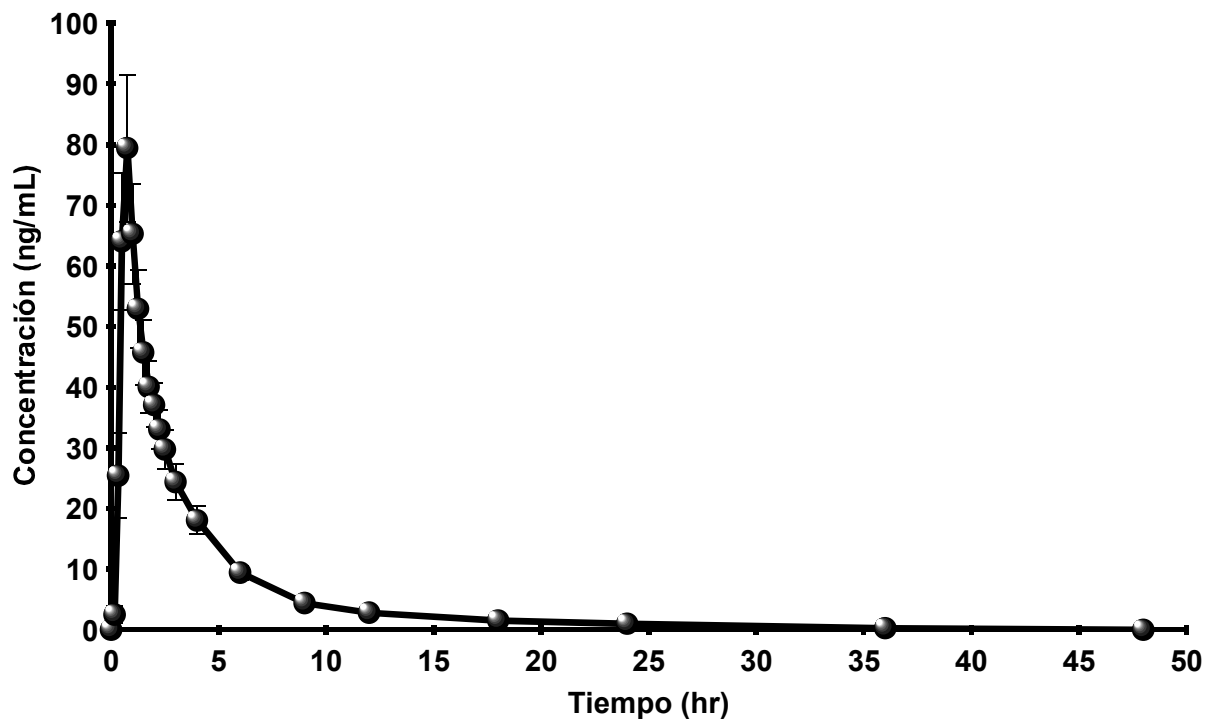


Figura 6. Perfil farmacocinético promedio de carvedilol en escala normal.

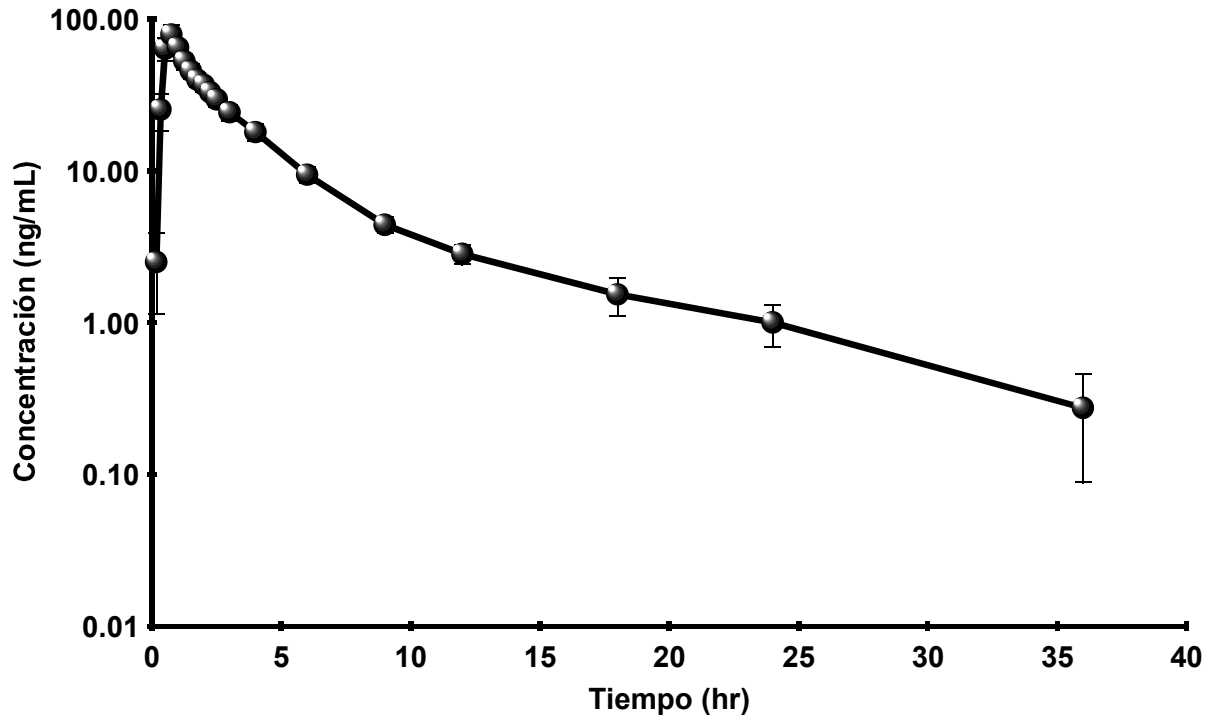


Figura 7. Perfil farmacocinético promedio de carvedilol en escala semilogarítmica.

5.3.4. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos fueron determinados a través de métodos no compartimentales (modelo independiente). La estadística descriptiva se presenta a continuación en la tabla 30:

Tabla 27. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos de carvedilol

Variable	N	Media	Desv. Est	Min	Mediana	Max	CV%
Tmax (h)	12.00	1.04	0.69	0.50	0.75	2.50	66.19
Cmax (ng/mL)	12.00	83.53	37.73	25.48	84.50	165.23	45.17
ABC 0-t (h*ng/mL)	12.00	225.76	80.91	118.61	237.34	330.95	35.84
ABC 0-inf (h*ng/mL)	12.00	242.34	79.34	128.72	245.18	357.12	32.74
Ke (1/h)	12.00	0.14	0.08	0.05	0.12	0.28	54.99
T 1/2 (h)	12.00	6.49	3.58	2.55	5.97	13.48	55.11
TMR 0-inf (h)	12.00	6.42	3.29	3.29	4.86	12.50	51.20

5.3.5. Estadística comparativa entre poblaciones

Los parámetros farmacocinéticos determinados en población mexicana, fueron comparados con los reportados en la literatura en población brasileña y coreana (ver tabla 31), mediante una prueba de t bilateral, cuyos resultados se muestran en las tablas 32 y 33.

Tabla 28. Parámetros farmacocinéticos entre distintas poblaciones

	MÉXICO (N=12)		BRASIL (N=36)		COREA (N=10)	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
C_{max} (ng/mL)	83.53	37.73	52.01	34.70	47.8	28.6
ABC 0-t (h*ng/mL)	225.76	80.91	188.28	102.22	238.1	85.1
ABC 0-inf (h*ng/mL)	242.34	79.43	198.59	108.29	-	-
T 1/2 (h)	6.49	3.58	10.16	4.76	-	-
T_{max} (h)	1.04	0.69	-	-	1.1	0.2

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

Tabla 29. Comparación entre población mexicana y brasileña

Grupo	N	t cal.	Grados de libertad	Rango -t _{.995} a t _{.995}	Dictamen
Cmax (ng/mL) México	12	2.61	46	-2.02 a 2.02	Hay diferencia estadísticamente significativa
Cmax (ng/mL) Brasil	36				
T 1/2 (h) México	12	-2.39	46	-2.02 a 2.02	Hay diferencia estadísticamente significativa
T 1/2 (h) Brasil	36				
ABC 0-t (h*ng/mL) México	12	1.13	46	-2.02 a 2.02	No hay diferencia estadísticamente significativa
ABC 0-t (h*ng/mL) Brasil	36				
ABC 0-inf (h*ng/mL) México	12	1.26	46	-2.02 a 2.02	No hay diferencia estadísticamente significativa
ABC 0-inf (h*ng/mL) Brasil	36				

Tabla 30. Comparación entre población mexicana y coreana

Grupo	N	t cal.	Grados de libertad	Rango $-t_{.995}$ a $t_{.995}$	Dictamen
Tmax(h) México	12	-0.25	20	-2.09 a 2.09	No hay diferencia estadísticamente significativa
Tmax(h) Korea	10				
Cmax (ng/mL) México	12	2.34	20	-2.09 a 2.09	Hay diferencia estadísticamente significativa
Cmax (ng/mL) Korea	10				
ABC 0-t (h*ng/mL) México	12	-0.33	20	-2.09 a 2.09	No hay diferencia estadísticamente significativa
ABC 0-t (h*ng/mL) Korea	10				

Al realizar la comparación entre la población mexicana y la población brasileña aplicando la prueba estadística con un contraste bilateral y un nivel de significancia de 0.05, se observaron diferencias estadísticamente significativas para el Cmax y $t_{1/2}$, pero no así, para el comparativo entre ABC_{0-t} y ABC_{0-inf} .

En forma similar, solo el parámetro de Cmax presento diferencias significativas al contrastar los resultados obtenidos en población mexicana con respecto a la población coreana.

6. CONCLUSIONES

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

- Lineal, preciso y exacto en un rango de concentraciones de 1 a 100 ng/mL.
- Selectivo, al no presentarse interferencias al tiempo de retención de carvedilol.
- Estable a temperatura ambiente (27°C) en muestra plasmática durante 48 horas.
- Estable en refrigeración (3°C) en muestra plasmática durante 48 horas.
- Estable a tres ciclos de congelación-descongelación.
- La muestra plasmática fue estable en congelación (-70°C) durante 32 días (estabilidad largo plazo).
- La muestra procesada almacenada en el automuestreador (20°C) fue estable por 48 horas.
- Exacto y repetible cuando se diluye la muestra utilizando un volumen de muestra de 100 µL.
- Tolerante hacia el cambio de proporción en fase móvil (65:35 v/v).
- Exacto y repetible cuando se utilizan muestras plasmáticas lipémicas y hemolizadas.
- Recobro del 100%.

Por lo tanto, se considera que el método analítico para cuantificar carvedilol en plasma es confiable para ser utilizado en un estudio de biodisponibilidad y cuya aplicación nos permitió una adecuada caracterización de los parámetros farmacocinéticos principales en población mexicana, obteniéndose valores de $T_{\text{máx}}$, $C_{\text{máx}}$, ABC_{0-t} , $ABC_{0-\text{inf}}$, k_e , $t_{1/2}$ de 1.04 (h), 83.53 (ng/mL), 225.76 (h*ng/mL), 242.34 (h*ng/mL), 0.14 (1/h) y 6.49 (h) respectivamente.

Los valores de área bajo la curva de concentración plasmática con respecto al tiempo, encontrado en la población mexicana fue semejante a la reportada en población brasileña y coreana.

7. ANEXOS**7.1. ANEXO I. Datos demográficos de los participantes del estudio.**

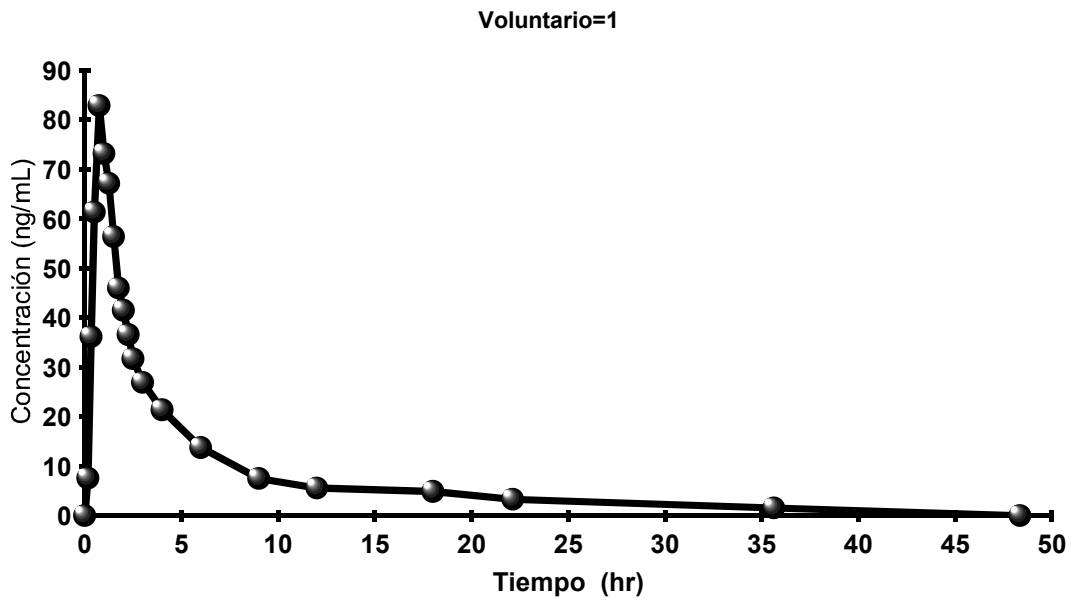
Voluntario	Edad (años)	Peso (Kg)	Talla (cm)	IMC (Kg/m²)
1	30	57.3	153	24.48
2	25	77	163	25.98
3	26	67	162	25.53
4	21	64.6	175	21.09
5	37	84.5	179	26.37
6	19	44	153	18.8
7	23	48.2	151	21.14
8	21	49.2	150	21.87
9	32	70	164	26.03
10	21	67.9	166	24.64
11	25	64.5	168	22.85
12	26	64.8	172	21.9

7.2. ANEXO II. Concentraciones plasmáticas de carvedilol para cada voluntario en los diferentes tiempos de muestreo.

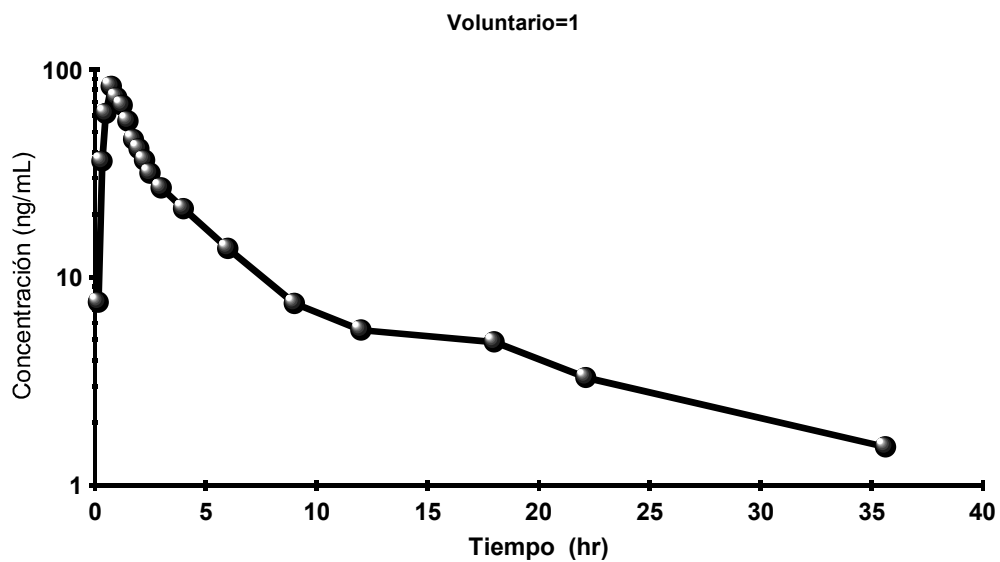
Tiempo nominal	Vol. 1 Conc. (ng/mL)	Vol. 2 Conc. (ng/mL)	Vol. 3 Conc. (ng/mL)	Vol. 4 Conc. (ng/mL)	Vol. 5 Conc. (ng/mL)	Vol. 6 Conc. (ng/mL)
0	0.00	0.00	0	0	0	0
0.167	7.58	3.66	0	1.47	0	0
0.333	36.15	39.20	3.2	34.53	3.54	2.21
0.5	61.33	70.64	33.55	91.63	14.3	7.6
0.75	82.88	87.61	46.96	102.5	22.61	16.04
1	73.16	86.23	39.97	77.91	25.48	25.72
1.25	67.14	82.00	32.17	56.33	25.34	28.14
1.5	56.39	76.37	27.59	52.64	22.63	27.03
1.75	45.98	65.62	25.81	43.61	20.19	29.85
2	41.47	56.05	24.75	35.53	20.93	43.71
2.25	36.58	43.46	24.14	33.55	18.35	49.55
2.5	31.68	36.49	22	29.01	16.41	53.34
3	26.90	27.77	15.59	23.29	16.11	50.16
4	21.37	18.17	11.44	15.77	10.91	34.23
6	13.75	8.58	5.63	7.49	6.06	16.11
9	7.48	4.92	2.48	3.9	4.12	7.85
12	5.57	2.74	1.4	2.35	3	4.36
18	4.88	1.81	N.C	1.34	1.69	2.97
24	3.29	1.11	N.C	1.3	1.34	2.26
36	1.53	N.C	N.C	N.C	N.C	1.17
48	N.C.	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C

Tiempo nominal	Vol. 7 Conc. (ng/mL)	Vol. 8 Conc. (ng/mL)	Vol. 9 Conc. (ng/mL)	Vol. 10 Conc. (ng/mL)	Vol. 11 Conc. (ng/mL)	Vol. 12 Conc. (ng/mL)
0	0	0	0	0	0	0
0.167	15.69	0	0	1.75	0	0
0.333	85	10.63	40.21	32.09	8.53	9.76
0.5	130	90.16	86.11	110.99	26.49	45.55
0.75	165.23	97.86	76.71	127.71	64.7	61.94
1	123.77	83.7	74.32	75.74	49.68	47.62
1.25	92.18	72.29	56.9	50.38	39.39	32.75
1.5	73.02	57.71	51.19	45.41	31.75	26.96
1.75	61.11	48.57	50.73	37.74	29.11	22.23
2	55.75	44.94	44.79	32.79	21.9	20.01
2.25	46.76	36.03	41	30.14	17.94	18.9
2.5	40.49	30.79	34.06	29.72	15.93	16.91
3	30.25	25.95	26.34	23.94	12.92	13.06
4	20.72	18.21	30.37	17.67	8.81	8.88
6	8.32	11.43	15.92	8.99	6.88	4.22
9	3.68	3.52	4.02	5.82	3.63	1.58
12	4.09	2.33	2.77	3.31	2.16	3.1
18	1.91	N.C	2.62	1.24	N.C	N.C
24	1.17	N.C	1.59	N.C	N.C	N.C
36	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C
48	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C	N.C

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

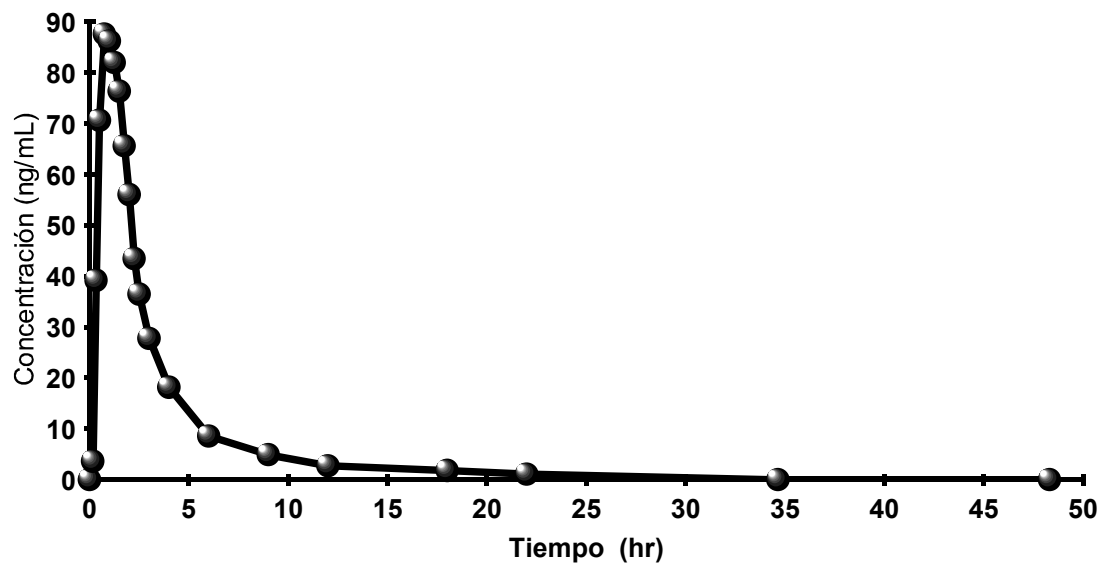


Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 1 (escala normal)



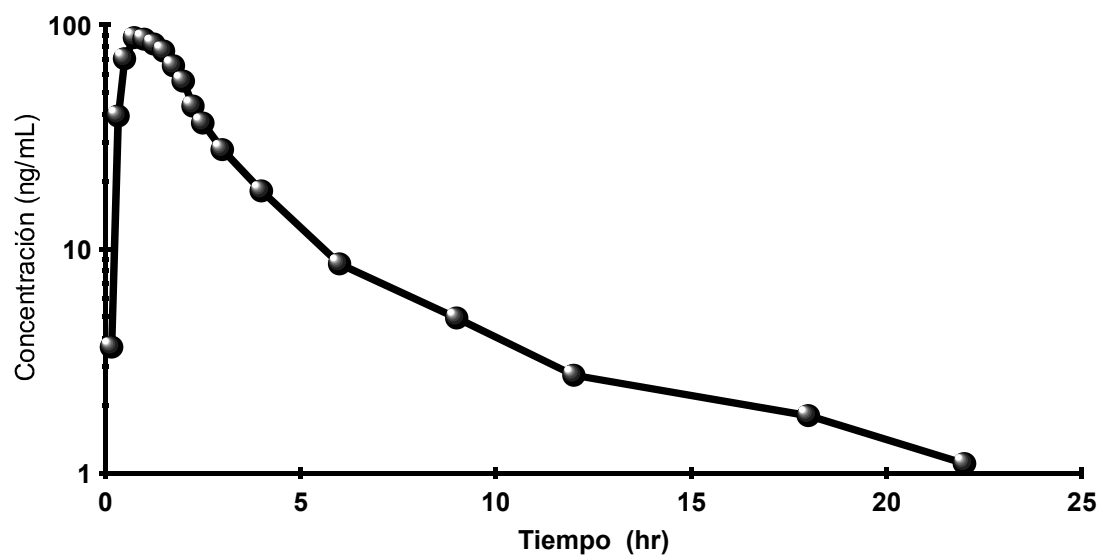
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 1 (escala semilogarítmica)

Voluntario=2



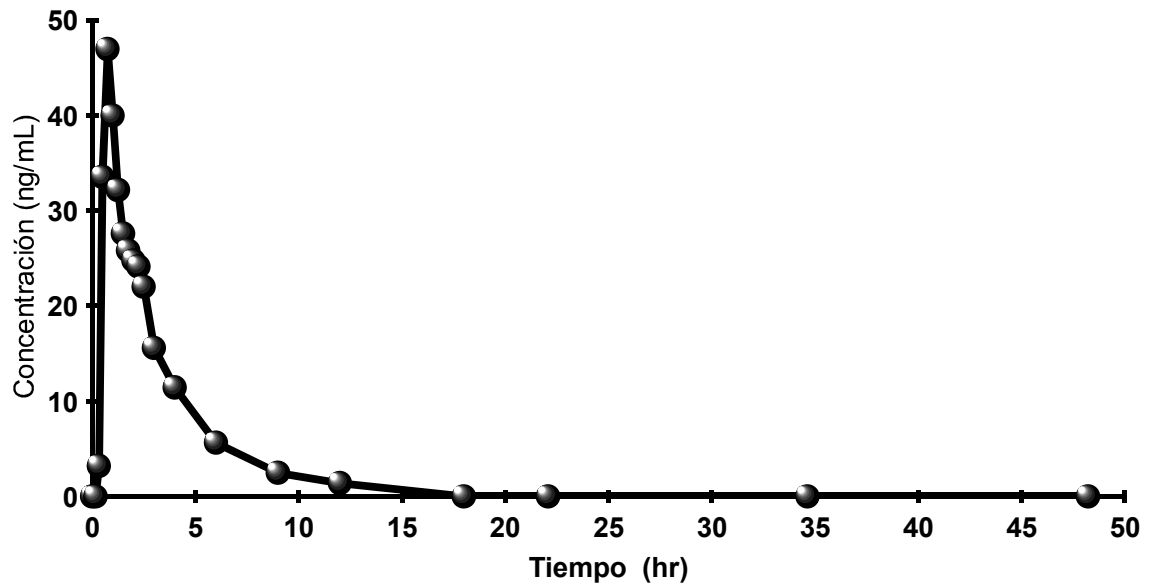
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 2 (escala normal)

Voluntario=2



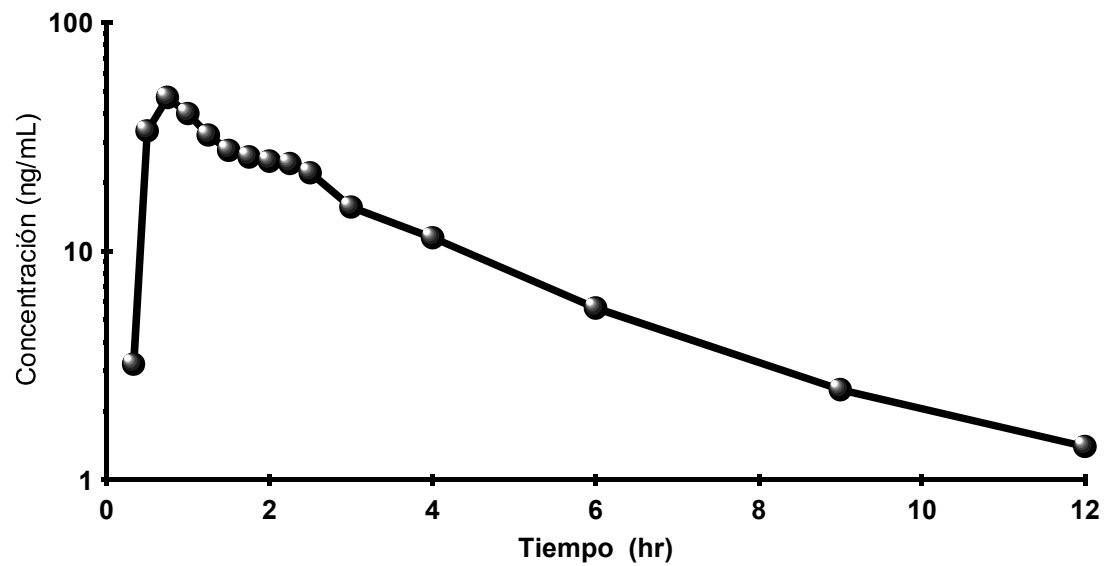
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 2 (escala semilogarítmica)

Voluntario=3



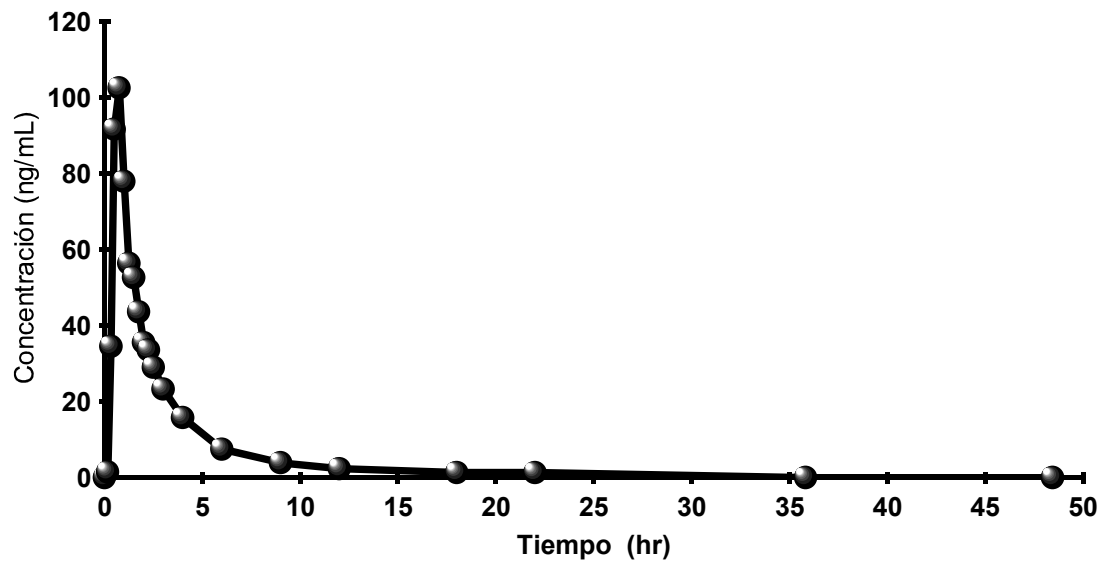
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 3 (escala normal)

Voluntario=3



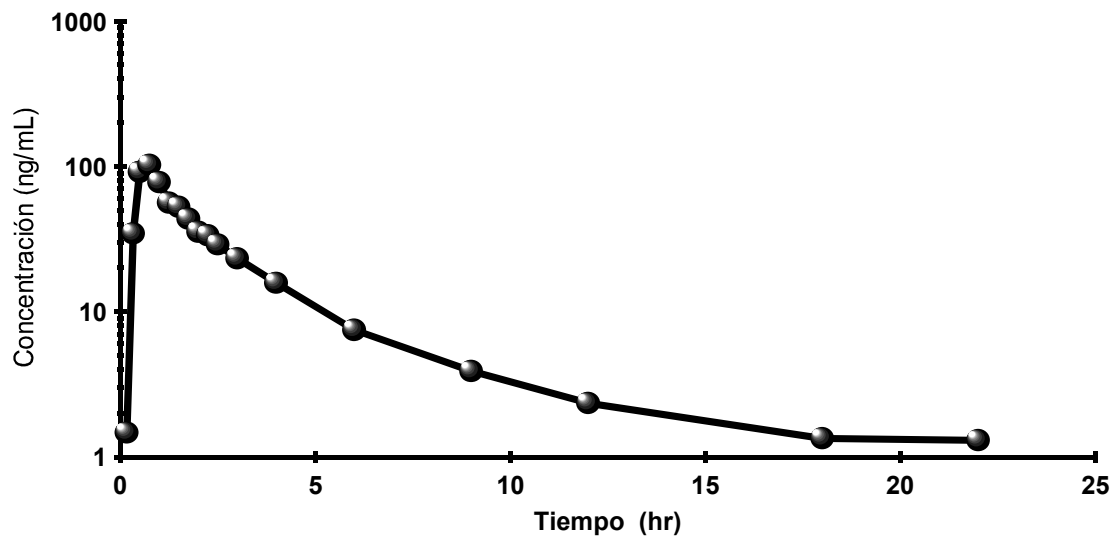
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 3 (escala semilogarítmica)

Voluntario=4



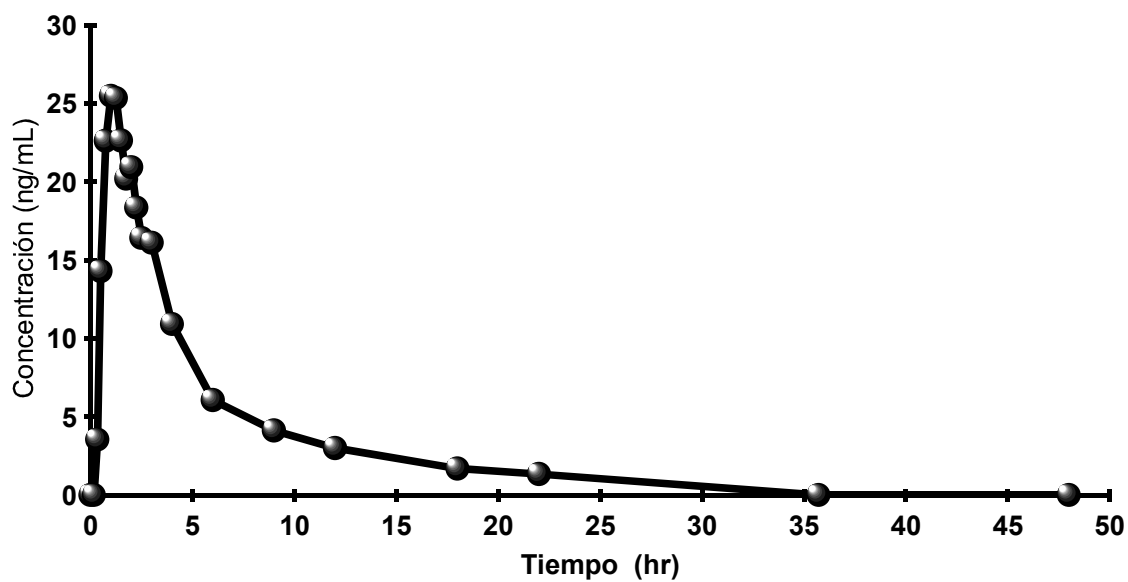
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 4 (escala normal)

Voluntario=4



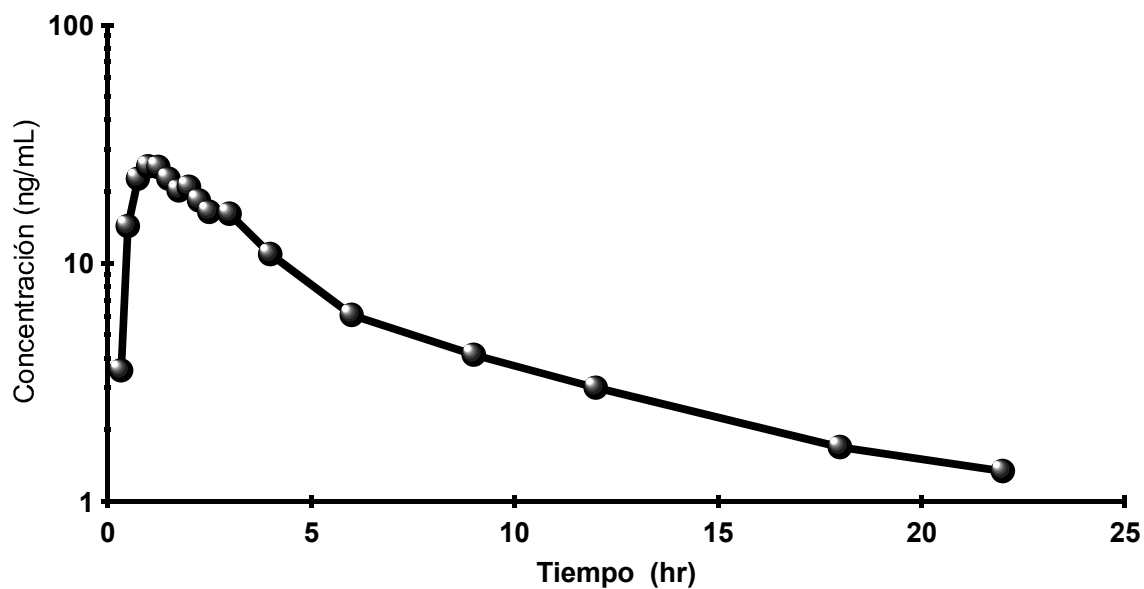
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 4 (escala semilogarítmica)

Voluntario=5



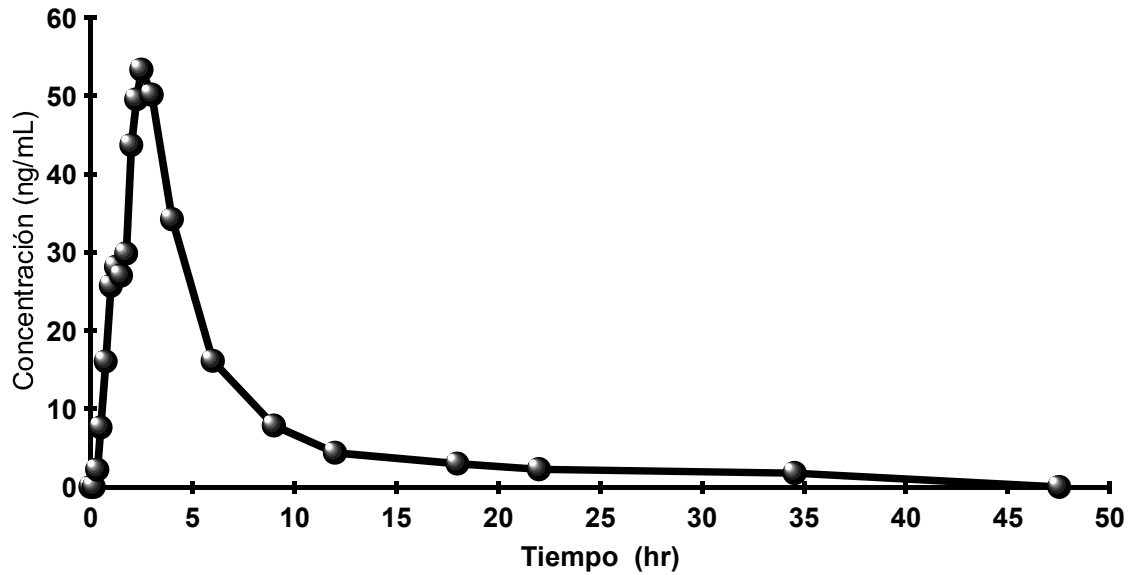
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 5 (escala normal)

Voluntario=5



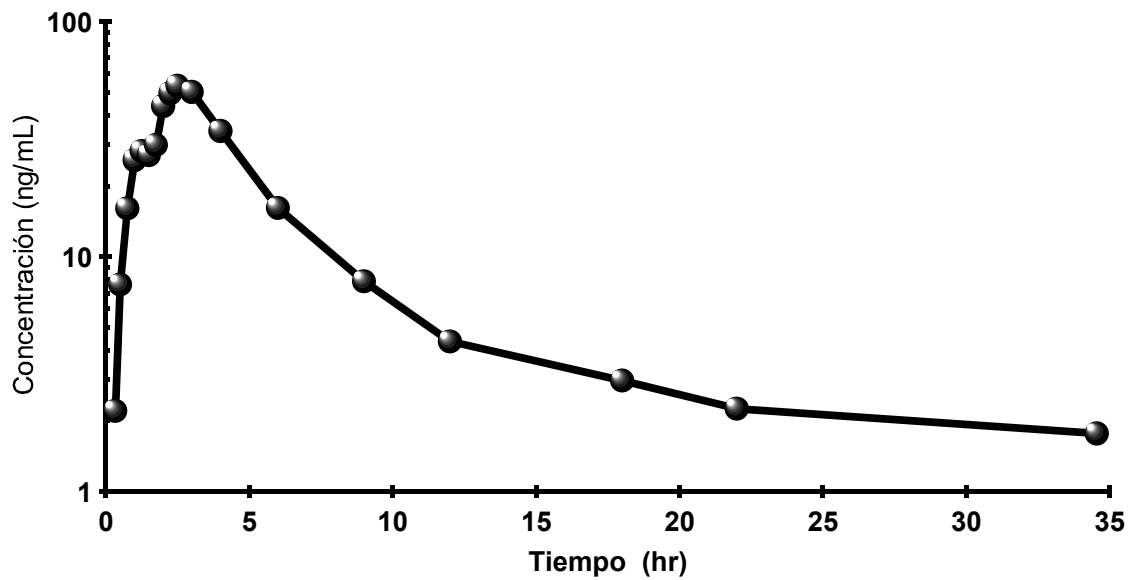
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 5 (escala semilogarítmica)

Voluntario=6



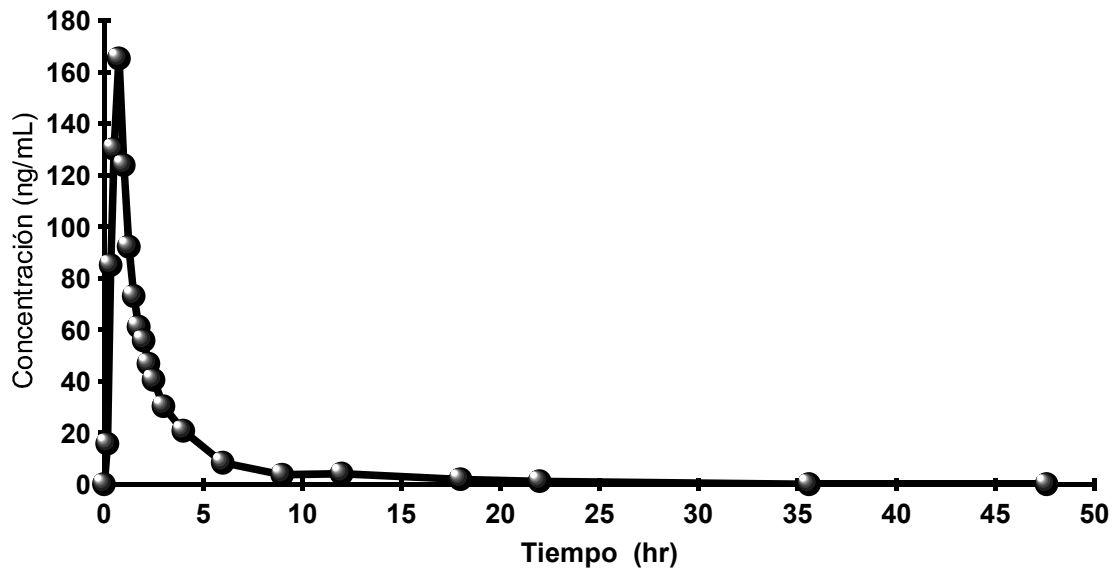
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 6 (escala normal)

Voluntario=6



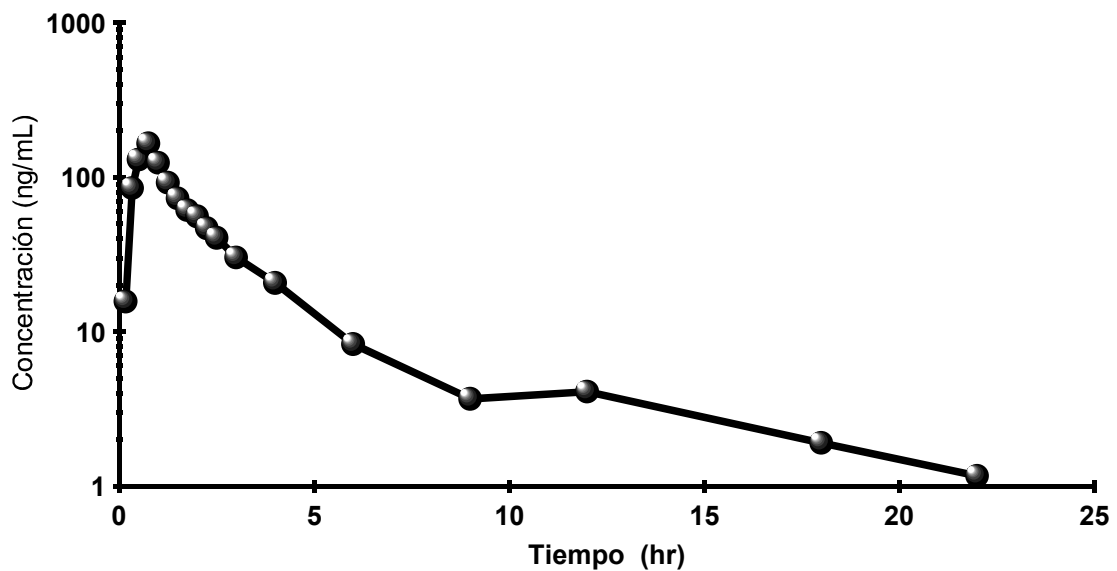
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 6 (escala semilogarítmica)

Voluntario=7

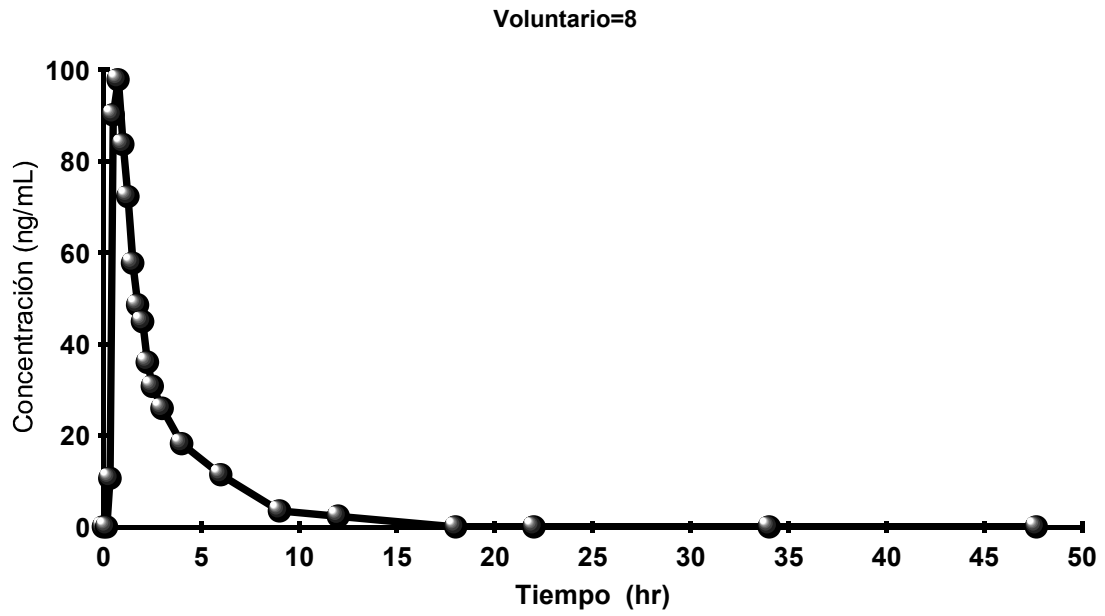


Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 7 (escala normal)

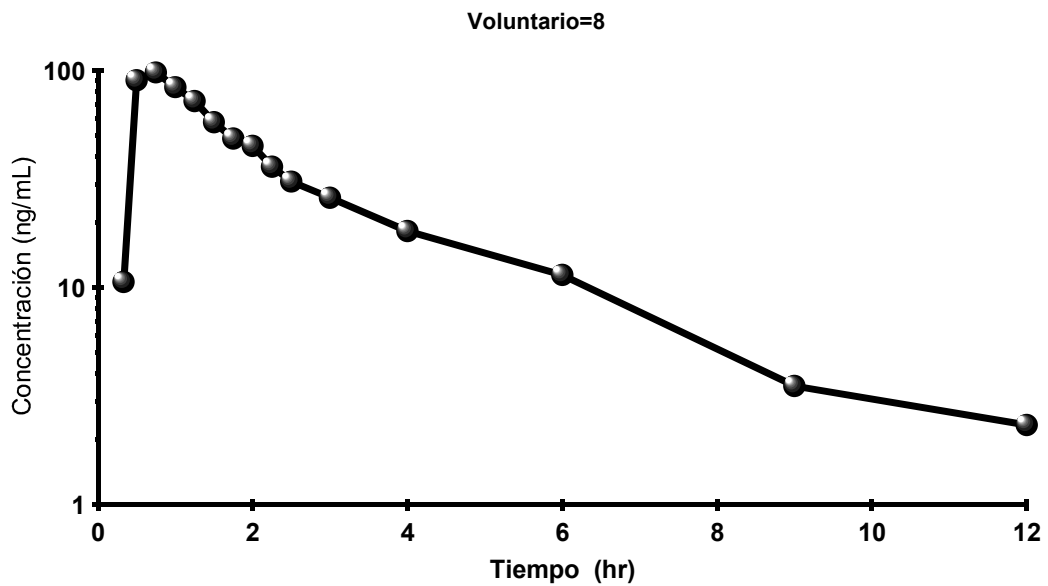
Voluntario=7



Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 7 (escala semilogarítmica)

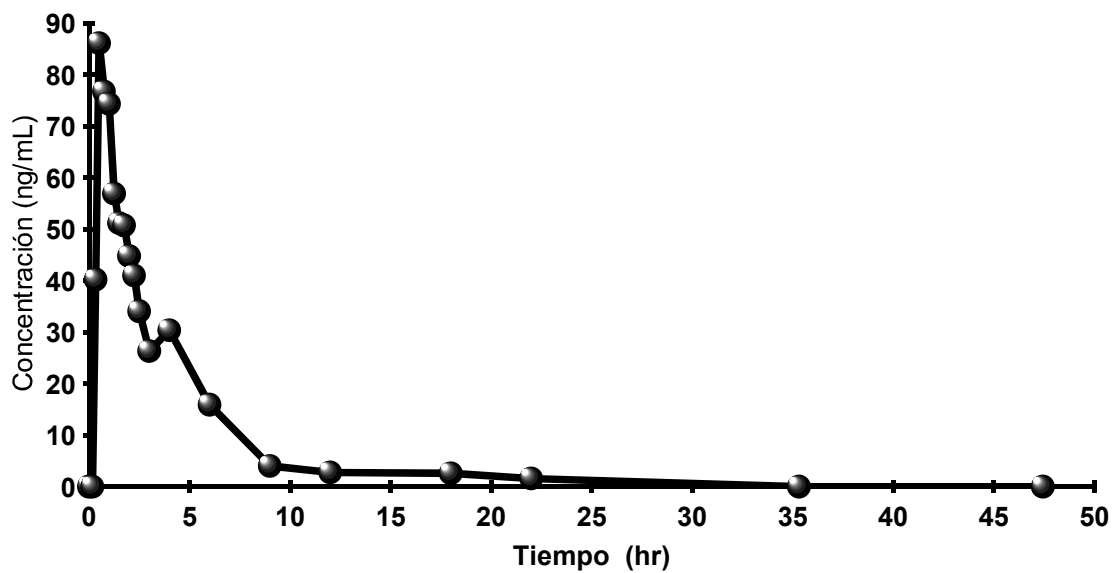


Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 8 (escala normal)



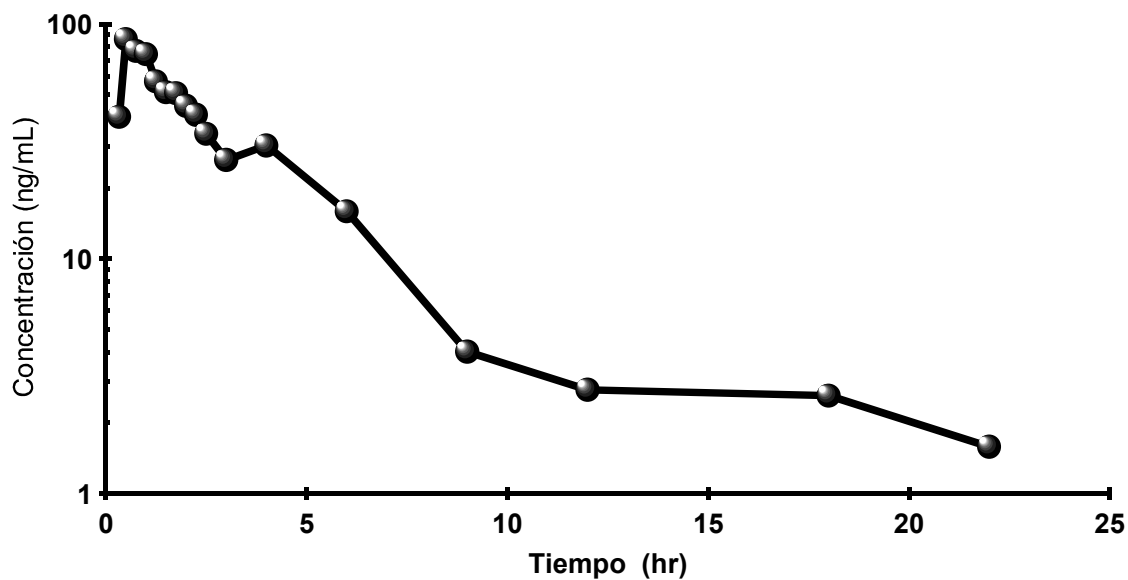
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 8 (escala semilogarítmica)

Voluntario=9



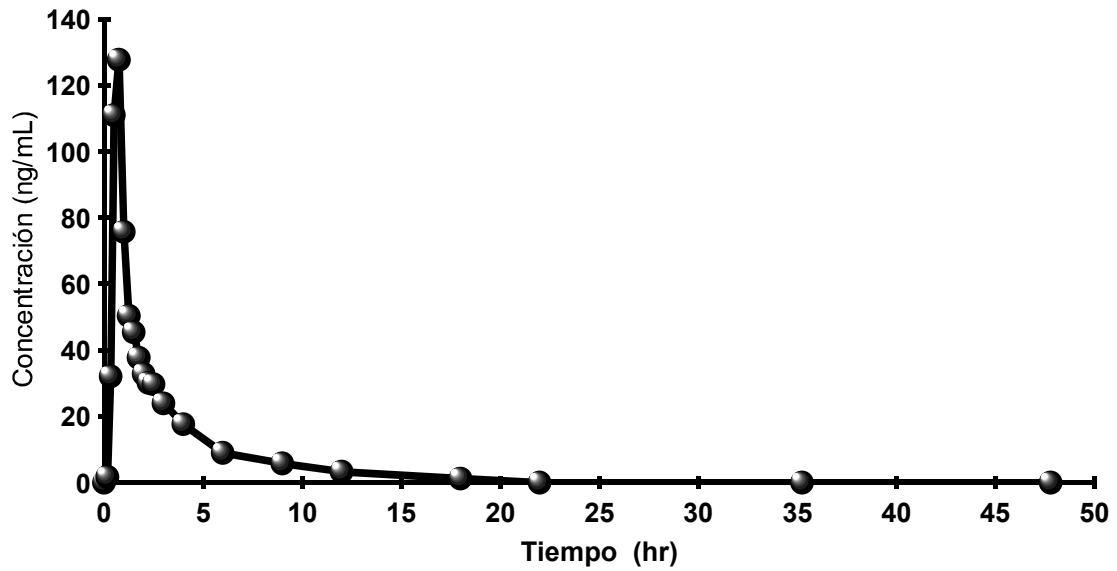
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 9 (escala normal)

Voluntario=9



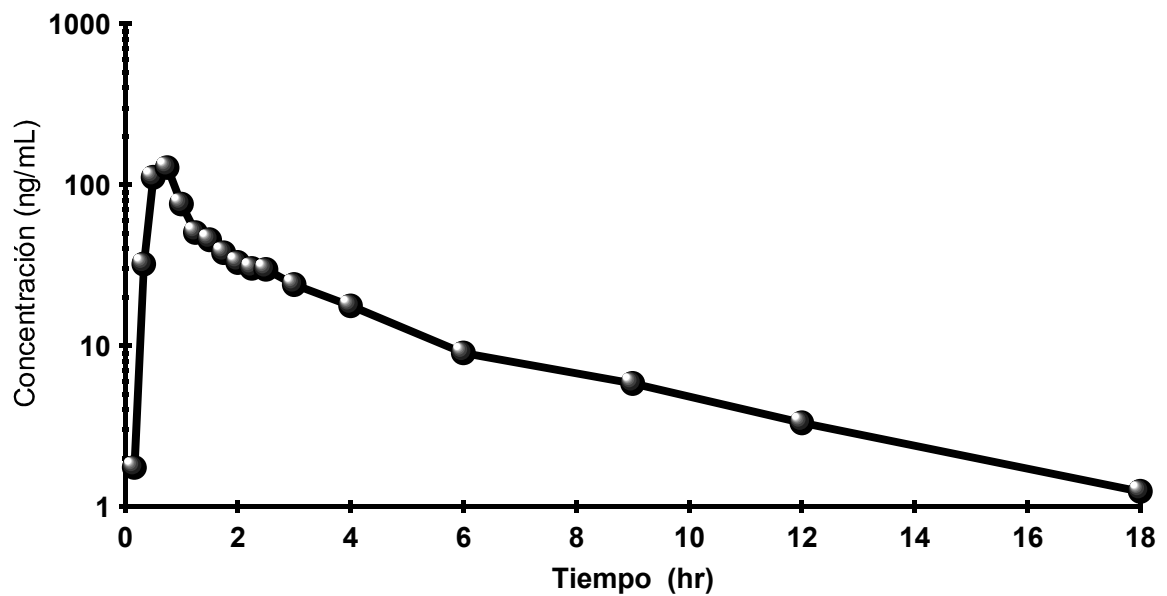
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 9 (escala normal)

Voluntario=10



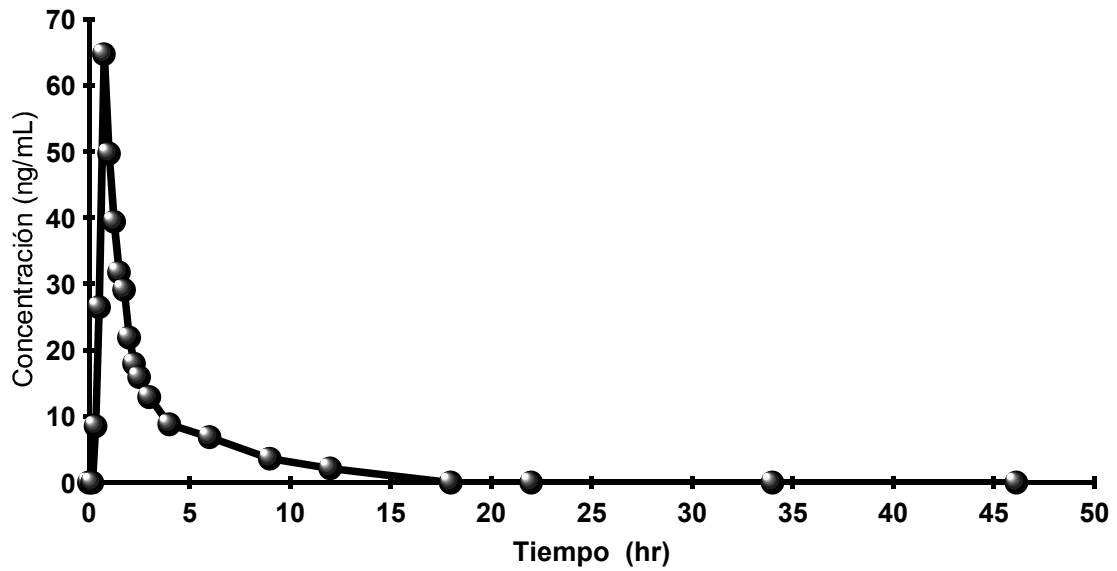
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 10 (escala normal)

Voluntario=10



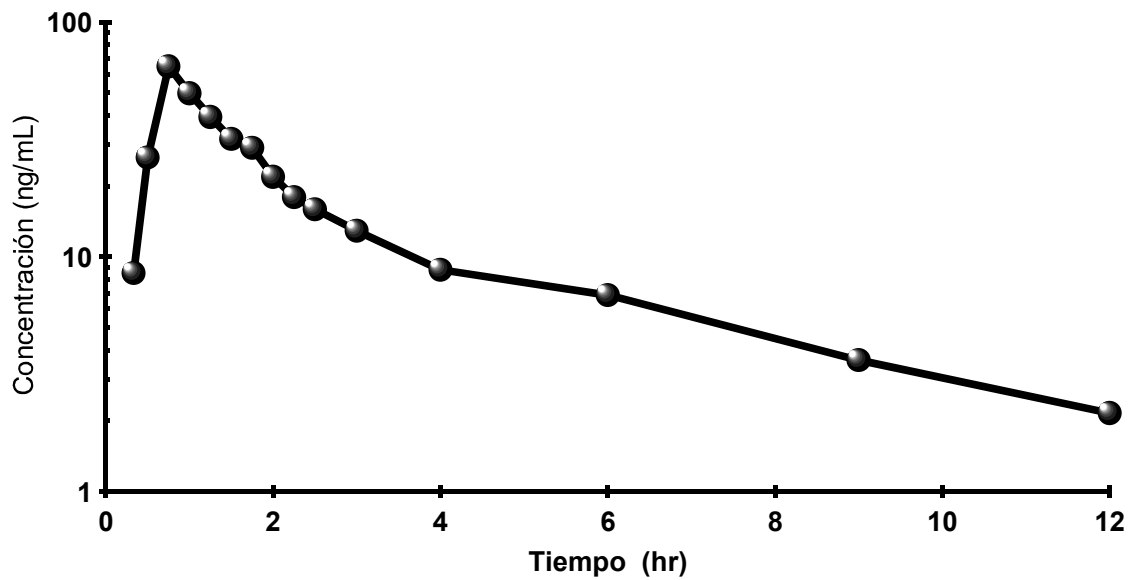
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 10 (escala semilogarítmica)

Voluntario=11



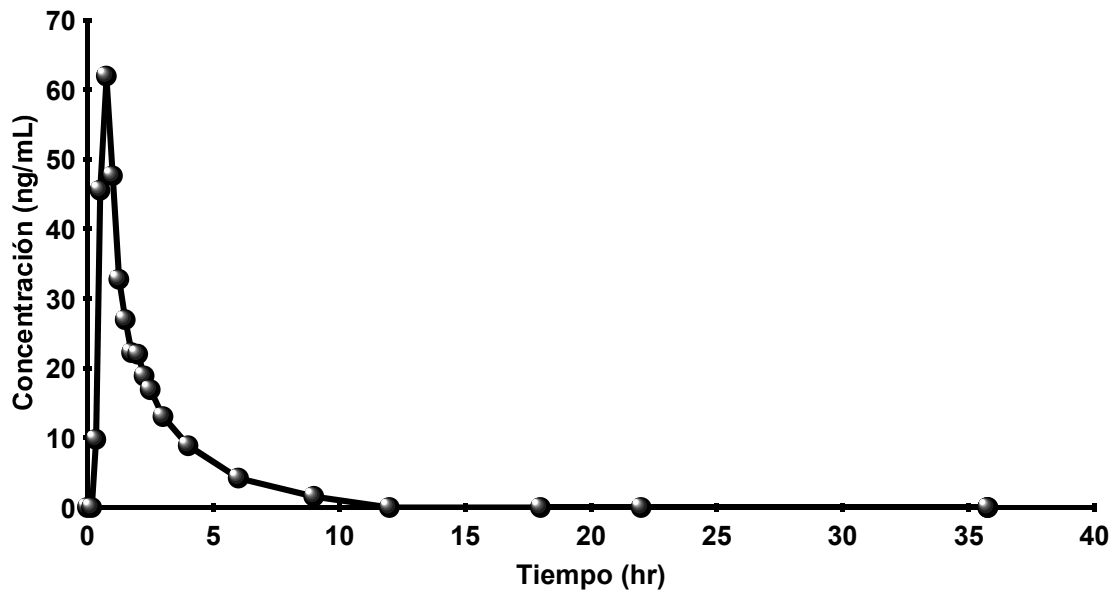
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 11 (escala normal)

Voluntario=11



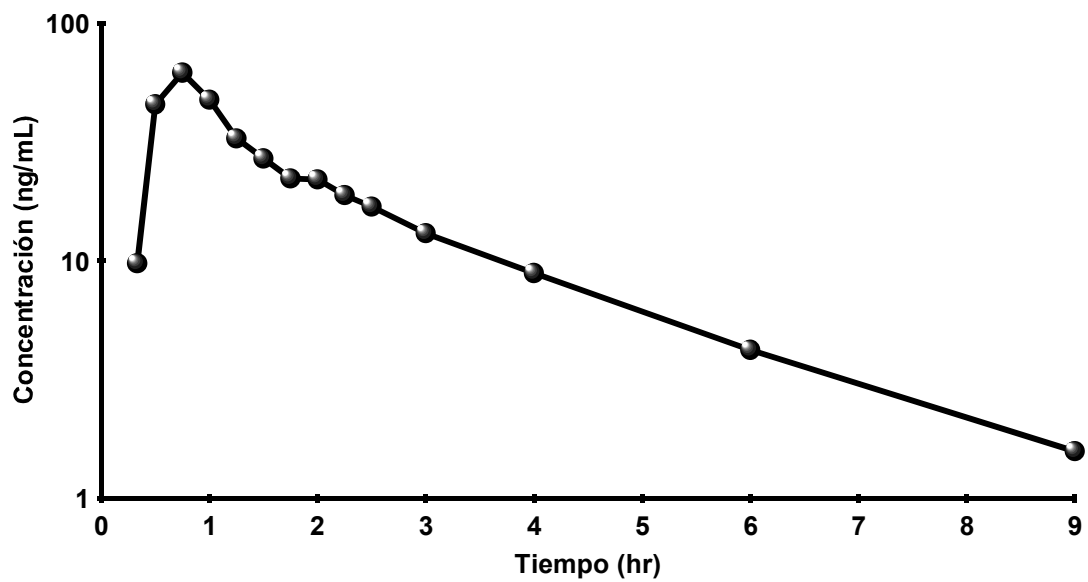
Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 11 (escala semilogarítmica)

Voluntario=12



Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 12 (escala normal)

Voluntario=12



Perfil farmacocinético de carvedilol voluntario 12 (escala normal)

7.4. ANEXO IV. Parámetros farmacocinéticos de carvedilol obtenidos para cada voluntario.

Vol.	Tmax (h)	C max (ng/mL)	ABC _{0-t} (h*ng/mL)	ABC _{0-inf} (h*ng/mL)	Ke (1/h)	T _{1/2} (h)	TMR _{0-inf} (h)
1	0.75	82.88	330.95	357.12	0.06	11.89	10.94
2	0.75	87.61	267.77	276.88	0.12	5.72	4.64
3	0.75	46.96	123.59	128.72	0.27	2.55	3.58
4	2.50	102.50	227.93	240.02	0.11	6.43	5.08
5	1	25.48	129.20	143.38	0.09	7.34	8.46
6	2.50	53.34	293.94	318.86	0.07	9.77	10.73
7	0.75	165.23	329.43	339.90	0.11	6.22	4.24
8	0.75	97.86	231.78	240	0.28	2.45	3.29
9	0.50	86.11	282.22	292.48	0.15	4.49	5.19
10	0.75	127.71	242.90	250.33	0.17	4.15	4.16
11	0.75	64.70	130.76	141.46	0.20	3.43	4.27
12	0.75	61.94	118.61	178.88	0.05	13.48	12.5

8. BIBLIOGRAFIA

1. http://asmedasantioquia.org/momento_medico/biodisponibilidad.htm
2. <http://www.cardiologos.org/profarma/fc/fc216.html>
3. <http://ar.geocities.com/indicededrogas/carvedilol.htm>
4. <http://redpoll.pharmacy.ualberta.ca/drugbank/cgi-bin/molsearch.cgi>
5. <http://www.rxlist.com/cgi/generic/carvedilol.htm>
6. Mosby's GenRx. A comprehensive referente for generis and brad prescription drugs. Elevent edition. Mosby 2001. pag. 111-388.
7. Bruce T. Vanderhoff, Heather M. Rupeel, Peter B. Ámsterdam. Carvedilol el Nuevo papel de los betabloqueadores en la insuficiencia cardíaca congestiva. American Family Physician, November 1, 1998.
8. Rathod R, Prasad LP, Rani S, Nivsarkar M, Padh H. Estimation of carvedilol in human plasma by using HPLC-fluorescence detector and its application to pharmacokinetic study. : J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007 Oct 1;857(2):219-23. Epub 2007 Jul 22.
9. Zarghi A, Foroutan SM, Shafaati A, Khoddam A. Quantification of carvedilol in human plasma by liquid chromatography using fluorescence detection: application in pharmacokinetic studies. J Pharm Biomed Anal. 2007 May 9;44(1):250-3. Epub 2007 Jan 21.
10. Ptáček P, Macek J, Klíma J. Liquid chromatographic determination of carvedilol in human plasma. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2003 Jun 15;789(2):405-10.

11. Ney Carter do Carmo Borges, Gustavo Duarte Mendes, Diogo de Oliveira Silva, Vinicius Marcondes Rezende, Rafael Eliseo Barrientos-Astigarraga and Gilberto De Nucci. Quantification of carvedilol in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry: Application to bioequivalence study. *Journal of Chromatography B*. Volume 822, Issues 1-2, 5 August 2005, Pages 253-262
12. Dong Won Jeong, Young Hoon Kim, Hye Young Ji, Yu Seok Youn, Kang Choon Lee and Hye Suk Lee. Analysis of carvedilol in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Volume 44, Issue 2, 28 June 2007, Pages 547-552.
13. M.P. McIntosh, B.J. Carlson, K.S. Schorno and R.A. Rajewski. Single quadrupole mass spectrometry for pre-clinical pharmacokinetic analysis: Quantitation of carvedilol in dog plasma. *Journal of Chromatography B* Volume 852, Issues 1-2, 1 June 2007, Pages 665-668.
14. Masako Saito, Junichi Kawana, Tetsuro Ohno, Masahiro Kaneko, Kiyoshi Mihara, Kazuhiko Hanada, Risa Sugita, Natsuki Okada, Sachiko Oosato, Masatoshi Nagayama^c, Tetsuya Sumiyoshi and Hiroyasu Ogata. Enantioselective and highly sensitive determination of carvedilol in human plasma and whole blood after administration of the racemate using normal-phase high-performance liquid chromatography. : *Journal of Chromatography B* Volume 843, Issue 1, 20 October 2006, Pages 73-77.
15. Harris, D.C. – “Análisis químico cuantitativo”. Ed. Reverte, S. A. Barcelona. 2001.
16. Soog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. – “Química analítica”. Ed. Mc Graw Hill. 7ª edición. 2001.
17. Hernández, L y González, C. “Introducción al análisis instrumental”. Ed. Ariel Ciencia. España 2002. 393-426.

18. Loro, J. F. – “Manual de cromatografía”. Colección Textos Universitarios. 2001
19. Chamberlain J. Why analyze drugs in biological fluids and Special problems with biological fluids en Analysis of Drugs in Biological. USA. CRC Press. 1987.25-35.
20. D.Teneo, S.Boike, D.Boyle, B.Ilson, H.F. Fesniak, S.Brozena, D.Jorkasky. Quantification of carvedilol in human plasma by high performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. Application to bioequivalence study. Journal of Chromatography B, 822 (2005) 253-262.
21. Ray H. Liu. Handbook of drug analyses. Applications in forensic and clinical laboratories. American Society. USA: 17:49.
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.
23. Murray R. Spiegel, Larry J. Stephens. Estadística. Tercera edición. Editorial Mc Graw Hill 2002.