



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**DETERMINACION DE DICLOFENACO EN TEJIDO BUCAL POR
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN**

**PRESENTA:
JUANA ROSAS LÓPEZ**

**PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

Director: Dr. Gilberto Castañeda Hernández

Asesora: Dra. Leticia Cruz Antonio



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento surge cuando una persona se siente en deuda con otra porque le ha procurado algún bien, o le ha hecho un regalo. Las personas agradecidas nos alegramos por los bienes recibidos, los reconocemos y estamos dispuestas a corresponderlos. No se trata de devolver favor con favor ni regalo con regalo, sino de sentir y expresar admiración y gratitud por las calidades humanas de quienes me han honrado con sus dones.

Cada uno tiene siempre mucho que agradecer, y cuidar lo recibido es una forma de hacer evidente un reconocimiento. Entre los bienes que más agradezco, se encuentra la vida, la salud, la amistad, la lealtad y las enseñanzas de mis antecesores.



Gracias a todos y cada uno de los que participaron en este proyecto que, hoy me permite empezar una vida profesional, gracias por que nunca me han dejado sola.

No creo que Dios quiera exactamente que seamos felices, quiere que seamos capaces de amar y ser amados, quiere que maduremos, y yo sugiero que precisamente porque Dios nos ama nos concedió el don de sufrir; o por decirlo de otro modo: el dolor es el megáfono que Dios utiliza para despertar a un mundo de sordos; porque somos como bloques de piedra, a partir de los cuales el escultor poco a poco va formando la figura de un hombre, los golpes de su cincel que tanto daño nos hacen también nos hacen mejores hombres

Gracias Dios por la familia, los amigos y maestros que me has brindado, gracias por el camino que has creado para mí, pues es justo el que necesito para llegar a ti.

“En realidad, todas las cosas, todos los acontecimientos, para quien sabe leerlos con profundidad, encierran un mensaje que, en definitiva, remite a Dios”



Juan Pablo II

“Para las personas creyentes, Dios esta al principio. Para los científicos está en el final de todas sus reflexiones.”

Max Planck

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

Albert Einstein

“Las personas inteligentes tienen un derecho sobre las ignorantes: el derecho a instruírlas.”

Ralph Waldo Emerson

“sí yo pudiera enumerar cuánto debo a mis antecesores y contemporáneos, no me quedaría gran cosa en propiedad”

Goethe

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), bajo la supervisión del Dr. Gilberto Castañeda Hernández.



Dra. Leticia Cruz Antonio

Ejemplo de dedicación, gracias por sus consejos, la entrega y el tiempo que le otorgo a este trabajo, además de iniciar mi carrera profesional

Dr. Gilberto Castañeda Hernández

Por todas las oportunidad brindadas, así como por ser un ejemplo de dedicación y sencillez.

QFB. Lourdes Gonzáles Flores

Por la asistencia técnica otorgada para la realización de este proyecto
Te agradezco el compartir con empeño, tiempo y dedicación, todos tus conocimientos.

QFB. A. Guillermina Rojas Fernández

Por el tiempo y dedicación que le otorgó a este trabajo, gracias por los valiosos comentarios y consejos otorgados.

QFB. Lilitiana M^a. López González

Por la revisión y comentarios, encaminados a la mejora del trabajo

M en C. Consuelo Bautista Aragón

Por su tiempo y comentarios

QFB. Elena Olvera Guillen

Por su aportación en este trabajo



“La enseñanza que deja huella no es la que se hace de cabeza a cabeza, sino de corazón a corazón”

Howard G. Hendricks

A mis padres:

Antonio Rosas Caballero †

Alberta López Delgadillo

Por enseñarme que los objetivos solo se logran con tenacidad, trabajo y perseverancia, gracias por la vida y por el apoyo que siempre me han brindado, porque están acompañados de todos esos sacrificios que han hecho que sean mi mejor ejemplo a seguir.



A mi hermana Nallely y su familia: Juan, Guadalupe, Ana Paula, Juan de Jesús y Natalia, por el apoyo incondicional que solo una familia puede ofrecer.

Rosita Delgadillo Sánchez

Por ser la mejor abuelita, gracias por las oraciones que me brindas, es ese además de tu cariño y apoyo el mejor regalo que me has podido dar.

QFB. Karen Vázquez Tolentino

A mi hermana por elección, gracias por ser mi compañera de escuela, de aventuras y confidente, pero sobre todo por ser la amiga que nunca duda al brindar su apoyo.

“La falta de talento innato se compensa con dedicación, tu Karen, no eres la más brillante... solo la mejor”

“En la prosperidad, nuestros amigos nos conocen; en la adversidad, nosotros conocemos a nuestros amigos”

Churton Collins.

Francisco López Delgadillo

Por todo el apoyo que me ha brindado durante mi educación escolar.

Familia Vázquez Tolentino

Gracias, porque cuando lo necesite no dudaron en abrir las puertas de su casa para brindarme su apoyo incondicional.



A mis amigas: María Juana, Claudía, Dianita y compañeros del laboratorio de Farmacología por hacer más ameno y agradable el curso de esta etapa de mi vida, gracias por todos los momentos que me regalaron.

“EL ÉXITO ESTÁ EN LA LUCHA, EN EL ESFUERZO, EN EL SUFRIMIENTO QUE SUPONE LA LUCHA Y NO, EN LA VICTORIA MISMA”



	ÍNDICE GENERAL	Pág.
	Resumen.....	I
	Introducción.....	II
I.	Antecedentes Teóricos.....	1
	A. Inflamación.....	1
	1. Definición.....	1
	B. Eicosanoides.....	2
	1. Definición y Características Generales.....	2
	2. Síntesis de eicosanoides.....	3
	a. Vía de la ciclooxigenasa.....	3
	b. Vía de la lipooxigenasa.....	5
	3. Funciones Fisiológicas.....	7
	a. Sistema nervioso.....	7
	b. Inflamación.....	7
	4. Inhibición de la síntesis de eicosanoides.....	8
	C. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos.....	10
	1. Definición.....	10
	2. Acción farmacológica.....	10
	a. Acción antiinflamatoria.....	10
	b. Acción antipirética.....	10
	c. Acción analgésica.....	10
	3. Mecanismo de acción.....	11
	D. Diclofenaco.....	11
	1. Definición.....	11
	2. Nombres comerciales.....	12
	3. Propiedades fisicoquímicas.....	12
	4. Propiedades farmacológicas.....	13
	5. Farmacocinética.....	14
	6. Efectos adversos.....	14
	7. Investigación clínica.....	15
	a. Modelos animales.....	15
	E. Método analítico.....	16
	1. Definición.....	16
	2. Validación.....	17
	a. Rango.....	17
	b. Selectividad.....	17
	c. Límite de cuantificación.....	17
	d. Límite de detección.....	18
	e. Linealidad.....	18
	f. Precisión.....	18
	g. Repetibilidad.....	18
	h. Reproducibilidad.....	18
	i. Exactitud.....	18
	j. Estabilidad de la muestra.....	18



k. Recuperación absoluta.....	18
F. Cromatografía.....	19
1. Definición.....	19
2. Clasificación.....	19
3. Cromatografía líquida de alta resolución.....	21
4. Tipos de cromatografía líquida.....	22
a. Cromatografía de adsorción.....	22
b. Cromatografía de intercambio iónico.....	22
c. Cromatografía de exclusión.....	22
d. Cromatografía de reparto.....	22
1) Cromatografía en fase normal.....	23
2) Cromatografía en fase reversa.....	23
5. Componentes de CLAR.....	24
Planteamiento del problema.....	26
Objetivo.....	27
Objetivo particular.....	27
Hipótesis.....	28
II. Metodología.....	29
A. Materiales.....	29
B. Procedimiento.....	30
C. Condiciones cromatográficas.....	30
D. Validación del método analítico.....	31
III. Resultados.....	36
IV. Análisis de resultados.....	47
V. Conclusiones.....	52
VI. Referencias bibliograficas.....	53



RESUMEN

El propósito del siguiente trabajo fue determinar con precisión y exactitud a través de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), las concentraciones de diclofenaco en tejido gingival humano, una vez administrado éste por vía oral, empleando como matriz biológica, el tejido bucal del maxilar inferior del cerdo.

La primera fase del método del método de cuantificación consistió en la extracción sólido-líquido del principio activo, en la cual la matriz biológica adicionada con concentraciones conocidas de diclofenaco y una cantidad fija de estándar interno y metanol fue sometida a un proceso de maceración, agitación mecánica y centrifugación. El sobrenadante líquido obtenido de la primera fase, fue analizado por CLAR con detección UV a 275 nm, empleando para la separación una columna C18, una fase móvil consistente en una mezcla de acetato de sodio y metanol (40:60 v/v). La validación del método analítico fue realizada conforme a los parámetros analíticos que marcan las guías para validación de métodos bioanalíticos y la NOM 177-SSA1-1998.

El método analítico fue capaz de cuantificar diclofenaco en muestras de 100 mg de tejido bucal humano de forma sencilla, reproducible y exacta en un rango de 0.1 a 5 µg/mL de diclofenaco, con una $r^2 = 0.9998$, y un límite de cuantificación de 0.0880 µg/mL, sin interferencia de productos endógenos derivados de la matriz. Los tiempos de retención para el estándar interno y el Diclofenaco fueron de 3.5 min. y 7 min. respectivamente, con un recobro mayor al 90%, y una precisión y exactitud que no rebasan los criterios establecidos para determinaciones en fluidos biológicos. La aplicabilidad del método se demostró determinando la presencia de diclofenaco en muestras de tejido bucal provenientes de pacientes administrados con una dosis única oral de 50 mg de diclofenaco en un rango de 2 a 19 µg de Diclofenaco/g de tejido. El método analítico validado puede ser aplicado en estudios de investigación que requieran la cuantificación de este principio activo dentro del rango de concentración previamente establecido.



INTRODUCCIÓN

Las extracciones quirúrgicas dentales, son procedimientos que generalmente están acompañados de dolor e inflamación. Son muchos los fármacos que se han investigado para minimizar el dolor postoperatorio, los más ampliamente utilizados son los AINES, (antiinflamatorios no esteroideos) que inhiben la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, reduciendo así su actividad sensibilizadora sobre las terminaciones sensitivas. Entre ellos ha demostrado su eficacia en diversos estudios el diclofenaco, un principio activo que además de inhibir la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, tiene la particularidad de distribuirse en líquidos y tejidos corporales, manteniendo concentraciones altas durante más tiempo.

Hasta el momento los trabajos publicados sobre la eficacia de los fármacos utilizados en este tipo de padecimientos, están basados en valoraciones de escala visual análoga (EVA) o evaluaciones semicuantitativas.

El laboratorio de farmacología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, se planteo el objetivo de obtener un método analítico por CLAR capaz de cuantificar con precisión y exactitud la concentración de diclofenaco en tejido bucal humano, siendo así el primer método capaz de realizar determinaciones cuantitativas de fármaco en tejido para su aplicación en la investigación odontológica.

Cualquier método que tenga por objetivo el ser utilizado para rutina o en la cuantificación de fármacos, es necesario que cuente con atributos de calidad y confiabilidad de que los datos obtenidos a partir de este son confiables, por lo que el método deberá ser validado conforme a los parámetros analíticos que marcan las guías para validación de métodos bioanalíticos y la NOM 177-SSA1-1998.



I. ANTECEDENTES TEORICOS

A. Inflamación

Cuando se produce una lesión en cualquier tejido del organismo, sea cual sea su origen (traumatismo, infección o tumor), éste tiene un mecanismo de reparación, que es la inflamación.¹

1. DEFINICIÓN.

La inflamación es una reacción protectora normal a la lesión tisular producida por traumatismos físicos, productos químicos nocivos o agentes microbiológicos. Es el esfuerzo del cuerpo por inactivar o destruir los microorganismos invasores, eliminar las sustancias irritantes e iniciar la etapa para la reparación tisular. El proceso inflamatorio suele desaparecer una vez que la cicatrización o la curación se completan. Sin embargo, en ocasiones la desencadena de manera inapropiada una reacción autoinmunitaria, como sucede en el asma o la artritis reumatoide. En estos casos las propias reacciones de defensa producen lesión tisular progresiva y pueden requerirse agentes antiinflamatorios para modular el proceso inflamatorio.²

En una primera fase se produce un aumento del flujo sanguíneo que se traducirá en dos de los signos cardinales de la inflamación: el "calor" y el "rubor". El plasma y algunas células de la sangre salen de los vasos sanguíneos hacia las células inflamadas produciendo el siguiente signo cardinal de la inflamación: el "tumor". Por último se liberan mediadores químicos específicos que varían según el tipo de proceso inflamatorio y consisten en aminas, como la histamina, péptidos pequeños, como la bradicinina, péptidos de mayor tamaño, como la interleucina y lípidos, como los eicosanoides, que estimulan los receptores del dolor generando el último signo cardinal de la inflamación que es el dolor.^{1,2}



El dolor es quizá uno de los síntomas más comunes que se presenta en una enfermedad, es una experiencia sensorial y emocional desagradable que experimenta un individuo de manera única para él, razón por la cual es referido y vivido en cada persona de manera diferente. El dolor es también un problema físico, psicológico y social, que puede afectar el desenvolvimiento y conducta normal de una persona.¹

B. Eicosanoides

1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES

Se engloba bajo esta denominación al conjunto de sustancias de prostaglandinas, tromboxanos, prostacilinas, leucotrienos, etc., (ver figura 1), de acciones fisiológicas diversas y a menudo contrapuestas, que poseen la característica común de ser sintetizadas a partir de ácidos grasos poliinsaturados esenciales de 20 átomos de carbono que contienen tres, cuatro ó cinco enlaces dobles.³

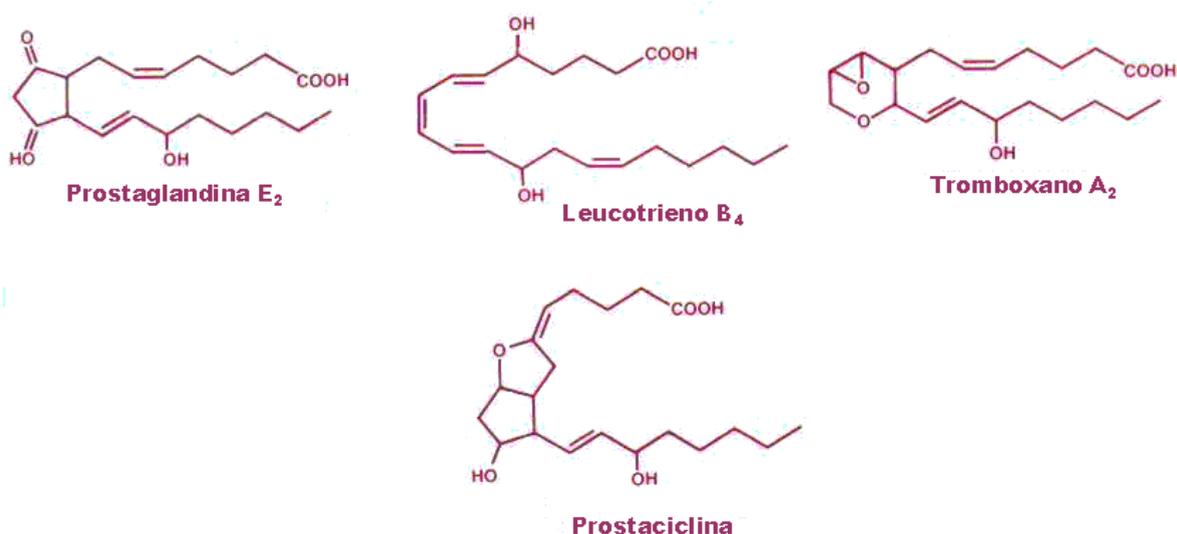


Fig.1 Estructura Química de los Eicosanoides



Los eicosanoides están implicados en la regulación de muchos procesos fisiológicos y se encuentran entre los mediadores y los moduladores de la reacción inflamatoria más importante.

La fuente principal de los eicosanoides es el ácido araquidónico, que deriva del metabolismo del ácido linoleico y se almacena formando parte de los fosfolípidos de la membrana celular. Su liberación se produce por acción de la fosfolipasa A₂ y otras acilhidrolasas, como respuesta a un número diverso de estímulos físicos, químicos o mecánicos, y es metabolizado por dos sistemas enzimáticos principales: a) la ciclooxigenasa, de la cual proceden las prostaglandinas, los tromboxanos y la prostaciclina y b) la lipooxigenasas, que median la producción de los leucotrienos.³

2. SÍNTESIS DE EICOSANOIDES

El ácido araquidónico liberado de los fosfolípidos de la membrana puede tener tres finalidades diferentes: a) difundir fuera del entorno celular sin causar efecto alguno; b) ser reincorporado a los fosfolípidos de la membrana, y c) actuar como sustrato de los sistemas enzimáticos ciclooxigenasa y lipooxigenasa.

a. Vía de la ciclooxigenasa: Las prostaglandinas, los tromboxanos y prostaciclina, se sintetizan por la vía de la ciclooxigenasa. Se identifican dos ciclooxigenasas: COX-1 y COX-2. La primera es constitutiva, en tanto que la segunda es inducida como reacción a los estímulos inflamatorios.³

La síntesis de todas las prostaglandinas se inicia en una primera etapa catalizada por la prostaglandina endoperóxido-sintetasa (PGH-sintetasa), que convierte el ácido araquidónico en PGH₂. La PGH-sintetasa es una glicoproteína de membrana que posee dos actividades catalíticas:



La primera es una ciclooxigenasa, encargada de insertar dos moléculas de oxígeno en el ácido araquidónico, ciclándolo, y produciendo un endoperóxido intermedio denominado PGG₂. La segunda actividad es una peroxidasa que cataliza la reducción del grupo 15-hidroperoxilo de la PGG₂ para convertirla en PGH₂⁴

A partir de la PGH₂, las endoperóxido isomerasas sintetizan PGE₂ y PGD₂, mientras que por reducción origina PGF_{2α}. La PGH₂ también es el origen de dos compuestos inestables y muy potentes; el tromboxano TXA₂ que se crea por la actuación de la tromboxano sintetasa y se metaboliza rápidamente y de forma no enzimática en el tromboxano TXB₂; la prostaciclina o PGI₂ es consecuencia de la actuación de la prostaciclina sintetasa, se metaboliza rápidamente a dos metabolitos uno inactivo y otro activo (ver figura 2).³

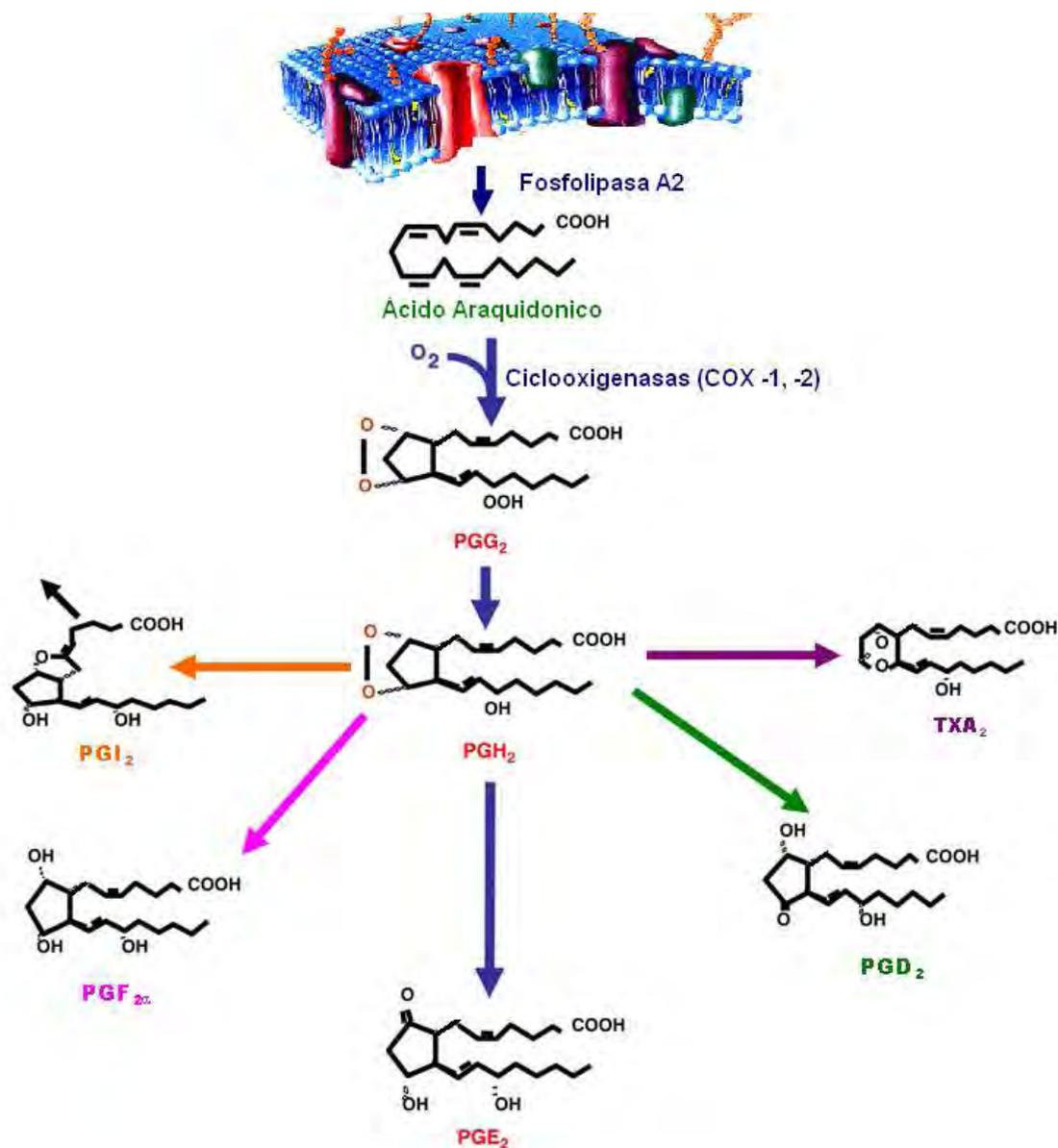


Fig. 2 Síntesis de los Derivados del Ácido Araquidónico Producidos por Ciclooxygenación. Modificado de Dey I et al. 2008

b. Vía de la lipooxigenasa: De manera alternativa pueden actuar diversas lipooxigenasas sobre el ácido araquidónico para formar derivados peroxidados inestables que se convierten en los derivados hidroxilados correspondientes, o en leucotrienos o lipoxinas, lo que depende del tejido.^{2,3}



El metabolismo del ácido araquidónico por la 5-12 y 15-lipooxigenasa resulta en la producción de los ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETE), los cuales se convierten rápido en hidroxiderivados (HETE) y leucotrienos. Los leucotrienos producidos por la 5-lipooxigenasa, están presentes en las células inflamatorias (PMN, basófilos, células cebadas, eosinófilos, macrófagos). La estimulación de estas células aumenta el Ca^{2+} intracelular, libera araquidonato e incorpora oxígeno molecular por la 5-lipooxigenasa que produce el epóxido inestable leucotrieno LTA_4 . Este intermediario, o se convierte al dihidroxileucotrieno LTB_4 o se conjuga con glutatión para producir el leucotrieno LTC_4 , el cual puede ser sometido a transformación secuencial de la molécula de glutatión por peptidasas para producir LTD_4 y LTE_4 (ver figura 3).⁶

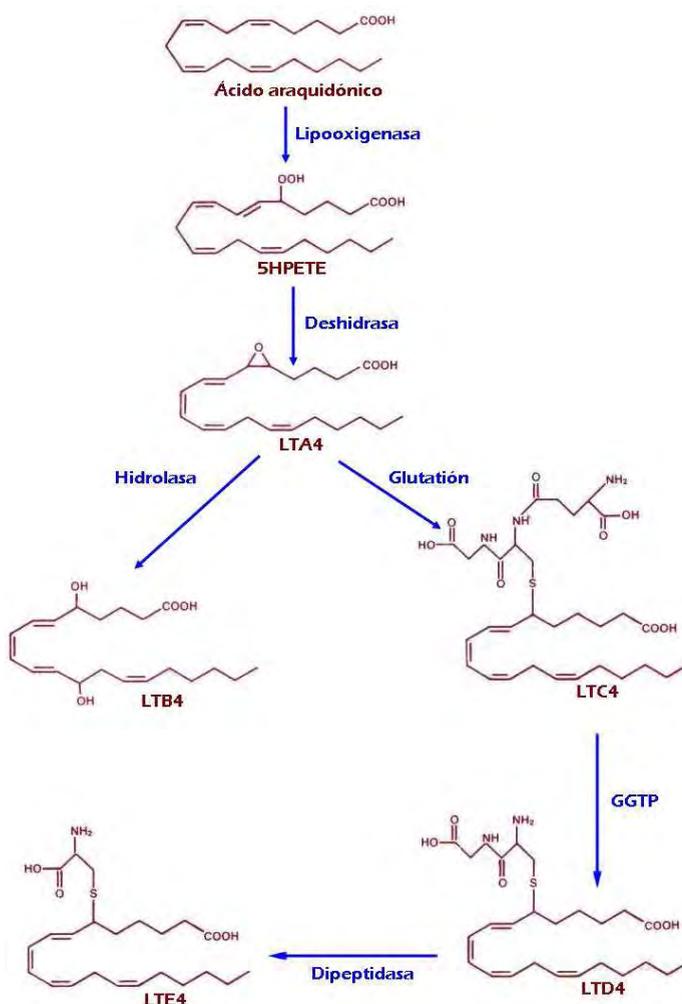


Fig. 3 Síntesis de Leucotrienos⁶



3. FUNCIONES FISIOLÓGICAS

Se sabe que los eicosanoides son producidos por casi todas las células, estando por tanto involucradas en la mayoría de las funciones orgánicas.

a. Sistema nervioso. En el sistema nervioso periférico las PGE_2 , PGE_1 y PGI_2 , ya sean liberadas por estímulos variados de naturaleza lesiva o administradas de forma parenteral, sensibilizan las terminaciones nociceptivas sin producir dolor de forma directa. Esto se caracteriza por los incrementos en la intensidad y la duración de la sensibilización del dolor inducida por estímulos como el calor, la presión o distensión, o por potenciación en la actuación de otros mediadores como la bradicinina, histamina, etc.³

b. Inflamación. Los eicosanoides contribuyen a conformar los síntomas de la inflamación en sus primeras dos fases, la vasodilatación aguda, acompañada de incrementos de la permeabilidad, y la consiguiente infiltración de leucocitos y células fagocíticas.

Los derivados de la ciclooxigenasa favorecen la vasodilatación prolongada y aumentan el flujo sanguíneo, al tiempo que potencian la acción de otros mediadores, como bradicinina y serotonina, capaces de incrementar la permeabilidad vascular y activar las terminales nerviosas.

Los derivados de la vía de la lipooxigenasas se forman y son liberados en neutrófilos, eosinófilos y macrófagos convenientemente estimulados. El LTB_4 ejerce una poderosa acción quimiotáctica que favorece la concentración de neutrófilos y produce hiperalgesia, así como el aumento en la permeabilidad vascular³



4. INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE EICOSANOIDES

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) bloquean tanto la formación de prostaglandina como de tromboxanos mediante la inhibición de la actividad de la ciclooxigenasa (ver figura 4). La inhibición de la vía de la lipooxigenasa aún se encuentra en investigación. Con algunas excepciones, los AINES no inhiben la actividad de la lipooxigenasa en concentraciones que inhiben de manera notable la actividad de la ciclooxigenasa. De hecho, al impedir la conversión de ácido araquidónico por la vía de la ciclooxigenasa, los AINES pueden hacer que más sustrato sea metabolizado a través de las vías de la lipooxigenasa, lo que lleva a un aumento en la formación de leucotrienos inflamatorios.⁶

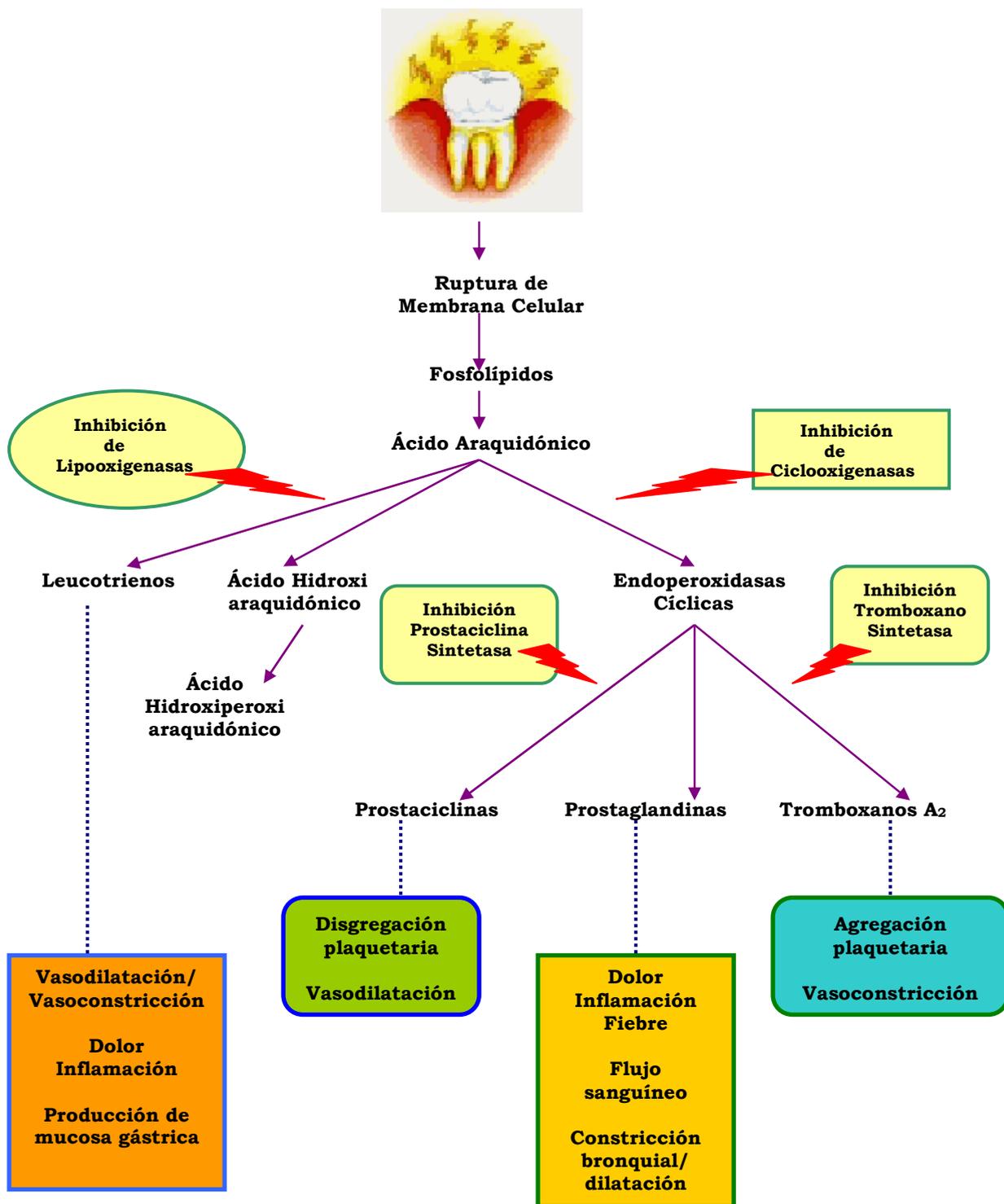


Fig.4 Tejido Dañado, Cascada del Ácido araquidónico y sus Metabolitos.

Modificada de Cashman J.



C. Fármacos Antiinflamatorios No Esteroides

1. DEFINICIÓN

Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES) constituyen un grupo farmacológico, químicamente heterogéneo y ampliamente utilizado, no solo en el tratamiento de patologías del aparato locomotor (artrosis, artritis reumatoide, trastornos músculo esqueléticos), sino también en otras indicaciones terapéuticas (fiebre, cólicos nefríticos y biliares, cefaleas, dismenorrea, traumatismos, y otras). Comparten acciones terapéuticas y efectos adversos, no producen depresión respiratoria y no inducen tolerancia ni dependencia física.^{8, 9}

2. ACCIÓN FARMACOLÓGICA

a. Acción Antiinflamatoria. Los AINES reducen la inflamación al inhibir la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, reducen su actividad sensibilizadora sobre terminaciones sensitivas, así como la actividad vasodilatadora y quimiotáctica.

b. Acción Antipirética. Es consecuencia de la capacidad inhibitoria de la síntesis de prostaglandina a nivel central. Reducen la liberación local de PGE₂ en la región preóptica hipotálmica que regula la temperatura corporal. La PGE₂ cuya liberación es estimulada por la acción de diferentes pirógenos, actúa como mediador de la respuesta febril al alterar el punto fijo de la temperatura.

c. Acción Analgésica. Las prostaglandinas vuelven sensibles las terminaciones nerviosas a la acción de la bradicinina, la histamina y otros mediadores químicos que el proceso inflamatorio libera a nivel local. De este modo, al disminuir la síntesis de prostaglandinas, se reprime la sensación de dolor.^{3, 9}



La acción analgésica abarca los dolores articulares, musculares y dentarios, además de cefaleas de diversa etiología, incluidas las formas moderadas de migraña. Pero a dosis suficientemente elevadas son también eficaces en dolores postoperatorios y postraumáticos, ciertos cólicos y dolores debidos a enfermedad cancerosa en sus primeras etapas.

En cuanto al dolor de la inflamación, la propia actividad antiinflamatoria contribuye a disminuir la cascada de producción, liberación y llegada de sustancias que pueden activar directamente las terminaciones sensitivas.³

3. MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo de acción de los AINES clásicos consiste en la inhibición de las ciclooxigenasas, impidiendo la sustracción del hidrógeno en el carbono 13 del ácido araquidónico y, por lo tanto bloquean la peroxidación en los carbonos 11 y 15. De manera que impiden la síntesis de distintos eicosanoides a partir del ácido araquidónico. Estos eicosanoides son los responsables en diversos grados de los mecanismos patogénicos de la inflamación, dolor y de la fiebre, pero debido a que también participan en otros procesos fisiológicos, su inhibición, sería igualmente la responsable de varios efectos adversos de estos fármacos.¹⁰

D. Diclofenaco

1. DEFINICIÓN

El diclofenaco es un derivado del ácido fenilacético, relativamente no selectivo como inhibidor de la ciclooxigenasa, tiene una fuerte actividad antipirética y analgésica.¹¹



El nombre químico del diclofenaco es sal monosódica del ácido benzoacético 2-[(2,6- diclorofenil) amino]¹²

2. NOMBRES COMERCIALES.

Voltaren, Voltarol, Cataflam, Dolobasan^{11, 12}

3. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Es un polvo cristalino de color blanco amarillento, ligeramente higroscópico y prácticamente inodoro.^{12, 13}

Presenta una fórmula empírica $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ y un peso molecular de 318.13 g/mol, con una estructura química:^{11, 13}

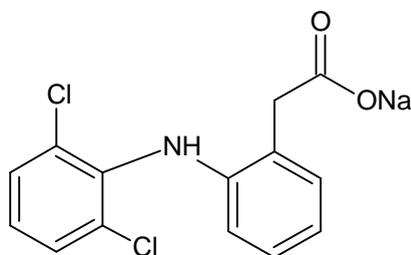


Fig.5 Estructura Química de Diclofenaco Sódico^{11, 12}

pKa: 4 (25°C)¹¹⁻¹³



Solubilidad

Tabla No 1. Solubilidad del Diclofenaco ^{11, 12}

Solvente	Solubilidad (mg/mL)
Agua desionizada	>9
Metanol	>24
Acetona	6
Acetonitrilo	<1
Ciclohexano	<1
Ácido clorhídrico (pH 1.1)	1
Buffer de fosfatos (pH 7.2)	6

El diclofenaco sódico tiene dos longitudes de onda de máxima absorción, en metanol a 283 nm y buffer de fosfatos (pH 7.2) a 276 nm.¹¹

4. PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Posee actividad analgésica, antipirética y antiinflamatoria, es un inhibidor de la ciclooxigenasa en la síntesis de las prostaglandinas. Es utilizado en condiciones clínicas como dolor agudo, dolor crónico e inflamación tal como en cirugía bucal, dismenorrea, dolor en espalda baja, cólico renal, cólico biliar.¹⁴

El diclofenaco también está aprobado para el tratamiento prolongado de la artritis reumatoide y la osteoartritis. Es más potente que la indometacina y el naproxeno.¹¹



5. FARMACOCINÉTICA

El diclofenaco es absorbido rápida y eficientemente luego de su administración oral, rectal o intramuscular. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan entre los 10 y 30 minutos posteriores a la administración intramuscular y entre 1.5 y 2.5 horas luego de administración oral recubierta.

El diclofenaco se une en un 99.5% a proteínas. Penetra eficientemente en el líquido sinovial inflamado, en el cual mantiene altas concentraciones en comparación con los niveles plasmáticos.

Presenta un metabolismo de primer paso y solo un 60% del fármaco alcanza la circulación sanguínea sin modificaciones luego de la administración oral. Se elimina principalmente por metabolismo hepático y posterior excreción urinaria de los conjugados de sus metabolitos. En humanos el principal metabolito es el 4-hidroxi-diclofenaco, que posee una actividad antiinflamatoria despreciable.^{15, 16}

6. EFECTOS ADVERSOS

Los efectos adversos se presentan generalmente en los primeros seis meses del tratamiento y son más frecuentes en los ancianos. Los problemas más frecuentes son los gastrointestinales, seguidos por los trastornos nerviosos menores y las reacciones alérgicas.^{14, 15}



7. INVESTIGACIÓN CLÍNICA

El diclofenaco al igual que otros AINES ha sido sujeto de investigaciones que describen su eficacia analgésica y antiinflamatoria. La mayoría de estos se ha realizado en fluidos biológicos como lo son el plasma, sangre y líquido sinovial. Estudios recientes han estado encaminados hacia las cirugías dentales, donde ha demostrado su eficacia antiinflamatoria con respecto a los demás fármacos.¹⁷⁻²²

Debido a esto en la última década se han desarrollado estudios de modelos in Vitro que simulan la cavidad bucal en los que se comparan diferentes tipos de tejido para su posterior uso en la investigación clínica. De entre varios tipos de tejido, la mucosa bucal del cerdo ha demostrado ser la más apropiada, debido principalmente a la permeabilidad que presenta.²³

a. Modelos animales. Debido a la limitada disponibilidad de la mucosa bucal humana, es muy frecuente el uso de mucosa bucal de una especie animal alternativa. Cuando se usan modelos animales para estudios in Vitro, estos deberán ser seleccionados en base a la similitud en estructura y permeabilidad con la mucosa bucal humana.^{24, 25}

Se han reportado trabajos usando mucosa oral de ratas y hámster, estas superficies son queratinizadas y por lo tanto no pueden ser un modelo apropiado de la mucosa bucal humana, que es una mucosa no-queratinizada. La mucosa bucal de los conejos, es un tejido no-queratinizado, sin embargo el área disponible es muy pequeña y frecuentemente limita su uso. La mucosa bucal de los perros y los monos es no-queratinizada, sin embargo se ha demostrado que es más permeable que la mucosa humana. Debido a la similitud fisiológica, anatómica, nutricional y metabólica entre los humanos y los cerdos, este último ha sido muy frecuentemente utilizado como modelo animal en la investigación de enfermedades humanas.



La mucosa bucal del cerdo es no-queratinizada y el grosor de los dos epitelios es muy similar (ver Tabla No. 2), además de que se ha demostrado que no hay diferencia significativa en cuanto a permeabilidad.²⁶⁻³⁰

Tabla No 2. Grosor Epitelial y Coeficiente de Permeabilidad (P) para Agua a través de la Mucosa Bucal de Diferentes Especies Animales.

Especie	P x 10⁻⁷ (cm/min)	Espesor Epitelial (µm)
Humana	579 ± 122	580 ± 90
Cerdo	634 ± 60	772 ± 150
Mono	1.025 ± 154	271 ± 50
Perro	1.045 ± 37	126 ± 20

Los datos son presentados con su ± desviación estándar. Reproducido de Squier et al. 1996. Copyright de: Oral Mucosal Drug Delivery

E. Método analítico

1. DEFINICIÓN

El método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir, para llevar a cabo el análisis de un componente específico en una muestra.³¹

Una vez determinado el método analítico que se va a emplear, es necesario establecer por medio de estudios de laboratorio una base de datos que demuestren científicamente que el método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requisitos de su aplicación.^{32, 33}



2. VALIDACIÓN

Los métodos analíticos que son usados para la determinación cuantitativa de fármacos y sus metabolitos en muestras biológicas tienen un papel significativo en la evaluación e interpretación de los datos del estudio. Por esto es preciso contar con un método analítico que tenga como principal atributo la confiabilidad para producir resultados fidedignos que puedan ser satisfactoriamente interpretados, por lo que es necesario llevar a cabo estudios experimentales que permitan demostrar que los parámetros que se están midiendo son confiables. Un proceso que permite cumplir este fin, es la validación. La validación le proporciona, a quien aplica la metodología, una seguridad sobre los métodos empleados y así poder tomar decisiones con certeza.^{31, 34}

La validación de un método analítico es el proceso que establece, mediante estudios en laboratorio, que las características de desempeño del procedimiento cumplen los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.³⁵

Los parámetros fundamentales para asegurar la aceptabilidad del desempeño de un método analítico son los siguientes:

a. Rango. Intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

b. Selectividad. Es la 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.

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



d. Limite de detección. Es la mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.

e. 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.

f. Precisión. Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes proporciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad

g. Repetibilidad. Se denomina a la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida mediante determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

h. Reproducibilidad. Es la 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.

i. Exactitud. Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

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

k. Recuperación Absoluta. A la eficiencia del método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.³⁶



F. Cromatografía

1. DEFINICIÓN

La cromatografía es un poderoso método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia y esta basado en un proceso de migración diferencial en el cual los componentes de una mezcla son transportados por una fase móvil, gas o líquido y retenidos selectivamente por una fase estacionaria que puede ser un líquido o un sólido.

La cromatografía fue inventada y denominada así, a principios del siglo XX por el botánico ruso Mikhail Tswett. Él empleó la técnica para separar varios pigmentos vegetales, haciendo pasar disoluciones de estos compuestos a través de una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio finamente dividido. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna, lo que justifica el nombre que eligió para el método (del griego **chroma** que significa "color", y **graphein** que significa "escribir").³²

2. CLASIFICACIÓN

Existen muchas maneras de clasificar los métodos cromatográficos, uno de ellos se basa en la forma en la que la fase estacionaria y la fase móvil hacen contacto, existiendo la cromatografía en columna y la cromatografía plana. Una clasificación más fundamental se basa en el tipo de fase móvil y estacionaria, y en la clase de equilibrios implicados en la transferencia de los solutos entre las fases. En la Tabla No. 3 se da la relación de las tres clases generales de cromatografía: cromatografía de líquidos, gases y fluidos supercríticos.



Tabla No 3. Clasificación General de los Métodos Cromatográficos en Columna ³²

Clasificación General	Método Específico	Fase Estacionaria	Tipo de Equilibrio
Cromatografía de Líquidos	Líquido-Líquido o reparto	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el líquido y la superficie enlazada
	Líquido-sólido o adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un sólido polimérico	Distribución/exclusión
Cromatografía de gases	Gas-líquido	Líquido adsorbido sobre un sólido	Distribución entre un gas y un sólido
	Gas- fase unida químicamente	Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre un líquido y una superficie enlazada
	Gas- sólido	Sólido	Adsorción
Cromatografía de fluidos supercríticos		Especies orgánicas enlazadas a una superficie sólida	Distribución entre el fluido supercrítico y la superficie enlazada.



3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) es la técnica que realiza la separación física de una mezcla de compuestos a través de la interacción selectiva entre los solutos, una fase estacionaria y una fase móvil, haciendo uso de instrumentación automatizada de alta eficiencia.³⁷

Entre las técnicas cromatográficas cuya fase móvil es un líquido, la cromatografía líquida de alta resolución es la más conocida. Su campo de aplicación cubre una gran parte del ámbito científico y su éxito se debe a la posibilidad de actuar de forma muy precisa sobre la selectividad entre los compuestos a través de la elección de la columna y de la composición del eluyente, es decir, al sacar partido de las interacciones disolución/fase móvil/fase estacionaria.

Entre sus ventajas se encuentran:

Eficacia. Los detectores empleados son generalmente detectores no destructivos, por lo que este método puede ser empleado no solo para la cuantificación de los productos sin degradar y/o degradados, sino que puede servir para el aislamiento y la identificación de los mismos.

Economía. Aunque el costo inicial del equipo y solventes son altos, la rapidez del análisis, la cantidad de información obtenida, la pequeña cantidad de muestra y el número de análisis que se puede realizar por jornada laboral, hace del mismo un método analítico ideal.



4. TIPOS DE CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

Existen diferentes maneras de clasificar la cromatografía líquida en columna. Basándose en la naturaleza de la fase estacionaria y en los procesos de separación, pueden enumerarse cuatro tipos:³⁷

a. Cromatografía de adsorción. La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción.

b. Cromatografía de intercambio iónico. La fase estacionaria tiene una superficie cargada iónicamente, con carga contraria a la de la muestra. La fase móvil es un amortiguador acuoso, en el que el pH y la polaridad se utilizan para controlar el tiempo de elución.

c. Cromatografía de exclusión. El relleno de la columna es un material que posee poros de dimensiones comprendidas entre ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según sea su tamaño molecular.

d. Cromatografía de reparto. En este caso, el medio poroso actúa únicamente como un soporte para el agua, que se desempeña como un agente de reparto.

La fase estacionaria de cromatografía de reparto es un líquido adsorbido o enlazado covalentemente en un sólido inerte. La separación se fundamenta en el reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria.

En relación con las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto.

1) Cromatografía en fase normal. Inicialmente la cromatografía de líquidos utilizaba fases estacionarias de elevada polaridad tales como el agua o el trietilenglicol soportadas sobre partículas de sílice o alúmina y como fase móvil se empleaba un disolvente relativamente no polar como el hexano, a este tipo de cromatografía se le conoce ahora como cromatografía en fase normal (ver figura 6). En este tipo de cromatografía el componente menos polar se eluye primero, debido a que relativamente es el más soluble en la fase móvil y un aumento en la polaridad de la fase móvil provoca una disminución del tiempo de elución.

2) Cromatografía en fase reversa. En este tipo de cromatografía, la fase estacionaria es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo, y la fase móvil es relativamente polar como el agua, el metanol o el acetonitrilo. Los componentes más polares eluyen primero, y un aumento en la polaridad de la fase móvil aumenta el tiempo de elución.^{32, 35, 37}

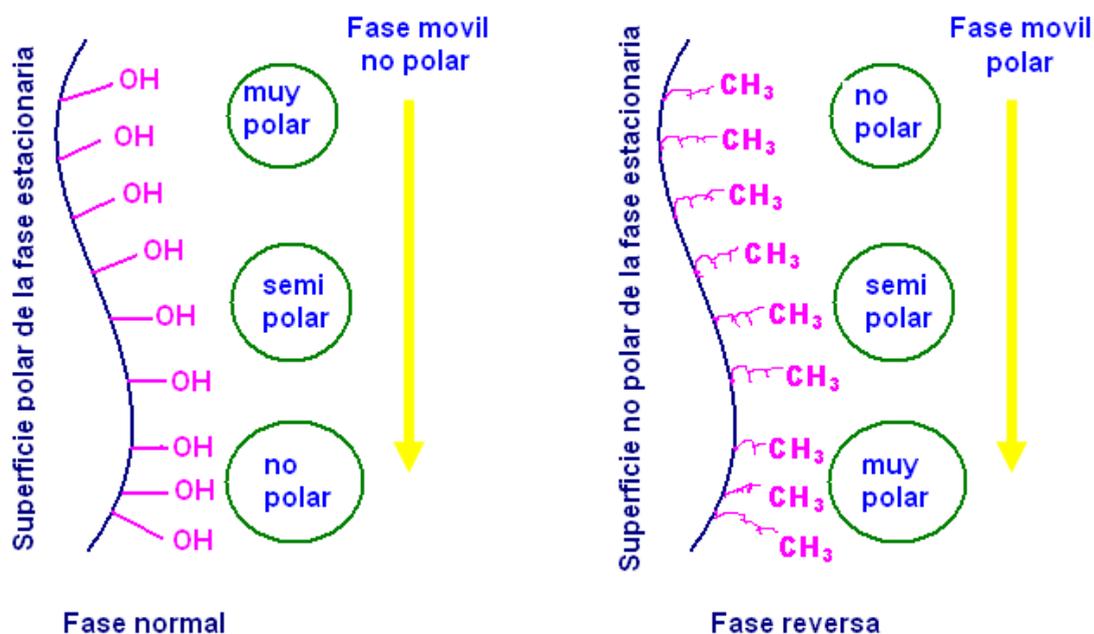


Fig.6 Ilustración gráfica de la cromatografía líquida en fase normal y en fase reversa. Los círculos representan los tipos de compuestos presentes en la muestra y su orden de elución.³⁷



5. COMPONENTES DE CLAR

La instrumentación general para un cromatógrafo de líquidos incorpora los siguientes componentes (ver figura 7):

- Un recipiente para la fase móvil, que puede ser de vidrio o de acero inoxidable, y que puede contener de 200 a 1000 mL de un disolvente.
- Un sistema de bombeo, que impulsa a la fase móvil hacia el inyector, el sistema de bombeo es el módulo que entrega al solvente de una manera exacta y precisa al resto del sistema cromatográfico
- Un sistema de inyección, que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el flujo del solvente a través del sistema, el sistema de inyección puede ser manual ó automatizado.
- Una columna de separación de acero inoxidable, que contiene el empaque necesario para efectuar la separación deseada.
- Un detector, el cual permite observar y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna.
- Un registrador que recibe y almacena la señal de los detectores e imprimen el cromatograma completo con las alturas y las áreas de los picos.^{33, 36}



Fig. 7 Componentes de un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución³⁸



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las extracciones quirúrgicas dentales, son procedimientos que generalmente están seguidos de dolor e inflamación. Los fármacos indicados en estos casos son los AINES, que inhiben la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos, reduciendo así su actividad sensibilizadora sobre terminaciones sensitivas. Entre ellos se encuentra el diclofenaco, fármaco que se une a proteínas plasmáticas en un 99.5%, permitiendo así su distribución a todos los tejidos corporales. Esta característica le permite mantener concentraciones altas en tejido durante más tiempo por lo que es el fármaco de primera elección en cirugías dentales. Ante la necesidad de cuantificar diclofenaco en tejido bucal en el laboratorio de Farmacología del CINVESTAV, el presente trabajo pretende obtener un método analítico por CLAR capaz de separar y cuantificar con precisión y exactitud dicho fármaco en tejido antes mencionado.



OBJETIVO

Implementar un método analítico, por Cromatografía Líquida de Alta Resolución que permita determinar con precisión y exactitud la presencia del Diclofenaco sódico en tejido bucal.

OBJETIVOS PARTICULARES

Obtener las condiciones adecuadas de extracción del principio activo en la matriz biológica.

Determinar los parámetros de linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación, límite de detección, selectividad, recuperación absoluta y estabilidad, para el método analítico implementado.



HIPOTESIS

La presencia de diclofenaco en tejido bucal, podrá ser evidenciada con precisión y exactitud a través del uso de la Cromatografía líquida de alta resolución, donde las condiciones de extracción y detección en el método analítico, serán definidas en función a las características de la matriz biológica y el fármaco de interés.



II. METODOLOGÍA

A. Materiales.

1. REACTIVOS

Diclofenaco sódico de Sigma Aldrich, Naproxeno sódico de Grupo Roche Syntex, Acetato de sodio anhidro y cloruro de sodio de JT-Baker, Metanol, Acetonitrilo y Ácido acético glacial, calidad HPLC y Agua calidad HPLC.

2. MATERIAL BIOLÓGICO

El tejido biológico fue obtenido de la encía de cerdo, maxilar inferior y recientemente sacrificado. Una vez obtenido se mantuvo en solución salina al 0.9% y en congelación, hasta el día de su análisis.

Para demostrar la aplicabilidad del método, se evaluaron muestras de tejido gingival de pacientes administrados con 50 mg de diclofenaco.

3. SOLUCIONES

Se prepararon dos soluciones stock de diclofenaco a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y de 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en metanol y una solución de Naproxeno de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ también en metanol.

Se preparó también una solución de acetato de sodio anhidro 0.075 M a un pH de 3.3 con ácido acético glacial.

La fase móvil se preparó con la solución de acetato de sodio anhidro de 0.075 M y metanol, en una proporción de 40:60 volumen/volumen.



B. Procedimiento

1. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Con base en la información teórica al tejido gingival seleccionado se le sometió a una serie de evaluaciones prácticas para determinar la mejor forma de tratamiento de la muestra (agitación directa, agitación mecánica usando un agitador magnético, y maceración con disolvente). El método de extracción del fármaco a partir de la matriz biológica elegido fue por medio de una extracción sólido- líquido donde el sólido fue triturado manualmente con ayuda de una punta de plástico.

En micro tubos eppendorf de 1.5 mL, se colectó el tejido (muestras con cantidades conocidas de fármaco, o bien muestras provenientes de pacientes).

Se adicionaron 50 μ L de naproxeno sódico en metanol [30 μ g/mL] como estándar interno y metanol suficiente para ajustar al volumen de 500 μ L. Se trituró la muestra con una punta de plástico, durante un minuto. Se agitaron los tubos en un vortex durante cinco minutos y se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 minutos, del sobrenadante se tomaron 60 μ L y se inyectaron al cromatógrafo.

C. Condiciones Cromatográficas

El sistema cromatográfico usado para la cuantificación del diclofenaco fue una adecuación del método reportado por Navarrete et al. 2005, por lo que consistió de una bomba Waters 501, un inyector manual Waters U6K con un asa de 20 μ L. La separación se realizó sobre una columna de fase reversa Novapack C18 de 150 x 3.9 mm D.I y de 5 μ m de tamaño de partícula. Un detector ultravioleta Waters 486, a una longitud de onda de 275 nm y la señal generada se capturó en un integrador Varian, modelo



4270. La fase móvil se colocó en un recipiente con un volumen de 1000 mL y se hizo pasar a través de la columna a un flujo constante de 1.2 mL/min.

D. Validación del Método Analítico

El método de cuantificación de Diclofenaco se validó tomando en cuenta los parámetros descritos en la NOM 177-1 SSA1- 1998.²⁵

1. RANGO

El rango de concentraciones a trabajar en el estudio se estableció de 0.1 µg/mL a 3.0 µg/ mL en la matriz biológica.

Tabla No 4. Curva de Concentración de Diclofenaco en Método

Concentración (µg/mL)	Tejido (mg)	Diclofenaco [0.5µg/mL]	Diclofenaco [5 µg/mL]	Naproxeno [30µg/mL]	Metanol (µL)
0.1	10	100 µL	-	50 µL	350
0.3	10	-	30 µL	50 µL	420
0.5	10	-	50 µL	50 µL	400
0.8	10	-	80 µL	50 µL	370
1.0	10	-	100 µL	50 µL	350
3.0	10	-	300 µL	50 µL	150

2. SELECTIVIDAD

Se estableció la selectividad del método al realizar el análisis de muestras provenientes de seis tejidos gingivales de cerdo. A cada tejido se le adicionaron 500 µL de metanol, se trituro la muestra con una punta de plástico, durante un minuto. Se agitaron mecánicamente los tubos en un vortex durante cinco minutos y se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 minutos, del sobrenadante se tomaron 60 µL y se inyectaron al cromatógrafo.



Se observó en el cromatograma que no existiera interferencia por productos endógenos de la matriz biológica en las respuestas cromatográficas del principio activo y estándar interno.

3. LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

Se analizó por quintuplicado la concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$. Se obtuvo la concentración promedio y el porcentaje del coeficiente de variación

4. LIMITE DE DETECCIÓN

Se prepararon y analizaron por triplicado las concentraciones por debajo del límite de cuantificación (0.02, 0.04, 0.06 y 0.08 $\mu\text{g/mL}$), se consideró como límite de detección a aquella concentración que logró distinguirse de los niveles de ruido.

5. LINEALIDAD

a. Sistema. Se preparó una curva de calibración en solución, con los seis niveles de concentración, (0.1 $\mu\text{g/mL}$ a 3.0 $\mu\text{g/mL}$.) Cada nivel de concentración se inyectó tres veces al cromatógrafo.

1) Precisión del sistema. Para evaluar la precisión del sistema, se analizó por sextuplicado la concentración de 0.8 $\mu\text{g/mL}$.

b. Método. A partir de pesadas independientes se prepararon seis soluciones de Diclofenaco de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ y 5 $\mu\text{g/mL}$, para obtener de forma independiente curvas de calibración en el rango de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ a 3.0 $\mu\text{g/mL}$, empleando Naproxeno sódico como estándar interno (30 $\mu\text{g/mL}$). Ver Tabla No. 4



En ambos casos se determinó la concentración a partir del promedio de las curvas de calibración, se calculó el valor de la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de determinación.

Se calcularon los intervalos de confianza, para la pendiente y la ordenada al origen, así como los coeficientes de variación de cada una.

6. PRECISIÓN DEL MÉTODO

a. Repetibilidad. En un mismo día se prepararon y analizaron por quintuplicado los niveles de concentración 0.2, 0.6 y 2.0 ug/mL (ver tabla No 5).

b. Reproducibilidad. Durante tres días se realizó el análisis por duplicado de los niveles de concentración 0.2, 0.6 y 2.0 ug/mL (ver tabla No 5).

Tabla No 5. Concentraciones para Precisión del Método

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Tejido (mg)	Diclofenaco [5 $\mu\text{g/mL}$]	Naproxeno [30 $\mu\text{g/mL}$]	Metanol (μL)
0.2	10	20 μL	50 μL	430
0.6	10	60 μL	50 μL	390
2.0	10	200 μL	50 μL	250

Las concentraciones de repetibilidad y reproducibilidad, se determinaron a partir del promedio de tres curvas de calibración realizadas el día del análisis.



7. EXACTITUD

Para evaluar la exactitud del método, se obtuvo el porcentaje recuperado de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad.

8. ESTABILIDAD

a. Análisis Inicial de Estabilidad. Se realizó un análisis inicial de estabilidad, que será el tiempo cero. Para lo cual se prepararon y analizaron por duplicado, los niveles de concentración 0.2, 0.6 y 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (ver tabla No 5).

Se planteó evaluar la estabilidad de las muestras de la siguiente forma.

b. Estabilidad de Muestras Preparadas. Se colocaron en tubos de plástico cónicos, muestras de 10 mg de tejido, solución de diclofenaco y naproxeno sódico, como se muestra en la tabla No 5, cada nivel de concentración se preparó por duplicado para cada periodo de tiempo, se procesaron hasta el punto de estar listas para su análisis y se sometieron a temperaturas de 4°C y -39°C , durante un periodo de 24, 48 hrs., y una semana.

c. Estabilidad de Muestras sin Preparar. Se colocaron a -39°C y para cada periodo de tiempo, muestras por duplicado de 10 mg de tejido, adicionadas con las concentraciones respectivas de diclofenaco para 0.2, 0.6 y 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para que a los tiempos de 24, 48 hrs., 1, 2, 3 y 4 semanas, se les adicionaran la cantidad respectiva de Naproxeno y metanol y así ser procesadas.



9. RECUPERACIÓN ABSOLUTA

En un mismo día se analizaron por triplicado los niveles de concentración 0.2, 0.6 y 2.0 ug/mL de Diclofenaco con tejido y en solución. La concentración de las muestras se determinó en una curva de calibración realizada el día del análisis.

Los resultados se compararon con respecto al valor nominal de cada nivel de concentración.

10. APLICACIÓN DEL MÉTODO

La utilidad del método validado se demostró al llevar a cabo la cuantificación de diclofenaco en muestras de tejido bucal de pacientes administrados con 50 mg del fármaco.



III. RESULTADOS

A. Selectividad

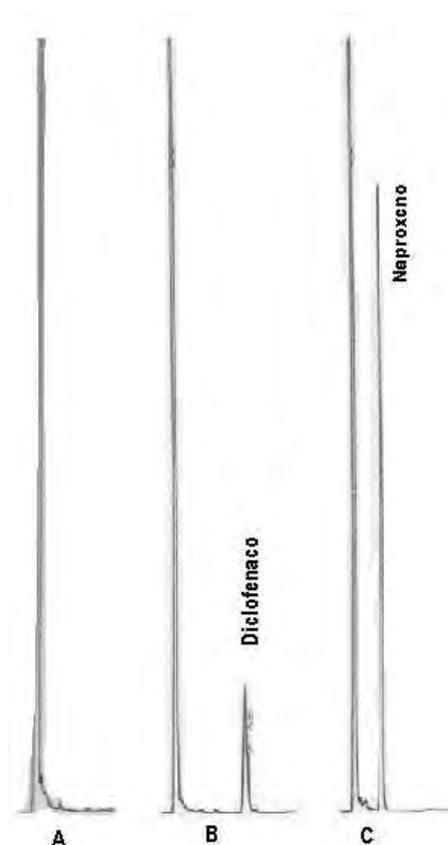


Fig. 8 Cromatograma **A**: tejido y metanol, Cromatograma **B**: tejido y Diclofenaco (5 μ g/mL) y Cromatograma **C**: tejido y Naproxeno sódico (30 μ g/mL)

B. Límite de Cuantificación

Tabla No 6. Resultados del Límite de Cuantificación

Concentración Nominal (μ g/mL)	Promedio de Concentración (0.08-1.2 μ g/mL)	Desviación Estándar	% CV (CV <20%)
0.1	0.0880 μ g/mL	\pm 0.0027	3.0395



C. Límite de Detección

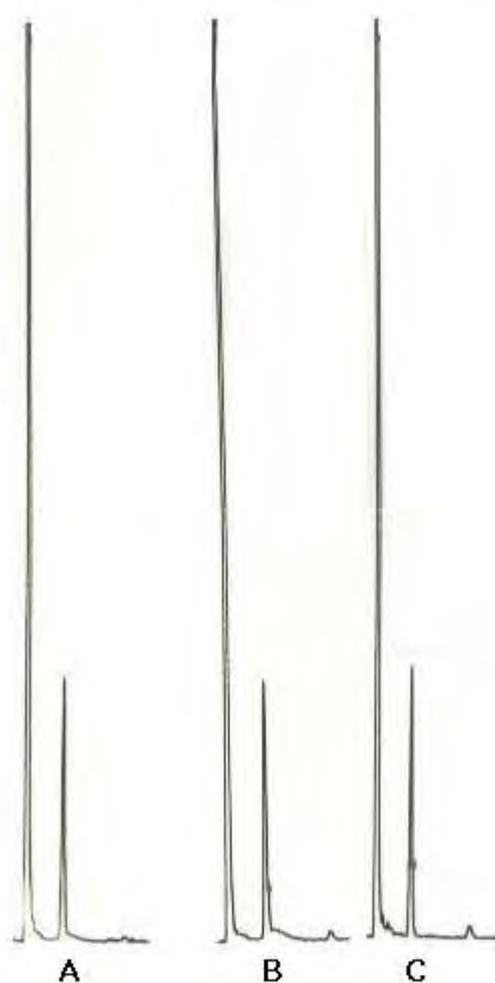
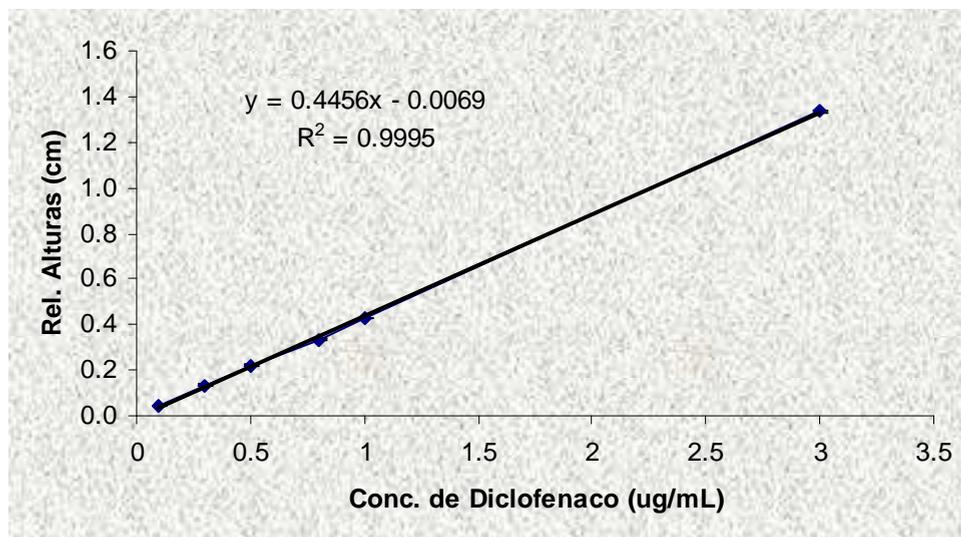


Fig. 9 Cromatograma **A**: Diclofenaco [0.04 µg/mL]
Cromatograma **B**: Diclofenaco [0.06 µg/mL]
Cromatograma **C**: Diclofenaco [0.1µg/mL]



D. Linealidad

1. SISTEMA



Gráfica No. 1 Curva de Concentración para Linealidad en Sistema, cada punto representa el promedio de seis determinaciones \pm su desviación estándar; además se presenta la ecuación de la recta con una pendiente de 0.4456 una ordenada al origen de -0.0069 y un coeficiente de determinación de 0.9995.

Tabla No. 7 Coeficiente de Variación para cada Nivel de Concentración

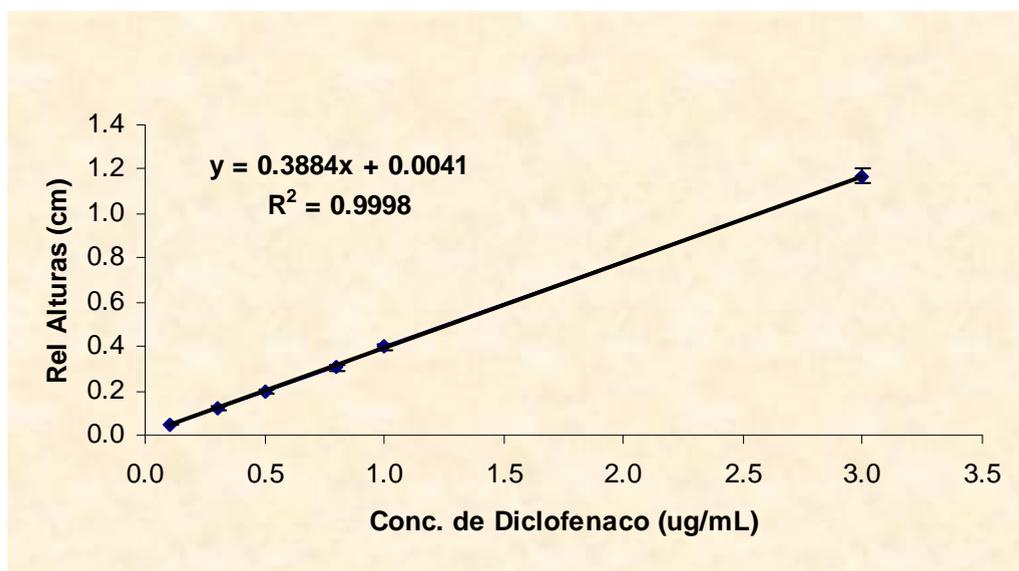
Concentración teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio Relación de Altura (cm)	Desviación Estándar	% CV (CV<20%)
0.1	0.0438	0.0006	1.2736
0.3	0.1354	0.0017	1.2926
0.5	0.2213	0.0032	1.4314
0.8	0.3359	0.0058	1.3023
1	0.4265	0.0018	0.4114
3	1.3357	0.0041	0.3066



Tabla No. 8 Precisión del Sistema

Concentración teórica ($\mu\text{g/mL}$)	Promedio Relación de Altura (cm)	Desviación Estándar	% CV (CV<20%)
0.8	0.3320	0.0058	1.7412

2. MÉTODO



Gráfica No.2 Curva de Concentración para Linealidad en Método, cada punto representa el promedio de seis determinaciones \pm su desviación estándar; además se presenta la ecuación de la recta; una pendiente de 0.3884, ordenada al origen de 0.0041 y un coeficiente de determinación de 0.9998



Tabla No. 9 Linealidad en Método

Concentración Nominal (µg/mL)	Promedio Concentración Experimental (µg/mL)	Exactitud (85 – 115%)	% CV (No mayor al 15%)
0.1	0.1122	112.1873	4.3191
0.3	0.3061	102.0214	7.6688
0.5	0.4922	98.4422	4.1466
0.8	0.7752	96.8978	4.9767
1	1.0112	101.1177	4.1921
3	3.0032	100.1059	2.6629

E. Precisión y Exactitud del Método

1. REPETIBILIDAD

Tabla No. 10 Resultados de Repetibilidad

Concentración Nominal (µg/mL)	Promedio Concentración Experimental (µg/mL) ± e.e	Exactitud (85 – 115%)	% CV (No mayor al 15%)
0.2	0.1728 ± 0.0037	86.4220	4.8001
0.6	0.6372 ± 0.0130	106.1993	4.5735
2	2.0931 ± 0.0272	104.6566	2.9066



2. REPRODUCIBILIDAD

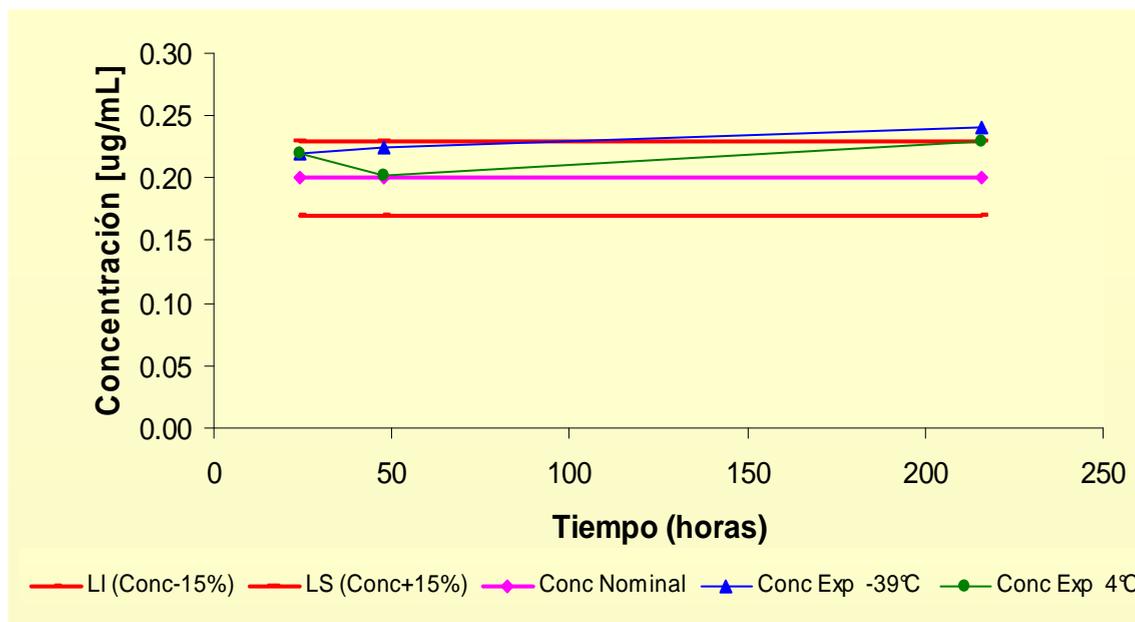
Tabla No.11 Resultados de Reproducibilidad

Concentración Nominal (µg/mL)	Promedio Concentración Experimental (µg/mL) ± e.e	Exactitud (85 - 115%)	% CV (No mayor al 15%)
0.2	0.1964 ± 0.0059	98.1966	7.4002
0.6	0.6062 ± 0.0053	101.0303	2.1592
2	2.0071 ± 0.0129	100.3559	1.5764

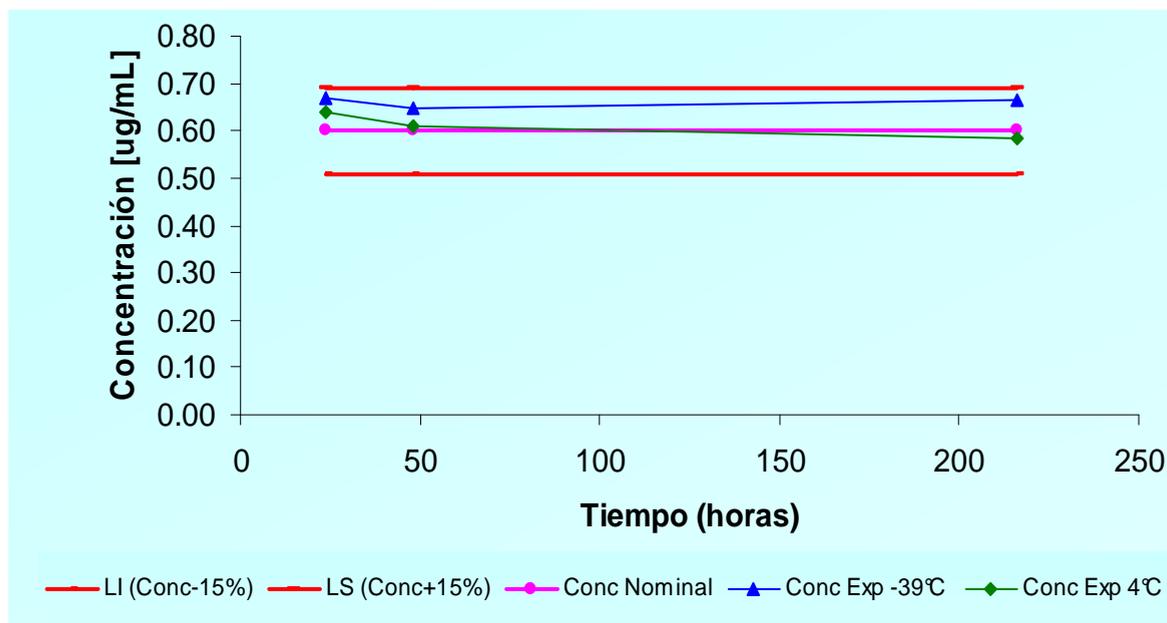
F. Estabilidad de la Muestra

Tabla No.12 Resultados del Análisis Inicial de Estabilidad

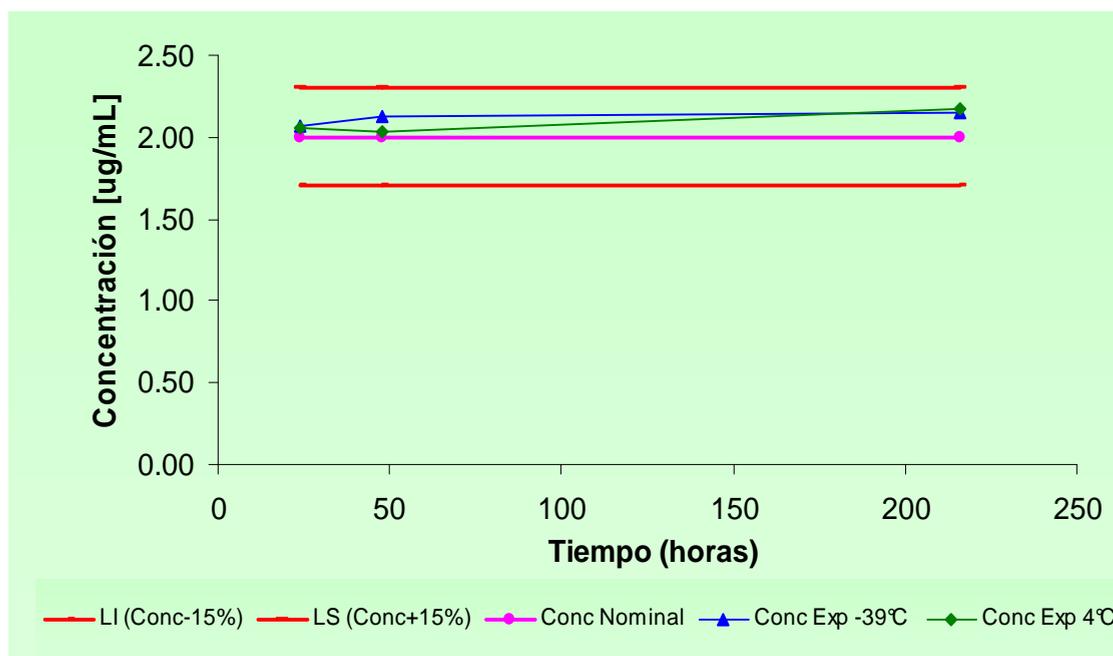
Concentración Nominal (µg/mL)	Promedio Concentración Experimental (µg/mL)	Desviación Estándar	Exactitud (85-115%)	CV (No mayor al 15%)
0.2	0.1781	0.0016	89.0505	0.9222
0.6	0.5994	0.0043	99.8937	0.7186
2	1.9378	0.0107	96.8895	0.5534



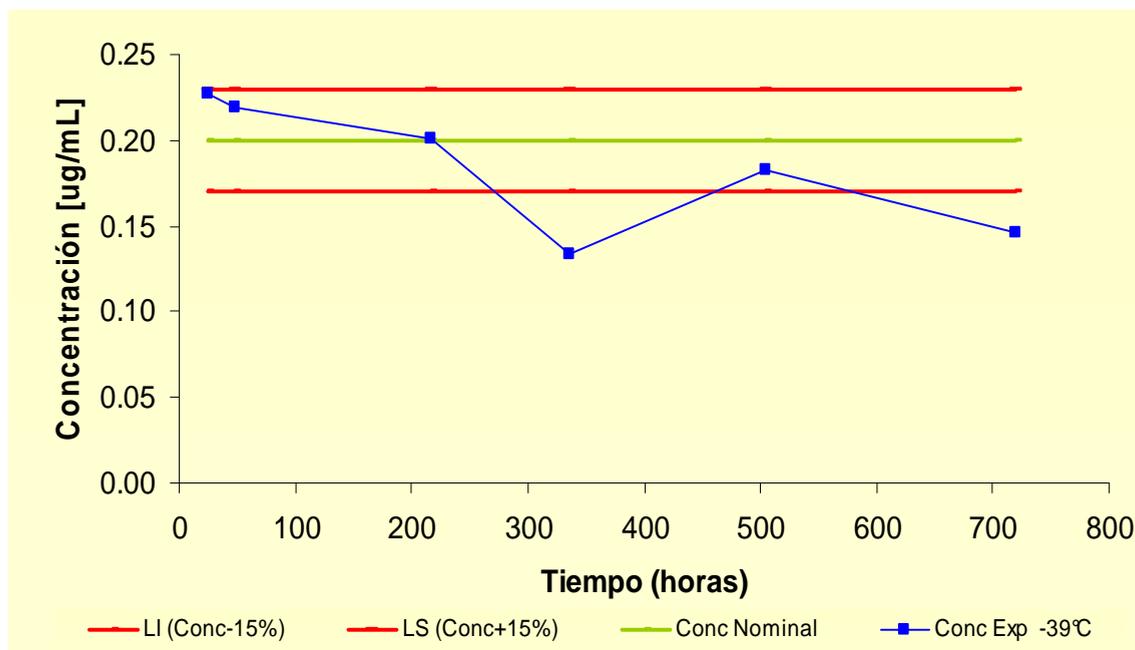
Gráfica No.3 Análisis de Estabilidad de Muestras Preparadas a una Concentración de 0.20 µg/mL, a 24 hrs, 48 hrs y 1 Semana.



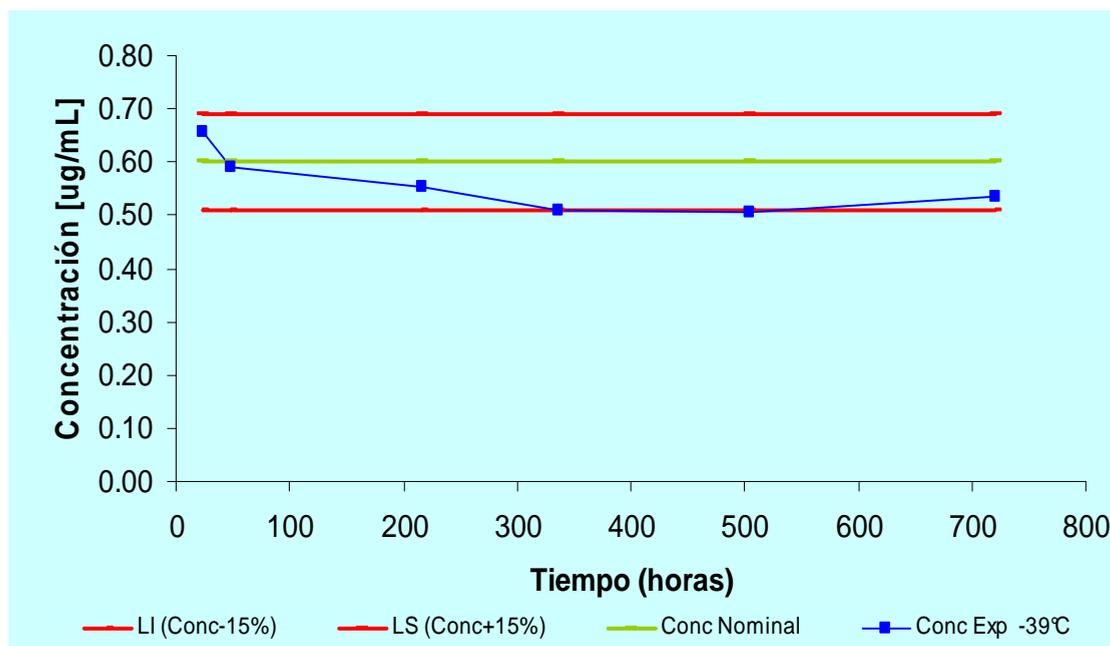
Gráfica No. 4 Análisis de Estabilidad de Muestras Preparadas a una Concentración de 0.60 µg/mL, a 24 hrs, 48 hrs y 1 Semana.



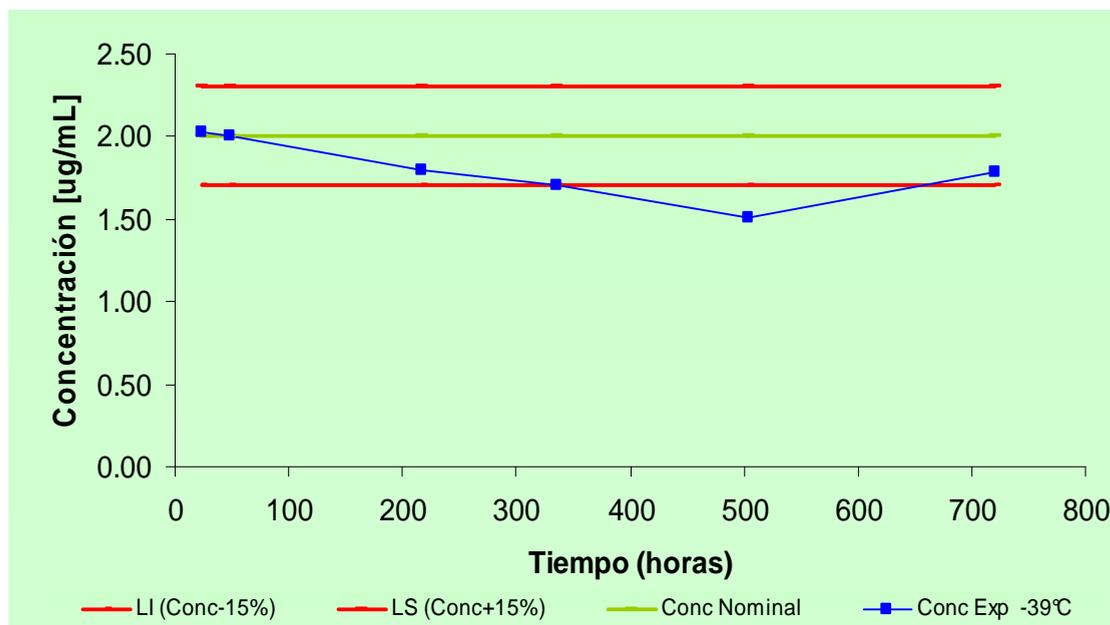
Gráfica No. 5 Análisis de Estabilidad de Muestras Preparadas a una Concentración de 2.0 µg/mL, a 24 hrs, 48 hrs y 1 Semana.



Gráfica No.6 Análisis de Estabilidad de Muestras sin Preparar a una Concentración de 0.20 µg/mL, a 24 hrs, 48 hrs y de 1 a 4 Semanas.



Gráfica No. 7 Análisis de Estabilidad de Muestras sin Preparar a una Concentración de 0.60 µg/mL, a 24 hrs, 48 hrs y de 1 a 4 Semanas.



Gráfica No.8 Análisis de Estabilidad de Muestras sin Preparar a una concentración de 2.0 µg/mL, a 24 hrs, 48 hrs y de 1 a 4 Semanas.



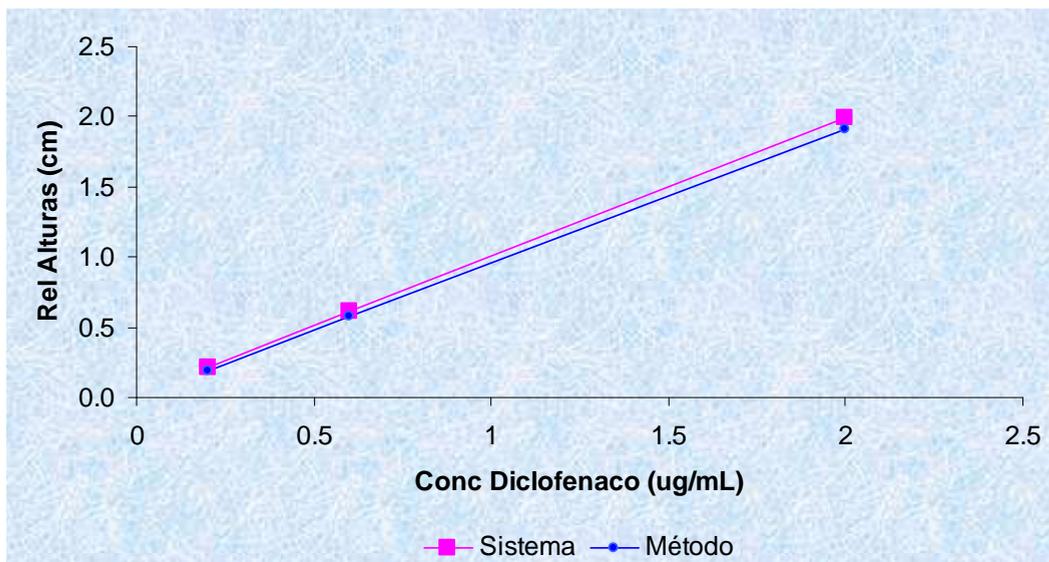
G. Recuperación Absoluta.

Tabla No.13 Recuperación Absoluta en Sistema

Concentración Nominal (µg/mL)	Promedio Concentración Experimental (µg/mL)	Desviación Estándar	Exactitud	CV (< 15%)	Recuperación Absoluta (%)
0.2	0.2165	0.0292	108.2324	13.4772	108.2324
0.6	0.6159	0.0202	102.6446	3.2779	102.6446
2.0	1.9878	0.0534	99.3886	2.6862	99.3886

Tabla No.14 Recuperación Absoluta en Método

Concentración Nominal (µg/mL)	Promedio Concentración Experimental (µg/mL)	Desviación Estándar	Exactitud	CV (< 15%)	Recuperación Absoluta (%)
0.2	0.1845	0.0068	92.2551	3.6686	92.2551
0.6	0.5743	0.0073	95.7135	1.2723	95.7135
2.0	1.9136	0.0531	95.6804	2.7725	95.6804



Gráfica No. 9 Comparación de la Recuperación Absoluta en el Sistema Contra la Recuperación Absoluta en el Método, se Observa que hay Similitud entre ambas Rectas.

H. Aplicabilidad del Método

Tabla No. 15 Concentraciones determinadas en pacientes, posterior a una administración oral de 50 mg de Diclofenaco

Paciente	μg de Diclofenaco g de Tejido
1	7.5811
2	10.8833
3	7.1933
4	6.5320
5	2.4326
6	4.6410
7	19.9074
8	2.9259
9	2.9737
10	2.3231
11	2.5133
12	2.1762



IV. ANÁLISIS DE RESULTADOS

La matriz biológica se eligió con base a una revisión bibliográfica, donde se encontraron estudios sobre la mucosa bucal del cerdo, en los cuales se menciona el parecido de este tejido con respecto a la mucosa bucal humana en términos de permeabilidad, bioquímica y morfología (Wertz P et al, 1993; Squier C et al 1985, 1986, 1991; Law S et al, 1995). La mucosa bucal de ambos tejidos es no queratinizada y comparten también un parecido muy cercano con el grosor del epitelio (Nicolazzo J et al, 2007; Obradovic et al, 2007). Cabe señalar también que el tejido que se ocupó específicamente fue la encía del cerdo, esto porque en la bibliografía se destaca como una área con una distribución morfológica y un contenido de lípidos que presenta una mayor permeabilidad, con respecto a otras áreas de la mucosa bucal del cerdo (Armored et al; Squier C et al 1986), asimismo esta área es equiparable con el área de los tejidos analizados con diclofenaco.

Otra de las ventajas que muestra este tejido con respecto al de otros animales es su disponibilidad inmediata en rastros, lo cual permitió garantizar que el tejido estuviera en condiciones ideales al momento de su análisis (Lee J et al 2002). Asociado a esto podemos mencionar el bajo costo que representaba este tejido en comparación con otros tipos de tejidos (Obradovic et al, 2007).

Como agente extrayente en la parte inicial del método se eligió al metanol, debido a que el diclofenaco es muy soluble en éste (ver tabla 1) y a su bajo costo con respecto a otros disolventes. Se planteó una técnica sencilla y eficaz de extracción como lo es la extracción sólido-líquido. No se realizaron pruebas con otro tipo de disolventes debido a que se evaluó la eficiencia de la extracción para el metanol en sistema y método, con la técnica propuesta, en el parámetro de la recuperación absoluta, donde se obtuvo un recobro mayor al 92 %, con precisión y exactitud que cumplen con los criterios de aceptación de la NOM-177-SSA-1998, como podemos observar en la tabla No. 14 y en la gráfica No. 9. No se descarta que el uso de otro tipo de disolvente e inclusive una extracción líquido-líquido genere



mejores resultados, pero esto implicaría un costo más elevado debido a lo complicado del procedimiento de extracción.

Una vez que se realizó el procesamiento de la muestra y que se obtuvo la respuesta cromatográfica, se observó que el extrayente no interfería con el análisis cromatográfico, ya que la señal generada por el metanol se presentaba en los primeros segundos del análisis. Se observó también que el cromatograma no presentaba ningún tipo de interferencia con respecto a la matriz biológica (ver figura 8), esto también es atribuible al extrayente ya que estaría permitiendo separar bien al diclofenaco y el Naproxeno de los componentes de la matriz biológica.

Lo anterior queda confirmado con la prueba de selectividad que se realizó a los seis tejidos gingivales de cerdo, para asegurar que no hubiera interferencia de la matriz biológica en los análisis posteriores. Con los resultados obtenidos se estableció al tejido bucal de la encía de cerdo como una matriz biológica idónea para ser utilizada en este análisis.

Al realizar la revisión bibliográfica se encontró que la concentración promedio de diclofenaco cuantificada en tejido sinovial era de 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (Blagbrough I et al, 1992), bajo este supuesto y como único dato de concentración en un fluido biológico diferente al plasma o suero (Li K et al, 1995; Mason J et al, 1995; Lee HS et al, 2000), pero sin referencia alguna en tejido bucal u otro, se propuso el rango de concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ a 3.0 $\mu\text{g/mL}$, donde la relación respuesta - concentración demostró linealidad (ver gráfica 1).

Para calcular el límite de cuantificación se analizó por quintuplicado la concentración más baja de la curva de calibración y al promediar las determinaciones (ver tabla 6), se estableció como límite de cuantificación 0.0880 $\mu\text{g/mL}$, debido a que el valor se encuentra dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal, con una exactitud del 88% y un coeficiente de variación del 3.0395 %, cumpliendo con los criterios de aceptación especificados en la NOM-177-SSA-1998.



Para el cálculo del límite de detección se analizaron por triplicado las concentraciones por debajo del límite inferior de la curva de calibración, evaluandolas visualmente en el cromatograma. La concentración de 0.06 $\mu\text{g/mL}$, se distinguió del ruido sin ningún problema (ver figura 6) y se le consideró a esta concentración el límite de detección para este método.

La linealidad del sistema se evaluó, al inyectar al cromatógrafo por triplicado cada nivel de concentración de la curva de calibración realizada sin adición de la matriz biológica (CNQFB, 2002), observándose que la relación concentración - respuesta es lineal (ver gráfica 1). Los coeficientes de variación del rango de concentración evaluados no fueron mayores al 1.5% y una precisión con coeficiente de variación menor al 1.8 % (ver tabla 7 y 8), lo que asegura proporcionalidad directa entre la concentración y su respuesta, además de indicar que el sistema de medición funciona apropiadamente.

La linealidad del método se realizó en la matriz biológica preparando seis curvas de calibración de forma independiente. Al realizar el promedio de las seis determinaciones, se obtuvo una respuesta lineal continua y reproducible a lo largo del rango de concentración (gráfica 2), presentando exactitud dentro del rango establecido por la NOM-177-SSA-1998, esto es del 85% al 115% del valor nominal establecido (ver tabla 9), observándose que el nivel de concentración menor presentó una exactitud del 112.1873 %, valor mayor al de las otras concentraciones, pero dentro del criterio establecido, explicado por el hecho de que a menores concentraciones la precisión y exactitud están más influenciadas por errores sistemáticos, como la preparación de las soluciones usadas, la exactitud en la medición de la altura del pico cromatográfico para la concentración de 0.2 $\mu\text{g/mL}$.

Tanto en la repetibilidad como en la reproducibilidad del método, se obtuvieron porcentajes del CV menores de 7.5 %, para ambos casos la exactitud estuvo dentro del rango del 85-115% (ver tabla 10 y 11). Con los resultados obtenidos, queda establecido que el método presenta exactitud y precisión, por lo que la variabilidad del método y la variabilidad atribuible al



análisis en diferentes días, esta dentro de los parámetros establecidos como aceptables por la NOM-177-SSA-1998.

Al realizar la estabilidad se encontró que las muestras procesadas y listas para su análisis, a una concentración de 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ son estables hasta las 48 horas; en tanto concentraciones por arriba de 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pueden ser estables hasta una semana

La evaluación de la estabilidad en la matriz biológica adicionada con el fármaco de interés, tuvo la finalidad de establecer la integridad fármaco-matriz biológica a determinadas condiciones de temperatura y tiempo (ver gráficas 3-8) antes de su análisis; en función a que muestras de posibles pacientes son sometidas a la misma condición. La condición de tiempo fue establecida en un lapso de cuatro semanas a una temperatura de $-39\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se observó que las muestras con concentraciones de hasta 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ son estables únicamente por una semana (gráfica 6); en tanto concentraciones por arriba de 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pueden ser estables hasta por cuatro semanas (ver gráfica 7), no obstante es conveniente repetir el estudio de estabilidad para la concentración de 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (gráfica 8) para asegurar esto, dado que se obtuvo en la tercera semana una desviación al criterio de aceptación establecido por la NOM-177-SSA-1998, que pudo deberse en este caso a la preparación de la solución del estándar interno, originando una diferencia en el cociente de la relación diclofenaco-naproxeno sódico..

La aplicabilidad del método quedó demostrada al poder determinar la concentración de diclofenaco, presente en las muestras de pacientes. Las diferencias de concentraciones, varían en función de la cantidad de tejido enviado para el análisis de cada paciente, ya que las muestras, no presentaban un peso uniforme, se decidió presentar los resultados como μg de diclofenaco/g de tejido, obteniéndose una concentración mínima de 2.1762 μg de diclofenaco/g de tejido, para el paciente No. 12 y la concentración más alta encontrada fue de 19.9074 μg de diclofenaco/g de tejido, como se puede observar en la tabla 15. Las concentraciones de diclofenaco determinadas demuestran que el diclofenaco está llegando



hasta su sitio de acción, en este caso tejido proveniente de la encía inflamada de pacientes.

Las concentraciones determinadas en el tejido gingival de pacientes a los cuales les fueron administrados 50 mg de diclofenaco, resultaron ser altas con respecto a las cuantificadas en otras matrices biológicas (Li K et al, 1995; Mason J et al, 1995; Lee HS et al, 2000), donde las concentraciones se encuentran en intervalos de nanogramos hasta 2.5 µg/mL, resultando relevante para su aplicación en investigación odontológica debido a que no existe reporte alguno en encía bucal.



V. CONCLUSIONES

El método analítico fue capaz de cuantificar diclofenaco en muestras de 100 mg de tejido bucal humano de forma sencilla, reproducible y exacta en un rango de 0.1 a 3.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de diclofenaco, sin interferencia de productos endógenos derivados de la matriz.

Muestras provenientes de pacientes administrados con una dosis única oral de 50 mg de diclofenaco mostraron la presencia del mismo en un rango de 2 a 19 μg de Diclofenaco por gramo de tejido.

El método analítico validado puede ser aplicado en estudios de investigación que requieran la cuantificación de este principio activo dentro del rango de concentración previamente establecido en tejido dental.



VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Doloweb [sede Web] México: Novartis Farmacéutica, S.A.; 2005 [acceso el 28 de marzo del 2008] El dolor. Disponible en: <http://www.doloweb.com/Publico/Consejos/Dolor/EIDolor>
2. Mycek M, Harvey R, Champe P. Farmacología. 2da ed. México: Mc Graw-Hill; 2004. 475-486
3. Espulgues J. Mediadores celulares II. Eicosanoides. En Florez J. Farmacología. Barcelona:Salvat; 1994. 289- 292
4. Steinmeyer Jürgen. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Arthritis Research. 2000; 2: 379-385
5. Dey Y, Lejeune M, Chadee K. Prostaglandin E₂ receptor distribution and function in the gastrointestinal tract. [Sede web] 2008 [acceso 05 de Marzo 2009] Disponible en: <http://www.nature.com/.../v149/n6/images/0706923f1.jpg>
6. Foegh M, Ramwell P. Eicosanoides: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y compuestos relacionados. En Katzung G. Farmacología Básica y Clínica. 9na ed. México: El manual moderno; 2005. 300-302
7. Cashman J. Non-steroidal anti-inflammatory drugs versus postoperative pain. Journal of the Royal Society of Medicine. 1993; 86: 464-465
8. Rivera A. AINES: su mecanismo de acción en el sistema nervioso central. Revista Mexicana de Anestesiología. Artículo de Revisión No. 1. 2006; 29: 36-40



9. Instituto de Salud. Boletín Farmacoterapéutico de Castilla la Mancha [sede Web] España: Instituto de Salud; 2001 [acceso el 21 de abril del 2008] AINES "Clásicos" e inhibidores selectivos de la COX-2. Disponible en: http://sescam.jccm.es/web/farmacia/guiaspublicaciones/II_4_AINEs.pdf
10. Florez J. Fármacos analgésicos antitérmicos y antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos. En Florez J. Farmacología. Barcelona: Salvat; 1994. 316- 318
11. Florey K. Analytical Profiles of Drug Substances. New York: Borrard Academy Press. 1990; 19: 123-141
12. The Merck Index an encyclopedia of chemical drugs & biologicals, published by Merck Research Laboratories of merck 13th edition, Co. Inc. Whitehouse Station 2001. 521
13. Quanyum A. Stability-Indicating HPLC. Methods for Drug Analysis, New York: Pharmaceutical Press London. 2003; 215-216
14. Smith C. Farmacología. México: Medica Panamericana. 1994; 652
15. OdontoRed.com [sede Web] México: Bagó, S.A.; 2005 [acceso el 28 de marzo del 2008] Dioxaflex. Disponible en: <http://www.bago.com/odontored>
16. MacVan B. Índice de medicamentos. 5^a ed. México: El Manual Moderno. 1995; 486-488
17. Carriches C, Martínez J. Eficacia analgésica de diclofenaco versus metilprednisolona en el control del dolor postoperatorio tras la cirugía del tercer molar inferior. Cirugía Bucal, Oral Surgery. 2005; 10:432-439



18. Gómez J, Castillejos V. Evaluación del efecto del diclofenaco versus ibuprofeno en el dolor postoperatorio después de la extracción quirúrgica del tercer molar inferior, *Revista Asociación Dental Mexicana*. 1999; 44 (4):137-140
19. Hyrkäs T, et al. Effective postoperative pain prevention through administration of bupivacaine and diclofenac. *Anesth Prog*. 1994; 41(6):6-9
20. Ahlström U, Bakshi R, Nilson P, Wåhlander. The analgesic Efficacy of diclofenac dispersible and ibuprofen in postoperative pain after dental extraction. *European Journal of Clinical Pharmacology*. 1993; 44: 587-588
21. Roelofse J, et al. Analgesic and anti-inflammatory efficacy of tenoxicam and diclofenac sodium after third molar surgery. *Anesth Prog*. 1996; 43: 103 – 107
22. Tai Y, Baker R. Comparison of controlled-release ketoprofen and diclofenac in the control of post-surgical dental pain. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 1992; 85: 16-18
23. Armored D. Comparative permeability of various chemical markers through human vaginal and bucal mucosa as well as porcine bucal and mouth floor mucosa. *Archives of Oral Biology*. 2004;49: 387-392
24. Nicolazzo JA, Finnin BC. In vivo and In Vitro Models for Assessing Drug Absorption Across the Buccal Mucosa. En: Springer US. *Drug Absorption Studies In Situ, In Vitro and In Silico Models*. NY: Springer; 2007. 7(4): 89-111



25. Obradovic T, Hidalgo JI. In Vitro Models for Investigations of Buccal Drug Permeation and Metabolism. En Springer US. Drug Absorption Studies In Situ, In Vitro and In Silico Models. NY: Springer; 2007. 7(7): 167-181
26. Squier CA, Hall BK. In-vitro Permeability of Porcine Oral Mucosa after Epithelial Separation, Stripping and Hydration. Archives of Oral Biology. 1985; 30 (6): 485-491
27. Squier CA, Wertz PW, Cox P. Thin-layer Chromatographic analyses of Lipids in Different Layers of Porcine Epidermis and Oral Epithelium. Archives of Oral Biology. 1991; 36 (9): 647-653
28. Wertz PW, Swartzendruber D, Squier CA. Regional Variation in the Structure and Permeability of Oral Mucosa and Skin. Advanced Drug Delivery Reviews. 1993; 12 (1-2): 1-12
29. Law S, Squier CA, Wertz PW. Regional variation in content, Composition and Organization of Porcine: Epithelial Barrier Lipids Revealed by Thin-layer Chromatography and Transmission Electron Microscopy. Archives of Oral Biology. 1995; 40 (12): 1085-1091
30. Squier CA, Wertz PW, Cox P, Downing D. The Lipid composition of Porcine Epidermis and Oral Epithelium. Archives of Oral Biology. 1986; 31 (11): 741-747
31. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Guía de Validación. Métodos Analíticos. México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A. C. 2002
32. Skoog D. Principios de Análisis Instrumental. 5ta ed. España: Mc Graw-Hill; 2001. 1-19, 785-793



33. SSA. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, FEUM 8ª edición. México 2004, 874-875
34. Vinod P, et al. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1992; 81 (3): 309-310
35. Farmacopea de los Estados Unidos de América, Formulario Nacional. USP 30 NF 25, 2007: 438- 452
36. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
37. Yost R, Etre L, Conlon R. Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica, Barcelona: Perkin-Elmer; 1980. Págs.3, 17-30
38. Waters the science of what's posible. [sede web] USA: Waters company; [acceso 05 de Marzo 2009]. High Performance Liquid Chromatography. Disponible en: <http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=es> ES...
39. Navarrete A, Cruz L, Oliva I, Castañeda G. Gastroprotection and effect of the simultaneous administration of Cuachalalate (*Amphipterygium adstringens*) on the pharmacokinetics and anti-inflammatory activity of diclofenac in rats. Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2005: 1-8
40. Lee J, Kil S, Wook Y. The effect of storage conditions on the permeability of porcine buccal mucosa. Archives of Pharmacal Research. 2002; 25 (4): 546-549



41. Blagbrough I, et al. High-performance liquid chromatographic determination of naproxen, ibuprofen and Diclofenac in plasma and synovial fluid in man. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications*. 1992;578 (2): 251-257

42. Li K, et al. Determination of Diclofenac sodium in human plasma by reversed-phase liquid chromatographic. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 1995;18 (11): 2205-2216

43. Mason J, et al. A rapid high-performance liquid chromatographic assay for the measurement of Diclofenac in human plasma. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 1995;18 (10): 2245-2258

44. Lee HS, et al. Simultaneous determination of aceclofenac and diclofenac in human plasma by narrowbore HPLC using column-switching. *Journal Pharmaceutical Biomedic*. 2000; 23 (5): 775-781