



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Desarrollo y validación de un método analítico por
cromatografía de líquidos de alta resolución para
cuantificar Telmisartán en plasma y su aplicación en un
estudio de biodisponibilidad en población mexicana.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

Nathalie Montserrat Hernández Rodríguez

MÉXICO, D.F.

2011





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Dra. Inés Fuentes Noriega
VOCAL: Profesor: M en C. Juan Manuel Rodríguez
SECRETARIO: Profesor: M en F. Luis Jesús García Aguirre
1er. SUPLENTE: Profesor: M en C. María de Lourdes Mayet Cruz
2° SUPLENTE: Profesor: QFB. Kenneth Rubio Carrasco

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Investigación Farmacológica y Biofarmacéutica S.A de C.V

ASESOR DEL TEMA:

M en F Luis Jesús García Aguirre

SUSTENTANTE :

Nathalíe Montserrat Hernández Rodríguez

Dedicatorias

A mis padres, **Bertha R y Tomás H**, por ser mis maestros en la vida, por formarme durante todos estos años en los que me han cuidado, mimado, regañado, aconsejado, orientado y aunque digan que siempre hago lo que quiero no se han detenido hasta hacer de mí lo que soy ☺, espero algún día poder recompensar todo lo que he recibido de ustedes, al menos con esta tesis se que cumplo uno de sus sueños y eso me hace muy feliz. Disculpen por las veces que el teclado de mi computadora no los dejó dormir, lo lamento era inevitable jeje, gracias por estar orgullosos de los hijos que formaron, pero no creo que ese orgullo supere al que yo siento hacia ustedes. Los amo

A mi hermano **Oscar D. H.** por ser un excelente ejemplo de hermano mayor y no muy diferente a mis padres me has mimado y consentido de más, gracias por todas las veces que compartimos o diferimos en ideas, cada platica contigo me deja alguna enseñanza y sí no al menos una gran sonrisa, agradezco las veces que con una simple palabra me hiciste sentir mejor cuando las cosas no estaban muy bien, por ser mi asesor (sin honorarios) de materias inentendibles para mí ... por ser además de mi hermano mi confidente, mi compañero en desveladas escolares en donde nunca dejaste de ofrecerme un café con chocolate, te lo he dicho y ahora lo repito: de grande quiero ser como tú ... te amo "jermanito mayor"

Agradecimientos

A toda mi numerosa familia, por que se que siempre confiaron en mí, gracias.

Gracias a los dueños de coffee time: mi prima Claudia y su esposo Moisés por la colaboración en el empastado de este trabajo.

A mis viejas amigas desde la secundaria: Norma, Joscelyn, Cecilia porque nuestras reuniones nunca se han interrumpido, porque hemos formado una amistad solida llena de buenos momentos.

A mis amigos del CCH: Ana (Hamta), Abelardo (pajarraco), Marcos (mapachín) nos alejamos por momentos pero se que siempre están ahí, a Viri (pequeño troll) además de ser mi compañera y amiga desde media superior, emprendimos juntas este camino por la Facultad de Química gracias por ser un excelente ser humano.

A todos aquellos con los que compartí la emoción del primer día en esta facultad en aquel grupo 8 y quien me diría que entre ellos se encontrarían algunos de mis ahora mejores amigos gracias a todos ustedes QFB's, IQM, QA o IQ's: Marisol (marichocho o tía pelucas), Mónica (mini equipa!), Oscar (clarkete), Yuridia (torpa insumos), Allan (allanoma), Alfonsina (madame ponchoi), José Luis (balsero), Eduardo (cereal), Fabi, Nara, Roge, a los que conocí porque la facultad y el orden del caos así lo quiso, agradezco su deseo pues pude formar una excelente amistad con ellos: Claudia Alejandra (alita), Ángel (face), Alejandra Yunuen (yunyen), Anllely (anallely? o anLeLy?), Paulette (Po...pol), Adriana, Araceli, Marco, Paola (torpe), Iván (skafandroos!), Mara, Paulina, Diana; a los que llegaron como perdidos a la facultad y pase divertidos momentos en mi último semestre en esta facultad, los politos consentidos: Javier (keke) y Arturo (Arthur). Los momentos con todos ustedes han sido de calidad, pero sobre todo han marcado mi vida universitaria, me llevo los mejores momentos compartidos como el estrés pre examen, las comidas flash en algún pasillo, la jardinera o el "jardín de las ardillas", los repasos de 15 minutos antes de cada practica de laboratorio o las desveladas por msn pretendiendo terminar tareas infinitas, sin ustedes definitivamente este camino no habría sido tan sensacional.

Gracias al M en F Luis J García y la M en F Liz Medina , por compartir sus conocimientos y asesorarme en este trabajo limitante entre profesional y estudiante,

sobre todo agradezco las puertas abiertas para ingresar a IFaB y con ello conocer a excelentes profesionales de la química, con capacidad de transmitir su conocimiento.

A los QFB's Jenny Reyes y Jaime García por ser mis Jasco teachers, por la paciencia para explicarme cualquier cosa, porque sin pedir nada a cambio siempre estuvieron dispuestos a resolver cualquier duda gracias sobre todo por su amistad sin su gran ayuda este trabajo no habría sido posible, a los QFB's Sandra P, Enrique S y Javier M, por que en algún momento los auxilié y distraje con mis ociosidades además de que siempre se encargaron de que aprendiera algo nuevo, gracias a los QFB's Mireya, Lluvia, Paulina y Alberto, a pQFB's Teresa, Araceli y Tec QI Yadira, que aunque nunca los auxilié pase muy buenos y divertidos momentos en el laboratorio, pretendiendo adivinar cuantos viales había en algún reservorio ☺ o simplemente por la "pregunta química del día", a los QFB's Griselda Rodríguez y Omar Hernández, por ser muy buenos jefes conmigo y considerarme parte de la familia IFaB, a las "chicas calidad" las QFB's Adalith Rojas, Rosa Dorantes, Alejandra Herrera, Marisol Soriano y Rocío gracias por permitirme fastidiarlas a menudo y con eso cortar un poco el estrés que las podía invadir, a Don Julio (puma de corazón) y Paco porque siempre tuvieron mi material pulcro impidiendo la contaminación de las muestras y por las buenas pláticas en el cuarto de lavado ☺.

Gracias mis sinodales la Dra. Inés Fuentes Noriega y el M en C. Juan Manuel Rodríguez por el apoyo en la revisión de este trabajo.

Gracias a la **Universidad Nacional Autónoma de México** por brindarme educación de calidad desde nivel medio superior e inculcarme que debo: *"aprender a ser, aprender a aprender y aprender a hacer"*

Gracias a la **Facultad de Química**, por formarme como profesional de la Química y sembrar en mí las ganas de seguir aprendiendo, por enseñarme que nunca es suficiente.

*Por mi raza hablará el espíritu
iii México, Pumas, Universidad, Gooooya !!!*

“

*“Para triunfar en la lucha por la vida, el hombre ha de tener o una gran inteligencia o un corazón de
piedra.”
(Max Frisch)*

*“La inteligencia consiste no sólo en el conocimiento, sino también en la destreza de aplicar los
conocimientos en la práctica.”
(Aristóteles)*

A mis padres y hermano...

Índice

Abreviaturas.....	i
Índice de tablas.....	iii
Índice de figuras	v
1. Resumen.....	1
2. Introducción y objetivos	2
3.Generalidades.....	4
3.1 Telmisartán.....	4
3.1.1 Propiedades fisicoquímicas.....	4
3.1.2Farmacodinamia	5
3.1.3Farmacocinética.....	6
3.1.4 Indicaciones terapéuticas	8
3.1.5 Contraindicaciones.....	8
3.1.6 Interacciones medicamentosas.....	9
3.2 Métodos analíticos.....	10
3.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	11
3.4 Cuantificación en fluidos biológicos.....	13
3.5 Validación de métodos analíticos.....	16
4. Parte experimental.....	19
4.1 Material, equipo e instrumentos.....	19
4.1.1 Material.....	19
4.1.2 Equipo e instrumentos	19
4.1.3 Reactivos y disolventes.....	20
4.1.4 Sustancias de referencia.....	21
4.1.5 Preparación de soluciones.....	21
4.2 Desarrollo del método analítico.....	24
4.2.1 Condiciones cromatográficas.....	24
4.2.3 Elección de estándar interno	25
4.2.4 Método de extracción	26
4.3 Validación del método analítico.....	30
4.3.1 Adecuabilidad del sistema	30
4.3.2 Preparación de curva de calibración y puntos control de calidad en plasma	30
4.3.3 Selectividad del método	32
4.3.4 Repetibilidad de la curva de calibración	32
4.3.5 Linealidad.....	33
4.3.6 Limite de cuantificación y limite de detección	33
4.3.7 Precisión del método.....	33
4.3.8 Exactitud del método	34
4.3.9 Recobro.....	35
4.3.10 Estabilidad	35
4.3.11 Tolerancia del método	38
4.4 Aplicación del método en un estudio de biodisponibilidad	39
4.4.1Criterios de inclusión	39

4.4.2	Criterios de exclusión	40
4.4.3	Retiro de voluntarios	40
4.4.4	Evolución del estudio de biodisponibilidad	41
4.4.5	Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos	42
5.	Resultados y análisis de resultados	44
5.1	Desarrollo del método analítico	44
5.1.1	Condiciones del detector	44
5.1.2	Fase móvil y solución de lavado	44
5.1.3	Volumen de inyección y velocidad de flujo	45
5.1.4	Estándar interno	45
5.1.5	Método de extracción	46
5.2	Validación del método analítico	48
5.2.1	Adecuabilidad del sistema	48
5.2.2	Linealidad del método	49
5.2.3	Precisión	51
5.2.4	Límite de cuantificación y límite de detección	55
5.2.5	Recobro.....	57
5.2.6	Selectividad.....	59
5.2.7	Estabilidad.....	62
5.2.8	Tolerancia.....	74
5.3	Etapas clínicas.....	76
5.3.1	Estadística demográfica descriptiva	76
5.3.2	Estadística descriptiva de los datos de concentración de plasma con respecto al tiempo	76
5.3.3	Concentración plasmática con respecto al tiempo en escala normal y semilogarítmica.....	78
5.3.4	Parámetros farmacocinéticos	80
6.	Conclusiones.....	82
7.	Anexos	83
7.1	Anexo I. Datos demográficos de 3 voluntarios de los 56 participantes en el estudio	83
7.2	Anexo II. Muestra representativa de las concentraciones plasmáticas de Telmisartán para tres voluntarios en los diferentes tiempos de muestreo de los 56 analizados.	85
7.3	Anexo III. Muestra representativa de las gráficas en escala normal y semilogarítmica con respecto al tiempo para tres voluntarios de 56 analizados	86
7.4	Anexo IV. Parámetros farmacocinéticos de telmisartán obtenidos para cada voluntario	89
8.	Bibliografía.....	90

Abreviaturas

ABC _{0-t}	Área bajo la curva de la concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t
ABC _{0-Inf}	Área bajo la curva de la concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo infinito
ACN	Acetonitrilo
AAINE	Analgesico Antiinflamatorio No Esteroideo
ARA II	Antagonista de los receptores de angiotensina II
°C	Grados Celsius
CA	Control de calidad Alto
CB	Control de calidad Bajo
CC	Muestras de Control de Calidad
CFR	Cromatografía en Fase Reversa
CIH	Cromatografía de Interacción Hidrofóbica
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
CM	Control de calidad Medio
cm	Centímetros
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios
CP	Concentración plasmática
CV	Coeficiente de variación
C _{max}	Concentración plasmática máxima
DE	Desviación estándar
DEA	Desviación estándar absoluta
EE	Error estándar
EMA	European Medicines Agency
FDA	Food and Drug Administration
Fig.	Figura
FP	Fluorescencia
g	Gramos
h	Horas
HTA	Hipertensión arterial
HPLC-ESI	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización electro spray
MS/MS	espectrometría de masas en tándem con ionización electro spray
IMC	Índice de masa corporal
IPA	Isopropanol
K _e	Constante de eliminación
LC	Limite de cuantificación
LD	Limite de detección
LS	Límite superior de la curva de calibración
M	Molar
mg	Miligramos
Max	Máximo
MeOH	Metanol
µg	Microgramos
µL	Microlitros

μM	Micromolar
μm	Micrometros
mL	Mililitros
min	Minutos
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercurio
nm	Nanómetro
PA	Presión arterial
PS	Presión sistólica
r	Coefficiente de correlación lineal
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
T_{max}	Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima
$t_{1/2}$	Vida media de eliminación
TMR	Tiempo medio de residencia

Índice de tablas

Tabla 1	Métodos analíticos reportados para la extracción de telmisartán...	10
Tabla 2	Clasificación de los métodos de cromatografía en columna.....	11
Tabla 3	Preparación de curvas de calibración y puntos control de calidad.	31
Tabla 4	Preparación de puntos control de calidad en plasma.....	31
Tabla 5	Condiciones cromatográficas.....	46
Tabla 6	Resultados de la adecuabilidad del sistema para corridas de validación.....	48
Tabla 7	Resultados de la linealidad del método para cuantificar telmisartán en plasma.....	49
Tabla 8	Parámetros de linealidad del método para cuantificar telmisartán en plasma.....	50
Tabla 9	Repetibilidad del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma	52
Tabla 10	Reproducibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma analista 1.....	53
Tabla 11	Reproducibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma analista 2.....	54
Tabla 12	Reproducibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma entre analistas.....	55
Tabla 13	Límite de cuantificación y límite de detección para cuantificar telmisartana en plasma.....	56
Tabla 14	Recobro absoluto del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma.....	58
Tabla 15	Recobro absoluto de zolpidem tartrato (E.I) en plasma.....	59
Tabla 16	Estabilidad de telmisartán en plasma (primer ciclo de congelación – descongelación a -70°C).....	62
Tabla 17	Estabilidad de telmisartán en plasma (segundo ciclo de congelación– descongelación a -70°C).....	63
Tabla 18	Estabilidad de telmisartán en plasma (tercer ciclo de congelación– descongelación a -70°C).....	64
Tabla 19	Estabilidad de telmisartán en plasma (temperatura ambiente de 21-29°C) 24h.....	65
Tabla 20	Estabilidad de telmisartán en plasma (temperatura ambiente de 21-29°C) 48 h.....	66
Tabla 21	Estabilidad de telmisartán en plasma (primer ciclo de refrigeración de 1-8°C).....	67
Tabla 22	Estabilidad de Telmisartán en plasma (segundo ciclo de refrigeración de 1-8°C).....	68
Tabla 23	Estabilidad de muestra procesada (24h en automuestreador 4°C)	69
Tabla 24	Estabilidad de muestra procesada (96 h en automuestreador 4°C)	70
Tabla 25	Estabilidad de Telmisartán muestra evaporada (24h en refrigeración a 1-8°C).....	71
Tabla 26	Estabilidad de telmisartán muestra evaporada (96 h en refrigeración a 1-8°C).....	72
Tabla 27	Estabilidad a largo plazo de telmisartán (-70°C) después de 160	

	días.	73
Tabla 28	Tolerancia del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma con volumen parcial de muestra (concentración dentro de la curva de calibración).....	74
Tabla 29	Tolerancia del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma con volumen parcial de muestra (concentración por encima de la curva de calibración).....	75
Tabla 30	Estadística descriptiva de las variables demográficas.....	76
Tabla 31	Estadística descriptiva de las concentraciones de telmisartán con respecto al tiempo	77
Tabla 32	Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos de telmisartán.....	80
Tabla 33	Estadística comparativa entre los parámetros farmacocinéticos de telmisartán en población mexicana versus población china.....	81

Índice de figuras

Fig. 1	Estructura química de telmisartán	4
Fig. 2	Método de extracción evaluado N° 1 (sólido – líquido)	26
Fig. 3	Método de extracción evaluado N° 2 (precipitación – evaporación)	27
Fig. 4	Método de extracción evaluado N° 3 (sólido – líquido)	28
Fig. 5	Método de extracción evaluado N° 4 y utilizado (precipitación – evaporación)	29
Fig. 6	Gráfico de linealidad del método para cuantificar telmisartán en plasma	51
Fig. 7	Límite de Detección y Cuantificación.....	57
Fig. 8	Selectividad del método para la mezcla de plasma y los plasmas individuales.....	60
Fig. 9	Selectividad del método para fármacos de uso común	61
Fig. 10	Perfil farmacocinético promedio de telmisartán ± error estándar en escala normal.....	78
Fig. 11	Perfil farmacocinético promedio de telmisartán en escala semilogarítmica	79

1. Resumen

A continuación se presenta el desarrollo de un método analítico para cuantificar telmisartán en plasma mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), por detección de fluorescencia con λ_{ex} 305 nm y λ_{em} 375 nm, en donde se empleó la técnica de precipitación de proteínas, en un rango de 1-1500 ng/mL.

La columna cromatográfica utilizada en el análisis fue Zorbax Eclipse XDB C8 4.6 x150 mm, 5 μ m de tamaño de partícula y fase móvil de solución amortiguadora de fosfatos de sodio (Na₂HPO₄ 10 mM): acetonitrilo (69:31 v/v).

Para evidenciar que el método desarrollado fue consistente se validó de acuerdo a los parámetros establecidos en la NOM-177-SSA1-1998; a las muestras analizadas se les determinó: linealidad, selectividad, precisión y exactitud, límite inferior de cuantificación (LIC), límite de detección (LD), recobro, tolerancia y estabilidad de la muestra a temperatura ambiente, en ciclos de congelación-descongelación, muestra evaporada, procesada, y a largo plazo.

Una vez validado el método analítico pudo ser empleado en un estudio de biodisponibilidad en un grupo de 56 voluntarios sanos pertenecientes a la población mexicana a los que se les tomaron 20 muestras sanguíneas periódicamente en un lapso de 0-96 horas lo que nos permitió obtener los siguientes valores para los parámetros farmacocinéticos después de la administración de un comprimido de 80 mg de telmisartán : $T_{\text{max}} = 1.26 \pm 0.86\text{h}$, $C_{\text{max}} = 434.80 \pm 274.19 \text{ ng/mL}$, $ABC_{0-t} = 2561.41 \pm 1502.91 \text{ h*ng/mL}$, $ABC_{0-\text{inf}} = 2702.47 \pm 1666.66 \text{ h*ng/mL}$, $K_e = 0.038 \pm 0.011 \text{ h}^{-1}$ y $t_{1/2} = 20.27 \pm 7.21\text{h}$.

Cada muestra fue analizada de acuerdo al método analítico desarrollado para la cuantificación de telmisartán en plasma.

2. Introducción y objetivos ^(1, 5, 13, 24)

La hipertensión arterial es un síndrome cardiovascular progresivo, de etiología multifactorial, caracterizada por aumento sostenido de las cifras de presión arterial (PA), presión sistólica (PS) igual o mayor a 140 mmHg y/o presión diastólica (PD) igual o mayor a 90 mmHg. Desafortunadamente la hipertensión y la diabetes tipo 2 se vinculan mortalmente y son dos de los factores de riesgo más altos para desarrollar una enfermedad cardiovascular.

Los pacientes con hipertensión arterial sufren daño progresivo en los llamados órganos blanco (corazón, riñones, cerebro y vasos sanguíneos) como consecuencia de esta enfermedad.

La prevalencia nacional registrada de esta patología en la población se encuentra entre 20 y 69 años de edad es de 30%.

De acuerdo a reportes emitidos por la OMS, la hipertensión es el factor de riesgo número uno de muerte. En México, los problemas cardiovasculares y metabólicos han ido en aumento, entre los cuales, la hipertensión arterial (HTA) es el principal factor de riesgo asociado a mortalidad.

La tasa de mortalidad en México por enfermedades del corazón se ha incrementado de manera progresiva: en 1990 fue 36.6%, en 1995 se elevó a 41.9% y en 2000 los datos reportaron una cifra de 43.5% con desalentadores pronósticos. Hasta el 2010 se estimó que en nuestro país existen 15 millones de pacientes hipertensos, sin embargo poco más de la mitad de los afectados no han sido diagnosticados con HTA (57%), de los pacientes diagnosticados, la mitad no sigue ningún tratamiento terapéutico y solo el 19% logran controlar su hipertensión.

Los sistemas de salud, así como el resto de la sociedad, actualmente se encuentran inmersos en la dinámica de la economía de la salud, por lo tanto la escasez de los recursos, el alto costo de la atención y el presupuesto asignado a la salud adquieren relevancia.

Se ha descrito que el costo anual de la atención del paciente hipertenso ambulatorio varía entre 57 y 450 dólares, incluyendo pruebas de laboratorio y medicamento.

El complicado panorama para un paciente con un alto riesgo cardiovascular actualmente es alentador, al existir en el mercado un medicamento mexicano que ha sido autorizado por la FDA, EMEA y la COFEPRIS como protector cardiovascular. Telmisartán es el único antihipertensivo de su clase que puede reducir el riesgo de eventos cardiovasculares, la autorización se basó en los excelentes resultados del estudio clínico ONTARGET por sus siglas en inglés (ONgoing Telmisartan Alone and in Combination with Rampiril Global Endpoint Trial), ofreciendo con plena confianza al paciente un control de su tensión arterial de manera eficaz y un excelente perfil de seguridad durante 24 horas. Telmisartán es el único medicamento en su clase (ARAI) que ha demostrado tales propiedades cardioprotectoras en forma “global”.

El trabajo que a continuación se presenta, tiene como objetivos:

- Ø Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar telmisartán en plasma mediante cromatografía de líquidos de alta resolución y detección por fluorescencia.
- Ø Aplicar el método analítico en un estudio de biodisponibilidad en población mexicana.

3. Generalidades

3.1 Telmisartán

Es un antagonista específico de los receptores de la angiotensina II, del tipo AT1, efectivo por vía oral. Desplaza a la angiotensina II con muy elevada afinidad de su sitio de unión en el subtipo de receptores AT1.

3.1.1 Propiedades fisicoquímicas ^(2, 3, 12)

- Ø **Fórmula condensada** : $C_{33}H_{30}N_4O_2$
- Ø **Peso molecular** : 514.169 g/mol
- Ø **Estructura química** :

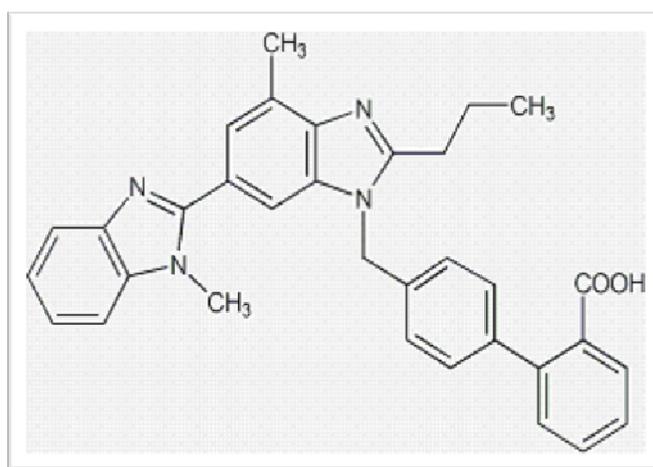


Fig. 1 Estructura química de telmisartán

- Ø **Nombre IUPAC**: ácido 4i-[2-N-propil-4-metil-6-(1-metilbencimidazol-2-il) bencimidazol-1-il-metil] bifenil-2-carboxílico.
- Ø **Nombre común**: Telmisartán.
- Ø **Descripción**: Polvo cristalino blanco.

- Ø **Solubilidad:** Prácticamente insoluble en agua y en un rango de pH de 3 a 9, ligeramente soluble en ácidos fuertes (excepto ácido clorhídrico) y soluble en bases fuertes.
- Ø **pKa:** $pK_{a1}=3.5$, $pK_{a2}=4.1$, $pK_{a3}=6.0$
- Ø **Clasificación Biofarmacéutica:** Clase II (baja solubilidad – alta permeabilidad)

3.1.2 Farmacodinamia ⁽⁶⁾

Telmisartán es un fármaco activo por vía oral, actúa bloqueando selectivamente al receptor AT_1 de angiotensina II. El receptor AT_1 es más numeroso en personas adultas, se encuentra en el músculo liso arterial, cerebro, riñones y pulmones; su interacción con angiotensina causa aumento de sed y liberación de vasopresina. Por otro lado el efecto antagonista de la angiotensina II en el sistema nervioso central, es inhibir la liberación de vasopresina y disminuir el tono simpático, para dar como resultado vasodilatación y disminución de la presión arterial.

Telmisartán no muestra afinidad por otros receptores, incluyendo los AT_2 y otros receptores AT menos caracterizados. Los niveles plasmáticos de aldosterona son disminuidos por telmisartán. No inhibe la renina plasmática humana ni bloquea los canales de iones, no inhibe la enzima convertidora de la angiotensina (quininasa II), enzima que también degrada la bradiquinina. Por lo tanto, no es de esperar una potenciación de los efectos adversos mediados por bradiquinina.

En humanos, una dosis de 80 mg de telmisartán inhibe casi completamente el aumento de la presión arterial producido por la angiotensina II. El efecto inhibitor se mantiene durante 24 horas y es todavía medible hasta las 48 horas.

3.1.3 Farmacocinética

Absorción ⁽⁶⁾

La absorción de telmisartán es rápida, aunque la cantidad absorbida es variable. El promedio de la biodisponibilidad absoluta de telmisartán es aproximadamente de 50%.

Administrado concomitantemente con los alimentos, disminuye el área bajo la curva (ABC) de su concentración. Tres horas después de su administración, las concentraciones plasmáticas de telmisartán son similares en ayunas o con alimentos. No es de esperar que este decremento afecte el ABC y ocasione disminución de su eficacia terapéutica.

Distribución ⁽⁶⁾

Telmisartán se une extensamente a las proteínas plasmáticas (> 99.5%), principalmente a la albúmina y a la glucoproteína α -1 ácida. El volumen aparente de distribución en estado estable (Vdss) es aproximadamente de 500 L.

Metabolismo ⁽²⁵⁾

El metabolismo de telmisartán ha sido evaluado en estudios in vivo/in vitro. Los resultados han revelado que la biotransformación de telmisartán se considera exclusivamente de reacciones de fase II, es decir conjugación por la UDP-glucuronosiltransferasa dando como resultado un glucoronido de acilo del compuesto original. En un estudio realizado en un grupo de voluntarios sanos de sexo masculino, se utilizaron marcadores de telmisartán, dando como resultado que después de su administración intravenosa y oral la concentración máxima alcanzada es la misma.

En las especies en las que se ha investigado el metabolismo de telmisartán no se han identificado metabolitos pertenecientes a la fase-I lo que nos indica que las isoenzimas dependientes de CYP450 no están involucradas en la biotransformación de telmisartán.

El papel que desempeñan las UDP-glucuronosiltransferasas se investigó en ratas Gunn con deficiencia de glucuronosiltransferasas de la familia UGT1. Para el caso de ratas Gunn la eliminación fue más lenta que en el caso de las ratas Winstar, lo que nos indica que telmisartán es glucuronizado principalmente por glucuronosiltransferasas de la familia UGT1.

Telmisartán es metabolizado por conjugación hasta el glucurónido del fármaco original; este conjugado es farmacológicamente inactivo.

Eliminación ^(7, 25)

La excreción de telmisartán y su glucuronido fue estudiada a través de un compuesto marcador, encontrándose que su excreción por vía urinaria es baja (0.1 al 4% de la dosis total administrada); por otro lado se ha encontrado que más del 97% de telmisartán es eliminado en materia fecal. La mayoría de las fracciones excretadas corresponden al telmisartán 1-O-glucoronido de acilo. De acuerdo a la bibliografía consultada el tiempo de vida media de eliminación es de 24 h.

Efecto de la edad ⁽¹⁰⁾

Pacientes geriátricos (mayores de 65 años)

No es necesario ajustar la dosis, sin embargo no se debe descartar que algunas personas mayores pueden presentar sensibilidad.

Pacientes pediátricos (menores de 18 años)

La seguridad y eficacia no ha sido establecida en niños y adolescentes menores de 18 años.

Efecto del género ^(6, 18)

En estudios de farmacocinética se observaron diferencias en las concentraciones plasmáticas relacionadas con el género; así tenemos que la C_{máx} y el ABC fueron, respectivamente, 3 y 2 veces mayores en las mujeres que en los hombres, pero sin repercusiones sobre la eficacia terapéutica del medicamento.

3.1.4 Indicaciones terapéuticas⁽³⁾

Telmisartán es indicado principalmente para tratar hipertensión sanguínea.

3.1.5 Contraindicaciones ^(4, 14)

Hipersensibilidad conocida al principio activo o a alguno de los excipientes.

Trastornos obstructivos biliares, colestasis, cirrosis biliar, pues se elimina principalmente con la bilis.

Insuficiencia hepática grave.

Durante el embarazo y la lactancia.

En sujetos con patología obstructiva de las vías biliares y en casos de insuficiencia hepática severa.

3.1.6 Interacciones medicamentosas ⁽⁴⁾

Telmisartán puede potenciar los efectos hipotensores de otros medicamentos antihipertensivos. No se han identificado otras interacciones que sean de trascendencia clínica.

En estudios de farmacocinética en donde se combina telmisartán con digoxina se ha observado un aumento de 20% en las concentraciones plasmáticas mínimas de digoxina (39% en algunos casos), por lo que debe considerarse el monitoreo de éstas.

Compuestos que actúan en el sistema renina-angiotensina como telmisartán pueden tener efectos sinérgicos. Los pacientes que reciben AINE y telmisartán deben ser hidratados adecuadamente y ser monitoreada su función renal desde el inicio del tratamiento combinado ya que el tratamiento con AINE es asociado con insuficiencia renal aguda potencial.

Un efecto reducido de fármacos antihipertensivos como telmisartán por inhibición de prostaglandinas vasodilatadoras han sido reportados durante el tratamiento combinado con AINE.

Se corre riesgo de hiperpotasemia si se combina telmisartán con diuréticos ahorradores de potasio, suplementos de potasio, sustitutos de la sal conteniendo potasio, ciclosporina o tacrolimús, trimetoprim

3.2 Métodos analíticos

Tabla 1. Métodos analíticos reportados para la extracción de telmisartán

Matriz biológica	Preparación de la muestra	Estándar interno	Columna analítica	Fase Móvil	Rango de trabajo	Instrumento de detección
Plasma humano ⁽⁸⁾	0.1 mL de muestra + 0.2 mL Metanol (agitar 30 s en vortex) y centrifugar a 14000rpm/10 min , decantar, evaporar, y reconstituir en 0.1 mL de fase móvil , agitar 30s, centrifugar 14000 rpm/5 min e inyectar 5mL	Valsartán	Hypersil-Keystone C18 Fase Reversa (150 mm x 2.1 mm d.i; 5µm)	ACN: CH ₃ COONH ₄ 10mM (42:58 v/v), 0,2% acido acético Flujo : 0.2 mL/min	1-2000 ng/mL	HPLC-ESI-MS/MS (modo positivo)
Orina ⁽²¹⁾	1mL de muestra+ 0.5mL de Na ₂ HPO ₄ 0.1M pH 6.0 , se centrifugan a 3500 rpm/5 min @ 4° C. La extracción fue en fase sólida utilizando cartuchos Bond Elut C8 1mL/100 mg se condiciono previamente con 2 mL de metanol y 1 mL de buffer de fosfatos (pH 6,0 0.1M), se lavo con 1 mL de mezcla MeOH: Buffer de fosfatos (pH 6; 0.1M)(30:70 v/v), finalmente telmisartán fue eluido con 1 mL de MeOH.El eluido fue secado con nitrógeno a 40°C y el remanente se disolvió en 0.5mL de fase móvil. Se inyectaron 20 µL	—	Novapak C18 column 3.9x150 mm,d.i 4 µm	ACN : Na ₂ HO ₄ 5mM pH 6.0 (45:55 v/v) Flujo 0.5 mL/min	1-1000 ng/mL	Fluorescencia λ ex 305 nm λ em 365 nm
Plasma humano ⁽¹⁵⁾	50 µL de muestra precipitación de proteínas con acetonitrilo, se inyectaron 20 µL	Naproxeno	Chromolith® (RP-18e 100mm×4.6mm i.d ; Tamaño de particular : Monolithic size Merck, Germany)	ACN: MeOH: H ₂ O: CH ₃ COOH (30:20:50:0.05 v/v) Flujo: 3mL/min	1-200 ng/mL	Fluorescencia λ ex 300 nm λ em 385 nm
Plasma humano ⁽¹⁷⁾	100 µL extracción sólido- líquido con cartuchos Oasis HLB eluido con 1mL de MeOH, se evaporó la muestra y reconstituido en 20µL de fase móvil +20µL MeOH. Se inyectaron 20 µL	Candesartán	Grand 120-CN-5 CN25% (150 mm×4.6 mm diámetro interno)	0.5% KH ₂ PO ₄ (pH 3.5):MeOH:ACN (70:20:10 v/v/v) Flujo: 0.5 mL/min	5-200 ng/mL	UV-250 nm
Telmisartán con hidroclorotiazida						
Plasma humano ⁽²⁰⁾	100 µL de muestra Extracción liquido-liquido con dietil éter – diclorometano (60:40 v/v)	Probenecid	Venusil XBP-C ₈ 4.6mm×50mm i.d ; 5µm;	Gradiente de elución con ACN: CH ₃ COONH ₄ :Acido Formico Flujo: 1.2 mL/min	1-600 ng/mL	LC-ESI-MS/MS (modo positivo)

3.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución ^(11, 19)

La cromatografía de líquidos de alta resolución es un conjunto de técnicas utilizadas para separar, identificar y determinar los componentes químicos de mezclas complejas. Todos estos métodos, sin embargo, tienen en común el uso de una fase estacionaria y una fase móvil.

Los métodos cromatográficos son de dos tipos. En la cromatografía de columna, la fase estacionaria está retenida en una columna, y la fase móvil se hace pasar a través de ella por presión o por gravedad, a su vez la cromatografía en columna se clasifica como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 2. Clasificación de los métodos de cromatografía en columna

Clasificación de los métodos de cromatografía en columna			
Clasificación general	Método específico	Fase estacionaria	Tipo de equilibrio
Cromatografía de líquidos (LC) (fase móvil: líquido)	Líquido-líquido, o reparto	Líquido adsorbido en un sólido	Reparto entre líquidos inmiscibles
	Líquido-fase enlazada	Especie orgánica unida a una superficie sólida	Reparto entre líquido y superficie químicamente modificada
	Líquido-sólido, o de adsorción	Sólido	Adsorción
	Intercambio iónico	Resina de Intercambio iónico	Intercambio iónico
	Exclusión por tamaño	Líquido en los intersticios de un polímero sólido	Reparto/tamizado
Cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) (fase móvil: fluido supercrítico)	-	Sólido Especie orgánica unida a una especie sólida	Adsorción Reparto entre el fluido supercrítico y superficie químicamente modificada.

La cromatografía de líquidos de alta resolución utiliza una presión elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución. La cromatografía de líquidos de alta resolución consta de un sistema de suministro de disolvente, una

válvula de inyección de muestra, una columna de alta presión, un detector y un ordenador para controlar el sistema y visualizar los resultados, incluye además un horno para controlar la temperatura de la columna.

El soporte más común en cromatografía de líquidos de alta resolución son partículas microporosas esféricas de sílice muy pura, que son permeables al disolvente, y que tienen un área superficial de varios centenares de metros cuadrados por gramo. La superficie de sílice tiene hasta 8 μ moles de grupos silanol por metro cuadrado.

Cromatografía en fase reversa

La cromatografía en fase reversa permite separar moléculas en base a su polaridad, aquí la fase estacionaria es de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos. Esto convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar. Por lo tanto, para este tipo de cromatografías se emplean mezclas de disolventes polares, tales como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos.

Este tipo de cromatografía ha sido también llamada cromatografía de interacción hidrofóbica (CIH). En general, este último término se ha utilizado para referirse a las aplicaciones en las que se emplean substituyentes y matrices compatibles con fluidos biológicos. Por tanto, el termino CIH es común cuando se habla de purificación de proteínas y carbohidratos, en tanto que la cromatografía en fase reversa (CFR) es más empleado para referirse a la separación de moléculas en sistemas que son inadecuados para la separación de macromoléculas biológicas.

Detector cromatográfico

Un detector ideal, de cualquier tipo que sea, debe ser sensible a pequeñas concentraciones de analito, dar una respuesta lineal y no ensanchar los picos del cromatograma. No debe ser sensible a variaciones de temperatura y de la

composición del disolvente. Los detectores por fluorescencia excitan el eluato con un láser, y miden la fluorescencia que se origina. Estos detectores son muy sensibles pero responden sólo a los analitos que presentan fluorescencia por lo tanto son selectivos, son adecuados para el análisis de trazas, se utilizan dos longitudes de onda, una de excitación y otra de emisión. Para aumentar la utilidad de los detectores de fluorescencia se pueden enlazar covalentemente al analito grupos fluorescentes; este proceso recibe el nombre de derivatización.

3.4 Cuantificación en fluidos biológicos ^(9,22)

Los fluidos biológicos más comúnmente utilizados son sangre, plasma, suero, orina y en últimos tiempos saliva. Sangre y derivados presentan una composición relativamente constante de proteínas y sales, pero pueden variar los lípidos por efecto de la dieta.

La importancia del suero y plasma radica en la presencia de grandes cantidades de proteínas, cuantitativamente estas representan la mayor parte de los componentes de la fracción soluble del plasma sanguíneo. Con concentraciones entre 60 y 80 g/L equivalen aproximadamente al 4% de todas las proteínas corporales. En el plasma humano existen cerca de 100 proteínas diferentes que de acuerdo con su comportamiento electroforético se pueden clasificar en cinco fracciones: la albúmina y las globulinas $\alpha_1, \alpha_2, \beta, \gamma$. La proteína más abundante en el plasma es la albúmina, con una concentración de cerca de 45 g/L. Entre las proteínas plasmáticas más importantes ésta es la única que no esta glucosilada. La albúmina tiene importantes sitios de unión para sustancias no polares y por eso puede funcionar como proteína transportadora de ácidos grasos de cadena larga, de bilirrubina, algunas hormonas esteroidales, vitaminas y fármacos. Para fines como los que este trabajo tiene, que es el cuantificar un fármaco en plasma, puede ser un gran problema que el analito sea afín a proteínas, si bien se sabe que es fisiológicamente importante tenerlo libre, muchos fármacos se encuentran en su mayoría unidos a proteínas. Por tal razón el

principal reto es separar el analito de las proteínas a las que se pueda encontrar unido y después extraer el fármaco total presente.

La mayoría de los métodos analíticos exigen una preparación previa de la muestra. El primer paso en la preparación de una muestra de plasma o suero para su análisis es obtener la proteína libre en solución acuosa para la extracción con un disolvente orgánico. Las técnicas más comúnmente utilizadas para la extracción de fármacos son: precipitación de proteínas, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida, extracción con fluidos supercríticos y extracción con membranas sólidas (diálisis y ultrafiltración) o líquidas.

La precipitación de proteínas es la técnica más antigua utilizada. Aunque las soluciones básicas son efectivas en la desnaturalización y precipitación de proteínas también suelen utilizarse compuestos ácidos como el ácido tricloroacético, ácido perclórico o ácido tungstico, la desventaja que presenta trabajar con ellos es el no poder trabajar con fármacos inestables a pH's bajos, en cuyo caso es preferible utilizar disolventes orgánicos como agentes desnaturizantes y precipitantes, los más utilizados son: metanol, etanol, y acetonitrilo, este último es el más utilizado para hacer análisis en CLAR.

Las proteínas también pueden ser desnaturalizadas usando enzimas proteolíticas, este procedimiento puede evitar el daño al analito como el que provocaría una desnaturalización si se usan sustancias químicas.

Por otro lado, un método muy utilizado es la ultrafiltración, sin embargo cuando se tienen bajas concentraciones del fármaco libre la concentración obtenida queda fuera del límite de detección, por tal motivo una estrategia es evaluar el porcentaje de fármaco unido y el porcentaje del que se encuentra libre a través de un radiomarcador en la misma muestra de plasma, con el objetivo de poder analizar el fármaco total.

Aunque algunos fármacos pueden encontrarse unidos fuertemente a proteínas del plasma, las uniones son reversibles. Por lo que el manejo de la extracción en correctas condiciones de pH permite que si la parte no ionizada es lo suficientemente estable entonces el equilibrio puede ser desplazado permitiendo una extracción eficiente con disolventes orgánicos.

La extracción líquido-líquido se lleva a cabo con dos fases inmiscibles (orgánica y acuosa), la eficiencia de la extracción consiste en la afinidad que tenga el soluto por el disolvente de extracción, la relación de las fases, y el número de extracciones. Dentro de las ventajas que esta técnica ofrece es el poder utilizar un gran número de disolventes y por consiguiente saber cuál de ellos es más afín al analito en cuestión. Se incluye en sus ventajas la desnaturalización de proteínas evitando así contaminación en la columna cromatográfica; sin embargo dentro de las desventajas que se han encontrado en esta técnica es que en algunos casos el analito puede presentar afinidad por el agua, de tal manera que si solo se extrae el disolvente orgánico se quedara disuelta parte del analito en la fase acuosa consiguiendo una pérdida de este, otra desventaja es la necesidad de utilizar disolventes con alto grado de pureza y en volúmenes grandes, generando mayor cantidad de residuos tóxicos, además de que se pueden formar emulsiones. A pesar de los puntos en contra que esta técnica puede presentar es muy recurrida por los extractos bastante limpios que se pueden obtener.

La extracción en fase sólida es una de las más utilizadas en la extracción de analitos en matrices complejas. En general, el proceso se divide en cinco etapas:

- i. Activación del cartucho, en donde se emplea un disolvente orgánico, con el fin de dejar los sitios activos disponibles.
- ii. Acondicionamiento con el mismo disolvente de la matriz (por ejemplo en matrices acuosas el disolvente es agua), este permite “alinearse” la fase estacionaria lejos de la superficie de la sílice, permitiendo la interacción entre el analito y la fase estacionaria. Cualquier disolvente orgánico

residual se elimina en esta etapa, asegurando que el componente de interés sea retenido en la parte superior de la columna.

- iii. Introducción de la muestra. Las interacciones de la muestra y la fase estacionaria controlan la retención en el adsorbente de la extracción. Esta se controla mediante una válvula en la estación de vacío. Los componentes de interés se retienen mientras que la matriz y los contaminantes serán eluidos y eliminados.
- iv. Por medio de una serie de disolventes de fuerza creciente se lleva a cabo el lavado de la columna para retirar las interferencias y dejar solo el analito unido al cartucho.
- v. Elución del analito. La elución del analito se efectúa mediante un eluyente adecuado. El adsorbente y la interacción analito-adsorbente determinan el eluyente final de elución.

Extracción con fluidos supercríticos: un fluido supercrítico es un estado de la materia en donde una temperatura y presión se encuentran por encima de la crítica en donde el vapor y el líquido se encuentran a la misma densidad, el líquido no puede ser licuado por simple aumento de presión. Las ventajas que este método ofrece es el disminuir tiempo en el análisis de muestra, pues no es necesario eliminar disolventes que se utilizan en técnicas convencionales, no utiliza disolventes orgánicos que suelen ser tóxicos, lo que disminuye riesgo de manipulación y minimiza costos. Sin embargo, una de las desventajas que presenta es que el analito debe ser soluble en el líquido supercrítico.

3.5 Validación de métodos analíticos ⁽²³⁾

De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, validación es la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado, en dicha norma se encuentran los criterios establecidos para la validación de un método analítico cuya aplicación será un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia.

Dentro de los parámetros a considerar dentro de una validación se encuentran:

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.

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.

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

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.

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.

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

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

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.

Muestras control: Muestras de concentración conocida que se cuantifican durante la corrida analítica para corroborar la validez del método.

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.

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

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

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

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.

Tolerancia: Capacidad del 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.

4. Parte experimental.

La parte experimental se llevo a cabo en dos etapas en el siguiente orden:

- Desarrollo y validación del método analítico
- Aplicación del método en la cuantificación de telmisartán en muestras de fluido biológico provenientes de voluntarios sanos de población mexicana.

4.1 Material, equipo e instrumentos.

4.1.1 Material.

- Matraces volumétricos: 20, 50, 100, 1000 y 2000 mL.
- Pipetas volumétricas. 4, 5, 6 y 8 mL.
- Puntas para repetidora.
- Membranas de filtración de nylon, 0.2 micras y 47mm de diámetro.
- Viales para automuestreador.
- Perillas de succión.
- Pipetas Pasteur.
- Vasos de precipitados de polipropileno: 50, 100 y 1000 mL.
- Frascos de polipropileno con tapa de rosca de: 50 y 100 mL.
- Guantes.
- Agitador vortex.

4.1.2 Equipos e instrumentos.

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, que consta de:
 - Sistema de bombeo marca Jasco modelo PU-2080 plus.
 - Sistema de bombeo marca Jasco modelo PU-2080 plus.
 - Automuestreador marca Jasco modelo 3159AS plus.
 - Sistema de control de temperatura para columnas marca Jasco modelo CO-2067 plus.

- Interfase marca Jasco modelo LC-NETII/ADC.
- Desgasificador en línea marca Jasco modelo DG-2080-54.
- Mezclador de alta presión marca Jasco modelo MX-2080.
- Detector marca Jasco modelo X-LC 3120 FP
- Balanza granataria marca Ohaus modelo Adventurer PRO.
- Balanza analítica marca Ohaus modelo EP214C.
- Agitador vórtex marca Thermolyne, modelo Maxi Mix II M37615.
- Ultracongelador marca REVCO modelo ULT2186-5-A36.
- Sistema de purificación de agua marca Barnstead.
- Pipeta repetidora electrónica marca Eppendorf modelo Repeater Plus.
- Micropipeta volumen variable 100-1000 μ L marca Hirschmann Laborgerate modelo Hirschmann Labopette.
- Micropipeta volumen fijo 200 μ L marca Hirschmann Laborgerate modelo Hirschmann Labopette.
- Refrigerador Torrey R-16.
- Centrífuga Hettich Rotanta 460R.
- Centrífuga Eppendorf 5424.
- Centrífuga Centra CL5.
- Potenciómetro Oakton Serie pH 510 series.

Todos los instrumentos tenían fecha de calibración y/o verificación vigente.

4.1.3 Reactivos y disolventes.

- Agua grado cromatográfico obtenida del sistema de purificación de agua.
- Fosfato dibásico de sodio, J.T. Baker, grado reactivo.
- Acetonitrilo (ACN), J. T. Baker, grado cromatográfico (CLAR).

- Acido fosfórico, J.T. Baker, grado reactivo.
- Metanol (MeOH) J.T. Baker, grado cromatográfico.
- Hidróxido de sodio J.T. Baker, grado reactivo.

4.1.4 Sustancia de referencia.

- Telmisatán. Estándar secundario, TEVA, lote IARS0901, potencia 99.3%.
- Zolpidem Tartrato. Estándar secundario, Lemery, lote 1026097002, potencia 99.7%.

4.1.5 Preparación de soluciones.

- **Solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.01 M, pH 6.5.**

Se pesaron 1.42 g de fosfato dibásico de sodio, se transfirieron a un matraz volumétrico de 1L, se disolvió y llevó a volumen con agua grado cromatográfico. Se ajustó el pH a 6.5 con acido fosfórico concentrado.

- **Solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.01M, pH 6.5: acetonitrilo (69:31 v/v).**

Se transfirieron cuantitativamente 310 mL de acetonitrilo a un matraz volumétrico de 1000 mL y se llevó a volumen con solución amortiguadora de fosfato de sódio 0.01 M, pH 6.5.

- **Solución de hidróxido de sodio 0.5M.**

Se pesaron 10 g de hidróxido de sodio, se transfirieron a un matraz volumétrico de 500 mL, se disolvieron y llevaron a volumen con agua grado cromatográfico.

- **Solución de lavado ACN: NaOH 0.5M:H₂O: (57:15:28 v/v).**

Se transfirieron 75 mL de NaOH 0.5N y 140 mL de agua grado cromatográfico a un matraz volumétrico de 500 mL y se llevó a volumen con acetonitrilo grado cromatográfico.

- **Solución de referencia de telmisartán (100 µg/mL) Solución A**

Se pesó el equivalente a 10 mg de Telmisartán, se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL y se llevó a volumen con metanol grado cromatográfico.

- **Solución de referencia de telmisartán (30 µg/mL). Solución B**

Se transfirieron cuantitativamente 6 mL de la solución de 100 µg/mL de telmisartán a un matraz volumétrico de 20 mL y se llevó a volumen con metanol grado cromatográfico.

- **Solución de referencia de telmisartán (6 µg/mL). Solución C**

Se transfirieron cuantitativamente 4 mL de la solución de 30 µg/mL de telmisartán a un matraz volumétrico de 20 mL y se llevó a volumen con metanol grado cromatográfico.

- **Solución de referencia de telmisartán (10 µg/mL). Solución D**

Se transfirieron cuantitativamente 5 mL de la solución de 100 µg/mL de telmisartán a un matraz volumétrico de 50 mL y se llevó a volumen con metanol grado cromatográfico.

- **Solución de referencia de telmisartán (1 µg/mL). Solución E**

Se transfirieron cuantitativamente 5 mL de la solución de 10 µg/mL de telmisartán a un matraz volumétrico de 50 mL y se llevó a volumen con metanol grado cromatográfico.

- **Solución de referencia de telmisartán (0.1 µg/mL). Solución F**

Se transfirieron cuantitativamente 5 mL de la solución de 1 µg/mL de telmisartán a un matraz volumétrico de 50 mL y se llevó a volumen con metanol grado cromatográfico

- **Solución de referencia de zolpidem tartrato (100 µg/mL). Solución I.**

Se peso con exactitud, el equivalente a 10 mg de zolpidem tartrato, se transfirió cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, se disolvió y llevó a volumen con acetonitrilo grado cromatográfico: agua grado cromatográfico (50:50 v/v).

- **Solución de referencia zolpidem tartrato (40 µg/mL). Solución II.**

Se transfirieron cuantitativamente 8 mL de la solución de 100 µg/mL de zolpidem tartrato a un matraz volumétrico de 20 mL y se llevó a volumen con acetonitrilo grado cromatografico : agua grado cromatográfico (50:50 v/v).

- **Solución para evaluar precisión del estándar de referencia de zolpidem tartrato (10 µg/mL). Solución III**

Se transfirieron cuantitativamente 5 mL de la solución de 40 µg/mL de zolpidem tartrato a un matraz volumétrico de 20 mL y se llevó a volumen con acetonitrilo grado cromatográfico: agua grado cromatográfico (50:50 v/v)

- **Preparación de la fase de reconstitución: solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.01M, pH 6.5:acetonitrilo (50:50 v/v).**

Se transfirieron cuantitativamente 100 mL de acetonitrilo grado cromatográfico a un matraz volumétrico de 200 mL y se llevó a volumen con solución amortiguadora de fosfato de sodio 0.01M, pH 6.5.

- **Solución para evaluar la adecuabilidad del sistema (telmisartán 750 ng/mL y zolpidem tartrato 4000 ng/mL).**

Se transfirieron cuantitativamente 500 µL de la solución de 30 µg/mL de telmisartán y 800 µL de la solución de 100 µg/mL de zolpidem tartrato a un matraz volumétrico de 20mL y se llevó a volumen con fase de reconstitución. Se dividió en alicuotas

de 1 mL y se almacenaron a -70°C . Se descongeló una de las alicuotas cada día de trabajo a temperatura ambiente.

4.2 Desarrollo del método analítico.

Para poder establecer un método analítico que nos permitiera la cuantificación del analito de interés en fluido biológico y así poderlo emplear en un estudio de biodisponibilidad se siguieron los pasos que a continuación de mencionan:

Primeramente se comenzó con una revisión bibliográfica, con el fin de encontrar información de interés. Dentro de los aspectos analíticos que fueron considerados son los siguientes: estructura, solubilidad, expectativas de detección (determinar si absorbe el compuesto en el espectro UV, fluorescencia) se averiguaron también aspectos farmacocinéticos (C_{max}) del compuesto de interés, de tal manera poder establecer un intervalo de trabajo, en donde se encontró que para una dosis de 40 mg se alcanza una C_{max} de 43.1 ng/mL- 104.5 ng/mL y para 80 mg de 407 ng/mL – 607 ng/mL, el rango establecido para la curva fue de 1 ng/mL - 1500 ng/mL, en donde fue considerado el 5% de la C_{max} (el 5 % de 43.1 ng/mL) para el punto más bajo de la curva y 200% C_{max} (el 200% de 607 ng/mL) para el punto más alto de la curva.

4.2.1 Condiciones cromatográficas.

Condiciones del detector.

Se recopiló información bibliográfica, se encontró que el analito de interés es detectable por fluorescencia, en donde se encontró reportado que su detección era en este intervalo de longitudes de onda: λ_{ex} 300 nm, λ_{em} 385 nm, y para obtener una mejor detección en el equipo cromatográfico que se utilizó se analizaron diferentes longitudes de onda: λ_{ex} 300 nm, λ_{em} 375 nm; λ_{ex} 305 nm, λ_{em} 375 nm; λ_{ex} 254 nm, λ_{em} 400 nm.

Selección de columna cromatográfica.

Se probaron diferentes columnas cromatográficas, con el fin de encontrar la más adecuada para el estudio, se probaron las siguientes:

- Zorbax eclipse XDB-C8 4.6x150mm; 5 μ m
- Pursuit XRs5C18 4.6x150 mm; 5 μ m
- Polaris C18-A 4.6x150 mm; 5 μ m
- Zorbax eclipse plus Phenyl-Hexyl 3 x 150 mm; 3.5 μ m

En todos los casos, la temperatura de la columna se mantuvo en 38^o C, con volumen de inyección de 10 μ L, se probó velocidad de flujo a 1y 1.2 mL/min .

Fase móvil y solución de lavado.

Se probaron diferentes proporciones de fase móvil con acetonitrilo, en todos los casos se trabajó con solución amortiguadora de Na₂HPO₄ 10mM en pH: 7.5 y 6.5.

Para pH: 7,5 se evaluaron las siguientes proporciones con acetonitrilo:

-70:30 v/v, 65:35 v/v, 50:50 v/v y 58:42 v/v.

Para pH: 6,5, se evaluaron las siguientes proporciones con acetonitrilo:

-45:55 v/v, 65:35 v/v y 31:69 v/v.

En cuanto a la solución de lavado, se evaluaron las siguientes:

- Hexano: IPA: MeOH 70:10:20 v/v/v.
- ACN 100%.
- MeOH: ACN: IPA: H₂O 40:40:10: 10 v/v/v.
- MeOH: ACN: IPA 45:45:10 v/v/v.
- ACN: NaOH 0.5M: H₂O 57:15:28 v/v/v.

4.2.2 Elección del estándar interno.

Para la selección de estándar interno se evaluaron los siguientes analitos: terazosina, escitalopram, citalopram y zolpidem. Se seleccionó aquel que

cumpliera con los siguientes parámetros: resolución con respecto al analito de interés ≥ 1.6 , factor de capacidad >2 y simetría de pico ≤ 2 .

4.2.3 Método de extracción.

Para el procesamiento de telmisartán, fue necesario evaluar diferentes técnicas de extracción, la primera de ellas se muestra a continuación.

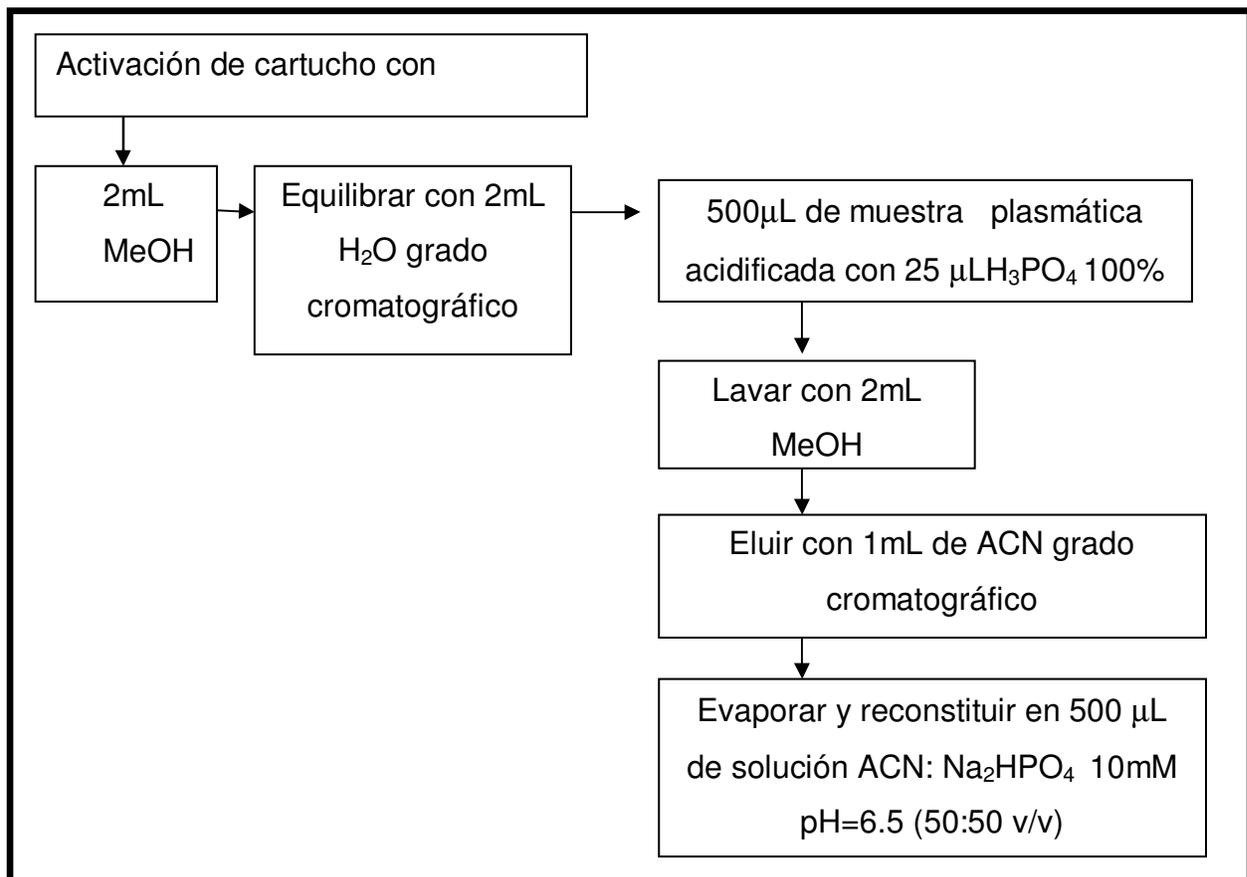


Fig. 2 Método de extracción evaluado N° 1 (sólido - líquido)

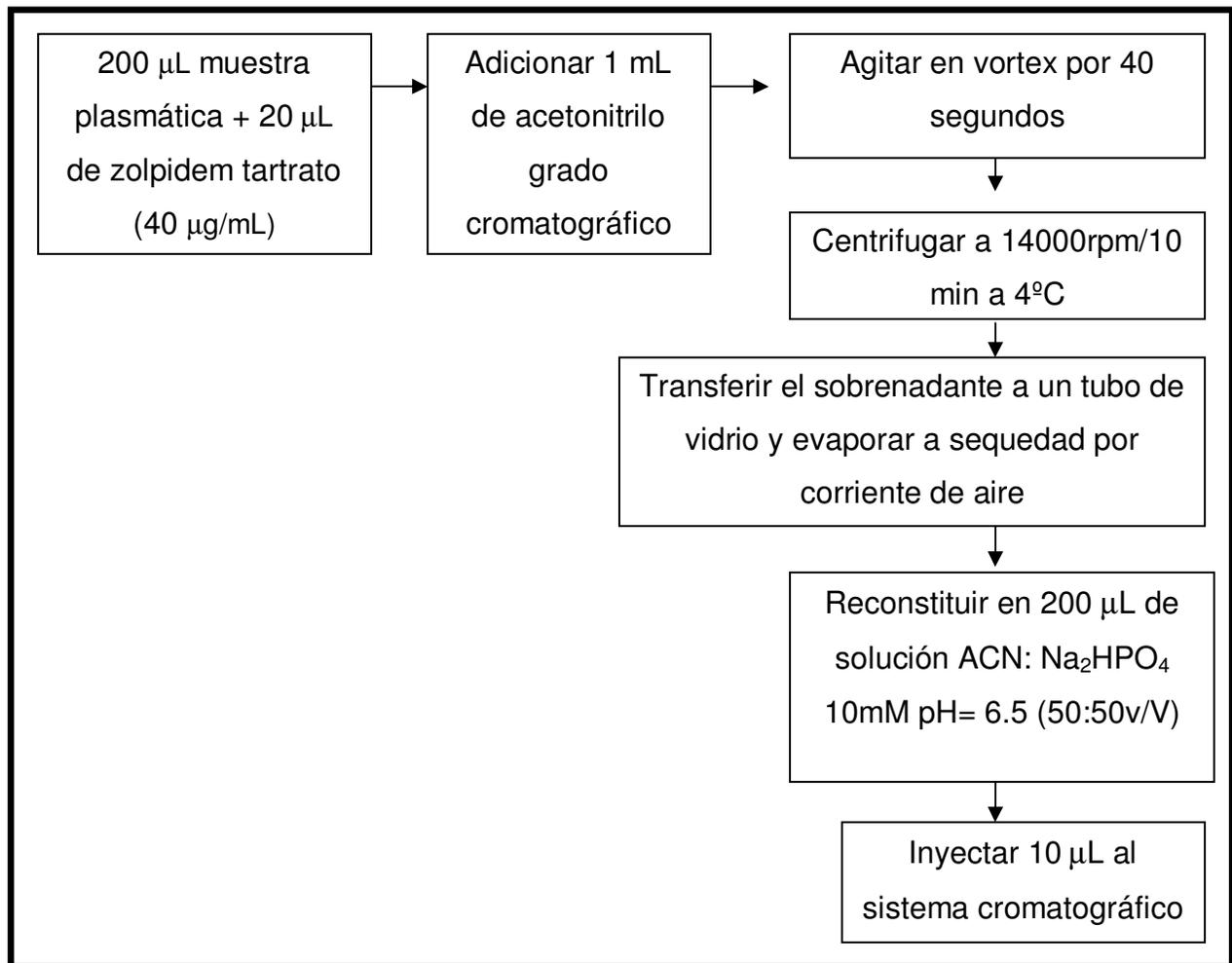


Fig. 3 Método de extracción evaluado Nº 2 (precipitación - evaporación)

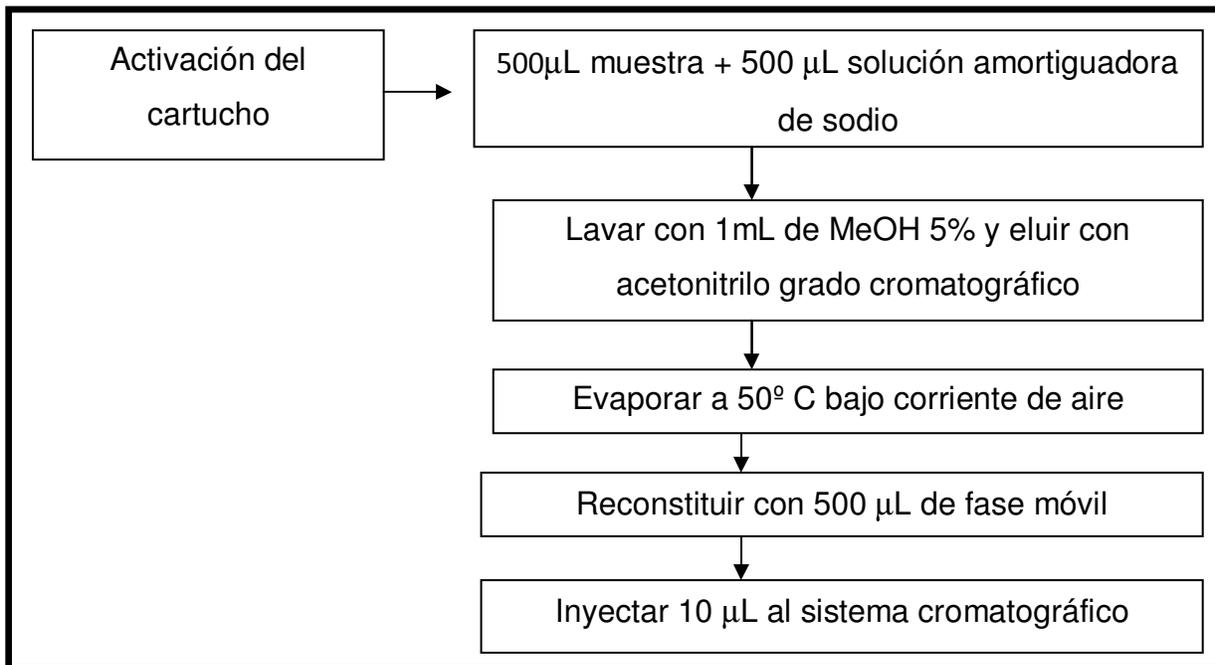


Fig. 4 Método de extracción evaluado Nº 3 (sólido – líquido)

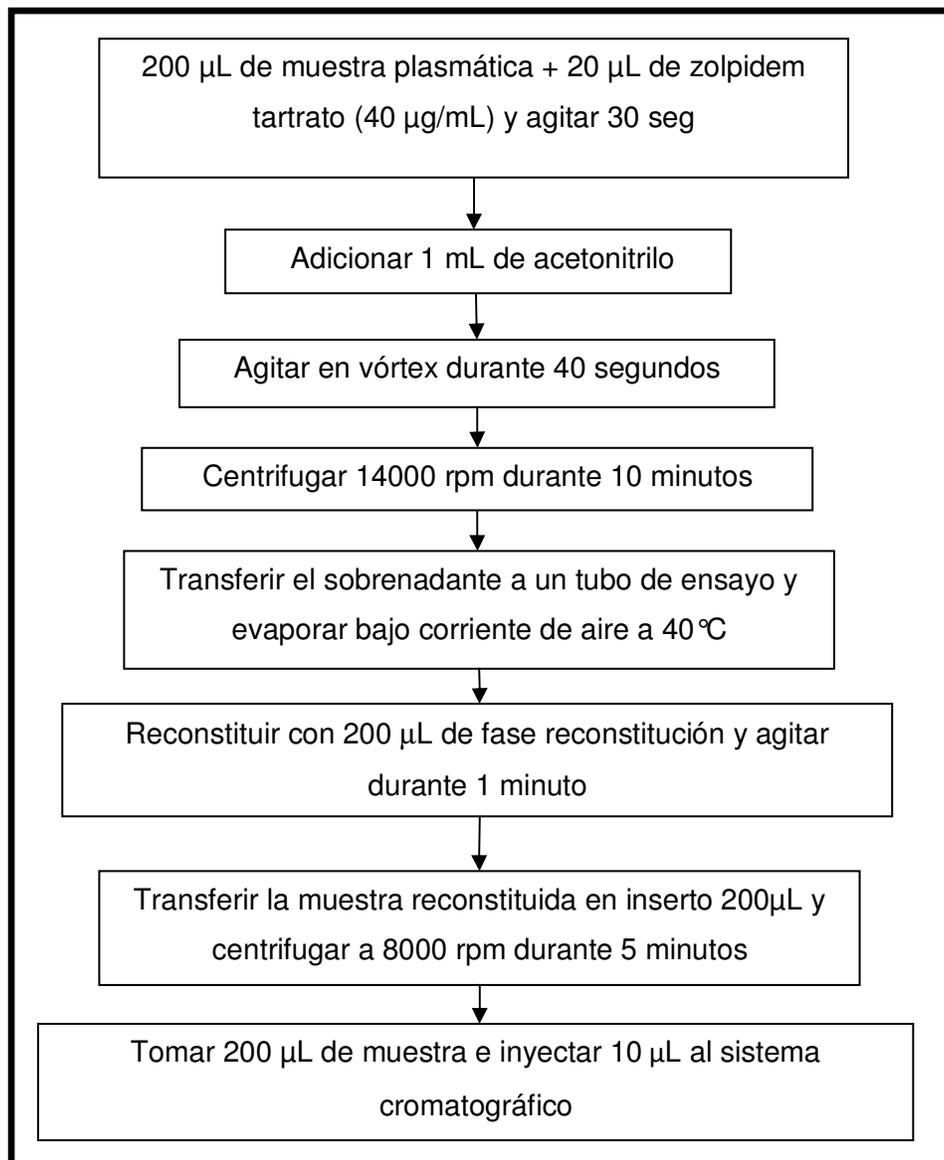


Fig. 5 Método de extracción evaluado N° 4 (precipitación de proteínas)

Se evaluaron diferentes técnicas con el fin de obtener un recobro superior al 90%, sensibilidad, y selectividad.

4.3 Validación del método analítico.

Con el fin de evidenciar que el método desarrollado era consistente, fue validado siguiendo los criterios establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, en lo referente al análisis químico de muestras biológicas de una prueba de bioequivalencia.

4.3.1 Adecuabilidad del sistema.

Durante todas las corridas analíticas de la validación se evaluó la adecuabilidad del sistema mediante inyecciones consecutivas de una solución que contenía 750ng/mL de telmisartán y 4000 ng/mL de zolpidem tartrato.

Adicionalmente cada día de análisis se comprobó que no existieran interferencias con los picos de interés en la solución con la que se reconstituyen las muestras (blanco de reactivos), ni con la matriz biológica utilizada (blanco de plasma).

4.3.2 Preparación de curva de calibración y puntos control en plasma.

Se prepararon los puntos de la curva de calibración y los puntos control como se muestra en la tabla 3 y 4, se utilizó el material pertinente para llevarlo a cabo.

Cada nivel de concentración se llevo a 1 mL con 950 μ L de plasma y se agitaron las muestras por 30 segundos en el vortex.

Tabla 3. Preparación de la curva de calibración.

μL de Telmisartán Solución B	μL de Telmisartán Solución C	μL de Telmisartán Solución E	μL de Telmisartán Solución F	μL Metanol	μL plasma	Concentración Telmisartán (ng/mL)
50	-	-	-	-	950	1500*
45	-	-	-	5	950	1350
30	-	-	-	20	950	900
20	-	-	-	30	950	600
-	50	-	-	-	950	300
-	25	-	-	25	950	150
-	-	50	-	-	950	50
-	-	10	-	40	950	10
-	-	-	20	30	950	2
-	-	-	10	40	950	1**

*LS (Limite superior de la curva) **LC(Limite de cuantificación)

Tabla 4. Preparación de puntos control en plasma.

Nivel	μL de Telmisartán Solución B	μL de Telmisartán Solución F	μL Metanol	μL plasma	Concentración Telmisartán (ng/mL)
LSC	50	-	-	950	1500
CC alto	40	-	10	950	1200
CC medio	25	-	25	950	750
CC bajo	-	30	20	950	3
LC	-	10	40	950	1

CC=Muestras de control de calidad

4.3.3 Selectividad del método.

Se evaluó la selectividad del método, analizando seis plasmas de voluntarios sanos, libres de fármaco, con certificado de sangre segura, sometidos al método de extracción establecido. Se considera que el método analítico es selectivo si no se presentan picos de interferencia en el tiempo de retención de telmisartán o zolpidem (E.I.).

Prueba de arrastre: En cada corrida analítica se evaluó el efecto de acarreamiento o arrastre del analito, intercalando muestras blanco de plasma precedidas de una muestra de concentración conocida de telmisartán equivalente al punto más alto en la curva de calibración. La interferencia endógena en los blancos de plasma utilizados para la prueba de arrastre de muestra, no debió ser mayor al 5% comparada con la respuesta del estándar interno y no mayor a la respuesta para el límite de cuantificación en $\pm 20\%$.

La selectividad del método se determinó, analizando la muestra blanco de la matriz biológica (muestras de plasma de seis donadores y su mezcla) y muestras de plasma conteniendo fármacos de uso común, ácido salicílico (300 $\mu\text{g/mL}$), naproxeno (50 $\mu\text{g/mL}$), paracetamol (20 $\mu\text{g/mL}$) y el anticoagulante (Heparina 143 unidades USP), evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de telmisartán y zolpidem (E.I.). Se evaluó también la posible interferencia de muestras hemolizadas y lipémicas. Las sustancias evaluadas no debían mostrar interferencia con el pico de interés.

4.3.4 Repetibilidad de la curva de calibración

Se prepararon tres curvas de calibración a partir de la misma pesada con el fin de evaluar la repetibilidad de la curva de calibración, con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada de cada nivel de concentración. El coeficiente de variación no debía ser mayor al 15%.

4.3.5 Linealidad.

Se prepararon cinco curvas de calibración a partir de pesadas independientes, contemplando las concentraciones de 1, 2, 10, 50, 150, 300, 600, 900, 1350 y 1500 ng/mL de telmisartán. El método cumple con este parámetro, si al realizar el ajuste determinado, en cada una de las curvas analizadas, se obtiene un coeficiente de correlación mayor o igual a 0.99 y el coeficiente de variación y la desviación porcentual de la concentración recuperada (interpolada) con respecto a la nominal (adicionada) son menores o iguales al 15% en todos los puntos que constituyen la curva de calibración, a excepción del límite inferior de cuantificación que no debía ser mayor al 20%.

4.3.6 Límite de cuantificación y límite de detección.

Se evaluaron muestras de telmisartán en plasma a las concentraciones de 0.5 y 1.0 ng/mL. La sensibilidad del método se define como el cambio de la respuesta con respecto al cambio de la concentración, la concentración mínima cuantificable ó límite inferior de la curva (LC). El LC será la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor de concentración recuperada promedio se encuentre dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal, con un coeficiente de variación no mayor que 20%.

El límite de detección (LD) fue aquella concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica fue tres veces mayor que el nivel de ruido.

4.3.7 Precisión del método.

Repetibilidad del método.

Se evaluaron muestras plasmáticas de telmisartán de 3, 750 y 1200 ng/mL, estas muestras no pertenecen a la curva, pero se encuentran dentro del intervalo de concentraciones establecido. Además se evaluaron el límite superior de la curva y límite de cuantificación. Con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada

para cada nivel. El coeficiente de variación no debió ser mayor al 15% para los puntos control y para el límite superior de la curva de calibración, y no mayor al 20% para el límite de cuantificación.

Reproducibilidad entre días.

Se evaluó la reproducibilidad entre días, para lo cual:

Se prepararon y evaluaron una curva de calibración de telmisartán en plasma y los puntos control de calidad durante tres días, empleando cada día una solución de referencia preparada cada día de trabajo.

Se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los puntos de control de calidad (concentración recuperada), tomando en cuenta las determinaciones realizadas durante los tres días. El coeficiente de variación global no debió ser mayor al 15% en cada nivel de concentración.

Reproducibilidad entre analistas.

Para evaluar reproducibilidad entre analistas, la cuantificación se llevo a cabo por tres días, en donde se prepararon cada día: series de controles de calidad (CB 3 ng/mL, CM 750 ng/mL y CA 1200 ng/mL) por sextuplicado, las muestras fueron tratadas de acuerdo al método analítico desarrollado. El coeficiente de variación y la desviación absoluta entre analistas no debieron ser mayores al 15% para la concentración plasmática promedio.

4.3.8 Exactitud del método.

Para determinar si el método es exacto, el valor promedio en cada nivel de concentración de las determinaciones realizadas para evaluar repetibilidad y reproducibilidad de los puntos control debían estar dentro del $\pm 15\%$ de su valor nominal correspondiente, haciendo uso de la siguiente ecuación:

$$\text{Desv Abs \%} = 100 \times \frac{|\text{Concentración nominal} - \text{Concentración Recuperada}|}{\text{Concentración nominal}}$$

4.3.9 Recobro.

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

Se evaluaron los puntos de control de calidad de telmisartán en plasma de cada nivel de concentración y se compararon sus respuestas cromatográficas promedio (área de pico), contra su correspondiente en muestras de los analitos en solución a las mismas concentraciones.

El recobro no necesariamente debió ser del 100%, pero debe ser constante en los niveles de concentración evaluados, además, los valores promedio individuales no debieron desviarse del promedio total en más del 15%, mientras que en el caso del estándar interno, se determinó el recobro promedio con los resultados obtenidos en plasma y solución respectivamente.

4.3.10 Estabilidad.

La prueba de estabilidad tiene como función determinar las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto de interés (analito) permanece estable en solución y en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, evaluando la respuesta (concentración) del compuesto por analizar en la matriz biológica.

Ciclos de congelación-descongelación

La estabilidad de telmisartán en plasma bajo ciclos congelación-descongelación fue evaluada de la siguiente manera:

Se prepararon tres series de controles en plasma de telmisartán: 3, 750 y 1200 ng/mL, CB, CM y CA respectivamente, las cuales fueron almacenadas a -70 °C.

Las muestras fueron descongeladas a las 24, 48 y 72 (ciclo 1, ciclo 2, y ciclo 3) horas posteriores a su preparación y en cada uno de los tiempos seis muestras de cada nivel de concentración fueron cuantificadas y el resto se congelaron nuevamente a -70°C ; de esta manera se cumplen los tres ciclos con diferencias de por lo menos 24 horas entre las descongelaciones.

Cada día se preparó una serie de controles por triplicado con el fin de comparar el porcentaje de recuperación de la muestra congelada con respecto a la muestra preparada el día del análisis.

Los valores de concentración interpolada promedio obtenidos de las determinaciones en cada nivel de concentración, deben cumplir con el límite de $\pm 15\%$ del valor obtenido de controles preparados el día del análisis (controles frescos) para considerar que son estables bajo esas condiciones durante determinado tiempo

1.1.1 Estabilidad a temperatura ambiente (21 - 29°C) y refrigeración (1-8°C).

La evaluación de esta prueba se siguió de la siguiente manera:

Fueron preparadas series de controles con las siguientes concentraciones: 3, 750 y 1200 ng/mL (CB, CM, CA respectivamente) de telmisartán, las cuales fueron almacenadas a temperatura ambiente y en refrigeración. Cada día se prepararon series de controles por sextuplicado, con el fin de comparar el porcentaje de recuperación de la muestra expuesta a temperatura ambiente o en refrigeración con respecto a la muestra fresca.

Los valores de concentración interpolada promedio obtenidos de las determinaciones en cada nivel de concentración, debieron cumplir con el límite de $\pm 15\%$ del valor obtenido de controles preparados el día del análisis (controles frescos) para considerar que son estables bajo esas condiciones durante determinado tiempo.

Estabilidad de la muestra procesada.

Para determinar la estabilidad de la muestra procesada, se prepararon por sextuplicado las muestras de control de calidad de telmisartán en plasma a concentraciones de 3, 750 y 1200 ng/mL (nivel bajo, medio y alto respectivamente), se sometieron al procedimiento de extracción establecido 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 96 horas después de preparadas.

Para cada análisis se analizaban series de controles preparados el mismo día (controles frescos), esto con la finalidad de comparar resultados.

Para que el compuesto de interés se considere estable a la condición evaluada, los resultados de concentración interpolada promedio obtenidos para cada nivel de concentración debieron estar dentro del $\pm 15\%$ del valor promedio obtenido con muestras controles preparados el día del análisis (controles frescos).

Estabilidad de muestra evaporada.

Para determinar la estabilidad de muestra evaporada, se sometieron series de controles de calidad (altos, medios y bajos) al método de extracción, las muestras no fueron reconstituidas y se conservaron evaporadas en refrigeración durante 24 y 96 horas, transcurrido el tiempo pertinente fueron reconstituidas e inyectadas al sistema cromatográfico.

Para cada prueba se analizaban series de controles frescos con el fin de comparar porcentaje de recobro de muestra evaporada con respecto a las muestras frescas. Para que el compuesto de interés se considere estable a la condición evaluada, los resultados de concentración interpolada promedio obtenidos para cada nivel de concentración debían estar dentro del $\pm 15\%$ del valor promedio obtenido con muestras controles preparados el día del análisis (controles frescos).

Estabilidad a largo plazo (congelación a -70°C).

Se prepararon series de controles por sextuplicado: CB (3ng/mL), CM (750 ng/mL), CA (1500 ng/mL), fueron almacenados a -70°C por 160 días, el día del análisis se prepararon series de controles por sextuplicado los cuales se procesaron. Para que el compuesto de interés se considere estable a la condición evaluada, los resultados de concentración interpolada promedio obtenidos para cada nivel de concentración debían estar dentro del $\pm 15\%$ del valor promedio obtenido con muestras controles preparados el día del análisis (controles frescos).

La respuesta analítica de las muestras preparadas y analizadas el mismo día fue comparada con las muestras con 160 días de congelación.

4.3.11 Tolerancia del método.

Integridad de la dilución (aplicación de una dilución 1:2).

Se evaluó el efecto de realizar una dilución 1:2 en las muestras sobre los resultados. Para ello, se prepararon por triplicado muestras de telmisartán en plasma a concentraciones de 1200 y 2500 ng/mL. Se aplicó el proceso de extracción empleando 100 μL de la muestra y completando el volumen a 200 μL con blanco de plasma libre de fármaco y se sometió a las condiciones establecidas para extracción.

Para las muestras de 1200 ng/mL la concentración calculada multiplicada por un factor de dilución de 5 no debió de exceder el 15% del promedio de valor nominal.

En cuanto a las muestras de 2500 ng/mL la concentración interpolada y multiplicada por un factor de dilución de 2 no debía desviarse más del 15% con respecto al valor nominal.

4.4. Aplicación del método en un estudio de biodisponibilidad

Para la realización de este estudio, las muestras provenientes de voluntarios sanos (un total de 1120 muestras de plasma humano con heparina, provenientes de la Unidad Clínica del Centro de Investigación Farmacológica y Biofarmacéutica), fueron almacenadas en tubos criogénicos a -70°C para su posterior procesamiento (método analítico) y análisis cromatográfico con detección por fluorescencia.

Las muestras plasmáticas corresponden al estudio, en el que participaron 56 voluntarios sanos (hombres) a los que se les administró una dosis de 80 mg de telmisartán, de acuerdo a lo establecido en el protocolo clínico-analítico

4.4.1. Criterios de inclusión.

- La participación de los sujetos en el estudio de Telmisartán fue de manera voluntaria.
- Se incluyeron solamente voluntarios sanos de nacionalidad mexicana, de entre 18 a 40 años de edad.
- El índice de masa corporal de los voluntarios sanos estuvo entre 18 a $27(\text{Kg}/\text{m}^2)$.
- 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 exámenes de laboratorio realizados, fueron los siguientes:

- Hematología: hemoglobina, hematocrito, cuenta total de glóbulos blancos con diferencial y cuenta de plaquetas.
- Química sanguínea.
- Marcadores para hepatitis B y C.
- Detección de VIH.

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

4.4.2. Criterios de exclusión.

- 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.
- 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.

Los sujetos podrían ser 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, debieron ser enviados a la valoración analítica y anexar la razón del porqué se retiró del estudio.

4.4.4 Evolución del estudio de biodisponibilidad.

A cada voluntario reclutado para el estudio, se le administró una tableta de 80mg de telmisartán para posteriormente tomar muestras sanguíneas a cada voluntario, se tomaron muestras predosis y posteriormente a las 0.17, 0.33, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 horas después de la administración del medicamento.

No se administró ningún otro medicamento durante el tiempo que duró el estudio.

Se analizaron 1120 muestras correspondientes a 56 voluntarios de acuerdo al método analítico de cromatografía de líquidos de alta resolución por fluorescencia desarrollado y validado anteriormente.

En cada corrida analítica se evaluó adecuabilidad, misma que contenía 750 ng/mL de telmisartán y 4000 ng/mL de zolpidem tartrato, además de intercalar entre las muestras analizadas controles de calidad por duplicado de cada nivel: bajo, medio y alto, de 3, 750, 1200 ng/mL de telmisartán respectivamente.

Se evaluó en cada corrida que no existieran interferencias de la matriz biológica o de la solución de reconstitución en el tiempo de retención correspondiente al analito o al estándar interno, la evaluación se llevó a cabo a través del análisis de la matriz biológica utilizada (blanco de plasma) y solución de reconstitución (blanco de reactivos); en cada corrida analítica se incluyeron dos curvas de calibración una al inicio y otra al final de la corrida.

4.4.5 Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos fueron evaluados a través de métodos no compartimentales (modelo independiente).

Calculo de parámetros farmacocinéticos

- **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.

- **C max**

Concentración plasmática máxima obtenida 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.

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

Donde:

C_f = Concentración de la última muestra cuantificable

K_e = Constante de eliminación

- **K_e**

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

- **Vida media de eliminación**

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_e}$$

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

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

5. Resultados y análisis de resultados.

De acuerdo a las condiciones evaluadas durante el desarrollo del método, se pudieron establecer las óptimas para el análisis de telmisartán en fluido biológico.

5.1. Desarrollo del método analítico.

5.1.1 Condiciones del detector y columna cromatográfica.

El detector de fluorescencia utilizado durante desarrollo, validación y análisis de muestras de voluntarios fue marca Jasco modelo XLC-3120-FP a una λ_{ex} 305 nm y una λ_{em} 375 nm y una columna Zorbax Eclipse XDB C8 4.6 x 150 mm, 5 μ m de tamaño de partícula. Con estas condiciones se alcanzó la sensibilidad adecuada en la cuantificación de telmisartán en fluido biológico, además de observarse mejores características en la señal cromatográfica, como simetría de pico y buena resolución (mayor o igual a 1.5) con respecto a las interferencias de la matriz o bien con el estándar interno.

5.1.2 Fase móvil y solución de lavado.

La sal utilizada para la fase móvil fue para todas las pruebas fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4 10mM), con referencia al pH y la proporción utilizada las condiciones más convenientes fueron la fase isocrática en proporciones 31:69 v/v para ACN: Na_2HPO_4 10mM con un pH 6.5. A esta proporción y pH se obtuvo resolución ≥ 1.5 y simetría de pico ≤ 2 para telmisartán (tiempo de retención 5.5-6.5 minutos) y su estándar interno zolpidem (tiempo de retención 8.1-9.1 minutos).

En cuanto a la solución de lavado utilizada se realizaron pruebas con diferentes disolventes y diferentes proporciones, la mezcla de: ACN: NaOH 0.5M: H_2O 57:15:28 v/v/v fue elegida como mejor opción ya que ésta no presentó problemas de arrastre en comparación con las mezclas probadas en donde en todos los casos al analizar pruebas de arrastre se presentaban señales cromatográficas en el tiempo de retención correspondiente a telmisartán.

5.1.3 Volumen de inyección y velocidad de flujo.

El volumen de inyección que se manejó durante el desarrollo, validación y análisis de muestras de voluntarios siempre fue de 10 μ L.

Para la fase móvil elegida para el estudio solo se probó la velocidad de 1.2 mL/min presentando buena simetría de pico.

5.1.4 Estándar interno.

Se probaron cuatro diferentes sustancias como estándar interno, de las cuales, zolpidem presentó buena selectividad, adecuada simetría de pico (≤ 2) y sobre todo buena resolución (≥ 1.5), sin verse afectado por la matriz biológica, se obtuvo también un porcentaje de recobro mayor al 90%.

En la tabla 5 se muestran las condiciones cromatográficas obtenidas para la cuantificación de telmisartán en plasma.

Tabla 5. Condiciones cromatográficas

Detector	Fluorescencia
Longitud de onda	λ_{ex} 305 nm λ_{em} :375 nm
Ganancia	100
Atenuación	Short
Columna	Zorbax Eclipse XDB C8 4.6 x 150 mm, 5 μ m.
Fase móvil	Solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.01 M, pH 6.5:Acetonitrilo (69:31 v/v)
Velocidad de flujo	1.2 mL/min
Volumen de inyección	10 μ L
Temperatura columna	38 °C
Solución de lavado	ACN:NaOH 0.5M: H ₂ O (57:15:28 v/v)
Tiempo de retención aproximado	Telmisartán 5.5 – 6.5 minutos Zolpidem 8.1 – 9.1 minutos

5.1.5 Método de extracción.

De acuerdo a la bibliografía consultada, se reportan dos diferentes técnicas de extracción, que son las siguientes: extracción por precipitación de proteínas, extracción sólido-líquido, y una tercera técnica, la extracción líquido-líquido para el combinado de telmisartán con hidroclorotiazida.

Se probó la técnica de extracción sólido- líquido en donde se utilizó MeOH y acetonitrilo en diferentes pruebas para eluir la muestra previamente acidificada.

A pesar de presentar buena simetría de pico (≥ 2), no resulto ser una técnica selectiva al presentar interferencias en el tiempo de retención del analito de interés.

Después de probar los diferentes tipos de extracción de la muestra, se decidió realizar la extracción por precipitación de proteínas, en donde se empleó acetonitrilo como agente precipitante y se obtuvo como resultado buena linealidad (cumpliendo con los criterios de precisión y exactitud establecidos), selectividad (no interferencias en el tiempo de retención del analito y del estándar interno), buen recobro y sobre todo buena sensibilidad pudiendo cuantificar desde 1 ng/mL hasta 1500 ng/mL de acuerdo al rango de concentración planteado en la curva,

demostrando una señal reproducible en cada nivel de concentración. A continuación se muestra un diagrama con la técnica seleccionada para la extracción de la muestra.

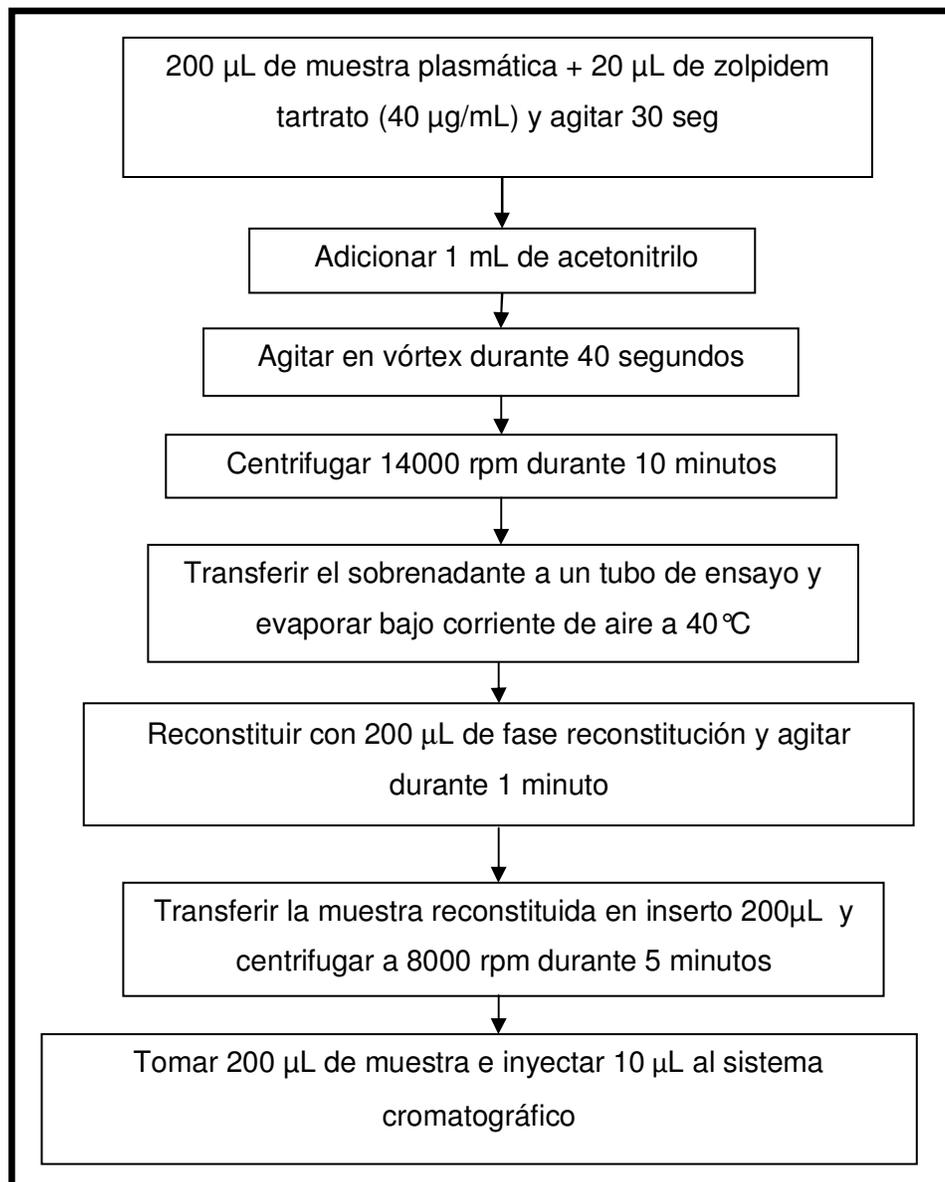


Fig.5 Diagrama del método de extracción.

5.2. Validación del método analítico.

5.2.1 Adecuabilidad del sistema.

En la tabla 6 se presentan los resultados promedio de todas las corridas analíticas que se llevaron a cabo para validar el método. Se muestra que cumple con los criterios de aceptación, contando con coeficiente de variación no mayor al 2% para el área, simetría de pico menor a 2, platos teóricos mayores a 2000 y tiempo de retención con $CV\% \leq 2.0$.

Adicionalmente cada día de análisis se comprobó que no existieran interferencias con los picos de interés en la solución con la que se reconstituyen las muestras (blanco de reactivos), ni con la matriz biológica utilizada (blanco de plasma).

Tabla. 6 Resultados de la adecuabilidad del sistema para corridas de validación

# Corrida analítica	Analito	Área promedio N=6	Área C.V.%	Simetría de pico Promedio N=6	Platos teóricos Promedio N=6
1	Telmisartán	2279075.000	0.376	1.068	5167.922
	Zolpidem	3257069.333	0.995	1.025	9825.181
2	Telmisartán	2370797.500	0.995	1.019	4740.496
	Zolpidem	3339170.667	1.133	1.025	8222.833
3	Telmisartán	2279492.167	0.758	1.045	5002.134
	Zolpidem	3338907.167	0.789	1.054	9600.468
4	Telmisartán	2292587.000	0.460	1.076	5052.076
	Zolpidem	3338907.167	0.244	1.074	9962.897
5	Telmisartán	2253472.167	1.269	1.081	5121.023
	Zolpidem	3311229.333	1.163	1.063	9911.095
6	Telmisartán	2255073.500	0.904	1.089	5084.332
	Zolpidem	3320576.167	0.987	1.060	9759.286

5.2.2 Linealidad del método.

El método demostró ser lineal en las concentraciones correspondientes a la curva de calibración (1 a 1500 ng/mL). En cada punto de la curva de calibración se cumplieron los criterios establecidos para precisión y exactitud, es decir C.V% y desviación absoluta porcentual para la concentración recuperada con respecto a la nominal fue menor o igual al 15% respectivamente y 20% para el límite de cuantificación.

La tabla 7 muestra los resultados de la linealidad del método para la cuantificación de telmisartán en plasma.

Tabla. 7 Resultados de la linealidad del método para cuantificar telmisartán en plasma

Concentración recuperada										
Conc. nominal (ng/mL)	1	2	10	50	150	300	600	900	1350	1500
Curva 1	1.022	1.935	9.476	47.652	152.137	301.041	612.098	919.504	1375.675	1546.458
Curva 2	0.997	2.000	10.331	50.093	151.151	287.815	605.819	870.649	1375.114	1508.369
Curva 3	1.012	1.947	10.193	48.763	150.164	298.381	600.659	904.956	1356.809	1519.144
Curva 4	1.002	2.000	9.760	50.278	150.192	300.853	599.779	896.262	1361.513	1512.194
Curva 5	0.941	2.239	9.963	49.473	149.476	301.816	591.065	885.180	1335.564	1490.156
Promedio	0.995	2.024	9.945	49.252	150.624	297.981	601.884	895.310	1360.935	1515.264
D. E	0.032	0.124	0.341	1.073	1.035	5.827	7.791	18.642	16.427	20.466
C. V (%)	3.174	6.112	3.429	2.179	0.687	1.956	1.294	2.082	1.207	1.351
Desv. Abs. (%)	0.520	1.210	0.554	1.496	0.416	0.673	0.314	0.521	0.810	1.018

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:

$$y = mx + b$$

Siendo:

Y: respuesta analítica (relación de áreas de telmisartán/ zolpidem tartrato)

X: concentración nominal de telmisartán.

m: pendiente de la recta

b: ordenada al origen

La linealidad del método fue definida a partir del coeficiente de correlación (r), cuyo valor de cumplimiento para cada curva de calibración fue de 0.99 o mayor, considerándose para esta evaluación las primeras 5 curvas de la validación del método analítico (ver tabla 8).

Tabla 8. Parámetros de linealidad del método para cuantificar telmisartán en plasma

	Pendiente (m)	Ordenada (b)	r
Curva 1	0.00093	0.00025	0.99947
Curva 2	0.00088	0.00046	0.99971
Curva 3	0.00088	0.00035	0.99993
Curva 4	0.00086	0.00025	0.99995
Curva 5	0.00089	0.00041	0.99990
Promedio	0.00089		
D. E	0.000030		
C. V (%)	2.817		

En la figura siguiente se reportan los datos de pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de correlación para las 5 curvas de calibración graficando concentración nominal vs respuesta relación de áreas telmisartán / zolpidem tartrato (E.I.) (ver fig. 6).

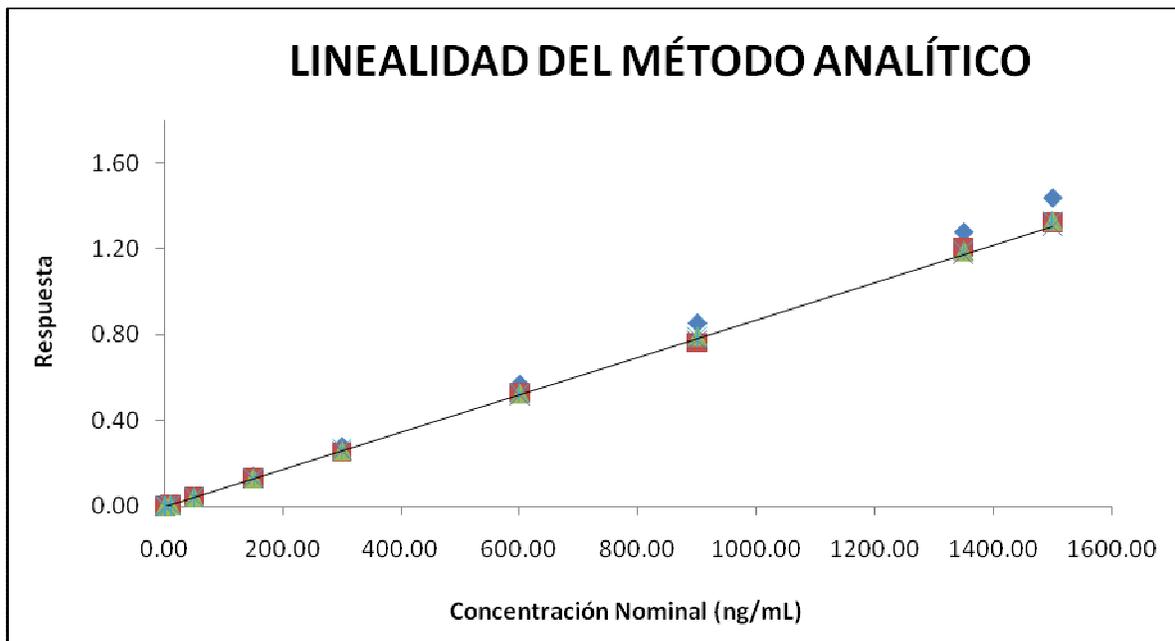


Fig. 6 Linealidad del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma.

5. 2. 3 Precisión

Ø Repetibilidad y exactitud del método (intradía)

En la tabla 9, se muestran los resultados correspondientes a la repetibilidad, en los cuales se puede observar que el coeficiente de variación fue de 11.25% para el límite de cuantificación mientras que para CB, CM, CA y LS el coeficiente de variación mostro valores menores o iguales a 2.357% por lo que se puede decir que cada uno de los niveles de concentración evaluados cumplen con los criterios establecidos.

Tabla 9. Repetibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma

Muestra	Límite de Cuantificación (1 ng/mL)	Control Bajo (3 ng/mL)	Control Medio (750 ng/mL)	Control Alto (1200 ng/mL)	Límite Superior (1500 ng/mL)
1	1.118	2.780	700.089	1125.342	1415.081
2	0.905	2.759	711.247	1124.203	1413.811
3	1.050	2.820	708.633	1138.166	1478.859
4	0.931	2.792	698.065	1188.118	1401.549
5	0.931	2.752	744.046	1123.077	1408.351
6	1.182	2.931	711.293	1114.971	1400.301
Promedio	1.020	2.806	712.229	1135.646	1419.659
D. E	0.115	0.066	16.584	26.766	29.632
C. V (%)	11.253	2.354	2.328	2.357	2.087
Desv. Abs. (%)	1.950	6.478	5.036	5.363	5.356

∅ **Reproducibilidad y exactitud del método interdía (analista1).**

En la tabla 10 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método y exactitud interdía correspondiente, para el analista 1, en donde se observa que el método es reproducible pues el coeficiente de variación entre los tres días de trabajo cumple con un valor menor al $\pm 15\%$.

Tabla 10. Reproducibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma analista 1.

Analista/Día	Concentración recuperada		
	Control Bajo (3 ng/mL)	Control Medio (750 ng/mL)	Control Alto (1200 ng/mL)
Analista1 Día 1	2.780	700.089	1125.342
	2.759	711.247	1124.203
	2.820	708.633	1138.166
	2.792	698.065	1188.118
	2.752	744.046	1123.077
	2.931	711.293	1114.971
Analista1 Día 2	3.126	747.736	1181.752
	3.020	755.524	1196.327
	3.030	743.378	1209.509
	2.910	751.949	1191.286
	2.800	753.899	1196.484
	2.886	751.090	1199.527
Analista 1 Día 3	3.167	737.886	1181.953
	3.370	739.554	1193.535
	3.189	740.047	1193.620
	3.248	744.145	1194.987
	3.309	715.610	1186.837
	2.852	741.617	1189.562
Promedio	2.986	733.100	1173.848
D. E	0.203	19.608	31.956
C. V (%)	6.808	2.675	2.722
Desv. Abs. (%)	0.480	2.253	2.179

∅ **Reproducibilidad y exactitud del método interdía (analista2).**

En la tabla 11 se muestran los resultados correspondientes a la reproducibilidad y exactitud interdía para el analista 2, de acuerdo al coeficiente de variación obtenido, el método es reproducible pues se obtuvo un valor menor al $\pm 15\%$ en cada una de las concentraciones evaluadas.

Tabla 11. Reproducibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma analista 2

Analista/Día	Concentración recuperada		
	Control Bajo (3 ng/mL)	Control Medio (750 ng/mL)	Control Alto (1200 ng/mL)
Analista2 Día 1	3.256	725.762	1193.892
	3.087	737.688	1172.930
	6.875*	741.762	1156.385
	2.930	739.005	1170.088
	1171.71**	725.886	3.155**
	2.941	728.561	1158.059
Analista 2 Día 2	3.099	832.924	1223.304
	3.142	764.877	1246.401
	3.084	789.470	1207.489
	3.021	780.021	1176.273
	3.263	764.718	1205.572
	3.438	775.191	1201.912
Analista 2 Día 3	3.035	758.214	1280.401
	3.042	781.552	1227.535
	3.009	762.434	1168.637
	3.338	763.709	1238.201
	2.958	758.341	1215.732
	3.462	762.656	1230.662
Promedio	3.132	760.710	1204.322
D.E.	0.170	26.511	34.651
C.V. (%)	5.441	3.485	2.877
Desv. Abs. (%)	4.385	1.428	0.360

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

** Confusión de muestra

∅ Reproducibilidad y exactitud entre analistas.

Tal como se muestra en la tabla 12, los valores obtenidos del coeficiente de variación para las diferentes concentraciones evaluadas fueron de 3.050% a 6.544% y valores menores o iguales a 1.810% para la desviación absoluta por lo tanto se demuestra que el método es exacto y reproducible entre analistas, al presentar valores globales menores al $\pm 15\%$.

Tabla 12. Reproducibilidad y exactitud del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma entre analistas

	Control Bajo (3 ng/mL)	Control Medio (750 ng/mL)	Control Alto (1250 ng/mL)
Promedio	3.054	746.905	1188.649
D.E.	0.200	26.910	36.255
C.V. (%)	6.544	3.603	3.050
Desv. Abs. (%)	1.810	0.413	0.946

5.2.4 Límite de cuantificación y detección.

La sensibilidad del método fue determinada a partir de la concentración mínima cuantificable ó límite de cuantificación (LC) y del límite de detección (LD). En la tabla 13 se muestran los resultados.

Tabla 13. Limite de cuantificación y limite de detección para cuantificar telmisartán en plasma

Muestra	Concentración recuperada	
	Limite de detección. Concentración (0.5 ng/mL)	Límite de cuantificación. Concentración (1 ng/mL)
1	0.649	1.118
2	0.531	0.905
3	0.555	1.050
4	0.469	0.931
5	0.534	0.931
6	0.484	1.182
Promedio	0.537	1.020
D. E	0.064	0.115
C. V (%)	11.879	11.253
Desv. Abs. (%)	7.400	1.950

Se consideró 1 ng/mL como el límite de cuantificación ya que en su análisis se obtuvo un coeficiente de variación de 11.225% y un valor de 1.950% para desviación absoluta. Por otro lado la concentración de 0.5 ng/mL fue considerada como límite de detección, ya que a pesar de tener un coeficiente de variación de 11.879%, presenta una relación señal/ruido cercana a 3.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede decir que cumple con los requisitos de acuerdo a La Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, pues indica que el LC es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con precisión y exactitud establecidas en el método y tiene valides como LC si su valor promedio cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal, con un coeficiente de variación no mayor que 20%; mientras que el LD se define como la mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas, su señal cromatográfica se distingue del nivel de ruido (aproximadamente tres veces mayor) y el coeficiente de variación de la concentración recuperada (precisión) y/o la desviación absoluta por ciento (exactitud) no son mayores al 20%.

A continuación se muestra un cromatograma característico de las muestras pertenecientes al límite de cuantificación y de detección (ver fig. 7).

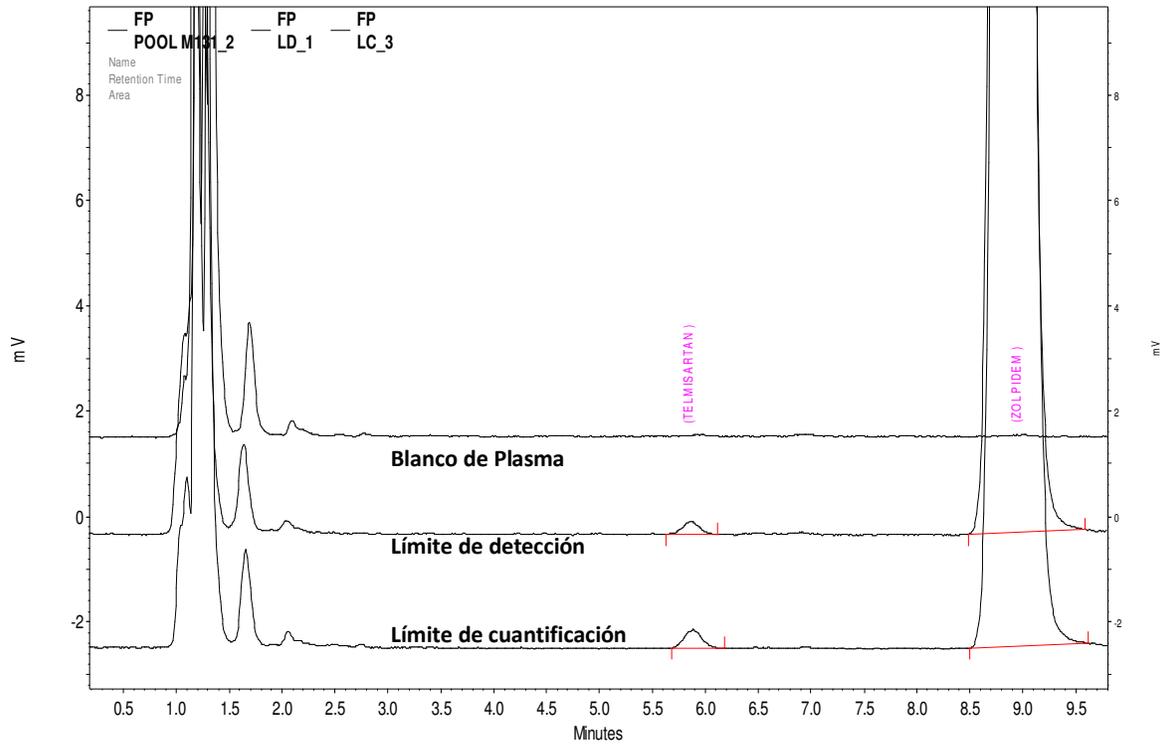


Fig. 7 Limite de Detección y Cuantificación

5.2.5 Recobro.

El recobro del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma fue constante con un recobro global de 92.802% para las concentraciones evaluadas: CB (3ng/mL), CM (750 ng/mL), CA (1200 ng/mL) presentando una desviación de los promedios individuales con respecto al global, menor al 15% (ver tabla 14).

Tabla 14. Recobro absoluto del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma

Nivel de concentración	Áreas		Recobro	% desv
	Sistema	Método		
Control bajo (3 ng/mL)	9977	8933		
	9933	9272		
	9885	9257		
	9729	9329		
	10059	9869		
	9582	10016		
Promedio	9861	9446	95.793	3.223
Control medio (750 ng/mL)	2400841	2145695		
	2373780	2255719		
	2376944	2212134		
	2403061	2132217		
	2409244	2360142		
	2483218	2191491		
Promedio	2407848	2216233	92.042	0.819
Control alto (1200 ng/mL)	3823413	3488530		
	3897619	3483998		
	3867289	3474236		
	3887971	3812552		
	3896754	3454044		
	3962902	3422358		
Promedio	3889325	3522620	90.571	2.404
	Promedio Global		92.802	2.149

A continuación se muestra la tabla con el recobro para zolpidem (tartrato), estándar interno utilizado, dando como resultado un recobro global promedio de 97.069% (ver tabla 15)

Tabla 15. Recobro absoluto de zolpidem tartrato (E.I) en plasma

Concentración	Áreas		Recobro
	Sistema	Método	
4.0 µg/mL	3294644	3156008	
	3361732	3298161	
	3430302	3228366	
	3389980	3283629	
	3616684	3518812	
	3402907	3372045	
	3428007	3298964	
	3375543	3413733	
	3393924	3360118	
	3420253	3287739	
	3421986	3414370	
	3531779	3316317	
	3405476	3337208	
	3463844	3336248	
	3427695	3286096	
	3452468	3454514	
3454660	3310881		
3516753	3304351		
Promedio	3432702	3332087	97.069

5.2.6 Selectividad.

La selectividad del método fue determinada, analizando la muestra blanco de la matriz biológica (muestras de plasma de seis donadores y su mezcla) (fig. 8) y muestras de plasma conteniendo fármacos de uso común, como ácido salicílico (300 µg/mL), naproxeno (50 µg/mL), paracetamol (20 µg/mL) y el anticoagulante (Heparina 143 unidades USP), evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de telmisartán (5.5 – 6.5 minutos) y zolpidem tartrato

(E.I.) (8.1 – 9.1 minutos). Se evaluó también la posible interferencia de muestras hemolizadas y lipémicas (ver fig. 9).

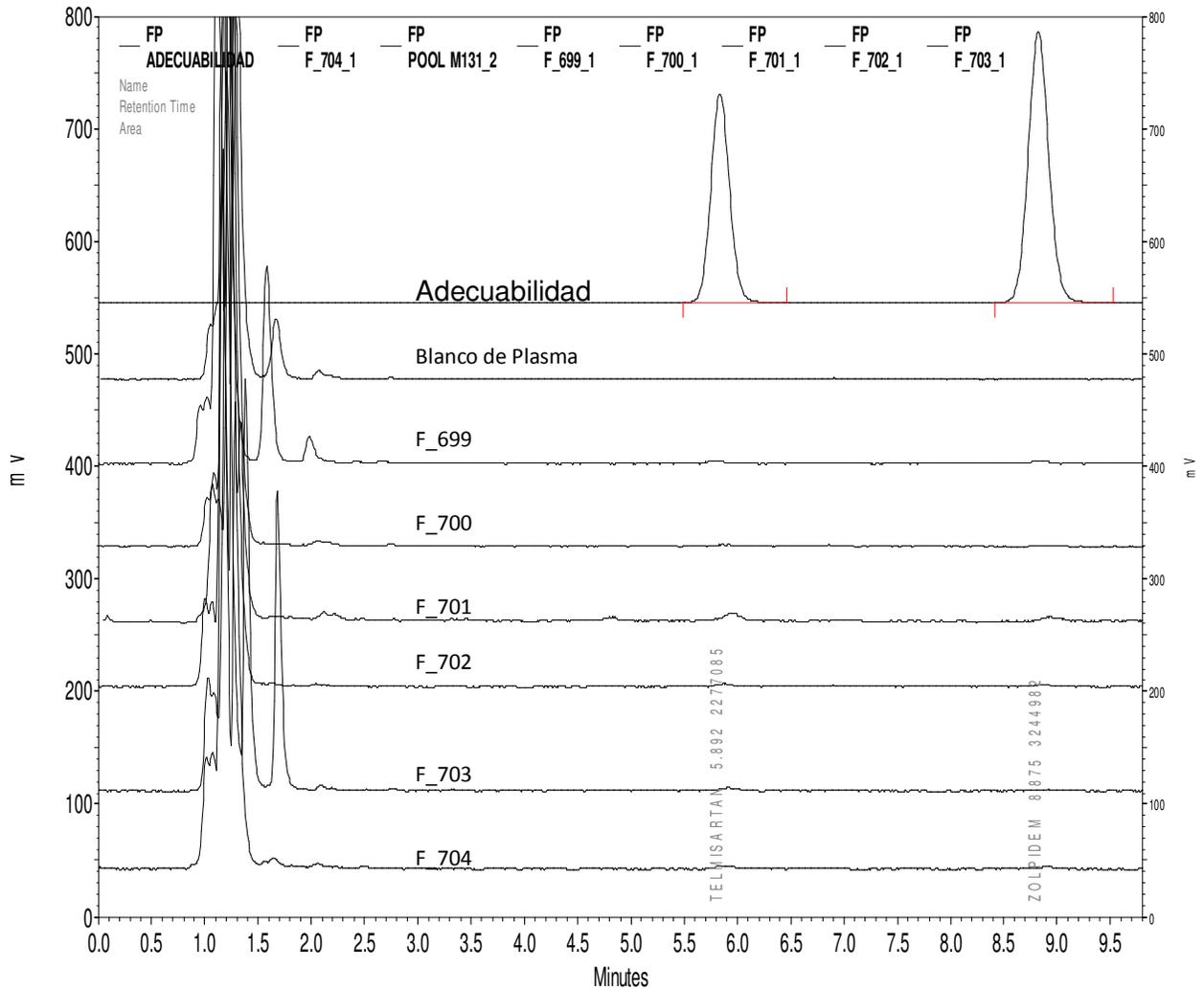


Fig. 8 Selectividad del método para la mezcla de plasma y los plasmas individuales.

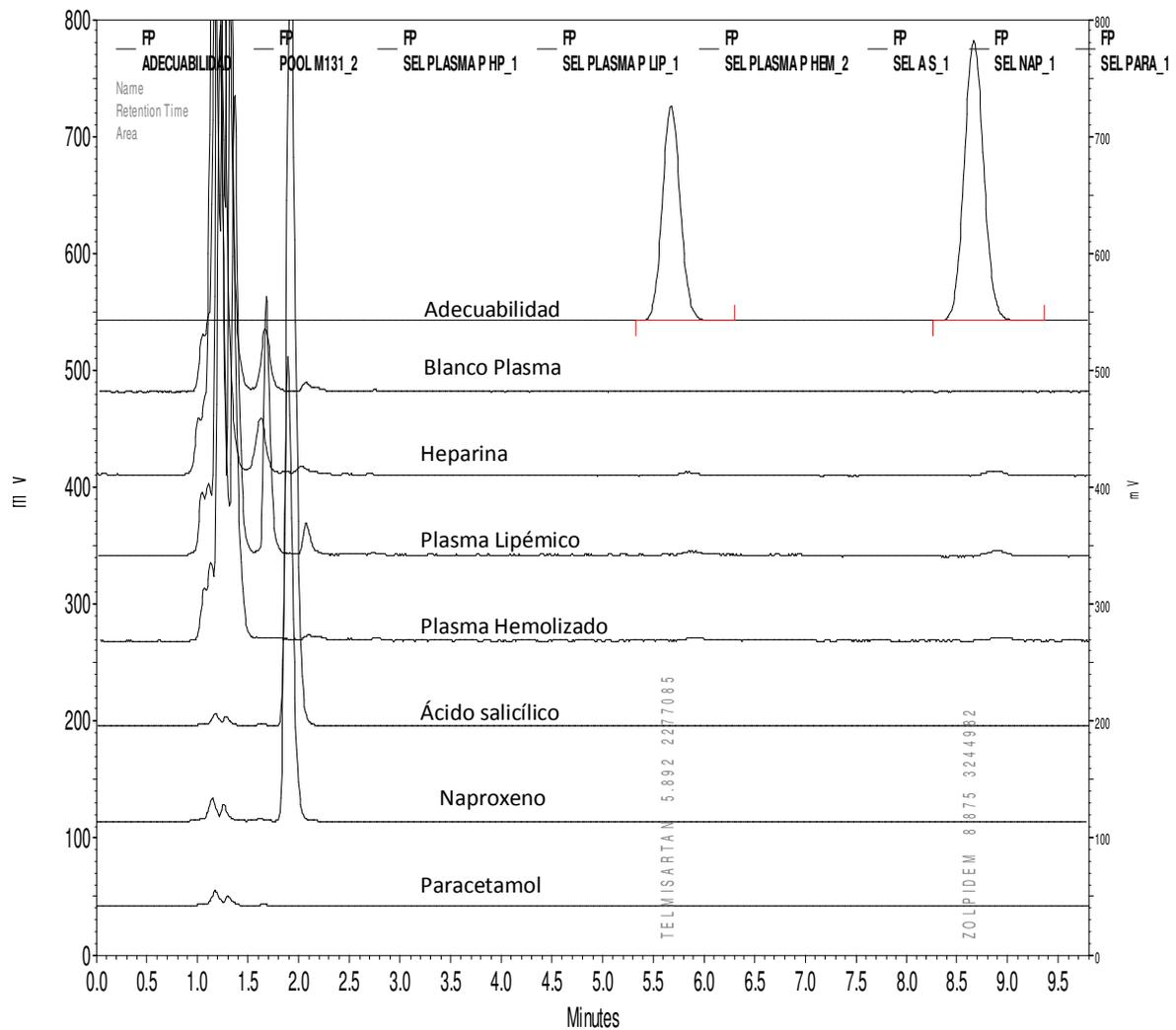


Fig. 9 Selectividad del método para fármacos de uso común

En las figuras 8 y 9, se demuestra que el método analítico es selectivo, al no presentar interferencia en los tiempos de retención para telmisartan y zolpidem tartrato.

5.2.7 Estabilidad.

∅ Estabilidad ciclos de congelación- descongelación (-70°C).

En las tablas 16, 17 y 18, se muestran los resultados obtenidos de la estabilidad de telmisartán en ciclos de congelación a -70°C.

Tabla 16. Estabilidad de telmisartán en plasma (primer ciclo de congelación – descongelación a -70°C)

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (3 ng/mL)	Control medio (750 ng/mL)	Control alto (1200 ng/mL)
1	3.167	737.886	1181.953
2	3.370	739.554	1193.535
3	3.189	740.047	1193.620
4	3.248	744.145	1194.987
5	3.309	715.610	1186.837
6	2.852	741.617	1189.562
Promedio	3.189	736.477	1190.082
D.E	0.181	10.439	5.008
C.V. (%)	5.691	1.417	0.421
Concentraciones plasmáticas después del CICLO1			
1	3.060	713.052	1165.167
2	3.160	751.296	1185.838
3	3.081	725.121	1157.680
4	3.058	542.612	1228.900
5	2.913	725.164	1174.720
6	5.267*	712.732	1167.972
Promedio	3.054	694.996	1180.046
D.E	0.089	75.959	25.753
C.V. (%)	2.924	10.929	2.182
Desv. Abs. (%)	4.226	5.632	0.843

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

Tabla 17. Estabilidad de Telmisartán en plasma (segundo ciclo de congelación– descongelación a -70°C)

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (3 ng/mL)	Control medio (750 ng/mL)	Control alto (1200 ng/mL)
1	2.975	761.591	1177.027
2	3.124	755.166	1168.442
3	3.201	763.436	1171.211
4	3.030	752.751	1170.962
5	3.086	761.593	1173.581
6	2.886	764.063	1177.338
Promedio	3.050	759.767	1173.094
D.E	0.112	4.668	3.562
C.V. (%)	3.665	0.614	0.304
Concentraciones plasmáticas después del CICLO 2			
1	3.441	752.719	1207.071
2	3.173	756.002	1220.766
3	3.187	759.014	1198.008
4	3.348	764.420	1214.141
5	3.037	786.784	1218.296
6	3.386	760.015	1176.287
Promedio	3.262	763.159	1205.762
D.E	0.154	12.223	16.632
C.V. (%)	4.729	1.602	1.379
Desv. Abs. (%)	6.939	0.446	2.785

Tabla 18. Estabilidad de telmisartán en plasma (tercer ciclo de congelación-descongelación a -70°C)

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (3 ng/mL)	Control medio (750 ng/mL)	Control alto (1200 ng/mL)
1	3.002	758.374	1219.955
2	3.007	768.182	1210.854
3	2.895	765.184	1206.999
4	3.100	759.095	1209.689
5	2.919	757.170	1211.199
6	3.042	767.575	1207.375
Promedio	2.994	762.597	1211.012
D.E	0.076	4.944	4.714
C. V. (%)	2.552	0.648	0.389
Concentraciones plasmáticas después del CICLO 3			
1	3.350	815.632	1215.437
2	3.236	748.342	1222.797
3	3.048	794.273	1224.089
4	3.139	756.360	1232.136
5	3.443	755.061	1223.585
6	4.243*	758.417	1227.087
Promedio	3.243	771.348	1224.189
D.E	0.158	27.104	5.486
C. V. (%)	4.883	3.514	0.448
Desv. Abs. (%)	8.317	1.148	1.088

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

Los resultados obtenidos, demuestran que telmisartán es estable en los tres ciclos de congelación-descongelación a -70°C, pues en cada ciclo analizado el coeficiente de variación fue menor al 15%, presentando para el primer ciclo valores $\leq 10.929\%$, en cuanto al segundo ciclo valores $\leq 4.729\%$ y finalmente para el tercer ciclo valores $\leq 4.883\%$, en lo referente al valor de desviación

absoluta obtenida con respecto al valor de las muestras de control de calidad recién preparadas no se presentó diferencia mayor al 15%.

∅ **Estabilidad a temperatura ambiente (21 - 29°C) y refrigeración (1-8°C).**

En las tablas 19 y 20 se muestran los resultados obtenidos para el análisis de estabilidad de muestras a temperatura ambiente (24 h y 48 h), en las tablas 21 y 22 se muestran los resultados para en análisis de estabilidad de muestras en refrigeración (24 y 48 h).

Tabla 19. Estabilidad de telmisartán en plasma (temperatura ambiente de 21-29°C) 24h

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (3 ng/mL)	Control medio (750 ng/mL)	Control alto (1200 ng/mL)
1	3.015	743.590	1172.334
2	3.407	740.047	1186.670
3	3.072	745.498	1189.242
4	3.307	736.519	1183.750
5	3.023	737.736	1190.138
6	3.102	741.468	1180.711
Promedio	3.154	740.810	1183.808
D.E	0.163	3.423	6.619
C.V. (%)	5.177	0.462	0.559
Concentraciones plasmáticas después de 24 h			
1	3.397	737.776	1177.362
2	3.430	731.952	1180.688
3	3.144	728.940	1165.524
4	3.165	736.336	1179.230
5	4.631*	730.826	1171.832
6	3.363	740.849	1169.661
Promedio	3.300	734.447	1174.050
D.E	0.135	4.589	5.979
C.V. (%)	4.089	0.625	0.509
Desv. Abs. (%)	4.612	0.859	0.824

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

Tabla 20. Estabilidad de Telmisartán en plasma (temperatura ambiente de 21-29 °C) 48 h

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (3 ng/mL)	Control medio (750 ng/mL)	Control alto (1200 ng/mL)
1	3.126	747.736	1181.752
2	3.020	755.524	1196.327
3	3.030	743.378	1209.509
4	2.910	751.949	1191.286
5	2.800	753.899	1196.484
6	2.886	751.090	1199.527
Promedio	2.962	750.596	1195.814
D.E	0.118	4.417	9.168
C.V. (%)	3.983	0.588	0.767
Concentraciones plasmáticas después de 48 h			
1	3.078	738.944	1163.251
2	3.118	735.081	1184.683
3	3.146	747.181	1190.827
4	3.032	734.673	1178.950
5	3.220	714.548	1188.089
6	3.225	741.226	1187.059
Promedio	3.137	735.276	1182.143
D.E	0.077	11.141	10.085
C.V. (%)	2.452	1.515	0.853
Desv. Abs. (%)	5.891	2.041	1.143

Tabla 21. Estabilidad de telmisartán en plasma (primer ciclo de refrigeración de 1-8°C)

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (3 ng/mL)	Control medio (750 ng/mL)	Control alto (1200 ng/mL)
1	3.015	743.590	1172.334
2	3.407	740.047	1186.670
3	3.072	745.498	1189.242
4	3.307	736.519	1183.750
5	3.023	737.736	1190.138
6	3.102	741.468	1180.711
Promedio	3.154	740.810	1183.808
D.E	0.163	3.423	6.619
C.V. (%)	5.177	0.462	0.559
Concentraciones plasmáticas después de 24 h			
1	3.373	735.822	1184.000
2	2.995	743.268	1190.258
3	3.767*	732.663	1189.545
4	2.824	745.879	1219.523
5	3.062	739.447	1151.544
6	2.978	741.295	1183.206
Promedio	3.046	739.729	1186.346
D.E	0.202	4.859	21.692
C.V. (%)	6.640	0.657	1.829
Desv. Abs. (%)	3.422	0.146	0.214

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

Tabla 22. Estabilidad de Telmisartán en plasma (segundo ciclo de refrigeración de 1-8°C)

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (3 ng/mL)	Control medio (750 ng/mL)	Control alto (1200 ng/mL)
1	3.126	747.736	1181.752
2	3.020	755.524	1196.327
3	3.030	743.378	1209.509
4	2.910	751.949	1191.286
5	2.800	753.899	1196.484
6	2.886	751.090	1199.527
Promedio	2.962	750.596	1195.814
D.E	0.118	4.417	9.168
C.V. (%)	3.983	0.588	0.767
Concentraciones plasmáticas después de 48 h			
1	4.024*	735.561	1175.487
2	3.164	735.578	1164.613
3	3.263	733.105	1165.601
4	3.083	734.556	1165.147
5	3.221	737.421	1175.223
6	3.399	733.852	1159.649
Promedio	3.226	735.012	1167.620
D.E	0.118	1.524	6.363
C.V. (%)	3.655	0.207	0.545
Desv. Abs. (%)	8.913	2.076	2.358

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

Se puede observar que las muestras almacenadas a temperatura ambiente y en refrigeración son estables hasta 48 horas, ya que para todos los controles se presenta una desviación absoluta menor a 15% con respecto al valor de las muestras de control de calidad recién preparadas.

∅ **Estabilidad de muestra procesada.**

De acuerdo a los resultados obtenidos, se demuestra que telmisartán es estable a 24 y 96 horas después de su preparación, pues en cada caso se obtuvieron coeficientes de variación así como desviación absoluta menor a $\pm 15\%$ con respecto a las muestras de recién preparación (ver tablas 23 y 24)

Tabla 23. Estabilidad de muestra procesada (24h en automuestrador 4°C)

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (3 ng/mL)	Control medio (750 ng/mL)	Control alto (1200 ng/mL)
1	3.015	743.590	1172.334
2	3.407	740.047	1186.670
3	3.072	745.498	1189.242
4	3.307	736.519	1183.750
5	3.023	737.736	1190.138
6	3.102	741.468	1180.711
Promedio	3.154	740.810	1183.808
D.E	0.163	3.423	6.619
C.V. (%)	5.177	0.462	0.559
Concentraciones plasmáticas después de 24 h			
1	3.125	729.404	1170.617
2	3.402	734.151	1167.496
3	3.023	731.072	1161.763
4	2.988	726.172	1162.212
5	2.988	726.239	1173.823
6	3.003	736.704	1156.661
Promedio	3.088	730.624	1165.429
D.E	0.162	4.246	6.361
C.V. (%)	5.250	0.581	0.546
Desv. Abs. (%)	2.098	1.375	1.553

Tabla 24. Estabilidad en muestra procesada (96 h en automuestreador 4º)

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (3 ng/mL)	Control medio (750 ng/mL)	Control alto (1200 ng/mL)
1	2.975	761.591	1177.027
2	3.124	755.166	1168.442
3	3.201	763.436	1171.211
4	3.030	752.751	1170.962
5	3.086	761.593	1173.581
6	2.886	764.063	1177.338
Promedio	3.050	759.767	1173.094
D.E	0.112	4.668	3.562
C.V. (%)	3.665	0.614	0.304
Concentraciones plasmáticas después de 96 h			
1	3.406	796.017	1259.076
2	6.796*	806.104	1273.562
3	3.297	789.494	1269.941
4	3.392	783.158	1268.953
5	3.396	779.428	1272.252
6	3.334	790.111	1268.272
Promedio	3.365	790.719	1268.676
D.E	0.047	9.500	5.112
C.V. (%)	1.406	1.201	0.403
Desv. Abs. (%)	10.316	4.074	8.148

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

∅ **Estabilidad de muestra evaporada.**

En las tablas 25 y 26 se demuestra la estabilidad de la muestra evaporada a 24 y 96 horas en refrigeración al presentar un valor para desviación absoluta para cada análisis menor de $\pm 15\%$ con respecto a las muestras recién preparadas.

Tabla 25. Estabilidad de telmisartán muestra evaporada (24h en refrigeración a 1-8°C)

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (3 ng/mL)	Control medio (750 ng/mL)	Control alto (1200 ng/mL)
1	3.002	758.374	1219.955
2	3.007	768.182	1210.854
3	2.895	765.184	1206.999
4	3.100	759.095	1209.689
5	2.919	757.170	1211.199
6	3.042	767.575	1207.375
Promedio	2.994	762.597	1211.012
D.E	0.076	4.944	4.714
C.V. (%)	2.552	0.648	0.389
Concentraciones plasmáticas después de 24 h			
1	2.900	733.396	1173.555
2	2.864	735.302	1169.243
3	2.986	768.290	1224.468
4	3.034	762.639	1270.568
5	2.795	770.499	1160.602
6	2.602	761.562	1163.163
Promedio	2.864	755.281	1193.600
D.E	0.154	16.568	44.469
C.V. (%)	5.376	2.194	3.726
Desv. Abs. (%)	4.364	0.959	1.438

Tabla 26. Estabilidad de telmisartán muestra evaporada (96h en refrigeración a 1-8°C)

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control bajo (3 ng/mL)	Control medio (750 ng/mL)	Control alto (1200 ng/mL)
1	2.975	761.591	1177.027
2	3.124	755.166	1168.442
3	3.201	763.436	1171.211
4	3.030	752.751	1170.962
5	3.086	761.593	1173.581
6	2.886	764.063	1177.338
<i>Promedio</i>	3.050	759.767	1173.094
<i>D.E</i>	0.112	4.668	3.562
<i>C.V. (%)</i>	3.665	0.614	0.304
Concentraciones plasmáticas después de 96 h			
1	3.436	801.641	1292.891
2	3.387	805.202	1280.045
3	3.225	796.123	1280.268
4	3.375	757.693	1250.328
5	3.389	798.490	1285.825
6	3.218	800.416	1281.754
<i>Promedio</i>	3.338	793.261	1278.519
<i>D.E</i>	0.093	17.690	14.632
<i>C.V. (%)</i>	2.783	2.230	1.144
<i>Desv. Abs. (%)</i>	9.442	4.408	8.987

∅ **Estabilidad a largo plazo (congelación -70°C).**

En la tabla 27 se demuestra la estabilidad de telmisartán a -70°C por 160 días, pues se obtuvieron coeficientes de variación menores a $\pm 15\%$, y presento una diferencia no mayor a $\pm 15\%$ de las muestras con 160 días en almacenamiento, con respecto a las muestras recién preparadas.

Tabla 27. Estabilidad a largo plazo de telmisartán (-70°C) después de 160 días

Concentraciones plasmáticas de muestras recién preparadas			
Muestra	Control Bajo (3 ng/mL)	Control Medio (750 ng/mL)	Control Alto (1200 ng/mL)
1	3.772*	781.190	1247.441
2	3.292	743.470	1185.663
3	2.711	771.078	1277.394
4	2.673	748.865	1260.383
5	2.635	794.813	1271.426
6	2.560	790.167	1258.391
Promedio	2.774	771.597	1250.116
D.E.	0.295	21.373	33.267
C.V. (%)	10.626	2.770	2.661
Concentraciones plasmáticas después de 160 días en congelación a -70°C			
1	2.747	750.135	1279.981
2	2.603	731.686	1279.650
3	3.848*	773.851	1263.390
4	2.632	801.587	1278.186
5	2.641	793.085	1233.641
6	2.648	759.293	1273.920
Promedio	2.654	768.273	1268.128
D.E.	0.055	26.476	17.999
C.V. (%)	2.058	3.446	1.419
Desv. Abs. (%)	4.326	0.431	1.441

5.2.8 Tolerancia.

De acuerdo a la NOM-177-SSA-1998 define tolerancia como la capacidad del 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

∅ Integridad de la dilución.

En la tabla 28 se muestra que la prueba fue aceptable, pues la diferencia de concentraciones entre las muestras extraídas con el volumen normal y la concentración calculada multiplicando por un factor de dilución de 5 no excedió el 15% del promedio del valor nominal.

Tabla 28. Tolerancia del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma con volumen parcial de muestra (concentración dentro de la curva de calibración)

Integridad de la dilución	
Telmisartán (Valor nominal 1200 ng/mL)	
MUESTRA #	Concentración interpolada considerando un factor de dilución 2
1	1212.788
2	1201.672
3	1204.436
4	1209.074
5	1185.722
6	1203.810
Promedio	1202.917
D. E	9.335
C. V (%)	0.776
Desv. Abs. (%)	0.243

En la tabla 29 se muestran los resultados obtenidos para las pruebas realizadas en las muestras con concentración por encima de la curva de calibración.

Tabla 29. Tolerancia del método analítico para cuantificar telmisartán en plasma con volumen parcial de muestra (concentración por encima de la curva de calibración)

Integridad de la dilución	
Telmisartán (Valor nominal de 2500 ng/mL)	
Muestra #	Concentración interpolada Considerando un factor de dilución de 2
1	2517.272
2	2502.800
3	2511.278
4	2483.130
5	2529.094
6	2519.250
Promedio	2510.471
D. E	15.982
C. V (%)	0.637
Desv. Abs. (%)	0.419

De acuerdo a los resultados obtenidos, se demuestra que en caso de que alguna muestra presentara concentración por encima del punto más alto de la curva de calibración, se podría utilizar un volumen de 100 μ L y añadir 100 μ L de plasma libre de fármaco para procesarla y generará valores que cumplirán con los parámetros de exactitud establecidos.

5.3. Etapa clínica.

En el estudio clínico participaron 56 voluntarios de sexo masculino clínicamente sanos a los que se les realizaron las pruebas mencionadas en la parte experimental para corroborar esta condición.

5.3.1 Estadística demográfica descriptiva.

En la tabla 30 se muestran los datos de: edad, peso, talla e IMC, y los siguientes parámetros estadísticos para cada dato: media, desviación estándar (Desv. Est), error estándar (Error Est), mínimo (min), mediana, máximo (max), coeficiente de variación (CV).

Tabla 30. Estadística descriptiva de las variables demográficas

Variable	Genero	N	Media	Desv. Est	Error Est	Min	Mediana	Max	CV%
Edad (años)	Hombres	56	28.64	7.14	0.95	18.00	27.50	46.00	24.93
Peso (Kg)	Hombres	56	69.08	7.49	1.00	54.00	69.00	82.00	10.85
Talla (cm)	Hombres	56	168.48	7.24	0.97	154.00	168.00	183.00	4.30
IMC (Kg/m ²)	Hombres	56	24.31	1.84	0.25	20.33	24.47	27.48	7.57

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

En la tabla 31 se muestran los parámetros calculados para la concentración de telmisartán con respecto al tiempo, el numero considerado para el análisis estadístico fue de 56.

Tabla 31. Estadística descriptiva para las concentraciones plasmáticas de telmisartán con respecto al tiempo para el medicamento de referencia

Tiempo (h)	N	Media (ng/mL)	Desv. Est (ng/mL)	Error Est (ng/mL)	Min (ng/mL)	Mediana (ng/mL)	Max (ng/mL)	CV%
0	56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	-
0.17	56	19.39	31.52	4.21	0.00	3.75	116.69	162.56
0.33	56	123.81	236.05	31.54	1.16	28.60	1032.46	190.65
0.5	56	204.86	310.96	41.55	1.73	65.27	1507.28	151.79
0.75	56	296.99	258.55	34.55	3.39	256.84	1108.94	87.06
1	56	295.49	191.59	25.60	5.73	271.19	949.51	64.84
1.25	56	283.88	160.68	21.47	9.13	263.25	798.01	56.60
1.5	56	259.64	140.38	18.76	11.13	230.39	668.98	54.07
1.75	56	237.41	128.42	17.16	30.37	218.36	596.91	54.09
2	56	212.22	112.47	15.03	40.83	189.70	532.11	53.00
2.5	56	188.50	111.12	14.85	45.59	157.99	491.56	58.95
3	56	163.14	99.48	13.29	34.44	140.10	434.33	60.98
4	56	123.70	78.10	10.44	19.64	103.62	332.83	63.13
6	56	79.41	50.12	6.70	10.17	67.67	219.51	63.11
8	56	67.00	41.63	5.56	7.49	56.54	161.86	62.13
12	56	48.69	30.16	4.03	6.57	41.59	152.95	61.93
24	56	25.47	16.60	2.22	2.43	20.37	64.58	65.15
48	52	12.67	10.39	1.44	2.12	9.69	46.01	81.96
72	53	5.24	5.05	0.69	0.00	3.59	24.12	96.45
96	54	2.89	4.45	0.61	0.00	1.50	21.29	154.07

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

Para visualizar el comportamiento farmacocinético que tuvo telmisartán con respecto al tiempo, se muestran gráficos con datos promedio de concentración plasmática (ng/mL) con respecto al tiempo (ver Fig. 10 y 11).

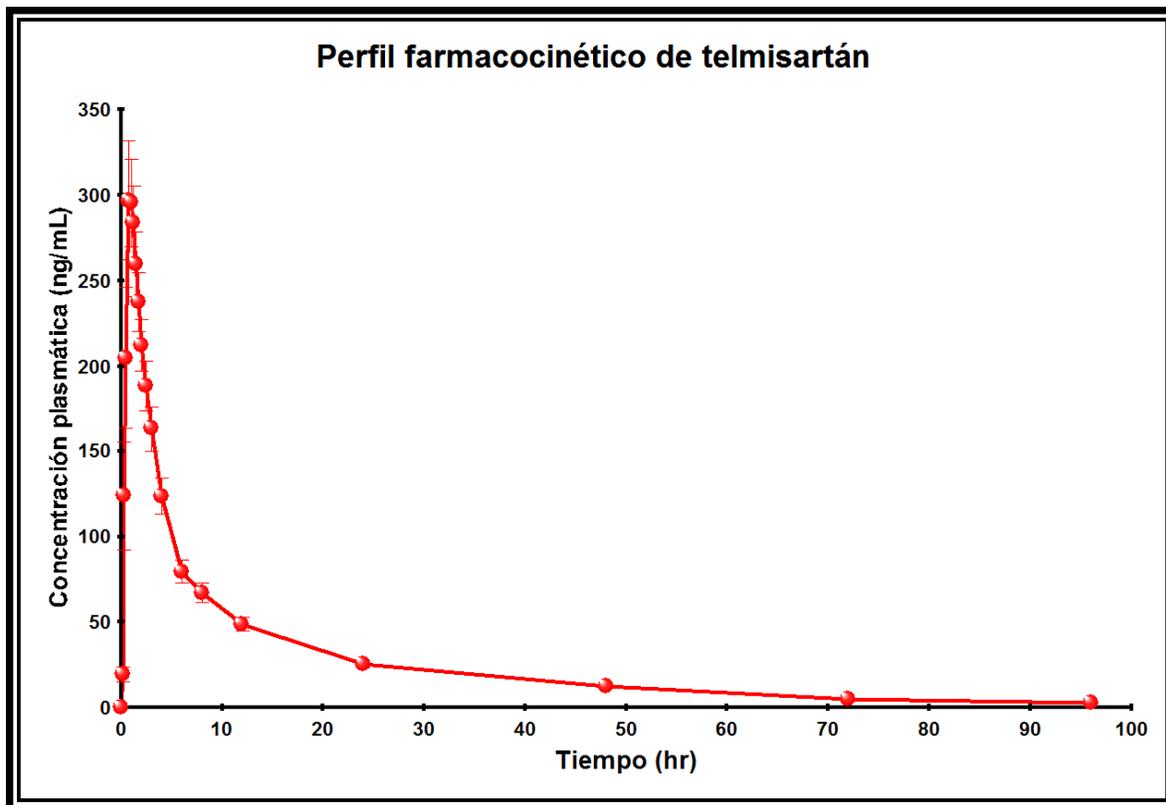


Fig. 10 Perfil Farmacocinético promedio de telmisartán \pm error estándar en escala normal

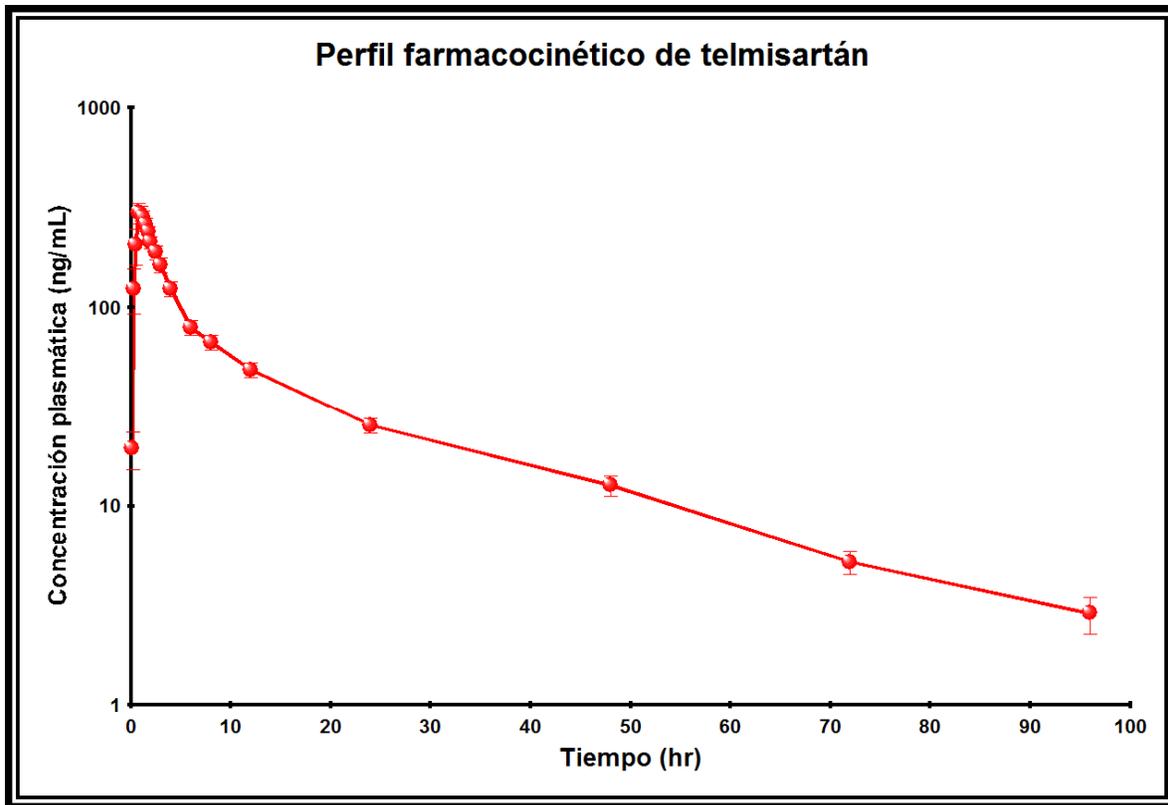


Fig. 11 Perfil farmacocinético promedio de telmisartán \pm error estándar en escala semilogarítmica.

5.3.4 Parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos fueron evaluados a través de métodos no compartimentales (modelo independiente). A continuación se muestran los resultados de la estadística descriptiva (ver tabla 32).

Tabla 32. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos de telmisartán

Variable	N	Media	Desv. Est	Error Est	Min	Mediana	Max	C.V.%
T_{max} (h)	56	1.26	0.86	0.11	0.33	1.00	4.00	67.75
C_{max} (ng/mL)	56	434.80	274.19	36.64	54.65	367.13	1507.28	63.06
ABC_{0-t} (h*ng/mL)	56	2561.41	1502.91	200.84	422.31	2148.59	6731.71	58.68
ABC_{0-inf} (h*ng/mL)	56	2702.47	1666.66	222.72	484.09	2221.97	7758.36	61.67
Constante de eliminación K_e (1/h)	56	0.038	0.011	0.002	0.015	0.037	0.072	29.952
Vida Media de eliminación (h)	56	20.27	7.21	0.96	9.68	18.69	45.85	35.58
TMR_{0-inf} (h)	56	21.15	8.44	1.13	9.02	19.80	55.92	39.92

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos para población mexicana fueron comparados con los reportados en bibliografía para población china⁽¹⁵⁾ mediante una prueba de t de student y un nivel de significancia de 0.05, se pudo demostrar que no hay diferencia estadísticamente significativa para: C_{max} , T_{max} y $T_{1/2}$, pero no así para ABC_{0-t} y $ABC_{0-\infty}$ (ver tabla 33).

Tabla 33. Estadística comparativa entre los parámetros farmacocinéticos de Telmisartán (80 mg) en población mexicana versus población china.

Población	México (n=56)		China ⁽¹⁵⁾ (n=20)		Comparación estadística entre poblaciones		Dictamen
	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>Media</i>	<i>DE</i>	<i>t calculada</i>	<i>t tablas</i> $\alpha= 0.05$	
T max (h)	1.26	0.86	0.91	0.37	0.0126	2.6365	No hay diferencia estadísticamente significativa
Cmax ng/mL	434.80	274.19	377.7	142.6	1.1755	1.6645	
T ½ h	20.27	7.21	194	3.55	0.6969	1.6645	
ABC_{0-t} (h*ng/mL)	2561.41	1502.91	1623.2	570.2	3.4255	1.6645	Hay diferencia estadísticamente significativa
ABC_{0-∞} (h*ng/mL)	2702.47	1666.66	1831	625	3.3144	1.6645	

6. Conclusiones

- ✓ Se desarrollo un método analítico por cromatográfica de líquidos de alta resolución para cuantificar telmisartán en fluido biológico (plasma) el cual es rápido y efectivo.
- ✓ El método analítico desarrollado fue validado de acuerdo a lo establecido en la NOM-177-SSA-1998 en donde el método demostró ser: lineal, preciso, exacto, selectivo en el rango de concentraciones de 1-1500 ng/mL.
- ✓ La técnica demostró tener alto recobro tanto para el analito como para el estándar interno (92.80% y 97.06% respectivamente).
- ✓ Se demostró la estabilidad de telmisartán en tres ciclos de congelación-descongelación
- ✓ Estable en temperatura ambiente por 48h (21-29°C)
- ✓ Estable en refrigeración por 48h (1-8°C)
- ✓ Estable en muestra procesada conservada en automuestreador a 4°C por 24 y 96h.
- ✓ Se demostró la estabilidad de muestra evaporada por 24 y 96 h después de estar conservadas en refrigeración (1-8°C)
- ✓ Fue demostrada la estabilidad a largo plazo (160 días) en muestras conservadas en congelación a -70°C
- ✓ Tolerante a cambio en volumen de muestra (100µL)
- ✓ Se consideró apto el método analítico para aplicarlo en un estudio de biodisponibilidad en un grupo de individuos pertenecientes a la población mexicana en donde los principales parámetros farmacocinéticos obtenidos fueron: T_{max} , C_{max} , ABC_{0-t} , ABC_{0-inf} , K_e , $t_{1/2}$ y TMR_{0-inf} con valores de 1.26 (h), 434.80 (ng/mL), 2561.41 (h*ng/mL), 2702.47 (h*ng/mL), 0.038 (1/h), 20.27 (h) y 21.15 (h), respectivamente.
- ✓ Con todo lo anterior el método analítico puede seguir siendo utilizado en otro estudio de Telmisartán en donde a través de una técnica sencilla de extracción se puede tener la certeza de que se obtendrán resultados confiables.

7. Anexos

7.1 Anexo I. Datos demográficos de 3 voluntarios de los 56 participantes en el estudio.

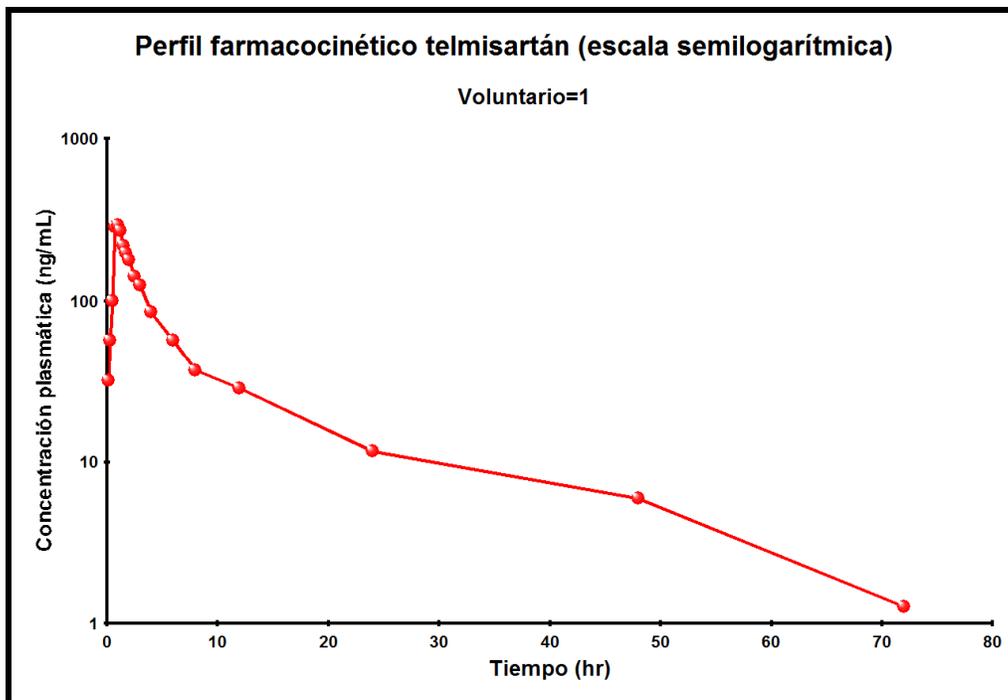
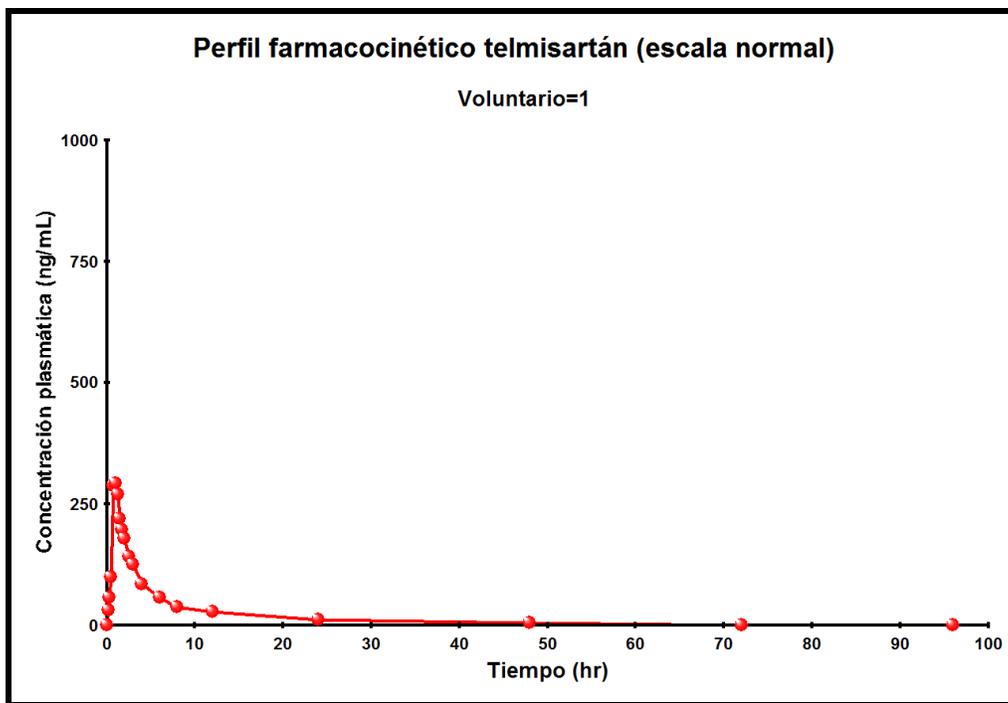
Sexo	Voluntario	Edad (años)	Peso (Kg)	Talla (cm)	IMC (Kg/m ²)
Hombres	1	31	67.50	164	25.10
	10	23	77.50	171	26.50
	14	29	69.00	168	24.45

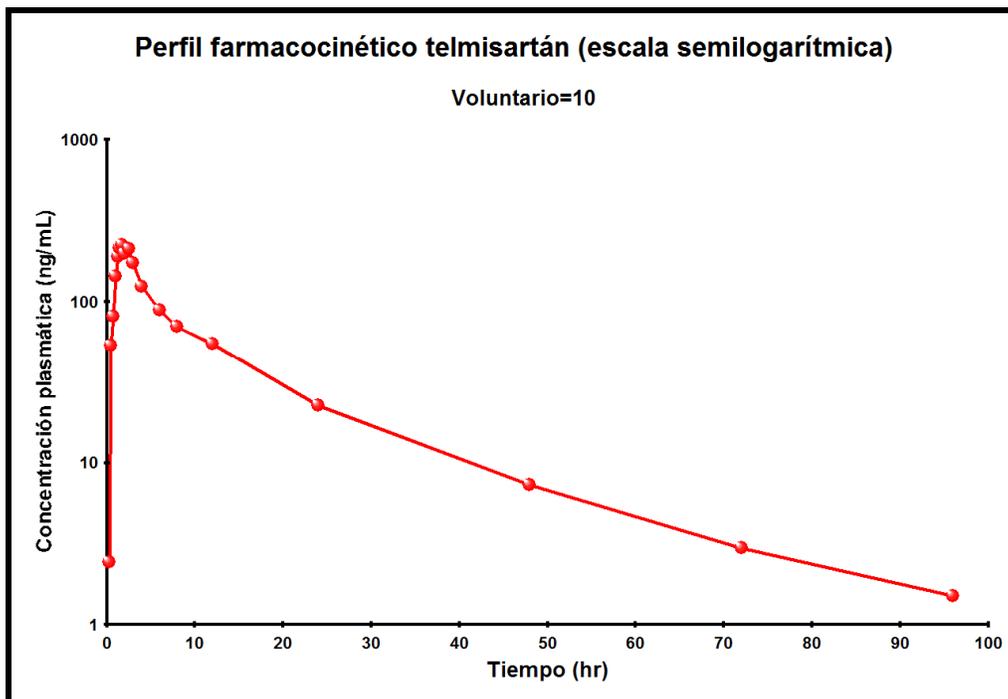
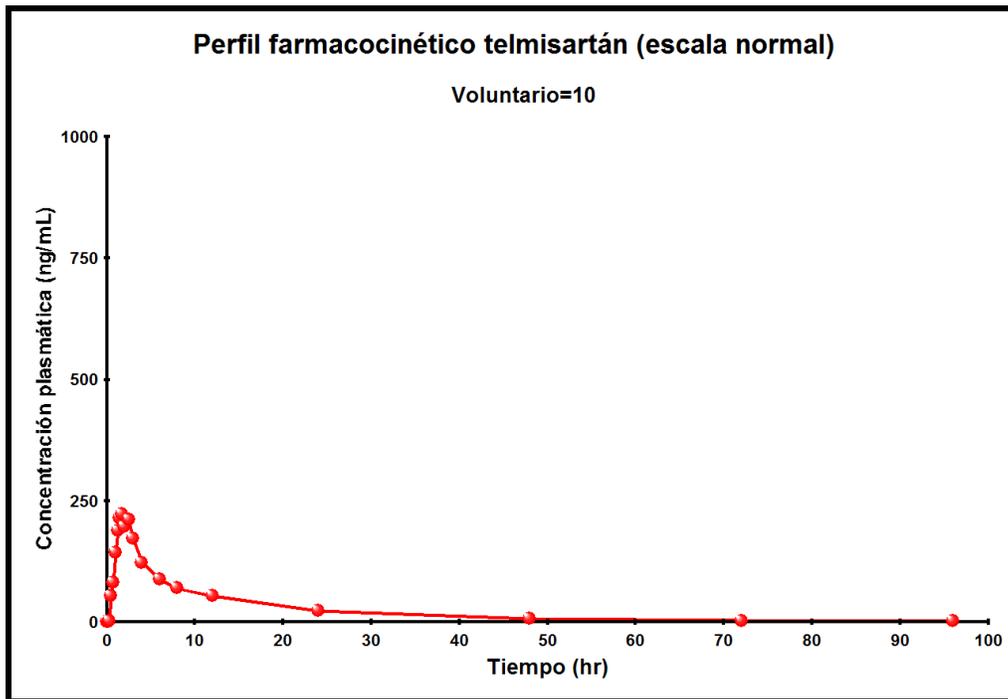
7.2 Anexo II. Muestra representativa de las concentraciones plasmáticas de telmisartán para 3 voluntarios en los diferentes tiempos de muestreo de los 56 analizados.

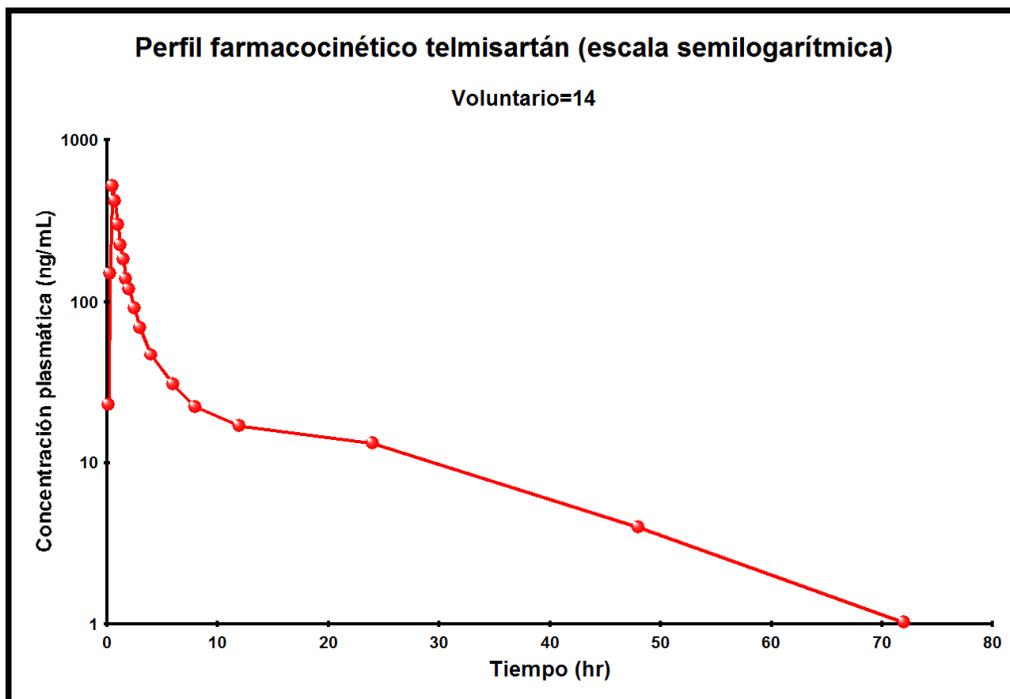
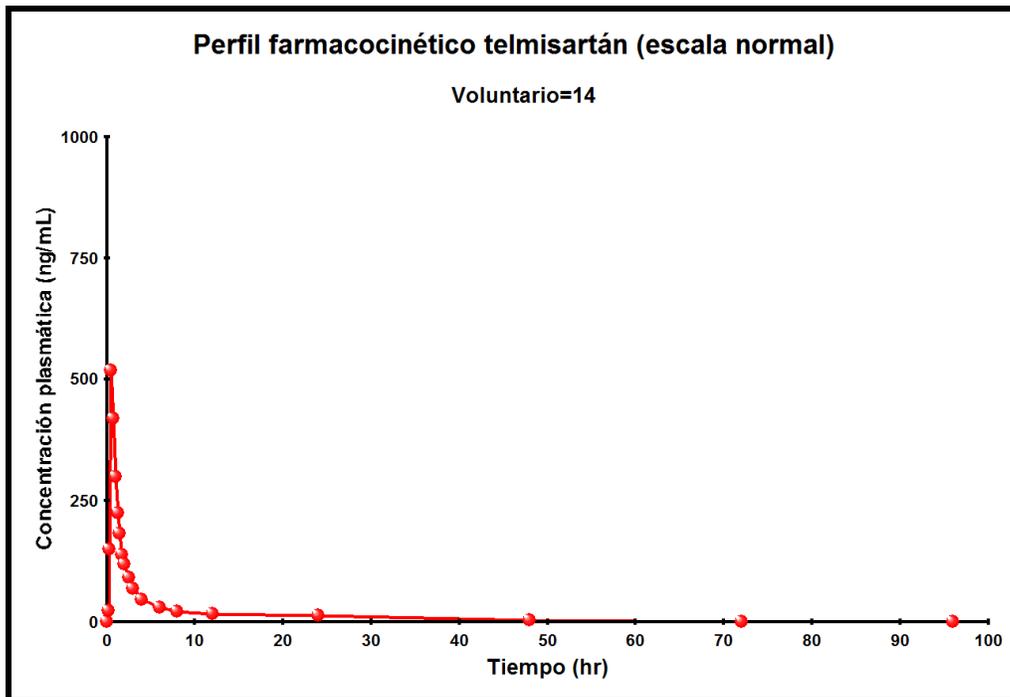
Concentración plasmática de telmisartán con respecto al tiempo (ng/mL)																				
Vol.	Tiempo Nominal (horas)																			
	0.0	0.17	0.33	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50	1.75	2.00	2.50	3.00	4.00	6.00	8.00	12.0	24.0	48.0	72.0	96.00
1	0.00	31.86	56.90	99.86	287.13	292.55	269.26	218.64	197.00	178.78	141.25	124.65	85.25	56.89	37.05	28.63	11.64	5.93	1.27	0.00
10	0.00	0.00	2.44	53.35	80.85	143.53	188.51	214.29	222.35	196.99	211.56	172.58	122.86	88.24	69.45	54.46	22.48	7.26	2.97	1.51
14	0.00	22.91	149.70	517.40	418.51	297.97	223.63	182.06	138.29	119.63	90.84	68.88	46.64	30.43	22.08	16.91	13.16	3.96	1.02	0.00
N*	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	52	53	54
Prom*	0.0	19.39	123.8	204.8	296.9	295.4	283.8	259.6	237.4	212.2	188.5	163.1	123.7	79.4	67.0	48.6	25.4	12.6	5.24	2.89
D.E.*	0.0	31.52	236.0	310.9	258.5	191.5	160.6	140.3	128.4	112.4	111.1	99.48	78.10	50.1	41.6	30.1	16.6	10.3	5.05	4.45
C.V.%	-	162.5	190.6	151.7	87.06	64.84	56.60	54.07	54.09	53.00	58.95	60.98	63.13	63.1	62.1	61.9	65.1	81.9	96.4	154.0
*		6	5	9										1	3	3	5	6	5	7

* Se consideraron los datos de los 56 voluntarios

7.3 Anexo III. Muestra representativa de las graficas en escala normal y semilogaritmica con respecto al tiempo para 3 voluntarios de 56 analizados.







7.4. Anexo IV Parámetros farmacocinéticos de telmisartán obtenidos para cada voluntario

Voluntario	Tmax (h)	Cmax (ng/mL)	ABC 0-t (h*ng/mL)	ABC 0-inf (h*ng/mL)	Ke (1/h)	Vida media de eliminación (h)	TMR 0-inf (h)
1	1.00	292.55	1535.09	1560.44	0.050	13.80	13.56
10	1.75	222.35	2220.67	2266.88	0.033	21.28	18.24
14	0.50	517.40	1273.71	1292.77	0.054	12.91	12.76

1. <http://www.boehringer-ingelheim.com.mx/index.php/centro-de-prensa/indice-de-noticias/3-destacado/254-la-evidencia-es-contundente-solo-telmisartan-esta-autorizado-por-la-emea-la-fda-y-la-cofepris-para-ofrecer-proteccion-cardiovascular.html?f=1&p=1&n=3&searchword=&i=4> <18/10/2010 11: 20 pm>
2. <http://69.20.123.154/services/bcs/results.cfm> <20/10/2010 11:30 pm >
3. <http://co.patentesonline.com/sal-sodica-cristalina-del-telmisartan-y-su-uso-como-antagonista-de-angiotensina-46348.html> <21/10/2010 9:00 pm>
4. http://www.facmed.unam.mx/bmnd/plm_2k8/src/prods/34300.htm <10/11/2010 6:20 pm>
5. http://www.cronica.com.mx/especial.php?id_tema=1146&id_nota=498018 04/01/2011 6:32 pm
6. http://www.vademecum.es/medicamentomicardis_farmacodinamica_21697_5_1 <05/01/2011 12:20 pm >
7. Adis R&D Profile, *Telmisartan BIBR 277*, Drugs R&D Vol 3, (2002) Pp250-256
8. Ben-mei Chen, et.al. *Development and validation of liquid chromatography-mass spectrometry method for determination of telmisartan in human plasma*. Analytica Chimica Acta, Vol. 540 (2005), págs 367-373.
9. Chamberlain J. *Why analyze drugs in biological fluids and special problems with biological fluids en Analysis of Drugs in Biological*. USA. CRC Press 1987. Pp. 25-35.
10. Chiara M. Meier, et. al. *Palatability of angiotensin II antagonist among nephropatic children*, British Journal of Clinical Pharmacology. Vol 63 (2006), Pp 628-631.
11. Daniel C. Harris. *Análisis químico cuantitativo, 3a edición 2004*. Pp. 693-700.
12. Emanuel O Fadiran, *Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics Reviews*, Center for Drug Evaluation and Research. 1998.
13. Enlaces Médicos Francia*Mexico *Hipertensión arterial: diagnostico y tratamiento*, Boletín trimestral, Vol.3 (2006). Pp 1-8.
14. Ficha técnica Micardis Plus, Pritor 40 mg, 2003
15. He Zhang; et. al. *Rapid determination of telmisartan in human plasma by HPLC using a monolithic column with fluorescence detection and its*

-
- application to a bioequivalence study*. Journal Chromatography B. Vol. 877 (2009), Pp.3729-3733.
- 16.** Koolman Jan, *Bioquímica: texto y atlas*, 3ª edición 2005. P. 276.
- 17.** Masamoto Miura, et. al, *Telmisartan pharmacokinetics in Japanese renal transplant recipients*. Clinica Chimica, Vol Acta 399 (2009), Pp 83-87.
- 18.** Shinji T, et al. *Population pharmacokinetics of an Angiotensin II receptor Antagonist, Telmisartan, in Healthy volunteers and Hypertensive Patients*. Drug Metab. Pharmacokin, Vol 18 (2003), Pp 203-211.
- 19.** Skoog Douglas A, et. al. *Fundamentos de química analítica*, Ed Reverte 1997, P 604.
- 20.** Tingting Yan, et.al. *Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the simultaneous quantitation of telmisartan and hydrochlorothiazide in human plasma*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol 48 (2008), Pp 1225-1229.
- 21.** Torrealday N, et.al; *Experimental design approach for de optimisation of a HPLC-fluorimetric method for the quantitation of the angiotensin II receptor antagonist telmisartan in urine*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Vol. 32 (2003), Pp. 847-857.
- 22.** Queiroz S; Collins H; *Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica*. Quim. Nova, Vol. 24, (2001), No. 1, Pp. 68-76.
- 23.** 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.
- 24.** Villareal-Rios E, et.al, *Costo de la atención de la hipertensión arterial y su impacto en el presupuesto destinado a la salud en México*. Salud pública de México, Vol. 44 (2002), Pp. 7-13.
- 25.** Wolfgang W, et.al, *A Review on Telmisartán: A novel, Long-Acting Angiotensin II-Receptor Antagonist*. Cardiovascular Drug Review, Vol- 18. (2000), págs 127 -154.
-