



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*“Desarrollo y Validación de un Método Analítico Por Cromatografía de
Líquidos de Alta Resolución (CLAR) Para la Cuantificación de Ketoprofeno en
Plasma Humano.”*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

SERGIO SOTO ROMO



CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Inés Fuentes Noriega.

VOCAL: Dra. Helgi Helene Jung Cook.

SECRETARIO: M. en C. Lauro Misael del Rivero Ramírez.

1er. SUPLENTE: M. en C. Araceli Salazar Pereyra.

2do. SUPLENTE: M. en C. María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 112 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM).

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Helgi Helene Jung Cook.

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz.

SUSTENTANTE:

Sergio Soto Romo.

LISTA DE ABREVIATURAS

λ	Longitud de onda.
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius.
%C.V.	Porcentaje de coeficiente de variación.
ABC	Área Bajo la Curva.
ACN	Acetonitrilo.
AINE	Antiinflamatorio No Esteroideo
b	Ordenada al Origen o Intercepto.
BA	Biodisponibilidad
BCS	<i>Del inglés:</i> Biopharmaceutical Classification System (Sistema de Clasificación Biofarmacéutico).
BE	Bioequivalencia
BH	Base húmeda.
C18	n-octadecilo.
C8	n-octilo.
C_{KPF}	Concentración de ketoprofeno.
$C_{\text{máx}}$	Concentración plasmática máxima.
C_{nominal}	Concentración nominal.
$C_{\text{recuperada}}$	Concentración recuperada.
CH_3COOH	Ácido Acético.
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
COX	Ciclooxigenasa.
CSG	Consejo de Salubridad General.
CYP	Citocromo P450.
D/S	Cociente Dosis/Solubilidad.
DE	Desviación estándar.
DIC	Diclofenaco sódico.
EI	Estándar Interno.
EMA	<i>Del inglés:</i> European Medicines Agency.
ER	<i>Del inglés:</i> Extended release (Liberación prolongada).
F	Prueba F de Fisher.
FDA	Food And Drug Administration.
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
FM	Fase móvil.
FR	Factor respuesta.
h	Horas.
IBP	Ibuprofeno.
IC	Intervalos de confianza.
ICH	<i>Del inglés:</i> International Council for Harmonisation.
IR	<i>Del inglés:</i> Immediate release (Liberación inmediata).
IUPAC	<i>Del inglés:</i> International Union of Pure and Applied Chemistry.

I.V.	Administración intravenosa.
K_c	Constante de distribución.
KET	Ketorolaco.
KPF	Ketoprofeno.
LD	Límite de detección.
LIC	Límite Inferior de Cuantificación.
\ln	Logaritmo Natural.
Log	Logaritmo en base 10.
Log D	Coeficiente de distribución.
Log P	Coeficiente de partición.
LSC	Límite Superior de Cuantificación.
m	Pendiente.
MC	Muestra Control.
MCA	Muestra control alta.
MCB	Muestra control baja.
MCD	Muestra control diluida.
MCM	Muestra control alta.
MeOH	Metanol.
min	Minutos.
MTBE	Metil terbutil éter.
NAP	Naproxeno sódico.
nm	Nanómetros.
NOM	Norma Oficial Mexicana.
NPC	<i>Del inglés:</i> Normal-phase chromatography (Cromatografía en fase normal).
OMS	Organización Mundial de la Salud.
Papp	Coeficiente de Permeabilidad Aparente.
PG	Prostaglandinas.
pI	Punto Isoeléctrico.
RIS	Reglamento de Insumos Para la Salud.
r	Coeficiente de correlación.
RPC	<i>Del inglés:</i> Reversed-phase chromatography (Cromatografía de fase inversa o reversa).
rpm	Revoluciones por minuto.
s^2	Varianza.
STD	Solución Estándar.
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media.
$t_{m\acute{a}x}$	Tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima después de la administración del medicamento.
TDM	Monitoreo terapéutico de fármacos.
THF	Tetrahidrofurano.
UV	Ultravioleta.
Vd	Volumen de distribución.

ÍNDICE GENERAL.

LISTA DE ABREVIATURAS	I
ÍNDICE GENERAL.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	2
2.1. Medicamentos Genéricos.....	2
2.2. Estudios In Vivo de Biodisponibilidad y Bioequivalencia en Humanos.....	2
2.2.1. Criterios Para Establecer Bioequivalencia	5
2.3. Ketoprofeno (KPF)	5
2.3.1. Propiedades Físicoquímicas	6
2.3.1.1. Solubilidad.....	6
2.3.2. Mecanismo de Acción	7
2.3.3. Indicaciones Terapéuticas y Dosis.....	9
2.3.4. Reacciones Adversas.....	9
2.3.5. Propiedades Farmacocinéticas	10
2.3.5.1. Absorción y Permeabilidad.....	10
2.3.5.2. Distribución.....	10
2.3.5.3. Metabolismo	10
2.3.5.4. Excreción.....	11
2.4. Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS)	11
2.4.1. Alta Solubilidad.....	12
2.4.2. Alta Permeabilidad	12
2.4.3. Clasificación del KPF Dentro del BCS	12
2.5. Estudios Farmacocinéticos y de Bioequivalencia de Medicamentos que Contienen KPF	13
2.5.1. Riesgos de Bioinequivalencia de Medicamentos que Contienen KPF	15
2.6. Validación de Métodos Bioanalíticos.	16
2.7. Cromatografía	20

2.7.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)	21
2.7.1.1. Tipos de Cromatografía de Líquidos	21
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo General.	23
3.2. Objetivos Particulares.	23
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	24
4.1 Reactivos, materiales, instrumentos y equipos	24
4.1.1. Reactivos	24
4.1.2. Materiales	24
4.1.3. Instrumentos y equipos	24
4.2. Desarrollo y Validación del Método Analítico	25
4.2.1. Preparación de Soluciones	25
4.2.1.1. Solución de Ácido Acético al 0.2 %, pH 3.1	25
4.2.1.2. Solución de Ácido Fosfórico (H ₃ PO ₄) 5.0 M.....	25
4.2.1.3. Fase Móvil (FM). Solución de Ácido Acético al 0.2%, pH 3.1: ACN (55:45).....	25
4.2.1.4. Preparación de la Mezcla de Matriz Biológica (Plasma Humano).....	26
4.2.2. Preparación de Soluciones Estándar y de Trabajo de KPF.....	26
4.2.2.1. Solución Estándar 1 (STD 1 de KPF). Concentración de 2000 µg/mL de KPF	26
4.2.2.2. Solución Estándar 2 (STD 2 de KPF). Concentración de 200 µg/mL de KPF	26
4.2.2.3. Solución Estándar 3 (STD 3 de KPF). Concentración de 20 µg/mL de KPF	26
4.2.2.4. Soluciones de Trabajo de KPF.....	26
4.2.3. Preparación de Soluciones Estándar y de Estándar Interno (EI) de KET	27
4.2.3.1. Solución Estándar 1 (STD 1 de KET). Concentración de 1000 µg/mL de KET	27
4.2.3.2. Solución de Estándar Interno de KET. Concentración de 200 µg/mL de KET	27
4.2.4. Solución Para la Verificación del Desempeño del Sistema	27
4.2.5. Preparación de la Curva de Calibración de KPF en Plasma	27
4.2.6. Preparación de las Muestras Control de KPF en Plasma y en Solución	28
4.2.6.1. Muestras Control en Plasma	28
4.2.6.2. Muestras Control en Solución	29

4.2.7. Desarrollo del Método Analítico	29
4.2.7.1. Selección de las Condiciones Cromatográficas para el Análisis	29
4.2.7.1.1. Selección de la Longitud de Onda de Análisis.....	29
4.2.7.1.2. Selección de la Columna Cromatográfica.....	30
4.2.7.1.3. Selección de la Fase Móvil.....	30
4.2.7.1.4. Selección del Volumen de Inyección	31
4.2.7.1.5. Selección de la Velocidad de Flujo de la FM y Tiempo de Corrida	31
4.2.7.1.6. Selección del Estándar Interno (EI)	31
4.2.7.2. Desarrollo del Método para la Extracción del KPF de las Muestras Plasmáticas ...	32
4.2.7.2.1. Selección del Volumen de Muestra de Plasma.....	33
4.2.7.2.2. Selección del Disolvente de Extracción y del Volumen a Utilizar	33
4.2.7.2.3. Selección del Agente Acidificante de la Muestra	33
4.2.7.2.4. Selección del Agente Precipitante de Proteínas	34
4.2.7.2.5. Selección del Tiempo y Tipo de Agitación	34
4.2.8. Validación del Método Analítico Desarrollado.....	34
4.2.8.1. Selectividad	34
4.2.8.2. Curva de Calibración.....	35
4.2.8.3. Límite Inferior de Cuantificación.....	38
4.2.8.4. Precisión.....	38
4.2.8.4.1. Repetibilidad.....	38
4.2.8.4.2. Reproducibilidad (Precisión Intermedia)	39
4.2.8.5. Exactitud.....	40
4.2.8.6. Estabilidad.....	40
4.2.8.6.1. Estabilidad a Corto Plazo (Mesa de Trabajo)	40
4.2.8.6.2. Estabilidad a Largo Plazo.....	41
4.2.8.6.3. Estabilidad en Ciclos de Congelación y Descongelación	41
4.2.8.6.4. Estabilidad en el Automuestreador	41
4.2.8.6.6. Estabilidad de las Soluciones Estándar	42
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44

5.1. Desarrollo del Método Analítico	44
5.1.1. Condiciones Cromatográficas Finales para el Análisis de las Muestras	44
5.1.1.1. Longitud de Onda de Análisis (λ)	44
5.1.1.2. Selección de la Columna Cromatográfica.....	44
5.1.1.3. Composición de la Fase Móvil	47
5.1.1.4. Volumen de Inyección de la Muestra	47
5.1.1.5. Velocidad de Flujo de la FM y Tiempo de Corrida.....	47
5.1.1.6. Estándar Interno (EI)	48
5.1.1.7. Condiciones Cromatográficas Finales	50
5.1.2. Desarrollo del Método para la Extracción del KPF de las Muestras Plasmáticas	50
5.1.2.1. Volumen de Muestra de Plasma	50
5.1.2.2. Disolvente de Extracción y Volumen a Utilizar.....	51
5.1.2.3. Agente Acidificante de la Muestra.....	51
5.1.2.4. Agente Precipitante de Proteínas Plasmáticas	52
5.1.2.5. Tiempo y Tipo de Agitación.....	52
5.1.2.6. Procedimiento Final para la Extracción del KPF del Plasma Humano.	53
5.2. Validación del Método Analítico	56
5.2.1. Selectividad	56
5.2.2. Curva de Calibración	57
5.2.3. Límite Inferior de Cuantificación.....	61
5.2.4. Precisión y Exactitud	62
5.2.6. Estabilidad	63
5.2.6.1. Estabilidad en la Matriz Biológica	63
5.2.6.2. Estabilidad de la Muestra Procesada.....	65
5.2.6.3. Estabilidad de las Soluciones Estándar	66
6. CONCLUSIONES	67
7. PERSPECTIVAS.....	68
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
Tabla 1.	<i>Métodos de Evaluación de BA y BE.</i>	4
Tabla 2.	<i>Parámetros farmacocinéticos reportados por Hassanzadeh M. K., 1997.</i>	14
Tabla 3.	<i>Parámetros farmacocinéticos reportados por Baldo M.N., et al, 2015.</i>	15
Tabla 4.	<i>Comparación entre los requisitos y criterios de validación establecidos en la NOM-177-SSA1-2013 y en el borrador de Guía de la FDA del 2013.</i>	17
Tabla 5.	<i>Preparación de las Soluciones de Trabajo de KPF en MeOH.</i>	27
Tabla 6.	<i>Preparación de la Curva de Calibración de KPF en Plasma.</i>	28
Tabla 7.	<i>Preparación de las Muestras Control de KPF en Plasma.</i>	28
Tabla 8.	<i>Preparación de las Muestras Control de KPF en Solución.</i>	29
Tabla 9.	<i>Fases Móvil Evaluadas.</i>	30
Tabla 10.	<i>Características fisicoquímicas de los fármacos evaluados para su uso como EI.</i>	31
Tabla 11.	<i>Agentes Precipitantes de Proteínas Evaluados.</i>	34
Tabla 12.	<i>Tipo y Tiempos de Agitación Evaluados.</i>	34
Tabla 13.	<i>Columnas Cromatográficas Evaluadas.</i>	45
Tabla 14.	<i>Resultados de los fármacos evaluados para su uso como posibles Estándar Interno (EI).</i>	49
Tabla 15.	<i>Respuesta Analítica de las Muestras Blanco de Plasma Analizadas.</i>	56
Tabla 16.	<i>Prueba de homogeneidad de las varianzas para la selección del modelo de ajuste de la curva de calibración (Prueba de F).</i>	59
Tabla 17.	<i>Pendiente, intercepto y coeficiente de correlación de las Curvas de Calibración evaluadas.</i>	61
Tabla 18.	<i>% de desviación para cada nivel de concentración de las Curvas de Calibración evaluadas.</i>	61
Tabla 19.	<i>Evaluación de la Precisión y Exactitud en la Cuantificación del LIC.</i>	62
Tabla 20.	<i>Repetibilidad del Método Analítico.</i>	62
Tabla 21.	<i>Reproducibilidad o Precisión Intermedia del Método Analítico.</i>	63
Tabla 22.	<i>Exactitud del Método Analítico.</i>	63
Tabla 23.	<i>Resultados de la Estabilidad a Corto Plazo (6 h en la mesa de trabajo).</i>	64
Tabla 24.	<i>Resultados de la Estabilidad a Largo Plazo (1 mes a -20° C).</i>	64
Tabla 25.	<i>Resultados de la Estabilidad de 3 Ciclos de Congelación y Descongelación.</i>	64
Tabla 26.	<i>Resultados de la Estabilidad de las Muestras Procesadas en el Automuestreador.</i>	65
Tabla 27.	<i>Resumen de la estabilidad del KPF en la matriz biológica y en la muestra procesada.</i>	65
Tabla 28.	<i>Resultados de la Estabilidad de las Soluciones Estándar.</i>	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1.	<i>Estructura química del Ketoprofeno (KPF).</i>	5
Figura 2.	<i>Cascada biosintética derivada del Ácido Araquidónico y mecanismo de acción del KPF.</i>	8
Figura 3.	<i>Estructura química del metabolito de KPF (Glucurónido).</i>	11
Figura 4.	<i>Concentraciones plasmáticas promedio alcanzadas después de la administración de una dosis única de 200 mg de KPF a 24 voluntarios sanos. (Baldo M.N., 2015)</i>	15
Figura 5.	<i>Espectro de absorción del KPF en MeOH y en FM en el Rango del UV (190 - 400 nm.).</i>	44
Figura 6.	<i>Cromatograma del KPF en solución, analizado en la columna Zorbax SB-C18.</i>	45
Figura 7.	<i>Cromatograma del KPF en solución, analizado en la columna Gemini C18.</i>	45
Figura 8.	<i>Cromatograma del KPF en solución, analizado en la columna Zorbax Eclipse XDB-C18.</i>	45
Figura 9.	<i>Cromatograma del KPF en solución, analizado en la columna NOVA PAK C18.</i>	45
Figura 10.	<i>Cromatograma correspondiente a una muestra de KPF en plasma (5.0 µg/mL), analizada en la columna Zorbax Eclipse XDB-C18.</i>	46
Figura 11.	<i>Cromatograma correspondiente a una muestra de KPF en plasma (5.0 µg/mL), analizada en la columna NOVA PAK-C18.</i>	46
Figura 12.	<i>Cromatograma correspondiente al KPF y DIC en solución.</i>	48
Figura 13.	<i>Cromatograma correspondiente al KPF y KET en solución.</i>	48
Figura 14.	<i>Cromatograma correspondiente al KPF e IBP en solución.</i>	48
Figura 15.	<i>Cromatograma correspondiente al KPF y NAP en solución.</i>	48
Figura 16.	<i>Estructura química del Ketorolaco (KET), fármaco seleccionado como EI.</i>	49
Figura 17.	<i>Estructura química ionizada del KPF.</i>	54
Figura 18.	<i>Estructura química no ionizada del KPF.</i>	54
Figura 19.	<i>Cromatograma correspondiente a la MCB de KPF en plasma sometida a las condiciones finales de extracción y analizada por CLAR bajo las condiciones cromatográficas finales.</i>	55
Figura 20.	<i>Cromatograma correspondiente a la MCM de KPF en plasma sometida a las condiciones finales de extracción y analizada por CLAR bajo las condiciones cromatográficas finales.</i>	55
Figura 21.	<i>Cromatograma correspondiente a la MCA de KPF en plasma sometida a las condiciones finales de extracción y analizada por CLAR bajo las condiciones cromatográficas finales.</i>	56
Figura 22.	<i>Cromatograma típico correspondiente a una muestra blanco de plasma.</i>	57
Figura 23.	<i>Cromatograma típico correspondiente a una concentración de 0.5 µg/mL de KPF.</i>	57
Figura 24.	<i>Gráfico de Respuesta Promedio contra Concentración de KPF en plasma (n = 3).</i>	58
Figura 25.	<i>Gráfico de los Residuales para evaluar el ajuste de los datos al modelo de regresión lineal.</i>	59
Figura 26.	<i>Gráfico de los Residuales para evaluar el ajuste de los datos al modelo de regresión Ln-Ln.</i>	60
Figura 27.	<i>Curva de Calibración Promedio de KPF en Plasma (n = 3).</i>	60



1. INTRODUCCIÓN

El Ketoprofeno (KPF) es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que también presenta actividad analgésica y antipirética. Este fármaco es ampliamente utilizado para tratar trastornos músculo-esqueléticos, articulares y para el alivio de dolor post-operatorio leve a moderado. En la edición 2014 del Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos, emitido por el Consejo de Salubridad General (CSG), el KPF forma parte del cuadro básico para la atención de primer nivel del Grupo No. 21: Reumatología y Traumatología.

Debido a que los medicamentos que contienen KPF son ampliamente utilizados en la terapéutica, y a que en México existen medicamentos genéricos conteniendo este fármaco, el Acuerdo que determina el tipo de prueba para demostrar intercambiabilidad, emitido por el CSG, indica que la prueba para las cápsulas que contienen 100 mg de KPF es la "C" que es un estudio de Bioequivalencia en humanos. Esto se debe a que de acuerdo al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS), el KPF es un ácido débil que se clasifica dentro de los fármacos de Clase II, es decir, alta permeabilidad intestinal y baja solubilidad acuosa, por lo cual el paso limitante en la absorción de este fármaco será la disolución.

Un estudio de bioequivalencia es un estudio in vivo realizado en humanos en el cual se compara la biodisponibilidad de un medicamento genérico contra un medicamento de referencia después de ser administrados bajo condiciones similares. En este tipo de estudios se requiere cuantificar el fármaco en sangre, suero, plasma o bien en orina para determinar los parámetros farmacocinéticos indicadores de bioequivalencia. Para los estudios en los cuales el fármaco se cuantifica en sangre, plasma o suero, estos parámetros son: la concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) y el Área bajo la curva (ABC).

Tomando como base la importancia de contar con métodos analíticos para cuantificar fármacos en fluidos biológicos para estudios de bioequivalencia, en el presente trabajo se desarrolló un método analítico para la cuantificación de KPF en muestras de plasma humano, utilizando la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) en fase reversa con detección UV.



2. MARCO TEÓRICO

2.1. Medicamentos Genéricos

Los estudios de Biodisponibilidad y Bioequivalencia son importantes en el proceso de aprobación de un producto farmacéutico para su comercialización.(Shargel, 2016). En el desarrollo de un medicamento genérico, el estudio de bioequivalencia tiene como propósito demostrar la semejanza en el comportamiento in vivo y en la calidad farmacéutica entre este producto y el medicamento de referencia y con ello evitar que estos productos, provenientes de fuentes múltiples, realicen estudios preclínicos o clínicos de eficacia y seguridad, que ya fueron documentados por el medicamento innovador.(EMA, 2010; Shargel, 2016).

El Reglamento de Insumos para la Salud (RIS) define un medicamento genérico como a la especialidad farmacéutica que contiene el mismo fármaco o sustancia activa y la misma forma farmacéutica, con igual concentración o potencia, que se administra por la misma vía de administración y al cual mediante las pruebas reglamentarias, ha comprobado que sus especificaciones farmacopéicas, perfiles de disolución o su biodisponibilidad y otros parámetros, según sea el caso, son equivalentes a las del medicamento de referencia. (Salud, 1998).

De igual manera, define un medicamento de referencia, como aquél medicamento indicado por la Secretaría de Salud como tal, que cuenta con el registro de dicha dependencia, que se encuentra disponible comercialmente y el cual es seleccionado conforme a los criterios establecidos en las Normas.(Salud, 1998).

2.2. Estudios In Vivo de Biodisponibilidad y Bioequivalencia en Humanos

Dos medicamentos son equivalentes farmacéuticos si contienen el mismo principio activo, en la misma cantidad y en la misma forma farmacéutica, si cumplen con las mismas especificaciones o estándares de calidad y si se administran por la misma vía. Sin embargo, estos productos pueden diferir en sus excipientes, aditivos y/o proceso de fabricación, siendo estas últimas variables las que pueden dar lugar a diferencias en el desempeño in vivo del producto.(WHO, 2006).



La evaluación del desempeño in vivo de un medicamento es de gran importancia debido a que la biodisponibilidad está relacionada tanto a la respuesta farmacodinámica como a los efectos adversos. El desempeño in vivo de un medicamento puede definirse como el proceso que implica la liberación del fármaco desde su forma de dosificación, seguido de su biodisponibilidad y su asociación a una respuesta farmacodinámica. La biodisponibilidad y la bioequivalencia pueden ser consideradas como medidas del desempeño in vivo de un medicamento (Shargel, 2016).

La Biodisponibilidad es definida por la FDA como el grado y la velocidad a la cual un principio activo contenido en un medicamento es absorbido y se encuentra disponible en el sitio de acción. Esta definición se enfoca en el proceso por el cual el principio activo es liberado de la forma de dosificación oral y es distribuido hacia el sitio de acción.(FDA, 2014).

Desde el punto de vista farmacocinético, los datos de Biodisponibilidad Absoluta de una formulación ayudan a estimar la fracción relativa, de la dosis oral administrada, que es absorbida y pasa a la circulación sistémica cuando se compara con una administración intravenosa.(FDA, 2014).

La Biodisponibilidad Absoluta compara la biodisponibilidad de la sustancia activa en la circulación sistémica después de una administración extravascular con la biodisponibilidad del mismo fármaco después de una administración intravenosa. La administración intravenosa del fármaco considera un 100% de absorción. (Shargel, 2016).

Otro tipo de estudio comparativo de la biodisponibilidad es el de Biodisponibilidad Relativa, en el cual se realiza la comparación de la biodisponibilidad de productos administrados por la vía extravascular (alternativas farmacéuticas). Estos son útiles para seleccionar la forma farmacéutica o la formulación más adecuada. (Shargel, 2016).

Dos medicamentos son alternativas farmacéuticas si contienen el mismo principio activo y en la misma cantidad molar, pero difieren en su forma farmacéutica y/o en la forma química del principio activo, es decir, en la sal o el éster. Ambos medicamentos son administrados por la misma vía y liberan el mismo principio activo.(WHO., 2006).

La FDA define a la BE como la ausencia de diferencias significativas en el grado y velocidad a la cual un principio activo, contenido en equivalentes farmacéuticos o



alternativas farmacéuticas, se encontrará disponible en el sitio de acción del fármaco cuando éste es administrado a la misma dosis molar y bajo condiciones similares en un estudio in vivo diseñado de forma adecuada. (FDA, 2014).

La BE es un criterio esencial para los medicamentos genéricos así como para el innovador. Para los medicamentos innovadores, la BE se utiliza para establecer la equivalencia terapéutica entre el producto farmacéutico comercializado y el que fue sometido o utilizado durante los estudios clínicos para la evaluación de su eficacia y seguridad. (Amidon, 2011). En caso de que el producto innovador sea sometido a cambios posteriores a su aprobación, en cuanto a su formulación, proceso de fabricación o un aumento de dosis, será necesario evaluar su bioequivalencia. (Amidon, 2011).

Los estudios de bioequivalencia (BE) se llevan a cabo con el fin de asegurar que los pacientes adquieran equivalentes farmacéuticos que sean intercambiables terapéuticamente y eficaces. (Amidon, 2011).

Para evaluar la Biodisponibilidad y la Bioequivalencia existen métodos directos e indirectos. El diseño dependerá de los objetivos del mismo, de la capacidad para analizar el fármaco y/o sus metabolitos en un fluido biológico, de la farmacodinamia del fármaco, su vía de administración y la naturaleza del medicamento. Algunos de los métodos empleados para la evaluación de la BA y la BE se presentan en la **Tabla 1**. (Shargel, 2016).

Tabla 1. Métodos de Evaluación de BA y BE.

Método de Evaluación.	Forma de Evaluar la BA o BE.
Estudios Farmacocinéticos.	*Cuantificación de las concentraciones plasmáticas del fármaco. *Excreción urinaria del fármaco.
Estudios Farmacodinámicos.	Evalúan el efecto farmacológico (farmacodinámico) en función del tiempo.
Observaciones Clínicas.	Ensayos clínicos en humanos, altamente controlados, que establecen la eficacia y la seguridad de los medicamentos. Método menos exacto, sensible, reproducible para determinar la BA in vivo.
Estudios in vitro.	Estudios de perfiles de disolución que bajo ciertas condiciones pueden ser indicativos de la BA del fármaco.



Esta comparación del desempeño de medicamentos genéricos, administrados por vía oral, se realiza generalmente mediante un estudio in vivo de BE en voluntarios sanos adultos, los cuales son sometidos bajo condiciones definidas de alimentación y/o ayuno. Estos estudios comparativos también pueden incluir estudios in vitro mediante la comparación de los perfiles de liberación/disolución de los fármacos.(Shargel, 2016)

Tanto la BE y la BA se centran en la liberación del fármaco de un medicamento y su subsecuente absorción en la circulación sistémica.(FDA, 2014)

2.2.1. Criterios Para Establecer Bioequivalencia

Los parámetros farmacocinéticos para establecer la bioequivalencia son la concentración plasmática máxima ($C_{m\acute{a}x}$) como indicativo de la velocidad de absorción y el Área bajo la curva (ABC) como indicativo de la cantidad absorbida. (Salud, 2013)

El criterio para dictaminar BE en estudios farmacocinéticos, son los intervalos de confianza (IC) al 90% de las medias geométricas o promedios de los cocientes (Prueba/Referencia) de los parámetros $C_{m\acute{a}x}$ y ABC de acuerdo al diseño, los cuales se deben encontrar entre 80% y 125%.(Salud, 2013)

2.3. Ketoprofeno (KPF)

El ácido (R, S)-2-[3-benzoilfenil] propanóico, comúnmente denominado Ketoprofeno (KPF), forma parte del grupo de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE's), también se clasifica químicamente como un derivado del ácido 2-arilpropiónico. (a - Reval et al., 2004; Miles., 2007).

Éste fármaco antiinflamatorio tipo Ibuprofeno y Naproxeno también presenta actividad analgésica y ejerce efectos antipiréticos. (Baldo M.N., 2015).

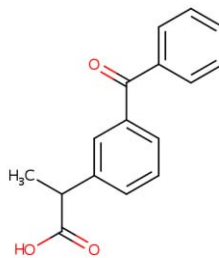


Figura 1. Estructura química del Ketoprofeno (KPF).



2.3.1. Propiedades Fisicoquímicas

- **Fórmula química:** $C_{16}H_{14}O_3$.
- **Masa Molar:** 254.284 g/mol.
- **Apariencia:** Polvo fino o granulado blanco o grisáceo, inodoro y no higroscópico.(Amidon, 2011)
- **Punto de fusión:** 94-95° C.
- **pKa experimental:** 4.45 a 25° C, presenta propiedades de ácido débil las cuales están asociadas al grupo funcional carboxilo presente en su estructura.
- **Coefficiente de Distribución (Log D):** El Log D del KPF reportado en n-octanol/buffer acuoso es de 0.1 a pH 7.4 y de 1.31 a pH de 6.5.
- **Coefficiente de Partición (Log P) experimental y C log P:** Son de 3.2 y 2.76, respectivamente. Sus valores de Log P y C Log P son mayores a los correspondientes al fármaco marcador de alta permeabilidad, el metoprolol, para el cual dichos valores son de 1.72 y 1.35, respectivamente.(Shohin et al., 2012)
- No existen datos con respecto a su estabilidad en fluidos gástrico e intestinal humano; sin embargo, su alto grado de absorción en humanos sugiere que el fármaco es estable en el tracto gastrointestinal.

Debido a que presenta un carbono asimétrico, existen dos enantiómeros, ambos poseen actividad biológica. La mayoría de los medicamentos contienen la mezcla racémica; sin embargo, existen formulaciones que contienen una sal del (S)-(+)-ketoprofeno, conocido como desketoprofeno, que son utilizadas para reducir la inflamación y el dolor. El enantiómero (R)-(-) es utilizado como aditivo en pastas dentales para prevenir la enfermedad periodontal.

En voluntarios sanos el (R)-ketoprofeno sufre inversión en un pequeño grado, entre el 10-15% de la dosis administrada, al (S)-ketoprofeno. Esto implica una bioactivación ya que el (S)-ketoprofeno es el principal responsable de la actividad antiinflamatoria vía la inhibición de la COX. (Grubb, 1996)

2.3.1.1. Solubilidad

Solubilidad en agua pura: 0.010 mg/mL a temperatura ambiente (22-24° C).

Muy soluble en disolventes orgánicos tales como el etanol, cloroformo, acetona, éter y benceno., al igual que en soluciones fuertemente alcalinas.



Debido a que el KPF es un ácido débil, este se puede encontrar en su forma ionizada dentro del rango de pH del tracto gastrointestinal. Así, su solubilidad aumenta conforme se incrementa el valor del pH del medio. Por ejemplo, a pH 6.8 su solubilidad es aproximadamente de 40.76 mg/mL. (Shohin et al., 2011)

El cociente Dosis/Solubilidad (D/S) del KPF para la dosis de 100 mg, oscila entre 700 y 350 mL a pH's bajos (1.2 - 4.0), excediendo el criterio de los 250 mL para ser clasificado como un fármaco de alta solubilidad, por lo que de acuerdo a las guías del Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS) de la FDA, la EMA y la OMS, el KPF sería clasificado como un fármaco de baja solubilidad. Sin embargo, a partir de pH 6.5, dicha dosis se disuelve en 250 mL lo que llevaría a pensar que a ese pH se comportaría como un fármaco "altamente soluble"(Shohin et al., 2011)

Tomando en cuenta lo anterior, el KPF es un fármaco de baja solubilidad conforme a lo establecido en la Guía de la OMS. (Shohin et al., 2011)

2.3.2. Mecanismo de Acción

El efecto antiinflamatorio del KPF se lleva a cabo principalmente mediante la inhibición no selectiva y reversible de las enzimas ciclooxigenasa 1 y 2 (COX-1 y COX-2), lo cual produce una disminución en la síntesis de prostaglandinas (PG) pro-inflamatorias y de precursores a tromboxanos. (Baldo M.N., 2015)

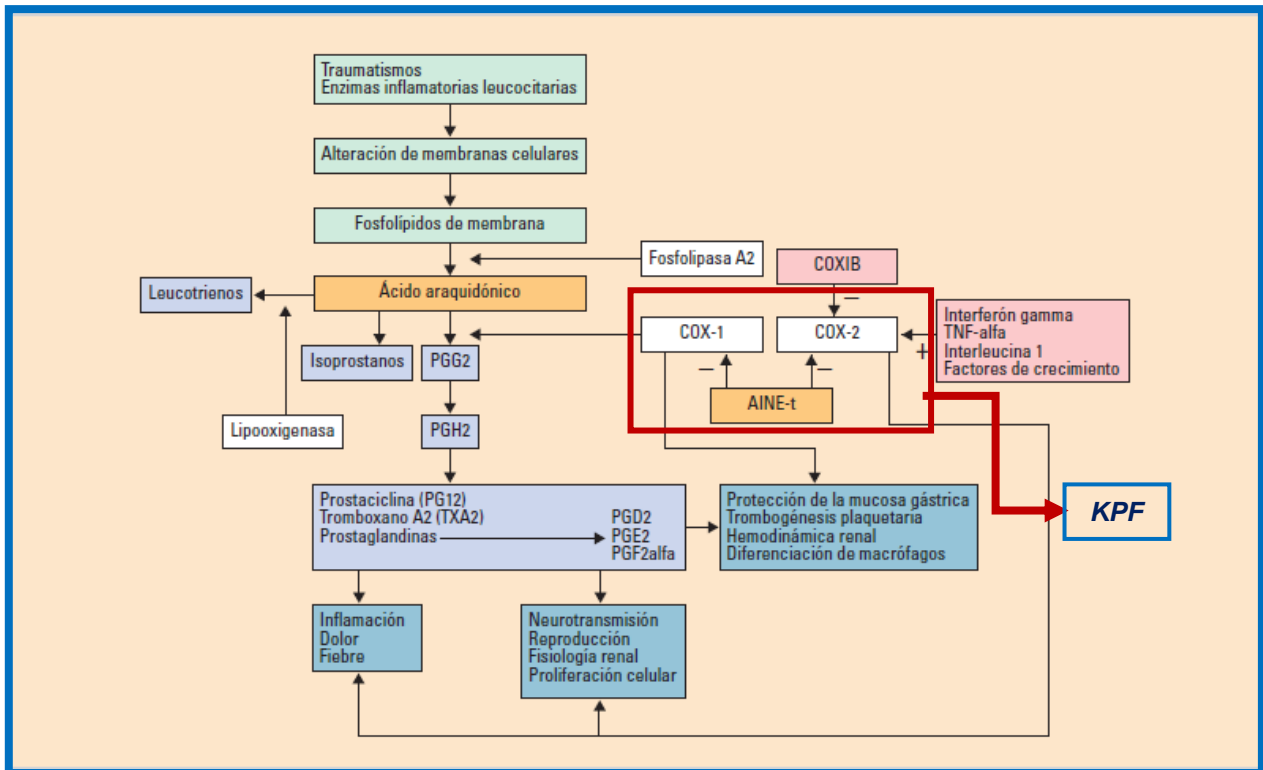


Figura 2. Cascada biosintética derivada del Ácido Araquidónico y mecanismo de acción del KPF.

Modificado de (Garrido et al., 2011).

La COX existe en al menos dos isoformas diferentes: la COX-1, la cual se expresa de forma constitutiva, por lo que siempre se encuentra presente en muchas células bajo condiciones fisiológicas, mientras que la COX-2 es inducida principalmente en respuesta a estímulos inflamatorios. (Levoin et al., 2004) Dichos estímulos inflamatorios generan una alteración en la membrana de las células. Como respuesta al estímulo, la fosfolipasa A_2 actúa sobre los fosfolípidos de membrana y libera ácido araquidónico (AA) precursor de los eicosanoides que participan en los mecanismos de inflamación, dolor y fiebre. (Garrido et al., 2011).

En los últimos años, se ha pensado que la inhibición de la isoforma inducible de la enzima (COX-2) es la responsable de las propiedades benéficas de los AINE's, mientras que el bloqueo de las funciones de la forma constitutiva está implicado en sus reacciones adversas a nivel gastrointestinal. (Levoin et al., 2004).

Muchos de sus efectos clínicos son atribuidos al (S)-(+)-ketoprofeno, como un inhibidor altamente estereoselectivo de la COX in vitro; mientras que el (R)-(-)-ketoprofeno a pesar



de ser un inhibidor pobre de la COX, presenta una actividad analgésica significativa lo cual sugiere que este AINE actúa mediante ambas vías, los mecanismos COX-dependiente y COX-independiente.(Levoín et al., 2004).

2.3.3. Indicaciones Terapéuticas y Dosis

Se utiliza para tratar trastornos músculo-esqueléticos y articulares tales como la espondilitis anquilosante, la artritis reumatoide, la osteoartritis y trastornos peri-articulares como la bursitis o la tendinitis. También es empleado para tratar dismenorrea, para el alivio de dolor leve a moderado post-operatorio y en condiciones inflamatorias y dolorosas tales como la gota aguda o en trastornos de tejidos blandos, así como para tratar la fiebre. (Sweetman, S., 2003).

La dosis única más alta recomendada para formulaciones orales conteniendo ketoprofeno de liberación inmediata (IR) es de 100 mg, para formulaciones de liberación prolongada (ER) es de 200 mg. Dependiendo de la indicación terapéutica, el régimen de dosificación puede variar desde 12.5 mg cada 4 a 6 h (dosis utilizada para tratar la fiebre en adultos) hasta los 100 mg cada 8 h, con una dosis máxima de 300 mg por día.

2.3.4. Reacciones Adversas

Sus reacciones adversas son similares a las de otros AINE's, siendo las más comunes el rash cutáneo, zumbido en los oídos, dolor de cabeza, mareo, somnolencia, dolor abdominal, náuseas, diarrea y constipación.

El KPF es uno de los AINE's más ulcerogénicos y es un factor de riesgo de serias complicaciones gastrointestinales. La información para prescribir sugiere que el KPF sea administrado con alimentos para minimizar sus reacciones adversas sobre el sistema gastrointestinal ya que la biodisponibilidad total en términos de ABC no se ve alterada, aunque la velocidad de absorción en formulaciones de liberación inmediata si se ve disminuida. (Shohin et al., 2012)



2.3.5. Propiedades Farmacocinéticas

2.3.5.1. Absorción y Permeabilidad

La biodisponibilidad absoluta de KPF después de la administración oral de cápsulas de 100 mg de KPF contra la administración intravenosa (I.V.) es en promedio del 92.0%, lo cual corresponde a la fracción de dosis absorbida. (Shohin et al., 2012).

El KPF, al igual que otros fármacos, es absorbido principalmente por el intestino delgado. La $C_{m\acute{a}x}$ se alcanza entre 1-2 horas ($t_{m\acute{a}x}$) después de la administración de una dosis única.

La absorción casi completa del KPF está sustentada por estudios de permeabilidad in vivo, in situ e in vitro. Su permeabilidad, estudiada por perfusión intestinal en humanos ($P_{eff\ in\ vivo}$), es de $8.4 \pm 3.3 \times 10^{-4}$ cm/s, la cual es significativamente más rápida que la del fármaco marcador de alta permeabilidad, el metoprolol, para el cual su valor de $P_{eff\ in\ vivo}$ es de 1.34×10^{-4} cm/s. (Shohin et al., 2012). En estudios in vitro realizados en cultivos celulares de Caco-2 el KPF presenta un P_{app} de 40.6×10^{-4} cm/s y la $P_{eff\ in\ situ}$ obtenida por perfusión intestinal en ratas es de 1.9×10^{-4} cm/s. (Sheng et al., 2006).

La Guía de Exención de Estudios In Vivo de Biodisponibilidad y Bioequivalencia basado en el BCS de la FDA, clasifica al KPF dentro del grupo de los fármacos altamente permeables, tomando como criterio que la fracción de dosis absorbida es mayor o igual al 85.0%.

2.3.5.2. Distribución

El KPF presenta más del 99.0% de unión a proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina. Su volumen de distribución (Vd) puede variar entre los 7 y los 14 L (acerca de 0.1-0.2 L/Kg). (Shohin et al., 2012).

2.3.5.3. Metabolismo

Al igual que otros AINE's derivados del ácido 2-arilpropiónico, el KPF es metabolizado principalmente por la conjugación con glucurónido por la enzima UDP-glucuroniltransferasa (UGT) mayoritariamente en el hígado, formando un acil glucurónido inestable. (Levoin et al., 2004).

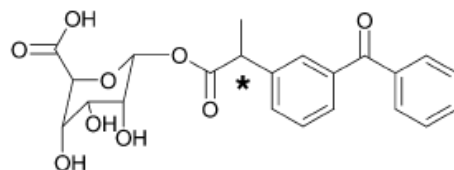


Figura 3. Estructura química del metabolito de KPF (Glucurónido).

También puede sufrir hidroxilación en el anillo de benzoilo vía la CYP3A4 y CYP2C9. No se conocen metabolitos activos del ketoprofeno, ni tampoco se ha mostrado que presenta inducción de enzimas implicadas en el metabolismo de otros fármacos. (Shohin et al., 2012).

2.3.5.4. Excreción

Menos del 1.0% de la dosis administrada es excretada inalterada en la orina, mientras que el metabolito conjugado con glucurónido representa cerca del 65% al 75% del fármaco excretado por orina. (Shohin et al., 2012).

La vida media de eliminación ($t_{1/2}$) reportada para el KPF es de 2.05 ± 0.58 h. (Shohin et al., 2012).

2.4. Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS)

El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico es un marco de referencia científico para la clasificación de sustancias farmacológicas, el cual se basa en su solubilidad acuosa y en su permeabilidad intestinal. Con base en lo anterior, este sistema clasifica a los fármacos dentro de una de las cuatro clases siguientes (WHO., 2006):

<u>Clase I</u> Alta Permeabilidad Alta Solubilidad	<u>Clase II</u> Alta Permeabilidad Baja Solubilidad
<u>Clase III</u> Baja Permeabilidad Alta Solubilidad	<u>Clase IV</u> Baja Permeabilidad Baja Solubilidad

Diagrama 1. Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS).



Cuando se toma en cuenta la disolución del producto farmacéutico o medicamento, sumado a las dos propiedades antes mencionadas, el BCS toma en cuenta los tres principales factores que rigen el grado y la velocidad de absorción de un fármaco contenido en una forma farmacéutica sólida de dosificación oral y de liberación inmediata (IR): la disolución, la solubilidad acuosa y la permeabilidad intestinal. Con base en sus propiedades de disolución, las formas farmacéuticas de liberación inmediata pueden ser clasificadas como de muy rápida disolución, de rápida disolución o de no rápida disolución. (WHO., 2006).

2.4.1. Alta Solubilidad

Un fármaco se considera altamente soluble cuando la dosis más alta recomendada por la OMS o cuando la dosis más alta disponible comercialmente, en formas farmacéuticas sólidas orales, es soluble en 250 mL o menos de medio acuoso en un rango de pH de 1.2-6.8., el perfil de solubilidad con respecto al pH debe determinarse en el medio acuoso a $37 \pm 1^\circ\text{C}$. (OMS).

2.4.2. Alta Permeabilidad

Un fármaco es considerado altamente permeable cuando la cantidad de fármaco absorbida en el humano es mayor o igual al 85.0% con respecto a la dosis administrada basándose en un balance de masa (con evidencia de la estabilidad del fármaco en el tracto gastrointestinal) o con la comparación de la administración de dosis comparables por vía intravenosa. (FDA, 2015).

La medición de esta propiedad de los fármacos, se basa indirectamente en el grado o cantidad de fármaco absorbida en el humano, es decir, la fracción de dosis que es absorbida y directamente en la medición de la velocidad de transferencia de masa a través de la membrana intestinal en el humano. Como alternativa, se pueden utilizar otros sistemas que permitan predecir la cantidad de fármaco que se absorbe en el humano como el uso de modelos animales in situ o de métodos in vitro con cultivos de células epiteliales. (FDA., 2015).

2.4.3. Clasificación del KPF Dentro del BCS

La OMS no ha clasificado al KPF dentro del BCS, sin embargo, tomando en cuenta sus características antes descritas de baja solubilidad y alta permeabilidad intestinal, así como



los criterios de la guía de la OMS, este fármaco sería agrupado dentro de los Clase II. Dichos fármacos, serán absorbidos por completo, siempre y cuando se encuentren en solución. Algunos autores como *Yazdani M., et al* lo han clasificado como un fármaco de Clase I, esto basándose solamente en la alta solubilidad del KPF a pH 7.4.

La solubilidad es uno de los parámetros clave utilizado dentro del BCS, y junto con el grado de disolución, es uno de los principales factores que regulan la velocidad y el grado de absorción de un fármaco. La solubilización de un fármaco in vivo y su disolución son procesos muy complejos debido a que existen un gran número de factores fisiológicos, principalmente dentro del tracto gastrointestinal, tales como la motilidad intestinal, el pH, la presencia de sales biliares, la capacidad amortiguadora, la fuerza iónica, la ingesta de alimentos y la viscosidad que van a influir en su realización. El pH y el efecto surfactante son los principales determinantes fisicoquímicos de la disolución del fármaco, estos se ven reflejados en los cambios de pH y en la presencia de las sales biliares, ambos factores son de gran importancia cuando consideramos un fármaco ionizable, principalmente aquellos que tienen un valor de pKa incluido dentro del intervalo de pH del tracto gastrointestinal.(Sheng et al., 2006).

El Acuerdo que determina el tipo de prueba para demostrar intercambiabilidad de medicamentos genéricos, emitido por el CSG, indica que la prueba que le corresponde a las cápsulas que contienen 100 mg de KPF es la “C” que es un estudio de Bioequivalencia en humanos. ("Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos," 2014).

2.5. Estudios Farmacocinéticos y de Bioequivalencia de Medicamentos que Contienen KPF

En el estudio farmacocinético realizado por *Hassanzadeh M.K., et al*, en el que a seis varones sanos se les administró una dosis única de 100 mg de KPF contenida en dos cápsulas de gelatina dura de liberación inmediata, la administración de la dosis se realizó con 100 mL de agua. (Hassanzadeh M. K. et al., 1997).

En el estudio, se encontró que la absorción del fármaco es muy rápida, alcanzándose el pico de concentración plasmática entre las 1.35 y 2.35 horas después de la administración. Sin embargo, se observó que la vida media de eliminación fue rápida con un valor promedio de 1.33 h. Lo cual requiere de un aumento en la frecuencia de



administración para mantener los niveles terapéuticos y en una mayor posibilidad de que el paciente presente alguna reacción adversa. (Hassanzadeh M. K. et al, 1997) La reacción adversa que se presenta con mayor frecuencia con el uso de este fármaco, al igual que con otros AINE's, está relacionada con el daño al tracto gastrointestinal, ocasionando inflamación, sangrado, ulceración y en algunos casos de mayor gravedad perforación del estómago, del intestino delgado o del intestino grueso. Estas reacciones adversas son una consecuencia de sus propias acciones farmacológicas ya que actúa de forma local alterando la integridad celular de la mucosa gástrica y a nivel sistémico reduciendo el nivel de PG que protegen la mucosa gástrica. (Garrido et al., 2011).

Tabla 2. Parámetros farmacocinéticos reportados por Hassanzadeh M. K., 1997.

Parámetro Farmacocinético	Cápsulas de 50 mg de KPF Promedio \pm DE (n=6)
ABC [$\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$]	24.2 \pm 3.0
$C_{\text{máx}}$ [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	9.4 \pm 1.8
$t_{\text{máx}}$ [h]	1.6 \pm 0.4
$t_{1/2}$ [h]	1.33 \pm 0.3

En 2015, **Baldo M.N. et al**, (Baldo M.N., 2015) llevaron a cabo un estudio de Bioequivalencia en el que compararon la biodisponibilidad de ketoprofeno en un medicamento de prueba y el medicamento de referencia, el Profenid® de Sanofi Aventis. Dicho estudio se realizó con 24 voluntarios sanos varones, de origen latino americano, a los cuales se les administró una dosis única de 200 mg de KPF por lo que fue necesario se tomaran 4 cápsulas de gelatina dura conteniendo 50 mg de KPF con 240 mL de agua.

El estudio se llevó a cabo empleando un diseño cruzado de dos vías con un ayuno de 10 h previo a la administración del medicamento y un periodo de lavado de 7 días. Se tomaron muestras sanguíneas durante 24 horas. La concentración plasmática de KTP en plasma se determinó empleando un método por LC-MS/MS, el rango de la curva de calibración fue de 48- 19294 ng/mL. Los resultados se presentan en la **Tabla 3**. Al llevar a cabo el análisis estadístico, se encontró que para los parámetros $C_{\text{máx}}$, ABC_{0-24} y $ABC_{0-\infty}$, los IC al 90% cumplen con el criterio de encontrarse dentro del 80-125%, lo que muestra que ambos productos fueron bioequivalentes.



Tabla 3. Parámetros farmacocinéticos reportados por Baldo, M.N., et al, 2015.

Parámetro Farmacocinético	Producto de Prueba Flogofin®	Producto de Referencia Profenid®
ABC ₀₋₂₄ [µg.h/mL]	52.21 ± 1.15	50.68 ± 10.52
ABC _{0-∞} [µg.h/mL]	52.38 ± 11.51	50.84 ± 10.57
C _{máx} [µg/mL]	21.58 ± 6.69	21.65 ± 8.48
t _{máx} [h]	1.10 ± 0.53	1.49 ± 1.00
t _{1/2} [h]	3.62 ± 0.75	3.54 ± 0.59
K _e [h ⁻¹]	0.20 ± 0.05	0.20 ± 0.05

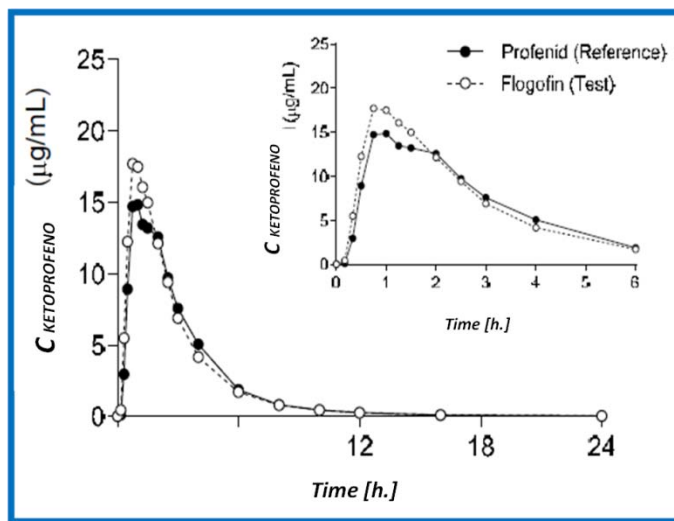


Figura 4. Concentraciones plasmáticas promedio de KPF alcanzadas después de la administración de una dosis única de 200 mg de KPF a 24 voluntarios sanos.(Baldo M.N. et al., 2015)

2.5.1. Riesgos de Bioequivalencia de Medicamentos que Contienen KPF

El grado de absorción del KPF parece ser muy robusto y no dependiente de la formulación ni de los excipientes, al menos no para las formulaciones de liberación inmediata, por lo que el riesgo de bioequivalencia en términos del ABC es muy bajo. El riesgo puede reducirse más, si los medicamentos genéricos de KPF se formularan utilizando los excipientes presentes en otras formulaciones orales de liberación inmediata aprobadas por la International Council for Harmonisation (ICH) y si fueran utilizados en cantidades similares a dichos productos.(Shohin et al., 2012).

Sin embargo, la velocidad de absorción, en términos de la C_{máx}, puede verse alterada por la formulación. Factores farmacéuticos tales como, el uso de tensoactivos en concentraciones tales que favorezcan la humectación y solubilización del fármaco, el uso



de algún excipiente o aditivo que incremente el pH del estómago; formas sólidas que generen una súper saturación y que incrementen la velocidad de disolución en el estómago puedan dar como resultado un incremento en la velocidad de absorción del fármaco.(Shohin et al., 2012).

Otro punto importante, es el efecto del consumo de alimentos, ya que la información para prescribir sugiere que el KPF sea administrado junto con los alimentos para minimizar los efectos adversos gastrointestinales. Cuando esto se lleva a cabo, la biodisponibilidad del KPF no se ve alterada en términos del ABC, sin embargo, la velocidad de absorción del fármaco disminuye. Esto se debe a que la ingesta de alimentos produce una disminución en la $C_{máx}$ a aproximadamente la mitad, incrementando el tiempo en el que se alcanza dicha concentración de 1.2 h (sujetos en ayuno) a 2 h en estado postprandial. (Shohin et al., 2012).

2.6. Validación de Métodos Bioanalíticos.

La cuantificación o medición de las concentraciones de un fármaco y/o sus metabolitos en alguna matriz biológica es ampliamente utilizado en estudios clínicos, toxicológicos, farmacocinéticos, de biodisponibilidad, de Bioequivalencia y en el monitoreo terapéutico de fármacos (TDM). Es por ello que se requiere contar con métodos analíticos validados que permitan cuantificar el analito en un rango de concentraciones específico, el cual dependerá del tipo de estudio a realizar.(Helmy et al., 2014).

La validación de un método bioanalítico implica el realizar y documentar, todos aquellos procedimientos o pruebas que demuestren que un método analítico que será utilizado para medir cuantitativamente un fármaco y/o sus metabolitos en una matriz biológica (sangre total, plasma, suero u orina), es confiable y reproducible para las aplicaciones analíticas que fue desarrollado. Algunos de los parámetros fundamentales que se deben incluir en la validación son: curva de calibración, precisión, exactitud, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad.(FDA, 2013).

En México, el documento de carácter oficial que establece los criterios, requisitos y características de desempeño de un método analítico utilizado para el análisis de muestras biológicas en un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia es la NOM-177-SSA1-2013.



Dicha norma establece, que todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de fármacos en muestras biológicas, deben ser validados en el sitio de análisis y además se debe demostrar y documentar que alcanzan el propósito para el cual han sido desarrollados. (Salud, 2013).

En la siguiente tabla se presenta una comparación de de los requisitos establecidos en la NOM-177-SSA1-2013 y en el borrador de la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos de la FDA publicado en el 2013, para la validación de métodos analíticos empleados para la cuantificación de fármacos y/o sus metabolitos en matrices biológicas.

Tabla 4. Comparación entre los requisitos y criterios de validación establecidos en la NOM-177-SSA1-2013 y en el Borrador de Guía de la FDA del 2013.

<i>Prueba</i>	<i>Condiciones Experimentales de la Prueba</i>	
	<i>NOM-177-SSA1-2013.</i>	<i>Borrador de Guía de la FDA del 2013.</i>
Selectividad	<p>Demostrar la no interferencia de compuestos endógenos del plasma, mediante la evaluación:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. El plasma blanco normal de 6 voluntarios. 2. Preparar una mezcla de matriz biológica, mezclando volúmenes iguales del plasma de los 6 voluntarios, a partir de él preparar y analizar: <ol style="list-style-type: none"> a) Muestra blanco. b) Muestra cero. c) Mezcla de plasma adicionada con el fármaco a la concentración del LIC. 3. Analizar la matriz biológica lipémica y la hemolizada. <p>La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención deben ser menor al 20.0% para el LIC del analito y del 5.0% para el EI.</p>	<p>Analizar muestras blanco de la matriz biológica de interés obtenida de por lo menos seis fuentes. Para cada muestra debe probarse la no interferencia y la selectividad debe garantizarse en el LIC. Evaluar posibles sustancias que puedan interferir, tales como componentes endógenos del plasma, metabolitos, productos de descomposición; y posibles interferencias en el estudio, medicación concomitante y otros xenobióticos.</p>



Tabla 4. CONTINUACIÓN.

Prueba	Condiciones Experimentales de la Prueba	
	NOM-177-SSA1-2013.	Borrador de Guía de la FDA del 2013.
Límite Inferior de Cuantificación (LIC)	<p>Se determina con base en el 5.0% del $C_{m\acute{a}x}$ reportado para el fármaco de interés.</p> <p>La NOM-177 considera su evaluación durante la evaluación de los parámetros de precisión y exactitud.</p>	<p>La concentración más baja de la curva de calibración puede ser aceptada como el LIC si cumple con lo siguiente:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. La respuesta en el LIC es por lo menos 5 veces la respuesta analítica de un blanco de plasma en el t_r del fármaco. 2. El pico del fármaco es identificable, discreto y reproducible. La precisión del promedio de las concentraciones recuperadas tiene un %C.V. $\leq 20.0\%$ y la exactitud es $\leq 20.0\%$ de la concentración nominal. 3. Evaluar por quintuplicado, muestras adicionadas con la concentración más baja considerada en el intervalo de trabajo. <p>El LIC no debe ser confundido con el límite de detección (LD) y/o con la MCB.</p>
Curva de Calibración	<p>Caracterizar al menos 6 concentraciones distintas sin incluir las muestras blanco y cero. Definir un modelo matemático que describa la relación entre la concentración y la respuesta analítica, la cual debe ser continua y reproducible en el intervalo de trabajo.</p> <p>Evaluar un mínimo de 3 curvas de calibración del analito en plasma en el intervalo de trabajo.</p> <p>La $C_{recuperada}$ debe estar dentro del 15.0% de la $C_{nominal}$ para cada nivel de concentración, para el LIC puede ser \leq al 20.0%.</p> <p>Al menos el 75.0% de las concentraciones de la curva de calibración, con un mínimo de 6 puntos, deben cumplir con este criterio. Del total de curvas evaluadas, al menos el 50.0% de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio de aceptación.</p>	<p>Evaluar un mínimo de 6 corridas llevadas a cabo durante varios días, con al menos 4 concentraciones (incluyendo el LIC, un punto bajo, medio y alto) analizadas por duplicado en cada corrida.</p> <p>Utilizar el modelo más simple que describa adecuadamente la relación entre la concentración-respuesta. La selección de una ponderación y el uso de una ecuación de regresión compleja deben ser justificada.</p>



Tabla 4. CONTINUACIÓN.

Prueba	Condiciones Experimentales de la Prueba	
	NOM-177-SSA1-2013.	Borrador de Guía de la FDA del 2013.
Recuperación Absoluta (Recobro)	NO INCLUIDA	Analizar por quintuplicado las MCB, MCM y MCA. Comparar sus respuestas analíticas con las obtenidas por soluciones preparadas a la misma concentración y en el mismo disolvente. El % de recobro del fármaco y del EI no necesita ser del 100%, sólo deben ser consistentes, precisos y reproducibles.
Precisión del Método	Repetibilidad (Precisión Intra-día) Analizar en un mismo día, al menos por quintuplicado, las muestras correspondientes al LIC, MCB, MCM, MCA y MCD. El %C.V. del promedio de las $C_{recuperadas}$ debe ser \leq al 15.0%, para el LIC puede ser \leq al 20.0%.	Utilizar un mínimo de 5 determinaciones por concentración y un mínimo de 3 concentraciones distintas e incluidas dentro del intervalo de concentraciones esperadas en el estudio. *Precisión durante una sola corrida analítica.
	Reproducibilidad (Precisión Inter-día) Analizar al menos por quintuplicado, en tres corridas analíticas diferentes y en al menos dos días, las muestras correspondientes al LIC, MCB, MCM y MCA. El %C.V. del promedio de las $C_{recuperadas}$ debe ser \leq al 15.0%, para el LIC puede ser \leq al 20.0%.	Precisión entre varias corridas analíticas o que puede involucrar diferentes analistas, equipos, reactivos y laboratorios. La adición de otro analista o el uso de otro equipo, debe cumplir con los criterios de Reproducibilidad.
Exactitud	Utilizar los datos de Repetibilidad y Reproducibilidad en concentración recuperada. El promedio del % de desviación de las $C_{recuperadas}$ debe ser \leq al 15.0%, para el LIC puede ser \leq al 20.0%.	Evaluar con un mínimo de 5 determinaciones por concentración y con un mínimo de 3 concentraciones distintas que estén incluidas en el intervalo de trabajo. El promedio de las $C_{recuperadas}$ para cada nivel de concentración, debe tener un % de desviación \leq al 15.0%, para el LIC puede ser \leq al 20.0%.
Estabilidad de la Muestra	Evaluar por triplicado la respuesta del fármaco en las MCB y MCA, estas deben analizarse inmediatamente después de su preparación y después de ser sometidas a las condiciones a evaluar. La $C_{recuperada}$ promedio de cada nivel de concentración evaluado debe estar dentro del 15.0% de la $C_{nominal}$.	
Estabilidad a Corto Plazo	Evaluar la estabilidad del fármaco y del EI en las muestras sin procesar (matriz biológica) en la mesa de trabajo, a condiciones de temperatura ambientales y en el periodo de procesamiento de las muestras. El borrador de Guía de la FDA del 2013 la denomina Estabilidad en la mesa de trabajo .	



Tabla 4. CONTINUACIÓN.

Prueba	Condiciones Experimentales de la Prueba	
	NOM-177-SSA1-2013.	Borrador de Guía de la FDA del 2013.
Estabilidad a Largo Plazo	Evaluar la estabilidad del fármaco y del EI en las muestras sin procesar bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán, por un periodo de tiempo por lo menos equivalente al que transcurre desde la toma de la muestra hasta su análisis.	
Estabilidad en Ciclos de Congelación - Descongelación	Evaluar la estabilidad del fármaco y del EI en las muestras sin procesar, almacenadas a la temperatura de congelación por al menos 12 h, descongelarlas completamente a temperatura ambiente y volver a congelarlas por al menos 12 h bajo las mismas condiciones. El número de ciclos de congelación-descongelación evaluados debe ser al menos de tres.	
Estabilidad en el Automuestreador	Evaluar la estabilidad del fármaco y del EI en las muestras procesadas a la temperatura del automuestreador al menos el tiempo que dure una corrida analítica completa.	Ambas pruebas de la NOM-177 están incluidas en la prueba de Estabilidad de la Muestra Procesada del borrador de Guía de la FDA del 2013.
Estabilidad de la Muestra Procesada	Evaluar la estabilidad del fármaco y del EI en las muestras procesadas bajo las condiciones de almacenamiento que serán utilizadas durante el estudio.	
Estabilidad en Solución. (Fármaco y EI)	<p>Evaluar la estabilidad del fármaco y del EI en la solución de referencia principal y de trabajo sometidas bajo las condiciones a las cuales serán almacenadas por un tiempo mayor o igual al periodo de almacenamiento.</p> <p>La estabilidad se evalúa realizando una dilución apropiada de dichas soluciones. Las soluciones se considerarán estables si la desviación de la respuesta analítica promedio con respecto a la obtenida con muestras recién preparadas es \leq al 10.0%.</p>	

2.7. Cromatografía

La cromatografía es un método físico de separación, en el que los componentes a separar se distribuyen en dos fases, una estacionaria (fase estacionaria) y otra que se mueve (fase móvil) en una dirección definida. (IUPAC)

Los mecanismos de retención en los diversos tipos de cromatografía difieren, todos se basan en establecer un equilibrio entre la fase estacionaria y la fase móvil. Dicho equilibrio de distribución se define con la constante de distribución (K_c):

$$K_c = \frac{[X]_s}{[X]_m}$$

Donde $[X]_s$ es la concentración del componente X sobre o en la fase estacionaria, y $[X]_m$ es su concentración en la fase móvil. Esta constante, también denominada constante de



distribución o coeficiente de partición en la cromatografía de partición, está gobernada por la temperatura, la clase de compuesto y las fases estacionaria y móvil. Los solutos con un valor grande de K_c serán retenidos con mayor fuerza por la fase estacionaria que aquellos que tengan un valor pequeño. Como resultado, estos últimos avanzarán por la columna, es decir, serán eluidos, con mayor rapidez. (Christian, 2009)

2.7.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es una técnica analítica instrumental que puede ser utilizada como técnica preparativa o analítica, permitiendo la purificación, identificación y cuantificación del analito de interés.

Un instrumento para CLAR se compone principalmente de cuatro partes: un sistema de bombeo a altas presiones que permite el flujo de la fase móvil, un sistema de inyección de la muestra, la columna cromatográfica que permitirá la separación de sus componentes y un sistema de detección. En esta técnica analítica, la muestra es inyectada en el seno de la fase móvil en la que es soluble, y es transportada a través de la columna por el flujo continuo de la fase móvil a una alta presión. Al ir fluyendo continuamente la fase móvil a través de la columna, los analitos se distribuirán entre las dos fases y terminarán por ser eluidos, y si la distribución es lo suficientemente distinta para cada uno de los componentes de una muestra, terminarán por separarse y pasarán a través de un sistema de detección el cual detectará la presencia de cada uno de los componentes de la muestra y los convertirá en una señal eléctrica que será registrada en un sistema de procesamiento de datos que los representará como un gráfico denominado cromatograma; cada componente o soluto se representará gráficamente como un pico que podrá identificarse por su tiempo de retención (t_r), su ancho, altura y área.

La cromatografía de líquidos tiene un potencial amplio de aplicaciones debido a que alrededor del 85% de los compuestos conocidos no son lo suficientemente volátiles o estables a altas temperaturas como para ser separados por cromatografía de gases. (Christian, 2009)

2.7.1.1. Tipos de Cromatografía de Líquidos

La CLAR se usa en modo de cromatografía de adsorción líquido-sólido, o en el de cromatografía de partición líquido-líquido, siendo éste último el más común, ya sea de



fase normal o de fase reversa o inversa. Ambos modos aprovechan diferencias en la polaridad del soluto, ya que dicha propiedad es importante para determinar tanto la adsorción como la solubilidad.

En la cromatografía de fase normal (NPC), la fase estacionaria es polar. Se utiliza una fase móvil no polar como el n-hexano, cloruro de metileno o cloroformo. La fase estacionaria es un siloxano unido con un grupo funcional polar (ciano, diol, amino, dimetilamonio). Esas fases retienen compuestos polares preferentemente a compuestos no polares.

En la cromatografía de fase inversa o reversa (RPC), se utiliza una fase estacionaria relativamente no polar, y la fase móvil polar puede estar compuesta de MeOH, ACN, THF, agua o con frecuencia, una mezcla de agua con uno de los disolventes orgánicos mencionados a los cuales se les denomina modificadores. Estos disolventes son transparentes al UV y tienen poca viscosidad. Las fases enlazadas más comunes son cadenas de n-octadecilo (C18) o n-octilo (C8) o grupos fenilo.

Una gran variedad de compuestos orgánicos se pueden disolver en fases móviles compuestas de agua-disolvente orgánico para separarlos, de tal modo que la cromatografía de fase inversa es; con mucho, la forma más utilizada de CLAR.



3. OBJETIVOS.

3.1. Objetivo General.

- Desarrollar y validar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para la cuantificación de Ketoprofeno en plasma humano para su aplicación en estudios de Biodisponibilidad o Bioequivalencia.

3.2. Objetivos Particulares.

- Seleccionar las condiciones cromatográficas adecuadas que permitan obtener la mejor separación y resolución del KPF por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).
- Establecer las mejores condiciones de extracción del KPF del plasma, las cuales permitan obtener un recobro reproducible en el intervalo de concentración de 0.5 a 20.0 µg/mL.
- Validar el método analítico desarrollado conforme a los criterios establecidos en la NOM-177-SSA1-2013.



4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Reactivos, materiales, instrumentos y equipos

4.1.1. Reactivos

- Estándar secundario de Ketoprofeno de Sanofi, Pureza: 99.7% BH.
- Estándar secundario de Ketorolaco Trometamina de Laboratorios RAM de Sahuayo, Pureza: 99.46% BH.
- Metil terbutil éter grado reactivo J.T. Baker.
- Metanol grado HPLC J.T. Baker.
- Acetonitrilo grado HPLC J.T. Baker.
- Ácido Acético glacial grado reactivo J.T. Baker.
- Ácido Fosfórico grado reactivo J.T. Baker.
- Agua grado HPLC.
- Nitrógeno gas.

4.1.2. Materiales

- Columna cromatográfica NOVA-PAK C18 Waters, dimensiones de 3.9 mm x 150 mm y 4.0 μm de tamaño de partícula.
- Pre-columna SecurityGuard Phenomenex.
- Matraces volumétricos de 10.0 mL, 25.0 mL y 500 mL.
- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm.
- Tubos de ensaye de vidrio con tapón de rosca.
- Puntas para micropipeta.

4.1.3. Instrumentos y equipos

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución modelo LC10AT Shimadzu con detector UV-visible modelo SPD-10AV Shimadzu.
- Micropipeta Eppendorf de 100-1000 μL .
- Micropipeta Eppendorf de 500-5000 μL .
- Micropipeta Eppendorf de 1-10 mL.
- Repipeteador Eppendorf Plus.
- Potenciómetro Thermo Orion Star A211.



- Balanza analítica Sartorius.
- Espectrofotómetro UV-Visible 1601 Shimadzu.
- Agitador vortex MX-S de Science MED Finland Technology.
- Agitador Lab-Line 3520 Orbital Platform Shaker.
- Centrífuga Eppendorf 5416.
- Ultra-congelador REVCO a -70°C .
- Congelador Lab-Line, modelo 3552 a -20°C .
- Baño de agua Lab-Line 18005.
- Baño de ultrasonido Fisher Scientific FS60.
- Equipo de Filtración Millipore.

4.2. Desarrollo y Validación del Método Analítico

4.2.1. Preparación de Soluciones

4.2.1.1. Solución de Ácido Acético al 0.2 %, pH 3.1

Se tomó una alícuota de 954 μL de ácido acético glacial la cual se transfirió a un matraz volumétrico de 500.0 mL con aproximadamente 250 mL de agua grado HPLC, se disolvió y posteriormente se llevó a la marca de aforo con agua grado HPLC. El pH se determinó sólo con el fin de corroborar que se encuentre dentro del rango de 3.0 – 3.2 ya que no puede ajustarse para evitar modificar la concentración de ácido acético.

4.2.1.2. Solución de Ácido Fosfórico (H_3PO_4) 5.0 M

Se tomó una alícuota de 8.4 mL del reactivo de ácido fosfórico la cual se transfirió a un matraz volumétrico de 25.0 mL con aproximadamente 10 mL de agua grado HPLC, se disolvió y posteriormente se llevó a la marca de aforo con agua grado HPLC.

4.2.1.3. Fase Móvil (FM). Solución de Ácido Acético al 0.2%, pH 3.1: ACN (55:45)

Para preparar 1.0 L de FM se mezclan 550 mL de la solución de Ácido Acético al 0.2% pH 3.1 con 450 mL de ACN., tanto la solución de ácido como el ACN se filtraron de forma independiente a través de un filtro de nylon de 0.45 μm . de tamaño de poro, posteriormente se mezclaron los volúmenes correspondientes y se colocó en un baño de ultrasonido por 30 min a temperatura ambiente.



4.2.1.4. Preparación de la Mezcla de Matriz Biológica (Plasma Humano)

Para su preparación, se mezclaron volúmenes iguales de plasma normal proveniente de seis donadores distintos, incluyendo tanto hombres como mujeres. Dicha mezcla de plasma se fraccionó en frascos de plástico herméticos de aproximadamente 50 mL y se almacenaron en congelación (-20°C) durante el periodo de validación del método analítico. Los paquetes de plasma fresco congelado humano utilizados durante la validación del método analítico fueron donados por el banco de sangre de Médica Sur.

4.2.2. Preparación de Soluciones Estándar y de Trabajo de KPF

4.2.2.1. Solución Estándar 1 (STD 1 de KPF). Concentración de 2000 $\mu\text{g/mL}$ de KPF

Se pesaron con exactitud el equivalente a 20.0 mg del estándar secundario de KPF los cuales fueron transferidos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10.0 mL, se disolvió en aproximadamente 5.0 mL de MeOH y se llevó a la marca de aforo con el mismo disolvente. La concentración de KPF obtenida en esta solución es de 2000 $\mu\text{g/mL}$.

A partir del STD 1 de KPF se prepararon las soluciones estándar 2 y 3 tal y como se describe a continuación:

4.2.2.2. Solución Estándar 2 (STD 2 de KPF). Concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ de KPF

De la solución STD 1 de KPF se tomó una alícuota de 1000 μL , la cual se transfirió a un matraz volumétrico de 10.0 mL y se llevó a la marca de aforo con MeOH. La concentración de KPF obtenida en esta solución es de 200 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.2.3. Solución Estándar 3 (STD 3 de KPF). Concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$ de KPF

De la solución STD 1 de KPF se tomó una alícuota de 100 μL la cual se transfirió a un matraz volumétrico de 10.0 mL y se llevó a la marca de aforo con MeOH. La concentración de KPF obtenida en esta solución es de 20 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.2.4. Soluciones de Trabajo de KPF

En la siguiente tabla se presenta la forma de preparación de las Soluciones de Trabajo de KPF a partir de las tres soluciones estándar de KPF mencionadas en el apartado **4.2.2.**



Tabla 5. Preparación de las Soluciones de Trabajo de KPF en MeOH.

C_{KPF} en la Solución de Trabajo	STD de KPF	C_{KPF} en el STD [$\mu\text{g/mL}$]	Alícuota del STD [μL]	Aforo con MeOH [μL]
10	3	20	500	500
20	3	20	-----	-----
30	2	200	150	850
50	2	200	250	750
100	2	200	500	500
160	2	200	800	200
200	2	200	-----	-----
340	1	2000	170	830
400	1	2000	200	800

4.2.3. Preparación de Soluciones Estándar y de Estándar Interno (EI) de KET

4.2.3.1. Solución Estándar 1 (STD 1 de KET). Concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de KET

Se pesaron con precisión el equivalente a 14.8 mg del estándar secundario de Ketorolaco-Trometamina los cuales fueron transferidos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10.0 mL, se disolvieron en aproximadamente 5.0 mL de MeOH y se llevó a la marca de aforo con el mismo disolvente. La concentración de KET obtenida en esta solución es de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.3.2. Solución de Estándar Interno de KET. Concentración de 200 $\mu\text{g/mL}$ de KET

De la solución STD 1 de KET se tomó una alícuota de 2000 μL la cual se transfirió a un matraz volumétrico de 10.0 mL y se llevó a la marca de aforo con agua grado HPLC. La concentración de KET obtenida en esta solución es de 200 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.4. Solución Para la Verificación del Desempeño del Sistema

De la solución STD 2 de KPF se tomó una alícuota de 375 μL la cual se transfirió a un matraz volumétrico de 10.0 mL, posteriormente se tomó una alícuota de 1000 μL del STD 1 de KET y de igual manera se transfirió al matraz volumétrico de 10.0 mL., finalmente se llevó a la marca de aforo con FM. La concentración obtenida en esta solución es de 7.5 $\mu\text{g/mL}$ de KPF y de 100 $\mu\text{g/mL}$ de KET.

4.2.5. Preparación de la Curva de Calibración de KPF en Plasma

La siguiente tabla muestra la forma de preparación de cada nivel de concentración de la curva de calibración en plasma humano utilizando las Soluciones de Trabajo de KPF descritas en el apartado **4.2.2**.



Tabla 6. Preparación de la Curva de Calibración de KPF en Plasma.

Nivel de la Curva de Calibración en Plasma. [$\mu\text{g/mL}$]	C_{KPF} en la Solución de Trabajo. [$\mu\text{g/mL}$]	Alícuota de la Solución de Trabajo de KPF. [μL]	Aforo con Mezcla de Plasma. [μL]	Volumen final de la muestra de KPF en Plasma. [mL]
0.5	10	50	950	1.0
1.0	20	50	950	1.0
2.5	50	50	950	1.0
5.0	100	50	950	1.0
10.0	200	50	950	1.0
20.0	400	50	950	1.0

4.2.6. Preparación de las Muestras Control de KPF en Plasma y en Solución

Para seleccionar las concentraciones correspondientes a cada una de las muestras control (MC), se tomaron en cuenta los criterios establecido en la NOM-177-SSA1-2013:

- **Muestra Control Baja (MCB):** Concentración equivalente a 3 veces la concentración del LIC, la cual es de 0.5 $\mu\text{g/mL}$. La concentración de KPF en la MCB es de 1.5 $\mu\text{g/mL}$.
- **Muestra Control Media (MCM):** Concentración intermedia entre la MCB y la MCA. La concentración de KPF en la MCM es de 8.0 $\mu\text{g/mL}$.
- **Muestra Control Alta (MCA):** Concentración equivalente al 85.0% de la concentración del Límite Superior de Cuantificación (LSC), la cual es de 20.0 $\mu\text{g/mL}$. La concentración de KPF en la MCA es de 17.0 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.6.1. Muestras Control en Plasma

La siguiente tabla muestra la forma de preparación de las MC de KPF en plasma humano utilizando las Soluciones de Trabajo de KPF descritas en el apartado 4.2.2.

Tabla 7. Preparación de las Muestras Control de KPF en Plasma.

MC en Plasma. [$\mu\text{g/mL}$]	C_{KPF} en la Solución de Trabajo. [$\mu\text{g/mL}$]	Alícuota de la Solución de Trabajo de KPF. [μL]	Aforo con Mezcla de Plasma. [μL]	Volumen final de la MC de KPF en Plasma. [mL]
MCB [1.5 $\mu\text{g/mL}$]	30	50	950	1.0
MCM [8.0 $\mu\text{g/mL}$]	160	50	950	1.0
MCA [17.0 $\mu\text{g/mL}$]	340	50	950	1.0



4.2.6.2. Muestras Control en Solución

La siguiente tabla muestra la forma de preparación de las MC de KPF en solución utilizando las tres soluciones estándar de KPF mencionadas en el apartado 4.2.2. Es importante mencionar que dichas soluciones se prepararon a una concentración 3 veces mayor que la correspondiente a cada muestra control en plasma para que sus respuestas analíticas puedan ser comparadas, esto debido a que al momento de reconstituir las muestras control en plasma están se concentran 3 veces.

Tabla 8. Preparación de las Muestras Control de KPF en Solución.

MC de KPF en Solución [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	C_{KPF} en la MC en Solución [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	STD de KPF	C_{KPF} en el STD [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	Alícuota del STD [μL]	Aforo con FM [mL]
MCB [1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	4.5	3	20	2250	10.0
MCM [8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	24.0	2	200	1200	10.0
MCA [17.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$]	51.0	2	200	2550	10.0

4.2.7. Desarrollo del Método Analítico

4.2.7.1. Selección de las Condiciones Cromatográficas para el Análisis

Para la cuantificación del KPF en las muestras de plasma se decidió emplear la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con detección al UV. Esto se debe a que dicho fármaco presenta en su estructura química dos anillos aromáticos con dobles enlaces conjugados que absorben en el rango del UV por lo que esta propiedad de la molécula puede ser utilizada para su cuantificación. También se tomó en cuenta la sensibilidad de esta técnica analítica para poder cuantificar con precisión y exactitud el 5.0% de la $C_{\text{máx}}$ de KPF esperada después de una dosis única de 100 mg, la cual es de aproximadamente 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (Hassanzadeh M. K., 1997).

4.2.7.1.1. Selección de la Longitud de Onda de Análisis

Para seleccionar la longitud de onda de análisis, se consideró que el KPF no es un fármaco nuevo, que existe información reportada acerca de sus propiedades fisicoquímicas por lo que se buscaron referencias en la bibliografía acerca de las longitudes de onda comúnmente utilizadas en métodos analíticos desarrollados por CLAR



con detección al UV y se encontró que en general se han empleado longitudes de onda en el rango de 250 a 260 nm. (Jin et al., 2008; Jiyauddin et al., 2011; Rajaa Farhan Hussein., 2011; Zafar et al., 2013).

Tomando en cuenta esta información, se decidió realizar un barrido de absorción al UV, por espectrofotometría UV-Visible, en un rango de 190 a 400 nm con soluciones de KPF a una concentración de 10.0 µg/mL preparadas en MeOH y en FM.

4.2.7.1.2. Selección de la Columna Cromatográfica

Tomando en cuenta la estructura química del KPF, su baja solubilidad en agua y su valor de Log P reportado (3.2), así como su solubilidad en varios disolventes orgánicos no polares, se concluyó que se trata de un compuesto orgánico poco polar por lo cual para su separación y análisis fue necesario el uso de una columna cromatográfica de Fase Reversa.

Las columnas evaluadas fueron:

- Zorbax Eclipse XDB-C18 de Agilent, dimensiones de 4.6 mm x 150 mm y 5.0 µm de tamaño de partícula.
- NOVA-PAK C18 de Waters, dimensiones de 3.9 mm x 150 mm y 4.0 µm de tamaño de partícula.
- Zorbax SB-C18 de Agilent, dimensiones de 4.6 mm x 150 mm y 5.0 µm de tamaño de partícula.
- Gemini C18 de Phenomenex, dimensiones de 4.6 mm x 150 mm y 5.0 µm. de tamaño de partícula.

Para la evaluación de cada una de las columnas antes mencionadas se utilizaron muestras de KPF preparadas en solución de FM a una concentración de 20.0 µg/mL.

4.2.7.1.3. Selección de la Fase Móvil

Se evaluaron las siguientes composiciones y proporciones de la fase móvil:

Tabla 9. Fases Móvil Evaluadas.

Composición (Fase Acuosa: Fase Orgánica)	Proporciones (Fase Acuosa: Fase Orgánica)
Solución de Ácido Acético 0.2% pH 3.1: ACN	50:50
Solución de Ácido Acético 0.2% pH 3.1: ACN	55:45



4.2.7.1.4. Selección del Volumen de Inyección

Para la selección del volumen de inyección, se evaluó la intensidad de la respuesta analítica producida por el KPF utilizando soluciones del mismo a concentraciones bajas y preparadas en FM. Los volúmenes de inyección evaluados fueron:

- 25 μ L.
- 40 μ L.
- 50 μ L.

4.2.7.1.5. Selección de la Velocidad de Flujo de la FM y Tiempo de Corrida

Las velocidades de flujo de la fase móvil evaluadas fueron:

- 1.0 mL/min.
- 1.2 mL/min.

4.2.7.1.6. Selección del Estándar Interno (EI)

Las propiedades fisicoquímicas de los fármacos que fueron evaluados para su uso como EI se presentan en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Características fisicoquímicas de los fármacos evaluados para su uso como EI.

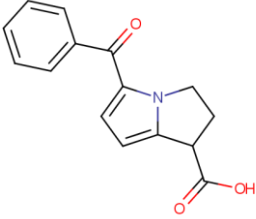
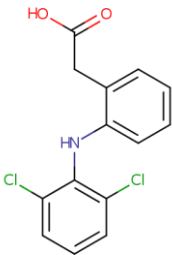
Fármaco	Estructura Química	pKa	Log P	Solubilidad en Agua a 25°C. [mg/mL]
KET: Ketorolaco		3.84	2.1	25 mg/mL. (sal de Trometamina)
DIC: Diclofenaco		4.15	4.51	0.00237 mg/MI



Tabla 10. CONTINUACION.

Fármaco	Estructura Química	pKa	Log P	Solubilidad en Agua a 25°C. [mg/mL]
IBP: Ibuprofeno		4.91	3.97	0.021 mg/mL.
NAP: Naproxeno		4.15	3.18	0.0159 mg/mL.

Para evaluar el comportamiento cromatográfico de los estándares seleccionados, se inyectaron soluciones en FM, conteniendo tanto al KPF como a cada uno de los estándares a evaluar. La concentración de KPF fue de 30.0 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la concentración de los estándares fue de 100 $\mu\text{g/mL}$. Cabe señalar que la concentración de los estándares fue seleccionada únicamente para evaluar la magnitud de la respuesta cromatográfica producida y para observar la separación de los picos del analito y el estándar a evaluar.

Posteriormente, fue necesario probar otras concentraciones del estándar interno seleccionado hasta encontrar aquella que produjera la respuesta analítica deseada, es decir, que la altura del pico correspondiente al EI fuera aproximadamente igual a la altura del pico producido por el analito a la concentración intermedia del intervalo de trabajo de la curva de calibración de KPF en plasma humano, la cual es de 10.0 $\mu\text{g/mL}$ de KPF.

4.2.7.2. Desarrollo del Método para la Extracción del KPF de las Muestras Plasmáticas

La técnica seleccionada para la extracción del KPF de las muestras de plasma humano fue la extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos no polares, el cual fue



seleccionado con base en las propiedades fisicoquímicas del KPF. Principalmente se tomó en cuenta: su baja solubilidad en agua, su solubilidad en disolventes orgánicos, su elevado valor de Log P, el cual habla de su alta afinidad a disolventes poco polares, y su carácter de ácido débil (pKa de 4.45) que permite tener la molécula del fármaco en un estado ionizado o no ionizado dependiendo del pH del medio en el que se encuentre.

Considerando el pKa del fármaco y el valor de pH del plasma humano (7.4) se decidió utilizar un agente acidificante con el fin de mantener la molécula de KPF en su forma no ionizada.

Finalmente, tomando en cuenta su alta unión a proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina sérica, fue necesario buscar un agente precipitante de proteínas que rompiera la interacción fármaco-proteínas, lo liberara y permitiera extraer al analito de la matriz.

Con base en lo anterior, para establecer las condiciones para la extracción del analito del plasma humano se evaluaron los siguientes parámetros:

4.2.7.2.1. Selección del Volumen de Muestra de Plasma

Los volúmenes de muestra de plasma que se evaluaron fueron:

- 1.0 mL.
- 200 µL.
- 300 µL.
- 600 µL.

4.2.7.2.2. Selección del Disolvente de Extracción y del Volumen a Utilizar

Las mezclas de disolventes y disolventes orgánicos que se evaluaron para la extracción del fármaco fueron:

- Acetato de Etilo: Hexano en proporción 75:25.
- Éter Etilico: Hexano en proporción 80:20.
- Metil terbutil éter (MTBE).

4.2.7.2.3. Selección del Agente Acidificante de la Muestra

Los agentes acidificantes evaluados fueron:

- Ácido Perclórico (HClO₄).



- Ácido Fosfórico (H_3PO_4).
- Fase Móvil, por la presencia de CH_3COOH .

4.2.7.2.4. Selección del Agente Precipitante de Proteínas

Las sustancias evaluadas como agentes precipitantes se presentan en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Agentes Precipitantes de Proteínas Evaluados.

Ácidos	Disolventes Orgánicos
HClO_4 .	MeOH.
H_3PO_4 .	ACN.
Fase Móvil por la presencia de CH_3COOH .	

4.2.7.2.5. Selección del Tiempo y Tipo de Agitación

En la **Tabla 12** se presentan los tipos de agitación evaluados para la extracción del KPF de las muestras de plasma.

Tabla 12. Tipo y Tiempos de Agitación Evaluados.

Tipo de Agitación	rpm	Tiempo de Agitación [min]
Vortex orbital	-----	1.0
		2.0
Agitación Orbital	300 rpm	5.0.
		10.0
	350 rpm	10.0
		20.0
Agitación Por Vibración	2000 rpm	10.0
		20.0.

4.2.8. Validación del Método Analítico Desarrollado

Una vez establecidas las mejores condiciones experimentales, se procedió a validar el método analítico. Los parámetros que se consideraron para la validación fueron los siguientes: selectividad, curva de calibración, límite inferior de cuantificación, precisión como repetibilidad y reproducibilidad, exactitud y estabilidad.

4.2.8.1. Selectividad

Se determinó analizando la no interferencia de compuestos endógenos del plasma humano en las siguientes muestras:



- a. Muestra blanco del plasma normal de 6 donadores diferentes (hombres y mujeres) analizados independientemente. La muestra blanco se define como la matriz biológica sin la adición del analito y del EI.
- b. Muestra blanco de la mezcla de plasma preparada a partir de la mezcla de volúmenes iguales del plasma normal de 6 donadores sin la adición del fármaco, ni del EI.
- c. Muestra cero: Blanco de mezcla de plasma adicionado con el EI a una concentración de 200 µg/mL de KET.
- d. Muestra blanco de la mezcla de plasma adicionada con el analito a la concentración correspondiente al LIC (0.5 µg/mL de KPF) y con el EI a una concentración de 200 µg/mL de KET.

Para cada muestra blanco analizada se identificaron aquellas señales cercanas a los tiempos de retención del fármaco y del EI. Se calculó el % de respuesta de dichas respuestas analíticas con respecto a las producidas por el fármaco y el EI en la muestra correspondiente al LIC utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Respuesta Analítica (Interferencia)} = \frac{\text{Altura del KPF o EI en la Mtra. Blanco}}{\text{Altura del KPF o EI en la Mtra. del LIC}} \times 100$$

Para la cuantificación de KPF en las muestras de plasma se utilizó la altura de los picos debido a que con este parámetro se obtuvo una menor variación en los resultados. Además, se consideró que si en algún momento se llegara a presentar alguna interferencia proveniente de la matriz biológica de un voluntario sano, el valor de la altura del pico no se vería tan afectado como el valor del área.

***CRITERIO DE ACEPTACIÓN:** El método es selectivo si la respuesta analítica, en altura del pico, de las interferencias próximas al tiempo de retención son menores al 20.0% para el LIC del KPF y menores al 5.0% para el EI.

4.2.8.2. Curva de Calibración

Para determinar la linealidad del método analítico se preparó por triplicado la curva de calibración de KPF en plasma en el intervalo de concentraciones de 0.5 a 20.0 µg/mL. El intervalo de trabajo se estableció tomando como LIC el 5.0% de la $C_{\text{máx}}$ reportada en la bibliografía y como LSC el 200% de la misma. El valor de la $C_{\text{máx}}$ reportado en estudios



farmacocinéticos en humanos, para una dosis de 100 mg de KPF, es aproximadamente de 10.0 µg/mL. (Hassanzadeh M. K., 1997).

Cada curva de calibración incluyó su muestra blanco y su muestra cero. Las muestras se procesaron de acuerdo a lo descrito en el **Diagrama 2** de la sección de Resultados y Discusión. Se determinó la relación de alturas (KPF/EI) y se seleccionó el modelo matemático al cual se ajustaron los datos. Para ello, se graficó la respuesta con respecto a la concentración de KPF en plasma, se determinó la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r).

Posteriormente, se realizaron los gráficos de los residuales para evaluar el ajuste de los datos al modelo de regresión lineal y al modelo de regresión Ln-Ln. Para elaborar estos gráficos se calculó la concentración recuperada de KPF con cada uno de los modelos matemáticos y a partir de estos valores, se calculó el % de recobro de KPF a cada nivel de concentración utilizando la siguiente expresión matemática:

$$\% \text{ de Recobro} = \frac{C_{\text{recuperada}}}{C_{\text{nominal}}} \times 100$$

Finalmente, se realizó la prueba de F de Fisher para evaluar si existía una diferencia estadísticamente significativa entre la varianza correspondiente a las respuestas analíticas de las concentraciones baja y alta del intervalo de trabajo de la curva de calibración (0.5 y 20.0 µg/mL). Para ello, se utilizaron los datos de relación de alturas KPF/EI de las 3 curvas de calibración de KPF en plasma y se calculó el promedio, la desviación estándar (DE) y la varianza (s^2) a partir de la cual, se calculó el valor de F_{exp} utilizando la siguiente expresión matemática:

$$F_{exp} = \frac{s_2^2}{s_1^2}$$

Donde:

- F_{exp} : Valor de F experimental o calculado.
- s_2^2 : Varianza de la respuesta analítica (relación de alturas KPF/EI) para la concentración de 20.0 µg/mL (LSC).



- s_1^2 : Varianza de la respuesta analítica (relación de alturas KPF/EI) para la concentración de 0.5 µg/mL (LIC).

El criterio que se utilizó para establecer la Homocedasticidad de las varianzas fue el siguiente:

$$F_{exp} < F_{tab}(f_1, f_2; 0.99)$$

Donde:

- F_{tab} : Valor de F de tablas.
- $f_1 = f_2 = n - 1$: grados de libertad para cada nivel de concentración evaluado.
- **0.99**: nivel de confianza del 99.0%.

El modelo matemático se seleccionó tomando como base el modelo que presentó el gráfico de los residuales con la menor dispersión en los valores de % de recobro de KPF en todos los niveles de concentración evaluados. El modelo matemático seleccionado fue el **modelo de regresión Ln-Ln**. La ecuación de la recta de este modelo matemático tiene la siguiente expresión general:

$$\text{Ln}\left(\frac{\text{Altura KPF}}{\text{Altura EI}}\right) = m \cdot \text{Ln}(C_{KPF}) + \text{Ln}(b)$$

Para cada curva de calibración evaluada se graficó el Ln de la relación de alturas KPF/EI respecto al Ln de la concentración de KPF, se determinó la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r). Para cada nivel de concentración, de cada curva de calibración, se calculó la concentración recuperada, la cual se define como la concentración de fármaco obtenida después de someter las muestras al proceso de extracción de KPF del plasma. Esta se calculó interpolando los datos correspondientes al Ln de la relación de alturas de KPF/EI dentro de la ecuación de la recta obtenida con su respectiva curva de calibración individual. Con la concentración recuperada obtenida para cada nivel de concentración, se calculó el % de desviación con respecto a la concentración nominal de fármaco.

***CRITERIO DE ACEPTACIÓN:** Las concentraciones recuperadas para cada nivel de concentración deben estar dentro del 15.0% de la concentración nominal, excepto para el LIC para el cual puede ser ≤ al 20.0%. Al menos el 75.0% de las concentraciones de la



curva de calibración deben cumplir con el criterio de aceptación y del total de curvas evaluadas, al menos el 50.0% de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio de aceptación.

4.2.8.3. Límite Inferior de Cuantificación

El límite inferior de cuantificación (LIC) se estableció con base en el 5.0% de la $C_{m\acute{a}x}$ reportada para el KPF, la cual es de aproximadamente 10.0 $\mu\text{g/mL}$ para una dosis de 100 mg de KPF. (Hassanzadeh M. K., 1997).

Para aceptar la concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$ como el LIC se prepararon 5 muestras de plasma adicionadas con KPF a dicha concentración las cuales fueron procesadas de acuerdo a lo descrito en el **Diagrama 2**, de la sección de Resultados y Discusión, junto con una curva de calibración de KPF en plasma preparada ese mismo día.

Se calculó la concentración recuperada de KPF en cada una las 5 muestras procesadas interpolando los datos correspondientes al logaritmo natural (Ln) de la relación de alturas de KPF/EI de dichas muestras en la ecuación de la recta obtenida con la curva de calibración de la misma corrida analítica. Con el valor promedio de las concentraciones recuperadas se calculó el %C.V. y el % de desviación absoluta promedio con respecto a la concentración nominal.

***CRITERIO DE ACEPTACIÓN:** El valor promedio de las concentraciones recuperadas obtenidas no debe tener un %C.V. mayor al 20.0% y el % de desviación promedio no debe ser mayor al 20.0% de la concentración nominal.

4.2.8.4. Precisión

La precisión del método analítico se evaluó de dos maneras: como repetibilidad o precisión intra-día y como reproducibilidad o precisión inter-día.

4.2.8.4.1. Repetibilidad

Para su evaluación se prepararon y analizaron en un mismo día, en una misma corrida analítica y por quintuplicado las muestras de KPF en plasma correspondientes al LIC, MCB, MCM y MCA., para las cuales su concentración se encuentra dentro del intervalo de trabajo. Las concentraciones de KPF en dichas muestras son 0.5, 1.5, 8.0 y 17.0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. El mismo día de análisis se preparó y analizó una curva de calibración de KPF en plasma en el intervalo de trabajo.



En el presente trabajo no se evaluó el efecto de la dilución (MCD) ya que el LSC de la curva de calibración fue equivalente al 200% del $C_{\text{máx}}$ esperado, por lo que existe poca probabilidad de que durante el estudio de BE se presenten muestras plasmáticas a una concentración de KPF mayor.

Para cada muestra analizada se calculó el Ln de la relación de alturas (KPF/EI). Con dichos valores, se calculó la concentración recuperada por interpolación en la ecuación de la recta obtenida con la curva de calibración de esa corrida analítica. Se calculó el promedio de las concentraciones recuperadas a cada nivel de concentración evaluado, es decir, a la del LIC, MCB, MCM y MCA y se calculó el % del coeficiente de variación (%C.V.) del promedio de los datos.

***CRITERIO DE ACEPTACIÓN:** El %C.V. del valor promedio de los resultados obtenidos para cada nivel de concentración no debe ser mayor al 15.0% excepto para el LIC, el cual puede ser menor o igual al 20.0%.

4.2.8.4.2. Reproducibilidad (Precisión Intermedia)

Para su evaluación se prepararon y analizaron por quintuplicado, en tres días diferentes (3 corridas analíticas diferentes), las muestras de KPF en plasma correspondientes al LIC, MCB, MCM y MCA. Las concentraciones de KPF en dichas muestras son 0.5, 1.5, 8.0 y 17.0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. El mismo día de análisis se preparó y analizó una curva de calibración de KPF en plasma en el intervalo de trabajo.

Para cada muestra analizada, se calculó el Ln de la relación de alturas KPF/EI. Con dichos valores, se obtuvo la concentración recuperada por interpolación en la ecuación de la recta de la curva de calibración correspondiente a cada muestra, es decir, aquella que fue preparada y analizada en la misma corrida analítica en que se analizaron las muestras. Se calculó el promedio de las concentraciones recuperadas para cada nivel de concentración evaluado, la desviación estándar y el % del coeficiente de variación (%C.V.) del promedio de los datos obtenidos en las tres corridas analíticas.

***CRITERIO DE ACEPTACIÓN:** El %C.V. del valor promedio de los resultados obtenidos en las tres corridas analíticas, para cada nivel de concentración, no debe ser mayor al 15.0%, excepto para el LIC, el cual puede ser menor o igual al 20.0%.



4.2.8.5. Exactitud

Para evaluar la exactitud del método se utilizaron los datos obtenidos para la evaluación de la precisión del método como repetibilidad y reproducibilidad en concentración recuperada. Para cada dato de concentración recuperada se calculó el % de desviación absoluta utilizando la siguiente expresión matemática:

$$\% \text{ Desviación} = \left| \left(\frac{C_{\text{nominal}} - C_{\text{recuperada}}}{C_{\text{nominal}}} \right) \times 100 \right|$$

Donde:

- **Concentración nominal (C_{nominal}):** Corresponde a la concentración teórica de KPF en la muestra de plasma.
- **Concentración recuperada ($C_{\text{recuperada}}$):** Corresponde a la concentración de KPF obtenida después del proceso de extracción del analito de la muestra de plasma. Dicho valor se obtiene por interpolación en la curva de calibración preparada el día del análisis.

***CRITERIO DE ACEPTACIÓN:** El valor promedio del % de desviación de las concentraciones recuperadas, para cada nivel de concentración evaluado, no debe tener un valor mayor al 15.0% excepto para el LIC que puede ser menor o igual al 20.0%.

4.2.8.6. Estabilidad

Para la evaluación de la estabilidad del KPF tanto en la matriz biológica como en las soluciones estándar y de trabajo, se realizaron las siguientes pruebas:

4.2.8.6.1. Estabilidad a Corto Plazo (Mesa de Trabajo)

Se prepararon por triplicado dos series de las MC baja y alta de concentración 1.5 y 17.0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La primera serie fue procesada y analizada de manera inmediata acompañada de una curva de calibración de KPF en plasma preparada el mismo día. La segunda serie se mantuvo sin procesar durante 6 h sobre la mesa de trabajo bajo las condiciones ambientales de temperatura. Transcurridas las 6 horas, las muestras de la serie 2 fueron procesadas y analizadas.



4.2.8.6.2. Estabilidad a Largo Plazo

Se prepararon por triplicado dos series de las MC baja y alta de concentración 1.5 y 17.0 µg/mL, respectivamente. Ambas series, sin procesar, fueron almacenadas a temperatura de congelación (-20° C) hasta la fecha de su análisis.

La serie 1 fue analizada después de 2 semanas de almacenamiento y la serie 2 después de 1 mes de almacenamiento. El día de análisis, las muestras fueron descongeladas, se homogenizaron agitándolas por 30 s en vortex, se procesaron y analizaron junto con una curva de calibración de KPF en plasma preparada ese día.

4.2.8.6.3. Estabilidad en Ciclos de Congelación y Descongelación

Se prepararon por triplicado las MC baja y alta de concentración 1.5 y 17.0 µg/mL, respectivamente. Dichas MC, sin procesar, fueron almacenadas a temperatura de congelación (-20° C) durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, las muestras se retiraron de congelación y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su completa descongelación, posteriormente las muestras se volvieron a almacenar a congelación durante 24 horas. Dicho proceso corresponde a un ciclo completo de congelación y descongelación.

Una vez que las muestras fueron sometidas a 3 ciclos de congelación y descongelación, se descongelaron, se homogenizaron agitándolas por 30 s en vortex, se procesaron y analizaron junto con una curva de calibración de KPF en plasma preparada el día del análisis.

4.2.8.6.4. Estabilidad en el Automuestreador

Se prepararon por triplicado dos series de las MC baja y alta de concentración 1.5 y 17.0 µg/mL, respectivamente. Ambas series fueron procesadas junto con una curva de calibración de KPF en plasma preparada el día del análisis. Una vez que las muestras fueron reconstituidas en FM y transferidas en los viales, se colocaron en la canastilla del automuestreador a temperatura ambiente.

Las muestras correspondientes a la serie 1 y a la curva de calibración de KPF en plasma humano fueron inyectadas en el cromatógrafo inmediatamente. La serie 2 fue inyectada después de permanecer 15 horas en el automuestreador a temperatura ambiente.



***EI CRITERIO DE ACEPTACIÓN seguido para todas las pruebas de estabilidad fue:**

El % de desviación, para cada nivel de concentración evaluado, debe estar dentro del 15.0% de la concentración nominal.

4.2.8.6.6. Estabilidad de las Soluciones Estándar

Se evaluó la estabilidad de las siguientes soluciones estándar: STD 1 de KPF, STD 3 de KPF y STD 1 de KET preparadas en MeOH y de concentración correspondiente a 2000 µg/mL, 20.0 µg/mL y 1000 µg/mL, respectivamente. La condición de almacenamiento a la cual se sometieron las soluciones de prueba fue la temperatura de refrigeración durante 1 mes, con la evaluación de la estabilidad cada semana.

Las tres soluciones fueron preparadas como se describe en los apartados **4.2.2.1**, **4.2.2.3** y **4.2.3.1**. Estas soluciones fueron seleccionadas para la evaluación de la prueba debido a que corresponden a las soluciones de mayor y menor concentración tanto para el fármaco como para el EI.

Los días de análisis se realizaron diluciones en FM de las soluciones almacenadas, las diluciones realizadas fueron:

- **STD 1 de KPF (2000 µg/mL de KPF):** Se tomó una alícuota de 100 µL la cual se transfirió a un matraz volumétrico de 10.0 mL y se llevó a la marca de aforo con FM. La concentración de KPF obtenida en esta solución es de 20.0 µg/mL.
- **STD 3 de KPF (20.0 µg/mL de KPF):** Se tomó una alícuota de 1000 µL la cual se transfirió a un matraz volumétrico de 10.0 mL y se llevó a la marca de aforo con FM. La concentración de KPF obtenida en esta solución es de 2.0 µg/mL.
- **STD 1 de KET (1000 µg/mL):** Se tomó una alícuota de 1000 µL la cual se transfirió a un matraz volumétrico de 10.0 mL y se llevó a la marca de aforo con FM. La concentración de KET obtenida en esta solución es de 100 µg/mL.

De igual manera, cada día de análisis se prepararon dichas soluciones estándar frescas y se realizaron las mismas diluciones en FM. Cada una de las soluciones preparadas en FM, correspondientes a las soluciones frescas y de prueba, fueron inyectadas por quintuplicado.



Se calculó el factor respuesta (FR) de cada una de las inyecciones realizadas y se obtuvo el promedio de los FR de las soluciones frescas y de prueba a cada concentración. Finalmente, se calculó el % de desviación del FR promedio de las soluciones de prueba con respecto al FR de las soluciones frescas. Para el cálculo del FR y del % de desviación absoluta se utilizaron las siguientes expresiones matemáticas:

$$FR = \frac{\text{Altura del pico del analito o EI}}{\text{Concentración del analito o EI}}$$

$$\% \text{ de Desviación} = \left| \left(\frac{FR_{\text{solución fresca}} - FR_{\text{solución de prueba}}}{FR_{\text{solución fresca}}} \right) \times 100 \right|$$

***CRITERIO DE ACEPTACIÓN:** Las soluciones estándar serán consideradas estables si el % de desviación obtenido no es mayor al 10.0%.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Desarrollo del Método Analítico

5.1.1. Condiciones Cromatográficas Finales para el Análisis de las Muestras

5.1.1.1. Longitud de Onda de Análisis (λ)

En la **Figura 5** se presenta el barrido de absorción del KPF en el rango del UV el cual se obtuvo de la evaluación de soluciones preparadas en MeOH y en FM. En él se puede observar que el máximo de absorción correspondiente al KPF se encuentra entre 254 y 256 nm.

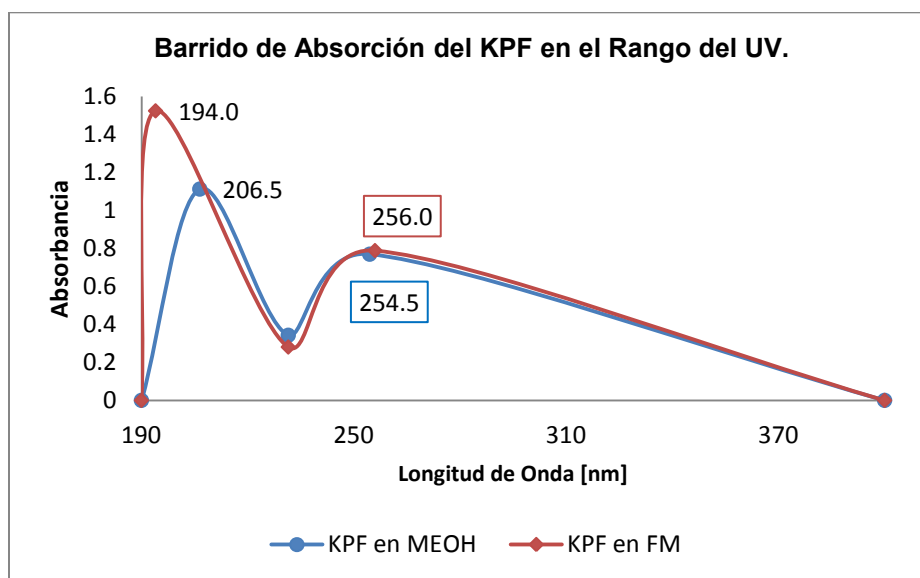


Figura 5. Espectro de Absorción del KPF en MeOH y en FM en el Rango del UV (190 – 400 nm)

La longitud de onda seleccionada para el análisis de las muestras de KPF en plasma fue de 254 nm, esto con base en el máximo de absorción obtenido en el barrido realizado y en la longitud de onda de análisis reportada en la FEUM 11va edición para la prueba de valoración de cápsulas que contienen KPF, la cual se realiza por CLAR.

5.1.1.2. Selección de la Columna Cromatográfica

En la **Tabla 13** se describen las características de los picos y los tiempos de retención (t_r) obtenidos para el KPF en cada una de las columnas cromatográficas de fase reversa evaluadas:



Tabla 13. Columnas Cromatográficas Evaluadas.

Columna Cromatográfica	t _r del KPF [min]	Características del Pico del Analito.
Zorbax Eclipse XDB-C18	5.9	Picos ligeramente ensanchados, no resueltos por coleo con componentes endógenos del plasma.
NOVA-PAK C18	3.2	Picos bien definidos, delgados, simétricos, sin coleo con componentes endógenos del plasma.
Zorbax SB-C18	6.2	Aumento en el tiempo de corrida, picos ensanchados y asimétricos por coleo con componentes endógenos del plasma.
Gemini C18	6.7	Aumento en el tiempo de corrida, en el ensanchamiento y en coleo del pico con componentes endógenos del plasma.

En las **Figuras 6, 7, 8 y 9** se presentan los cromatogramas obtenidos del análisis de KPF en solución en cada una de las columnas cromatográficas evaluadas. En ellos se puede observar que los picos menos adecuados, debido a su ensanchamiento y poca simetría a causa del coleo, fueron los obtenidos con las columnas Zorbax SB-C18 y Gemini C18 por lo cual ambas columnas fueron descartadas.

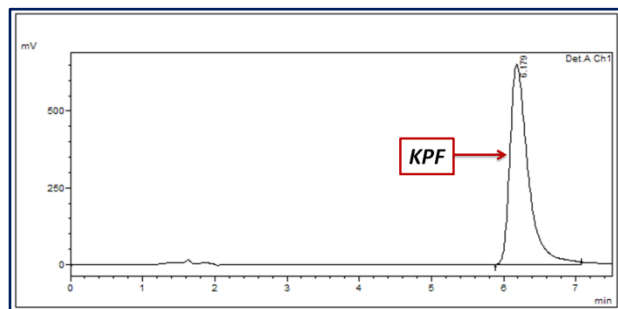


Figura 6. Cromatograma del KPF en solución, analizado en la columna Zorbax SB-C18.

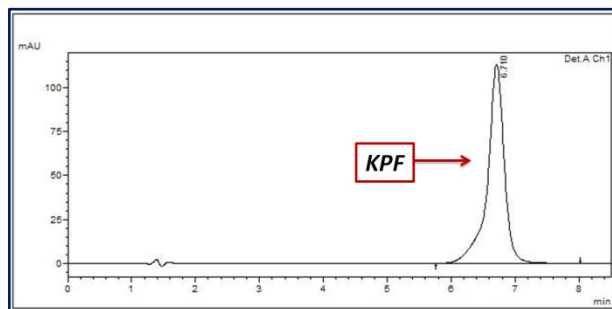


Figura 7. Cromatograma del KPF en solución, analizado en la columna Gemini C18.

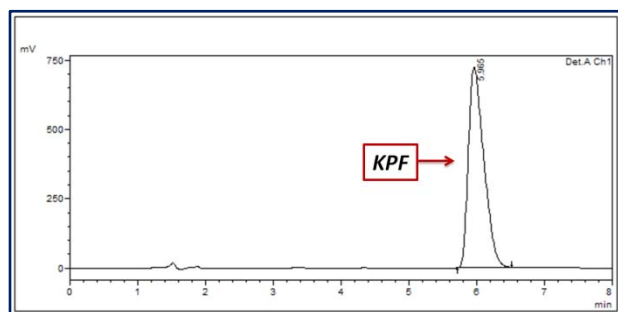


Figura 8. Cromatograma del KPF en solución, analizado en la columna Zorbax Eclipse XDB-C18.

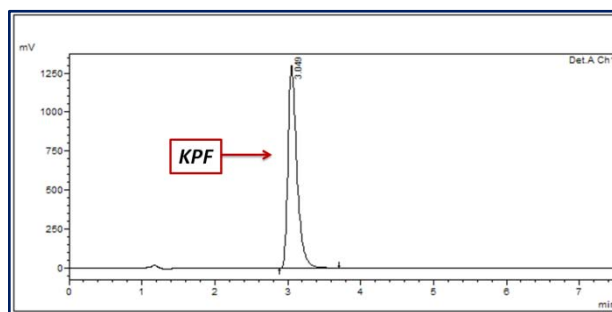


Figura 9. Cromatograma del KPF en solución, analizado en la columna NOVA PAK-C18.



Posteriormente, se analizaron muestras de plasma conteniendo KPF, utilizando las columnas Zorbax Eclipse XDB-C18 y NOVA PAK C-18. De esta prueba, se encontró que los picos más simétricos, que presentaron poco coleo, fueron los obtenidos con la columna NOVA PAK-C18, además de que los tiempos de corrida eran más cortos.

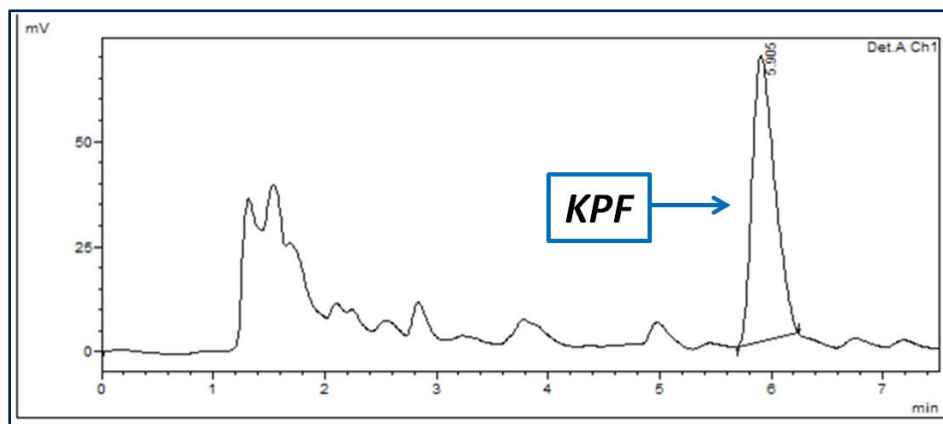


Figura 10. Cromatograma correspondiente a una muestra de KPF en plasma (5.0 µg/mL), analizada en la columna Zorbax Eclipse XDB-C18.

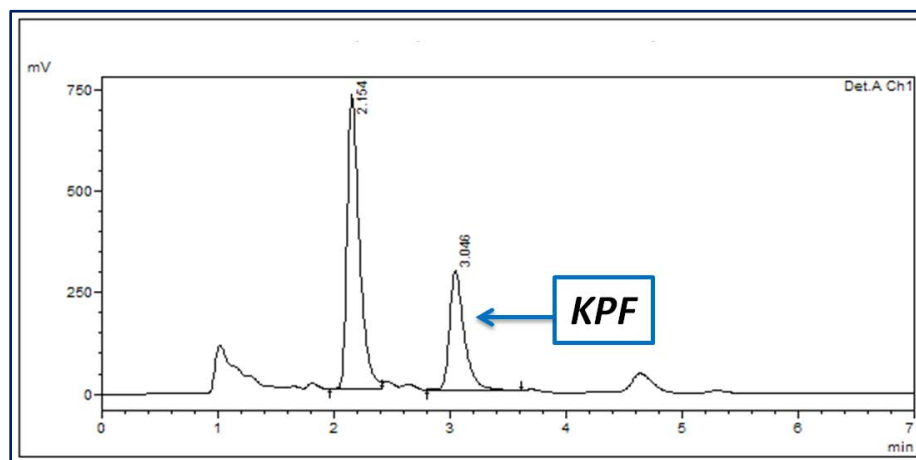


Figura 11. Cromatograma correspondiente a una muestra de KPF en plasma (5.0 µg/mL), analizada en la columna NOVA PAK-C18.

Por lo anterior, la columna seleccionada para el análisis de las muestras fue la NOVA PAK-C18. También se decidió utilizar una pre-columna Phenomenex C18, con el mismo empaque, con el objetivo de retener posibles residuos de material sólido provenientes de la muestra de plasma extraída, evitando así el desgaste de la columna y la modificación de su eficiencia en la separación.



5.1.1.3. Composición de la Fase Móvil

Para la selección de la fase móvil, se tomaron en cuenta los datos recopilados de las referencias bibliográficas, en las cuales se encontró que en general para cuantificar KPF por CLAR se utilizaban fases móviles compuestas por un disolvente orgánico como el MeOH o ACN y una fase acuosa acidificada con ácido acético, ácido fosfórico o alguna amortiguadora con pH ácido. También se revisó la FEUM 11va edición, la cual establece que para la prueba de valoración de cápsulas de ketoprofeno, la fase móvil está constituida por ACN: Agua: Ácido Acético glacial en proporciones 90:110:1. Una fase móvil de composición semejante, Ácido Acético 0.2% pH 3.0: ACN (50:50), se encontró reportada por **Raja y col.** (Rajaa Farhan Hussein., 2011) por lo que se realizaron pruebas con dicha fase móvil para evaluar la resolución de la respuesta analítica correspondiente al fármaco con respecto a las obtenidas por componentes endógenos del plasma humano, además de un tiempo de retención adecuado para la separación del analito.

La fase móvil seleccionada está constituida por Ácido Acético al 0.2% pH 3.1: ACN en proporción 55:45. Con ella, se obtuvo la mejor resolución del KPF de los componentes endógenos del plasma.

5.1.1.4. Volumen de Inyección de la Muestra

El volumen de inyección de 50 μ L fue seleccionado debido a que con él se obtuvieron respuestas analíticas adecuadas en términos de área y altura del pico del KPF, lo cual era necesario debido a que la concentración más baja, correspondiente a 0.5 μ g/mL, produce una respuesta analítica muy baja a volúmenes de inyección menores, lo cual podría generar complicación en el análisis de una muestra plasmática a esa concentración.

5.1.1.5. Velocidad de Flujo de la FM y Tiempo de Corrida

Con la velocidad de flujo de la fase móvil de 1.0 mL/min se obtuvo una mejor separación del KPF de los componentes de la matriz. A una velocidad de flujo mayor, el pico correspondiente al analito presentó muy poca separación de los componentes endógenos del plasma cercanos al tiempo de retención, por lo cual la resolución no era buena y a concentraciones bajas de KPF se presentaban picos coaleados.

Una vez seleccionada la fase móvil, la velocidad de flujo de la misma y tomando en cuenta el tiempo de retención del fármaco bajo dichas condiciones cromatográficas, el cual fue de aproximadamente 3.2 min, se decidió que el tiempo de corrida por muestra fuera de 7.0 min.



5.1.1.6. Estándar Interno (EI)

El uso de un estándar interno (EI) en un método por cromatografía de líquidos es de gran importancia. Ello ayuda a compensar variaciones de parámetros físicos como la inexactitud en el pipeteo o posibles pérdidas del analito durante el procesamiento de las muestras, es decir, elimina posibles errores de operación de la muestra.

Para la selección del EI, se buscaron moléculas con propiedades fisicoquímicas semejantes a las del analito, en términos de polaridad, solubilidad y carácter ácido-base. Esto con el objetivo de encontrar una molécula que presentara propiedades cromatográficas semejantes a las del KPF, permitiendo así que ambos fármacos presenten tiempos de retención cercanos, y que la presencia del EI ayudara a corregir las diferencias que pudieran presentarse en las respuestas analíticas del KPF debido a posibles errores cometidos durante el procesamiento de muestras.

En las **Figuras 12, 13, 14 y 15**, se presentan los perfiles cromatográficos obtenidos con cada uno de los estándares empleados y en la **Tabla 14**, se presentan las observaciones encontradas con los distintos fármacos analizados para su uso como posible EI.

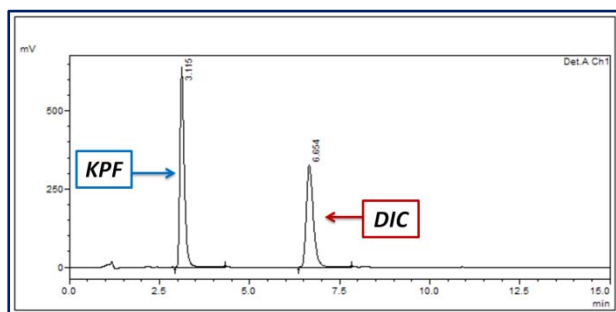


Figura 12. Cromatograma correspondiente al KPF y DIC en solución.

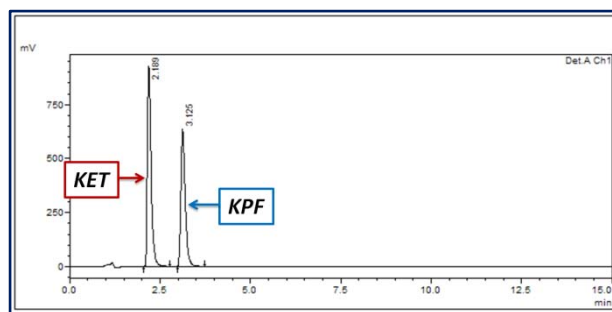


Figura 13. Cromatograma correspondiente al KPF y KET en solución.

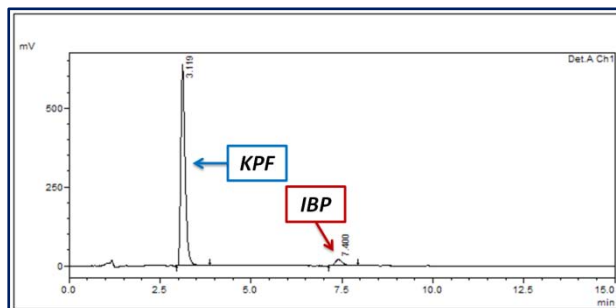


Figura 14. Cromatograma correspondiente al KPF e IBP en solución.

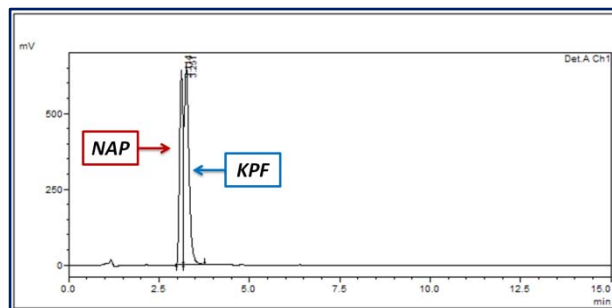


Figura 15. Cromatograma correspondiente al KPF y NAP en solución.



El fármaco que presentó las mejores características y que se seleccionó como EI fue el KET. En la **Figura 13**, se puede observar que al utilizar este fármaco como EI, los tiempos de corrida no tuvieron que ser modificados ya que su t_r , bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas, es menor al del KPF.

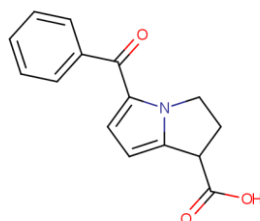


Figura 16. Estructura química del Ketorolaco (KET), fármaco seleccionado como EI.

Tabla 14. Resultados de los fármacos evaluados para su uso como posible Estándar Interno (EI).

Fármaco	t_r [min]	Observaciones
KET: Ketorolaco (Sal de Trometamina)	2.2 min	*Presentó la mejores características como EI debido a que: <ul style="list-style-type: none"> ▪ Los tiempos de corrida no se tuvieron que modificar ya que su t_r, bajo las condiciones cromatográficas seleccionadas, es menor al del KPF. ▪ Ambos fármacos eluyeron a t_r cercanos con una buena resolución de los picos. ▪ A una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ de KET, se obtuvieron picos con alturas muy semejantes a las obtenidas con el KPF en plasma a una concentración de 10.0 $\mu\text{g/mL}$.
DIC: Diclofenaco Sódico.	6.7 min	*El pico de este estándar salió muy separado del pico del KPF. *Su desventaja fue que al tener un t_r de casi 7.0 min, el tiempo de corrida de las muestras hubiera tenido que incrementarse. *Para lograr una respuesta analítica igual en magnitud a la generada por el KPF se hubieran tenido que utilizar concentraciones más altas.
IBP: Ibuprofeno.	7.4 min	*A la longitud de onda de análisis (254 nm), su respuesta analítica fue muy pequeña a pesar de que la solución utilizada para la prueba tenía una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$. *De haber sido seleccionado como EI se hubieran tenido que utilizar concentraciones más altas lo que pudo haber saturado la columna. *El tiempo de corrida de las muestras se hubiera incrementado.
NAP: Naproxeno sódico.	3.1 min	*Presentó una respuesta analítica adecuada en cuanto a tamaño del pico. *Desventaja: Bajo las condiciones cromatográficas empleadas en el análisis, el pico del KPF y del NAP coeluyen debido a la cercanía en sus t_r , por lo que las respuestas cromatográficas se empalmaron.



5.1.1.7. Condiciones Cromatográficas Finales

Con base en lo anteriormente mencionado, las condiciones cromatográficas empleadas para el análisis de las muestras de KPF en plasma fueron las siguientes:

- **Columna Cromatográfica:** NOVA-PAK C18 de Waters, dimensiones de 3.9 mm x 150 mm y 4.0 μm de tamaño de partícula.
- **Fase Móvil:** Solución de Ácido Acético al 0.2%, pH 3.1: ACN (55:45).
- **Velocidad de Flujo de la FM:** 1.0 mL/min.
- **Longitud de Onda:** 254 nm (UV).
- **Lámpara del Detector:** Deuterio.
- **Volumen de Inyección de la muestra:** 50 μL .
- **Tiempo de corrida por muestra:** 7.0 min.
- **Tipo de análisis:** Análisis Isocrático.
- **Temperatura de análisis:** Temperatura ambiente.
- **Temperatura del automuestreador:** Temperatura ambiente.

5.1.2. Desarrollo del Método para la Extracción del KPF de las Muestras Plasmáticas

La técnica seleccionada para la extracción del KPF de las muestras de plasma fue la extracción líquido-líquido con disolventes orgánicos no polares, el cual fue seleccionado con base en las propiedades fisicoquímicas del KPF. Principalmente se tomó en cuenta: su baja solubilidad en agua, su solubilidad en disolventes orgánicos, su elevado valor de Log P, el cual habla de su alta afinidad a disolventes poco polares, y su carácter de ácido débil (pKa de 4.45) que permite tener la molécula del fármaco en un estado ionizado o no ionizado dependiendo del pH del medio en el que se encuentre.

5.1.2.1. Volumen de Muestra de Plasma

Durante el desarrollo del método, se observó que utilizar cantidades bajas de plasma, disminuía considerablemente la cantidad de interferencias provenientes de la matriz biológica, esto favorecía que la cuantificación fuera más eficiente y confiable.

Después de evaluar distintos volúmenes de plasma, se encontró que la cantidad más adecuada para analizar es de 600 μL de plasma, ya que a ese volumen se logró obtener un cromatograma más limpio, se obtuvieron respuestas analíticas adecuadas para el analito en cuanto a intensidad y simetría del pico, principalmente para las concentraciones bajas de la curva de



calibración. Para incrementar la intensidad de la respuesta analítica del fármaco, las muestras se concentraron al momento de reconstituirlas, empleando un volumen de 200 μ L de FM.

5.1.2.2. Disolvente de Extracción y Volumen a Utilizar

Por la naturaleza del analito de interés, los disolventes orgánicos evaluados para la extracción del KPF de las muestras de plasma fueron de carácter no polar.

Al evaluar las mezclas de extracción compuestas de Acetato de Etilo: Hexano y Éter Etilico: Hexano se encontró que la limpieza de la muestra era poco eficiente, principalmente con la mezcla compuesta de Acetato de Etilo: Hexano, ya que esta mezcla de disolventes extraía una gran cantidad de componentes endógenos del plasma que producían muestras amarillentas y turbias, lo que se vio reflejado en los cromatogramas que presentaron una gran cantidad de interferencias presentes en tiempos de retención cercanos al t_r del analito. Con la segunda mezcla de extracción, compuesta de Éter Etilico: Hexano, se observó una mejora en la limpieza de las muestras, sin embargo, se seguían presentando sólidos en las muestras reconstituidas.

Con el disolvente que se obtuvieron mejores resultados fue con el MTBE. El uso de este disolvente, disminuyó la cantidad de señales correspondientes a componentes endógenos del plasma y la intensidad de la respuesta analítica producida por los mismos., también se observó que al momento de reconstituir, las muestras generadas eran translúcidas, libres de turbidez y de sólidos suspendidos que interfirieran en el análisis, o en su defecto que pudieran afectar el desempeño de la columna o el equipo cromatográfico.

Con respecto al volumen de disolvente de extracción, se evaluaron 4.0 mL y 5.0 mL, siendo este último con el cual se obtuvieron % de recobro más altos y consistentes en todo el intervalo de trabajo.

5.1.2.3. Agente Acidificante de la Muestra

Dado que el KPF es un ácido débil con pKa de 4.45, se esperaría que en el pH del plasma humano (7.4), el KPF se encuentre en su forma ionizada, por lo que se decidió utilizar un agente acidificante y así favorecer su extracción de la matriz en la fase orgánica.

De los tres ácidos evaluados, el más adecuado fue el H_3PO_4 debido a que la adición de este ácido a las muestras, favoreció la extracción del KPF. En el caso del $HClO_4$, al ser adicionado a las muestras produjo un precipitado que impedía que la agitación fuera homogénea y eficiente, mientras que el H_3PO_4 sólo ejerció el efecto acidificante deseado sin modificar la consistencia



de la matriz biológica e interferir negativamente en la extracción del analito. El volumen de ácido adicionado a cada muestra plasmática fue de 150 μ L.

5.1.2.4. Agente Precipitante de Proteínas Plasmáticas

Tomando en cuenta que el KPF es un fármaco que presenta un alto grado de unión a proteínas plasmáticas, fue necesario evaluar diferentes agentes precipitantes que rompieran la interacción fármaco-proteína.

A pesar de que en la literatura se encuentra reportado que, disolventes orgánicos como el MeOH y ACN son los mejores agentes precipitantes de proteínas plasmáticas, (Polson, 2003), para el presente método estos no fueron los más adecuados, posiblemente porque uno de ellos presenta un carácter polar y el otro medianamente polar, lo cual favoreció la extracción de otros componentes no deseados de la matriz, los cuales interferían en el análisis. A pesar de que el H_3PO_4 , no es el agente precipitante de elección, se ha demostrado que tiene un efecto sobre la precipitación de proteínas, ya que al disminuir el pH a valores menores al punto isoeléctrico (pI) de las proteínas, se forman sales insolubles con el grupo amino de las moléculas proteicas cargados positivamente, lo cual favorece su precipitación. (Polson, 2003), Es por lo anterior que se decidió utilizar el H_3PO_4 como agente precipitante, obteniendo los resultados más adecuados, debido a que su adición no dificultó la agitación de las muestras ni influyó en la limpieza de las mismas como lo hicieron el MeOH, ACN y $HClO_4$, los cuales dieron lugar a una alta cantidad de precipitado, lo cual interfirió en la agitación de las muestras. Además se tomó en cuenta que esta sustancia también sería utilizada como agente acidificante de las muestras lo cual tendría ventajas en el método de extracción, tales como: la adición de una menor cantidad de sustancias químicas, ajenas a la matriz, que pudieran influir en la extracción y el análisis cromatográfico., la reducción del número de pasos implicados en el procesamiento de las muestras, y con ello una menor posibilidad de cometer errores durante el proceso.

5.1.2.5. Tiempo y Tipo de Agitación

Se encontró que el tipo de agitación más eficiente, fue la agitación orbital a 350 rpm durante 10 min con valores de recobro mayores al 85.0% en el rango de trabajo, lo cual puede estar relacionado que con la posición de los tubos, la superficie de contacto entre la matriz biológica y el disolvente de extracción fuera mayor.

La agitación por vibración resultó ser el tipo de agitación menos eficiente, ya que el equipo no alcanzaba velocidades de agitación mayores y por la posición de los tubos durante la agitación,



la superficie de contacto entre el disolvente de extracción y la matriz era pequeña y se obtuvieron porcentos de recobro bajos, además de que la precisión fue baja.

- **Centrifugación de las Muestras:** Se determinó que el tiempo y la velocidad de centrifugación, para separar los componentes plasmáticos (fase acuosa) de la fase orgánica, fue de 3500 rpm durante 10 min.
- **Congelación de las Muestras:** Se observó que la forma más eficiente y rápida de separar la fase orgánica de la fase acuosa, sin acarrear componentes plasmáticos o residuos de agua que impidieran la evaporación del disolvente de extracción, fue el congelar las muestras a -70° C durante 20 min.

5.1.2.6. Procedimiento Final para la Extracción del KPF del Plasma Humano.

A continuación se describe el método analítico empleado para la cuantificación de ketoprofeno:

-A 600 μ L de la muestra de plasma humano:

- Se adicionaron 100 μ L de la Solución de EI de KET de concentración de 200 μ g/mL.
- Se agregaron 150 μ L de la solución de H_3PO_4 5.0 M.
- Las muestras se agitaron durante 30 s en vortex.
- Se adicionaron 5.0 mL del disolvente de extracción, Metil terbutil éter (MTBE).
- Las muestras se agitaron orbitalmente a 350 rpm durante 10 min.
- Se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min.
- Las muestras se congelaron a -70° C durante 20 min.
- La fase orgánica se transfirió a tubos de ensaye limpios.
- La fase orgánica se evaporó a sequedad en un baño a 40° C y bajo una corriente suave de N_2 durante 20 min.
- El sólido remanente se reconstituyó con 200 μ L de FM.

En el **Diagrama 2** se esquematiza el procedimiento seguido para la extracción del KPF de las muestras de plasma humano.

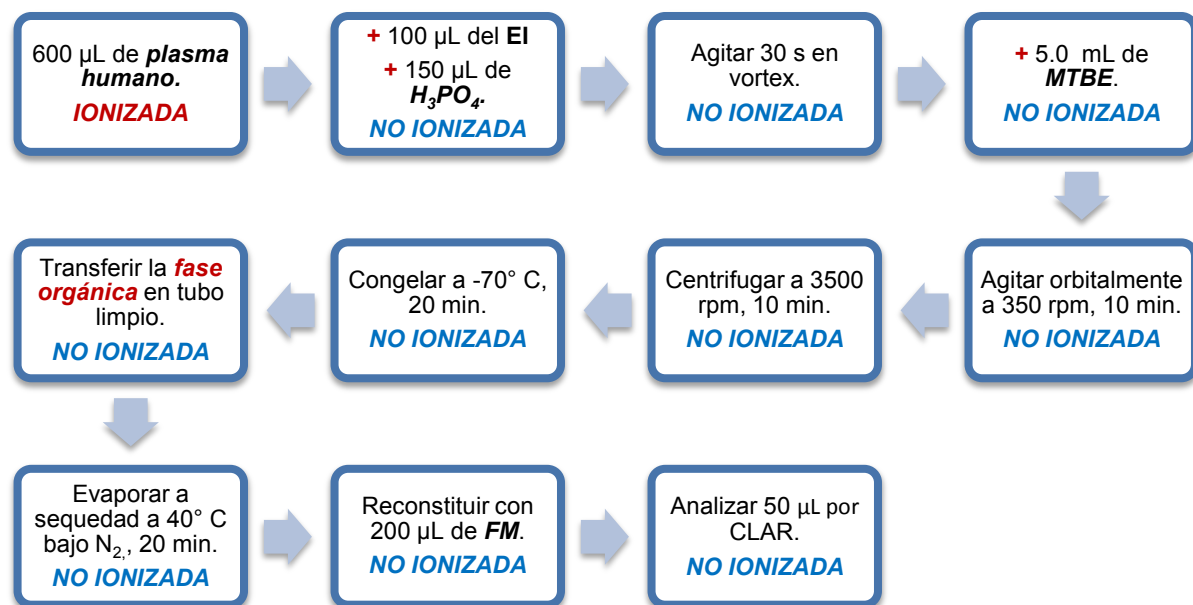


Diagrama 2. Procedimiento de extracción del KPF de las muestras de plasma humano. En cada etapa del proceso de extracción del analito se indica el estado de ionización de la molécula de KPF.

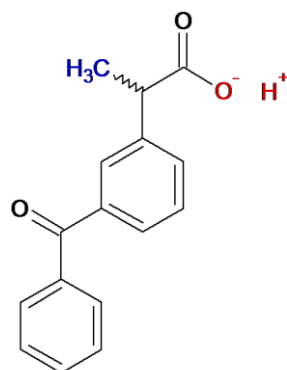


Figura 17. Estructura química **ionizada** del KPF. Esta forma se presenta cuando el fármaco se encuentra a valores de pH mayores a su valor de pKa (4.45)-

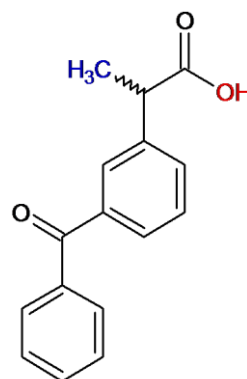


Figura 18. Estructura química **no ionizada** del KPF. Esta forma se presenta cuando el fármaco se encuentra a valores de pH menores a su valor de pKa (4.45).

En las **Figuras 19, 20 y 21** se presentan los cromatogramas típicos de las MC baja, media y alta de KPF en plasma adicionadas con el estándar interno, sometidas al proceso de extracción descrito en el apartado **5.1.2.6.** y analizadas por CLAR bajo las condiciones cromatográficas descritas en el apartado **5.1.1.7.**

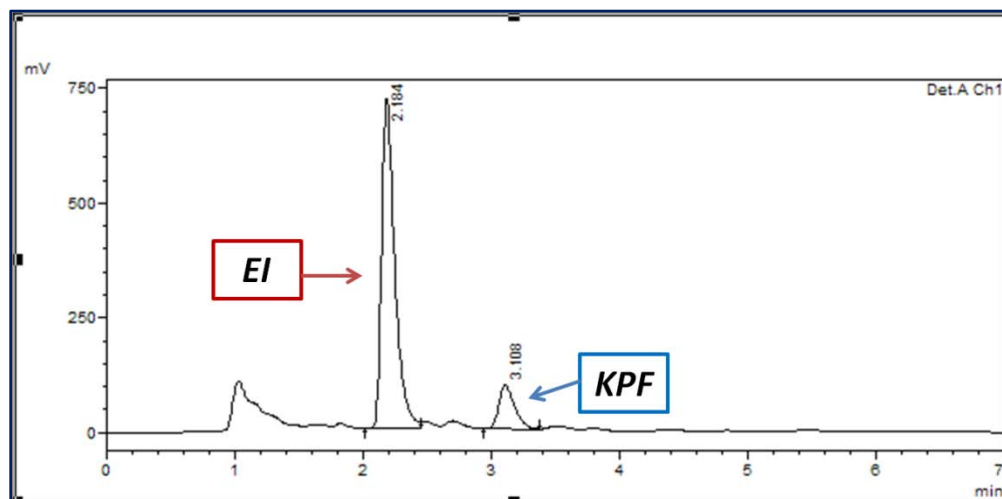


Figura 19. Cromatograma correspondiente a la MCB de KPF en plasma sometida a las condiciones finales de extracción y analizada por CLAR bajo las condiciones cromatográficas finales. La concentración de KPF y del EI en esta muestra es de 1.5 $\mu\text{g/mL}$ y de 200 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

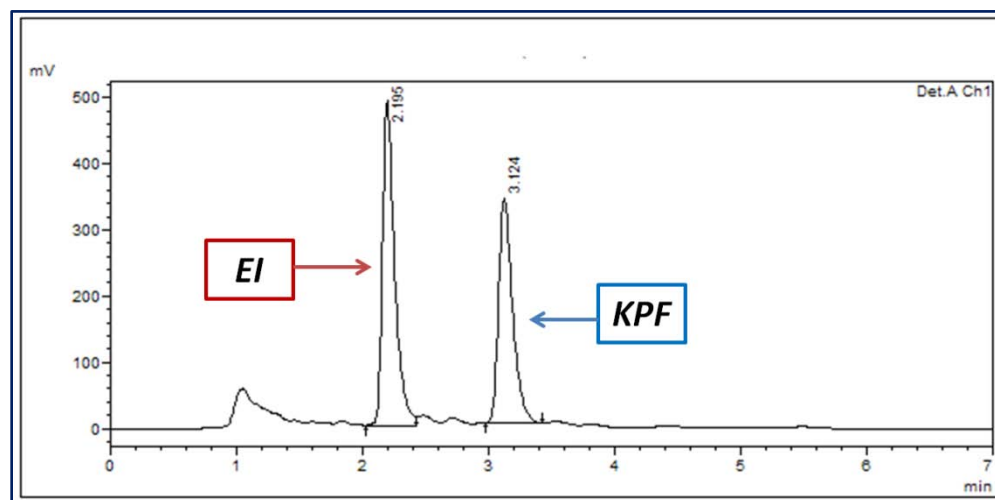


Figura 20. Cromatograma correspondiente a la MCM de KPF en plasma sometida a las condiciones finales de extracción y analizada por CLAR bajo las condiciones cromatográficas finales. La concentración de KPF y del EI en esta muestra es de 8.0 $\mu\text{g/mL}$ y de 200 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

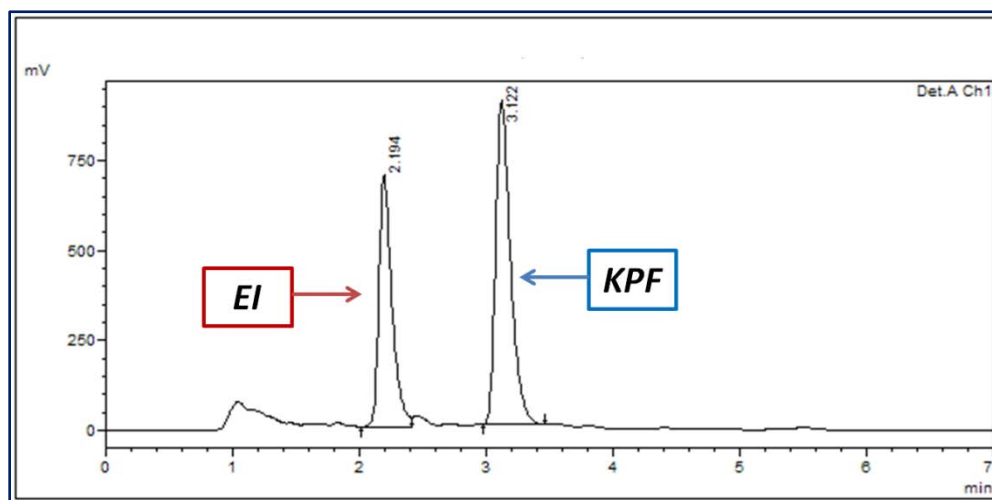


Figura 21. Cromatograma correspondiente a la MCA de KPF en plasma sometida a las condiciones finales de extracción y analizada por CLAR bajo las condiciones cromatográficas finales. La concentración de KPF y del EI en esta muestra es de 17.0 $\mu\text{g/mL}$ y de 200 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

5.2. Validación del Método Analítico

5.2.1. Selectividad

En la **Tabla 15** se presentan los resultados obtenidos de la prueba de selectividad. En ella se puede observar que el método analítico es selectivo para la cuantificación de KPF en muestras de plasma humano, ya que las respuestas analíticas de las interferencias, cercanas a los t_r del fármaco y del EI, presentes en las muestras blanco de plasma normal analizadas no son mayores al 20.0% de la respuesta del analito en el LIC ni mayores al 5.0% de la respuesta analítica del EI.

Tabla 15. Respuesta Analítica de las Muestras Blanco de Plasma Analizadas.

Muestra Blanco de Plasma Normal.	% Respuesta con Respecto a la Altura de los Picos Obtenidos en la Muestra del LIC.			
	% LIC	t_r [min]	% EI	t_r [min]
Individuo A	2.6 %	3.3	0.9 %	2.2
Individuo B	19.3 %	3.2	2.2 %	2.2
Individuo C	19.7 %	3.3	2.6 %	2.2
Individuo D	16.0 %	3.3	0.5 %	2.2
Individuo E	5.7 %	3.3	1.3 %	2.2
Individuo F	3.4 %	3.3	0.4 %	2.2
Mezcla de Plasma	7.5 %	2.9 min	1.1 %	2.2 min



En las **Figuras 22 y 23** se presentan los cromatogramas típicos obtenidos con una muestra blanco de plasma y el de la muestra correspondiente al LIC (0.5 µg/mL) de KPF.

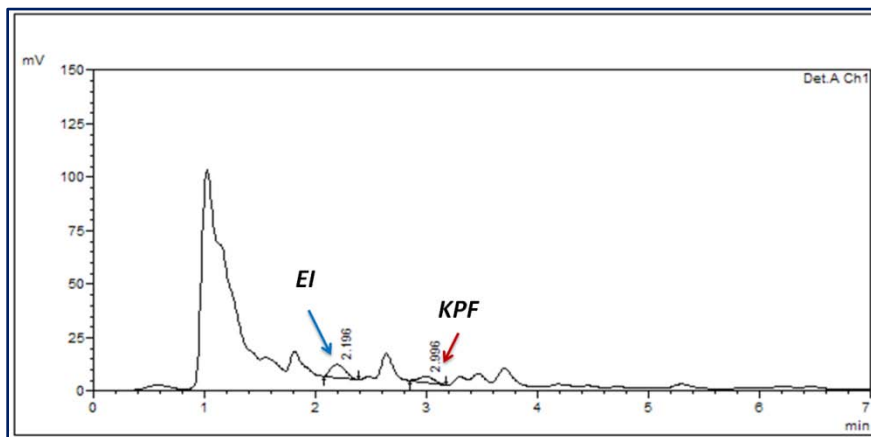


Figura 22. Cromatograma típico correspondiente a una muestra blanco de plasma.

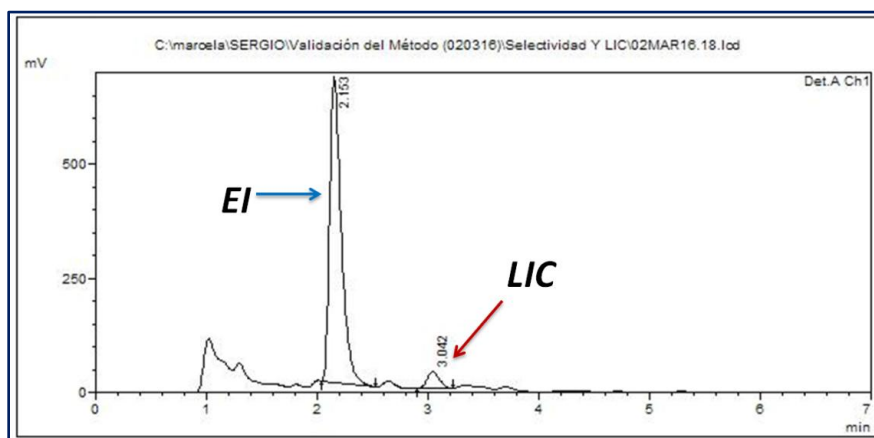


Figura 23. Cromatograma típico correspondiente a una concentración de 0.5 µg/mL de KPF (LIC).

5.2.2. Curva de Calibración

El intervalo de trabajo seleccionado para la curva de calibración fue de 0.5 µg/mL a 20 µg/mL. La gráfica de respuesta promedio contra concentración de KPF se presenta en la **Figura 24**. Los datos utilizados para graficarla se obtuvieron de calcular el promedio de la relación de alturas KPF/EI de las 3 curvas de calibración realizadas para la evaluación de éste parámetro.

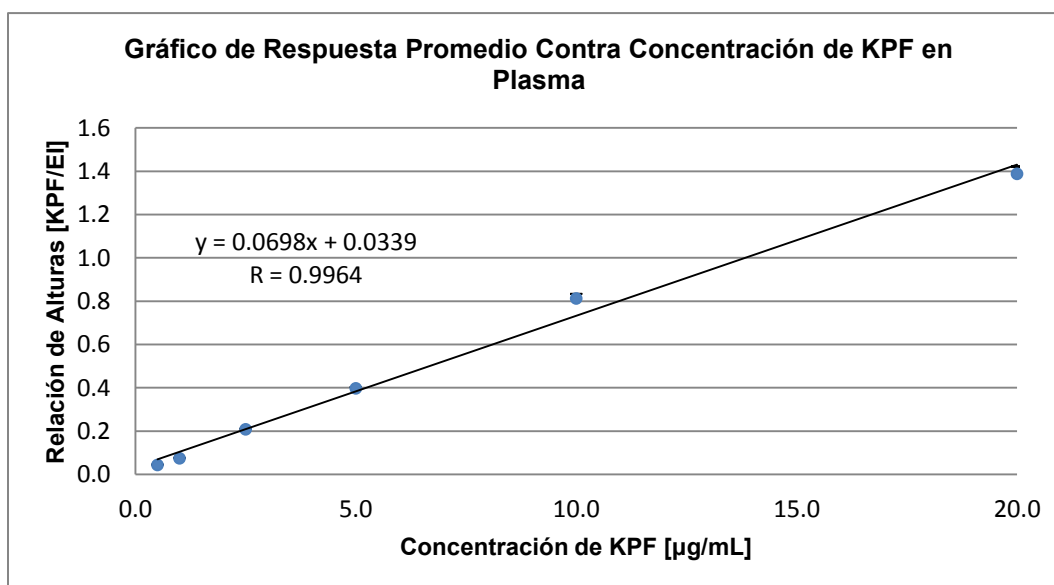


Figura 24. Gráfico de Respuesta Promedio contra Concentración de KPF en plasma ($n = 3$).

Los resultados obtenidos con cada curva de calibración se graficaron en términos de la concentración de KPF contra la respuesta analítica (relación de alturas KPF/EI), se calculó la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (r). Los resultados mostraron que, a pesar de que los coeficientes de correlación obtenidos con el modelo lineal eran mayores a 0.99, al calcular las concentraciones recuperadas a cada nivel de concentración, los % de desviación para las concentraciones correspondientes a 0.5 y 1.0 µg/mL fueron muy altos (mayores al 20% y al 15%, respectivamente).

En la **Figura 25**, se presenta el gráfico de los residuales que incluye los datos de las 3 curvas de calibración evaluadas. En ella se observa que la dispersión de los resultados no fue proporcional en todo el rango de concentraciones, lo que indica que los datos no cumplían con el criterio de homocedasticidad; cuando se cumple con el criterio de homocedasticidad en los resultados, la varianza de los datos se mantiene constante en todos los niveles de concentración evaluados. La falta de homocedasticidad en los datos puede ser atribuida a que en el intervalo de trabajo de la curva de calibración se incluyen tres niveles de magnitud en las concentraciones evaluadas: de 0.1 a 1.0 µg/mL, de 1.0 a 10.0 µg/mL y de 10.0 a 100.0 µg/mL.

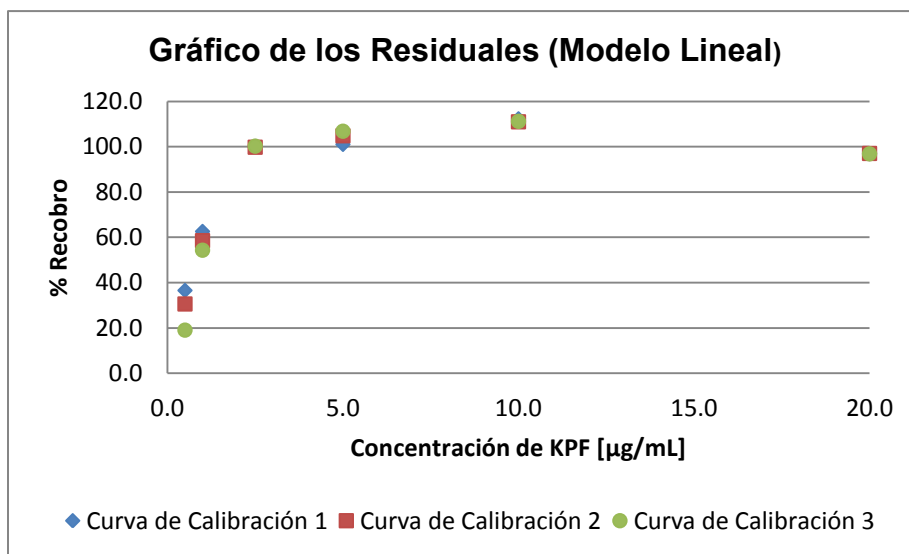


Figura 25. Gráfico de los Residuales para evaluar el ajuste de los datos al modelo de regresión lineal.

Para evaluar la homogeneidad de las varianzas en el intervalo de trabajo de la curva de calibración, se compararon las varianzas de las respuestas obtenidas con el LIC y el LSC.

Al comparar el valor de F_{exp} con el de tablas (F_{tab}), con un nivel de confianza del 99.0%, se obtuvo que el valor de F calculado fue mayor a la F_{tab} lo que indica que la varianza no es constante en todo el intervalo de la curva de calibración, por lo tanto no existe homocedasticidad en los resultados. La **Tabla 16** muestra los datos obtenidos del cálculo de F_{exp} :

$$F_{exp} = \frac{s_2^2}{s_1^2} = \frac{1.14 \times 10^{-3}}{2.73 \times 10^{-6}} = 415.89$$

Tabla 16. Prueba de homogeneidad de las varianzas para la selección del modelo de ajuste de la curva de calibración (Prueba de F)

C_{KPF} [µg/mL]	Respuesta KPF/EI	Promedio (n=3)	DE	s^2	F_{exp}	F_{tab} (2, 2, 0.99)
0.5	0.0441	0.0440	1.6523×10^{-3}	2.73×10^{-6}	415.89	99.00
	0.0456					
	0.0423					
20.0	1.4140	1.3885	3.3696×10^{-2}	1.14×10^{-3}		
	1.4012					
	1.3503					

$$F_{exp} > F_{tab} \therefore \text{no existe homocedasticidad}$$



Considerando lo anterior, se decidió probar el modelo Ln (Respuesta analítica) – Ln (Concentración de KPF). Con este modelo de regresión, se obtuvo un coeficiente de correlación mayor a 0.99 y los % de desviación, para los 6 niveles de concentración evaluados, cumplen con los criterios establecidos en la NOM-177-SSA1-2013 para la prueba de Curva de Calibración.

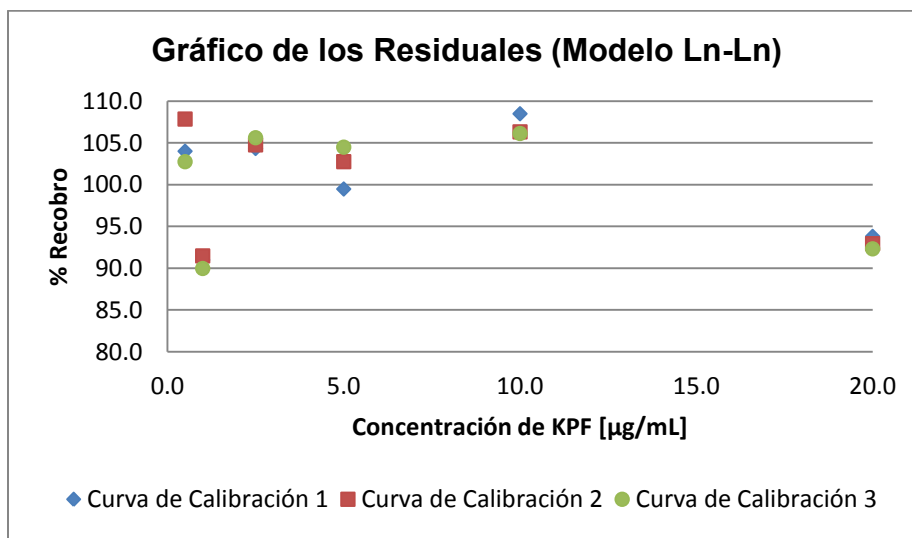


Figura 26. Gráfico de los Residuales para evaluar el ajuste de los datos al modelo de regresión Ln-Ln.

En la **Figura 27** se muestra una curva típica de calibración de KPF en plasma. Los datos utilizados para graficarla se obtuvieron de calcular el Ln del promedio de la relación de alturas KPF/EI de las 3 curvas de calibración realizadas para la evaluación de este parámetro.

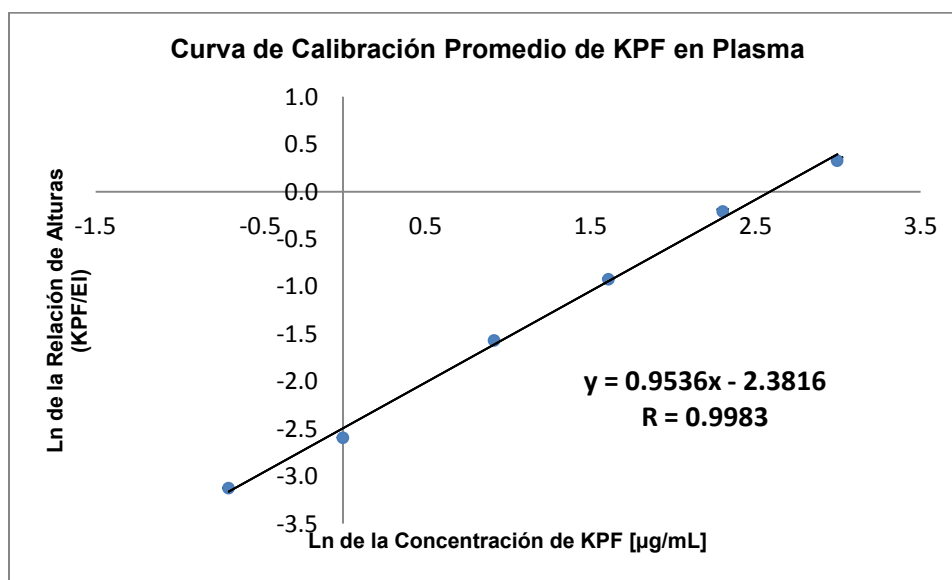


Figura 27. Curva de Calibración Promedio de KPF en Plasma (n = 3).



Tabla 17. Pendiente, intercepto y coeficiente de correlación de las Curvas de Calibración evaluadas.

No. Curva de Calibración	Pendiente (m)	Ln del Intercepto [Ln (b)]	Coefficiente de Correlación (r)
1	0.9674	-2.4899	0.9988
2	0.9573	-2.4700	0.9987
3	0.9671	-2.5198	0.9986
Promedio. (n=3)	0.9536	-2.3816	0.9983

La ecuación de la recta correspondiente a una curva de calibración de KPF en plasma, ajustada al modelo Ln-Ln tiene la siguiente expresión general:

$$\text{Ln} \left(\frac{\text{Altura KPF}}{\text{Altura EI}} \right) = m \cdot \text{Ln}(C_{KPF}) + \text{Ln}(b)$$

En la **Tabla 18** se observa que para cada nivel de concentración, los valores de % de desviación con respecto a la concentración nominal fueron menores al 15.0% y menores al 20.0% para el LIC.

Tabla 18. % de desviación para cada nivel de concentración de las Curvas de Calibración evaluadas.

C _{nominal} de KPF [µg/mL]	No. de Curva de Calibración.			
	1	2	3	Promedio (n=3)
0.5	4.01%	7.86%	2.76%	3.37%
1.0	9.01%	8.52%	10.02%	11.00%
2.5	4.34%	4.77%	5.62%	7.66%
5.0	0.51%	2.76%	4.49%	1.29%
10.0	8.49%	6.33%	6.13%	8.39%
20.0	6.18%	7.05%	7.67%	8.03%

5.2.3. Límite Inferior de Cuantificación

En la **Tabla 19** se presentan los resultados de precisión y exactitud en la cuantificación del LIC, en ella se puede observar que la cuantificación fue precisa y exacta con un %C.V. del promedio de las concentraciones recuperadas no mayor al 20.0%. Así mismo el % de desviación promedio con respecto al valor nominal (0.5 µg/mL), no fue mayor al 20.0%.



Tabla 19. Evaluación de la Precisión y Exactitud en la Cuantificación del LIC.

No. de Réplica	C _{recuperada} de KPF [µg/mL]	% de Desviación
1	0.546	9.15%
2	0.542	8.46%
3	0.584	16.76%
4	0.592	18.46%
5	0.584	16.89%
Promedio	0.569	13.94 %
DE	0.0237	
%C.V.	4.16%	

5.2.4. Precisión y Exactitud

La precisión del método analítico desarrollado fue evaluada como repetibilidad y como reproducibilidad o precisión intermedia entre varios días de análisis y corridas analíticas. Los datos correspondientes a estas pruebas se presentan en las **Tablas 20 y 21**. Dado que los valores de %C.V. fueron menores al 15.0% y menores al 20.0% para el LIC, se demuestra que el método fue repetible y reproducible.

Con los datos presentados en la **Tabla 22** se puede concluir que el método analítico es exacto, ya que para los cuatro niveles de concentración evaluados, se obtuvo un % de desviación promedio menor al 15.0% con respecto a la concentración nominal de KPF.

Tabla 20. Repetibilidad del Método Analítico.

Muestra de KPF	C _{recuperada} de KPF [µg/mL]			
	LIC	MCB	MCM	MCA
C _{nominal} [µg/mL]	0.5	1.5	8.0	17.0
1	0.409	1.437	8.529	16.619
2	0.528	1.488	8.350	15.729
3	0.509	1.234	8.596	17.104
4	0.478	1.281	9.803*	16.944
5	0.427	1.417	8.559	16.767
C_{recuperada} Promedio (n = 5) [µg/mL]	0.471	1.372	8.768	16.633
DE	0.0511	0.1083	0.5865	0.5369
%C.V.	10.86%	7.89%	6.69%	3.23%



Tabla 21. Reproducibilidad o Precisión Intermedia del Método Analítico.

MC de KPF	<i>C</i> _{recuperada} de KPF [µg/mL]											
	LIC			MCB			MCM			MCA		
<i>C</i> _{nominal} de KPF [µg/mL]	0.5			1.5			8.0			17.0		
Corrida analítica.	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	0.409	0.431	0.549	1.437	1.641	1.637	8.529	8.336	8.397	16.619	17.848	14.193*
	0.528	0.473	0.618*	1.488	1.599	1.431	8.350	9.012	7.997	15.729	16.659	13.906*
	0.509	0.589	0.619*	1.234*	1.466	1.520	8.596	8.962	8.203	17.104	18.063	13.828*
	0.478	0.502	0.591	1.281	1.305	1.561	9.803*	9.210*	7.845	16.944	17.298	16.980
	0.427	0.506	0.593	1.417	1.534	1.589	8.559	10.237*	8.096	16.767	17.205	16.793
<i>C</i> _{recuperada} Promedio (n=15) [µg/mL]	0.522			1.476			8.676			16.396		
DE	0.0701			0.1272			0.6676			1.3628		
% C.V.	13.43%			8.62%			7.69%			8.31%		

NOTA: Los valores de *C*_{recuperada} marcados con un asterisco (*) presentaron valores de % de desviación mayores a los especificados.

Tabla 22. Exactitud del Método Analítico.

MC de KPF	% de Desviación											
	LIC			MCB			MCM			MCA		
<i>C</i> _{nominal} de KPF [µg/mL]	0.5			1.5			8.0			17.0		
Corrida analítica	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	18.08	13.71	9.89	4.17	9.38	9.16	6.62	4.20	4.96	2.24	4.99	16.51*
	5.63	5.40	23.63*	0.83	6.60	4.57	4.38	12.65	0.04	7.48	2.00	18.20*
	1.83	17.91	23.86*	17.71*	2.29	1.34	7.45	12.02	2.54	0.61	6.25	18.66*
	4.34	0.46	18.25	14.59	13.00	4.06	22.54*	15.13*	1.94	0.33	1.75	0.11
	14.51	1.18	18.54	5.51	2.26	5.97	6.99	27.96*	1.20	1.37	1.20	1.22
% Desviación Promedio (n=15)	11.81 %			6.76 %			8.71 %			5.53 %		

NOTA: Los valores de % de desviación marcados con un asterisco (*) presentaron valores mayores a los especificados.

5.2.6. Estabilidad

5.2.6.1. Estabilidad en la Matriz Biológica

En las **Tablas 23, 24 y 25** se presentan los resultados de concentración recuperada de las MC baja y alta obtenidas en cada una de las pruebas de estabilidad en la matriz biológica.



Tabla 23. Resultados de la Estabilidad a Corto Plazo (6 h en la mesa de trabajo).

No. de Réplica	$C_{\text{recuperada}}$ [$\mu\text{g/mL}$] <i>t = 6.0 h, en la mesa de trabajo a temperatura ambiente.</i>	
	MCB [1.5 $\mu\text{g/mL}$]	MCA [17.0 $\mu\text{g/mL}$]
1	1.407	18.284
2	1.408	15.409
3	1.486	16.446
Promedio (n = 3)	1.434	16.713
DE	0.0456	1.4557
%C.V.	3.18	8.71
% de Desviación	4.43%	1.69%

Tabla 24. Resultados de la Estabilidad a Largo Plazo (1 mes a -20°C).

No. de Réplica	$C_{\text{recuperada}}$ [$\mu\text{g/mL}$] <i>t = 2 semanas, en congelación a -20°C</i>		$C_{\text{recuperada}}$ [$\mu\text{g/mL}$] <i>t = 1 mes, en congelación a -20°C.</i>	
	MCB [1.5 $\mu\text{g/mL}$]	MCA [17.0 $\mu\text{g/mL}$]	MCB [1.5 $\mu\text{g/mL}$]	MCA [17.0 $\mu\text{g/mL}$]
1	1.527	17.521	1.254	18.220
2	1.416	20.095	1.237	18.146
3	1.676	16.817	1.336	18.477
Promedio (n = 3)	1.539	18.144	1.276	18.183
DE	0.1305	1.7259	0.0530	0.0524
%C.V.	8.48%	9.51%	4.16%	0.29%
% de Desviación.	2.63%	6.73%	14.95%	6.96%

Tabla 25. Resultados de la Estabilidad de 3 Ciclos de Congelación y Descongelación.

No. de Réplica	$C_{\text{recuperada}}$ [$\mu\text{g/mL}$] Ciclo 3.	
	MCB [1.5 $\mu\text{g/mL}$]	MCA [17.0 $\mu\text{g/mL}$]
1	1.672	18.708
2	1.692	17.732
3	1.753	17.891
Promedio (n = 3)	1.706	18.110
DE	0.0577	0.5234
%C.V.	3.38%	2.89%
% de Desviación.	13.75%	6.53%



5.2.6.2. Estabilidad de la Muestra Procesada

En la **Tabla 26** se presentan los resultados de concentración recuperada, para las MC baja y alta, obtenidas en la prueba de estabilidad de la muestra procesada en el automuestreador a temperatura ambiente.

Tabla 26. Resultados de la Estabilidad de las Muestras Procesadas en el Automuestreador.

No. de Réplica	$C_{\text{recuperada}}$ [$\mu\text{g/mL}$] t = 15 h. en el automuestreador a temperatura ambiente.	
	MCB [1.5 $\mu\text{g/mL}$]	MCA [17.0 $\mu\text{g/mL}$]
1	1.541	15.980
2	1.455	15.961
3	1.583	18.422
Promedio (n = 3)	1.526	16.788
DE	0.0650	1.4154
%C.V.	4.26	8.43
% de Desviación.	1.76 %	1.25 %

En la **Tabla 27** se presenta un resumen de los resultados de % de desviación obtenida para cada una de las pruebas realizadas. En ella se observa que todos los valores de % de desviación, fueron menores al 15.0% con respecto a la concentración nominal de KPF. Por lo anterior, se demuestra que el KPF fue estable en la matriz biológica bajo las siguientes condiciones de almacenamiento: a temperatura ambiente sobre la mesa de trabajo hasta por 6 horas, en congelación a -20°C por 1 mes y después de ser sometidas a 3 ciclos de congelación y descongelación. También se demostró la estabilidad del KPF en las muestras procesadas y reconstituidas en FM a temperatura ambiente hasta por 15 horas dentro del automuestreador.

Tabla 27. Resumen de la estabilidad del KPF en la matriz biológica y en la muestra procesada.

Prueba de Estabilidad	% de Desviación de la $C_{\text{recuperada}}$ Promedio.	
	MCB [1.5 $\mu\text{g/mL}$]	MCA [17.0 $\mu\text{g/mL}$]
Estabilidad en la Matriz Biológica		
Corto Plazo en la mesa de trabajo por 6 h a temperatura ambiente.	4.43%	1.69%
Largo Plazo en congelación a -20°C por 1 mes.	14.95%	6.96%
Ciclos de Congelación-Descongelación (3 ciclos).	13.75%	6.53%
Estabilidad de la Muestra Procesada		
En el Automuestreador por 15 h a temperatura ambiente.	3.75%	6.83%



5.2.6.3. Estabilidad de las Soluciones Estándar

De igual forma, se comprobó la estabilidad de las soluciones estándar del fármaco y del EI, preparadas en MeOH, y almacenadas a temperatura de refrigeración durante 1 mes (**Tabla 28**), ya que los % de desviación fueron menores al 10.0% con respecto a las repuestas obtenidas de soluciones estándar frescas.

Tabla 28. Resultados de la Estabilidad de las Soluciones Estándar.

Solución Estándar	C _{STD} [µg/mL]	C _{DILUCIÓN} [µg/mL]	% de Desviación
STD 1 de KPF	2000	20.0	3.03 %
STD 3 de KPF	20.0	2.0	7.43 %
STD 1 de KET	1000	100.0	2.08 %



6. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) para la cuantificación de KPF en plasma humano y su aplicación en un estudio de Biodisponibilidad o Bioequivalencia.
- El método analítico se validó conforme a los requisitos y criterios establecidos en la NOM-177-SSA1-2013 con lo que se demuestra la confiabilidad del método en la cuantificación del KPF en plasma humano.
- El método analítico fue selectivo, lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones de 0.5 - 20.0 µg/mL.
- El Ketoprofeno es estable en el plasma humano bajo las siguientes condiciones de almacenamiento: a temperatura ambiente en la mesa de trabajo durante 6 h y en congelación a -20° C durante 1 mes.
- Las muestras de Ketoprofeno procesadas y reconstituidas en FM son estables en el automuestreador durante 15 horas a temperatura ambiente.
- El método analítico desarrollado puede ser utilizado para estudios de farmacocinética en humanos y/o estudios de bioequivalencia.



7. PERSPECTIVAS

- Utilizar el método analítico desarrollado y validado en un estudio de bioequivalencia en el que se comparen medicamentos genéricos que contienen 100 mg de ketoprofeno con el medicamento de referencia Profenid® de Sanofi Aventis.
- Evaluar otras condiciones de estabilidad de la muestra procesada de ketoprofeno, a las cuales pudieran llegar a exponerse las muestras durante el desarrollo del estudio de bioequivalencia.
- Evaluar la posible exención de estudios in vivo de medicamentos que contienen ketoprofeno, realizando un estudio de correlación in vivo- in vitro con los resultados obtenidos de realizar un estudio de bioequivalencia y los estudios in vitro de perfiles de disolución de productos genéricos conteniendo ketoprofeno.



8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida, A.M., Castel-Branco, M.M., Falcão, A.C. (2002). Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *Journal of Chromatography B*, 774, 215-222.
2. Amidon, K. S., Langguth, P., Lennernas, H., Yu, L., Amidon, G.L. (2011). Bioequivalence of oral products and the biopharmaceutics classification system: science, regulation, and public policy. *Clin Pharmacol Ther*, 90(3), 467-470.
3. Baldo M.N., H. G. A., Altamirano, J.C., Murguía, M.C., Hein, G.J. (2015). Bioequivalence Evaluation of Two Brands of Ketoprofen 50 Mg Capsules (Flogofin® & Profenid®) In Healthy Latin American Volunteers. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, 07(03), 108-111.
4. Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos. (2014). In Consejo de Salubridad General (CSG). (Ed. 2014). México.
5. Christian, G. D. (2009). *Química Analítica* (M. G.-H. Interamericana Ed. 6ta Edición ed.). México.
6. a -Reval, M. a. I., Ventura- art ne , R., Déciga-Campos, M., Terrón, J. A., Cabré, F., & López-Muñoz, F. J. (2004). Evidence for a central mechanism of action of S-(+)-ketoprofen. *European Journal of Pharmacology*, 483(2-3), 241-248.
7. EMA, European Medicines Agency (2010). Guideline of the Investigation of Bioequivalence. London.
8. FDA, Food and Drug Administration (2013). Draft Guidance For Industry. Bioanalytical Method Validation.
9. FDA, Food and Drug Administration (2014). Guidance For Industry. Bioavailability and Bioequivalence Studies Submitted in NDSAs or INDs-General Considerations.
10. FDA, Food and Drug Administration (2015). Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Guidance for Industry.
11. Garrido López, B. C., Navarro Sarabia, F., & Montero Martín, E. M. (2011). Antiinflamatorios no esteroideos: farmacodinámica, reacciones adversas e indicaciones en reumatología. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 10(92), 6255-6261.
12. Grubb, N. G., Rudy, David W., Hall Stephen D. (1996). Stereoselective High-Performance Liquid Chromatographic Anlysis of Ketoprofen and Its Acyl Glucuronides in Chronic Renal Insufficiency. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications.*, 678, 237-244.



13. Hassanzadeh M. K., B., A.H. . (1997). Pharmacokinetic Study of Ketoprofen After Oral Administration of Sustained Release and Non-Sustained Realease Dosage Forms. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 73-83.
14. Helmy, S. A., El-Bedaiwy, Heba M. (2014). Validation of a Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Determination of Several Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Human Plasma for Therapeutic Drug Monitoring. *Therapeutic Drug Monitoring.*, 36(1), 100-107.
15. Jin, Y. X., Tang, Y. H., & Zeng, S. (2008). Analysis of flurbiprofen, ketoprofen and etodolac enantiomers by pre-column derivatization RP-HPLC and application to drug-protein binding in human plasma. *J Pharm Biomed Anal*, 46(5), 953-958.
16. Jiyauddin Khan., K. H. Y., Ng Bee Hong., Wong Jia Woei., Samer ALDhalli., Gamal Osman Elhassan., Mallikarjun Chitneni., Kaleemullah Mohammed., & Junainah., E. Y. a. F. (2011). Development And Validation of a Simple High Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Ketoprofen in Human Plasma. *International Journal Of Pharmaceutical Studies And Research.*, 2(4), 1-5.
17. Levoine, N., Blondeau, C., Guillaume, C., Grandcolas, L., Chretien, F., Jouzeau, J. Y., . . . Lopicque, F. (2004). Elucidation of the mechanism of inhibition of cyclooxygenases by acyl-coenzyme A and acylglucuronic conjugates of ketoprofen. *Biochem Pharmacol*, 68(10), 1957-1969.
18. Miles., S. (2007). Ketoprofen. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. Elsevier Inc.*, 1-7.
19. Polson, C., Sarkar, Pratibha., Incledon, Bev., Raguvaran, Vanaja., Grant, Russell. (2003). Optimization of Protein Precipitation Based Upon Effectiveness of Protein Removal and Ionization Effect in Liquid Chromatography-Tanden Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B.*, 785, 263-275.
20. Rajaa Farhan Hussein., M. M. H. (2011). Determination Of Ketoprofen Levels in Human Plasma By Fully Validation HPLC Assay. *International Journal Of Pharmacy And Technology.*, 3(1), 1644-1657.
21. Secretaría de Salud (1998). Reglamento de Insumos Para La Salud (RIS). Estados Unidos Mexicanos.
22. Secretaría de Salud (2013). Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Estados Unidos Mexicanos.
23. Shargel, L., Yu, Andrew B.C. (2016). *Applied Biopharmaceutics And Pharmacokinetics* (M. G. H. Education Ed. Seventh Edition ed.). United States of America.



24. Sheng, J. J., Kasim, N. A., Chandrasekharan, R., & Amidon, G. L. (2006). Solubilization and dissolution of insoluble weak acid, ketoprofen: effects of pH combined with surfactant. *Eur J Pharm Sci*, 29(3-4), 306-314.
25. Shohin, I. E., Kulinich, J. I., Ramenskaya, G. V., Abrahamsson, B., Kopp, S., Langguth, P., Dressman, J. B. (2012). Biowaiver monographs for immediate-release solid oral dosage forms: ketoprofen. *J Pharm Sci*, 101(10), 3593-3603.
26. Shohin, I. E., Kulinich, J. I., Ramenskaya, G. V., & Vasilenko, G. F. (2011). Evaluation of In Vitro Equivalence for Drugs Containing BCS Class II Compound Ketoprofen. *Dissolution Technologies*, 18(1), 26-29.
27. WHO Expert Committee on Specifications For Pharmaceutical Preparations. Fortieth Report. (2006).
28. Zafar, F., Shoab, M. H., Naz, A., Yousuf, R. I., & Ali, H. (2013). Determination of Ketoprofen in Human Plasma by RP-HPLC. *American Journal of Analytical Chemistry*, 04(05), 252-257.
29. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2014). Undécima edición, Secretaria de Salud, México. Volúmenes I y II.
30. Sweetman, S., 2003. Sweetman, S. (Ed.), Martindale: The Complete Drug Reference. MICROMEDEX, Greenwood Village, CO.
31. DrugBank, en línea: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB01009>. Recuperado el día 26/Marzo/2016.
32. COFEPRIS, en línea:
<http://www.cofepris.gob.mx/as/documents/registrosanitariomedicamentos/susceptibles.pdf>.
Recuperado el día 20/Abril/2016.
33. COFEPRIS, en línea:
<http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/CritTipoPrueba.pdf>.
f. Recuperado el día 20/Abril/2016.