



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS:

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
CUANTIFICAR METRONIDAZOL EN PLASMA HUMANO POR
ESPECTROFOTOMETRÍA UV, PARA SU APLICACIÓN EN EL
LABORATORIO DE BIOFARMACIA**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

VARGAS MARTÍNEZ CINTHYA



CIUDAD DE MÉXICO

AÑO 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: **PROFESOR : INÉS FUENTES NORIEGA**

VOCAL: **PROFESOR : RICARDO RODRIGUEZ SAENZ**

SECRETARIO: **PROFESOR : MARIA DE LOURDES BEATRIZ MAYET CRUZ**

1er. SUPLENTE: **PROFESOR : MA. DE LOS DOLORES CAMPOS ECHEVERRIA**

2° SUPLENTE: **PROFESOR : BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 113 DE BIOFARMACIA,
EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA.**

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Inés Fuentes Noriega

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Kenneth Rubio Carrasco

SUSTENTANTE (S):

Vargas Martínez Cinthya

AGRADECIMIENTOS

AGRADECEMOS EL APOYO BRINDADO AL PRESENTE TRABAJO POR EL PROYECTO PAPIME (PE207815) “OPTIMIZACIÓN DE LA ENSEÑANZA EXPERIMENTAL DE BIOFARMACIA EN LA CARRERA DE QFB DE LA FACULTAD DE QUIMICA DE LA UNAM”

AGRADECEMOS LA DONACIÓN DE PLASMA FRESCO CONGELADO AL BANCO DE SANGRE DE MÉDICA SUR.

AGRADECEMOS A QUÍMICA SON'S POR EL ESTANDAR SECUNDARIO DE METRONIDAZOL UTILIZADO PARA EL PRESENTE TRABAJO.

*Mamá, Papá,
agradezco infinitamente su esfuerzo y dedicación.
Gracias por todo!*

*Agradezco mucho su cariño amigos míos.
Ojalá sigamos compartiendo este viaje juntos!*

INDICE GENERAL

Anexos

Índice de abreviaturas.....	8
Índice de tablas.....	9
Índice de figuras.....	10
Introducción.....	12
Antecedentes.....	14
Metronidazol.....	15
Absorción.....	15
Distribución.....	15
Metabolismo.....	16
Eliminación.....	16
Reacciones Secundarias y Adversas.....	17
Desarrollo de métodos.....	18
Técnica de precipitación de proteínas.....	21
Validación.....	23
Justificación.....	24
Objetivo.....	25
Metodología.....	27
Desarrollo del método analítico.....	27
Método Analítico.....	29
Criterios para la Validación del método analítico.....	30
Selectividad.....	30
Precisión.....	31

Repetibilidad.....	31
Reproducibilidad.....	32
Exactitud.....	32
Estabilidad.....	33
Materiales.....	35
Reactivos.....	35
Equipos e instrumentos.....	36
Preparación de reactivos.....	36
Curva de calibración.....	37
Método de extracción por precipitación de proteínas.....	38
Descripción gráfica del procedimiento a utilizarse.....	39
Resultados.....	41
Resultados del Desarrollo Analítico.....	41
Validación del método.....	43
Precisión.....	47
Repetibilidad.....	47
Reproducibilidad.....	48
Exactitud.....	51
Estabilidad.....	52
Análisis de resultados.....	61
Conclusiones.....	64
Bibliografía.....	65

INDICE DE ABREVIATURAS

mg miligramos

min. minutos

µg microgramo

µL microlitro

COFEPRIS Comisión Federal para la protección de Riesgos Sanitarios

CV% Coeficiente de Variación

DE Desviación Estándar

CLAR Cromatografía Líquida de Alta Resolución

NOM Norma Oficial Mexicana

SSA Secretaría de Salud

r Coeficiente de correlación

rpm revoluciones por minuto

UV Ultravioleta

PCB Punto Control Bajo

PCM Punto Control Medio

PCA Punto Control Alto

ACN Acetonitrilo

pI Punto isoelectrico

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Resumen de técnicas utilizadas para cuantificar Metronidazol.

Tabla 2.- Condiciones iniciales del método

Tabla 3.- Preparación de soluciones de trabajo y muestras control en plasma humano.

Tabla 4.- Criterios de aceptación para la linealidad del método.

Tabla 5.- Criterios de aceptación para la repetibilidad del método.

Tabla 6.- Criterios de aceptación para la reproducibilidad del método.

Tabla 7.- Criterios de aceptación para la exactitud del método.

Tabla 8.- Criterios de aceptación para la estabilidad del método.

Tabla 9.- Preparación de soluciones de trabajo y muestras control en plasma humano.

Tabla 10.- Condiciones finales del experimento.

Tabla 11.- Resultados de las curvas de calibración del método.

Tabla 12.- Curva promedio de absorbancias del método

Tabla 13.- Resultados de concentraciones calculadas

Tabla 14.- Resultados de repetibilidad del método.

Tabla 15.- Resultados de reproducibilidad punto control bajo del método.

Tabla 16.- Resultados de reproducibilidad punto control medio del método.

Tabla 17.- Resultados de reproducibilidad punto control alto del método.

Tabla 18.- Resultados de exactitud del método.

Tabla 19.- Resultados estabilidad a tiempo cero.

Tabla 20.- Resultados de estabilidad a Temperatura Ambiente.

Tabla 21.- Resultados de estabilidad Refrigeración a 24hrs.

Tabla 22.- Resultados de estabilidad Refrigeración a 48hrs.

Tabla 23.- Resultados de estabilidad en Refrigeración a 7 días.

Tabla 24.- Resultados de estabilidad Congelación a 15 días.

Tabla 25.- Resultados de estabilidad Refrigeración 15 días

Tabla 26.- Resultados de estabilidad Congelación a 21 días.

Tabla 27.- Resultados de estabilidad Congelación a 28 días

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Metronidazol

Figura 2.- Diagrama del proceso para la estabilidad a diferentes tiempos.

Figura 3.- Barrido de blanco de plasma humano tratada con acetonitrilo

Figura 4.- Barrido de la muestra cargada con metronidazol usando como precipitante el ácido perclórico.

Figura 5.- Barrido de la muestra con metronidazol tratada con Acetonitrilo.

Figura 6.- Curva de calibración promedio del método

INTRODUCCIÓN

Es de primordial importancia la actualización de la asignatura de Biofarmacia que actualmente se estudia en la Facultad de Química para la licenciatura de Químico Farmacéutico biólogo debido a los cambios en materia de regulación sanitaria y avances tecnológicos en el área de la salud, así como cuestiones de bioseguridad y control ambiental.

Se pretende elaborar y actualizar los recursos didácticos (protocolos de prácticas, manuales, procedimientos, etc). y fortalecer el desarrollo de actividades académicas vinculadas con el uso de nuevas tecnologías, con el apoyo del PAPIME uno de los objetivos que se plantea es el de actualizar un guión sobre la evaluación de biodisponibilidad relativa de un fármaco en comercialización, por lo cual se decidió estudiar al metronidazol en un fluido biológico.

El presente trabajo tuvo como fin desarrollar y validar un método analítico que permita cuantificar Metronidazol en plasma humano por espectrofotometría UV, para su aplicación en el laboratorio de biofarmacia bajo los criterios de la NOM-SSA1-177-2013.

Un simple, exacto, preciso y sensible método espectrofotométrico fue desarrollado para la determinación de metronidazol en plasma humano. El metronidazol fue extraído del plasma humano usando Acetonitrilo. El metronidazol fue cuantificado por espectrofotometría UV a 318nm. El método fue lineal en intervalo de concentraciones de 0.6 µg/mL a 104 µg/mL.

Se desarrollo un método espectrofotométrico debido a la infraestructura de los laboratorios de biofarmacia a nivel licenciatura, las muestras se trabajaron en tubos eppendorf de 2.5 mL y como agente precipitante de proteínas se emplearon 600µL de Acetonitrilo, se centrifugaron a 15000 rpm y se realizó la determinación espectrofométrica a 318 nm, empleando microceldas de cuarzo de 10mm, dimensiones: 12.5X12.5X45mm.

El método se validó cumpliendo los lineamientos establecidos por la NOM-SSA1-177-2013, en cuanto a curva de calibración, especificidad, precisión, repetibilidad y reproducibilidad, estabilidad a corto y largo plazo para su posterior uso en las prácticas del laboratorio de biofarmacia.

ANTECEDENTES

Debido al continuo desarrollo de la educación, la mejora y optimización de recursos en la materia de biofarmacia es necesario contar con alternativas para la enseñanza, es decir nuevas prácticas que puedan utilizarse para explicar el mismo fenómeno; con recursos más eficientes, rápidos y que no dañen al medio ambiente. Es por eso que se tiene la tarea de experimentar con fármacos a nuestro alcance como lo es el Metronidazol el cual se utiliza en este trabajo, ya que es un medicamento de amplio espectro, económico, seguro y eficaz, que permite el uso para su cuantificación de una técnica sencilla de bajo costo, con un proceso simple de extracción del analito para su cuantificación en plasma.

A lo largo de la carrera de Q. F. B. los alumnos cursan prácticas utilizando los mismos medicamentos esto propicia que los estudiantes que ya cursaron la materia transfieran resultados a los compañeros que aún no la cursan, facilitando “reportes” de la prácticas, el obtener nuevos métodos de enseñanza implica que el alumno, realice nuevos experimentos y observe el mismo fenómeno de manera diferente.

Se pretende que con esta propuesta los alumnos no generen una cantidad de residuos considerables ya que de acuerdo a Esperanza Torres Espinosa y Juan Pedro Castrellón Santa Anna. (Abril 2000).

“Desde el punto de vista pedagógico, hemos logrado llamar la atención del estudiante al cuidado de su entorno, mediante el desarrollo de habilidades y en el cuidado y manejo de sustancias químicas. Al efectuar los cambios en la escala de experimentación, se aprecia un incremento en el interés del estudiante por observar más detenidamente el fenómeno que se está demostrando en cada experimento, logrando con ello una mayor protección en su exposición a sustancias peligrosas y un incremento en el ejercicio de su capacidad analítica.

Aprendizaje + Semimicroescala = - Residuos Peligrosos + Seguridad.”¹

Metronidazol

El metronidazol es un compuesto 5-nitro-imidazol introducido en el año 1959 para el tratamiento de infecciones producidas por *Trichomonas vaginalis*. Su potente actividad anaerobicida lo ha convertido en un referente y el comparador obligado (*gold standard*) para estimar la actividad relativa de cualquier fármaco con actividad frente a anaerobios. Es útil en muchas infecciones parasitarias, aunque nuevos compuestos lo han desbancado parcialmente². El metronidazol inicialmente fue aprobado por la asociación de alimentos y drogas de Estados Unidos (FDA) para uso humano en 1963, se encuentra disponible en formulaciones: oral, parenteral, vaginal y tópica.³

Absorción

El metronidazol se absorbe muy bien por vía oral, su biodisponibilidad es superior al 90%. Las concentraciones máximas se observan entre 1 y 2 horas después de su administración y son proporcionales a la dosis (250, 500mg ó 2 g vía oral de Metronidazol producen concentraciones séricas máximas de 6, 12 y 40µg/mL respectivamente) en pacientes con tratamiento intravenoso, tras una dosis inicial de 15mg/kg seguidos de 7,5mg/kg cada 6h, las concentraciones pico-valle son de 25–18µg/ml. Los alimentos no disminuyen su absorción, pero pueden retrasarla. La biodisponibilidad del metronidazol en supositorios es del 60–80%, y tras su administración vaginal es del 20%. La semivida del metronidazol es de 6–12h².

Distribución

El metronidazol se distribuye ampliamente y alcanza todos los tejidos y líquidos por vía oral o intravenosa (saliva, bilis, huesos, hígado, pulmón líquido peritoneal, semen y secreciones vaginales). Se une escasamente a proteínas (menos del 20%). Atraviesa la placenta y la barrera hematoencefalica. Los volúmenes de distribución reportados varían de 0.53 a 0.96 L/kg⁵. En el LCR alcanza niveles terapéuticos incluso sin inflamación meníngea. Se excreta en la leche materna, por lo que no se recomienda en madres lactantes. Se metaboliza en el hígado en

un 30-60% de la dosis. El metabolito principal es el 2-hidroximetil metronidazol, que tiene cierta actividad antibacteriana y antiprotozoaria.²

Metabolismo

En los mamíferos incluyendo al humano, la principal vía de biotransformación del metronidazol es el metabolismo oxidativo. Las principales modificaciones que se dan en la estructura química del metronidazol son sobre sus cadenas alifáticas, involucrando reacciones tanto de las llamadas de fase I (oxidaciones e hidroxilaciones) y como las de fase II (conjugaciones) que finalmente dan origen a las formas metabólicas hidroxilada, acetilada, así como a metabolitos conjugados con glucurónidos respectivamente.⁶ En el humano es el hígado el principal órgano encargado en llevar a cabo la mayoría de las reacciones de biotransformación del MTZ mencionadas. En las reacciones de fase I participan los complejos enzimáticos de citocromos P450 (CYP450); se ha propuesto la participación de los complejos de las subfamilias 1A, 2B y 2C.⁷

Eliminación

La eliminación es fundamentalmente a través de la vía renal. Cerca del 60-80% se excreta en la orina (el 20% como fármaco sin cambios) y el 6-15% en las heces sin metabolizar. Se elimina rápidamente por hemodiálisis, pero no por diálisis peritoneal. La disminución en la función renal no altera la eliminación, pero si el paciente está anúrico es preferible evitar dosis elevadas debido a la posibilidad de la acumulación de sus metabolitos. En pacientes con deterioro de la función hepática puede disminuir su eliminación, por lo que si la insuficiencia es grave será preciso modificar la dosis o la frecuencia de administración.²

La dosis de metronidazol más habitual en el adulto es de 500 mg/8 h, sea oral o intravenoso, pero hay variaciones en sus indicaciones. Para la tricomoniasis fuera y dentro del embarazo y como profilaxis ante un caso de violación se recomienda una dosis única de 2g⁴; para la vaginosis, 500 mg/ 12 h oral/7 días; para giardiasis, 250 mg/8 h oral/5-7 días. En el niño, las dosis oscilan entre 15 – 50

mg/kg/día (sin superar los 750 mg/día), oral o intravenosa, y se recomienda administrarlo en 3 dosis.

Reacciones Secundarias y Adversas

Las reacciones más graves reportadas con el uso de Metronidazol incluyen convulsiones y neuropatía periférica.

Otras reacciones reportadas son:

Tracto gastrointestinal: Náusea, vómito, alteraciones gastrointestinales, diarrea y sabor metálico.

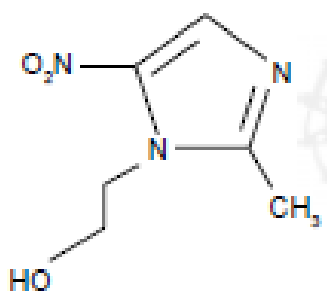
Hematopoyético: Neutropenia reversible.

Piel: Erupciones y prurito.

SNC: Cefalea, mareo, síncope, ataxia y confusión. Estos síntomas pueden interferir con la habilidad para conducir o utilizar maquinaria peligrosa.

Reacciones locales: Flebitis en el sitio de infusión I.V.⁸

Figura 1. Metronidazol



Propiedades Físicoquímicas²⁵

Número de monografía: 6178

Nombre: Metronidazol

Número de registro CAS: 443-48-1

Nombre CAS: 2-metil-5nitroimidazole-1etanol

Nombres Adicionales: 1-(2hidroxietil)-2-metil-5-

nitrimidazol; 1-(β-etioli)-2-metil-5-nitro-3-azapirrol. **Fórmula Molecular:** $C_6H_9N_3O_3$

Peso molecular: 171.15 g/mol **λ máx:** 278 nm²⁶

Composición por ciento: C 42.11%, H 5.30%, N 24.55%, O 28.04%

Cristales crema, mp.158-160°C. **Solubilidad a 20°C(g/100ml):** agua 1.0, etanol 0.5,éter <0.05; cloroformo <0.05, moderadamente soluble en DMF, soluble en ácidos diluidos.

Precaución: el metronidazol es considerablemente carcinogénico para el ser humano. Report on Carcinogens, Eleventh Edition (PB2005-104914,2004) pIII-173.

Therap-cat: antiprotozoaria (Trichomonas); antibacterial; en tratamiento de rosacea.

Therap-Cat-Vet: Antiprotozoaria (Trichomonas); antiamebiana, antibacterial.

Desarrollo de métodos

Muchos factores influyen en el desarrollo de métodos bioanalíticos para el análisis de muestras, las matrices biológicas de interés por ejemplo, el intervalo de concentraciones de los analitos que deben ser medidos, estructuras y número de analitos, propiedades fisicoquímicas de los analitos y estabilidad en las matrices biológicas desde el momento de la toma de muestra hasta su análisis.^{9,10}

Los ensayos bioanalíticos permiten cuantificar con exactitud y de forma fiable estos fármacos a concentraciones más bajas. Esto ha llevado a mejoras en la tecnología y los métodos analíticos.^{9,10}

El bioanálisis en la industria farmacéutica se aplica principalmente en las áreas de farmacocinética, toxicinética, bioequivalencia, correlación farmacocinética-farmacodinámica. Así como en las investigaciones forenses, antidopaje en el deporte y toxicidad, entre otras.^{9,10}

En gran medida la estructura química de un fármaco indica cual es el mejor procedimiento para realizar un ensayo que permita cuantificar el compuesto en fluidos biológicos.^{10,11}

El compuesto normalmente se extrae de la matriz biológica (sangre, plasma, suero) seguido de una limpieza de la muestra para mejorar la sensibilidad de detección y la selectividad para el análisis. La monitorización terapéutica del fármaco puede implicar la cuantificación en microgramos, nanogramos o picogramos. El grado de limpieza requerido depende del método analítico a utilizar, ya que puede ser cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y de la tolerancia específica del sistema para la detección de la contaminación.^{10,11}

Los factores responsables de la pérdida de los compuestos durante la precipitación de la muestra (adsorción, estabilidad) son críticos a bajas concentraciones y pueden afectar negativamente a la fiabilidad de un ensayo. En consecuencia, la maximización de la recuperación global del analito es esencial no

sólo para la sensibilidad sino también para una buena precisión y exactitud en la cuantificación del fármaco.¹²

Según las propiedades fisicoquímicas intrínsecas del analito, como por ejemplo, su valor de pka, la solubilidad en disolventes orgánicos, las características de partición y las vías más probables de biotransformación (basada en la experiencia anterior con compuestos analógicos) y a la decisión en cuanto a qué método analítico se va a utilizar, se podrá tener un ensayo adecuadamente sensible y específico para la cuantificación del fármaco y sus principales metabolitos.¹³

Debido a que las muestras biológicas son matrices muy complejas formadas por muchos componentes que pueden interferir con buenas separaciones y/o buenas señales de cuantificación, la preparación de la muestra es un aspecto importante de la estimación de bioanálisis. Esto es importante si las muestras se originan de extractos de tejido, plasma, suero u orina. Generalmente desde la perspectiva bioanalítica existen algunas ventajas de elegir suero sobre plasma excepto donde haya interferencias notorias en el ensayo en estas situaciones se requiere al plasma para obtener una buena cuantificación.⁹

La determinación del fármaco en el plasma humano es a menudo complicada por bajas concentraciones 0.1-10ng/mL. La magnitud del reto de la purificación de proteínas se hace más clara cuando se considera la mezcla de macromoléculas presentes en las matrices biológicas. Por lo tanto la preparación de muestras es crucial en el análisis de fármacos que incluye tanto pre-concentración de analito y la limpieza de la muestra.¹⁴

El método de preparación de la muestra seleccionada esta dado generalmente por las técnicas analíticas disponibles y las características fisicoquímicas de los analitos investigados. Los métodos principales de preparación de muestras son la limpieza de la matriz o de inyección directa. En un procedimiento de limpieza de la matriz, el objetivo es eliminar la mayor cantidad de material endógeno como sea posible de la muestra de fármacos.¹⁵

La preparación de la muestra se lleva a cabo tradicionalmente por:

- ✓ Extracción líquido-líquido
- ✓ Precipitación de proteínas del plasma
- ✓ Extracción en fase sólida

El análisis final en la mayoría de los casos se lleva a cabo por cromatografía líquida de interfaz con espectrometría de masas o cromatografía de gases con columna capilar.

La precipitación de proteínas es un método muy utilizado en los análisis bioanalíticos. Esta es una técnica muy sencilla para la extracción del analito de la matriz. Si se sospecha de una unión de proteína con el fármaco, entonces la precipitación de proteínas como método de extracción de la muestra puede ser considerado. Reactivos para realizar la precipitación de pueden ser el ácido perclórico, tricloroacético y ácidos túngstico, y disolventes orgánicos tales como el acetonitrilo o el metanol.

Técnica de precipitación de proteínas

La preparación de una muestra a través de la precipitación de proteínas logra la separación por conversión de proteínas solubles a un estado insoluble por desplazamiento salino o mediante la adición de algún disolvente de precipitación miscible o disolventes orgánicos tales como: Acetonitrilo, acetona, etanol o metanol.¹⁷ Este procedimiento se utiliza frecuentemente en purificaciones de muestras puesto que reducen el volumen y aumentan la pureza de la proteína en cuestión antes de cualquier análisis.

Mediante la alteración de sus propiedades superficiales las proteínas pueden volverse insolubles, también mediante características de carga o cambiando las características del disolvente, el más utilizado es el cambio de las características del disolvente. Las proteínas son menos solubles cuando su punto isoeléctrico (pI) oscila entre el 4-10. Se recomienda la selección de un buffer cerca del punto isoeléctrico de la proteína. Hay que tener en cuenta también que algunas proteínas pueden desnaturizarse abajo de su punto Isoeléctrico y por encima de su punto Isoeléctrico.¹⁷

Existen diferentes métodos para reducir la solubilidad de las proteínas, uno de estos es la precipitación iónica, en los que se utilizan compuestos como el cloruro de sodio, sulfato de amonio, iones metálicos como el cobre, zinc, hierro.¹⁸

En la práctica, la precipitación se realiza generalmente a baja temperatura. La condición para la proteína es que se manejen en un medio frío, por ejemplo en un baño de hielo, porque las proteínas tienden a desnaturizarse a temperaturas más altas, aunque si su proteína es más estable que otras, esto puede ser selectivo y lograr una mayor purificación.¹⁷

Comúnmente la muestra se centrifuga a alta velocidad durante un tiempo suficiente, todos los componentes precipitados de plasma se depositarán en el fondo del sobrenadante. El líquido sobrenadante obtenido se puede inyectar directamente en un HPLC, puede ser evaporado. Puede llevarse a cabo mediante

el uso de microcentrifuga a muy alta velocidad para mejorar la limpieza de muestra.¹⁸

Existen algunos métodos ya reportados y validados en los que se utilizó el metronidazol por HPLC a continuación para la realización de este trabajo se refieren algunos y se adaptaron a la infraestructura del laboratorio de biofarmacia.

Autor	Matriz Biológica	Rango de concentración	Instrumentos utilizados
I.I. Al-Dabagh and F. K. Mohammad. ²¹	Plasma de rata	12.3µg/mL-140.6µg/mL	Espectrofotómetro a 318nm
Elena Gabriela Oltean, A. Nica. ²²	---	0.01mg/mL-0.2mg/mL	HPLC-UV a 317nm
Essam Ezzeldin and Toqa M. El-Nahas. ²³	Plasma Humano	0.05µg/mL-30µg/mL	HPLC-UV a 320nm
Jaber Emami, Neda Ghassami, Hamed Hamishehkar. ²⁴	Plasma Humano	0.15µg/mL-30µg/mL	HPLC-UV a 324nm

Tabla 1.- Resumen de técnicas utilizadas para cuantificar Metronidazol.

Validación

En la actualidad existen medicamentos con categoría de genéricos los cuales deben de cumplir con pruebas de intercambiabilidad. Para establecer la intercambiabilidad de los medicamentos genéricos es necesario realizar, de manera científica, pruebas que demuestren que éstos son equivalentes con respecto al medicamento de referencia dentro de un intervalo definido. Entre las principales pruebas, están las de biodisponibilidad, bioequivalencia, y la comparación de perfiles de disolución, las cuales están incluidas en la norma NOM-177-SSA1-2013.¹⁹

Hoy en día los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados confiables y adecuados para su finalidad y propósito perseguido ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos datos proporcionan. La validación de la metodología junto con otras actividades engloba el control de aseguramiento de calidad y permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos son confiables.

La validación se define como el proceso que se establece para la obtención de pruebas documentadas mediante la aplicación de estudios sistemáticos de laboratorio, estos deben de ser capaces de demostrar que un método de análisis es lo suficientemente confiable y reproducible para generar el resultado previsto dentro de un intervalo definido.²⁰

JUSTIFICACIÓN;

Es de primordial importancia la actualización de la materia de Biofarmacia debido a los cambios en materia de regulación sanitaria y avances tecnológicos en el área de la salud, así como cuestiones de bioseguridad y control ambiental.

Se pretende elaborar y actualizar los recursos didácticos a las prácticas del laboratorio de Biofarmacia (protocolos de prácticas, manuales, procedimientos, etc). y fortalecer el desarrollo de actividades académicas vinculadas con el uso de nuevas tecnologías, por tanto uno de los objetivos a cumplir es actualizar el guión sobre la biodisponibilidad relativa de un fármaco en comercialización de acuerdo al apartado de la NOM-177-SSA1-2013 (9. Criterios y requisitos para el análisis de muestras biológicas de un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia), el cual se empleará en el desarrollo de prácticas de laboratorio de Biofarmacia., “Desarrollo y validación de un método analítico para cuantificar metronidazol en plasma para las prácticas de laboratorio de Biofarmacia”.

Objetivo:

Desarrollar y validar un método analítico para cuantificar metronidazol en plasma por espectrofotometría UV de acuerdo al apartado de la NOM-177-SSA1-2013 (9. Criterios y requisitos para el análisis de muestras biológicas de un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia), el cual se empleará en el desarrollo de prácticas de laboratorio de Biofarmacia.

Metodología:

Desarrollo del Método Analítico

En el desarrollo del método analítico se buscó que el Metronidazol tuviese condiciones espectrofotométricas y condiciones de extracción idóneas. La primera fase del desarrollo del método fue encontrar las condiciones espectrofotométricas necesarias para cuantificar al metronidazol en plasma humano y en ACN. Se partió de métodos previamente descritos por otros autores en los que se utiliza HPLC (I. Al Dabagh and F. K Mohammad, 2008)

Estos trabajos reportan la determinación de metronidazol en un rango de concentraciones de 12.3µg/mL a 140µg/mL en rata por espectrofotometría y de 0.04 µg/mL a 20 µg/mL por HPLC a una longitud de onda de 318nm, pero considerando la infraestructura de los equipos de licenciatura se adaptó para el espectrofotómetro UV experimentando con los rangos. De estos experimentos se obtienen condiciones iniciales que fueron probadas, sin embargo algunos de estos experimentos no dieron buenos resultados puesto que se presentaron problemas de selectividad y precipitación de proteínas, por consecuencia se realizaron cambios en las condiciones con el propósito de optimizar y obtener una adecuada cuantificación de Metronidazol. Para establecer un rango de trabajo en nuestra curva se acoto con las concentraciones que se observaron en el espectrofotómetro por lo que el intervalo final se definió de 0.6µg/mL a 104 µg/mL, considerando la administración de dosis de 500mg y 2g por vía oral de tabletas de metronidazol.

De los métodos de extracción se eligió la precipitación de proteínas ya que este método es sencillo y necesita un tiempo corto de preparación en la muestra, sin embargo, se tuvieron que probar diferentes agentes precipitantes como fueron el HCl, HClO₄ y ACN. El ACN dio muy buenos resultados en cuanto a la no interferencia con el analito y plasma, también con la adecuada precipitación de proteínas estableciéndose condiciones para la eficiente extracción y proceder a la

validación del método. Se descartaron el ácido perclórico en consideración a lo molesto que resultaría trabajar con él debido a su toxicidad y el manejo, el ácido clorhídrico no dio buenos resultados a la limpieza del sobrenadante presentando suciedad aún aumentado el tiempo de centrifugación. En este trabajo se utilizara el Acetonitrilo que presenta una longitud de onda máxima de 190nm lo cual es adecuado para este experimento.¹⁶

En tabla 3 se observan las condiciones iniciales y las condiciones que se fueron cambiando a lo largo del desarrollo para la cuantificación de Metronidazol en plasma.

Parámetros	Condiciones iniciales			Condiciones finales
Disolvente	Agua	ACN	ACN	ACN
Precipitante	HCl	HClO ₄	ACN	ACN
Volumen de Precipitante	200µL	20µL	60µL	600µL
Tiempo de Centrifugación 15000rpm	5 min	10 min	10 min	10min

Tabla 2.- Condiciones iniciales del método.

Una vez teniendo estas condiciones finales se elaboro una tabla de concentraciones para trabajar según los requerimientos de la la NOM-177-SSA1-2013 (9. Criterios y requisitos para el análisis de muestras biológicas de un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia).

Tabla 3.- Preparación de soluciones de trabajo y muestras control en plasma humano.

Solución A (µL)	Solución B (µL)	Solución C (µL)	Solución D (µL)	Solución E (µL)	Plasma (µL)	Concentración nominal (µg/mL)
-	-	-	-	60	940	0.6
-	-	-	25	-	975	2
-	-	20	-	-	980	4
-	-	40	-	-	960	8*
-	25	-	-	-	975	20
-	40	-	-	-	960	32*
25	-	-	-	-	975	40
40	-	-	-	-	960	64*
50	-	-	-	-	950	80
65	-	-	-	-	935	104

*Puntos control de calidad **Bajo (8µg/mL), Medio (32µg/mL), Alto (64µg/mL)**

A continuación se describe el método de extracción que se utilizó en este trabajo.

Método de extracción por precipitación de proteínas.

Trasvasar a tubos eppendorf 200 μ L de cada una de las Muestras cargadas con metronidazol conforme a la Tabla 1 (curva de calibración y puntos de control de calidad) luego adicionar 600 μ L de ACN y agitar durante 15 segundos en vórtex; centrifugar las muestras durante 10 minutos a 15000 rpm, el sobrenadante se transfiere a tubos eppendorf y se lee al espectrofotómetro a 318nm con microceldas de paredes negras.

Blanco de plasma:

Depositar 200 μ L de plasma y agregar 600 μ L de ACN en un tubo eppendorf y tratarlo como a las muestras.

Criterios para la Validación del método

De esta NOM-177-SSA1-2013 (9. Criterios y requisitos para el análisis de muestras biológicas de un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia) también se tomaron los criterios para la validación del método los cuales se citan a continuación.

Selectividad del método

Para descartar interferencias del agente precipitante con el plasma y el analito se determinó la selectividad del método analizando muestras de blanco de plasma con muestras cargadas con el analito a una concentración de 32 μ L/mL así como muestras de reactivos empleados. NOM-177-SSAI-2013¹⁹

Criterio de aceptación: No debe presentarse interferencia entre los analitos de interés. Si hay alguna señal, debe ser menor a 20% de la respuesta de la concentración más baja de la curva. NOM-177-SSAI-2013¹⁹

Curva de Calibración

La linealidad de la curva de calibración del método se determina mediante el coeficiente de correlación (r) por medio de una regresión lineal por el método de

mínimos cuadrados para ello preparar tres curvas de calibración de 0.6 a 104 µg/mL. Cada curva debe incluir una muestra de blanco matriz (muestra procesada sin la adición de analito). NOM-177-SSAI-2013¹⁹

Los datos de concentración de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración. Como mínimo el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con al menos 6 puntos evaluados deben cumplir con este criterio. Cuando un punto de la curva de calibración no cumpla con el criterio de aceptación, debe ser rechazado y la curva de calibración debe ser recalculada sin modificar el modelo matemático. NOM-177-SSAI-2013¹⁹

Del total de las curvas evaluadas al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del 15% de la concentración nominal. NOM-177-SSAI-2013¹⁹

Parámetro	Criterio
Coeficiente de correlación para cada curva	$r \geq 0.98$
Exactitud	
Cada nivel de concentración	$DE \leq 15\%$

Tabla 4.- Criterios de aceptación para la linealidad del método.

Precisión:

Se denomina precisión al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea; se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad. NOM-177-SSAI-2013¹⁹

Repetibilidad

Analizar en un mismo día al menos por quintuplicado las siguientes muestras control PCB, PCM, PCA. Calcular la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración.

El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%. NOM-177-SSAI-2013¹⁹

Parámetro	Criterio
%CV	≤15%

Tabla 5.- Criterios de aceptación para la repetibilidad del método.¹⁹

Reproducibilidad.

Analizar al menos por quintuplicado tres curvas analíticas diferentes y en al menos 2 días, las muestras control PCB, PCM y PCA.

Para cada muestra control calcular la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración. La adición de otro analista o el uso de otro equipo, debe cumplir con los criterios de reproducibilidad.

El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%. NOM-177-SSAI-2013

Parámetro	Criterio
%CV	≤15%

Tabla 6.- Criterios de aceptación para la reproducibilidad del método.¹⁹

Exactitud

Calcular la exactitud de los datos de repetibilidad y reproducibilidad mediante la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) empleando la siguiente ecuación. NOM-177-SSAI-2013

$$\%Desviación = \frac{\text{valor nominal} - \text{valor calculado}}{\text{valor nominal}} \times 100$$

Parámetro	Criterio aceptable
Desviación para cada concentración	≤15%

Tabla 7.- Criterios de aceptación para la exactitud del método.¹⁹

Estabilidad

Estabilidad de la muestra.

Determinar las condiciones de temperatura y tiempo en las que el fármaco permanezca estable en la matriz biológica, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento analítico.

Preparar suficientes muestras para evaluar por triplicado la respuesta del analito a las concentraciones de PCB, PCM y PCA y tomar alícuotas de tal manera que existan muestras para la evaluación a 24hrs temperatura ambiente y refrigeración, 48hrs refrigeración 4°C, 1, 2 semanas en refrigeración, 15, 21, 28 días en congelación de -60°C, las cuales son analizadas inmediatamente después de su preparación y después de ser sometidas a las condiciones del ensayo en este caso primero en almacenamiento por 24 hrs. Calcular la concentración recuperada interpolando en la curva de calibración recién preparada y compararla con los datos obtenidos a tiempo cero.

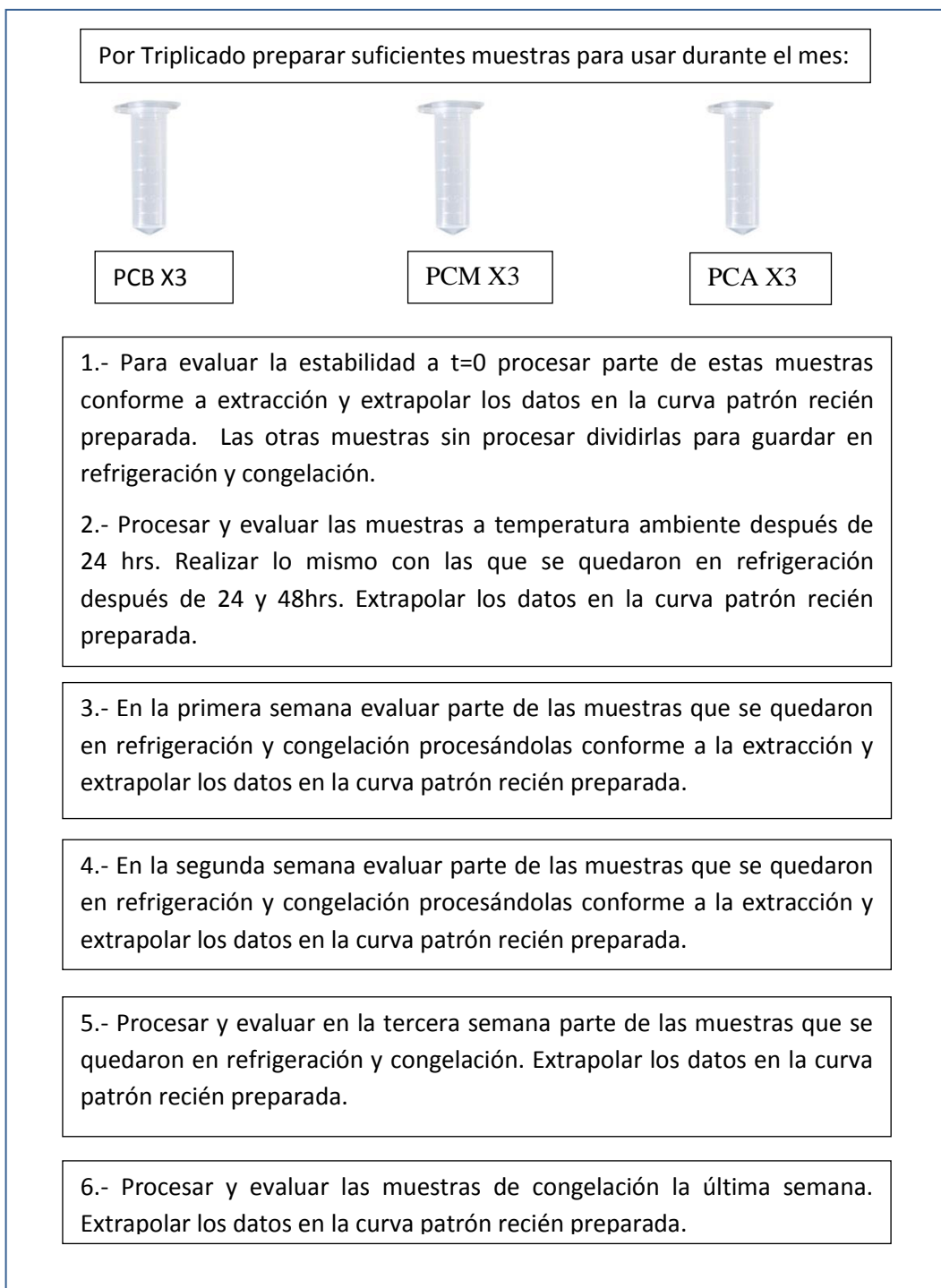


Figura 2.- Diagrama del proceso para la estabilidad a diferentes tiempos.

Evaluar mediante los siguientes criterios:

Parámetros	Criterio
Concentración promedio de cada nivel de concentración	Estar dentro del 15% de la concentración nominal.

Tabla 8.- Criterios de aceptación para la estabilidad del método.¹⁹

Procedimiento

Materiales:

Matraces volumétricos de 10mL

Viales de 1.5 mL

Nave de pesado

Vasos de precipitado de 50mL

Espátula de acero

Pipetas Pasteur

Guantes

Celda de cuarzo Spectrosil, paredes negras, dimensiones: 12.5X12.5X45mm, vol. Nominal: 0.700ml

Reactivos:

Acetonitrilo J.T. Baker

Plasma Humano (Donado por el Hospital Médica Sur)

Sustancia de Referencia Secundaria de metronidazol (Clave: 7290-012-006)

Lote: IA300072760010

Pureza: 100.34% BS

Caducidad: Junio 2016

Laboratorios Química Son's

Equipos e instrumentos:

Balanza analítica Sartorius A9, Modelo: A2 10P

Espectrofotómetro Thermo Scientific, Modelo: Evolution 60

Microcentrífuga EPPENDORF con control de temperatura (20°C), Modelo Centrifuge 5416

Agitador tipo Vortex Genie II, Modelo: G560

Micropipetas Eppendorf 100-1000 µL

Preparación de Reactivos

Solución Stock de referencia de Metronidazol, 1600 µg/mL (Solución A)

Pesar con exactitud el equivalente a 0.0160 g de estándar de Metronidazol, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver hasta llevar a volumen con ACN.

Solución B (800 µg/mL)

Tomar una alícuota de 5mL de la solución A (1600 µg/mL) y transferir cuantitativamente a un matraz de 10mL, llevar al aforo con ACN.

Solución C (200µg/mL):

Tomar una alícuota de 2.5 mL de la solución B y transferir cuantitativamente a un matraz de 10mL, llevar al aforo con ACN.

Solución D (80µg/mL):

Tomar una alícuota de 1 mL de la solución B llevar al aforo con ACN en un matraz de 10mL.

Solución E (10µg/mL)

Tomar una alícuota de 0.5 mL de la solución C y llevar al aforo con ACN en un matraz de 10mL.

Curva de Calibración.

Preparar las curvas de calibración y muestras control de calidad en plasma bajo el esquema descrito en la Tabla 2.

Tabla 9.- Preparación de soluciones de trabajo y muestras control en plasma humano.

Solución A (µL)	Solución B (µL)	Solución C (µL)	Solución D (µL)	Solución E (µL)	Plasma (µL)	Concentración nominal (µg/mL)
-	-	-	-	60	940	0.6
-	-	-	25	-	975	2
-	-	20	-	-	980	4
-	-	40	-	-	960	8*
-	25	-	-	-	975	20
-	40	-	-	-	960	32*
25	-	-	-	-	975	40
40	-	-	-	-	960	64*
50	-	-	-	-	950	80
65	-	-	-	-	935	104

*Puntos control de calidad **Bajo (8µg/mL), Medio (32µg/mL), Alto (64µg/mL)**

Método de extracción por precipitación de proteínas.

Trasvasar a tubos eppendorf 200 μ L de cada una de las Muestras cargadas con metronidazol conforme a la Tabla 1 (curva de calibración y puntos de control de calidad) luego adicionar 600 μ L de ACN y agitar durante 15 segundos en vórtex; centrifugar las muestras durante 10 minutos a 15000 rpm, el sobrenadante se transfiere a tubos eppendorf y se lee al espectrofotómetro a 318nm con microceldas de paredes negras.

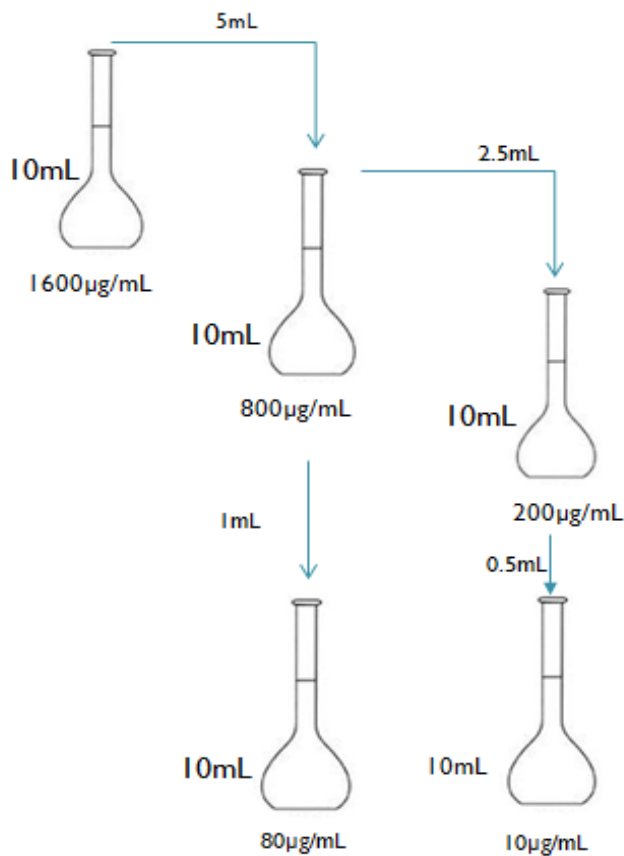
Blanco de plasma:

Depositar 200 μ L de plasma y agregar 600 μ Lde ACN en un tubo eppendorf y tratarlo como a las muestras.

Descripción gráfica del procedimiento

La metodología optimizada a validar se describe brevemente en la Figura. Tomando como referencia las características de desempeño y criterios de la NOM-177-SSAI-2013, Especificidad, Linealidad, Precisión por medio de la repetibilidad y reproducibilidad, Exactitud, Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación.

Metodología



Preparación de la curva y puntos control

Se preparó cada uno de los puntos de la curva de calibración y los puntos control por triplicado como se describe a continuación.

Tabla I. Preparación de la curva

*Puntos control de Calidad: Bajo, Medio y Alto

Solución A (µL)	Solución B (µL)	Solución C (µL)	Solución D (µL)	Solución E (µL)	Plasma (µL)	Concentración nominal (µg/mL)
-	-	-	-	60	940	0.6
-	-	-	25	-	975	2
-	-	20	-	-	980	4
-	-	40	-	-	960	8*
-	25	-	-	-	975	20
-	40	-	-	-	960	32*
25	-	-	-	-	975	40
40	-	-	-	-	960	64*
50	-	-	-	-	950	80
65	-	-	-	-	935	104

Método de extracción

Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)
0.6
2
4
8*
20
32*
40
64*
80
104

200 μL de muestra cargada con metronidazol



600 μL de ACN



15s



10min a 15000rpm



318nm con celda de cuarzo

Resultados

Desarrollo del método analítico

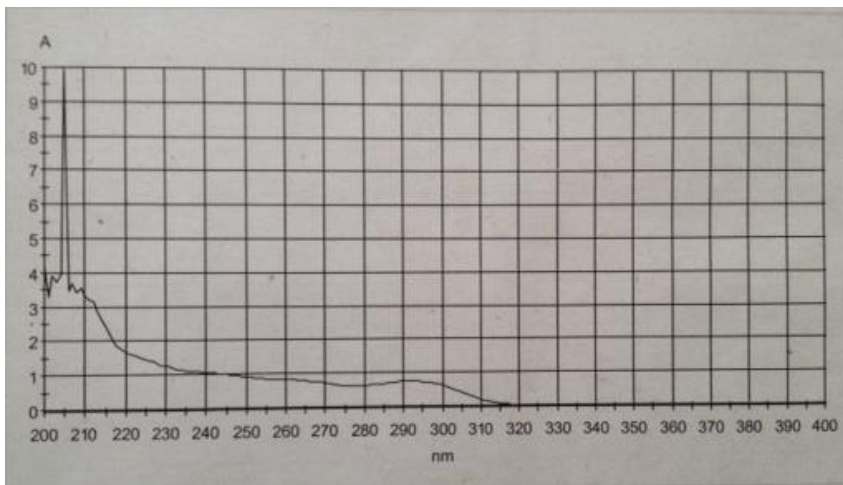


Figura 3.- Barrido de blanco de plasma humano tratada con acetonitrilo

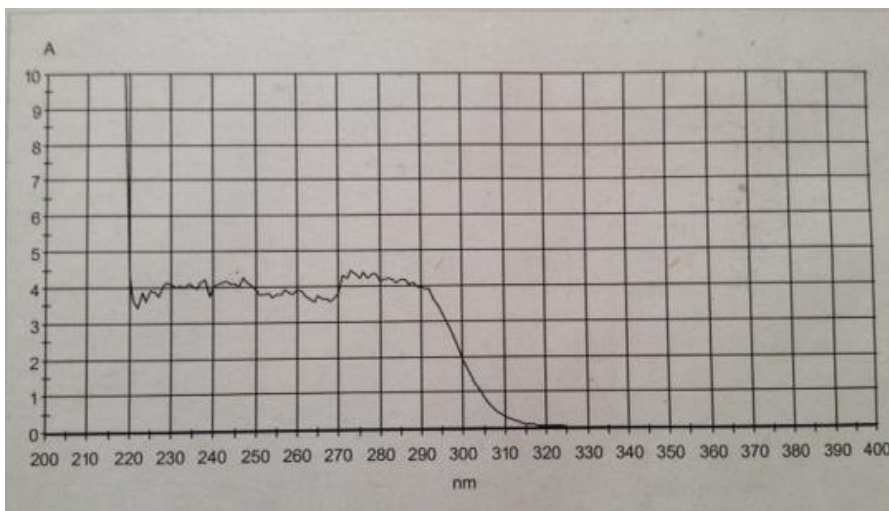


Figura 4.- Barrido de la muestra cargada con metronidazol usando como precipitante el ácido perclórico.

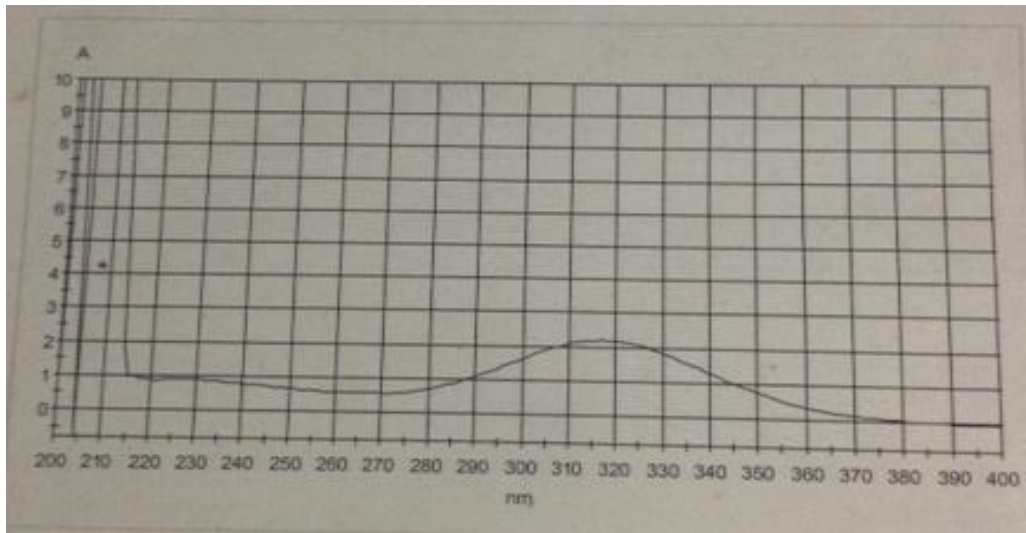


Figura 5.- Barrido de la muestra con metronidazol tratada con Acetonitrilo.

Parámetros	Condiciones finales
Disolvente	ACN
Precipitante	ACN
Volumen de Precipitante	600µL
Tiempo de Centrifugación a 15000rpm	10min

Tabla 10.- Condiciones finales que se utilizaran en este método.

Validación del método

Selectividad del método

En la determinación del método analítico validado se probaron los siguientes agentes precipitantes ACN, HClO₄, y HCl.

De los métodos de extracción se eligió la precipitación de proteínas ya que este método es sencillo y necesita un tiempo corto de preparación en la muestra, sin embargo se tuvieron que probar diferentes agentes precipitantes como fueron el HCl, HClO₄ y ACN.

En la selectividad del método se puede observar en los barridos la Figura 3 que el plasma no interfiere con el analito de estudio ya que presenta una longitud de onda debajo de los 230nm. Se puede observar en el barrido de la muestra de la Figura 4 el ácido perclórico que este si interfiere con el analito también se descarta en consideración a lo molesto que resultaría trabajar con él debido a su toxicidad y el manejo. Se observa en el barrido de la Figura 5 que el Acetonitrilo no interfiere con el analito, la longitud de onda máxima del acetonitrilo se encuentra en los 190 nm por lo que es ideal usarlo puesto que entre estas longitudes de onda hay una distancia considerable. Es por esto que se tomó al Acetonitrilo como agente precipitante además de que no presentaba impurezas visibles después del tratamiento de extracción de proteínas.

El ácido clorhídrico se descartó debido a que presentaba impurezas visibles en el tubo eppendorf con existencia de gránulos amarillos alrededor de las paredes después del tratamiento final, interfiriendo con la lectura, no desapareciendo estas impurezas aún aumentando el tiempo de centrifugación.

Curva de Calibración del método

Tabla 11.- Resultados de la curvas de calibración del método.

Concentración µg/mL	Curva 1 Abs	Curva 2 Abs	Curva 3 Abs	Promedio	DE	%CV	%DEA
0.6	0.0124	0.0125	0.0123	0.0124	0.0001	0.8065	-843
2	0.025	0.026	0.025	0.0253	0.0006	2.2790	5.870
4	0.058	0.062	0.06	0.0600	0.0020	3.3333	-3.536
8	0.106	0.108	0.11	0.1080	0.0020	1.8519	9.127
20	0.284	0.303	0.309	0.2987	0.0131	4.3698	1.524
32	0.475	0.485	0.51	0.4900	0.0180	3.6791	-0.518
40	0.628	0.644	0.644	0.6387	0.0092	1.4464	-4.621
64	0.959	0.963	0.954	0.9587	0.0045	0.4704	2.035
80	1.235	1.232	1.235	1.2340	0.0017	0.1404	-0.801
104	1.583	1.606	1.573	1.5873	0.0169	1.0660	0.329
r	0.9995	0.9994	0.9989	0.9992			
m	0.0154	0.0155	0.0152	0.0153			
b	-0.0100	-0.0045	0.0038	-0.0036			

Tabla 12.- Curva promedio de absorbancias del método

Concentración	Promedio de Absorbancias
0.6	0.0124
2	0.0253
4	0.0600
8	0.1080
20	0.2987
32	0.4900
40	0.6387
64	0.9587
80	1.2340
104	1.5873
r	0.9992
m	0.0153
b	-0.0036

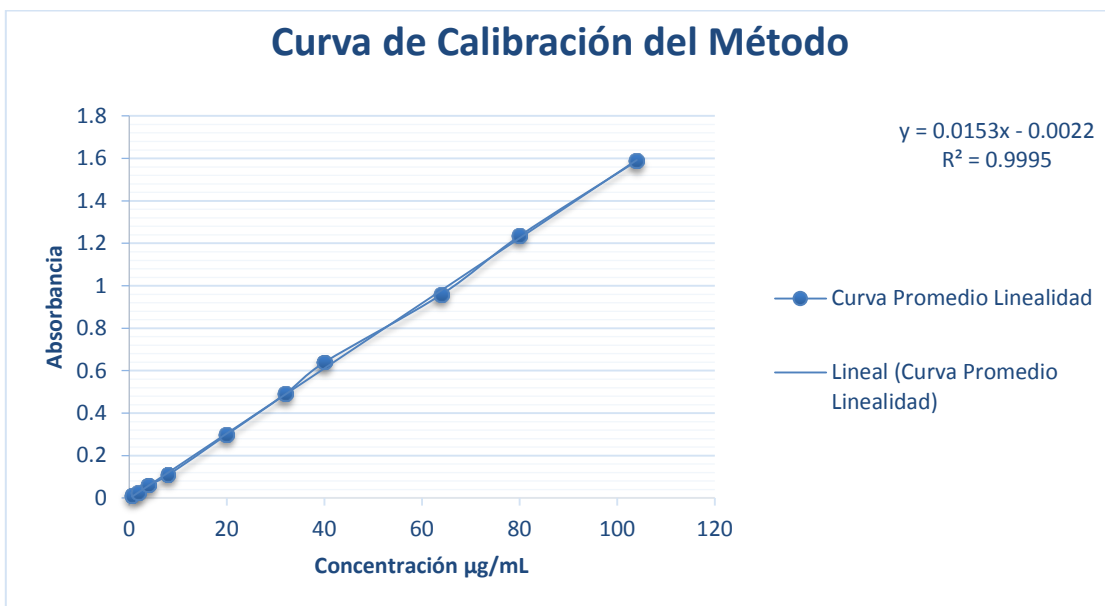
Cálculos

$$\text{Concentración} = \frac{\text{Absorbancia Obtenida} - \text{Ordenada al Origen}(b)}{\text{Pendiente}}$$

Concentración µg/mL	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Concentración calculada promedio µg/mL
0.6	0.5662	0.5728	0.5596	0.5662
2	2.2866	1.9764	1.3944	1.8858
4	4.4417	4.3063	3.6948	4.1476
8*	7.5765	7.2833	6.9811	7.2803
20	19.2013	19.9034	20.0608	19.7218
32*	31.6751	31.6822	33.2719	32.2097
40	41.6672	41.9724	42.0793	41.9063
64*	63.2841	62.6176	62.4546	62.7854
80	81.3090	80.0269	80.9238	80.7532
104	104.0362	104.2316	103.1394	103.8024

Tabla13.- Resultados de concentraciones calculadas

Figura 6.- Curva de calibración promedio del método.



Precisión

Repetibilidad

Tabla 14.- Resultados de repetibilidad del método

	Muestra Control	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Concentración calculada $\mu\text{g/mL}$	
Repetibilidad	BAJA	8 $\mu\text{g/mL}$	7.15	
			7.21	
			7.34	
			7.02	
			7.28	
		Promedio	7.16	
		DE	0.12	
		%CV	1.74	
		MEDIA	32 $\mu\text{g/mL}$	31.44
				32.61
	31.50			
	33.52			
	31.37			
	Promedio		32.09	
	DE		0.94	
	%CV		2.95	
	ALTA	64 $\mu\text{g/mL}$	61.67	
			62.19	
			63.24	
			65.13	
			64.94	
Promedio		63.43		
DE		1.56		
%CV		2.46		

Reproducibilidad

Tabla 15.- Resultados de reproducibilidad punto control bajo del método.

Reproducibilidad	Día 1	Muestra BAJA	Concentración calculada $\mu\text{g/mL}$
		8 $\mu\text{g/mL}$	7.15
			7.21
			7.34
			7.02
			7.28
		Promedio	7.16
		DE	0.12
	%CV	1.74	
	Día 2	8 $\mu\text{g/mL}$	6.87
			6.61
			7.01
			7.27
			6.48
		Promedio	6.85
		DE	0.31
%CV		4.53	

Tabla 16.- Resultados de reproducibilidad punto control medio del método.

Reproducibilidad	Día 1	CONTROL MEDIO	Concentración calculada $\mu\text{g/mL}$
		32 $\mu\text{g/mL}$	32.55
			32.81
			32.42
			32.61
			32.16
		Promedio	32.51
		DE	0.24
		%CV	0.74
		Día 2	32 $\mu\text{g/mL}$
	31.18		
	31.24		
	30.46		
	29.55		
	Promedio	30.44	
	DE	0.78	
	%CV	2.58	

Tabla 17.- Resultados de reproducibilidad punto control alto del método.

Reproducibilidad	Día 1	CONTROL ALTO	Concentración calculada $\mu\text{g/mL}$
		64 $\mu\text{g/mL}$	62.45
			61.54
			63.24
			62.26
			62.65
		Promedio	62.43
		DE	0.61
		%CV	0.98
		Día 2	64 $\mu\text{g/mL}$
	61.74		
	62.39		
	62.85		
	62.78		
	Promedio	62.32	
	DE	0.50	
	%CV	0.81	

Exactitud

Tabla 18.- Resultados de exactitud del método.

	Muestra Control	Concentración	Concentración calculada	%Desviación	
Exactitud	BAJA	8 µg/mL	6.87	14.00	
			6.61	17.25	
			7.01	12.37	
			7.27	9.11	
			6.78	15.13	
		Promedio	6.91	13.57	
		DE	0.24		
		%CV	3.54		
		MEDIO	32 µg/mL	29.75	7.03
				31.18	2.55
	31.24			2.34	
	30.46			4.79	
	29.55			7.64	
	Promedio		30.44	4.87	
	DE		0.78		
	%CV		2.58		
	ALTA	64 µg/mL	61.87	3.32	
			61.74	3.52	
			62.39	2.50	
			62.85	1.79	
			62.78	1.89	
		Promedio	62.32	2.61	
		DE	0.50		
		%CV	0.81		

Estabilidad

Estabilidad Tiempo 0

Tabla 19.- Resultados estabilidad a tiempo cero.

	PUNTO CONTROL	Absorbancia	Concentración Calculada	% Desviación
Tiempo cero (procesadas 1)	8 µg/mL	0.108	8.152	1.903
		0.113	8.495	6.191
		0.106	8.015	0.188
		Promedio	8.220	2.761
		DE	0.247	
		%CV	3.009	
	32 µg/mL	0.449	31.549	1.407
		0.445	31.275	2.265
		0.438	30.794	3.766
		Promedio	31.206	2.479
		DE	0.382	
		%CV	1.224	
	64 µg/mL	0.887	61.602	3.746
		0.875	60.778	5.033
		0.882	61.259	4.282
		Promedio	61.213	4.354
		DE	0.413	
		%CV	0.675	

Tabla 20.- Resultados de estabilidad a Temperatura Ambiente 20°C

	PUNTO CONTROL	Absorbancia	Concentración Calculada	%Desviación
	Temperatura Ambiente 24hrs	8 µg/mL	0.085	7.071
0.082			6.861	14.231
0.087			7.211	9.855
Promedio			7.048	11.89
DE			0.176	
%CV			2.500	
32 µg/mL		0.383	27.936	12.699
		0.39	28.426	11.167
		0.401	29.196	8.760
		Promedio	28.519	10.87
		DE	0.635	
		%CV	2.227	
64 µg/mL		0.85	60.633	5.259
		0.867	61.824	3.400
		0.872	62.174	2.853
		Promedio	61.544	3.83
		DE	0.807	
		%CV	1.312	

Tabla 21.- Resultados de estabilidad Refrigeración a 24hrs.

	PUNTO CONTROL	Absorbancia	Concentración Calculada	%Desviación
	Refrigeración procesadas 24hrs	8 µg/mL	0.089	7.351
0.088			7.281	8.980
0.087			7.211	9.855
Promedio			7.281	8.980
DE			0.070	
%CV			0.961	
32 µg/mL		0.404	29.406	8.104
		0.417	30.316	5.259
		0.406	29.546	7.666
		Promedio	29.756	7.010
		DE	0.490	
		%CV	1.647	
64 µg/mL		0.844	60.213	5.916
		0.787	56.222	12.152
		0.783	55.942	12.589
		Promedio	57.459	10.219
		DE	2.389	
		%CV	4.157	

Tabla 22.- Resultados de estabilidad. Refrigeración a 48hrs.

	PUNTO CONTROL	Absorbancia	Concentración Calculada	%Desviación
	Refrigeración procesadas después de 48	8 µg/mL	0.086	7.141
0.089			7.351	8.105
0.087			7.211	9.855
Promedio			7.234	9.563
DE			0.107	
%CV			1.478	
32 µg/mL		0.469	33.957	6.117
		0.476	34.447	7.649
		0.468	33.887	5.898
		Promedio	34.097	6.555
		DE	0.305	
		%CV	0.895	
64 µg/mL		0.861	61.403	4.056
		0.876	62.454	2.415
		0.893	63.644	0.555
		Promedio	62.500	2.342
		DE	1.121	
		%CV	1.793	

Tabla 23.- Resultados de estabilidad en Refrigeración a 7 días

	PUNTO CONTROL	Absorbancia	Concentración Calculada	%Desviación
	Refrigeración 7 días	8 µg/mL	0.120	8.374
0.1			7.041	11.978
0.102			7.175	10.312
Promedio			7.530	8.992
DE			0.734	
%CV			9.750	
32 µg/mL		0.414	27.972	12.587
		0.469	31.638	1.130
		0.461	31.104	2.797
		Promedio	30.238	5.505
		DE	1.980	
		%CV	6.550	
64 µg/mL		0.914	61.300	4.217
		0.954	63.966	0.051
		0.961	64.433	0.677
		Promedio	63.233	1.649
		DE	1.690	
		%CV	2.673	

Tabla 24.- Resultados de estabilidad Congelación a 15 días

	PUNTO CONTROL	Absorbancia	Concentración Calculada	%Desviación
	Congelación 15 días	8 µg/mL	0.105	7.375
0.107			7.508	6.146
0.106			7.441	6.979
Promedio			7.442	6.980
DE			0.066	
%CV			0.895	
32 µg/mL		0.444	29.971	6.338
		0.432	29.171	8.838
		0.430	29.038	9.254
		Promedio	29.394	8.143
		DE	0.504	
		%CV	1.717	
64 µg/mL		0.906	60.767	5.051
		0.926	62.100	2.968
		0.858	57.567	10.050
		Promedio	60.145	6.023
		DE	2.329	
		%CV	3.873	

Tabla 25.- Resultados de estabilidad Refrigeración 15 días

	PUNTO CONTROL	Absorbancia	Concentración Calculada	%Desviación
	Refrigeración 2da semana	8 µg/mL	0.108	7.657
0.103			7.307	8.660
0.11			7.798	2.525
Promedio			7.587	5.154
DE			0.252	
%CV			3.331	
32 µg/mL		0.438	30.795	3.765
		0.42	29.533	7.709
		0.461	32.407	1.274
		Promedio	29.720	4.249
		DE	2.599	
		%CV	8.745	
64 µg/mL		0.863	60.593	5.323
		0.93	65.290	2.016
		0.906	63.608	0.612
		Promedio	63.164	2.650
		DE	2.380	
		%CV	3.768	

Tabla 26.- Resultados de estabilidad Congelación a 21 días.

	PUNTO CONTROL	Absorbancia	Concentración Calculada	%Desviación
	Congelación 21 días	8 µg/mL	0.067	6.886
0.071			6.816	14.795
0.084			7.026	12.166
Promedio			6.909	13.626
DE			0.107	
%CV			1.550	
32 µg/mL		0.397	27.920	12.748
		0.434	30.514	4.641
		0.443	31.145	2.669
		Promedio	29.860	6.686
		DE	1.709	
		%CV	5.724	
64 µg/mL		0.846	59.401	7.185
		0.891	62.556	2.255
		0.89	62.486	2.365
		Promedio	61.481	3.935
		DE	1.801	
		%CV	2.930	

Tabla 27.- Resultados de estabilidad Congelación a 28 días

	PUNTO CONTROL	Absorbancia	Concentración Calculada	%Desviación
	Congelación 28 días	8 µg/mL	0.108	6.930
0.107			6.861	14.229
0.109			6.998	12.515
Promedio			6.930	13.372
DE			0.068	
%CV			0.989	
32 µg/mL		0.413	27.839	13.002
		0.450	30.375	5.076
		0.414	27.907	12.788
		Promedio	28.479	10.289
		DE	1.685	
		%CV	5.917	
64 µg/mL		0.871	59.236	7.442
		0.836	56.837	11.191
		0.854	58.071	9.263
		Promedio	58.048	
		DE	1.199	
		%CV	2.067	

Análisis de Resultados

La primera etapa del desarrollo del método fue encontrar las condiciones espectrofotométricas necesarias para cuantificar al metronidazol en plasma humano. Se partió de métodos previamente descritos por otros autores en los que se utiliza CLAR y una longitud de onda de 318nm; estos trabajos reportan que el Metronidazol el rango de concentraciones va de 0.04µg/mL a 20µg/mL para CLAR pero considerando la infraestructura de los equipos de licenciatura se adaptó para el espectrofotómetro experimentando con los rangos y manteniendo la longitud de onda de los mismos.

De estos experimentos se obtienen condiciones iniciales que fueron probadas, sin embargo algunos de estos no dieron buenos resultados puesto que se presentaron problemas de selectividad y precipitación de proteínas, por consecuencia se realizaron cambios en las condiciones con el propósito de optimizar y obtener una adecuada cuantificación de Metronidazol. Para establecer un rango de trabajo en nuestra curva se acoto con las concentraciones que se observaron en el espectrofotómetro por lo que el intervalo final se definió de 0.6µg/mL a 104µg/mL.

De los métodos de extracción se eligió la precipitación de proteínas ya que este método es sencillo y necesita un tiempo corto de preparación en la muestra, sin embargo se tuvieron que probar diferentes agentes precipitantes como fueron el HCl, HClO₄ y ACN.

En la selectividad del método se puede observar en los barridos la Figura 3 que el plasma no interfiere con el analito de estudio ya que presenta una longitud de onda debajo de los 230nm. Se puede observar en el barrido de la muestra de la Figura 4 el ácido perclórico que este si interfiere con el analito también se descarta en consideración a lo molesto que resultaría trabajar con él debido a su toxicidad y el manejo. Se observa en el barrido de la Figura 5 que el Acetonitrilo no interfiere con el analito, la longitud de onda máxima del acetonitrilo se encuentra en los 190 nm por lo que es ideal usarlo puesto que entre estas longitudes de onda hay una

distancia considerable. Es por esto que se tomó al Acetonitrilo como agente precipitante además de que no presentaba impurezas visibles después del tratamiento de extracción de proteínas.

El ácido clorhídrico se descartó debido a que presentaba impurezas visibles en el tubo eppendorf con existencia de gránulos amarillos alrededor de las paredes después del tratamiento final, interfiriendo con la lectura, no desapareciendo estas impurezas aún aumentando el tiempo de centrifugación.

La linealidad se evaluó realizando tres curvas en las que la curva promedio se obtuvo un coeficiente de correlación fue de 0.9992%, una pendiente de $m = 0.0153$ y una ordenada al origen de $b = -0.0036$. Siguiendo los lineamientos de la NOM-177-SSA1 vemos que nuestra curva tiene un factor de correlación mayor de 0.98% y la desviación estándar fue menor al 20% del punto más pequeño de la curva de calibración y menor al 15% en los puntos subsecuentes por lo que se puede considerar que el método es lineal, esto también se puede apreciar en la Figura 6 del presente trabajo.

La precisión se evaluó en repetibilidad y reproducibilidad; en la repetibilidad se observa que en el punto control bajo hubo una desviación estándar de 0.12 y un $CV\% = 1.74\%$, en el punto control medio se observó una desviación estándar de 0.94 y $CV\%$ de 2.95, el punto control alto existió una $DE = 1.56$ y un $CV\% = 2.46$. Por lo que refiriéndose a los criterios todos los $CV\%$ fueron menores al 15% entonces podemos decir que el método es repetible en los rangos de trabajo.

Para la reproducibilidad se analizaron por quintuplicado tres curvas analíticas diferentes y en 2 días diferentes, se puede observar una tabla para cada punto control ya sea PCB, PCM, PCA en la que se ven los resultados de los dos días diferentes (Tablas 15, 16, 17), para el PCB existió un promedio de 7.16, DE de 0.12 y un $CV\%$ de 1.74 para el primer día; en el segundo día el promedio fue de 6.85 y una DE de 0.31, $CV\%$ de 4.53. Para el PCM el promedio fue de 32.51, una desviación de 0.24 y un $CV\%$ de 0.74 en el primer día. En el segundo día el promedio de 30.44, una desviación de 0.78 y un $CV\%$ de 2.58. Para la última tabla

del PCA se observa que el promedio del primer día fue de 62.43, la desviación estándar fue de 0.61 y un %CV de 0.98. El segundo día el promedio fue de 62.32, la desviación estándar fue de 0.50 y el %CV de 0.81. se observa conforme a los lineamientos de la NOM-177-SSA1-2013 los CV% del valor promedio no fueron mayores de 15% por lo que existen consistencias entre los dos días de las curvas que se realizaron, esto es benéfico para nuestro experimento ya que si este método se implementa en el laboratorio de biofarmacia por los horarios que este maneja.

En la evaluación de la exactitud de este método se obtuvo con los datos del segundo día de repetibilidad y reproducibilidad calculando el porcentaje de desviación de cada muestra, observándose que se tiene un porcentaje menor al 15% por lo que cumple con los parámetros que requiere la norma y se puede decir que el método es exacto en estas condiciones.

La estabilidad del tiempo cero muestra en la tabla 19 en la cual se observa que la desviación estándar de cada punto (PCB, PCM, PCA) no es mayor a 15%, por lo que se puede establecer que al analizar las muestras el mismo día en que se preparan son estables. De igual forma se analizó el análisis de estabilidad de las muestras procesadas en plasma humano a una temperatura de 4°C y -60°C , se analizaron un total de tres muestras de cada control (PCB, PCM, PCA) en un periodo de 0, 24hrs en refrigeración a 4°C y a Temperatura ambiente, también a 48hrs, 7, 15 y 21 días en refrigeración y congelación. Estas muestras fueron analizadas contra muestras preparadas el mismo día de análisis para comparar los resultados obtenidos y determinar si las muestras son estables durante el periodo de tiempo estudiado y cumplen con los requerimientos de la la NOM-177-SSA1-2013 (9. Criterios y requisitos para el análisis de muestras biológicas de un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia)

Conclusiones

Se desarrolló y validó un método analítico para cuantificar metronidazol en plasma por espectrofotometría UV de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013 (9. Criterios y requisitos para el análisis de muestras biológicas de un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia), el cual puede emplearse en el desarrollo de prácticas de laboratorio de Biofarmacia.

El método desarrollado para la cuantificación de metronidazol en plasma demostró ser selectivo, lineal, exacto y preciso en un intervalo de trabajo de 0.6µg/mL a 104µg/mL.

Bibliografía

- 1.- Esperanza Torres Espinosa y Juan Pedro Castrellón Santa Anna. (Abril 2000). Minimización del impacto ecológico empleando microescala en los laboratorios de enseñanza Química. Educación Química, Volumen 1, págs.4.
- 2.- Diego Vicente, Emilio Pérez-Trallero. (15 de Octubre del 2009). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. Elsevier, Vol. 28, pág. 9. Consultado el 31-03-2016, De Elsevier Base de datos.
- 3.- Andrés Bendesky, Daniel Menéndez. (Noviembre-Diciembre, 2001). Metronidazol: Una visión integral . Facultad de Medicina, Vol. 44 No. 6, 5
- 4.-Kimberly A. Workowski, MD Stuart Berman; Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010 *Recommendations and Reports* December 17, 2010) / 59(RR12);1-110 Prepared by, MD Division of STD Prevention National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention Emory University, Atlanta, Georgia
5. Lau AH, Lam NP, Piscitelli SC. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. Clin Pharmacokinet (1992); 23: 328-64.
- 6.- Heisterberg L, Branebjerg PE. Blood and milk concentrations of metronidazole in mothers and infants. J Perinat Med 1983; 11: 114-20.
- 7.- Stambaugh JE, Feo LG, Manthei RW. The isolation and identification of the urinary oxidative of metronidazole in man. J Pharmacol Exp Ther 1968; 161: 373-6.
- 8.- S.S.A. Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables para farmacias y público en general. (Junio de 2005) págs. 31 a 39.
- 9.- S. Lakshmana Prabu and T. N. K. Suriyaprakash (2012). Extraction of Drug from the Biological Maatrix: A Review, Applied Biological Engineering – Principies and Practique, Dr. Ganesh R. Naik (Ed.) ISBN: 978-953-51-0412-4, InTech
- 10.- Cruz, L. (2015) Desarrollo y Validación de un Método Analítico para la cuantificación de Glimepirida en plasma de Rata por HPLC. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- 11.- G. Schill, H Ehrsson, J. Vessman and D. Westerlund, Separation Methods for Drugs and Related Organic Compounds, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, 2nd ed. 1983.

12.- J. A. F. de Silva, in J Swarbrik (Editor), Current Concepts in the Pharmaceutical Sciences, Vol. 1, Biopharmaceutics, Lea and Febiger, Philadelphia, P.A. 1970, p.p.203-264.

13.- S. A. Kaplan and M.L. Jack, in J.W. Bridges and L.F. Chasseaud (Editors). Progress in Drug Metabolism, Vol. 4, Wiley. New York, 1980, pp I-55

14.- Ho TS. Bjergaard SP, Rasmussen KE (2002). Liquid-phase microextraction of protein bound drugs under non-equilibrium, *Analyst*,127,608-13

15.- Watt AP, Morrison D, Evans D.C. (2000). Approaches to higher throughput pharmacokinetics in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 5(1), 17-24.

16.- Daniel C. Harris. (2001). Análisis Químico Cuantitativo. Barcelona, España: Editorial Reverté. Pág. 713

17.- Backes. D. (2000) Strategy for the development of quantitative analytical procedures, In: Principles and Practice of Bioanalysis, Venn RF, 342-358, Taylor & Francis, N. Y.

18. - Wells D.A. (2003) Protein precipitation: High throughput techniques and strategies for method development, In: High Throughput Bioanalytical Sample Preparation – Methods and Automation Strategies, Wells DA, 199-256, Elsevier, Amsterdam.

19.- NOM-177-SSA1-2013 Pruebas y Procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. 2013 México D. F.

20.- Food and Drug Administration. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation, September 2013

21-, I. Al Dabagh and F. K Mohammad, 2008, Pharmacokinetics and Distribution of Metronidazole Administered Intraperitoneally

22.- Elena Gabriela Oltean, A. Nica. (2011), Development and Validation of a RP-HPLC method for the Quantization Studies of Metronidazole in tablets powders Dosage forms.

23.- Essam Ezzeldin and Toqa M. El-Nahas,(2012), New Analytical Method for the Determination of Metronidazole in Human Plasma: Application to Bioequivalence Study, *Tropical Journal of Pharmaceutical*, págs. 7

24.- Jaber Emami, Neda Ghassami, Hamed Hamishehkar, A rapid and Sensitive HPLC Method for the Analysis of Metronidazole in human plasma: Application to single dose Pharmacokinetic and Bioequivalence Studies. DARU, Vol.14, No. 2006, págs. 7

25.- Maryadele J. O'Neil, (2006) The Merck Index an Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, Fourteenth Edition, pág.1061

26.- British Pharmacopoeia 2012, Vol.2, (1 January 2012), 5th Floor, 151 Buckingham Palace Road, London, SW IW 9SZ, page. 1464-1465.