



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**  
FACULTAD DE QUIMICA

---

LABORATORIO DE BIOFARMACIA

SIMULACIÓN DE UNA BIODISPONIBILIDAD RELATIVA  
DE METRONIDAZOL PARA APLICACIÓN EN  
LABORATORIO DE BIOFARMACIA

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

**FUENTES RANGEL KARINA**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017



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: INÉS FUENTES NORIEGA

VOCAL: LIZ JANNET MEDINA REYES

SECRETARIO: BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ

1er. SUPLENTE: NATIVIDAD GARCIA ESCAMILLA

2do. SUPLENTE: KENNETH RUBIO CARRASCO

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

ASESOR DE TEMA:

DRA. INÉS FUENTES NORIEGA

SUPERVISOR TECNICO:

M. en C. KENNETH RUBIO CARRASCO

SUSTENTANTE:

FUENTES RANGEL KARINA

**AGRADECIMIENTO POR EL FINANCIAMIENTO BRINDADO PARA LA  
REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO A LOS PROYECTOS:**

**PAPIME: PE207815**

**FACULTAD DE QUÍMICA (PAL) 3000-3467**

**BANCO DE SANGRE DE HOSPITAL MÉDICA SUR, TLAPAN DE LA CIUDAD  
DE MÉXICO**

*Agradezco infinitamente a mis padres, **Jose y Miguel**, quienes me dieron todo y más en esta hermosa vida a su lado, sus consejos, apoyo, aliento, amor, comprensión y desvelos, por ser excelentes ejemplos a seguir y demostrar día a día que con esfuerzo todo es posible.*

*Los amo tanto que quisiera que siempre supieran cuanto viven en mis pensamientos, y sobre todo les agradezco que me regalaran una familia tan hermosa.*

*A mis hermanos **Liz y Jos**, Mis compañeros, cómplices y consejeros, por cuidarme y protegerme, por siempre caminar a mi lado y darme todo el amor incondicional con el que crecí rodeada, por ser mis mentores en muchas cosas y por ser también un ejemplo a seguir, les amo con todo mi ser.*

***Leo**  
Gracias por todo el apoyo incondicional, por caminar juntos en los momentos cruciales de mi vida profesional y personal, por apoyarme, comprenderme y darme la fuerza que necesitaba, por todo tu amor y los momentos mágicos e inolvidables que vivimos juntos, Te amo.*

*A toda mi hermosa familia*

*Cada uno tiene un lugar especial en mí, por su amor, apoyo, presencia,  
por creer en mí y brindarme la seguridad con la que crecí.  
Mis Abuelos a quienes adoro con todo mi ser, mis Tías y Tíos por confiar en mí y  
su apreciado cariño, a todos mis Primos amados, con quienes crecí, pase y  
pasaré los momentos más inolvidables de mi vida.*

*Amados amigos*

*Siempre vivirán en mi corazón, todos y cada uno, formando parte esencial de mi vida, les amo tanto y agradezco el cariño, apoyo, risas y alegrías, llantos y tristezas, felicidad, todas las vivencias juntos y sobre todo por ser mis Hermanos dentro y fuera de la escuela, les amaré por siempre. Caro, Emma, Alda, Erick, Pili , Neto, Pepe, Ale, Angelito, Lau, Vicky, Pols, Are, Danni, Diana, May, Agni, Alex, Edgarsito, Marce, Dave, Carlita, Nandiz, Toñito Tavo y Josè.*

*There are places I remember all my life  
Though some have changed  
Some forever, not for better  
Some have gone and some remain*

*All these places have their moments  
Of lovers and friends I still can recall  
Some are dead and some are living  
In my life I loved them all*

The Beatles, In my life.

## ÍNDICE GENERAL

### Anexos

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| Índice de abreviaturas..... | 9  |
| Índice de tablas.....       | 11 |
| Índice de figuras.....      | 13 |
| Resumen.....                | 14 |
| Objetivos.....              | 15 |

## CAPÍTULO I

### 1. Metronidazol

|   |    |
|---|----|
| 1.1.1 Propiedades fisicoquímicas, farmacológicas y farmacéuticas..... | 16 |
| 1.1.2 Bases de la farmacocinética.....                                | 21 |
| 1.1.3 Biodisponibilidad.....  | 25 |
| 1.1.4 Bioequivalencia .....   | 28 |
| 1.1.5 Revalidación de la metodología.....                             | 31 |
| 1.1.6 Muestra biológica.....  | 32 |
| 1.2 Curva de calibración.....   | 35 |

## CAPÍTULO II

### 2 DESARROLLO EXPERIMENTAL

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| 2.1 Equipo y materiales.....     | 40 |
| 2.2 Reactivos y disolventes..... | 41 |
| 2.3 Optimización del método..... | 41 |

|  |    |
|--|----|
| 2.4 Revalidación del método.....                       | 42 |
| 2.5 Método de extracción de muestras.....              | 46 |
| 2.6 Simulación de perfil farmacocinético en Excel..... | 47 |
| 2.7 Aplicación del método a grupo piloto.....          | 51 |

### CAPÍTULO III

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

|   |    |
|---|----|
| 3.1 Curva de calibración.....                     | 53 |
| 3.2 Repetibilidad.....                            | 55 |
| 3.3 Reproducibilidad.....                         | 56 |
| 3.4 Exactitud.....                                | 59 |
| 3.5 Perfil farmacocinético simulado en Excel..... | 60 |
| 3.6 Resultados de grupo piloto.....               | 63 |
| 3.7 Conclusiones.....                             | 67 |
| 3.8 Bibliografía.....                             | 68 |

|                 |    |
|-----------------|----|
| Apéndice A..... | 72 |
|-----------------|----|

## INDICE DE ABREVIATURAS

|          |   |
|----------|---|
| mg       | miligramos  |
| min.     | minutos   |
| µg       | microgramos   |
| µL       | microlitros   |
| Cp       | Concentración plasmática                                |
| COFEPRIS | Comité 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

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Criterios de aceptación para la linealidad del método.

Tabla 2.- Criterios de aceptación para la repetibilidad del método.

Tabla 3.- Criterios de aceptación para la reproducibilidad del método.

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

Tabla 5.- Preparación de curva de calibración y muestras de control de calidad de metronidazol en plasma.

Tabla 6.- Tabla de Cp vs tiempo de metronidazol en plasma, simuladas en excel.

Tabla 7.- Preparación de concentraciones de metronidazol en plasma para simulación de perfiles farmacocinéticos de un producto referencia y dos productos prueba.

Tabla 8.- Preparación de concentraciones de metronidazol en plasma para simulación de perfiles farmacocinéticos de un producto referencia y dos productos prueba.

Tabla 9.-Tiempos teóricos y concentraciones de metronidazol simulados.

Tabla 10.- Resultados de curva de calibración de metronidazol en plasma.

Tabla 11.- Resultados de repetibilidad del método.

Tabla 12.-Resultados de reproducibilidad punto control bajo del método.

Tabla 13.- Resultados de reproducibilidad punto control medio del método.

Tabla 14.-Resultados de reproducibilidad punto control alto del método.

Tabla 15.- Resultados de Exactitud del método.

Tabla 16.- Datos de concentraciones de las muestras cargadas en un perfil simulado.

Tabla 17.-Parámetros Farmacocinéticos obtenidos con las muestras cargadas según los datos de los perfiles farmacocinéticos simulados en Excel.

Tabla 18.- Datos de Curva de calibración del método, grupo Piloto.

Tabla 19.- Datos de Concentración de muestras proporcionadas a los alumnos del grupo piloto.

Tabla 20.- Parámetros farmacocinéticos estimados por el grupo piloto.

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Estructura química del metronidazol.

Figura 2.- Datos de Cp vs Tiempo con concentraciones de metronidazol simuladas en Excel.

Figura 3.- Gráfico de Cp vs tiempo de la Curva de calibración promedio de metronidazol.

Figura 4.- Comportamiento farmacocinético de metronidazol de muestras cargadas según datos simulados en excel.

Figura 5.- Perfil farmacocinético de las muestras cargadas con metronidazol analizadas por el grupo piloto.

## **RESUMEN**

En toda la descripción cualitativa o cuantitativa del destino de un fármaco en el organismo se considera un modelo hipotético del cuerpo, sin embargo dicho modelo resulta inútil si no es verificado por observaciones experimentales.

El Objetivo del presente trabajo fue la revalidación de un método analítico, para cuantificar metronidazol en plasma por espectrofotometría UV y su aplicación en el análisis de muestras provenientes de un estudio de biodisponibilidad relativa de metronidazol.

Se emplearon muestras de plasma cargadas, para la simulación de un perfil farmacocinético, con la finalidad de que pueda servir en el diseño de prácticas experimentales en la materia del laboratorio de biofarmacia, esto para no emplear al alumno como sujeto de investigación, disminuir el impacto negativo al ambiente, reducir los costos y utilizar la infraestructura con la que cuenta la Facultad de Química de la UNAM.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Simulación de un perfil farmacocinético con muestras plasmáticas, provenientes de muestras cargadas con metronidazol, considerando una dosis única de 1000 mg por vía oral, para su aplicación en un estudio de biodisponibilidad relativa como práctica del laboratorio de Biofarmacia.

## **Objetivos Específicos**

- Revalidación de la metodología en fluido biológico de metronidazol por espectrofotometría UV.
- Simulación experimental con muestras plasmáticas cargadas, de la farmacocinética de metronidazol, después de la administración por vía oral de tabletas de liberación inmediata y su determinación por espectrofotometría U.V.

## CAPITULO I

### MARCO TEORICO

#### METRONIDAZOL

##### 1.1.1. Propiedades fisicoquímicas, Farmacología y Farmacocinética

- PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

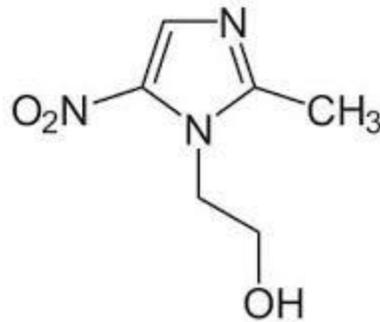


Figura 1. Estructura química del metronidazol

El Metronidazol (2-metil-5-nitroimidazol-etanol), es un producto en forma de cristales de color amarillento, con peso molecular de 158 g/mol a 160 g/mol, con una solubilidad a 20 °C g/100 mL en agua de 1.0, etanol 0.5, éter 0.05 y soluble en ácido diluido, el pH de una solución saturada es de 5.8<sup>1</sup>.

- MECANISMO DE ACCIÓN: El metronidazol, es un derivado del nitroimidazol, cuyo efecto está mediado por la reducción del grupo nitro en las bacterias y protozoarios, transformándose en productos altamente reactivos. Tiene efecto deletéreo sobre trofozoitos, pero ningún efecto sobre los quistes de *Entamoeba histolytica*.

Con acción bactericida, inhibiendo los microorganismos sensibles en fase de crecimiento. El metronidazol penetra en las células bacterianas por difusión

pasiva, siendo activado por un proceso de reducción, en aquellas células que poseen un sistema enzimático adecuado, como son las bacterias anaerobias. De la reducción del metronidazol resultan metabolitos activos que dañan el ADN de la bacteria, causando su muerte. Las bacterias aeróbicas tienen escaso poder reductor lo que explica la inactividad del fármaco frente a las mismas.

Espectro antimicrobiano:

- a) Bacterias generalmente sensibles. Más de 80% de las siguientes bacterias son sensibles: *Peptostreptococcus*, *Clostridium perfringes*, *Clostridium difficile*, *Clostridium sp.*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides sp.*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Veillonela*.
- b) Bacterias resistentes: Al menos el 50% de los aislamientos de las siguientes bacterias son resistentes: *Propionibacterium*, *Actinomyces*, *Mobiluncus*.
- c) Bacterias con sensibilidad variable: La resistencia adquirida es variable y, por lo tanto, impredecible sin pruebas de sensibilidad *in vitro* en las siguientes especies: *Bifidobacterium*, *Eubacterium*.
- d) Actividad antiprotozoaria: *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*.<sup>2, 3</sup>

- FARMACOCINÉTICA DEL METRONIDAZOL

El Metronidazol tiene las siguientes características farmacocinéticas:

Absorción y Biodisponibilidad:

Absorción oral rápida y completa, con muy buena biodisponibilidad tanto por la vía oral (99+8%), rectal (59-94%), por vía tópica (71%). Los medicamentos y alimentos no modifican la biodisponibilidad oral. El tiempo para alcanzar la concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ) ocurre entre 1 y 2 horas y varia conforme a la dosis empleada de la siguiente manera: 6,12, 21.4 y 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con dosis única oral de 250, 500, 750 y 2000 mg, respectivamente. En estado de equilibrio la  $C_{max}$  es de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con carga de 15 mg/Kg por vía endovenosa y de 18  $\mu\text{g}$  con dosis de mantenimiento de 7.5 mg/Kg cada 6 horas la concentración mínima inhibitoria de bacterias anaerobias varia de 0.25 a 4  $\mu\text{g}$ . Con dosis de 400 mg cada 12 horas por vía oral  $C_{max}$  es de 5.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y con 500 mg cada 12 horas por vía intravenosa es de 6.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Se absorbe en forma casi completa y rápida cuando se administra por vía oral. Los alimentos retrasan su absorción, determinando un retardo en alcanzar la concentración máxima, pero no disminuyen el total absorbido.

Distribución: El metronidazol tiene un volumen de distribución ( $V_d$ ) aproximado al total de agua corporal y penetra prácticamente a todos los tejidos. El  $V_d$  es de 0.25 a 0.85 L/Kg, con valor medio de 0.7 L/Kg. El  $V_d$  también se expresa como 5.4 L/70Kg. Se reportan los siguientes datos de concentración en diversos tejidos: en niños a dosis de 7.5 mg/Kg; en abscesos apendiculares alcanza concentraciones de 2.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tejido. En secreción bronquial, en líquido cefalorraquídeo y saliva se alcanzan concentraciones similares a las reportadas en sangre, mientras que en tejido pancreático llega a 5.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , con dosis de 500 mg por vía i.v, y a 7.2  $\mu\text{g}/\text{mal}$  en líquido peritoneal. El metronidazol cruza la barrera placentaria, el enlace a la albúmina plasmática es de hasta el 10%. Es importante señalar que la

concentración intracelular del metronidazol es ligeramente menor que la extracelular.

El volumen de distribución (Vd) del metronidazol es cerca del 80% del peso corporal menos el 20% que se liga a las proteínas plasmáticas. La penetración tisular es excelente en casi todos los tejidos y líquidos corporales, incluido el líquido cefalorraquídeo, saliva, leche materna, huesos y especialmente es importante su penetración en abscesos (cerebrales, hepáticos, etc.).

#### Metabolismo:

El metronidazol es biotransformado en el hígado por el sistema microsomal mediante oxidación de la cadena lateral para formar el 1 (2-hidroxietil-2-hidroximetil-5-nitro)-imidazol que mantiene hasta 30-65% de la actividad antimicrobiana del precursor, y el acetato del 2-metil-5-nitromidazol que es inactivo. El metabolito hidroxilado es posteriormente conjugado con el ácido glucurónico.

#### Eliminación:

Se elimina principalmente por vía renal 60-80% de la dosis administrada y puede acumularse en pacientes con daño renal, por lo que es recomendable reducir en ellos las dosis empleadas.

Se puede encontrar del 6 al 18 % del producto eliminado por vía renal como producto original, y del 24 al 28 % como el producto hidroxilado, el resto en forma de glucurónido. En presencia del metronidazol o de sus metabolitos la orina se tiñe de color rojizo. En las heces se elimina hasta el 15% por excreción biliar, también se elimina en la leche donde alcanza concentraciones similares a las observadas en la sangre.

La Vida media de eliminación varía de 6 -14 horas, y la del metabolito hidroxilado de 9.7 horas<sup>4, 5</sup>.

- Formas farmacéuticas: las características farmacocinéticas y de solubilidad del metronidazol, permiten elaborar diferentes formas farmacéuticas, incluyendo preparaciones tópicas en forma de gel o cremas, en concentraciones de 0.7 % tabletas o cápsulas en presentaciones de 200, 400 ó 500 mg, así como suspensiones con 50 a 100 mg/mL.
- También hay formas disponibles para administración *i.v.* el producto en solución tiene pH de 0.5 a 2.0 por lo que se debe administrar por vía *i.v* reconstituido y en forma lenta para evitar flebitis y dolor durante la infusión.
- Dosificación y vías de administración: la vía más común de administración es la oral, aunque también se puede emplear por vía rectal, tópica o endovenosa.

Las dosis varían conforme la indicación. En la colitis amebiana se emplea el esquema de 1.5 g/día, por 7 días o de 5 días en la giardiasis. En tricomoniasis se emplea dosis única de 2 g combinada en dosis de 500 mg y un óvulo vaginal de 500 mg/ durante 7 a 10 días, el tratamiento se extiende a la pareja sexual del paciente. En la enfermedad inflamatoria intestinal es recomendable la dosis de 15 mg/ Kg/ día por periodo de 10 días a 16 semanas y en la colitis ulcerativa una dosis de 600 mg/ día por periodos de hasta un año, en el esquema de mantenimiento para evitar recaídas del cuadro agudo.

- Toxicidad: Con relación a la dosis empleada. Pueden presentarse náuseas, anorexia y sensación de quemadura en la lengua (glositis) y sabor metálico, y es independiente de la vía de administración empleada. En el uso crónico pueden presentarse manifestaciones de neuropatía periférica. Todos los efectos indeseables son reversibles al suspender la administración del producto.

Tanto el metronidazol como sus metabolitos tienen actividad mutagénica en bacterias, y en el ratón induce linfoma y tumores en pulmón, no se ha demostrado

que induzca mutación de genes en células de mamíferos ni alteraciones cromosómicas.

En voluntarios sanos el metronidazol en dosis terapéuticas no tiene efectos genotóxicos en linfocitos, en cambio se observaron datos sugestivos de inmunoestimulación.

- Precauciones de uso: El Metronidazol es bien tolerado en forma aguda, pero con el uso prolongado existe el riesgo de leucopenia, convulsiones o neuropatía periférica, y se reporta el desarrollo de colitis pseudomembranosa. El Metronidazol potencia el efecto de los anticoagulantes y su metabolismo lo aceleran, fármacos como el fenobarbital o la prednisona, su uso está contraindicado en el embarazo a partir del segundo trimestre en pacientes con enfermedades del SNC, enfermedad hepática, o en sujetos que consuman alcohol por su efecto tipo Disulfiram. <sup>7</sup>

### 1.1.2 BASES DE LA FARMACOCINÉTICA<sup>2</sup>

La interacción del medicamento con el organismo requiere conocer, ¿qué le pasa al medicamento? (aspectos farmacocinéticos) y ¿qué le pasa al organismo? (aspectos farmacodinámicos). La descripción de este complejo proceso puede hacerse mediante modelos compartimentales, consistentes en un número finito de entidades “abstractas” en general, o con significación fisiológica - que es lo deseable- en particular.

Los modelos, aparte de su valor “descriptivo” y “predictivos”, es deseable que posean significancia fisiológica, reflejada en los “parámetros”, intercompartimentales.

La farmacocinética puede definirse como el estudio del comportamiento o evolución temporal, desde un punto de vista cuantitativo, de los fármacos en el organismo, desde que son administrados hasta que se eliminan.

Por tanto, abarca el estudio de los procesos de entrada del fármaco en el organismo, llegada al lugar de acción, metabolismo y salida del mismo. Los componentes básicos de la farmacocinética se abrevian en la serie LADME (liberación del fármaco del preparado farmacéutico, absorción o paso del fármaco a la sangre, distribución de éste en el organismo, metabolismo y eliminación).

Los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación ocurren de forma simultánea en el organismo; por tanto, tras la administración de un fármaco puede haber moléculas de éste que se estén absorbiendo, mientras otras ya han comenzado el proceso de eliminación.

Cuando se administra un medicamento, el fármaco es liberado de la forma de dosificación, se disuelve en el lugar de la absorción y desde allí se absorbe y distribuye por el organismo, accediendo a la biofase, donde se produce el efecto farmacológico. Simultáneamente, desde el primer momento en que el fármaco se encuentra en el organismo, es eliminado mediante procesos farmacológicos de metabolismo o excreción. Esta secuencia se designa convencionalmente bajo su acrónimo LADME.

- Liberación: primer proceso que sufre el fármaco, es decir, su separación del resto de componentes que constituyen la forma farmacéutica, esta etapa finaliza siempre con la disolución del fármaco para que pueda ser absorbido.
- Absorción: Proceso mediante el cual el fármaco accede a la circulación sistémica. En este proceso el fármaco atraviesa las diferentes barreras fisiológicas que existen hasta llegar a la sangre.

La vía de administración, determina la absorción del fármaco, excepto en el caso de vía intravenosa, en el que la dosis del fármaco va integra al torrente circulatorio (y por lo tanto no hay absorción), en las otras vías la absorción del fármaco nunca es completa.

- **Distribución:** una vez que las moléculas absorbidas del fármaco han llegado a torrente sanguíneo, tiene lugar la distribución, hasta alcanzar un estado de equilibrio dinámico entre concentraciones de las diferentes zonas del organismo.
- **Metabolismo:** desde que el fármaco está en el interior del organismo, se va distribuyendo y tiene lugar también su eliminación, que puede ser por metabolismo (biotransformación metabólica) y/o excreción (orina o bilis). Estos dos procesos disminuyen la concentración del fármaco activo en el organismo y por lo tanto reducen la actividad farmacológica y duración del efecto.
- **Excreción:** el fármaco y sus metabolitos se excretan a través de las vías fisiológicas que expulsan al exterior del organismo, líquidos y sustancias orgánicas. Las principales vías de eliminación, son la renal y la biliar, pero también se eliminan fármacos por vía pulmonar, la saliva o el sudor.

Curvas de niveles plasmáticos y principales parámetros farmacocinéticos.

En los estudios de farmacocinética, se pretende estimar parámetros cuantitativos que permitan obtener información acerca de los fenómenos implicados en los procesos LADME. Estos parámetros se obtienen a partir de estudios "in vivo", que proporcionan las curvas de niveles de fármaco en algún fluido biológico, frente al tiempo que nos describen la evolución temporal de la concentración del fármaco en el medio biológico considerado.

Los resultados obtenidos con los modelos simulados representativos de las concentraciones del fármaco en el organismo en función del tiempo, permiten estimar las constantes y parámetros farmacocinéticos representativos del comportamiento del fármaco, en función del modelo y vía de administración ensayada.

Para que un fármaco actúe debe existir una cantidad de éste en el órgano diana capaz de producir un efecto determinado.

La farmacocinética, además de estudiar descriptivamente los procesos de absorción, distribución, metabolismo y eliminación, también analiza estos procesos de forma cuantitativa, lo que permite definir y cuantificar parámetros como la velocidad de absorción del fármaco, su biodisponibilidad (cantidad del fármaco sin modificar que llega a la sangre), la vida media de eliminación (tiempo necesario para que la concentración plasmática del fármaco se reduzca a la mitad) y la concentración plasmática total de fármaco desde el momento de su administración hasta su eliminación total (representación gráfica que incluye toda la superficie o área bajo la curva y que relaciona las distintas concentraciones del fármaco durante todo el tiempo que éste permanece en plasma).

La farmacocinética forma parte imprescindible para el uso seguro y eficaz de los fármacos, proyectándose con fuerza sobre el diseño de fármacos y profármacos, así como en el desarrollo de nuevas formulaciones tecnológicas a través de la Biofarmacia, lo que permite asegurar a nivel básico óptimo de un fármaco en sus respectivas formas farmacéuticas, o si se requiere obtener el máximo rendimiento terapéutico.

El principio fundamental de la terapéutica farmacológica, es lograr que el fármaco llegue al sitio de acción y permanezca en el mismo a concentraciones adecuadas durante el tiempo necesario para lograr el efecto terapéutico. De este principio se deduce la importancia de la cantidad de fármaco que ingresa al organismo y la velocidad a la que lo hace. En el caso de la biodisponibilidad, los estudios se

basan en el empleo de procedimientos farmacocinéticos y estadísticos para hallar diferencias entre las magnitudes y velocidades de absorción de un fármaco.<sup>2</sup>

### 1.1.3 BIODISPONIBILIDAD<sup>10</sup>

La biodisponibilidad de un fármaco se define como la cantidad de fármaco que ingresa a la circulación sistémica y la velocidad a la cual este ingreso se produce. Como sinónimos podemos mencionar los términos: biodisponibilidad biológica y fracción biodisponible.

El estudio de la biodisponibilidad de un fármaco se basa en que cuando este es administrado por una vía extravascular, existe siempre el riesgo de que una fracción de la dosis administrada no ingrese a la circulación general, al tiempo que la velocidad de ingreso del fármaco a la circulación sistémica difiera de una formulación a otra o de una vía de administración a otra. Algunas causas de la reducción de la cantidad de fármaco biodisponible para ejercer su efecto terapéutico se presentan en los siguientes ejemplos.

En el caso de una administración oral

- Adsorción a partículas de alimento y posterior eliminación por materia fecal.
- Biotransformación por microorganismos ruminales y/o intestinales (efecto de primer paso).
- Biotransformación en los enterocitos (efecto de primer paso).
- Biotransformación hepática (efecto de primer paso).

En el caso de la velocidad de ingreso a la circulación sistémica, las variaciones de la misma se asocian a las características de la formulación tales como velocidad

de disgregación en el tracto digestivo en el caso de un comprimido o disolución/liberación del principio activo, desde la forma farmacéutica en el sitio de inyección en el caso de una formulación de administración parenteral extravascular.

Cuando se estudia la biodisponibilidad de un fármaco, se debe estimar la cantidad que ingresó a la circulación general y la velocidad de este ingreso. Para estimar la magnitud de estos fenómenos se emplean básicamente tres parámetros farmacocinéticos; el área bajo la curva de concentración plasmática en función del tiempo (ABC), la concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ) y el tiempo al cual esta se alcanza o tiempo de máxima concentración ( $T_{max}$ ).

- Área bajo la curva: Este parámetro, se usa para estimar la cantidad de fármaco ingresado a la circulación general. Su uso se fundamenta en el hecho de que existe una relación lineal entre el valor del ABC y la cantidad de fármaco ingresado a la circulación general.
- Concentración plasmática máxima observada,  $C_{max}$ : Este parámetro es un indicador tanto de la cantidad de fármaco ingresado a la circulación general como de la velocidad de ingreso. En el primer caso, se debe a la relación lineal existente entre la cantidad de fármaco ingresado y la concentración plasmática obtenida.
- Tiempo al que se observa la máxima concentración plasmática,  $T_{max}$ : este parámetro es un indicador relativo de la velocidad de ingreso del fármaco a la circulación general. Se lo considera de valor relativo ya que la verdadera magnitud de la velocidad de ingreso se debe estimar mediante procedimientos mucho más complejos y que están fuera del alcance y el objetivo del presente texto.

## Tipos de biodisponibilidad<sup>10</sup>

Los estudios de biodisponibilidad se realizan en su mayoría durante la fase de desarrollo farmacéutico, a fines de obtener una forma farmacéutica que garantice una cantidad de fármaco biodisponible y una velocidad de ingreso a la circulación general de tal magnitud que aseguren el efecto terapéutico. En este sentido, los estudios pueden ser de biodisponibilidad absoluta ( $F_{abs}$ ),  $F$  (fracción de dosis biodisponible) y biodisponibilidad relativa ( $F_{rel}$ ).

Biodisponibilidad absoluta ( $F_{abs}$ ): esta se estima a partir de la comparación de los valores del ABC obtenidas tras las administraciones intravascular y extravascular de un mismo fármaco a la misma dosis equimolar.

Se asume que tras la administración intravascular, la totalidad de la dosis ingresa a la circulación general, de manera que el ABC obtenida corresponde al máximo valor que se puede obtener para este parámetro con la administración de una dosis determinada.

Por el contrario, tras una administración extravascular, siempre existe el riesgo de que una fracción de la dosis administrada no sea biodisponible, por lo que el valor del ABC puede ser igual o menor al obtenido tras la administración intravascular.

El procedimiento para estimar la fracción de la dosis biodisponible ( $F$ ) absoluta es el siguiente:

$$F_{abs} = (ABC_{ev} / ABC_{iv}) \times 100$$

En donde  $ABC_{ev}$  es el área bajo la curva obtenida tras la administración extravascular y  $ABC_{iv}$  es el área bajo la curva obtenida tras la administración intravascular. El valor así obtenido es el porcentaje de la dosis administrada que ingresó a la circulación general tras su administración por vía extravascular.

Biodisponibilidad relativa: esta se estima a partir de la comparación entre los valores de las ABC,  $C_{max}$  y  $T_{max}$  obtenidas de un mismo fármaco que fuera administrado por vía extravascular a una misma dosis equimolar<sup>10</sup>.

## **BIOEQUIVALENCIA<sup>10</sup>**

Según la OMS, dos especialidades farmacéuticas son bioequivalentes cuando siendo equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas sus biodisponibilidades después de la administración en la misma dosis molar son semejantes en tal grado que puede esperarse que sus efectos sean esencialmente los mismos.

Los medicamentos genéricos son especialidades farmacéuticas compuestas por principios activos de eficacia y seguridad bien conocida que mantienen interés sanitario e industrial, estos son comercializados por otros laboratorios distintos de los que los desarrollaron y son comercializados a un precio menor, siempre que su fabricación cumpla con determinadas normativas que garanticen una eficacia y seguridad equivalente a la del producto innovador.

En nuestro país el organismo que dicta las normativas acerca de los estudios de bioequivalencia de medicamentos de uso humano es la ANMAT (*Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica*) que en la disposición 3185/99 aprobó el “Cronograma para exigencias de estudios de bioequivalencia entre medicamentos de riesgo sanitario significativo”. En el caso de medicamentos de uso veterinario el organismo que fija la reglamentación de los estudios de bioequivalencia es el SENASA (*El Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria*).

Todas las reglamentaciones acerca de los estudios de bioequivalencia se fundamentan en el mismo principio: si se administra un fármaco genérico o prueba (T) y un innovador o de referencia (R) a dos grupos de individuos a la misma dosis equimolar y se demuestra que el principio activo en el medicamento genérico (T) da origen al mismo perfil de concentraciones plasmáticas que el medicamento innovador (R), entonces estos pueden ser considerados intercambiables y la

evidencia de eficacia clínica y seguridad del fármaco innovador se puede aplicar al fármaco genérico con un riesgo mínimo para el paciente.

La razón de ser de los estudios de bioequivalencia con medicamentos genéricos es demostrar la recetabilidad y la intercambiabilidad entre fármacos innovadores y genéricos.

- Recetabilidad: en este caso el clínico puede garantizar el éxito terapéutico optando por prescribir indistintamente a un paciente tanto el medicamento innovador como el genérico.
- Intercambiabilidad: en este caso el clínico puede en mitad de un tratamiento reemplazar el producto innovador por el genérico sin que ello represente un riesgo para el fallo de la terapéutica.

Fundamentos farmacocinéticos/farmacodinámicos (bioequivalencia *in vivo*)

Lo lógico en un estudio de bioequivalencia sería demostrar que los perfiles de concentración del fármaco en la biofase tanto para la formulación genérica o de prueba (T) como la innovadora o de referencia (R) son idénticos. Pero eso desde un punto de vista práctico es muy difícil de llevar a cabo. No obstante, para la mayoría de los medicamentos, la cantidad de fármaco presente en plasma es un buen indicador de la concentración del mismo en la biofase y por lo tanto de la magnitud de su efecto.

Al mismo tiempo, su permanencia en plasma se correlaciona bastante bien con la duración de su acción, por ello, la forma más habitual de demostrar bioequivalencia entre dos formulaciones es comparar los perfiles de concentración

plasmática de ambos productos para asumir que, si estos son iguales, sus efectos terapéuticos y tóxicos también serán iguales.

### **CRITERIO DE BIOEQUIVALENCIA**

El criterio para dictaminar bioequivalencia en estudios farmacocinéticos entre los medicamentos de prueba y de referencia, son los estadísticos de los intervalos de confianza al 90% de las medias geométricas de los cocientes (prueba/referencia) de los parámetros  $C_{max}$  y ABC de acuerdo al diseño para una gran variedad de fármacos, un intervalo de 80 a 120% para el cociente de los promedios de los productos es suficiente como criterio de equivalencia, cuando los datos del estudio se analizan en la escala original. Esto corresponde a un intervalo de  $\pm 20\%$  para la diferencia relativa entre los promedios de los productos. Cuando los datos se transforman a su logaritmo, utilizando en el análisis ABC y  $C_{max}$  como criterio de equivalencia, se usa un intervalo de 80 a 125% para el cociente de los promedios.

**Consideraciones de valores extremos:** En los estudios de bioequivalencia, los sujetos extremos se definen como aquellos que presentan valores discordantes de uno o más parámetros farmacocinéticos cuando éstos se comparan con los valores provenientes de los otros sujetos. Debido a que los estudios por lo general se realizan con diseños cruzados, el tipo más importante de valores extremos es el valor extremo del sujeto, donde uno o varios sujetos pueden diferir del resto en la respuesta al producto de prueba contra la respuesta al producto de referencia.

La existencia de un valor extremo puede indicar problemas en la intercambiabilidad de los productos debido a falla del producto o a sujetos pertenecientes a subpoblaciones. Existen pruebas estadísticas para identificar los valores extremos; la mayoría de ellas parten de calcular el valor absoluto de la residual *estandarizada*. Los valores extremos no pueden eliminarse del análisis con base en una prueba estadística. La empresa o institución es la responsable de identificar uno o más valores extremos considerando, además de la evidencia estadística, la evidencia científica. Si uno o más sujetos se eliminan del análisis, la

empresa o institución debe justificar y explicar el porqué de la exclusión del o los sujetos del análisis estadístico. El criterio para considerar datos extremos debe ser  $\pm 4$  residuales *estandarizados*.

#### **1.1.4.- Revalidación de la metodología en fluido biológico<sup>9</sup>**

Los métodos utilizados en un laboratorio de análisis químicos han de ser evaluados y sometidos a pruebas para asegurarse de que producen unos resultados válidos y coherentes con el objetivo previsto, es decir, han de ser validados. Los laboratorios que adopten nuevos métodos deben o bien revalidarlos o bien verificarlos como proceda para garantizar su funcionamiento adecuado en su entorno habitual. La verificación supone menos operaciones experimentales que la validación.

Todos los métodos nuevos que se introduzcan en un laboratorio deben estar además documentados, y todos los analistas que los vayan a utilizar han de recibir una formación adecuada y demostrar su competencia en su uso antes de empezar a actuar en casos concretos.

También necesitan una revalidación, o al menos una verificación, los métodos comercializados. Si un método se modifica o se aplica en una situación nueva (por ejemplo, una muestra de matriz nueva) se necesitará una revalidación o una verificación, según el alcance de la modificación y el carácter de la nueva situación.

La validación o la verificación de un método se realizan mediante una serie de pruebas normalizadas y experimentales de las que se obtienen datos sobre su exactitud, precisión, etc. El proceso que ha de seguirse para ello debe constar por escrito como procedimiento normalizado de trabajo. Una vez validados o verificados los métodos, su uso habitual en el laboratorio debe ser autorizada formalmente por la persona responsable en el “certificado de método autorizado” o documento similar que se establezca.

En el manual de garantía de calidad se anotarán los detalles del método y los datos en que se basó su evaluación, entre ellos los siguientes:

- ✓ Denominación del método
- ✓ Analíto(s)
- ✓ Matriz de la muestra
- ✓ Fundamento científico del método
- ✓ Datos del estudio de validación (exactitud, precisión, selectividad, intervalo, límite de detección.)
- ✓ Nombre y cargo de la persona responsable de la autorización
- ✓ Fecha

Una vez aprobados, es fundamental que se respeten estrictamente todos ellos. Si se introducen variaciones, debe dejarse constancia documental del hecho. Si se introduce un cambio importante será necesario volver a validar las nuevas condiciones del método. En cualquier caso, debe utilizarse la última versión aprobada de los procedimientos normalizados de trabajo.

### **1.1.5 MUESTRA BIOLÓGICA**

Se define como muestra biológica, al material proveniente de tejidos o fluidos (sangre, orina, materia fecal, líquido cefalorraquídeo, semen, saliva, sudor, líquido amniótico y otros) obtenido para su análisis.

Los resultados obtenidos ayudan al diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las enfermedades. La muestra biológica también, es un depósito de información sobre las características genéticas del individuo.

Investigadores, laboratorios clínicos y de investigación tienen almacenadas muestras biológicas, unas veces obtenidas fruto de la asistencia (bien sean excedentes o reservadas para revisión diagnóstica o validación de nuevas técnicas), o sobrantes de muestras recabadas con fines de investigación para algún proyecto específico.

- Normas generales de conservación y transporte de las muestras.

Una vez obtenida la muestra, es importante que se haga llegar al laboratorio con celeridad para no alterar sus características y dificultar el análisis. El procedimiento de obtención de muestras se realiza teniendo en cuenta las características de las muestras y la organización de cada hospital, centro sanitario o laboratorio.

El personal que interviene en el proceso debe tener la formación, habilidades y experiencia necesarias para garantizar que se cumplan los siguientes objetivos respetando la normativa vigente:

- ✓ Mantener la integridad de las muestras para garantizar la estabilidad de sus propiedades biológicas.
- ✓ Conservar las características originales de las muestras, para garantizar que los resultados obtenidos en su análisis sean lo más próximos posible a su valor verdadero.
- ✓ Cumplir las condiciones y los requisitos de seguridad para disminuir o minimizar al máximo el riesgo que puede conllevar el proceso

Precauciones ante el transporte de la muestra: Riesgos posibles y soluciones

- ✓ Proliferación bacteriana: a T° ambiente es muy intensa, por tanto, no admiten demora en su análisis. Algunas permiten que el análisis se retrase si están refrigeradas.
- ✓ Contaminación de la muestra: puede ocurrir por una mala calidad del envase o por una excesiva manipulación, lo cual dará lugar a múltiples errores.
- ✓ Pérdida de la actividad biológica de microorganismos: Muchos microorganismos, al ser extraídos del ser humano, mueren. Para evitarlo hay que utilizar sustancias para el transporte de la muestra que mantengan su viabilidad (p.ej. el medio de Stuart: evita la desecación y muerte de microorganismos recogidos con un hisopo estéril).
- ✓ Diseminación de los microorganismos al exterior: Debida a una mala manipulación de la muestra, rotura, extravío, etc., siendo un material peligroso, en muchos casos microorganismos con un alto índice de virulencia. Se evita educando y formando al personal sobre la importancia del material transportado, utilizando materiales adecuados, identificándolos correctamente, protegiéndolos dentro de otros recipientes, etc.
- ✓ Transporte para estudios de anaerobiosis: Es necesario eliminar el oxígeno. Para ello, se recomiendan tubos que contienen CO<sub>2</sub>. Si la muestra se obtiene con un hisopo, el tubo en el que lo introduciremos debe estar en condiciones anaeróbicas<sup>11</sup>.

### **1.1.6 Parámetros de validación que indica la NOM-177-SSA1-2013 sus procesos y criterios para validación de método.**

#### **CRITERIO DE ACEPTACION:**

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<sup>12</sup>.

### **1.2 CURVA DE CALIBRACION**

La linealidad de la curva de calibración del método se determina mediante el coeficiente de correlación (R) por medio de una regresión lineal empleando el método de mínimos cuadrado. Cada curva debe incluir una muestra de blanco matriz (muestra procesada sin la adición de analíto).<sup>12</sup>

Los datos de concentración de la curva de calibración, deben estar dentro del 15% de la concentración nominal y en cada nivel de concentración, como mínimo el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con al menos seis puntos evaluados, debe cumplir con este criterio.

Cuando un punto de la curva de calibración no cumpla, debe ser rechazado y la curva de calibración recalculada, sin modificar el modelo matemático.

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.<sup>12</sup>

**Tabla 1.- Criterios de aceptación para la linealidad del método**

| Parámetro  | Criterio        |
|--|-----------------|
| <b>Coefficiente de correlación para cada curva</b> | $r^2 \geq 0.98$ |
| <b>Exactitud<br/>Cada nivel de concentración</b>   | DE $\leq$ 15%   |

## **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.<sup>12</sup>

## **REPETIBILIDAD**

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones.

El CV% de valor promedio no debe ser mayor que el 15%.<sup>12</sup>

**Tabla 2.- Criterio de aceptación para la repetibilidad del método.**

| Parámetro  | Criterio     |
|------------|--------------|
| <b>%CV</b> | <b>≤ 15%</b> |

## **REPRODUCIBILIDAD**

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analista.

El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%.<sup>12</sup>

**Tabla 3.- Criterio de aceptación para la reproducibilidad del método**

| Parámetro  | Criterio     |
|------------|--------------|
| <b>%CV</b> | <b>≤ 15%</b> |

## EXACTITUD

Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia

**Tabla 4.- Criterio de aceptación para la exactitud del método**

| Parámetro                                 | Criterio                      |
|---|-------------------------------|
| <b>Desviación para cada concentración</b> | <b><math>\leq 15\%</math></b> |

## SELECTIVIDAD

Se debe demostrar la selectividad del método para el fármaco ante otros componentes de la muestra, cualquier interferencia no debe producir un error mayor al aceptado en precisión y exactitud.

## CAPITULO II

### DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental de este trabajo constó de 4 partes:

1. Revalidación del método analítico para cuantificar metronidazol en plasma previamente desarrollado y validado por la Q.F.B. Cinthya Vargas Martínez<sup>13</sup> y el equipo de trabajo del laboratorio 113 de Biofarmacia de la Facultad de Química de la UNAM como parte del proyecto PAPIME PE207815.
2. Simulación de perfil farmacocinético en Excel y preparación y análisis de muestras cargadas.
3. Propuesta de metodología para una práctica
4. Aplicación y evaluación de la propuesta en grupo piloto.

## 2.1 Equipo y Materiales

- Balanza analítica electrónica marca SANTORUS con precisión de 0.1 mg
- Espectrofotométrico con luz UV Vis “Evolution 60, Thermo Scientific”
- Centrifuga 4500 rpm modelo “2058946 CUA-037”
- Vórtex marca “VORTEX GENIE-2” 60 Hz Ac 115 V.
- Material volumétrico clase A. matraces volumétricos aforados de 10 mL
- Micropipetas “Eppendorf Research”: 0.5-10  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$ , 20-250 $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$ , 500-5000  $\mu\text{L}$
- Celda de cuarzo Spectrosil, paredes negras, dimensiones: 12.5 x 12.5 x 45 mm, vol. Nominal: 0.700 mL
- Puntas para micropipetas
- Vasos de precipitados de 50, 100 y 250 mL
- Espátula de níquel
- Microtubos Eppendorf para centrifuga de 15 mL
- Nave para pesada
- Piseta
- Gradilla para tubos Eppendorff
- Embudo de separación de vidrio
- Papel filtro Whatman No. 1
- Guantes

## 2.2 Reactivos y Disolventes

Acetonitrilo grado HPLC, J.T Baker, Lote M11C66.

Sustancia de referencia patrón secundario de Metronidazol, 99.0% pureza, Química Barsa, MTZ-5050718.

Plasma Humano, Donado por el hospital Médica Sur, Tlalpan de la Ciudad de México

## 2.3 Optimización del método

La precipitación de plasma con acetonitrilo es un procedimiento más simple en comparación con otros disolventes orgánicos, requiere menos tiempo y, en general, resulta en menos variación con respecto al metronidazol. Es menos susceptible a variaciones en la concentración de los metabolitos derivadas del hematocrito y como consecuencia permite derivar resultados útiles a partir del estudio de sangre total. Es necesario mencionar que el intento de la reproducción de esta técnica, requiere el ajuste de condiciones instrumentales y experimentales que debe hacerse sobre bases empíricas.

Considerando que las concentraciones máximas se presentan entre 1 y 2 horas después de su administración y que son proporcionales a las dosis (250 mg, 500 mg y 2 g vía oral de metronidazol, pueden ser de 6, 12 y 40  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente<sup>7</sup>, se replanteó un rango de trabajo con respecto a lo experimentado en el trabajo de tesis de la Q.F.B. Cinthya Vargas<sup>13</sup>, de 1 a 50  $\mu\text{g/mL}$  una vez que se estableció que la dosis simulada a administrar sería de 1000 mg de metronidazol para obtener un  $C_{\text{max}}$  de 24  $\mu\text{g/mL}$ <sup>7</sup>, debido a problemas de sensibilidad del método para un dosis de 500 mg y considerando lo que establece la norma<sup>12</sup> para el límite inferior de cuantificación del analito, el cual se debe determinar con base en el 5% del  $C_{\text{max}}$  reportado para el analito de interés, a menos que los objetivos del estudio especifiquen otra cosa, por ejemplo un muestreo truncado, una distribución rápida o alta variabilidad farmacocinética.

Una vez que se estableció el rango de trabajo se procedió a revalidar el método analítico previamente reportado en la 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” (Cinthya Vargas Martínez).<sup>13</sup>

Dicho procedimiento está basado principalmente en los equipos, materiales e infraestructura con la que se cuenta en los laboratorios donde se imparte el laboratorio de Biofarmacia de la Facultad de Química, UNAM, para que el alumno reproduzca el trabajo descrito.

#### **2.4 Revalidación del método**

Para la revalidación del método analítico se contemplaron los parámetros de curva de calibración, exactitud y precisión:

##### **Curva de calibración.**

Se prepararon por triplicado tres curvas de calibración en plasma en un rango de concentración de a 1 a 50 µg/mL, de acuerdo al proceso indicado en la sección de *preparación de muestras*.

Los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, que puede ser menor o igual que el 20%. Al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos 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, que previamente fue determinado como lineal.

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 y 20% para el *límite inferior de cuantificación*.

### **Precisión.**

#### **Repetibilidad.**

Se analizaron por quintuplicado las siguientes muestras control en plasma: LIC (Límite Inferior de cuantificación), MCB (Muestra Control Baja), MCM (Muestra Control Medio) y MCA (Muestra Control Alta). Se calculó la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en una curva de calibración.

Estas concentraciones deben ser diferentes a las de la curva de calibración, pero deben incluirse en el rango. El coeficiente de variación no debe ser mayor que el 15%.

#### **Reproducibilidad.**

Analizar al menos por quintuplicado en 2 días, las muestras control LIC, MCB, MCM y MCA.

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%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

## **Exactitud.**

De los datos de repetibilidad y reproducibilidad calcular la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal (% de desviación) empleando la siguiente ecuación.

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

El valor promedio del % de desviación no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.

## **PREPARACIÓN DE CURVA DE CALIBRACIÓN, MUESTRAS DE CONTROL DE CALIDAD Y MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS**

Las curvas de calibración y las muestras de control de calidad a tres niveles de concentración; muestra control baja (MCB) de 3µg/mL, Muestra Control Media (MCM) de 15µg/mL y Muestra Control Alta (MCA) de 40 µg/ml se prepararon de acuerdo lo establecido en la NOM-177SSA1-2013 y como se indica a continuación:

### **Solución Stock (1000 µg/mL):**

Pesar exactamente 10 mg de estándar de referencia de metronidazol, trasvasar cuantitativamente a un matraz aforado de 10 mL, disolver con acetonitrilo y llevar al aforo con el mismo disolvente.

**Solución A (500 µg/mL):**

De la solución Patrón tomar una alícuota de 5 mL y trasvasar a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir y llevar al aforo con acetonitrilo.

**Solución B (100 µg/mL) :**

De la solución Patrón, tomar una alícuota de 1 mL y trasvasar a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir y llevar al aforo con acetonitrilo.

**Solución C (50 µg/mL):**

De la solución Patrón, tomar una alícuota de 500 µL y trasvasar a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir y llevar al aforo con acetonitrilo.

**Preparación de curva de calibración patrón en plasma:**

Tomar las alícuotas a partir de las soluciones de trabajo y realizar los aforos con plasma de acuerdo a la Tabla 5:

**Tabla 5. Preparación de curva de calibración y muestras de control de calidad de metronidazol en plasma**

| <b>Alícuota de Solución stock (1000 µg/mL)</b><br><b>(µL)</b> | <b>Alícuota de Solución A (500 µg/mL)</b><br><b>(µL)</b> | <b>Alícuota de Solución B (100 µg/mL)</b><br><b>(µL)</b> | <b>Alícuota de Solución C (50 µg/mL)</b><br><b>(µL)</b> | <b>Plasma</b><br><b>(µL)</b> | <b>Concentración Final</b><br><b>(µg/mL)</b> |
|---|--|--|---|------------------------------|--|
|   |  |  | 20  | 980                          | 1*   |
|   |  |  | 40  | 960                          | 2  |
|   |  | 30   |   | 970                          | 3**  |
|   |  | 50   |   | 950                          | 5  |
|   | 30   |  |   | 970                          | 15***  |
|   | 40   |  |   | 960                          | 20   |
|   | 50   |  |   | 950                          | 25   |
| 40  |  |  |   | 960                          | 40****                                       |
| 50  |  |  |   | 950                          | 50   |

**\*LIC\*\*MCB,\*\*\* MCM, \*\*\*\*MCA**

Una vez que ya se tienen las muestras de la curva de calibración, muestras de control de calidad y/o muestras cargadas en plasma se procede al proceso de extracción.

### **MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS**

Trasvasar a tubo Eppendorf 200 µL de cada muestra preparada conforme a la Tabla 5 (curva de calibración y muestras control de calidad) y adicionar 600 µL de ACN, colocar durante 15 segundos en vórtex, y posteriormente centrifugar, durante 10 minutos a 15000 rpm, analizar el sobrenadante en un espectrofotómetro a 318 nm; emplear celdas de cuarzo, de paredes negras de 10 mm, con dimensiones de: 12.5x12.5x45 mm y un volumen nominal de 0.700 mL.

Preparar un blanco de plasma libre de fármaco para que sirva como blanco de ajuste, tomando 200  $\mu\text{L}$  de plasma y adicionar 600  $\mu\text{L}$  de ACN, agitar durante 15 segundos en vórtex; centrifugar, durante 10 minutos a 15000 rpm, analizar el sobrenadante en un espectrofotómetro a 318 nm; emplear celdas de cuarzo, de paredes negras, 10mm, dimensiones: 12.5x12.5x45mm, volumen nominal de 0.700 mL

## **SIMULACIÓN DE PERFILES FARMACOCINÉTICOS EN EXCEL**

Una vez revalidado el método analítico se procedió a simular perfiles farmacocinéticos ( $C_p$  vs  $t$ ), en excel considerando una dosis a administrar de 1000 mg y un horario de muestreo que incluyera muestreos frecuentes alrededor del valor de  $T_{max}$  esperado para proporcionar un estimado confiable del  $C_{max}$  y para evitar que el primer tiempo de muestreo corresponda al  $C_{max}$  de tal manera que permita caracterizar el 80% del ABC (mínimo 4  $t_{1/2}$  de eliminación, con al menos cuatro muestras durante la fase log-terminal para obtener la constante de velocidad de eliminación), por lo que se consideró un tiempo total de muestreo de 56 h, ( $V_{1/2} = 14 \text{ h}$ )<sup>4</sup>.

Se simularon tres perfiles: uno, que simulara el producto de referencia y dos, que simularan los productos de prueba;

- Prueba 1 (datos que cumplen con biodisponibilidad relativa de al menos un 80% )
- Prueba 2 (Datos que no cumplen con biodisponibilidad relativa de al menos un 80%)

## ANÁLISIS DE MUESTRAS CARGADAS EN PLASMA SIMULANDO PERFILES FARMACOCINÉTICOS DE METRONIDAZOL

Una vez teniendo las simulaciones en Excel se procedió a preparar muestras en plasma cargadas con metronidazol a las concentraciones indicadas en la Tabla 6 y Figura 2, para ello se procedió a partir de soluciones de trabajo en acetonitrilo y llevando a las concentraciones finales en plasma de acuerdo a lo indicado en la Tabla 1 y posteriormente se trataron las muestras bajo el método anteriormente validado e interpolando los resultados de absorbancia en una curva de calibración preparada el día del análisis. Una vez obtenida la concentración se realizaron curvas de Cp vs tiempo y se calcularon el Área Bajo la Curva (ABC) y la biodisponibilidad relativa de los productos de prueba con respecto al producto de referencia

**Tabla 6.- Tabla de Cp vs tiempo de metronidazol en plasma, simuladas en excel**

| Tiempo (h)  | Producto de Referencia (µg/mL) | Producto de Prueba 1 (µg/mL) | Producto de Prueba 2 (µg/mL) |
|-------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| BLANCO      | BLANCO                         | BLANCO                       | BLANCO                       |
| <b>0</b>    | 0                              | 0                            | 0                            |
| <b>0,25</b> | 2                              | 4                            | 2                            |
| <b>0,5</b>  | 14                             | 14                           | 6                            |
| <b>1</b>    | 18                             | 16                           | 10                           |
| <b>2</b>    | 24                             | 22                           | 16                           |
| <b>5</b>    | 22                             | 20                           | 14                           |
| <b>6</b>    | 20                             | 18                           | 12                           |
| <b>10</b>   | 16                             | 14                           | 10                           |
| <b>12</b>   | 14                             | 12                           | 8                            |
| <b>24</b>   | 10                             | 10                           | 6                            |
| <b>36</b>   | 8                              | 8                            | 4                            |
| <b>48</b>   | 6                              | 6                            | 2                            |
| <b>56</b>   | 4                              | 4                            | 1                            |

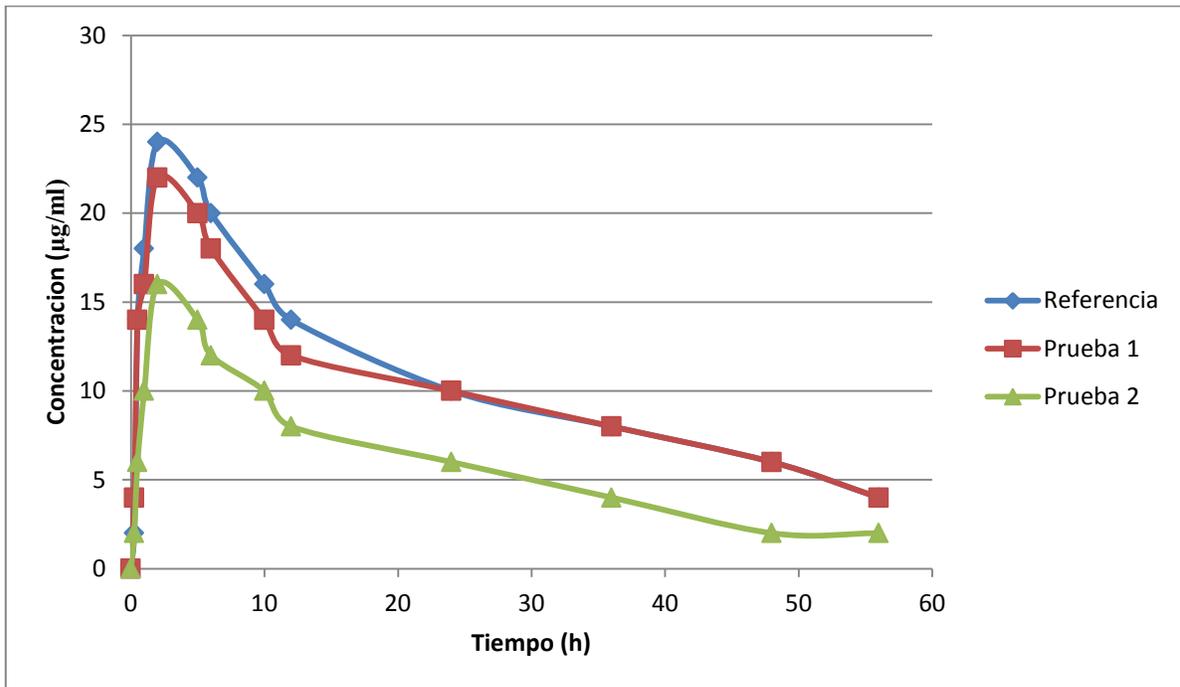


Figura 2. Datos de Cp vs Tiempo con concentraciones de metronidazol simuladas en Excel

Se prepararon las muestras de acuerdo a las concentraciones simuladas, tanto para producto de referencia como para dos productos de prueba tal como se indica en la siguiente tabla.

**TABLA 7. Preparación de concentraciones de metronidazol en plasma para simulación de perfiles farmacocinéticos de un producto referencia y dos productos prueba**

| <b>Etiqueta</b> | <b>Conc. µg/mL</b> | <b>Solución A<br/>(500 µg/mL)</b> | <b>Solución B<br/>(100 µg/mL)</b> | <b>Aforo<br/>Plasma mL</b> |
|-----------------|--------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| 1               | 1                  |                                   | 100                               | 10                         |
| 2               | 2                  |                                   | 200                               | 10                         |
| 3               | 4                  |                                   | 400                               | 10                         |
| 4               | 6                  | 120                               |                                   | 10                         |
| 5               | 8                  | 160                               |                                   | 10                         |
| 6               | 10                 | 200                               |                                   | 10                         |
| 7               | 12                 | 240                               |                                   | 10                         |
| 8               | 14                 | 280                               |                                   | 10                         |
| 9               | 16                 | 320                               |                                   | 10                         |
| 10              | 18                 | 360                               |                                   | 10                         |
| 11              | 20                 | 400                               |                                   | 10                         |
| 12              | 22                 | 440                               |                                   | 10                         |
| 13              | 24                 | 480                               |                                   | 10                         |
| 14              | 25                 | 500                               |                                   | 10                         |

A partir de las muestras preparadas como se indica en la Tabla 7, se procedió a etiquetar y ordenar las muestras de acuerdo a lo que se indica en la Tabla 8, para tener un perfil farmacocinético bien caracterizado en sus fases de absorción, alrededor del C<sub>max</sub> y fase de eliminación del fármaco.

## **APLICACIÓN DEL MÉTODO EN UN GRUPO PILOTO DE LICENCIATURA**

Una vez que se analizaron las muestras cargadas de metronidazol de los perfiles farmacocinéticos simulados se procedió al diseño de una práctica del laboratorio que se anexa en el apéndice A, y que considera un apartado de uso exclusivo para el maestro.

Una vez diseñada la práctica, se ejecutó en un grupo piloto del semestre 2016-2 de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo de la Facultad de Química de la UNAM en materia del laboratorio de biofarmacia para su verificación y ajuste, optando por proporcionar muestras cargadas simulando un perfil farmacocinético del producto de Referencia y del producto de prueba 1 a las concentraciones que se indican en la tabla 7, para ello se empleó plasma donado por el banco de sangre de Médica Sur y se ordenaron las muestras de acuerdo a la tabla 9.

**Tabla 9. Tiempos teóricos y concentraciones de metronidazol simulados**

| Tiempo (h) | Producto de Referencia (µg/mL) | Alícuota de tubo con Etiqueta | Producto de Prueba 1 (µg/mL) | Alícuota de tubo con Etiqueta |
|------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| BLANCO     | BLANCO                         | Plasma                        | BLANCO                       | Plasma                        |
| 0          | 0                              | Plasma                        | 0                            | Plasma                        |
| 0,25       | 2                              | 2                             | 4                            | 3                             |
| 0,5        | 14                             | 8                             | 14                           | 8                             |
| 1          | 18                             | 10                            | 16                           | 9                             |
| 2          | 24                             | 13                            | 22                           | 12                            |
| 5          | 22                             | 12                            | 20                           | 11                            |
| 6          | 20                             | 11                            | 18                           | 10                            |
| 10         | 16                             | 9                             | 14                           | 8                             |
| 12         | 14                             | 8                             | 12                           | 7                             |
| 24         | 10                             | 6                             | 10                           | 6                             |
| 36         | 8                              | 5                             | 8                            | 5                             |
| 48         | 6                              | 4                             | 6                            | 4                             |
| 56         | 4                              | 3                             | 4                            | 13                            |

Las muestras, se prepararon y mantuvieron en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 24 h (condiciones aprobadas previamente por la Q.F.B. Cinthya Vargas<sup>13</sup>), repartiéndose en el grupo de la siguiente manera: a dos equipos se les dieron muestras cargadas con la simulación del perfil del producto de Referencia y a otros dos equipos se les proporcionaron las muestras cargadas con la simulación del producto de prueba 1, además un equipo de trabajo preparó una curva de calibración el día del análisis de las muestras, cabe señalar que no se indicó a ninguno de los cuatro equipos que perfil era el que se les proporcionaba.

## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Revalidación del método

#### Curva de Calibración

En la Tabla 10 y la figura 3 se muestran los resultados de revalidación de las curvas de calibración en un rango de 1 a 50  $\mu\text{g/mL}$  y cómo podemos observar, el método demostró ser lineal, ya que se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.999, una pendiente de 0.013 y la ordenada al origen de 0.107; siguiendo los lineamientos de la NOM-177-SSA1-2013, se observa que la curva tiene un factor de correlación mayor al 0.98% y el porcentaje de desviación (%DE) menor al 20% del punto más pequeño de la curva de calibración y un 15% de los puntos subsecuentes.

**Tabla 10. Resultados de curva de calibración de metronidazol en plasma**

| Concentración nominal | Abs. Curva 1 | Abs. Curva 2 | Abs. Curva 3 | PROMEDIO | DESV. EST. | %CV  | %DE   |
|-----------------------|--------------|--------------|--------------|----------|------------|------|-------|
| 1                     | 0.12         | 0.12         | 0.12         | 0.12     | 0.00       | 2.10 | 0.80  |
| 2                     | 0.13         | 0.14         | 0.14         | 0.14     | 0.00       | 1.70 | 12.70 |
| 5                     | 0.17         | 0.18         | 0.19         | 0.18     | 0.00       | 3.20 | 0.80  |
| 20                    | 0.36         | 0.37         | 0.36         | 0.36     | 0.00       | 1.50 | 3.00  |
| 25                    | 0.44         | 0.42         | 0.43         | 0.43     | 0.00       | 1.10 | 0.90  |
| 50                    | 0.78         | 0.78         | 0.76         | 0.77     | 0.01       | 1.20 | -1.90 |
| r=                    | 0.99         | 0.99         | 0.99         | 0.99     |            |      |       |
| m=                    | 0.01         | 0.01         | 0.01         | 0.01     |            |      |       |
| b=                    | 0.10         | 0.11         | 0.11         | 0.11     |            |      |       |

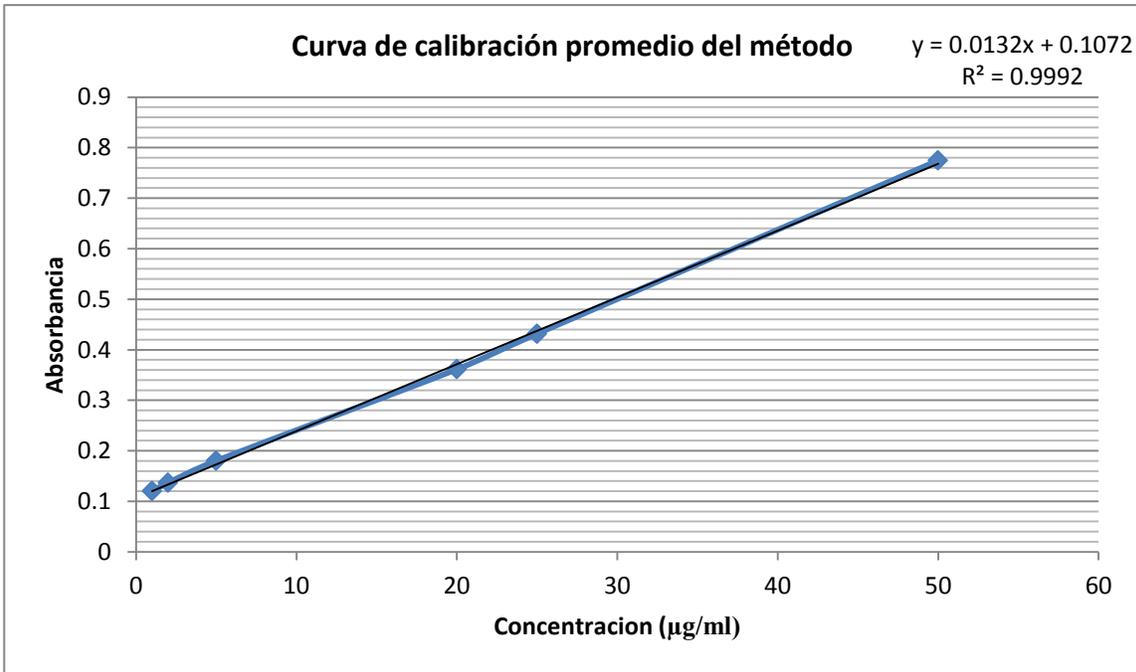


Figura 3. Gráfico de Cp vs tiempo de la Curva de calibración promedio de metronidazol

### Precisión como Repetibilidad y Reproducibilidad

En las Tablas 11 y 12 se muestran los resultados de repetibilidad y reproducibilidad de la revalidación del método analítico para cuantificar metronidazol, como podemos observar los datos cumplen el criterio que indica la NOM-177-SSA1-2013<sup>12</sup> de un %CV promedio  $\leq 15\%$ , para repetibilidad.

**Tabla 11.- Resultados de repetibilidad del método**

|                      | <b>Muestra Control</b> | <b>Concentración (µg/mL)</b> | <b>Concentración calculada (µg/mL)</b> |
|----------------------|------------------------|------------------------------|--|
| <b>REPETIBILIDAD</b> | BAJA                   | 3 µg/mL                      | 3.20                                   |
|                      |                        |                              | 3.12                                   |
|                      |                        |                              | 2.87                                   |
|                      |                        |                              | 3.32                                   |
|                      |                        |                              | 3.12                                   |
|                      |                        | Promedio                     | 3.13                                   |
|                      |                        | DE                           | 0.04                                   |
|                      |                        | %CV                          | 4.72                                   |
|                      |                        | MEDIA                        | 15 µg/mL                               |
|                      | 14.79                  |                              |  |
|                      | 14.49                  |                              |  |
|                      | 14.60                  |                              |  |
|                      | 14.08                  |                              |  |
|                      | Promedio               |                              | 14.44                                  |
|                      | DE                     |                              | 0.03                                   |
|                      | %CV                    |                              | 1.95                                   |
|                      | ALTA                   | 40 µg/mL                     | 39.00                                  |
|                      |                        |                              | 39.07                                  |
|                      |                        |                              | 39.45                                  |
|                      |                        |                              | 39.87                                  |
|                      |                        |                              | 38.85                                  |
|                      |                        | Promedio                     | 39.25                                  |
|                      |                        | DE                           | 0.02                                   |
|                      |                        | %CV                          | 1.05                                   |

**Tabla 12. . Resultados de reproducibilidad punto control bajo del método**

|                         |       | Muestra baja       | Concentración calculada ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|-------------------------|-------|--------------------|--|
| <b>REPRODUCIBILIDAD</b> | Día 1 | 3 $\mu\text{g/mL}$ | 3.20   |
|                         |       |                    | 3.12   |
|                         |       |                    | 2.87   |
|                         |       |                    | 3.32   |
|                         |       |                    | 3.12   |
|                         |       | Promedio           | 3.13   |
|                         |       | DE                 | -0.04  |
|                         |       | %CV                | 4.72   |
|                         | Día 2 | 3 $\mu\text{g/mL}$ | 3.13   |
|                         |       |                    | 3.05   |
|                         |       |                    | 3.10   |
|                         |       |                    | 3.32   |
|                         |       |                    | 3.12   |
|                         |       | Promedio           | 3.14   |
| DE                      |       | -0.05              |  |
| %CV                     |       | 2.93               |  |

### 13.- Resultados de reproducibilidad punto control medio del método

|                         |       | Muestra media       | Concentración calculada ( $\mu\text{g/mL}$ ) |
|-------------------------|-------|---------------------|--|
| <b>REPRODUCIBILIDAD</b> | Día 1 | 15 $\mu\text{g/mL}$ | 14.25  |
|                         |       |                     | 14.79  |
|                         |       |                     | 14.49  |
|                         |       |                     | 14.60  |
|                         |       |                     | 14.08  |
|                         |       | Promedio            | 14.44  |
|                         |       | DE                  | 0.03   |
|                         |       | %CV                 | 1.95   |
|                         | Día 2 | 15 $\mu\text{g/mL}$ | 14.53  |
|                         |       |                     | 15.11  |
|                         |       |                     | 15.03  |
|                         |       |                     | 14.87  |
|                         |       |                     | 15.09  |
|                         |       | Promedio            | 14.93  |
| DE                      |       | 0.01                |  |
| %CV                     |       | 1.61                |  |

#### 14.-Resultados de reproducibilidad punto control alto del método

|                         |       | Muestra alto | Concentración calculada (µg/mL) |
|-------------------------|-------|--------------|---------------------------------|
| <b>REPRODUCIBILIDAD</b> | Día 1 | 40 µg/mL     | 39.00                           |
|                         |       |              | 39.07                           |
|                         |       |              | 39.45                           |
|                         |       |              | 39.87                           |
|                         |       |              | 38.85                           |
|                         |       | Promedio     | 39.25                           |
|                         |       | DE           | 0.02                            |
|                         |       | %CV          | 1.05                            |
|                         | Día 2 | 40 µg/mL     | 40.04                           |
|                         |       |              | 39.19                           |
|                         |       |              | 40.35                           |
|                         |       |              | 39.92                           |
|                         |       |              | 39.73                           |
|                         |       | Promedio     | 39.85                           |
| DE                      |       | 0.00         |                                 |
| %CV                     |       | 1.08         |                                 |

Siguiendo el criterio de la NOM-177-SSA1-2013. Los datos de reproducibilidad cumplen con un %CV ≤ 15%. En la tabla 15, se muestran los resultados de

exactitud y siguiendo el criterio de la NOM-177SSA1-2013: Los datos de exactitud cumplen, al obtener un % de desviación para cada concentración  $\leq 15\%$ .

**Tabla 15. Resultados de Exactitud del método**

|                  | Muestra Control | Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) | Concentración calculada ( $\mu\text{g/mL}$ ) | %Desviación (%DE) |
|------------------|-----------------|------------------------------------|--|-------------------|
| <b>EXACTITUD</b> | BAJA            | 3 $\mu\text{g/mL}$                 | 3.13   | 4.33              |
|                  |                 |                                    | 3.05   | 1.67              |
|                  |                 |                                    | 3.10   | 3.33              |
|                  |                 |                                    | 3.32   | 10.67             |
|                  |                 |                                    | 3.12   | 4.00              |
|                  |                 | Promedio                           | 3.14   | 4.80              |
|                  |                 | DE                                 | -0.05  |                   |
|                  |                 | %CV                                | 2.93   |                   |
|                  | MEDIA           | 15 $\mu\text{g/mL}$                | 14.53  | 3.13              |
|                  |                 |                                    | 15.11  | 0.73              |
|                  |                 |                                    | 15.03  | 0.20              |
|                  |                 |                                    | 14.87  | 0.86              |
|                  |                 |                                    | 15.09  | 0.60              |
|                  |                 | Promedio                           | 14.93  | 0.49              |
|                  |                 | DE                                 | 0.01   |                   |
|                  | %CV             | 1.61                               |  |                   |
|                  | ALTA            | 40 $\mu\text{g/mL}$                | 40.04  | 0.10              |
|                  |                 |                                    | 39.19  | 2.02              |
|                  |                 |                                    | 40.35  | 0.88              |
|                  |                 |                                    | 39.92  | 0.20              |
|                  |                 |                                    | 39.73  | 0.68              |
|                  |                 | Promedio                           | 39.85  | 0.39              |
|                  |                 | DE                                 | 0.00   |                   |
|                  |                 | %CV                                | 1.08   |                   |

## RESULTADOS DE LOS PEFILES FARMACOCINÉTICOS SIMULADOS EN EXCEL

Los resultados del análisis de las muestras cargadas a las condiciones simuladas en la Tabla 6 se muestran en la Tabla 16 y el gráfico de Cp vs tiempo se muestra en la figura 4.

**Tabla 16: Datos de concentraciones de las muestras cargadas en un perfil simulado**

| Tiempo (h) | Conc. µg/mL<br>Producto de<br>Referencia | Conc. µg/mL<br>Producto de<br>Prueba 1 | Conc. µg/mL<br>Producto de<br>Prueba 2 |
|------------|--|--|--|
| 0          | 0  | 0                                      | 0                                      |
| 0.25       | 1.07                                     | 0.76                                   | 0.15                                   |
| 0.5        | 2.06                                     | 1.15                                   | 0.92                                   |
| 0.75       | 5.12                                     | 3.36                                   | 2.37                                   |
| 1          | 14.05                                    | 9.70                                   | 7.41                                   |
| 1.5        | 19.39                                    | 18.24                                  | 13.44                                  |
| 2          | 24.89                                    | 23.13                                  | 17.31                                  |
| 3          | 20.99                                    | 19.85                                  | 16.24                                  |
| 4          | 16.18                                    | 17.41                                  | 13.89                                  |
| 6          | 14.28                                    | 12.98                                  | 11.91                                  |
| 8          | 12.60                                    | 11.91                                  | 9.92                                   |
| 12         | 10.53                                    | 8.17                                   | 7.94                                   |
| 24         | 6.57                                     | 5.88                                   | 5.34                                   |
| 48         | 3.44                                     | 3.51                                   | 2.67                                   |
| 56         | 1.37                                     | 1.52                                   | 0.08                                   |

Como podemos observar en la Tabla 16 y la figura 4, según lo esperado el Tmax corresponde a las 2h y el Cmax para el producto de referencia fue de 24.89 µg/mL, para el producto de prueba fue de 23.13 µg/mL y para el producto de Prueba 2, fue de 17.31 µg/mL cuando se esperaban 24, 22 y 16 µg/mL, respectivamente. Así mismo podemos observar que la Cp a las 56 h para el producto de prueba está fuera del rango de trabajo que va de 1 a 50 µg/ml, por lo que este último dato no se contempló para los cálculos de los parámetros farmacocinéticos, ya que pudo deberse a un problema de manipulación de la muestra.

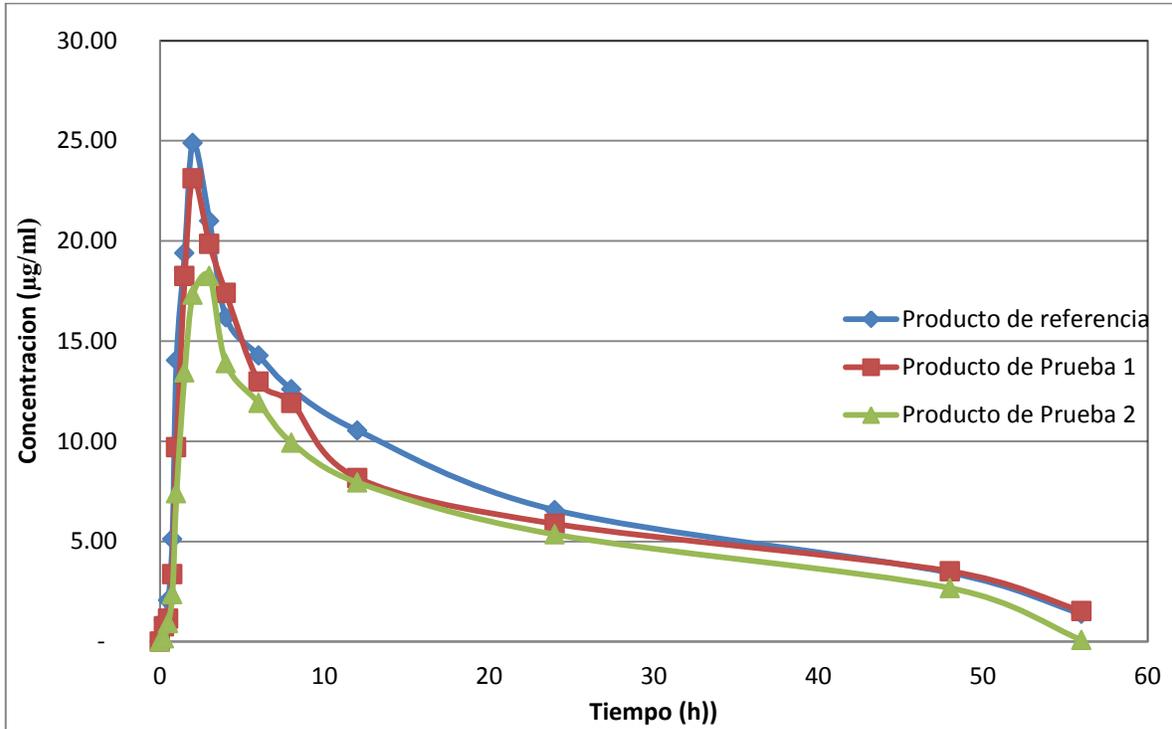


Figura 4. Comportamiento farmacocinético de metronidazol de muestras cargadas según datos simulados en excel

Se calcularon parámetros farmacocinéticos para los tres perfiles, tales como el Tmax, Cmax, Vida media de eliminación, ABC, éste último por el método de los trapezoides, además de la Frel de los productos de prueba con respecto al producto de referencia, los resultados se muestran en la Tabla 17.

$$\%Frel = [(ABC\ PRUEBA / ABC\ REFERENCIA) * DOSIS] * 100\%$$

**Tabla 17. Parámetros Farmacocinéticos obtenidos con las muestras cargadas según datos de los perfiles farmacocinéticos simulados en Excel**

| Productos            | Parámetros  |                 |                   |                  |        |
|----------------------|-------------|-----------------|-------------------|------------------|--------|
|                      | Tmax<br>(h) | Cmax<br>(µg/mL) | Vida media<br>(h) | ABC<br>(µg/mL.h) | % Frel |
| Referencia           | 2           | 24.89           | 16.64             | 443.17           |        |
| Producto de Prueba 1 | 2           | 23.13           | 17.82             | 411.51           | 92.86  |
| Producto de Prueba 2 | 2           | 17.31           | 19.38             | 309.90           | 75.31  |

En cuanto a los resultados de la vida media ésta se encontró que era mucho mayor a la reportada en la literatura (6-14h)<sup>4,5</sup>, lo cual se debe a que para simular los perfiles se contempló la sensibilidad del método, cuyo límite inferior es de 1 µg/mL, sin embargo las concentraciones reportadas en la literatura después de las 12 horas están por debajo de 1 µg/mL, por lo que para el rediseño de la práctica a desarrollar por el grupo piloto se consideró la simulación por arriba de concentraciones mayores a 2 µg/mL (Ver Anexo A).

Como podemos observar en la Tabla 17, los resultados de % de Biodisponibilidad Relativa estuvieron dentro de lo que se esperaba de que el producto de prueba 1 con respecto al producto de referencia su %Frel sería mayor del 80% y el %Frel del producto de prueba sería menor del 80%.

Debido a problemas con las muestras cargadas a una concentración de 1 µg/mL y a que esta es la concentración en el límite inferior de cuantificación, se reajustaron las simulaciones del producto de prueba B estipulando que la Concentración más baja a simular y preparar sería de 2 µg/mL y por ello se modificó la práctica que se había diseñado, por lo que a los alumnos del grupo piloto se les proporcionó la práctica que se muestran en el Anexo A.

## RESULTADOS DE MUESTRAS ANALIZADAS POR ALUMNOS DEL GRUPO PILOTO

En la tabla 18 se muestran los resultados de la curva de calibración preparada el día del análisis de las muestras proporcionadas a los alumnos del grupo del semestre 2016-2, formándose 4 equipos, de los cuales los equipos 1 y 3 analizaron muestras de producto Prueba 1 y los equipos 2 y 4 analizaron muestras cargadas como producto referencia.

**Tabla 18. Datos de Curva de calibración del método, grupo Piloto**

| Conc. (µg/mL)    | Absorbancia | Con. recuperada | %DE                    |              |        |
|------------------|-------------|-----------------|------------------------|--------------|--------|
| 1                | 0.01        | 1.06            | 6.40                   | MENOR AL 20% | CUMPLE |
| 2                | 0.02        | 2.18            | 8.90                   | MENOR AL 15% | CUMPLE |
| 5                | 0.06        | 5.18            | 3.50                   | MENOR AL 15% | CUMPLE |
| 20               | 0.22        | 19.31           | 3.50                   | MENOR AL 15% | CUMPLE |
| 25               | 0.29        | 25.05           | 0.20                   | MENOR AL 15% | CUMPLE |
| 50               | 0.58        | 50.23           | 0.50                   | MENOR AL 15% | CUMPLE |
| <b>Pendiente</b> | 0.01        |                 |                        |              |        |
| <b>Ordenada</b>  | -0.0034     |                 | R <sup>2</sup> =0.9997 | CUMPLE       |        |

Los valores obtenidos para la curva de calibración, se encuentran dentro de los parámetros que solicita la NOM-177-SSA1-2013 al tener un %DE menor al 20% en el primer punto de la curva y menor al 15% en los datos subsecuentes, con un coeficiente de correlación mayor al 0.98.

En la Tabla 19 se muestran los resultados de concentraciones obtenidas por los alumnos a partir de las muestras proporcionadas durante la sesión práctica del laboratorio de biofarmacia.

**Tabla 19. Datos de Concentración de muestras proporcionadas a los alumnos del grupo piloto**

| Tiempo (h) | Concentración Plasmática ( $\mu\text{g/mL}$ ) |                     |                   |                   |                     |                 |
|------------|---|---------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-----------------|
|            | Equipo 1 Referencia                           | Equipo 3 Referencia | Equipo 2 Prueba 1 | Equipo 4 Prueba 1 | Promedio Referencia | Promedio Prueba |
| 0          | 0   | 0                   | 0                 | 0                 | 0                   | 0               |
| 0,25       | 2,63  | 2,01                | 3,81              | 3,92              | 2,32                | 3,86            |
| 0,50       | 14,40   | 14,51               | 13,91             | 14,17             | 14,45               | 14,04           |
| 1,00       | 18,62   | 18,17               | 16,23             | 15,85             | 18,40               | 16,04           |
| 2,00       | 24,48   | 23,87               | 21,79             | 22,33             | 24,17               | 22,06           |
| 5,00       | 22,68   | 21,64               | 19,83             | 20,14             | 22,16               | 19,99           |
| 6,00       | 19,86   | 19,11               | 18,37             | 18,45             | 19,48               | 18,41           |
| 10,00      | 16,05   | 15,48               | 13,14             | 12,94             | 15,77               | 13,04           |
| 12,00      | 14,17   | 14,14               | 12,77             | 9,50              | 14,16               | 11,14           |
| 24,00      | 9,26  | 9,12                | 9,79              | 8,22              | 9,19                | 9,0             |
| 36,00      | 8,35  | 7,83                | 8,00              | 7,49              | 8,09                | 7,75            |
| 48,00      | 6,21  | 6,12                | 6,29              | 5,64              | 6,16                | 5,96            |
| 56,00      | 4,09  | 3,75                | 3,98              | 4,05              | 3,92                | 4,01            |

**Tabla 20 Parámetros farmacocinéticos estimados por el grupo piloto.**

| <b>Productos</b> | <b>Parámetros</b> |                 |                   |                  |        |
|------------------|-------------------|-----------------|-------------------|------------------|--------|
|                  | Tmax<br>(h)       | Cmax<br>(µg/mL) | Vida media<br>(h) | ABC<br>(µg/mL.h) | % Frel |
| Referencia       | 2                 | 24.17           | 24.46             | 686.70           |        |
| Producto prueba  | 2                 | 22.06           | 27.90             | 640.14           | 93.22  |

Como podemos observar en la Tabla 20, los datos cumplieron con lo estimado en los valores de Tmax, Cmax, y %Frel, sí bien los valores de vida media obtenidos están más elevados, tal como lo comentamos anteriormente, esto se puede deber a problemas de sensibilidad del método.

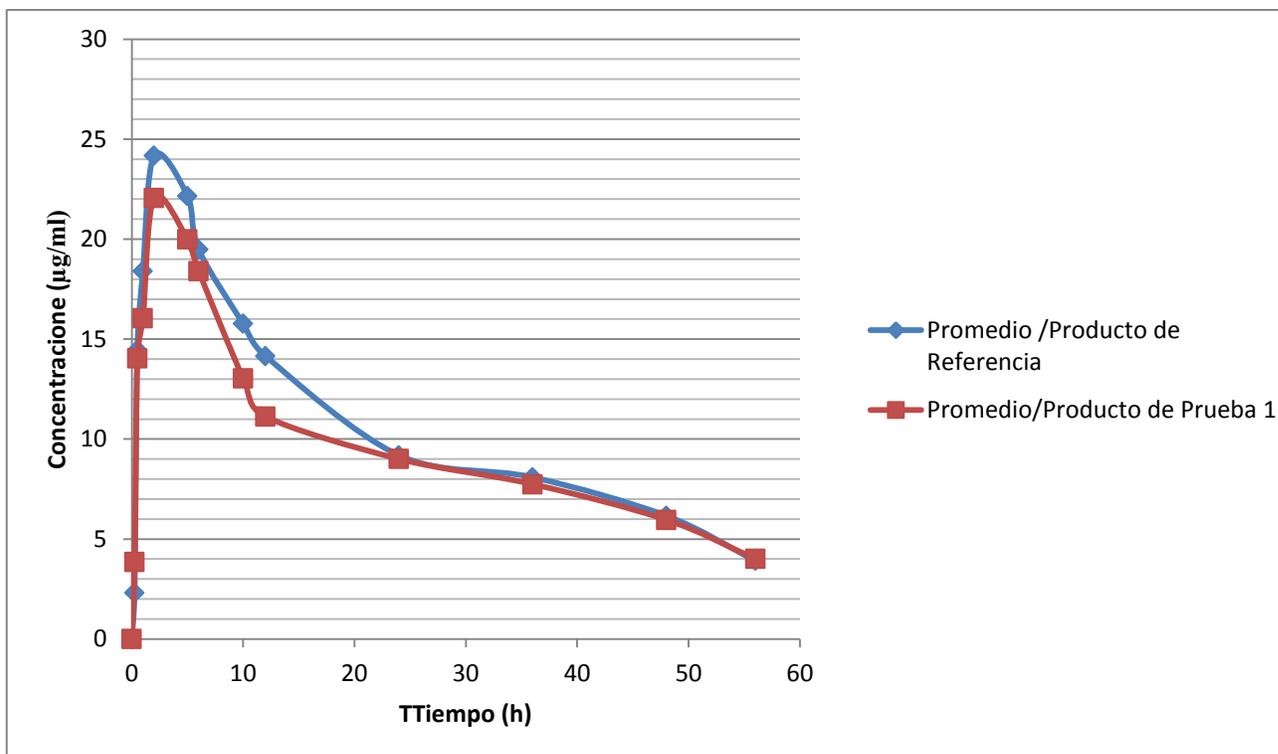


Figura 5: Perfil farmacocinético de las muestras cargadas con metronidazol analizadas por el por el grupo piloto

La figura 5, ilustra de un modo grafico la similitud de los perfiles farmacocinéticos para ambos producto. Por último, se obtuvo un valor de biodisponibilidad relativa dentro de lo esperado (mayor del 80%) por lo que podemos concluir que el método revalidado y los perfiles simulados cumplen con los objetivos planteados.

## CONCLUSIONES

Sé revalidó un método analítico para cuantificar metronidazol en plasma humano por espectrofotometría UV de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013, el cual se empleó en el desarrollo de un guión de laboratorio de Biofarmacia que involucra la simulación de un perfil farmacocinético.

El método fue lineal, exacto y preciso en un rango de 1.0 µg/ml a 50 µg/mL.

La simulación en hojas de cálculo de perfiles farmacocinéticos de metronidazol posteriores a una dosis, por vía oral, de 1000 mg de metronidazol y su aplicación con muestras de plasmas cargadas y su posterior análisis, permitió el diseño de una práctica a emplearse en los laboratorios de Biofarmacia, lo cual permitirá no emplear al alumno como sujeto de investigación, disminuir el impacto negativo al ambiente, reducir los costos y utilizar la infraestructura con la que cuenta la Facultad de Química de la UNAM.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. S.S.A Catálogo de medicamentos genéricos intercambiables para farmacias y público en general. (Junio de 2005). Págs. 31 a 36.
2. Med. Cir Gisela L. Herrera (2006), "Determinación de la bioequivalencia de dos formulaciones orales de metronidazol en voluntarios sanos", En Tesis, (21-24 pp), México: Escuela Superior de Medicina, IPN.
3. E. A. Vives, M. V. Ventriglia, D. Medvedovsky y R. Rothlin . (2004). nitroimidazoles y nitrofuranos. 2016, de farmacomedía Sitio web: <https://farmacomedía.files.wordpress.com/2010/05/nitroimidazoles-y-nitrofuranos.pdf>
4. IQB. (2010). metronidazol. 2010, de VADECUM Sitio web: <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/m038.htm>
5. Lau AH, Lam NP, Piscitelli SC. Clinical pharmacokinetics of metronidazole and other nitroimidazole anti-infectives. Clin Pharmacokinet (1992); 23: 328-64.
6. -Diego Vicente, Emilio Pérez-Trallero. (15 de octubre del 2009), Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. Elsevier. Vol. 28, pág. 9. Consultado el 26-05-2016, De Elsevier Base de datos.
7. Andrés Bendesky, Daniel Menendéz. (Noviembre-Diciembre, 2001). Metronidazol: Una visión integral. Facultad de medicina, Vol. 44 No. 6, 7.- Med. Cir. Gisela Larissa Herrera Rodríguez. (2006). Determinación de bioequivalencia de dos formulaciones orales de metronidazol en voluntarios sanos. En Escuela superior de medicina (17-26). México: Instituto politécnico nacional.

8. Laurence L. Brunton, Et. AL;(2006); Goodman & Guilman: Las bases de la terapéutica; 11va. Edición; Editorial Mc Gran Hill.
9. Sección de laboratorio y asuntos científicos Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito Viena. (2003). Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos. 2003, de Sección de Laboratorio y Asuntos Científicos de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC) [https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation\\_Manual\\_STNAR41\\_Ebook\\_S.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Validation_Manual_STNAR41_Ebook_S.pdf)
10. Dr. Enrique A. Formentini. (2006). Biodisponibilidad y bioequivalencia. 2006, de Farmacología general aplicada Sitio web: [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:WOpO9L3\\_zUJ:www.fcv.unl.edu.ar/archivos/posgrado/especializaciones/espsaludanimal/informacion/material/FarmacologiaGeneralAplicada/LibrodefarmacologiaBAandBE.doc+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=mx](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:WOpO9L3_zUJ:www.fcv.unl.edu.ar/archivos/posgrado/especializaciones/espsaludanimal/informacion/material/FarmacologiaGeneralAplicada/LibrodefarmacologiaBAandBE.doc+&cd=1&hl=es-419&ct=clnk&gl=mx)
11. Academia Mengar. (-). Muestras biológicas. -, de Centro de estudios RIVAS Y MENGAR Sitio web: [http://www.academiamengar.es/global/MisArchivos/Documentos/Aux\\_Enferm\\_ERA/Material%202/muestras.pdf](http://www.academiamengar.es/global/MisArchivos/Documentos/Aux_Enferm_ERA/Material%202/muestras.pdf)
12. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.

13. Vargas Martínez Cinthya. (2016). Desarrollo y validación de un método analítico para cuantificar metronidazol en plasma humano por espectrofotometría UV, para su aplicación en el laboratorio de Biofarmacia. En Tesis (25-33 pp.). México: Facultad de Química, UNAM.
14. PAPIIME: PE207815 FACULTAD DE QUÍMICA (PAL) 3000-3467
15. Silva M, Schramm S, Kano E, Koono E, Porta V, Serra C. (2009). Development and validation of a HPLC-MS-MS method for quantification of metronidazole in human plasma. *J Chromatogr Sci.* 2009 Oct;47(9):781-4.
16. Niazi Sarfaraz; "Textbook of biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics"; Appleton-Century Crofts; N.Y. 1979.
17. Doménech Berrozpe J., Martínez Lanao J., María Plá D.J. "Biofarmacia y Farmacocinética". Vol I. Editorial Síntesis.
18. Guidance for Industry: Bioavailability and bioequivalence studies for Orally Administered Drug Products-General Considerations. FDA July 2002.
19. Ashiq, B., Usman, M., et al. comparative pharmacokinetics of metronidazole in healthy volunteers and in patients suffering from amoebiasis . *Pak. J. Pharm.* 24 (1 & 2) 41-46, 2011 ISSN: 1019-956X
20. Lau, A. (1986). Pharmacokinetics of metronidazole in hospitalised patients. *International Journal of Clinical Pharmacology Therapeutics and Toxicology.* 24(12), 643–645.
21. Mustofa., Suryawati, S., Santoso, B. (1991). Pharmacokinetics of metronidazole in saliva. *International Journal of Clinical Pharmacology Therapeutics and Toxicology.* 29(12), 474-478.

22. Doménech Berrozpe, José., Martínez Lanao, José, Peraire Guitart, Concepción (eds.). Tratado general de Biofarmacia y farmacocinética. Volumen II. Ed. Síntesis. España. ISBN: 9788499589527
23. Iphigenia Naidis y Satu Turpeinen, Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos., E.u ( 8-11pp), New York,

## **APÉNDICE A**

### **PRÁCTICA DE BIODISPONIBILIDAD RELATIVA DE DOS PRODUCTOS FARMACÉUTICOS SÓLIDOS CONTENIENDO METRONIDAZOL**

#### **OBJETIVO ACADÉMICO**

Estimar la biodisponibilidad relativa entre dos productos conteniendo metronidazol a partir de muestras cargadas en plasma simulando una administración oral (extravasular).

Existen dos definiciones oficiales de la biodisponibilidad (F), una acuñada por la FDA y la emitida por la Asociación de Farmacéuticos Americanos (APhA).

La FDA define a la biodisponibilidad como:

Velocidad y cantidad a la cual un fármaco o componente activo, absorbido a partir de la forma de dosificación que lo contiene, se hace disponible en su lugar de acción.

La APhA la define como:

Velocidad y magnitud a la cual un principio activo o componente activo, absorbido a partir de la forma de dosificación que lo contiene, alcanza la circulación.

La biodisponibilidad es un parámetro biofarmacéutico que cuantifica la disponibilidad fisiológica de un determinado principio activo; es decir, cuantifica hasta qué punto éste es capaz de acceder, en forma inalterada, a la circulación sistémica y que velocidad se produce el proceso.

El acceso de un fármaco a la circulación sistémica depende de una serie de factores inherentes a sus propiedades fisicoquímicas y características farmacocinéticas, a la forma de dosificación que la contiene (capacidad de ser liberado de esta forma de dosificación y de la velocidad de liberación) y al sustrato biológico al que va destinado (factores fisiológicos y patológicos del organismo).

Para determinar la biodisponibilidad de un fármaco se hace uso del tránsito del fármaco a través del organismo, bien sea de sus niveles plasmáticos en la circulación sistémica o a través de la cuantificación del fármaco en otros fluidos biológicos, como puede ser la orina, la saliva, etc.

Los objetivos de los estudios de biodisponibilidad pueden ser entre otros:

- a) Como parámetro biofarmacéutico equivalente a la propiedad intrínseca de un principio activo.
- b) Como control biológico de calidad de la forma de dosificación que contiene a un principio activo.
- c) En términos comparativos, con la finalidad de comprobar si se presentan modificaciones de éste parámetro en las siguientes circunstancias;
  - 1. Modificaciones del proceso de fabricación (al existir factores tecnológicos que pueden influir en la biodisponibilidad)
  - 2. Modificaciones cuantitativas y/o cualitativas en una formulación.
  - 3. Cuando se requiere justificar las especificaciones del ensayo de disolución. El establecimiento de correlaciones *in vivo/in vitro* es un método racional para fijar las especificaciones del ensayo de disolución.

4. En los estudios de linealidad farmacocinética (en los que se persigue verificar que la F no se modifica dentro de un ámbito de dosis determinado.

5. En los estudios de interacción con alimentos para justificar de manera racional el modo de administración idóneo para un determinado principio activo en su forma de dosificación correspondiente.

d) En los ensayos de bioequivalencia encaminados a comprobar la similitud de F en alternativas farmacéuticas y equivalentes farmacéuticos, que son la base científica para poder realizar la intercambiabilidad terapéutica con las máximas garantías de seguridad y eficacia.

La determinación de la biodisponibilidad absoluta ( $F_{abs}$ ) conlleva la administración del fármaco por dos vías: extravasas e intravenosa, tomada ésta última como referencia, dado que por esta vía se asume que el 100% de la dosis administrada accede inalterada a la circulación sistémica, al depositarla directamente en la circulación general.

$$F_{abs} = \frac{ABC_{EV}}{ABC_{IV}} \times \frac{D_{IV}}{D_{EV}}$$

Dónde:

$F_{abs}$  = Biodisponibilidad absoluta

$ABC_{EV}$  = Área Bajo la Curva de  $0-\infty$  tras la administración extravascular (Ej. Oral)

$ABC_{IV}$  = Área Bajo la Curva de  $0-\infty$  tras la administración intravenosa

$D_{IV}$  = Dosis de fármaco administrado por vía intravenoso

$D_{EV}$  = Dosis de fármaco administrado por vía extravascular

En los casos en los que no es factible la vía intravenosa, o por ejemplo en los estudios de bioequivalencia se utilizará como estándar de referencia una forma de dosificación de la que se conoce la constancia de su biodisponibilidad así como su eficacia clínica. En estas circunstancias, en las que no puede estimarse en términos absolutos la fracción de dosis, que tras la administración de la formulación problema accede inalterada a la circulación sistémica, sino sólo en términos relativos respecto a la formulación de referencia, lo que se determina es la Biodisponibilidad Relativa.

Para la determinación de dicho parámetro se hará uso de la siguiente expresión:

$$F_{rel} = \frac{ABC_{Pba}}{ABC_{Ref}} \times \frac{D_{Ref}}{D_{Pba}}$$

En los casos en los que la dosis administrada sea la misma para las dos formulaciones (en los estudios de bioequivalencia con equivalentes terapéuticos) dicho parámetro se determinará a partir de la relación directa de las áreas bajo la curva de niveles plasmáticos, mediante la expresión.

$$F_{rel} = \frac{ABC_{Pba}}{ABC_{Ref}}$$

Dónde:

$F_{rel}$  = Biodisponibilidad relativa

$ABC_{Pba}$  = Área Bajo la Curva de  $0-\infty$  tras la administración del producto de prueba

$ABC_{Ref}$  = Área Bajo la Curva de  $0-\infty$  tras la administración del producto de referencia

$D_{Pba}$  = Dosis de fármaco administrado del producto de prueba

$D_{Ref}$  = Dosis de fármaco administrado del producto de referencia

Cabe señalar que la biodisponibilidad también puede determinarse a partir de la cantidad de fármaco excretado en orina, pero para ello se tiene que hacer una serie de consideraciones y el parámetro de comparación sería la cantidad de fármaco acumulado excretado por orina a tiempo infinito ( $Aex_{acum}^{\infty}$ ).

### **NOM-177-SSA1-2013. REVISAR LA NORMA VIGENTE.**

NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.

**Criterios y requisitos generales de Intercambiabilidad (biodisponibilidad o bioequivalencia)**

## Pruebas de Intercambiabilidad.

Para el cumplimiento de esta Norma, los tipos de prueba que pueden practicarse están basados en el Acuerdo que determina el tipo de prueba para demostrar la intercambiabilidad de medicamentos genéricos y sus actualizaciones.

Las pruebas de intercambiabilidad deberán realizarse por Terceros Autorizados en territorio nacional con población mexicana.

## **Medicamentos.**

Las pruebas de intercambiabilidad se deben realizar con un lote de producción, elaborado de acuerdo con la NOM-059-SSA1-2013 (y que cuente con un certificado de análisis de acuerdo con la FEUM; cuando en ésta no aparezca la información, puede recurrirse a farmacopeas de otros países o utilizar métodos analíticos validados.

El medicamento de referencia será el indicado por la autoridad sanitaria competente y deberá ser adquirido por el patrocinador o por el Tercero Autorizado, contenido en su envase original y con copia de la factura de compra. Las guías de criterios para la determinación de los medicamentos que serán considerados como Medicamentos de referencia, se encuentran disponibles en

<http://www.cofepris.gob.mx/AS/Paginas/Registros%20Sanitarios/RegistroSanitarioMedicamentos.aspx>.

En caso de que no se comercialice el medicamento de referencia, se podrá utilizar otro medicamento de referencia así reconocido a nivel internacional, siempre y cuando éste se encuentre en el protocolo autorizado por la COFEPRIS.

Cuando el medicamento de prueba contenga más de un fármaco de efecto sistémico, realizar la prueba de intercambiabilidad para cada uno de ellos, de acuerdo con esta Norma.

El medicamento de prueba y de referencia debe tener una fecha de caducidad vigente al momento de ser utilizados en el estudio clínico, de tal manera que su vigencia abarque toda la duración del estudio, así mismo para el medicamento empleado en el estudio de perfil de disolución.

Los medicamentos de prueba y de referencia deben proporcionarse al Tercero Autorizado en cantidad suficiente para realizar una vez el estudio y que mantenga en resguardo otro tanto.

Los medicamentos de prueba y de referencia deben contar con un certificado de análisis en el que se señalen las pruebas de control de calidad realizadas, ya sea proporcionado por el patrocinador o por un laboratorio de prueba, Tercero Autorizado.

Las pruebas de control de calidad de los medicamentos de prueba y de referencia, entre las que se incluyen valoración y uniformidad de dosis expresada como uniformidad de contenido y si aplica, disolución; deben realizarse siguiendo los métodos descritos en la FEUM, en farmacopeas reconocidas internacionalmente con métodos analíticos validados.

El porcentaje de valoración del medicamento de prueba debe estar dentro de los límites farmacopeícos y no debe diferir en más del 5% del medicamento de referencia.

Para el diseño de un protocolo clínico de estudios de bioequivalencia en plasma se debe considerar lo siguiente de acuerdo con la NOM-177-SSA1-2013 entre otras cuestiones:

Quando por razones científicamente justificadas y sustentadas en el protocolo, no se pueda llevar a cabo el estudio de bioequivalencia mediante el análisis de variables farmacocinéticas, podrán ser admitidos estudios farmacodinámicos y clínicos comparativos.

La asignación de sujetos de investigación a la secuencia de tratamiento o al producto de investigación, debe hacerse de acuerdo con una tabla de aleatorización o mediante otro método de aleatorización documentado en un PNO.

La administración de los medicamentos debe ser de acuerdo con lo indicado en el protocolo.

En un estudio cruzado de dosis única la administración de los medicamentos debe estar separada por un periodo de lavado, para garantizar la eliminación de la dosis previa del fármaco residual antes de administrar la siguiente; el periodo de lavado debe ser por lo menos de siete vidas medias del fármaco bajo estudio.

En general es suficiente llevar a cabo estudios de dosis única.

Para medicamentos de liberación inmediata con vida media de eliminación larga (> 24 h) se podrán realizar estudios truncados de ABC, obteniendo muestras por un mínimo de 72 h.

La dieta de los sujetos de investigación durante el estudio debe ser la misma en los dos periodos y congruente con el diseño del mismo y las características del fármaco en estudio.

Los estudios de bioequivalencia para medicamentos de liberación inmediata deben ser realizados bajo condiciones de ayuno a excepción de aquellos casos en donde el esquema de dosificación establecido en la IPP del medicamento de referencia recomiende una administración después de la ingesta de alimentos.

La administración de los medicamentos debe efectuarse a los 30 minutos de haber iniciado la ingesta de los alimentos.

Si el sujeto de investigación presenta vómito en un periodo de tiempo comprendido entre 0 y 2 veces el  $T_{max}$ , medida del valor obtenido en el período del tratamiento o del sujeto en el periodo del tratamiento, deberá ser retirado del estudio y eliminado del análisis estadístico.

En el caso de medicamentos de liberación modificada si el vómito se presenta dentro del intervalo de dosificación terapéutico, el sujeto de investigación debe ser retirado del estudio y eliminado del análisis estadístico.

#### Tamaño de la muestra.

El número de sujetos de investigación a incluir en un estudio convencional de bioequivalencia (en paralelo, cruzado, replicado, William o secuencial) debe estar basado en un cálculo apropiado del tamaño de muestra, el cual debe obtenerse a partir del CV% intrasujeto del parámetro farmacocinético ( $C_{max}$ ,  $ABC_{0-t}$  o  $ABC_{0-\infty}$ ) con mayor variabilidad, el cual a su vez debe obtenerse del CME obtenido en el ANADEVVA; esta información se podrá obtener de un estudio piloto o en la bibliografía científica reconocida internacionalmente.

El tamaño de la muestra debe satisfacer los criterios a cumplir con respecto al nivel de significancia deseado o error tipo I (a), el error tipo II (b) y una diferencia mínima a detectar, con relación a la biodisponibilidad promedio entre el medicamento de prueba y el medicamento de referencia, la potencia estadística no debe ser menor al 80%, el error tipo I debe ser menor o igual al 5%.

El número de sujetos de investigación evaluables no debe ser menor a 12 y se debe especificar previamente en el protocolo y en el informe.

Todos los sujetos de investigación tratados deben ser incluidos en el análisis estadístico, sin embargo, los sujetos de investigación que en un diseño cruzado no

proporcionen datos evaluables, tanto del medicamento de prueba como del medicamento de referencia, o que no presentan datos evaluables en el único periodo de un diseño en paralelo, no deben ser incluidos en el análisis estadístico de acuerdo a lo establecido en el Apéndice C Normativo.

No se permite la sustitución o reemplazo de sujetos de investigación.

Cada protocolo de un estudio clínico, debe ser previamente evaluado y dictaminado por el Comité de Ética en Investigación y por el Comité de Investigación, así como autorizado por la COFEPRIS.

El protocolo debe contener lo indicado en el Apéndice A Normativo y cumplir con lo señalado por las Buenas Prácticas Clínicas (BPC) y en las Guías que se encuentran disponibles en el sitio oficial de la COFEPRIS (<http://www.cofepris.gob.mx>).

Toda la información y datos generados en el desarrollo del estudio clínico deben registrarse en el documento fuente en tiempo y forma; estos datos serán trasladados a los formatos de reporte de caso.

### **Toma de muestras.**

El método de recolección de las muestras y las precauciones que deben tomarse durante el proceso deben establecerse en el protocolo.

Los tiempos para la toma de las muestras deben diseñarse de tal manera que se puedan caracterizar los parámetros farmacocinéticos, particularmente ABC y  $C_{m\acute{a}x}$ , definiendo el tiempo de tolerancia en el protocolo.

Cualquier desviación debe ser documentada y reportada a la unidad analítica,; también debe considerarse en el análisis estadístico e incluirse en el reporte final.

Debe ser recolectado un número suficiente de muestras para describir el perfil de concentración plasmática respecto al tiempo.

El horario de muestreo debe incluir muestreos frecuentes alrededor del valor de  $t_{max}$  esperado para proporcionar un estimado confiable del  $C_{max}$  y debe ser planeado para evitar que el primer tiempo de muestreo corresponda al  $C_{max}$ , de tal manera, que permita caracterizar el 80% del ABC (mínimo 4  $t_{1/2}$  de eliminación, con al menos cuatro muestras durante la fase log-terminal para obtener la constante de velocidad de eliminación) a excepción de estudios truncados.

**Parámetros farmacocinéticos a determinar en estudios con muestras plasmáticas.**

Después de la administración de una sola dosis del medicamento, se deben calcular los siguientes parámetros farmacocinéticos: ABC<sub>0-t</sub>, ABC<sub>t-∞</sub>,  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $t_{m\acute{a}x}$ , Ke y la  $t_{1/2}$  estimada en la fase terminal.

## PARTE EXPERIMENTAL

### ➤ MATERIAL

1 Nave para pesado

1 espátula

4 vasos de precipitado de 200 mL

4 matraces volumétricos de 10 mL

1 pipeta volumétrica de 3 mL

2 pipetas volumétricas de 1 mL

5 pipetas Pasteur

2 bulbos para pipetas Pasteur

1 agitador vórtex

50 Tubos Eppendorf de 2 mL

1 gradilla para Tubos Eppendorf

1 piseta

1 celda de cuarzo de paredes negras 10 mm, dimensiones: 12.5 x 12.5 x 45 mm, volumen nominal de 0.700 mL.

1 micropipeta de 10 a 100  $\mu$ L

1 micropipeta de 100 a 1000  $\mu$ L

➤ **EQUIPO**

Balanza analítica

Espectrofotómetro UV-Vis

Microcentrífuga

➤ **REACTIVOS, SUSTANCIA DE REFERENCIA Y OTROS INSUMOS**

Acetonitrilo HPLC

Sustancia de referencia de metronidazol

Cloro

**METODOLOGÍA**

El alumno deberá plantear un protocolo clínico para evaluar la biodisponibilidad comparativa de tabletas de metronidazol por vía oral, dicho protocolo formará parte del reporte de la práctica de acuerdo al esquema del apéndice considerando:

- 1) Los datos de los productos de referencia y prueba evaluados en la práctica de perfiles de disolución y control farmacéutico.
- 2) Que las muestras son de plasma, provenientes de 8 voluntarios divididos en 2 grupos (Grupo A y Grupo B), después de la administración por vía oral de 1000 mg de metronidazol (2 tabletas de 500 mg).
- 3) Que el estudio sería bajo un diseño cruzado 2 x 2. (Explicar el diseño, asignación de sujetos, período de lavado)

4) Que se empleará el método analítico utilizado en la práctica de validación para analizar las muestras.

5) Que los datos provenientes de las muestras a analizar serían los datos promedios de 4 voluntarios para el grupo A y 4 voluntarios para el grupo B.

Para cumplir con estos propósitos el alumno deberá realizar un investigación bibliográfica sobre: Propiedades fisicoquímicas del metronidazol, propiedades farmacocinéticas, métodos de análisis y requerimientos regulatorios de estudios de bioequivalencia.

Deberá diseñar el estudio de bioequivalencia estipulando por lo menos: criterios de inclusión y de exclusión, tiempos de muestreo, dosis, medicamento innovador, medicamento de prueba, número de voluntarios mínimo, tipo de diseño de estudio, tiempo de lavado sí aplica, tipo de muestra (plasma, orina, etc.), dieta, conservación de la muestra, entre otros datos, tales como: número de lote, fabricante, % de valoración, fecha de caducidad, etc., datos que deben ser registrados de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013.

## **EXPERIMENTAL**

El grupo se dividirá en 8 equipos y 2 subgrupos de 4 equipos c/uno, el subgrupo 1, representará el producto A y el subgrupo 2 representará al producto B.

Un equipo asignado por el profesor preparará una curva de calibración tal como se indica a continuación

### **PREPARACION DE SOLUCIONES DE METRONIDAZOL**

#### **1) PREPARACIÓN DE PUNTOS CURVA DE CALIBRACIÓN, PUNTOS CONTROL Y MUESTRAS.**

##### **Solución Stock (1000 µg/mL):**

Pesar exactamente 10 mg de estándar de referencia de metronidazol, trasvasar cuantitativamente a un matraz aforado de 10 mL, disolver con acetonitrilo y llevar al aforo con el mismo disolvente.

##### **Solución A (500 µg/mL) :**

De la solución Stock tomar una alícuota de 5 mL y trasvasar a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir y llevar al aforo con acetonitrilo

**Solución B (100 µg/mL) :**

De la solución Stock, tomar una alícuota de 1 mL y trasvasar a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir y llevar al aforo con acetonitrilo.

**Solución C (50 µg/mL) :**

De la solución stock, tomar una alícuota de 500 µL y trasvasar a un matraz volumétrico de 10 mL, diluir y llevar al aforo con acetonitrilo.

**Preparación de curva patrón en plasma:**

Tomar las alícuotas y realizar los aforos con plasma de acuerdo a la Tabla 1:

**Tabla 1. Preparación de curva patrón y puntos control de calidad en plasma (ACN)**

| Alícuota de Solución stock (1000 µg/mL) (µL) | Alícuota de Solución A (500 µg/mL) (µL) | Alícuota de Solución B (100 µg/mL) (µL) | Alícuota de Solución C (50 µg/mL) (µL) | Plasma (µL) | Concentración Final (µg/mL) |
|--|---|---|--|-------------|-----------------------------|
|  |   |   | 20                                     | 980         | 1                           |
|  |   |   | 40                                     | 960         | 2                           |
|  |   | 30                                      |  | 970         | 3*                          |
|  |   | 50                                      |  | 950         | 5                           |
|  | 30                                      |   |  | 970         | 15**                        |
|  | 40                                      |   |  | 960         | 20                          |
|  | 50                                      |   |  | 950         | 25                          |
| 40   |   |   |  | 960         | 40***                       |
| 50   |   |   |  | 950         | 50                          |

\*MCB, \*\* MCM, \*\*\*MCA

## 2) METODO DE EXTRACCIÓN PARA MUESTRAS

Trasvasar a tubo Eppendorf 200 µL de cada muestra preparada conforme a la Tabla 1 (curva de calibración y puntos de control de calidad) y adicionar 600 µL de ACN, agitar durante 15 segundos en vórtex; centrifugar, durante 10 minutos a 15000 rpm, analizar el sobrenadante en un espectrofotómetro a 318 nm; emplear celdas de cuarzo, de paredes negras, 10 mm, dimensiones: 12.5x12.5x45mm, Volumen nominal de 0.700 mL

\*\*Preparar un blanco de plasma libre de fármaco para que sirva como blanco de ajuste, tomando 200  $\mu$ L de plasma y adicionar 600  $\mu$ L de ACN, agitar durante 15 segundos en vórtex; centrifugar, durante 10 minutos a 15000 rpm, analizar el sobrenadante en un espectrofotómetro a 318 nm; emplear celdas de cuarzo, de paredes negras, 10mm, dimensiones: 12.5x12.5x45mm, volumen nominal de 0.700 mL

### **3) METODO DE EXTRACCIÓN**

Trasvasar a tubo Eppendorf 200  $\mu$ L de cada muestra preparada conforme a la Tabla 1 (curva de calibración y puntos de control de calidad) y adicionar 600  $\mu$ L de ACN, agitar durante 15 segundos en vórtex; centrifugar, durante 10 minutos a 15000 rpm, analizar el sobrenadante en un espectrofotómetro a 318 nm; emplear celdas de cuarzo, de paredes negras, 10mm, dimensiones: 12.5x12.5x45mm, vol. nominal: 0.700 mL

Preparar un blanco de plasma para que sirva como blanco de ajuste, tomando 200  $\mu$ L de plasma y adicionar 600  $\mu$ L de ACN, agitar durante 15 segundos en vórtex; centrifugar, durante 10 minutos a 15000 rpm, analizar el sobrenadante en un espectrofotómetro a 318 nm; emplear celdas de cuarzo, de paredes negras, 10mm, dimensiones: 12.5x12.5x45mm, vol. nominal: 0.700 mL

### **4) TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

Descongelar las muestras y adicionar a cada una 600  $\mu$ L de ACN, agitar durante 15 segundos en vórtex; centrifugar, durante 10 minutos a 15000 rpm, analizar el sobrenadante en un espectrofotómetro a 318 nm; emplear celdas de cuarzo, de paredes negras, 10mm, dimensiones: 12.5x12.5x45mm, vol. nominal: 0.700 mL

5) Interpolar los datos de absorbancias obtenidos en la curva de calibración preparada

6) Graficar la Concentración plasmática promedio vs tiempo de cada producto.

7) Determinar la biodisponibilidad relativa (comparativa del producto de prueba con respecto al producto de referencia) para cada equipo y para el promedio, aplicando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Biodisponibilidad relativa} = \frac{(ABC_{0-\infty})_B}{(ABC_{0-\infty})_A} \times 100$$

Dónde:

$(ABC_{0-\infty})_A$  Es el ABC del producto de prueba

$(ABC_{0-\infty})_B$  Es el ABC del producto de referencia

Los resultados obtenidos se registrarán en la Tabla 2.

Estadística descriptiva para las concentraciones plasmáticas de Metronidazol con respecto al tiempo para el tratamiento A.

**Tabla 2. Datos de concentración interpolada del tratamiento A**

| Tiempo (h) | CONC.<br>EQUIPO/S<br>SUJETO 1 | CONC.<br>EQUIPO/S<br>SUJETO 2 | CONC.<br>EQUIPO/S<br>SUJETO 3 | CONC.<br>EQUIPO/S<br>SUJETO 4 | MEDIA | DES.EST | ERROR<br>EST | MIN | CV% |
|------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------|---------|--------------|-----|-----|
| Blanco     |                               |                               |                               |                               |       |         |              |     |     |
| 0          |                               |                               |                               |                               |       |         |              |     |     |
| 0,25       |                               |                               |                               |                               |       |         |              |     |     |
| 0,5        |                               |                               |                               |                               |       |         |              |     |     |
| 1          |                               |                               |                               |                               |       |         |              |     |     |
| 2          |                               |                               |                               |                               |       |         |              |     |     |
| 5          |                               |                               |                               |                               |       |         |              |     |     |
| 6          |                               |                               |                               |                               |       |         |              |     |     |
| 10         |                               |                               |                               |                               |       |         |              |     |     |
| 12         |                               |                               |                               |                               |       |         |              |     |     |
| 24         |                               |                               |                               |                               |       |         |              |     |     |
| 36         |                               |                               |                               |                               |       |         |              |     |     |
| 48         |                               |                               |                               |                               |       |         |              |     |     |
| 56         |                               |                               |                               |                               |       |         |              |     |     |

Estadística descriptiva para las concentraciones plasmáticas de Metronidazol con respecto al tiempo para el tratamiento B.

**Tabla 3. Datos de concentración interpolada del tratamiento A**

| Tiempo (h) | CONC.<br>EQUIPO/<br>SUJETO<br>1 | CONC.<br>EQUIPO/<br>SUJETO<br>2 | CONC.<br>EQUIPO/<br>SUJETO<br>3 | CONC.<br>EQUIPO/<br>SUJETO<br>4 | MEDIA | DES.EST | ERROR<br>EST | MIN | CV% |
|------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------|---------|--------------|-----|-----|
| Blanco     |                                 |                                 |                                 |                                 |       |         |              |     |     |
| 0          |                                 |                                 |                                 |                                 |       |         |              |     |     |
| 0,25       |                                 |                                 |                                 |                                 |       |         |              |     |     |
| 0,5        |                                 |                                 |                                 |                                 |       |         |              |     |     |
| 1          |                                 |                                 |                                 |                                 |       |         |              |     |     |
| 2          |                                 |                                 |                                 |                                 |       |         |              |     |     |
| 5          |                                 |                                 |                                 |                                 |       |         |              |     |     |
| 6          |                                 |                                 |                                 |                                 |       |         |              |     |     |
| 10         |                                 |                                 |                                 |                                 |       |         |              |     |     |
| 12         |                                 |                                 |                                 |                                 |       |         |              |     |     |
| 24         |                                 |                                 |                                 |                                 |       |         |              |     |     |
| 36         |                                 |                                 |                                 |                                 |       |         |              |     |     |
| 48         |                                 |                                 |                                 |                                 |       |         |              |     |     |
| 56         |                                 |                                 |                                 |                                 |       |         |              |     |     |

$t_{max}$ ,  $C_{max}$  y  $ABC_{0-\infty}$ ,

Tabla 4. Datos de parámetros farmacocinéticos calculados

| Variabl<br>e                         | Tratamie<br>nto | Equipo<br>1 | Equipo<br>2 | Equipo<br>3 | Equipo<br>4 | N | MEDIA | DES.E<br>ST | ERRO<br>R EST | MIN | CV% |
|--------------------------------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---|-------|-------------|---------------|-----|-----|
| $t_{\max}(h)$                        | A               |             |             |             |             |   |       |             |               |     |     |
|                                      | B               |             |             |             |             |   |       |             |               |     |     |
| $C_{\max}$<br>(mcg/mL)               | A               |             |             |             |             |   |       |             |               |     |     |
|                                      | B               |             |             |             |             |   |       |             |               |     |     |
| $ABC_{0-t}$<br>(mcg/m<br>L*h)        | A               |             |             |             |             |   |       |             |               |     |     |
|                                      | B               |             |             |             |             |   |       |             |               |     |     |
| $ABC_{0-\infty}$ ,<br>(mcg/m<br>L*h) | A               |             |             |             |             |   |       |             |               |     |     |
|                                      | B               |             |             |             |             |   |       |             |               |     |     |
| $Ke$<br>( $h^{-1}$ )                 | A               |             |             |             |             |   |       |             |               |     |     |
|                                      | B               |             |             |             |             |   |       |             |               |     |     |
| $t_{1/2} (h)$                        | A               |             |             |             |             |   |       |             |               |     |     |
|                                      | B               |             |             |             |             |   |       |             |               |     |     |

8.- Concluya acerca de la biodisponibilidad relativa del producto de prueba con respecto al producto de referencia basando su decisión en que el valor de F deberá estar entre el intervalo de confianza de 80-120%.

## BIBLIOGRAFIA DE APÉNDICE

1. Niazi Sarfaraz; "Textbook of biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics"; Appleton-Century Crofts; N.Y. 1979.
2. Doménech Berrozpe J., Martínez Lanao J., María Plá D.J. "Biofarmacia y Farmacocinética". Vol I. Editorial Síntesis.
- 3 Guidance for Industry: Bioavailability and bioequivalence studies for Orally Administered Drug Products-General Considerations. FDA July 2002.
4. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad.
5. Ashiq, B., Usman, M., et al. comparative pharmacokinetics of metronidazole in healthy volunteers and in patients suffering from amoebiasis . *Pak. J. Pharm.* 24 (1 & 2) 41-46, 2011 ISSN: 1019-956X
6. Lau, A. (1986). Pharmacokinetics of metronidazole in hospitalised patients. *International Journal of Clinical Pharmacology Therapeutics and Toxicology.* 24(12), 643–645.
7. Mustofa., Suryawati, S., Santoso, B. (1991). Pharmacokinetics of metronidazole in saliva. *International Journal of Clinical Pharmacology Therapeutics and Toxicology.* 29(12), 474-478.

8. Doménech Berrozpe, José., Martínez Lanao, José, Peraire Guitart, Concepción (eds.). Tratado general de Biofarmacia y farmacocinética. Volumen II. Ed. Síntesis. España.

ISBN: 9788499589527