



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Metabolización de un fármaco: estudio analítico a través de la orina

Alumno: M^a Dolores Blanca Pestaña

Julio, 2017



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Facultad de Ciencias Experimentales



Metabolización de un fármaco: estudio analítico a través de la orina.

Trabajo Fin de Grado presentado por
M^aDolores Blanca Pestaña

Julio del 2017

Resumen.

1. Introducción.
 - 1.1. Definición de fármaco.
 - 1.2. Concepto y objetivos de la farmacología.
 - 1.3. Concepto y objetivos de la farmacocinética.
 - 1.3.1. Absorción.
 - 1.3.2. Distribución.
 - 1.3.3. Metabolismo.
 - 1.3.3.1. Reacciones de fase I.
 - 1.3.3.2. Reacciones de fase II.
 - 1.3.4. Eliminación.
 - 1.4. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).
 - 1.4.1. Definición, características principales y clasificación.
 - 1.4.2. Mecanismo general de acción.
 - 1.4.3. Acciones farmacológicas.
 - 1.4.4. Reacciones adversas.
 - 1.5. Características del fármaco objeto de estudio.
2. Antecedentes y justificación.
 - 2.1. Farmacocinética del Dexketoprofeno.
 - 2.2. Metabolismo.
 - 2.3. Métodos empleados en la determinación de los metabolitos.
3. Objetivos.
4. Experimental.
 - 4.1. Reactivos y material.
 - 4.2. Preparación de los calibrados.
 - 4.3. Recogida de la muestra.
 - 4.4. Preparación y tratamiento de la muestra.
 - 4.5. Instrumentación.
 - 4.6. Optimización del método.
 - 4.7. Validación del método.
5. Resultados y discusión.
 - 5.1. Estudio de eliminación del Dexketoprofeno.
 - 5.2. Identificación y confirmación de los respectivos metabolitos empleando HPLC-TOF-MS.
6. Conclusiones.
7. Bibliografía.

ANEXO

RESUMEN

Objetivos: El principal objetivo de esta memoria es llevar a cabo un estudio analítico de la metabolización de un fármaco en orina humana. El fármaco en cuestión consiste en el denominado Enantyum, compuesto principalmente de Dexketoprofeno Trometamol que se corresponde con la forma enantiomérica S-(+) del Ketoprofeno.

Métodos: Para llevar a cabo dicho estudio, la orina fue recogida y procesada empleando el método de extracción en fase sólida como tratamiento de la muestra y, a continuación, se analizó mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas y empleando analizador de tiempo de vuelo (HPLC-TOFMS). El analizador de tiempo de vuelo viene equipado con una fuente de ionización tipo electrospray (ESI) operando en modo negativo. Previamente se desarrolló el método para la identificación y cuantificación del Ketoprofeno.

Resultados: Se identificaron un total de 11 metabolitos del S-(+)-Ketoprofeno, de entre los cuales, 2 metabolitos se corresponden con glucurónidos del Ketoprofeno, 3 metabolitos son derivados hidroxilados del Ketoprofeno y 6 metabolitos que se basan en derivados glucurónidos del hidroxiketoprofeno. Se determinó la masa exacta de los metabolitos y sus respectivos fragmentos originados por disociación inducida por colisión (CID). Estos resultados son consistentes con la bibliografía. Además se ha estudiado la eliminación del Ketoprofeno por orina.

Conclusión: Se ha desarrollado un método HPLC-TOF-MS que ha permitido tanto el estudio de la eliminación y cuantificación del Ketoprofeno en orina, como la detección de sus principales metabolitos.

ABSTRACT

Aims: An analytical study of the metabolism of Ketoprofen in human urine was carried out. The drug studied was Enantyum and it is composed mainly of Dexketoprofen Trometamol which corresponds to the enantiomeric form S-(+)-Ketoprofen.

Methods: The urine sample was collected and processed using solid phase extraction method as sample treatment. Then, the samples were analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry with a time-of-flight mass analyzer (HPLC-TOF-MS) is equipped with an electrospray interface (ESI) which operated in negative ion mode.

Results: A total of eleven drug metabolites were identified by in-source collision induced dissociation (CID) fragmentation. Two metabolites correspond to ketoprofen's glucuronides, three metabolites are hydroxylated derivatives of ketoprofen and six metabolites are based on the glucuronide derivatives of hydroxyketoprofen.

Conclusion: In this work an effective method has been developed. This method has allowed both the quantification and the study of the elimination as well as the detection of the main metabolites of Dexketoprofen.

1. Introducción.

1.1. Definición de fármaco.

Fármaco es toda aquella sustancia química usada tanto en el tratamiento, la curación, la prevención ó en el diagnóstico de una enfermedad como en evitar la aparición de un procesos fisiológico no deseado.

Según la legislación española, un fármaco o sustancia medicinal es toda materia con la actividad apropiada para construir un medicamento; se podría definir en resumen como el principio activo del medicamento.

1.2. Concepto y objetivos de la Farmacología.

La farmacología es una ciencia de la Biología que se dedica al estudio de las propiedades y las acciones de los fármacos en los organismos (ser humano, animal y/o plantas). Teniendo una idea más completa se puede decir que la farmacología abarca aspectos tales como el origen del fármaco, su síntesis, su preparación, sus propiedades, sus acciones tanto a nivel molecular como a nivel del organismo en completo, su manera de situarse y cómo se mueve en el organismo, sus formas de administración, sus indicaciones terapéuticas y su toxicidad (Florez, J., *Capítulo 1: La farmacología, concepto y objetivos*, Farmacología Humana, 1997, Barcelona, Masson, S.A).

Como se puede comprobar la Farmacología es un amplio campo teniendo influencia tanto la Biología molecular como la Medicina terapéutica.

El objetivo principal de la Farmacología es beneficiar al paciente de un modo razonable y estricto con el objetivo de llegar a un buen diagnóstico. Para conseguir este fin se debe poseer previamente un conocimiento profundo de la acción del fármaco, cómo actúa y tener en cuenta los posibles efectos secundarios, por lo que la acción terapéutica adquiere también un papel muy importante en el mundo de los fármacos.

La influencia y el desarrollo de la Química, la Fisiología, la Bioquímica y la Tecnología analítica han tenido una gran repercusión en el aislamiento de los productos activos de las fuentes naturales, así como en el diseño y síntesis de nuevos compuestos siendo posible un análisis exhaustivo. Esto ha dado lugar a una enorme producción de fármacos con gran actividad terapéutica.

No obstante, otro punto importante a tener en cuenta es la toxicidad. Ante la decisión de tomar cualquier fármaco debe tenerse en cuenta el beneficio y el riesgo que pueda conllevar, de manera que la acción terapéutica se procesa en función de las características y las condiciones del paciente.

1.3. Concepto y objetivos de la Farmacocinética.

La Farmacocinética es una rama de la Farmacología encargada del estudio de los distintos procesos y factores que determinan la concentración adecuada de fármaco para actuar en el momento y en la zona de acción (Florez, J., *Capítulo 1: La farmacología, concepto y objetivos*, Farmacología Humana, 1997, Barcelona, Masson, S.A).

El principal objetivo de la Farmacocinética es proporcionar una relación cuantitativa entre la cantidad y los efectos del fármaco y así deducir su concentración en los líquidos biológicos por el bien del paciente. Otro de los objetivos es mejorar la eficacia terapéutica así como evitar los efectos indeseables de los fármacos.

La concentración adecuada que se alcanza en el lugar de acción es la consecuencia de los siguientes procesos:

- a) Absorción, entrada del fármaco en el organismo. Se lleva a cabo su liberación, disolución y su correspondiente absorción.
- b) Distribución del fármaco. Una vez producida la absorción del fármaco, éste debe alcanzar su lugar de acción; para ello, deberá atravesar diversas membranas hasta llegar a la circulación sistemática (la sangre) y de aquí pasar a los diferentes tejidos. Este paso de la sangre a los distintos tejidos va a depender de la fijación del fármaco a las proteínas presentes en el plasma.
- c) Eliminación del fármaco, llevada a cabo bien por metabolismo hepático, principalmente, donde en algunos casos se producen metabolitos activos que habrá que tener en cuenta o mediante excreción por la orina, la bilis, etc.

Estos procesos expuestos con sus ideas principales se verán más detenidamente en el siguiente apartado. En la **Figura 1** se puede observar de forma esquemática los distintos procesos.

La intensidad con la que se van a llevar a cabo los distintos procesos (absorción, distribución y eliminación) va a variar en el tiempo, por lo que la cantidad de fármaco en el organismo irá variando también con el tiempo. En la **Figura 2.A** se representa la influencia de los procesos de absorción, distribución y eliminación con respecto a la cantidad de fármaco frente al tiempo. En el caso de los metabolitos, los procesos a tener en cuenta serán los de formación y eliminación.

En los fármacos donde el efecto terapéutico va a depender de la concentración alcanzada en el lugar de acción (concentración en equilibrio con la concentración plasmática) se establece una relación entre el transcurso temporal de las concentraciones plasmáticas y sus correspondientes efectos (**Figura 2.B**).

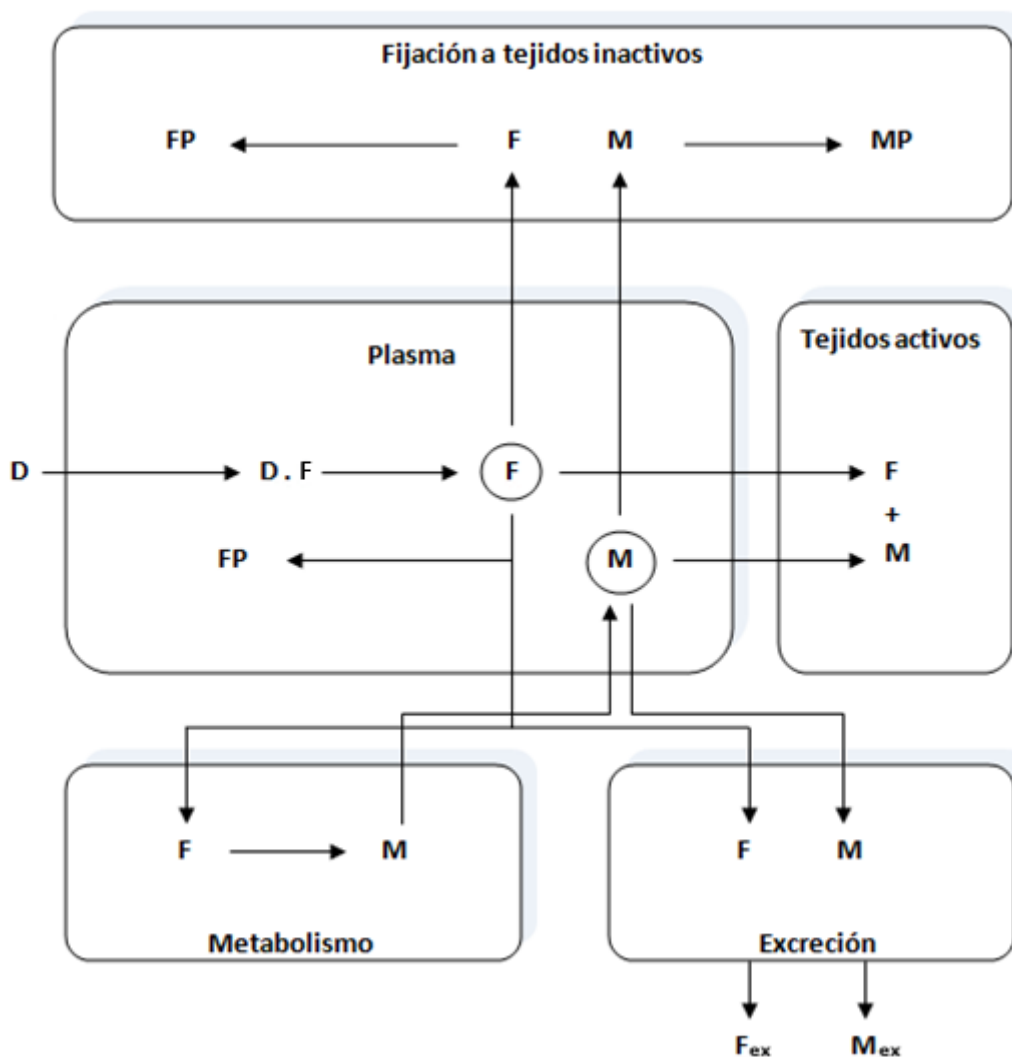


Figura 1: Procesos farmacocinéticos. Armijo, J.A., *Capítulo 4: Absorción, distribución y eliminación de los fármacos en Farmacología Humana*, 1997, Barcelona, MASSON, S.A.

ABREVIATURAS.

D: dosis administrada.

F: fármaco libre.

F_{ex} : fármaco excretado.

MP: metabolito activo unido a proteína.

D-F: cantidad de fármaco absorbida.

FP: fármaco unido a proteína.

M: metabolito activo libre.

M_{ex} : metabolito activo excretado.

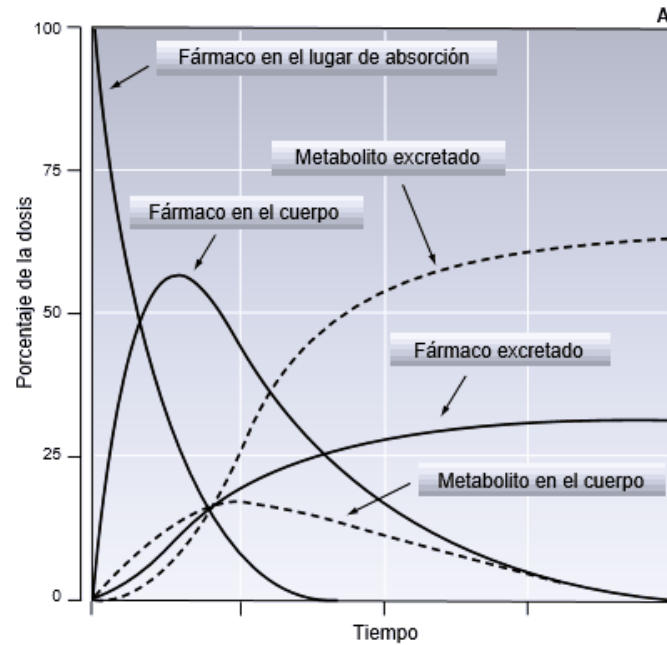
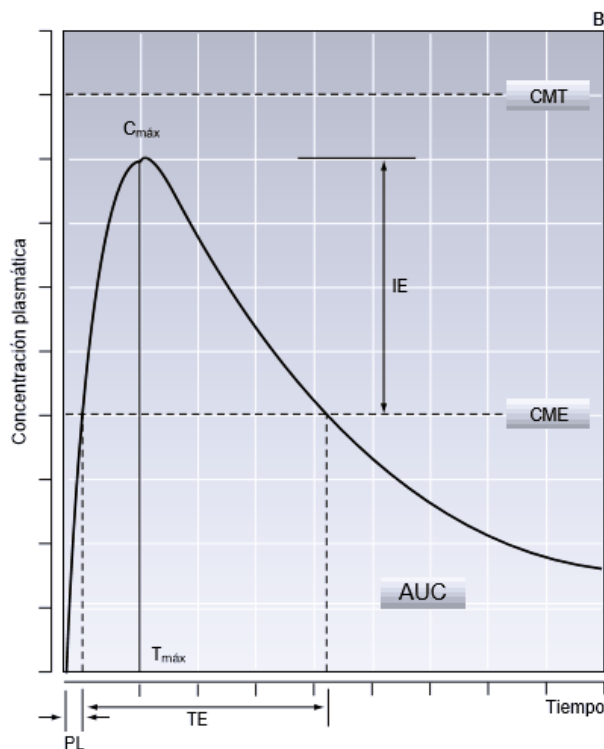


Figura 2: A) influencia de los procesos de absorción, distribución y eliminación con respecto a la cantidad de fármaco frente al tiempo. Armijo, J.A., *Capítulo 4: Absorción, distribución y eliminación de los fármacos en Farmacología Humana*, 1997, Barcelona, MASSON, S.A.



AUC: Área bajo la curva de [I]s plasmáticas.
CMT: Concentración mínima tóxica.
IE: Intensidad del efecto.
TE: Duración de la acción ó tiempo eficaz.
CME: Concentración mínima eficaz.
Cmáx: Concentración plasmática máxima.
PL: Período de latencia.
Tmáx: Tiempo donde se alcanza la Cmáx tras dosis.

Figura 2: B) Relación entre el transcurso temporal de las concentraciones plasmáticas y sus correspondientes efectos. Armijo, J.A., *Capítulo 4: Absorción, distribución y eliminación de los fármacos en Farmacología Humana*, 1997, Barcelona, MASSON, S.A.

1.3.1. Absorción.

El hecho de saber las características de absorción de un fármaco es muy útil para seleccionar la vía de administración (oral, parental, inhalatoria, etc) y forma farmacéutica adecuadas (cápsulas, comprimidos, soluciones); paralelamente, se debe tener en cuenta también los factores que pueden alterar la velocidad y la cantidad que se absorbe, en definitiva la cinética del fármaco.

Sea cual sea la vía de administración el fármaco tiene que disolverse en primer lugar para poder ser absorbido. Así por ejemplo, las formas sólidas, como los comprimidos, deben ser capaces de disolverse liberando el fármaco.

En este estudio, el paciente se administra el fármaco mediante vía oral. Las características de esta vía consisten en ser cómoda, barata y unipersonal. La absorción del fármaco por vía oral va a tener lugar en el estómago, concretamente en el duodeno, mediante difusión. En algunos casos puede llevarse a cabo transporte activo y filtración a través de los poros intercelulares.

1.3.2. Distribución.

Una vez producida la absorción del fármaco, éste debe alcanzar su lugar de acción; para ello, deberá atravesar diversas membranas hasta llegar a la circulación sistemática (la sangre) y de aquí pasar a los diferentes tejidos. Este paso de la sangre a los distintos tejidos va a depender de la fijación del fármaco a las proteínas presentes en el plasma. Otros factores de los cuales depende la distribución son la hidrofobia del fármaco, el pH o el volumen de distribución.

1.3.3. Metabolismo.

Los fármacos se van a metabolizar en el organismo humano a metabolitos que pueden ser activos o inactivos. Tanto la velocidad con la que se metabolizan, como la variedad de los metabolitos y su concentración, van a depender de la capacidad metabólica de cada individuo y de los factores fisiológicos, patológicos y iatrogénicos.

Cuando los fármacos ya han penetrado en el organismo, éstos van a ser transformados total o parcialmente en otras sustancias. Estas transformaciones son llevadas a cabo por las enzimas del hígado principalmente. Las enzimas responsables del metabolismo se pueden identificar según la fase de metabolización. Las reacciones involucradas en el proceso de metabolización de un fármaco tienen lugar en dos fases: una fase I o de funcionalización y una fase II o de conjugación. Esta biotransformación en los fármacos lo que facilita finalmente es su eliminación (fase III). Dichas transformaciones llevadas a cabo se ilustran en la **Figura 3**.

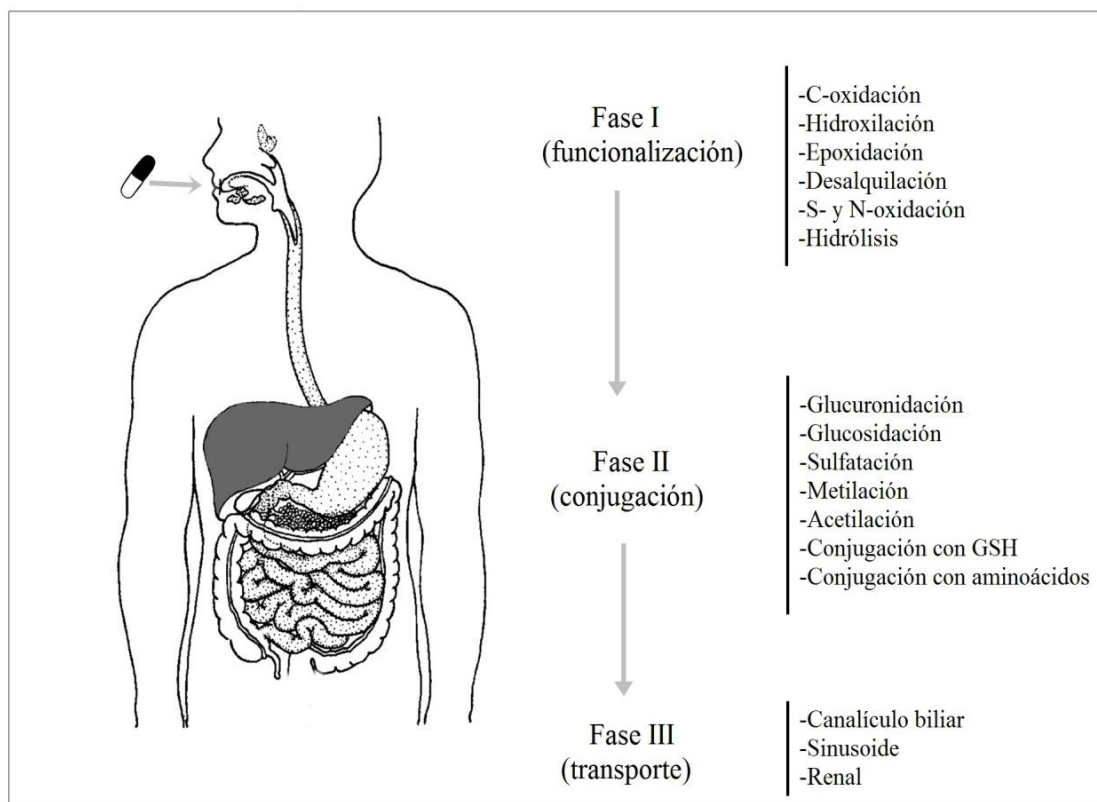


Figura 3: Etapas en la biotransformación de fármacos. Castell, J.V., *El metabolismo de fármacos, generación de metabolitos reactivos y su papel en el origen de las reacciones inmunológicas a fármacos*.

1.3.3.1. Reacciones de fase I.

El metabolismo llevado a cabo en la fase I se conoce como fase de funcionalización. Las reacciones involucradas en la fase I, consisten en: a) reacciones de oxidación, b) reacciones de reducción y c) reacciones de hidrólisis que rompen enlaces ésteres y de amidas, creándose así nuevos grupos funcionales. Estas reacciones van a producir un aumento de la polaridad del fármaco y determinan resultados con las siguientes posibilidades: 1ª La inactivación del fármaco, 2ª El paso de un producto inactivo a otro con actividad (profármaco), 3ª El paso de un producto activo a otro también activo con propiedades terapéuticas similares o distintas al producto de partida y 4ª El paso de un producto activo a otro activo pero con propiedades tóxicas.

En definitiva, en la fase I, se van a introducir grupos como hidroxilo ($-OH$), amino ($-NH_2$), ácido carboxílico ($-COOH$), que permiten después las reacciones de la fase II. A continuación, se exponen los distintos tipos de reacciones que tienen lugar en la fase I.

- a) *Reacciones de oxidación (Tabla 2)*. Son las más empleadas en la metabolización de fármacos debido a la gran variedad de reacciones oxidativas que se dan y al número de fármacos que las utilizan. Van a tener lugar en la fracción microsómica del hígado. Las enzimas que intervienen son las denominadas oxigenasas (**Tabla 1**).
- b) *Reacciones de reducción*. Son las más frecuentes después de las reacciones de oxidación. Se van a llevar a cabo en la fracción microsómica hepática, pero también en las bacterias intestinales, además de otros tejidos. Dichas reacciones están recogidas en la **Tabla 3**.
- c) *Reacciones de hidrólisis*. Estas reacciones son producidas por las enzimas hidrolasas que se encuentran distribuidas por el plasma y los tejidos. La riqueza en la distribución de algunas de estas enzimas influyen en la inactivación. Las reacciones más importantes son las que se describen en la **Tabla 3** junto con las de reducción.

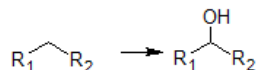
Enzimas	Reacciones
“Oxigenasas” de la fase I	
Citocromo P450 (P450 o CYP)	Oxidación de C y O, desalquilación, otras
Monooxigenasas con flavina (FMO)	Oxidación de N, S y P
Hidrolasas de epóxido (mEH, sEH)	Hidrólisis de epóxidos
“Transferasas” de la fase II	
Sulfotransferasas (SULT)	Adición de sulfato
Glucuronosiltransferasas de UDP (UGT)	Adición de ácido glucurónico
S-transferasas de glutatión (GST)	Adición de glutatión
N-acetiltransferasas (NAT)	Adición de un grupo acetilo
Metiltransferasas (MT)	Adición de un grupo metilo
Otras enzimas	
Deshidrogenasas de alcohol	Oxidación de alcoholes
Deshidrogenasas de aldehído	Oxidación de aldehídos
Oxidorreductasa de NADPH-quinona (NQO)	Reducción de quinonas

Tabla 1: Enzimas metabolizadoras de fármacos. Gonzalez, F.J. y Tukey, R.H., *Capítulo 3: Metabolismo de fármacos* en Las bases farmacológicas de la TERAPÉUTICA, 2006, Colombia, McGraw-Hill Companies.

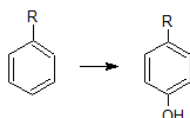
REACCIONES DE OXIDACIÓN

Oxidaciones microsómicas: con ayuda del citocromo P450

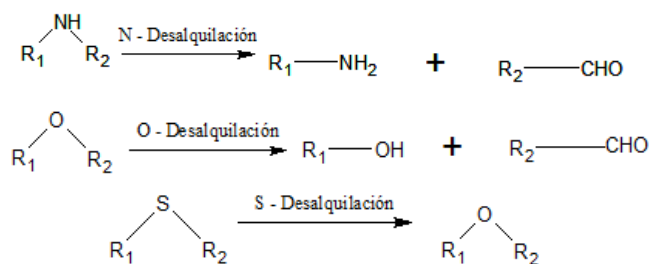
Hidroxilación alifática: formación de alcoholes.



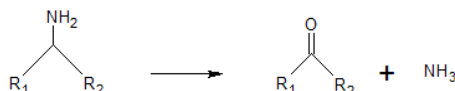
Hidroxilación aromática: formación de fenoles.



Desalquilación de grupos alquilo asociados a grupos N, O y S.



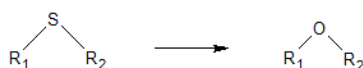
Desaminación: un grupo cetona sustituye a un grupo amino.



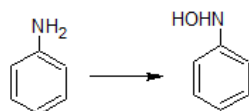
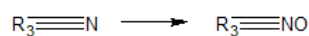
Sulfoxidación: introducción de oxígeno en un radical tioéter.



Desulfuración: sustitución del azufre del tioéter por un oxígeno.



Oxidación e hidroxilación de aminas.



Epoxidación: adición enzimática de un oxígeno a través de un doble enlace.

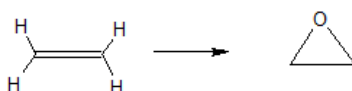
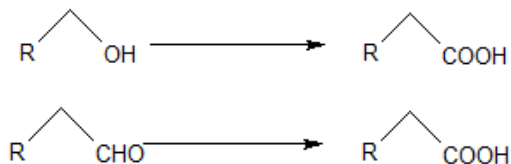


Tabla 2 (parte 1): Reacciones de oxidación de fase I. Del Arco, C., *Capítulo 5: Metabolismo de los fármacos* en Farmacología Humana, 1997, Barcelona, MASSON, S.A.

REACCIONES DE OXIDACIÓN

Oxidaciones no cromosómicas: con enzimas oxigenasas distintas del citocromo P450

Oxigenación de alcoholes y aldehídos: se emplean las enzimas alcoholdehidrogenasa y aldehídehidrogenasa.



Oxidación de purinas metiladas.

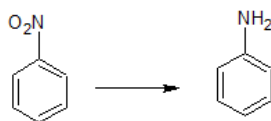
Desaminación con monoaminoxidasas (MAO).

Deshalogenación.

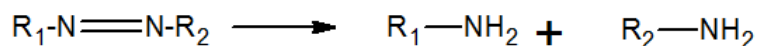
Tabla 2 (parte 2): Reacciones de oxidación de fase I. Del Arco, C., *Capítulo 5: Metabolismo de los fármacos* en Farmacología Humana, 1997, Barcelona, MASSON, S.A.

REACCIONES DE REDUCCIÓN

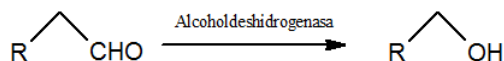
Nitrorreducción.



Azorreducción.



Reducción de aldehídos a alcoholes.



REACCIONES DE HIDRÓLISIS

Hidrólisis de ésteres producida por esterasas.

Hidrólisis de amidas producida por amidasas.

Hidrólisis de péptidos producida por peptidasas.

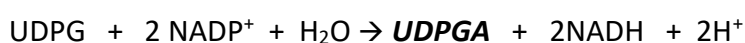
Tabla 3: Reacciones de reducción y de hidrólisis de fase I. Del Arco, C., *Capítulo 5: Metabolismo de los fármacos* en Farmacología Humana, 1997, Barcelona, MASSON, S.A.

1.3.3.2. Reacciones de fase II.

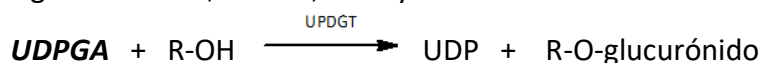
Las reacciones de fase II consisten en reacciones de conjugación y son debidas a las denominadas enzimas transferasas. A partir del metabolito obtenido de la fase I, el grupo funcional de éste se une covalentemente a un sustrato endógeno: ácido glucurónico, sulfato, glutatión, aminoácidos o acetato. Estos conjugados que se forman aumentan de tamaño y son fuertemente polares y, normalmente, inactivos facilitándose su eliminación.

Las principales reacciones de conjugación son las siguientes (**Tabla 4**):

- a) *Glucuronidación*. Es una de las reacciones más importantes de la fase II en el metabolismo de los fármacos y aumenta considerablemente el peso molecular del compuesto, favoreciendo así la excreción biliar. Es catalizada por las UDP-glucuronosiltransferasas (UDPGT). Estas enzimas se encuentran en los microsomas del hígado y catalizan la síntesis del ácido uridindifosfato glucurónico (UDPGA), síntesis llevada a cabo a partir de la glucosa y uridintrifosfato (UTP).



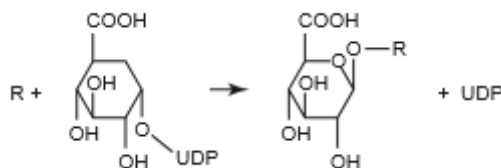
- b) El UDPGA, donador de ácido glucurónico, se combina con el fármaco o metabolito y con ayuda de las enzimas UDPGT dan el correspondiente glucurónido. El fármaco o metabolito deben presentar algunos de los grupos siguientes: -OH, -COOH, -NH₂ y -SH.



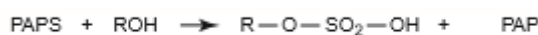
- c) *Sulfatación o conjugación con radicales fosfato*. Vía importante de biotransformación de grupos fenólicos y de grupos hidroxilo alifáticos, además de ciertos neurotransmisores, ácidos biliares e hidroxilaminas orgánicas. Las enzimas que participan son las denominadas sulfotransferasas (SULT). Se va a llevar a cabo en el hígado y requieren una activación previa del sulfato con ATP, obteniéndose así el 3'-fosfoadenosina5'-fosfosulfato (PAPS). Las sulfotransferasas (SULT) conjugan al sulfato derivado del 3'-fosfoadenosina5'-fosfosulfato (PAPS) con los grupos hidroxilo de los compuestos aromáticos y alifáticos
- d) *Acetilación*. Consiste en la incorporación de un acetilo a los radicales amino o carboxilo del fármaco debido a la influencia del CoA-SH.
- e) *Metilación*. Adición de un grupo metilo por acción de la enzima metiltransferasa (O-,N-,S-).
- f) *Conjugación con glutación*. Catalizada por la enzima glutathiontransferasa (GST). La enzima usa directamente el glutatión, GSH, formando tioéteres. Los conjugados van a ser eliminados directamente por la bilis, y en menor medida por la orina.

REACCIONES PRINCIPALES DE LA FASE II

Glucuronidación.



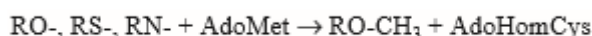
Sulfatación.



Acetilación.



Metilación.



Conjugación con glutatión.

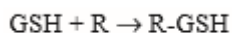


Tabla 4: Principales reacciones de conjugación. Frank J. Gonzalez y Robert H. Tukey, *Capítulo 3: Metabolismo de fármacos*, Goodman & Gilman Las bases Farmacológicas de la TERAPÉUTICA, 2007, México, McGRAW-HILLINTERAMERICANA EDITORE, S.A. de C.V.

1.3.4. Eliminación.

La actividad del fármaco en el organismo humano va a ir disminuyendo como consecuencia de la metabolización y la excreción. Las características en base a la eliminación de un fármaco son importantes a la hora de elegir el fármaco adecuado y el número de tomas, además de para valorar los factores que pueden alterar dicha eliminación.

Las principales vías de excreción de los fármacos son la vía renal y la biliar. La vía renal es la más importante, sobre todo en la eliminación del fármaco inalterado o sus metabolitos activos. Sin embargo, en aquellos casos donde la eliminación del fármaco se lleva a cabo principalmente por metabolismo, la vía renal pierde importancia y cobra relevancia la vía biliar, aunque si es cierto que parte de los metabolitos inactivos del proceso de metabolización se eliminan por el riñón.

1.5. Antiinflamatorios no esteroideos.

1.5.1. Definición, características principales y clasificación.

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) consisten en un grupo variado, químicamente heterogéneo, de fármacos con acción antiinflamatoria, analgésica y antipirética. Que se consideren no esteroideos se debe a su estructura química no esteroidea y al hecho de presentar menor cantidad de efectos secundarios.

Las principales características de los AINEs consisten en reducir los síntomas producidos por inflamación, dolor y la fiebre. En cuanto a su clasificación se detalla en la **tabla 5** indicando la categoría, el grupo farmacológico y el fármaco prototipo.

CATEGORÍA	GRUPO FARMACOLÓGICO	FÁRMACO PROTOTIPO
ÁCIDOS	→ Salicilatos	Ácido acetilsalicílico
	→ Enólicos:	
	Pirazononas	Metamizol
	Pirazolidindionas	Fenilbutazona
	Oxicams	Piroxicam y meloxicam
	→ Acético:	
	Indolacético	Indometacina
	Pirrolacético	Ketorolaco
	Fenilacético	Diclofenaco
	Piranoidoacético	Etodolaco
NO ÁCIDOS	→ Propiónico	Naproxeno, ibuprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno
	→ Antranílico	Ácido mefenámico
	→ Nicotínico	Clonixina
	→ Sulfoanilidas	Nimesulida
	→ Alcanonas	Nabumetona
	→ Paraaminofenoles	Paracetamol

Tabla 5 (parte 1): Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

Feria, M., *Capítulo 22: Fármacos analgésicos-antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos* en Farmacología Humana, 1997, Barcelona, MASSON, S.A

CATEGORÍA	GRUPO FARMACOLÓGICO	FÁRMACO PROTOTIPO
INHIBIDORES SELECTIVOS DE LA COX-2	→ COXIB	Celecoxib
		Parecoxib
		Lumiracoxib
		Etoricoxib
LIBERADORES DE ÓXIDO NÍTRICO	→ Nitroxibutilésteres	Flurbiprofeno
		Ketoprofeno
		Diclofenaco
		Nitroaspirina

Tabla 5 (parte 2): Clasificación de los antiinflamatorios no estereoides (AINEs).

1º Leza, J.C. y Lizasoain, I. *Capítulo 31: Fármacos antiinflamatorios no esteroideos y otros analgésicos-antipiréticos* en Farmacología básica y clínica, 2008, Madrid, Editorial Médica Panamericana, S.A.

2º Burke, Anne; Smyth, Emer M. y FitzGerald, G.A. *Capítulo 26: Agentes analgésicos-antipiréticos y antiinflamatorios* en Las bases farmacológicas de la TERAAPÉUTICA, 2006, Colombia, McGraw-Hill Companies.

1.5.2. Mecanismo general de acción.

El principal mecanismo de acción que presenta los antiinflamatorios no esteroideos es inhibir la actividad de la enzima ciclooxygenasa (COX) (**Figura 4**). Como resultado de esta inhibición se produce una disminución en la formación de prostaglandinas y tromboxanos que parten del ácido araquidónico. Este hecho convierte a los AINEs en los responsables de la mayoría de los efectos terapéuticos, entre otros.

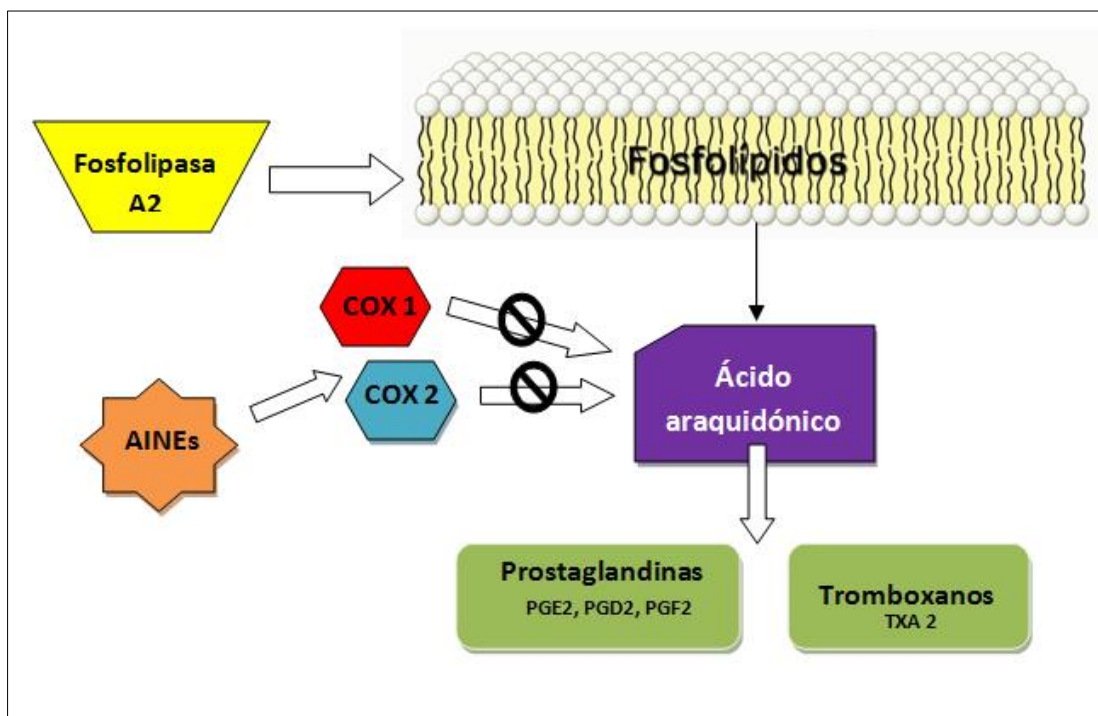


Figura 4: Esquema del mecanismo de acción de los AINEs sobre las isoformas de la enzima COX (García Mejide, J.A. et al, 2000).

Respecto a la enzima COX, se conocen dos formas de la enzima ciclooxygenasa: COX-1 y COX-2.

- La COX-1 es predominantemente una isoforma constitutiva presente en las células y tejidos. Su actividad consiste en la formación de prostaglandinas y tromboxanos para el control de las funciones fisiológicas.
- La COX-2, en cambio, presenta características propias de enzima inducible en determinadas células que están en circunstancias patológicas encontrándose en tejido dañado o inflamado.

Los AINEs conocidos no inhiben selectivamente la actividad enzimática de ambas isoformas de la COX. Uno de los problemas principales de los AINEs es su mayor inhibición en la COX-1 dando como consecuencia la aparición de efectos secundarios tanto a nivel gastrointestinal, renal como de coagulación. Como solución se plantea la obtención de AINEs específicos que inhiben selectivamente la COX-2.

1.5.3. Acciones farmacológicas.

Entre las acciones farmacológicas con interés terapéutico se pueden destacar principalmente:

- a) *Acción analgésica*: bloquea el impulso del dolor producida por la reducción de prostaglandinas y la inhibición en la síntesis de otras sustancias, como los eicosanoides, que sensibilizan los receptores responsables del dolor.
- b) *Acción antiinflamatoria*: sabiendo que la inflamación es una de las principales defensas fisiopatológicas del organismo ante agresiones (infección, lesión, etc), los AINEs inhiben la formación de prostaglandinas y tromboxanos interfiriendo en uno de los mecanismos iniciales de la inflamación.
- c) *Acción antitérmica*: otras de las respuestas de nuestro cuerpo ante una infección, inflamación, lesión, etc consiste en el aumento de la temperatura corporal. Este hecho es conocido también como fiebre y su función es alertar y poner en marcha el sistema inmune. Los AINEs van a actuar inhibiendo la síntesis de prostaglandinas que producen fiebre (PGE2, PGE1, PGE1 α).

1.5.4. Reacciones adversas.

Los efectos secundarios asociados al uso de estos AINEs se localizan principalmente a nivel gastrointestinal y renal o son debidos a fenómenos de hipersensibilidad (alergias) o reacciones hematológicas.

A nivel gastrointestinal, la mayoría de los AINEs son ácidos débiles con pH bajo. En esta situación, los AINEs son capaces de lesionar las células de la mucosa.

A nivel renal, los AINEs inhiben la formación de prostaglandinas renales responsables de diluir la orina. Como consecuencia de ello, se produce una retención de agua desencadenando también en una retención de iones sodio y potasio. Un uso excesivo de estos antiinflamatorios puede producir una nefropatía intersticial crónica desembocando en una necrosis papilar y en una insuficiencia renal crónica.

Reacciones relacionadas con fenómenos de hipersensibilidad van a aparecer entre el 1-2% de los pacientes bajo el tratamiento de los AINEs. En cuanto a reacciones hematológicas, la frecuencia con las que aparecen es baja, pero debido al amplio uso de los AINEs y a la gravedad de algunas de estas reacciones es importante tenerlas, también, en cuenta.

1.5. Características del fármaco objeto de estudio.

El fármaco objeto de estudio es el denominado Enantyum, disponible en diversas formas farmacéuticas como: inyección, comprimidos, sobres, bebible y cápsulas. La forma empleada en este trabajo consiste en comprimidos recubiertos ranurados de Enantyum de 25 mg, blancos y redondos, pudiéndose dividir en mitades iguales.

Está compuesto principalmente de Dexketoprofeno trometamol. El Dexketoprofeno se corresponde con la forma enantiomérica S-(+) del Ketoprofeno (ácido (R,S)-(±)-2-[3-(benzoil)fenil]- propiónico) (**Figura 5**). Del Ketoprofeno se podría decir que consiste en un compuesto racémico usado desde 1973 y es un potente inhibidor de la síntesis de prostaglandinas. Este efecto es exclusivamente debido al enantiómero (S)-(+), correspondiente al Dexketoprofeno, mientras que el (R)-(-) queda desprovisto de tal actividad (Barbanoj, M.J. et al, 2001).

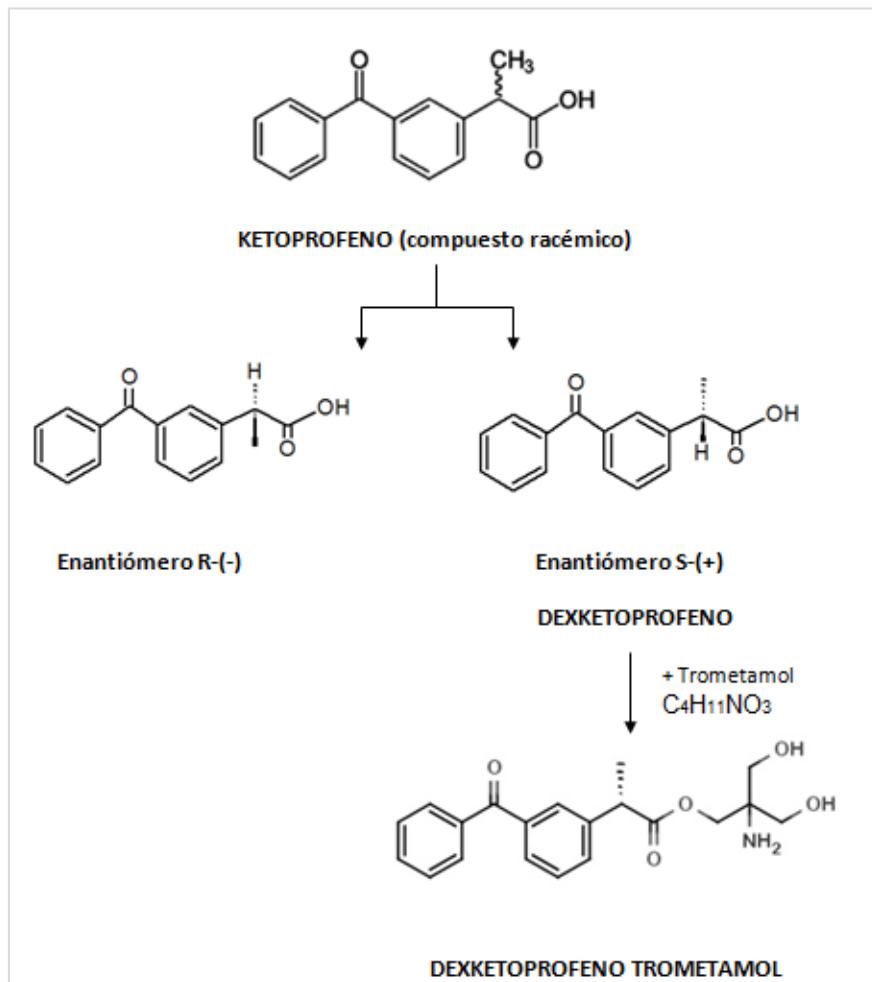


Figura 5: Estructura del Dexketoprofeno y del DexketoprofenoTrometamol.

Se trata de un antiinflamatorio no esteroideo derivado del ácido propiónico, además de un fármaco analgésico y antipirético. A diferencia de otros analgésicos, como paracetamol o ibuprofeno, el Enantyum se debe emplear en circunstancias más concretas, como por ejemplo: dolor musculoesquelético, dolor menstrual, odontología, dolor postoperatorio. Se emplea principalmente para el dolor musculoesquelético y dental. La ventaja del Enantyum es el hecho de mostrar una mayor rapidez de acción, aunque la duración analgésica del ibuprofeno sea más larga (de seis a ocho horas frente a cinco horas y media).

2. Antecedentes y justificación.

La farmacología clínica del Ketoprofeno racémico ha sido ampliamente investigada, sin embargo, son pocos los estudios dedicados a un análisis profundo de su metabolismo y la identificación de los metabolitos, como es el objetivo principal de este trabajo.

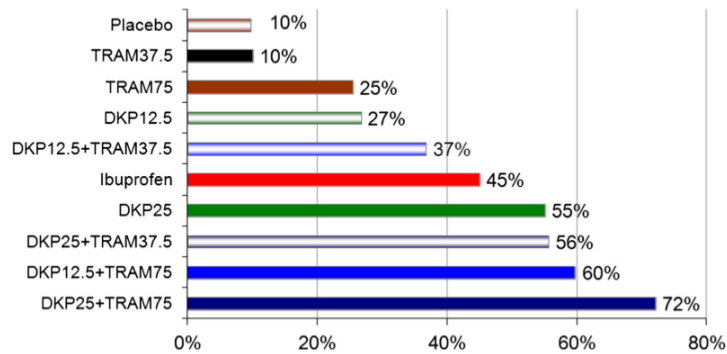
La mayoría de los estudios realizados se basan en comparar la eficacia analgésica que presenta el Dexketoprofeno al combinarse con otros compuestos.

Un primer estudio hallado (Andrew Moore, R. et al, 2015) consiste en la combinación del Dexketoprofeno Trometamol y del Clorhidrato de Tramadol el cual se prevé muy eficaz en el dolor agudo. El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia analgésica y la seguridad de cada combinación frente al placebo. El mayor porcentaje de respuesta fue detectada con el Dexketoprofeno Trometamol 25mg + Clorhidrato de Tramadol 75mg. La adición de Tramadol al Dexketoprofeno dio como resultado un mayor alivio en el umbral máximo del dolor con una duración superando incluso las 6 horas (8.1 horas de duración media) y sin dar problemas significativos (**Figura 6a y 6b**).

Otro estudio dedicado a dicha combinación aplicándose al dolor agudo después de la histerectomía abdominal, da evidencias también de obtener una mayor respuesta en comparación con el resto de componentes individualmente (**Figura 7**) (Andrew Moore, R. et al, 2016).

En un tercer estudio (Andrew Moore, R. y Barden, J., 2008) se lleva a cabo un análisis sistemático del Dexketoprofeno en el dolor agudo y crónico. Los eventos adversos no fueron mayores en comparación con otros analgésicos igualmente efectivos, a pesar de los limitados datos disponibles.

En un cuarto estudio se evaluó la eficacia analgésica tras la administración de Dexketoprofeno Trometamol 25mg comparado con Ibuprofeno 600mg ante el dolor somático agudo. Durante la primera hora tras la toma del analgésico, los pacientes presentaron menor dolor frente a los que estaban con Ibuprofeno. Se demuestra la mayor eficacia analgésica del Dexketoprofeno Trometamol en la primera hora tras la intervención quirúrgica oral, además de presentar mayor efecto antiinflamatorio. (Jiménez Martínez, E. et al, 2003). La eficacia analgésica que presenta el Dexketoprofeno Trometamol también se puede verificar en otro estudio sobre el control del dolor después de la cirugía ortopédica (Hanna, M.H. et al, 2003).



DKP12.5: Dexketoprofeno Trometamol 12.5mg
TRAM37.5: Tramadol 37.5mg

DKP25: Dexketoprofeno Trometamol 25mg
TRAM75: Tramadol 75mg

Figura 6a: Porcentaje de pacientes mostrando respuesta (Andrew Moore, R. et al, 2015).

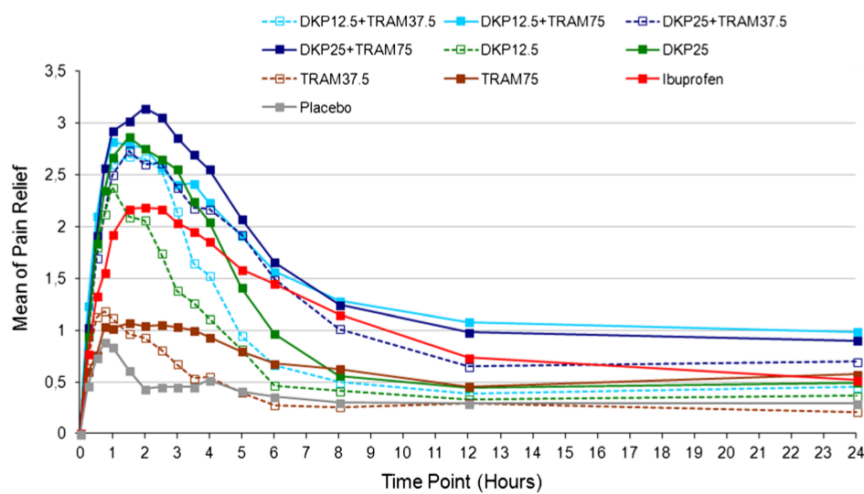
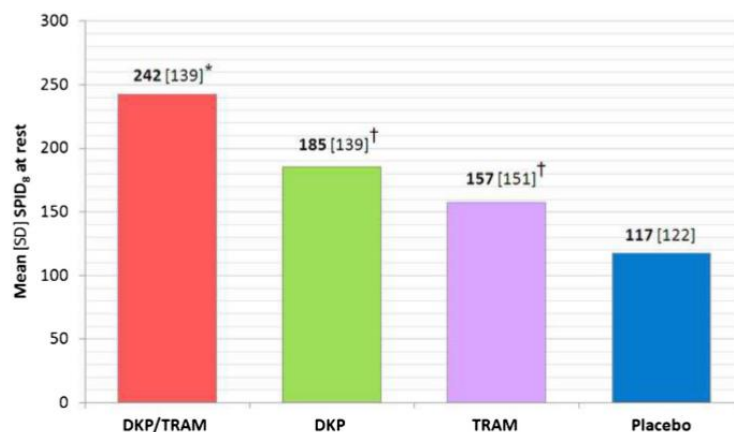


Figura 6b: Eficacia en el tiempo (0-24h), (Andrew Moore, R. et al, 2015).



DKP/TRAM: Dexketoprofeno Trometamol 25mg/ Clorhidrato de Tramadol 75mg. **DKP:** Dexketoprofeno Trometamol 25mg. **TRAM:** Clorhidrato de Tramadol 100mg. *: Estadísticamente significativa frente a DKP y TRAM. †: Estadísticamente significativa frente al placebo. SD: Desviación estándar.

Figura 7: SPID₈ media en reposo vs posibles combinaciones (Andrew Moore, R. et al, 2016).

2.1. Farmacocinética clínica del Dexketoprofeno.

Los métodos analíticos para cuantificar el Ketoprofeno racémico descritos en bibliografía consisten en el uso de HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) con detección UV-VIS, Cromatografía de Gases, Electroforesis Capilar y Espectrometría de Masas, donde se miden las concentraciones plasmáticas de los enantiómeros ($C_{máx}$) tras la administración del fármaco así como el tiempo de máxima concentración plasmática ($t_{máx}$). En cuanto a la preparación previa de la muestra, normalmente se logra mediante extracción líquido-líquido. Sin embargo, este tipo de extracción ha sido sustituida por la extracción en fase sólida, ya que se ahorra en disolvente, tiempo y proporciona una mejora en la calidad de medición (Barbanoj, M.J. et al, 2001).

El Dexketoprofeno Trometamol, suministrado como comprimido, es rápidamente absorbido con un tiempo máximo ($t_{máx}$) entre 0,25 y 0,75 horas; mientras, para el enantiómero (S)-(+) (libre de ácido) el tiempo máximo está entre 0,5 y 3 horas. El perfil de absorción se cambia cuando el Dexketoprofeno es ingerido con comida, donde se aumenta el tiempo máximo de absorción ($t_{máx}$) y se reduce la concentración máxima en el plasma ($C_{máx}$) (Barbanoj, M.J. et al, 2001).

El efecto que presenta la comida en la absorción varía según el tipo de fármaco. Dichos efectos recaen en el tiempo máximo de absorción ($t_{máx}$) y en la concentración máxima en el plasma ($C_{máx}$), no presentando diferencias en la biodisponibilidad. Para aquel fármaco con $t_{máx}$ en ayunas de menos de 4h, los alimentos normalmente van a retrasar su absorción, es decir, se produce un aumento en $t_{máx}$, del 250% o más, como es el caso del Bromfenaco, Etoricoxib, Ketoprofeno y Tenoxicam. En cuanto al efecto que presenta la comida en $C_{máx}$ recae en aquel fármaco con $t_{máx}$ en ayunas por debajo de 2h, donde se dan reducciones de hasta, aproximadamente, el 50% o más para el Bromfenaco, Dexketoprofeno, Diclofenaco, Indometacina, Paracetamol y Surprofeno (Andrew Moore, R. et al, 2015).

El Dexketoprofeno se va a encontrar fuertemente unido a las proteínas plasmáticas, concretamente la albúmina y va a eliminarse, mediante biotransformación, en metabolitos glucoconjugados inactivos.

Después de su administración, no se detecta en orina el R-(-)-Ketoprofeno, confirmándose la usencia de bioinversión del enantiómero S-(+) en humanos. El fármaco se elimina prácticamente sin sufrir cambios, excretándose solamente los metabolitos glucoconjugados por orina según Barbanoj, M.J et al, 2001.

Más del 80% del fármaco objeto de estudio es excretado en forma de glucurónido conjugado, siendo por lo tanto uno de los metabolitos el correspondiente al glucurónido del Dexketoprofeno (**Figura 8**). Los compuestos glucurónidos son muy solubles en agua y aparecen en la orina y la bilis.

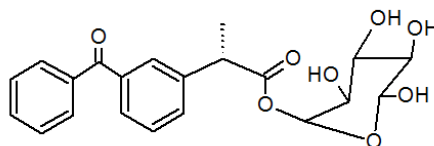


Figura 8: Glucurónido del Dexketoprofeno.

2.2. Metabolismo.

El Ketoprofeno racémico va a ser metabolizado en el hígado. Puede sufrir tres biotransformaciones diferentes:

- a) Conjugación con un acil-glucurónido, glucuronidación.
- b) Hidroxilación en el anillo aromático del grupo benzol.
- c) Inversión del (R)-(-) al enantiómero (S)-(+).

De entre las tres biotransformaciones, la glucuronidación va a ser la principal. La importancia de las otras biotransformaciones varía considerablemente según la especie, por ejemplo: se ha investigado que, en el caso de las ratas, tras la administración del Dexketoprofeno (correspondiente al enantiómero (S)-(+)) del Ketoprofeno) la biotransformación b) y c) se lleva a cabo, encontrándose una cantidad significativa de (R)-(-)-ketoprofeno en el plasma; en los seres humanos, estos dos últimos procesos no ocurren, y si lo hacen, es a largo plazo y no a una cantidad significativa (Barbanoj, M.J et al, 2001). En el caso de camellos y caballos, se han podido identificar metabolitos del Ketoprofeno formados por hidroxilación del anillo aromático, como el ácido 2-[3-(3-hidroxibenzoil)fenil] propanoico y así como el ácido 2-[3-(4-hidroxibenzoil)fenil] propanoico, y metabolitos por reducción del grupo cetona como el ácido 2-[3-(hidroxi(fenil)metil)fenil] propanoico (Skordi, E. et al, 2004).

Todos los AINEs derivados del ácido propiónico tienen la disposición, pero no la capacidad de pasar desde la configuración (R)-(-) a la (S)-(+) y va a depender de la especie (como ya se ha dicho anteriormente) y del fármaco: sólo el Ibuprofeno, Fenoprofeno y Benoxaprofeno experimentan una inversión metabólica importante en humanos. El mecanismo de esta biotransformación implica la formación de un tioéster de CoA y una posterior epimerización e hidrólisis generando el ácido libre. Los enantiómeros (R)-(-) se convierten en acil-CoAtioésteres, con ayuda de la acil-CoA sintetasa estereoselectiva microsomal o mitocondrial, a través de un intermedio de adenilato. Estos tioésteres son sustratos para la enzima epimerasa, resultando en una interconversión de la configuración del átomo de carbono α . La estereoselectividad total de la bioinversión se controla mediante la etapa de tioesterificación, que va a depender de cada especie. Normalmente, la acil-CoA sintetasa es específica para el enantiómero (R)-(-). Este proceso de inversión se va a llevar a cabo en el tracto gastrointestinal y el hígado (Barbanoj, M.J et al, 2001).

El Dexketoprofeno, administrado en humanos, se recupera en mayor parte en la forma inalterada (entre el 73,3 y el 81,9% de la dosis administrada) después de la hidrólisis del glucurónido en la orina durante las primeras 12 h, indicando el papel minoritario de dicha hidrólisis (Barbanoj, M.J et al, 2001).

2.3. Métodos empleados en la determinación de los metabolitos.

Se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica previa. El objetivo de dicha búsqueda ha sido familiarizarse con los metabolitos del Ketoprofeno que han sido encontrados precedentemente en diversas matrices de distintas especies (principalmente orina en humanos), así como familiarizarse en las respectivas técnicas analíticas empleadas y sus condiciones y el tratamiento de la muestra.

En la **tabla 6** se recogen las referencias donde se han podido encontrar ejemplos de métodos analíticos para la determinación de los metabolitos del fármaco en cuestión.

Tabla 6: Métodos empleados en la determinación de los metabolitos (parte 1).

Analitos	Matriz/especie	Técnica analítica	Petratamiento muestra	Tratamiento muestra	Condiciones análisis	Referencia
Ácido 2-(3-benzoilfenil)-propanoico Ácido 2-[3-(4-hidroxibenzoil)fenil]-propanoico Ácido 2-[3-(3-hidroxibenzoil)fenil]-propanoico Ácido 2-[3-(hidroxi(fenil)metil)fenil]-propanoico Conjugados del Ketoprofeno y metabolitos	Orina/humano	HPLC-UV Detección a 270 y 254nm HPLC-MS HPLC-RMN (600.22 MHz)	<i>Toma de muestra:</i> entre las 0-6h, en tres intervalos (0-2h, 2-4h y 4-6h). <i>Ajuste de pH a 2.5:</i> con 0.01M HCl. <i>Almacenamiento:</i> a -20°C	SPE: cartuchos C₁₈ con 10g de adsorbente Mega Bond-Elut Varian. I) <i>Acondicionamiento:</i> 40mL de metanol seguido de 40 mL de HCl 0.01M II) <i>Carga de la muestra:</i> 160 mL de orina. III) <i>Lavado:</i> 50 mL de HCl 0.01M IV) <i>Elución:</i> 40 mL mezcla metanol x%/HCl 0.01M (1º x: 20%, 2º x: 30%, 3º x: 40%, 4º x: 50%, 5º x: 60%, 6º x: 80%). V) <i>Evaporación:</i> rotavapor a temperatura ambiente VI) <i>Reconstitución:</i> eluato reconstituido en 0.5mL de agua.	Cromatografía analítica. a) Columna Genesis BDS (250 x 4.6mm i.d., 4µm). b) Temperatura: 26°C. c) Fase móvil isocrática: A: ACN. B: Formiato de amonio 25mM (pH 5.0). Cromatografía preparativa. a) Columna Spherisorb ODS-2 (250 x 10mm i.d., 5µm). b) Temperatura: 26°C c) Fase móvil isocrática con gradiente de elución : A: ACN. B: Formiato de amonio 25Mm, pH 5.	Skordi, E. et al, 2004

Tabla 6: Métodos empleados en la determinación de los metabolitos (parte 2).

Analitos	Matriz/especie	Técnica analítica	Pretratamiento muestra	Tratamiento muestra	Condiciones análisis	Referencia
Ácido 2 -(3-benzoilfenil)-propanoico Metan - [3-etilfenil(fenil)]-ona Metan - [3-hidroxifenil(fenil)]-ona Ácido - [3-hidroxifenil(oxo)]-acético	Cepa de bacteria biodegradable y de microalga	HPLC-UV Detección a 257nm UHPLC-ESI(-)-MS/MS QTRAP Triple cuadrupolo	Bacteria. I) <i>Aislamiento</i>: Ketoprofeno de 0.25 a 16mM como única fuente de carbono. II) <i>Enriquecimiento</i>: 2000mg NaHCO₃ L⁻¹. III) <i>Mantenimiento</i>: a 30 ± 2°C agitando a 150rpm. Alga. I) <i>Aislamiento</i>: Ketoprofeno de 0.25 a 16mM como única fuente de carbono. II) <i>Mantenimiento</i>: en condiciones de iluminación (4000-5000 lx) a 30 ± 2°C agitando a 150rpm durante 14 días. III) <i>Enriquecimiento</i>: 2000mg NaHCO₃ L⁻¹. IV) <i>Mantenimiento</i>: en condiciones de iluminación (4000-5000 lx) a 30 ± 2°C agitando a 150rpm durante 21 días.	Caracterización morfológica y molecular empleando dos cebadores universales.	a) Columna XDB-C18 Agilent Eclipse. b) Fase móvil isocrática (3:2 v/v): A: ACN. B: Tampón de fosfato de potasio 50mM, pH 4.	Maha, Ismail M. et al, 2016

Tabla 6: Métodos empleados en la determinación de los metabolitos (parte 3).

Analitos	Matriz/especie	Técnica analítica	Pretratamiento muestra	Tratamiento muestra	Condiciones análisis	Referencia
Enantiómeros del Ketoprofeno : (S)-(+) y (R)- (-)	Orina/humano	HPLC-UV Detección a 254nm	Seis muestras de 0.5mL de orina con concentraciones crecientes de KT (200, 500, 1000, 2000, 5000 y 10000 ng/mL) y 100µL de ácido sulfúrico 0.6M	Extracción L-L. 1º Adición de 4 ml de 2,2,4-trimetilpentano-isopropanol (95: 5,v/v). 2ºAgitación 10s y centrifugación 3min. -Fase orgánica: transferir a tubos limpios y añadir 3mL de agua. -Fase acuosa: desechar. 3ºAgitación 10s y centrifugación 3min. -Fase orgánica: desechar. -Fase acuosa: 200 µL ác.sulfúrico 0.6M y 3 mL cloroformo. 3ºAgitación 10s y centrifugación 3min. -Fase orgánica: evaporar hasta sequedad. -Fase acuosa: desechar.	a) Columna quirál 250 x 4.6 mm b)Fase móvil isocrática (80:19.9:0.1, v/v/v): A: Hexano. B: Isopropanol. C: Ác. trifluoroacético	Carr, R.A. et al, 1995

Tabla 6: Métodos empleados en la determinación de los metabolitos (parte 4).

Analitos	Matriz/especie	Técnica analítica	Pretratamiento muestra	Tratamiento muestra	Condiciones análisis	Referencia
Glucurónidos de los enantiómeros del Ketoprofeno: (S)-(+ y (R)-(-)	Orina/humano	HPLC-UV Detección a 254nm	<i>Toma de muestra:</i> hasta las 8h después de ingesta. <i>Ajuste de pH a 3.0:</i> con ác. acético glacial <i>Almacenamiento:</i> a -20°C.	SPE: cartuchos C ₁₈ Sep-Pak. I) <i>Acondicionamiento:</i> 1 ml de metanol, 1 ml de ácido trifluoroacético 10 mM hasta pH 3.0. II) <i>Carga de la muestra:</i> 10mL III) <i>Lavado:</i> con 3 ml de ácido trifluoroacético 10 mM. IV) <i>Elución:</i> con 3 ml de acetonitrilo: ác. trifluoroacético 10 mM (80:20, v/v). V) <i>Evaporación:</i> rotavapor.	HPLC a) Columna: C ₁₈ 5µm (25 cm x 10 mm). b) Fase móvil isocrática (30:70 v/v): A:ACN B: Tampón de fosfato de potasio 50mM (pH 3.0) c) Flujo: 3 mL/min HPLC a) Columna: C ₁₈ ODS (25 cm x 4.6 mm). b) Temperatura: 40°C c) Fase móvil (35:65 v/v): A:ACN B: Ác. acético al 02% d) Flujo: 0.7 mL/min	Grubb, N.G. et al, 1996
	Orina/camello	HPLC-UV Detección a 255nm HPLC-RMN (400 MHz) CG-MS	<i>Toma de muestra:</i> 6h después de la administración. <i>Ajuste de pH a 12.0:</i> con NaOH 2.5M <i>Almacenamiento:</i> a -20°C, liofilizadas durante siete días.	1º Disolver 24 g de muestra de orina liofilizada en 200 ml de agua destilada. 2º pH a 5 con ác. acético. 3º Adición 20000 unid. de β-glucuronidasa. 4º Incubación, 3h a 50°C. 5º pH a 3 con HCl 2M. 6º Extracción (x3) con 200mL de diclorometano. 7º Centrifugación 10 min. 8º Concentración del disolvente en rotavapor a 40°C.	CG-MS a) Columna DP-5MS (30m x 0.25mm). b) Temperatura: Incial: 90°C 1º Programa: 15 °C/min hasta 280° C (6 min). 2º Programa: 10 °C/min hasta 300° C (5 min). c) Flujo: 1mL/min.	Alkatheeri ,N.A. et al, 1998

3. Objetivos.

Como objetivos principales en este trabajo se destaca:

1. Desarrollar y validar un método analítico para el análisis del Dexketoprofeno presente en orina humana mediante HPLC-MS de alta resolución.
2. Llevar a cabo el estudio correspondiente al proceso de eliminación del fármaco objeto de estudio a través de la orina aplicando el método de análisis desarrollado y validado ya previamente.
3. Identificar los metabolitos del Dexketoprofeno Trometamol en orina humana después de sus dosis suministrada por vía oral.

4. Experimental.

4.1. Reactivos y material.

Como reactivos en la parte experimental se emplearon:

- Acetato amónico Sigma Aldrich.
- Ácido acético Sigma Aldrich.
- Agua Mili-Q (18,2 M Ω .cm a 25°C).
- Metanol (Sigma Aldrich) para la preparación de la disolución madre de Ketoprofeno y disolución MeOH:H₂O en proporción 10:90.
- Patrón de Ketoprofeno-(+)-(S) de calidad analítica Sigma Aldrich.

La disolución madre y el Buffer (disolución tampón de ácido acético/acetato amónico 100Mm, pH: 2,85) se almacenaron en el frigorífico a 4°C y la disolución de Ketoprofeno-(+)-(S) se almacenó en el congelador a una temperatura de -20°C.

En cuanto al material empleado:

- Agitador magnético, RCT Estándar, Ika a 210 rpm.
- Agitador Vortex-Genie 2
- Balanza analítica, SARTORIUS.
- Cartucho para SPE, HLB, OASIS con 200mg de adsorbente.
- Frascos de vidrio opaco de 250 mL .
- Filtros de membrana de 0,45 μ m, NY.
- Matraz aforado, 100ml y 250ml, PATRON, IN 20°C.
- Matraz aforado, 25ml, MBL ENGLAND, IN 20°C, ISO: 1042.
- Peachímetro, pHmeter GLP21, CRISON.
- Turbo Vap LV, Concentration Workstation, Caliber Life Science.
- Tubo de ensayo de 15ml.
- Viales, Agilent 1,5ml con tapón de 9mm+septum Sil/PTFE PK1000u.

4.2. Preparación de los calibrados.

Se hizo un calibrado externo, también llamado calibrado en disolvente o calibrado en patrones y un calibrado por adición de patrón/calibrado en matriz.

Para el calibrado externo se prepararon disoluciones de concentración 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001ppm en viales, a partir de la disolución madre de Ketoprofeno-(+)-(S) empleando como disolvente metanol:agua (10:90 v/v).

Para el calibrado por adición de patrón se prepararon patrones de 10ppm, 1ppm, 0.1ppm, 0.01ppm y 0.001ppm. Se utilizó un blanco de muestra de orina a la que previamente se le hizo una extracción en fase sólida (**punto 4.3**) y, a parte, se preparó una disolución de 10ppm partiendo de la disolución madre. A partir de la disolución de 10ppm se hicieron el resto de patrones empleando como disolvente la muestra de orina sin analito.

4.3. Recogida de la muestra.

Se siguieron las Directrices de la Comisión de Ética de la Universidad de Jaén (ANEXO). Se administró por vía oral 25mg de comprimido recubierto ranurado de Enantyum. Las muestras de orina se recogieron durante 48 horas tras su ingesta (13 muestras en total). Previamente, se obtuvo una muestra de orina antes de la ingesta de Enantyum para su uso como blanco.

4.4. Preparación y tratamiento de la muestra.

Para la preparación y el tratamiento de la muestra se llevó a cabo una extracción en fase sólida (SPE). Las etapas son las siguientes (**Figura 9**):

- i. **Acondicionamiento:** El cartucho fue acondicionado dos veces con 3ml de metanol en primer lugar, seguido de dos veces con 3ml de agua y por último dos veces con 3ml de disolución tampón o Buffer. En los tres casos, el flujo empleado es de 3ml/min.
- ii. **Carga de la muestra:** Se hizo pasar una mezcla de 3ml de muestra de orina con 3ml de disolución tampón con un flujo de 2ml/min. La muestra de orina fue previamente filtrada en un filtro de membrana de nylon 0.45µm para la eliminación de los sedimentos presentes.
- iii. **Lavado:** Con el objetivo de eliminar interferentes se emplearon 3ml de agua Mili-Q.
- iv. **Elución:** Los analitos que se han retenido en el cartucho se eluyeron empleando dos veces un volumen de metanol de 3ml a 1ml/min. El eluato, extracto, se recogió en un tubo de ensayo de 15ml.
- v. **Evaporación:** El extracto obtenido se llevó a evaporación en un baño de agua a 35°C empleando una corriente de nitrógeno. Se esperó aproximadamente 1h y 30 minutos hasta sequedad.

- vi. **Reconstitución:** Una vez seco el extracto se reconstituyó en 100µL de metanol, agitando después en el Vortex. Después, se añadió 900µL de agua Mili-Q teniendo así un volumen final de 1ml.
- vii. **Filtración:** Se filtró el volumen de muestra obtenido empleando un filtro de membrana de nylon de 0.45µm y se trasvasó a un vial. El análisis no se llevó a cabo de forma inmediata de manera que se conservó en frío a 4°C.

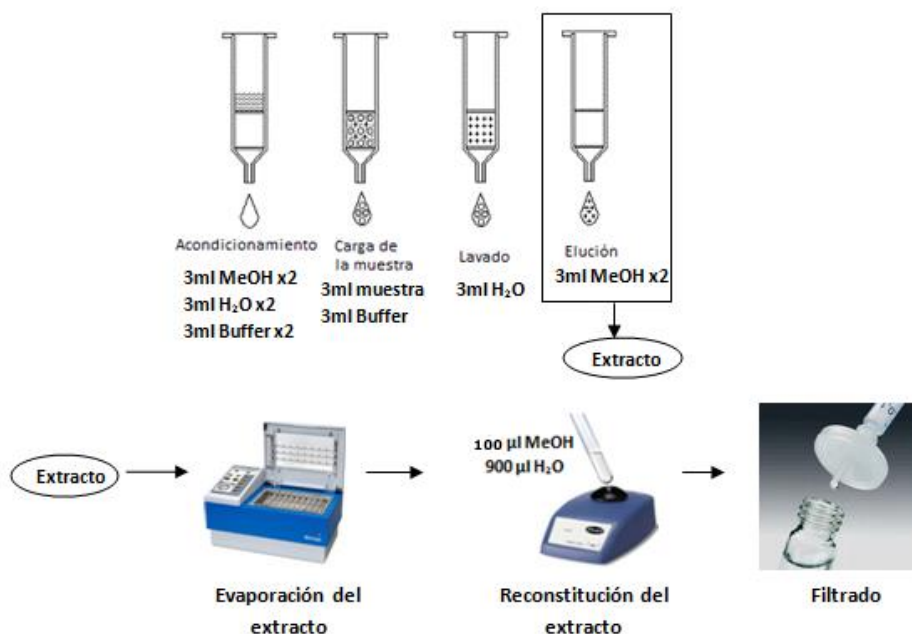


Figura 9: Etapas de la preparación y tratamiento de la muestra.

4.5. Instrumentación.

Los analitos de los extractos de orina obtenidos se separaron utilizando un sistema cromatográfico de líquidos, HPLC (Agilent Series 1290 INFINITY, Agilent Technologies) equipado con una columna analítica de fase reversa C₁₈ (RRHD) de características: 3mm x 100mm y 1.8µm de tamaño de partícula. En cuanto al gradiente de elución, se empleó fases móviles A y B compuestas de agua Mili-Q y acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (**Tabla 7**).

Mediante HPLC se pueden separar macromoléculas y especies no volátiles y hacer mediciones en cuestión de minutos. Uno de los campos de aplicación del HPLC está dedicado a la industria farmacéutica (Gary D. Christian, Química Analítica, 6ª Edición, 2009, McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S. A.).

Tiempo (min)	%B
0	10
3	10
5	25
30	50
33	100
38	100

Tabla 7: Gradientes de elución empleado.

Respecto a la instrumentación se utilizó el sistema HPLC conectado a un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo (TOF) (Agilent 6220 TOF, Agilent Technologies) equipado con una interfase de electrospray (ESI) operando en modo de ionización negativo. La espectrometría de masas en HPLC es una poderosa herramienta de detección de masas siendo sensible y selectiva en la caracterización de muestras complejas. Las condiciones de la fuente ESI consisten en:

- Caudal de gas de secado de 9 mL/min.
- Presión del gas de nebulización de 40 psi.
- Rango de masas m/z comprendido entre 50 y 1000.
- Temperatura del gas de secado de 325° C.
- Voltaje capilar 4000V.
- Voltaje del octapolo 250V.
- Voltaje de fragmentación 160V.

En este trabajo cabe destacar el empleo del analizador TOF. En un analizador TOF la muestra es vaporizada y sometida durante un período corto de tiempo, aproximadamente 1 μ s, a un pulso de extracción teniendo lugar la ionización. Seguidamente, se aplica un potencial de aceleración durante aproximadamente 100 ns (tiempo menor con respecto al utilizado en la ionización). De esta manera, todos los iones de la muestra de distinto rango de masas m/z son acelerados al mismo tiempo y, acto seguido, entran en una zona libre de campo moviéndose a velocidad constante hasta que alcanzan el detector (Jürgen H. Gross, Mass Spectrometry, 2004, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.). Las principales ventajas de los analizadores TOF que justifican su empleo son:

- i) Permite trabajar a un rango masas m/z grande.
- ii) Se obtiene un espectro de masas completo.
- iii) Transmisión muy alta dando lugar a una alta sensibilidad.
- iv) El montaje es relativamente sencillo y económico.
- v) Permite realizar mediciones exactas de las masas.

Todas estas ventajas hacen que el acoplamiento HPLC-TOF-MS sea ideal para la identificación de compuestos desconocidos como metabolitos del Ketoprofeno. Dichos metabolitos pueden ser identificados a través de su masa exacta con un error muy bajo en ppm y en una sola medida.

4.6. Optimización del método.

Se llevó a cabo la optimización de la separación por cromatografía de líquidos del Dexketoprofeno y sus respectivos metabolitos. Para ello, se partió del método de análisis de 38 minutos en las condiciones cromatográficas descritas en la **Tabla 7** del apartado anterior y se inyectó patrones de Ketoprofeno de 10 mg/L. De esta manera, todos los compuestos a estudiar pueden ser eluidos en un período de tiempo apropiado quedando mejor separados.

La fuente de ionización empleada fue por Electrospray operando tanto en modo ión positivo (**Figura 10 (a)**) como en modo ión negativo (**Figura 10 (b)**) con el objetivo de comparar y seleccionar el idóneo. Para la ionización en modo positivo se empleó un voltaje de fragmentación de 190 V, en modo negativo, se aplicó 170 V. Como modo de adquisición se utilizó el modo Scan para tener una información total del contenido de la muestra a analizar.

En la **Figura 10** se puede observar como en modo negativo la relación S/N es mucho mejor.

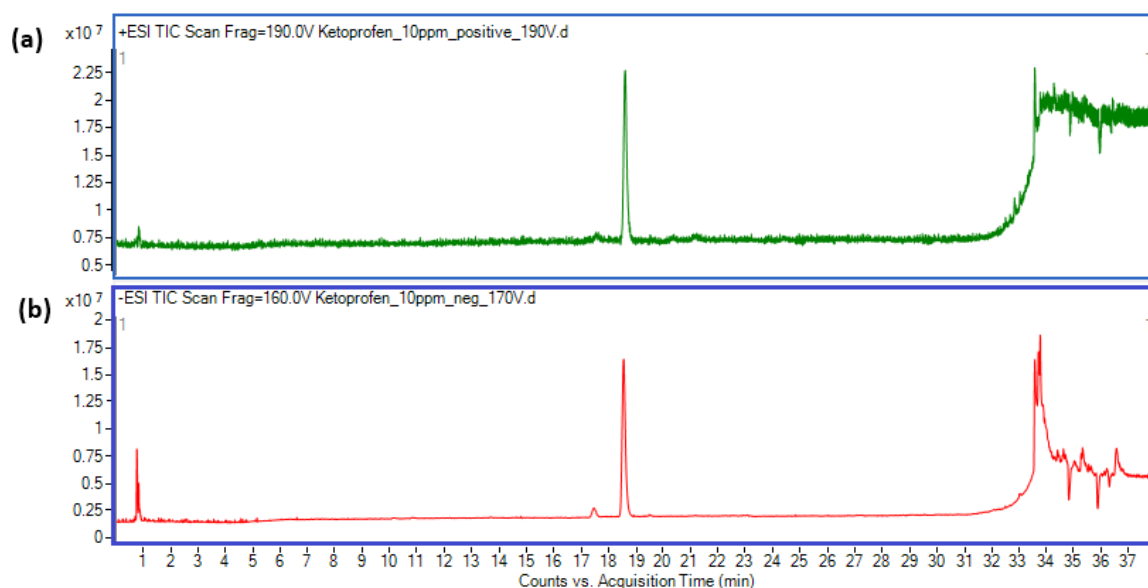


Figura 10: Total Ion Chromatogram (TIC) obtenidos de la muestra de orina para el método de análisis de 38 minutos tanto en modo positivo (a) como negativo (b).

4.7. Validación del método.

Para la validación del método analítico se empleó el calibrado en patrones y el calibrado en presencia de matriz y se estudiaron los siguientes parámetros: m/z teórica, tiempo de retención (t_R), el límite de detección (LOD), el límite de cuantificación (LOQ), el intervalo de linealidad, el efecto matriz y el coeficiente de correlación para el Ketoprofeno ($m/z=255,1016$) y uno de sus fragmentos mayoritarios ($m/z=209,0987$) (**Tabla 8**).

Para la determinación del LOD y LOQ los patrones correspondientes al calibrado en matriz siguiendo el criterio 3σ y 10σ respectivamente. El efecto matriz se evalúa con el cociente entre la pendiente de la recta de calibrado en patrones y la pendiente de la recta de calibrado en matriz.

m/z teórica	t _R (min)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Efecto matriz	R ²
255,1016	25,34	0,0008	0,0027	0,77 (-23%)	1
209,0987	25,34	0,008	0,027	0,80 (-20%)	0,999

Tabla 8: Parámetros estudiados para la validación del método analítico.

Se llevó a cabo también un estudio comparativo de ionización en modo positivo a voltaje de fragmentación de 190V y de ionización en modo negativo a voltaje de fragmentación de 170V en modo *Centroid* y *Profile* respectivamente (**Tabla 9**). Dichos parámetros fueron estudiados a partir del calibrado en disolvente y el calibrado en matriz (**Punto 4.1**).

Para el estudio comparativo del análisis en modo *Centroid* y *Profile* se prepararon patrones de Dexketoprofeno a concentraciones de 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 mg/L en metanol:agua (10:90 v/v), se analizaron y se representó la calibración.

Estudio comparativo del análisis		
Método positivo 190V para masa experimental 255,1028		
	Centroid	Profile
Pendiente	1,00E+06	5,00E+06
R ²	1	0,9998
Método negativo 170V para masa experimental 253.087		
	Centroid	Profile
Pendiente	1,52E+05	6.40E+05
R ²	0,9993	0,9991
Método negativo 170V para masa experimental 209.0987		
	Centroid	Profile
Pendiente	8,51E+05	3,00E+06
R ²	0,9993	0,999

Tabla 9: Estudio comparativo del análisis en modo *Centroid* y *Profile*.

Como se puede observar en la Tabla 9, para el modo negativo hay dos calibrados correspondientes a sus respectivos fragmentos según su masa experimental, siendo mayoritario el fragmento del Dexketoprofeno para una masa experimental de 209.0987 (mayor pendiente). También se observa cómo la pendiente es mayor en el modo *Profile*, siendo menor el error.

La masa experimental de 255,1028 se corresponde con el Dexketoprofeno protonado ($C_{16}H_{14}O_3$). El Dexketoprofeno con una pérdida de hidrógeno del grupo carboxílico ($C_{16}H_{13}O_3$) es el correspondiente a la masa experimental de 253,0870 y la masa experimental de 209,0987 es debida al Dexketoprofeno descarboxilado (**Figura 11**).

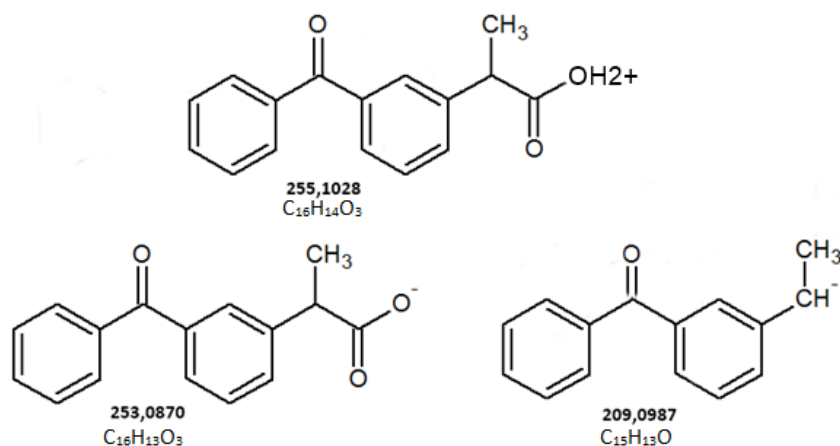


Figura 11: Estructura del compuesto para las respectivas masas experimentales.

5. Resultados y discusión.

5.1. Estudio de eliminación del Dexketoprofeno.

El estudio de excreción por vía renal del Dexketoprofeno se llevó a cabo siguiendo la cantidad del fármaco (mg) en función del tiempo (h). Para ello, se emplearon las áreas obtenidas del cromatograma en modo positivo y negativo correspondiente a las respectivas muestras de orina. Se seleccionó el modo de ionización negativo al ser más selectivo y dar mayor sensibilidad, según está descrito en el **punto 4.5**.

Tal y como se puede observar en la **Figura 12**, se alcanza el máximo en las primeras 2 horas. Este resultado es contrastable por otros autores (Barbanoj, M.J. et al, 2001) donde el enantiómero (S)-(+), correspondiente al Dexketoprofeno, presenta un tiempo máximo entre 0,5 y 3 horas.

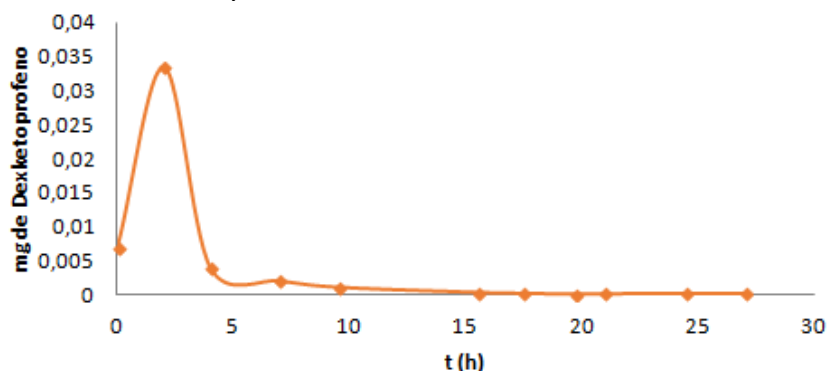


Figura 12: Representación mg de Dexketoprofeno excretado vs tiempo.

5.2. Identificación y cuantificación de los respectivos metabolitos empleando HPLC-TOF-MS.

Para la búsqueda y la identificación de los metabolitos en cada una de las muestras se empleó el software *Agilent MassHunter Workstation-Qualitative Analysis*.

Los pasos seguidos son los siguientes detallados a continuación:

1. Previo análisis de las muestras y, a continuación, la obtención del cromatograma total de iones (TIC).
2. Cálculo de la m/z teórica del ion $[M-H]^-$. Para ello, se calcula la masa exacta a partir de la fórmula molecular del analito y, a este valor, se le resta después el correspondiente a la masa del protón.
3. A partir de la m/z teórica del ion $[M-H]^-$ se obtiene el cromatograma de iones extraído (EIC), mediante la opción "Extract Ion Chromatogram". Se selecciona una tolerancia de masa de ± 20 ppm. Una vez obtenido se integra para obtener el tiempo de retención de cada pico.
4. Obtención del espectro de masas del pico cromatográfico del analito correspondiente con el objetivo de estudiar su fragmentación con la opción "Extract Peak Spectrum".
5. Cálculo del error en la medida de la masa exacta. El resultado debe ser ≤ 5 ppm. La fórmula a emplear para dicho cálculo es la siguiente:

$$\text{Error (ppm)} = \frac{m/z [M-H]^- \text{ experimental} - m/z [M-H]^- \text{ teórico}}{m/z [M-H]^- \text{ teórico}} \cdot 10^6$$

En la **Figura 13 A** (Maha, M.I. et al, 2016) y **B** (Skordi, I.D. et al, 2004), se puede observar los metabolitos que pueden originarse tanto por fragmentación (**Figura 13 A**) como por adición de grupo (**Figura 13 B**), correspondientes al Ketoprofeno, que pueden estar presentes en las respectivas muestras y que servirán como guía para la recopilación de los datos espectrométricos correspondientes de la **Tabla 10**.

En la **Tabla 10** están recogidos los datos que son necesarios tanto para la identificación como para la confirmación del Ketoprofeno y sus respectivos metabolitos en orina humana. Se han representado en dicha tabla los compuestos con un error en la medida de la masa exacta inferior a ± 5 ppm.

Se empleó una muestra en blanco y patrones. En la muestra en blanco no se detectó el analito en cuestión ni sus metabolitos y se empleó para el estudio del efecto matriz (como ya está descrito anteriormente). El primer compuesto identificado fue el Dexketoprofeno, cuyo tiempo de retención (25,34 min) se conoció empleando un patrón de 10mg/L y extrayendo el EIC del TIC para m/z 253,087. Se confirmó extrayendo el cromatograma para m/z experimental 253,087 en una muestra de orina después de 2 horas de la administración del Enantyum (**Figura 14 A y B**).

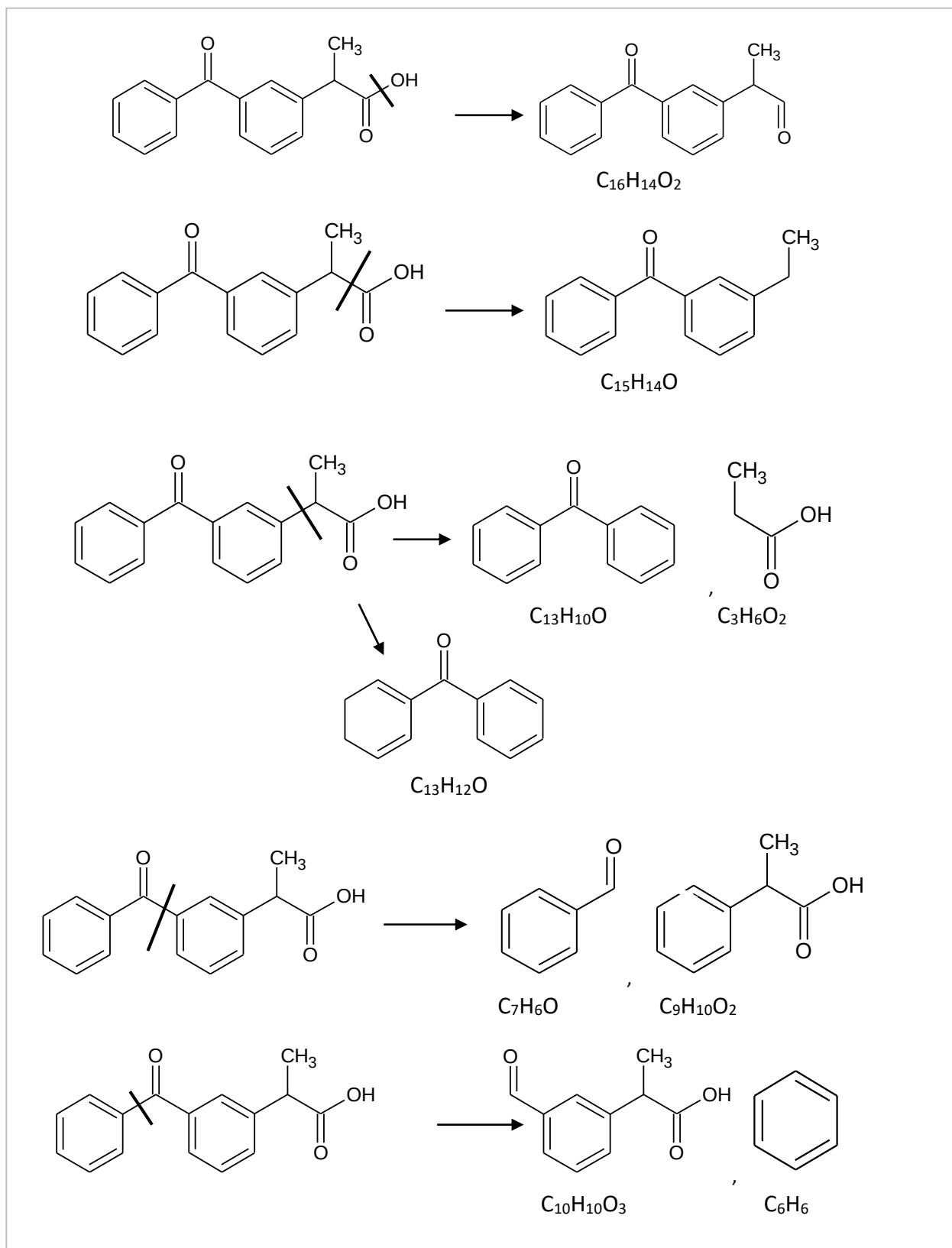
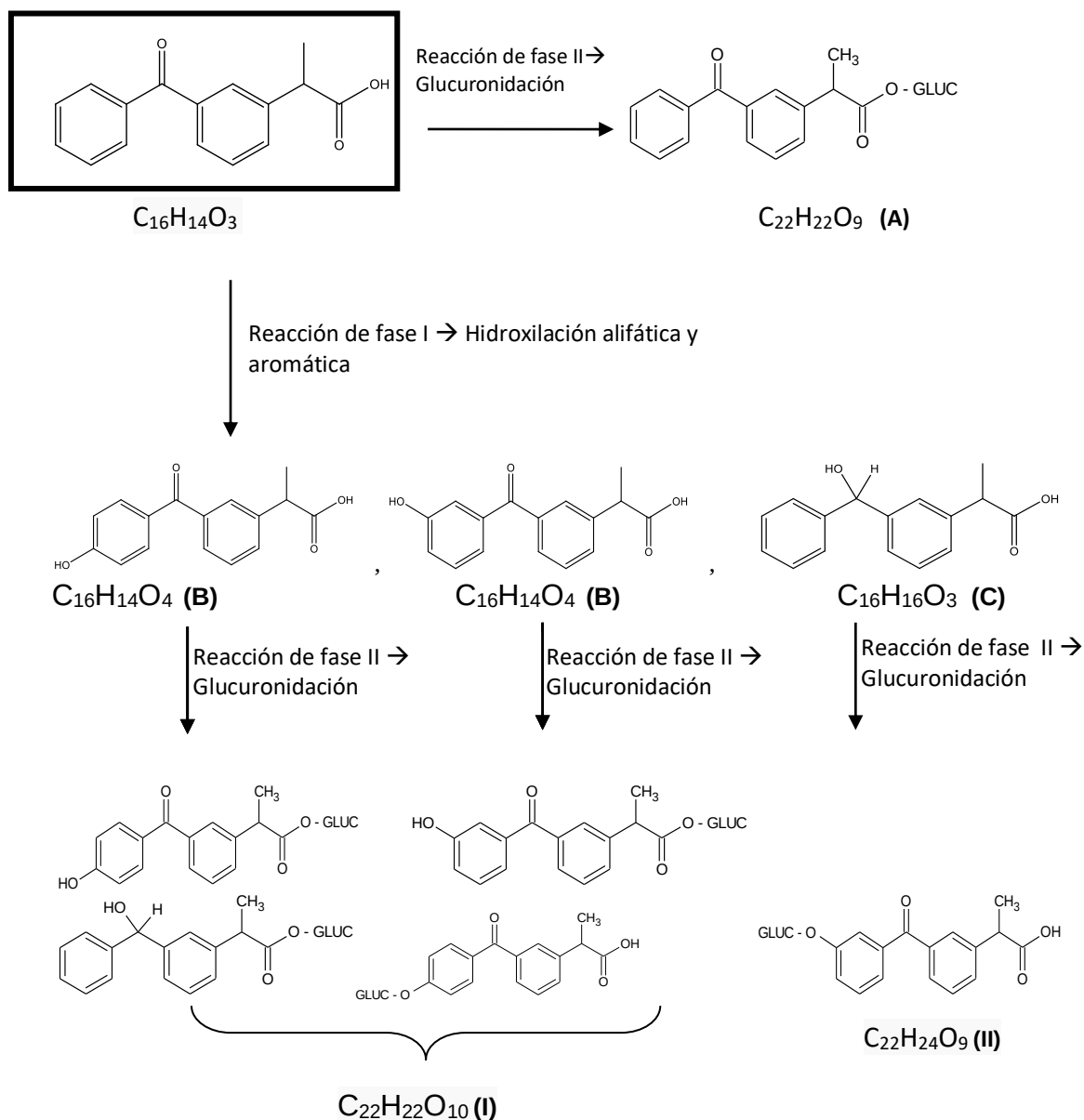


Figura 13 A: Metabolitos por fragmentación.



(A): Derivado glucurónido del Ketoprofeno.

(B), (C): Derivados hidroxilados del Ketoprofeno.

(I), (II): Derivados glucurónidos del hidroxiketoprofeno.

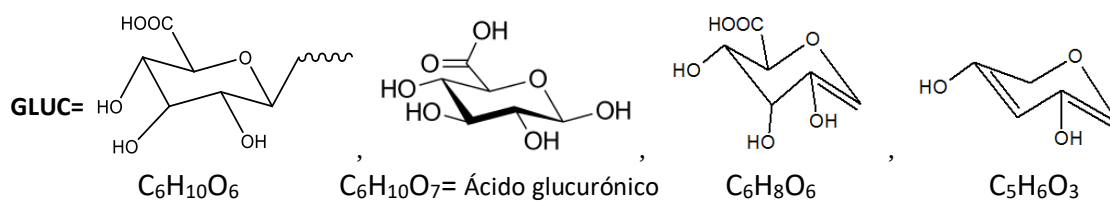


Figura 13 B: Metabolitos por adición de grupo.

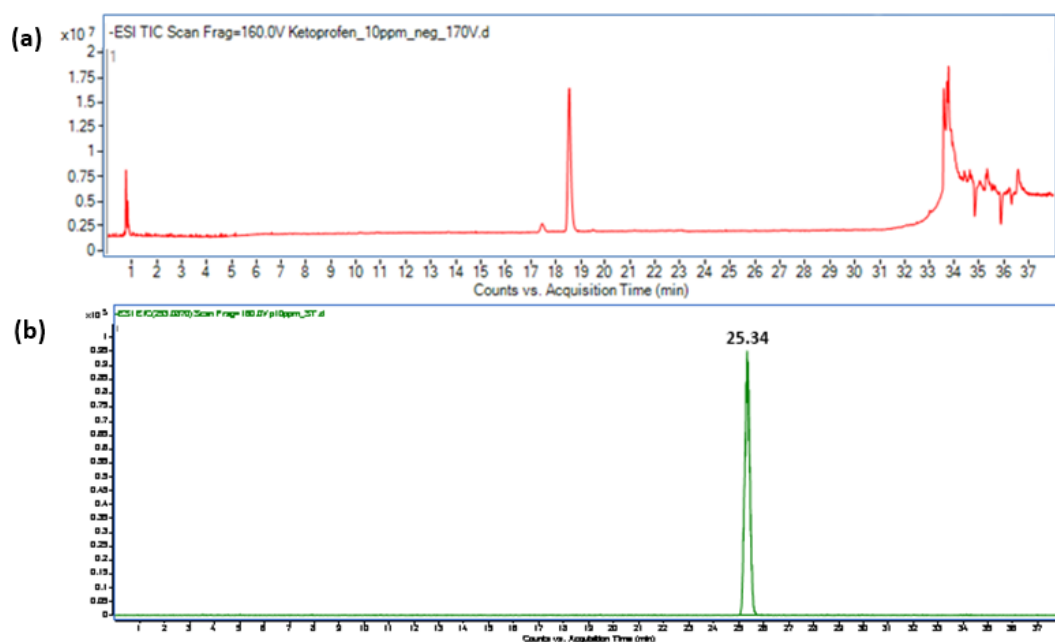


Figura 14 A: TIC (a) y EIC (b) para la m/z 253.087 del patrón de ketoprofeno (10ppm).

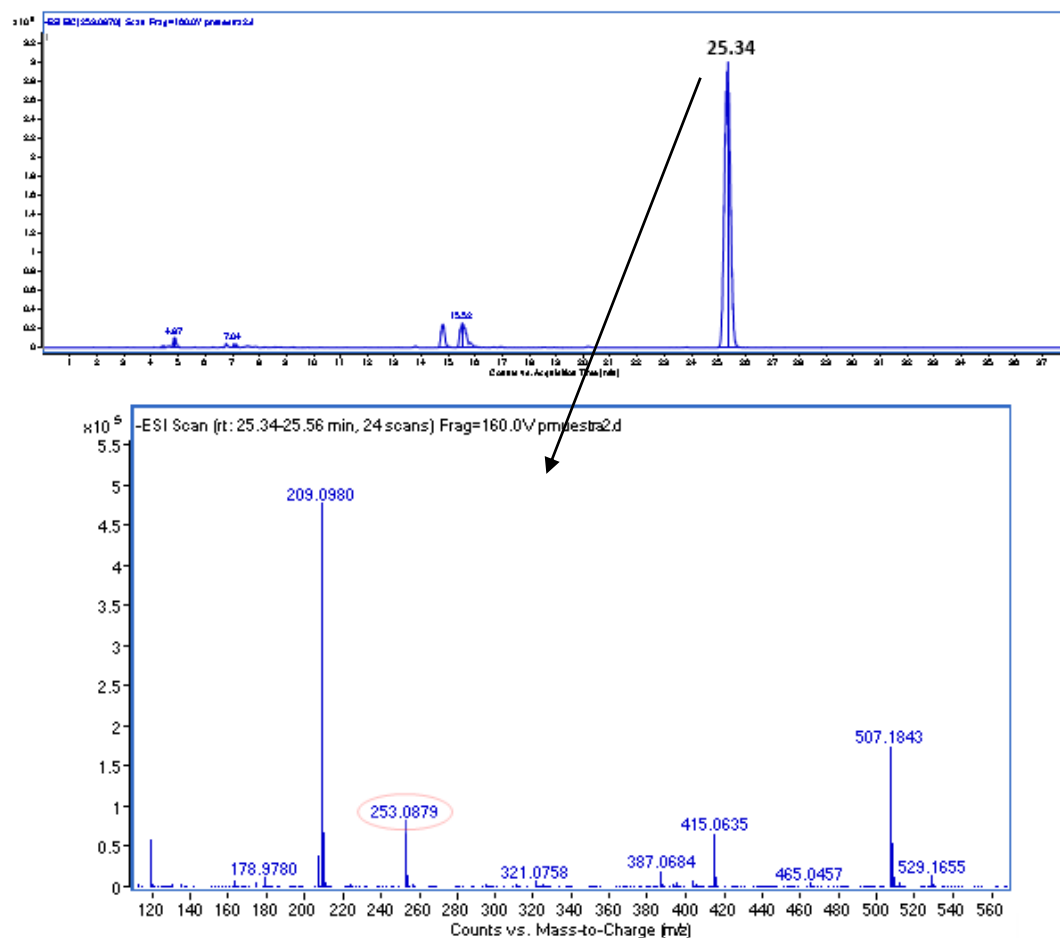


Figura 14 B: EIC para la m/z 253.087 y espectro de masas para la muestra 2 horas después de su administración.

Ketprofeno	t _R min	Fragmento	composición elemental	[M-H]-	m/z teórica	m/z experimental	Error (ppm)
	25.34	Ketoprofeno	C16H14O3	C16H13O3-	253,087	253,0877	2,765
		-CO ₂	C15H14O	C15H13O-	209,097 2	209,0976	1,91
Derivado glucurónico	t _R min	Fragmento	Composición elemental	[M-H]-	m/z teórica	m/z experimental	Error (ppm)
1	15.49	-Ácido glucurónico	C16H14O3	C16H13O3-	253,087	253,0875	1,97
		-CO ₂	C15H14O	C15H13O-	209,097	209,0976	1,91
		Ácido glucurónico	C6H10O7	C6H9O7-	193,035	193,0357	1,55
		-H ₂ O	C6H8O6	C6H7O6-	175,025	175,025	1,14
		-2H ₂ O, -CO ₂	C5H6O3	C5H5O3-	113,024	113,0244	0
2	15.55	Derivado glucurónico (A)	C22H22O9	C22H21O9-	429,119	429,1212	4,89
		Ácido glucurónico	C6H10O7	C6H9O7-	193,035	193,0355	0,51
Derivados hidroxilados	t _R min	Fragmento	Composición elemental	[M-H]-	m/z teórica	m/z experimental	Error (ppm)
3	16.45	Derivado hidroxilado (B)	C16H14O4	C16H13O4-	269,0819	269,0826	2,60
		-CO ₂	C15H14O2	C15H13O2-	225,0921	225,0926	2,22
4	16.51	Derivado hidroxilado (B)	C16H14O4	C16H13O4-	269,0819	269,0828	3,34
		-CO ₂	C15H14O2	C15H13O2-	225,0921	225,093	3,99
5	19.66	Derivado hidroxilado (C)	C16H16O3	C16H15O3-	255,1027	255,1034	2,74
		-CO ₂	C15H16O	C15H15O-	211,1128	211,1133	2,36

Tabla 10: Recopilación de los datos espectrométricos del analito y sus metabolitos (1).

Glucurónidos hidroxilados	t _R min	Fragmento	Composición elemental	[M-H] ⁻	m/z teórica	m/z experimental	Error (ppm)
6	5.69	Glucurónido hidroxilado I	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₀ ⁻	445,114	445,1139	-0,22
		Ác. glucurónico -H ₂ O	C ₆ H ₈ O ₆	C ₆ H ₇ O ₆ ⁻	175,0248	175,0248	0
7	6.66	Glucurónido hidroxilado I	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₀ ⁻	445,114	445,1144	0,89
8	9.61	Glucurónido hidroxilado I	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₀ ⁻	445,114	445,1126	-3,14
9	10.86	Glucurónido hidroxilado I	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₀ ⁻	445,114	445,1159	4,26
10	11.61	Glucurónido hidroxilado I	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₀ ⁻	445,114	445,1159	4,26
11	12.58	Glucurónido hidroxilado II	C ₂₂ H ₂₄ O ₉	C ₂₂ H ₂₃ O ₉ ⁻	431,1348	431,1366	4,17
		Ácido glucurónico	C ₆ H ₁₀ O ₇	C ₆ H ₉ O ₇ ⁻	193,0354	193,0357	1,55

Tabla 10: Recopilación de los datos espectrométricos del analito y sus metabolitos (2).

En las siguientes figuras (**Figura 15, 16 y 17**) se recogen los datos correspondientes al EIC y los espectros de masas en [M-H]⁻ que confirman y complementan la detección de los 11 metabolitos.

Los metabolitos 1 y 2 detectados a un t_R de 15.49 y 15.55 min respectivamente, corresponden a glucurónidos del Ketoprofeno con m/z 429.1191. Esto supone una variación de masa de +175.0248, respecto al Ketoprofeno, que está asociado a la adición de C₆H₈O₆ (ácido glucurónico deshidratado). Otro de los fragmentos que se han detectado compete a la pérdida del ácido glucurónico con m/z 193.0354, así como el Ketoprofeno con pérdida de CO₂ para m/z 209.0972 (**Figura 15**).

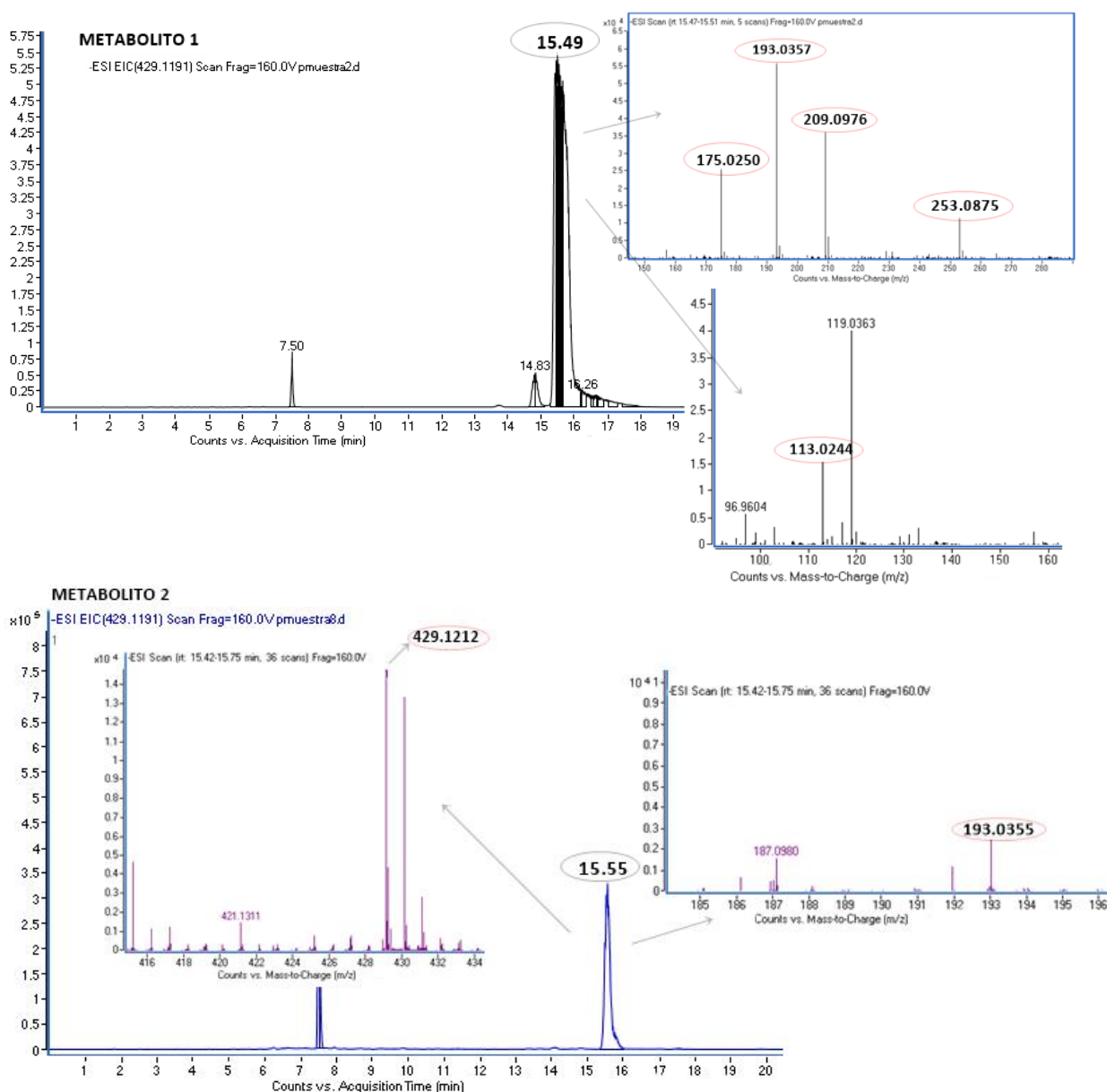


Figura 15: Cromatogramas extraídos y espectros de masas de los metabolitos que se corresponden con los derivados glucurónidos del Ketoprofeno (Metabolitos 1 y 2).

Los metabolitos 3, 4 y 5 se corresponden con derivados hidroxilados del Ketoprofeno con m/z 269.0819 (metabolitos 3 y 4) y 255.1027 (metabolito 5). La adición de un grupo hidroxilo supone una variación de masa de +15.9949Da respecto al Ketoprofeno. El resto de fragmentos está asociado a la pérdida de CO_2 dando una m/z de 225.0921 para el derivado hidroxilado (B) y una m/z 211.1128 para el derivado hidroxilado (C) (Figura 16).

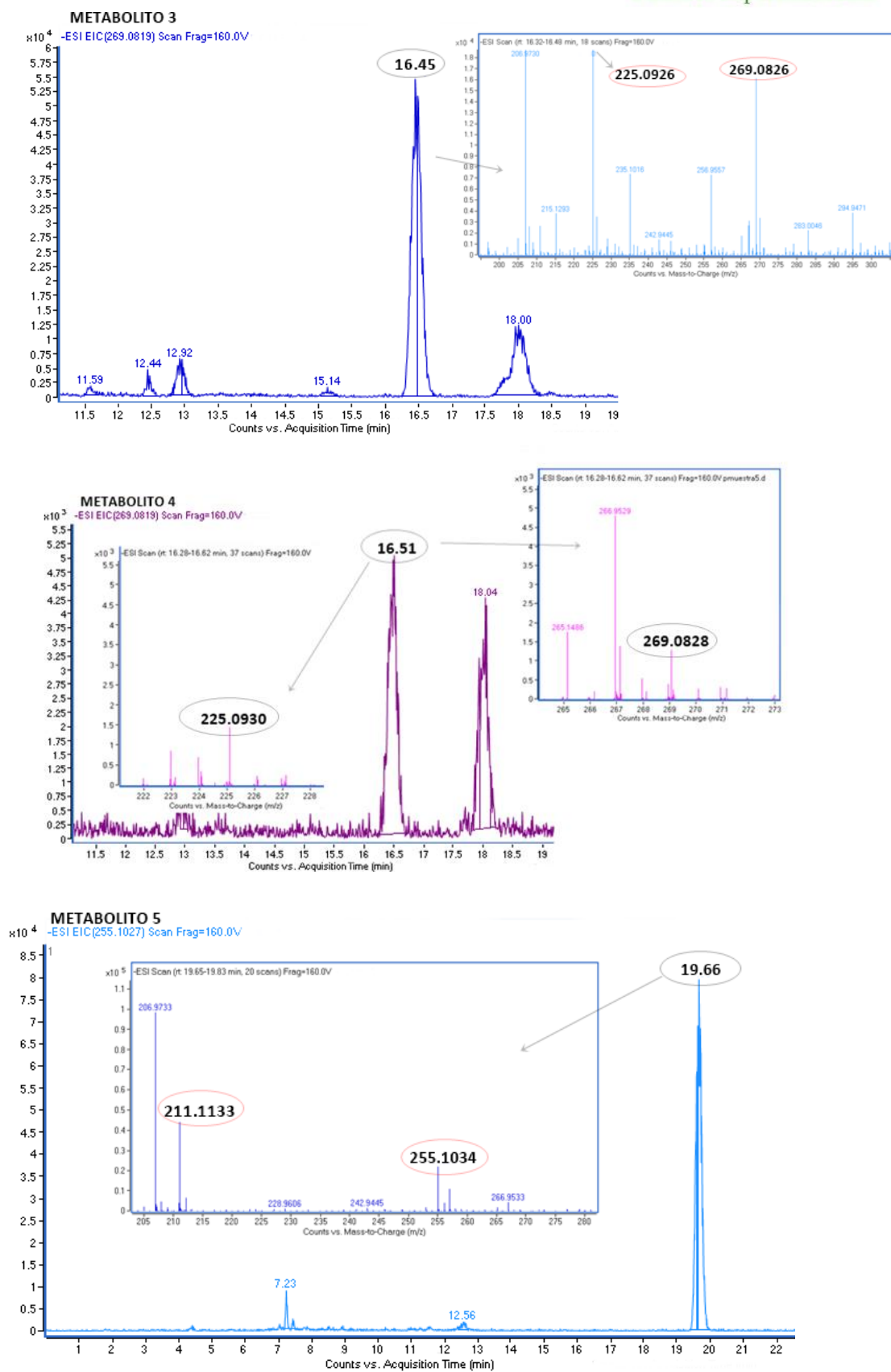


Figura 16: Metabolitos que se corresponden con los derivados hidroxilados del Ketoprofeno (2).

Los metabolitos 6-11 conciernen a derivados glucurónidos del hidroxiketoprofeno con m/z 445.114 (metabolitos 6-10) y 431.1348 (metabolito 11). Se detectaron los respectivos glucurónidos del hidroxiketoprofeno a distintos t_R y, como fragmentos, los correspondientes al ácido glucurónico con m/z 193.0354 y el ácido glucurónico con pérdida de agua a m/z 175.0248 (**Figura 17**).

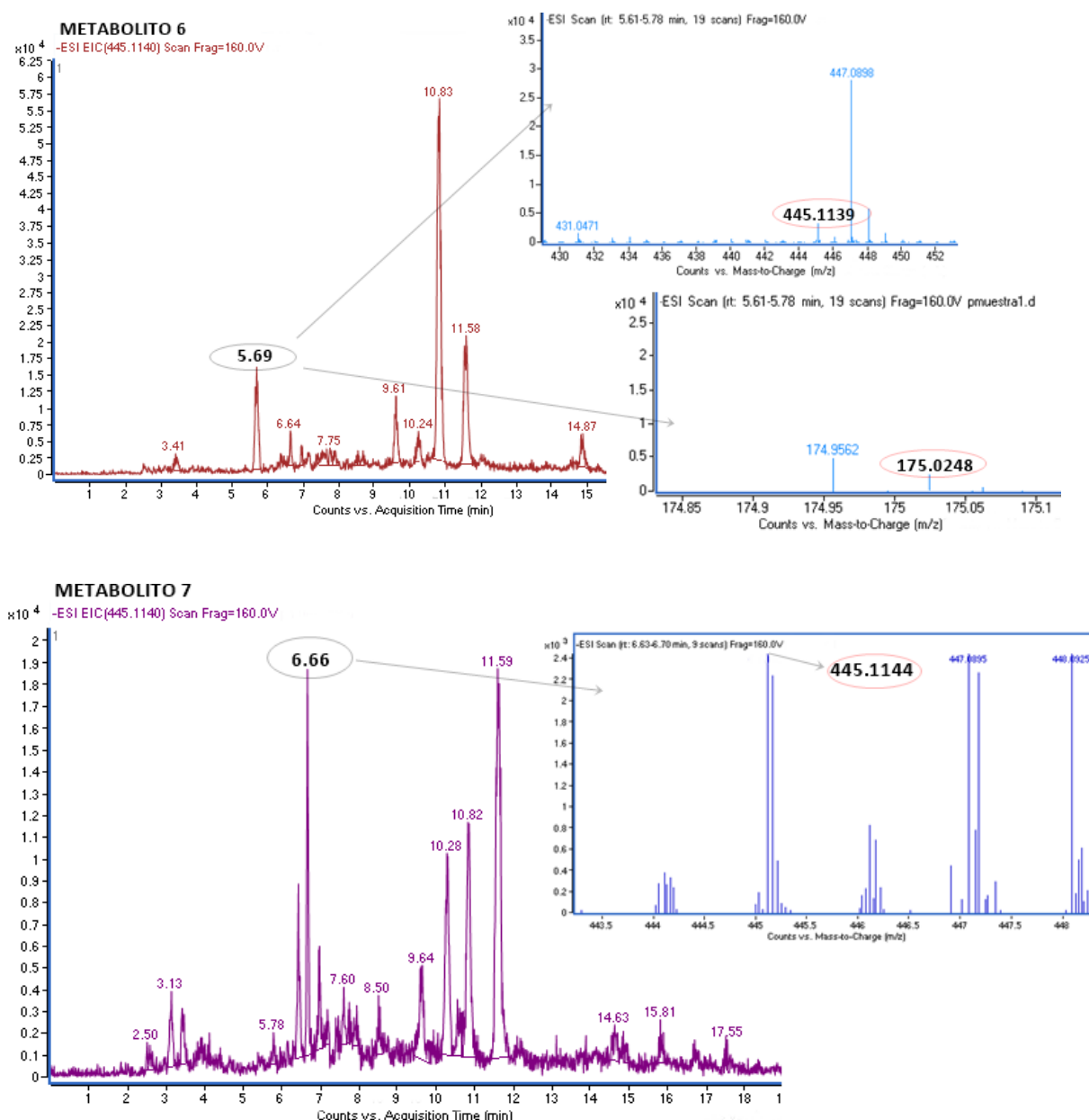


Figura 17: Metabolitos 6 y 7: metabolitos que se corresponden con los derivados glucurónidos hidroxilados del Ketoprofeno (1).

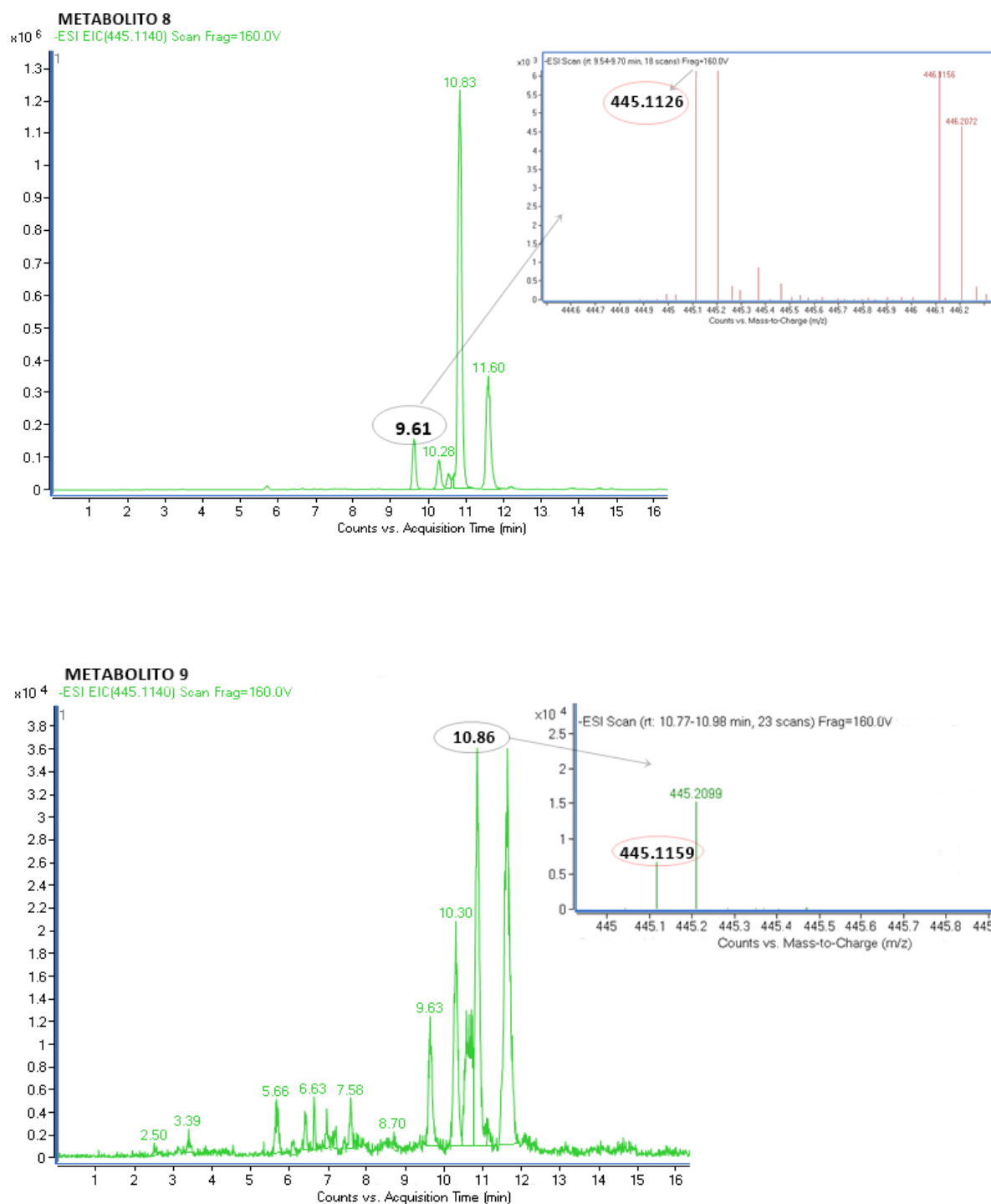


Figura 17: Metabolitos 8 y 9: metabolitos que se corresponden con los derivados glucurónidos hidroxilados del Ketoprofeno (2).

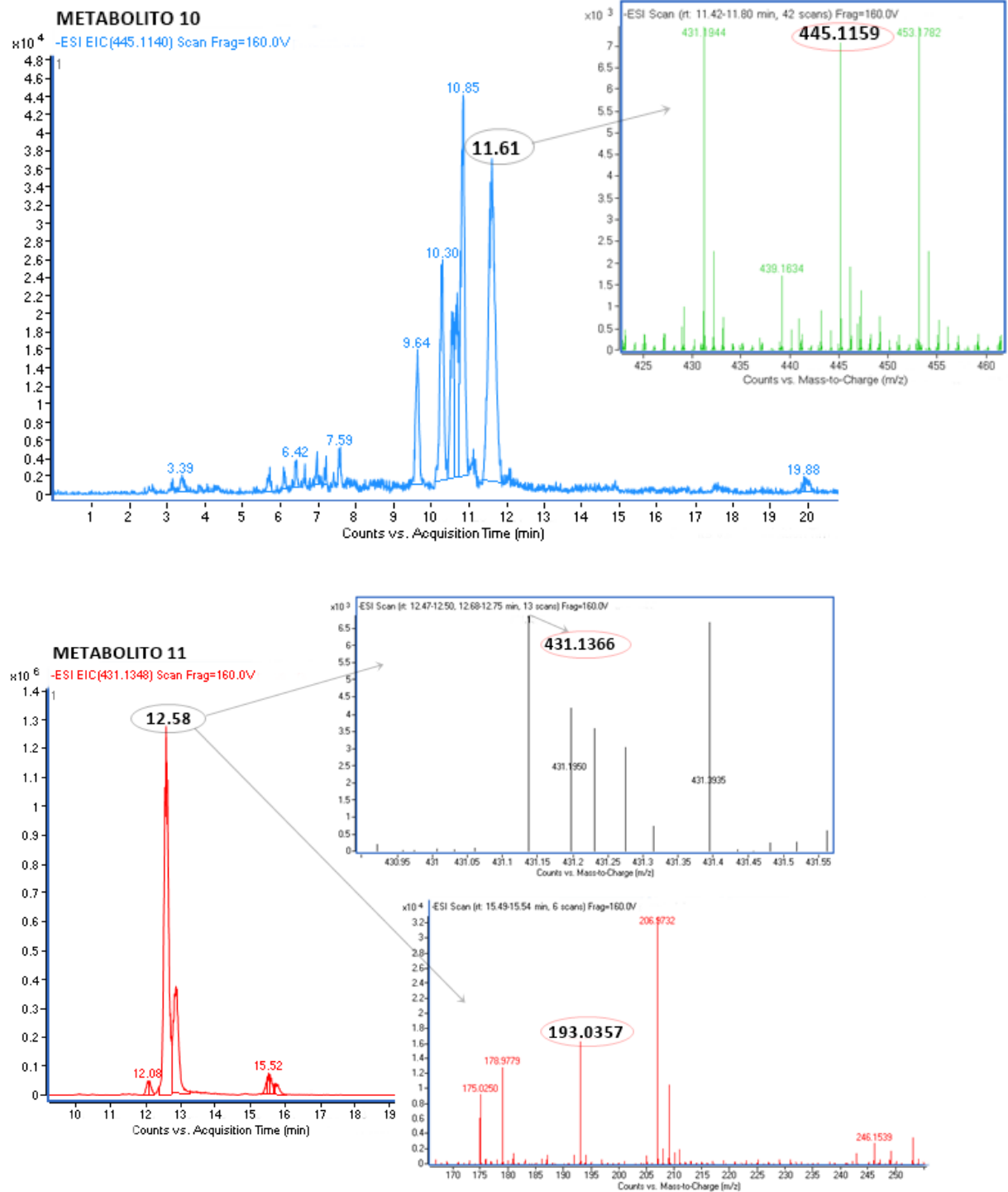


Figura 17: Metabolitos 10 y 11: metabolitos que se corresponden con los derivados glucurónidos hidroxilados del Ketoprofeno (3).

6. Conclusiones.

1. Se ha desarrollado un método para el estudio del metabolismo del Ketoprofeno en orina humana mediante HPLC-TOF-MS. Para ello, se optimizó y validó previamente dicho método para llevar a cabo la cuantificación y el estudio de la eliminación del fármaco y la identificación de los principales metabolitos.
2. El fármaco se elimina en un tiempo de 10 horas, si bien la mayor parte lo hace a las 4 horas de la ingesta, alcanzándose el máximo de concentración en orina a las 2 horas y media.
3. Los metabolitos identificados en total son 11, de los cuales dos se corresponden con derivados glucurónidos del Ketoprofeno, tres son derivados hidroxilados del Ketoprofeno y el resto, seis metabolitos, son derivados glucurónidos del hidroxiketoprofeno. Resultado consistente con la caracterización de los metabolitos del Ketoprofeno por HPLC-MS y HPLC-RMN proporcionado por el artículo de Skordi, E. et al, 2004.

El método desarrollado ha resultado eficaz proporcionando información sobre el estudio del metabolismo, aunque se necesitaría el uso de métodos de MS/MS y MSⁿ para poder profundizar, por ejemplo, en el orden de elución de los metabolitos y justificar la posición en las sustituciones.

7. Bibliografía.

- Alkatheeri, N.A.; Wasfi, I.A.; Kvanagh, P. & Lambert, M. Identification and confirmation of 3-hydroxy metabolite of ketoprofen in camels by gas chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy, 1998, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, Elsevier
- Andrew Moore, Robert; Gay-Escoda, Cosme; Figueiredo, R.;Tóth-Bagi, Z.; Dietrich, T.; Milleri, S.; Torres-Lagares, D.; Hill, C.M.; García-García, A.; Coulthard, P.; Wojtowicz, A.; Matenko, D.; Peñarrocha-Diago, M.; Cuadripani, S.; Pizà-Vallespir, B.; Guerrero-Bayón, C.; Contini, M.P.; Scartoni, S.; Nizzardo, A.; Captriat, A. and Maggi, C.A. *Dexketoprofen/tramadol: randomized double-blind trial and confirmation of empirical theory of combination analgesics in acute pain*, 2015, The Journal of Headache and Pain.
- Andrew Moore, Robert; McQuay, H.J.; Tomaszewski, J.; Raba, G.; Tutunaru, D.; Lietuviute, N.; Galad, J.; Hagymasy, L.; Melka, D.; Kotarski, J.; Rechberger, T.; Fülesdi, B.; Nizzardo, A.; Guerrero-Bayón, C.; Cuadripani, S.; Pizà-Vallespir, B.; and Bertolotti, M. *Dexketoprofen/tramadol 25mg/75mg: randomized double-blind trial in moderate-to-severe acute pain after abdominal hysterectomy*, 2016, BMC Anesthesiology.

- Andrew Moore, Robert; Derry, Sheena; Wiffen, Philip J. & Straube, Sebastian. *Effects of food on pharmacokinetics of immediate release oral formulations of aspirin, dipyrrone, paracetamol and NSAIDs-a systematic review*, 2015, BJCP British Journal of Clinical Pharmacology.
- Andrew Moore, Robert & Barden, Jodie. *Systematic review of dexketoprofen in acute and chronic pain*, 2008, BMC Clinical Pharmacology.
- Armijo, J.A. *Capítulo 4: Absorción, distribución y eliminación de los fármacos*, Farmacología Humana, 1997, Barcelona, Masson, S.A.
- Armijo, J.A. *Capítulo 11: Farmacología clínica, objetivos y metodología*, Farmacología Humana, 1997, Barcelona, Masson, S.A.
- Barbanoj, Manuel-José; Antonijoan, Rosa-María and Gich, Ignasi. *Clinical Pharmacokinetics of Dexketoprofen*, 2001, Clin Pharmacokinet.
- Burke, Anne; Smyth, Emer M. y FitzGerald, G.A. *Capítulo 26: Agentes analgésicos-antipiréticos y antiinflamatorios* en Las bases farmacológicas de la TERAAPÉUTICA, 2006, Colombia, McGraw-Hill Companies.
- Calvo Hernández, M^a Victoria y Planas Vilà, Mercè. *Interacción entre fármacos y nutrientes en situaciones fisiopatológicas determinadas*. Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral SENPE, 2008, Editorial Glosa, S.L.
- Carr, R.A; Caillé, G.; Hgoc, A.H. et al. *Stereospecific high-performance liquid chromatography assay of ketoprofeno in human plasma and urine*, 1995, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, Elsevier.0
- Castell, J.V., *El metabolismo de fármacos, generación de metabolitos reactivos y su papel en el origen de las reacciones inmunológicas a fármacos*, 2006.
- Cennet-Neslihan Eroglu, Hanife Ataoglu, Gulsun Yildirim, Demet Kiresi. *Comparison of the efficacy of low doses of methylprednisolone, acetaminophen, and dexketoprofen Trometamol on the swelling developed after the removal of impacted third molar*, 2015, Med Oral Patol Oral Cir Bucal.
- Centro de Información de Medicamentos Servicio de Farmacia. *INFORME A LA COMISIÓN DE FARMACIA Y TERAPÉUTICA ENANTYUM® (Dexketoprofeno)* 2004.
- Feria, M., *Capítulo 22: Fármacos analgésicos-antiinflamatorios no esteroideos. Antiartríticos* en Farmacología Humana, 1997, Barcelona, MASSON, S.A
- Florez, J., *Capítulo 1: La farmacología, concepto y objetivos*, Farmacología Humana, 1997, Barcelona, Masson, S.A.

- García Mejide, J.A.; Gómez-Reino Carnota, J.J. *Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2*, 2000, Rev Esp Reumatol.
- Gary D. Christian, *Química Analítica*, 6ª Edición, 2009, McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S. A.
- Gerd H. Brunner. *Loading of aerogels with drugs, Ketoprofen ((RS)-2-(3-benzoylphenyl) propionic acid). Supercritical Fluids as Solvents and Reaction Media*, 2004, Elsevier.
- Grubb, N.G.; Rudy, D.W. y Hall, S.D. *Stereoselective high-performance liquid chromatography analysis of ketoprofeno and its acyl glucurónidos in chronic renal insufficiency*, 1996, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, Elsevier.
- Hanna, M.H.; Elliott, K.M.; Stuart-Taylor, M.E.; Roberts, D.R.; Buggy, D. & Arthurs, G.J. *Comparative study of analgesic efficacy and morphine-sparing effect of intramuscular dexketoprofen trometamol with ketoprofen or placebo after major orthopaedic surgery*, 2003, Blackwell Science Ltd Br J Clin Pharmacol.
- Iain L. O. Buxton, *Capítulo 1: FARMACOCINÉTICA Y FARMACODINAMIA. Dinámica de la absorción, distribución, acción y eliminación de los fármacos*, Goodman & Gilman Las Bases Farmacológicas de la TERAPÉUTICA, 2007, México, McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORE, S.A. de C. V.
- Jiménez Martínez, Esther; Gasco García, Carmen; Arrieta Blanca, Juan José; Gómez del Torno, Javier y Bartolome Villar, Begoña. *Estudio de la eficacia analgésica del Dexketoprofeno Trometamol 25mg vs Ibuprofeno 600mg tras su administración oral en pacientes sometidos a una intervención quirúrgica oral*, 2003, Cirugía Bucal.
- Jürgen H. Gross, *Mass Spectrometry*, 2004, Springer-Verlag Berlin Hidelberg.
- Leza, J.C. y Lizasoain, I. *Capítulo 31: Fármacos antiinflamatorios no esteroideos y otros analgésicos-antipiréticos* en Farmacología básica y clínica, 2008, Madrid, Editorial Médica Panamericana, S.A.
- Lichtfouse, Eric; Schwarzbauer, Jan y Didier, Robert. *Non-steroidal Anti-inflammatory and Analgesic Drug*, Green Materials for Energy, Products and Depollution, 2013, Springer Science & Business Media
- Maha, M. I.; Tamer, M. E.; Yasser, M. R. & Fathia, E. M. *Biodegradation of Ketoprofen using microalgal-bacterial consortium*, 2016, Springer Science+Business Media Dordrecht.
- P. Lorenzo, *Capítulo 2: Metabolismo y excreción de los fármacos*, Velázquez. Farmacología Básica y Clínica, 2009, Madrid, Editorial Medica Panamericana, S.A.

-Primorac, Marija and Dekic, Ljiljana. *Chapter 3: Microemulsions and Nanoemulsions as Carriers for Delivery of NSAIDs. Microsized and Nanosized Carriers for Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Formulation Challenges and Potential Benefits*, 2017, Academic Press.

-Skordi, E.; Wilson, E.I.; Lindon, J.C. and Nicholson, J.K. *Characterization and quantification of metabolites of racemic ketoprofen excreted in urine following oral administration to man by ^1H -NMR spectroscopy, directly coupled HPLC-MS and HPLC-NMR, and circular dichroism*, 2004, Taylor&Francis Ltd.



ANEXO

UNIVERSIDAD DE JAÉN
Vicerrectorado de Investigación

COMISIÓN DE ÉTICA

Tipo de actividad : TFG

Referencia: OCT.16/6

Título de la actividad: Metabolización de un fármaco: estudio analítico a través de la orina

Convocatoria y/o entidad a la que se presenta: TFG UJA

- Tutor : Antonio Molina Diaz

Tipo de experimentación o actividad sometida a informe: Investigación en humanos: muestras biológicas

Informe que se emite : FAVORABLE

Observaciones:



Jaén, 7 de noviembre de 2016

Amelia Aránega Jiménez
Presidenta de la Comisión de Ética

Vicerrectorado de Investigación