



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

**DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA DE  
CUANTIFICACIÓN DE ERTAPENEM TOTAL EN PLASMA HUMANO  
MEDIANTE HPLC PARA SER APLICADA EN PACIENTES  
GERIÁTRICOS HOSPITALIZADOS EN UNIDADES NO CRÍTICAS  
DEL HOSPITAL CLÍNICO DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE**

**Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico**

**DANIELA ANDREA SAN MARTÍN DÍAZ**

**PROFESORA PATROCINANTE**

Dra. María Nella Gai Hernández  
Facultad de Ciencias Químicas  
y Farmacéuticas

**DIRECTORES DE TESIS**

Dra. María Nella Gai Hernández  
QF Daniel Palma  
Hospital Clínico Universidad de Chile

Santiago, Chile

2017

## DEDICATORIA

*Para Catalina,  
porque además de ser mi hermana,  
eres mi mejor amiga y compañía.*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas aquellas personas que se cruzaron en mi camino y que, de alguna u otra manera, hicieron posible que esta etapa llegara a término.

Agradezco a mis padres que desde pequeña me inculcaron la importancia de la constancia, la perseverancia y el estudio, los cuales fueron los pilares fundamentales que me permitieron culminar este proceso académico y esta etapa de mi vida.

Deseo agradecer especialmente a mi hermanita Catalina porque sin su amor incondicional y apoyo, mi vida estaría más vacía y es ella la que en infinitas oportunidades me ha dado la fuerza para continuar con mi camino. También agradezco a mis dos pequeñitos hermanos, Javier y Cristian, que, aunque ni siquiera saben qué es la Universidad, siempre me han dado mucho amor y alegría.

A mi tía y madrina Keka, por estar siempre presente dándome apoyo y por ser uno de mis referentes a seguir desde pequeña. También le agradezco que se haya ofrecido a ayudarme durante este desafío, el cual también lo fue para ella, ya que muchas veces ni siquiera entendía de lo que le estaba hablando.

Al resto de mi familia, especialmente a mi tía Mimi y a mi abuelita Eliana, ya que siempre confiaron en mí, se preocuparon por mi bienestar y me han entregado su cariño. También le agradezco a Juanita por haberme acompañado durante las noches que pasé en vela, manteniéndome despierta mientras estudiaba y dándome su cariño cuando lo necesitaba.

A Coca, por siempre estar dispuesta a ayudarme a enfrentar las diferentes etapas de mi vida y entregarme las herramientas necesarias para terminar este ciclo.

A los profesores que estuvieron presentes durante mi formación, principalmente a la profesora Nella, quien desde hace muchos años me ha ido aconsejando por las diversas áreas de la profesión y permitió que pudiera realizar este trabajo.

A Daniel, por estar siempre dispuesto a enseñarme nuevas cosas, por su apoyo, sus consejos y por haberme aceptado en su proyecto.

A Lily, quien tuvo la disposición y la paciencia para enseñarme a medir a los abuelitos, ya que para mí fue algo totalmente nuevo, pero muy grato de aprender gracias a su ayuda.

Por último, quiero agradecer a todos mis amigos que estuvieron presentes y que me apoyaron durante esta travesía.

# TABLA DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA .....	ii
AGRADECIMIENTOS .....	iii
TABLA DE CONTENIDO .....	iv
ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN .....	viii
SUMMARY .....	ix
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. PACIENTE ADULTO MAYOR .....	1
I. Características poblacionales.....	1
II. Modificaciones corporales en el adulto mayor: Importancia en las Mediciones Antropométricas y en la Farmacocinética clínica .....	2
1.2. TERAPIA ANTIMICROBIANA .....	4
1.3. PROPIEDADES DE ERTAPENEM.....	5
I. Características de la molécula .....	5
II. Mecanismo de acción y propiedades farmacocinéticas de ertapenem .....	6
1.4. PERFIL FARMACOCINÉTICO DE ERTAPENEM EN EL ADULTO MAYOR.....	8
<b>2. HIPÓTESIS .....</b>	<b>9</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>10</b>
3.1. OBJETIVO GENERAL .....	10
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	10

<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>11</b>
4.1. TIPO DE ESTUDIO, POBLACIÓN Y DURACIÓN .....	11
4.2. ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO .....	11
4.2.1. ETAPA CLÍNICA .....	12
I. Capacitación en Mediciones Antropométricas .....	12
II. Reclutamiento de pacientes .....	17
4.2.2. ETAPA ANALÍTICA .....	20
I. Diseño experimental .....	20
II. Parámetros de validación .....	27
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>33</b>
5.1. ETAPA CLÍNICA .....	33
5.2. ETAPA ANALÍTICA .....	38
I. Diseño experimental .....	38
II. Validación de la Metodología analítica .....	47
III. Cuidados y Mantenimiento de la columna cromatográfica .....	56
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>59</b>
<b>7. REFERENCIAS</b> .....	<b>64</b>
LISTADO DE ABREVIACIONES.....	61
BIBLIOGRAFÍA .....	63
ANEXOS DISPONIBLES EN CD .....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla N°1. Principales modificaciones en la absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos asociadas al envejecimiento.....	3
Tabla N°2. Reactivos utilizados durante el desarrollo de la metodología .....	21
Tabla N°3. Preparación de las soluciones calibrantes a partir de las soluciones de trabajo, plasma y acetonitrilo (ACN) .....	25
Tabla N°4. Volúmenes y soluciones de trabajo utilizados para preparar los controles de calidad .....	26
Tabla N°5. Evaluación antropométrica y nutricional de los pacientes del estudio .....	36
Tabla N°6. Comparación de las condiciones cromatográficas de ambas metodologías .....	38
Tabla N°7. Tiempos de retención (min) de los componentes de la muestra usando cefotaxima .....	42
Tabla N°8. Tiempos de retención ( $t_R$ ) a distintas velocidades de flujo .....	44
Tabla N°9. Caracterización de los plasmas utilizados en la validación .....	48
Tabla N°10. Precisión y exactitud de todas las soluciones calibrantes preparadas .....	48
Tabla N°11. Linealidad promedio del sistema considerando solo las concentraciones que cumplen los criterios de validación .....	49
Tabla N°12. Precisión y exactitud del límite de cuantificación .....	51
Tabla N°13. Precisión y exactitud intra-día para muestras controles de calidad .....	52
Tabla N°14. Precisión y exactitud inter-día para muestras límite de detección y controles de calidad.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura N°1. Elementos en la selección de la antibioterapia .....	4
Figura N°2. Estructura química de ertapenem .....	6
Figura N°3. Pliegues antropométricos de izquierda a derecha: Pliegue Bicipital y Pliegue Tricipital; Pliegue Supra-ilíaco; Pliegue Sub-escapular .....	14
Figura N 4. Componentes básicos de un equipo de High Performance Liquid Chromatography (HPLC) .....	22
Figura N°5. Cromatogramas con cefotaxima como estándar interno .....	42
Figura N°6. Cromatogramas con ácido salicílico como estándar interno .....	43
Figura N°7. Cromatogramas con ranitidina como estándar interno .....	43
Figura N°8. Cromatograma obtenido con las condiciones cromatográficas optimizadas para una muestra de ertapenem 50 mg/L en una matriz de plasma humano .....	45
Figura N°9. Plasma blanco para selectividad .....	47
Figura N°10. Representación gráfica de la linealidad del sistema .....	50
Figura N°11. Cromatograma obtenido de muestra control de calidad alto .....	56

## RESUMEN

El perfil farmacocinético de los adultos mayores sufre una serie de alteraciones debido a que experimentan cambios fisiológicos asociados al envejecimiento capaces de modificar la estructura y funcionamiento de los diferentes sistemas de su organismo. Dichos cambios, sumados a las co-morbilidades que pueden presentar estos pacientes al ser hospitalizados en unidades no críticas, condicionan la respuesta y éxito de las terapias farmacológicas con antimicrobianos, dado que pueden afectar el logro de un índice PK/PD óptimo.

El objetivo de este estudio fue desarrollar y optimizar una metodología analítica mediante HPLC acoplado a un detector UV/Vis para cuantificar ertapenem en plasma humano, para posteriormente ser aplicado en la caracterización del perfil farmacocinético de este antibiótico en adultos mayores hospitalizados en unidades no críticas, a los que, además, se les debió determinar su composición corporal.

Para llevar a cabo lo anterior se reclutó a pacientes hospitalizados en la Unidad Geriátrica de Agudos del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, a los que se les realizaron mediciones antropométricas y se les extrajeron muestras de sangre que fueron almacenadas para su posterior análisis. Paralelamente se trabajó evaluando diferentes condiciones experimentales que influyeran en el desarrollo de la metodología analítica y que permitieran validarla según parámetros internacionales.

La metodología analítica desarrollada utilizó una columna Waters Spherisorb® y una fase móvil ajustada a pH 2,4 compuesta por el 70% de *buffer* fosfato 10 mM y 30% de acetonitrilo. Además, la velocidad de flujo fue de 0,9 ml/min y la longitud de onda utilizada fue de 310 nm. A la metodología se le realizaron diferentes ensayos para validarla, pero no cumplió con el parámetro de exactitud y precisión inter-día, por lo que se descartó.

Por otro lado, de los 3 pacientes reclutados, 2 correspondieron a hombres y la edad promedio de la muestra fue de  $82,3 \pm 8,0$  años. El peso real se pudo determinar en solo 2 pacientes y dio un promedio de  $59,2 \pm 15,4$  kg. A su vez, el peso y la estatura se estimaron con diferentes métodos, arrojando valores de  $54,5 \pm 8,1$  kg y  $49,8 \pm 3,8$  kg y de  $1,65 \pm 0,1$  m y  $1,52 \pm 0,1$  m, respectivamente. El IMC clasificó a la muestra como normal o con déficit de peso, dependiendo de los datos utilizados. En relación a la composición corporal y estado nutricional de cada paciente, se pudo determinar que ID#1 estaba en riesgo de desnutrición/desnutrición, ID#2 se hallaba normal e ID#3 se encontraba en desnutrición/normal.



# **DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHODOLOGY OF QUANTIFICATION OF TOTAL ERTAPENEM IN HUMAN PLASMA THROUGH HPLC TO BE APPLIED IN GERIATRIC PATIENTS HOSPITALIZED IN NON-CRITICAL UNITS OF THE HOSPITAL CLÍNICO DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE**

## **SUMMARY**

The pharmacokinetic profile of older adults suffers a series of alterations because they experience physiological changes associated with aging, capable of modifying the structure and functioning of the different systems of their organism. These changes, added to the comorbidities that these patients can present when hospitalized in non-critical units, condition the response and success of pharmacological therapies with antimicrobials, since they can affect the achievement of an optimal PK/PD index.

The objective of this study was to develop and optimize an analytical methodology using HPLC coupled to a UV/Vis detector to quantify ertapenem in human plasma, to be subsequently applied in the characterization of the pharmacokinetic profile of this antibiotic in older adults hospitalized in non-critical units, to which, in addition, their body composition should have been determined.

To carry out the above, hospitalized patients were recruited in the Geriatric Acute Unit of the Hospital Clínico de la Universidad de Chile, who underwent anthropometric measurements and blood samples were taken and stored for later analysis. At the same time, we worked evaluating different experimental conditions that influenced the development of the analytical methodology and that allowed to validate it according to international parameters.

The developed analytical methodology used a Waters Spherisorb® column and a mobile phase adjusted to pH 2.4 composed of 70% of 10 mM phosphate buffer and 30% of acetonitrile. In addition, the flow rate was 0.9 ml/min and the wavelength used was 310 nm. The methodology was subjected to different tests to validate it, but it did not comply with the parameter of accuracy and precision inter-day, so it was discarded.

On the other hand, of the 3 patients recruited, 2 corresponded to men and the average age of the sample was  $82.3 \pm 8.0$  years. Actual weight could be determined in only 2 patients and averaged  $59.2 \pm 15.4$  kg. In turn, weight and height were estimated using different methods, yielding values of  $54.5 \pm 8.1$  kg and  $49.8 \pm 3.8$  kg and of  $1.65 \pm 0.1$  m and  $1.52 \pm 0.1$  m, respectively. The body mass index classified the sample as normal or with a weight deficit, depending on the data used. In relation to the body composition and nutritional status of each patient, it was determined that ID#1 was at risk of malnutrition/malnutrition, ID#2 was normal and ID#3 was malnutrition/normal.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. PACIENTE ADULTO MAYOR

### I. CARACTERÍSTICAS POBLACIONALES

Los adultos mayores son un grupo etario que ha ido en continuo aumento tanto en Chile como en el mundo. En nuestro país, los datos estadísticos señalan que el 15% de la población corresponde actualmente a personas mayores de 60 años y se estima que para el año 2025 este número aumente al 20%<sup>1</sup>, lo que traerá como consecuencia múltiples desafíos desde los ámbitos médico, familiar y social, con el fin de poder otorgar la mejor calidad de vida a este grupo vulnerable de la población.

El envejecimiento se puede entender como un proceso fisiológico e irreversible asociado con una alteración progresiva de las respuestas homeostáticas adaptativas del organismo, lo que provoca cambios en la estructura y función de los diferentes sistemas y además aumenta la vulnerabilidad del individuo al estrés ambiental y a la posibilidad de enfermarse<sup>2</sup>.

Los cambios fisiológicos, psicológicos y sociales que acompañan al envejecimiento condicionan la fragilidad de estos pacientes, lo que los hace más propensos a sufrir complicaciones tales como las relacionadas con el deterioro de su capacidad funcional y el padecimiento de enfermedades degenerativas e infecciosas, debido al proceso natural de inmunosenescencia, los trastornos de las barreras cutáneo-mucosas, las co-morbilidades y síndromes geriátricos, el uso de medicamentos, procedimientos médicos, la institucionalización -que los hace más susceptibles a infecciones causadas por microorganismos resistentes-, factores familiares y sociales, entre otros<sup>3-5</sup>.

## II. MODIFICACIONES CORPORALES EN EL ADULTO MAYOR: IMPORTANCIA EN LAS MEDICIONES ANTROPOMÉTRICAS Y EN LA FARMACOCINÉTICA CLÍNICA

La antropometría es el estudio de las proporciones y medidas del cuerpo humano y se utiliza para obtener una evaluación general de los cambios en las dimensiones corporales relacionadas con la edad, así como con el estado nutricional de las personas. De todas las modificaciones corporales que ocurren durante el proceso de envejecimiento, las medidas antropométricas son las más afectadas, destacando la redistribución de la masa corporal y la estatura<sup>6</sup>.

La estatura de los adultos mayores, a través de la medición directa por bipedestación, en algunos casos es difícil de determinar; por ello la utilización de otro segmento del cuerpo puede ser muy útil para estimarla y obtener así los diferentes parámetros nutricionales que entregarán información sobre la composición corporal<sup>7,8</sup>. Para calcular la estatura existen diversas fórmulas descritas en la literatura médica que se pueden utilizar en adultos mayores que estén postrados, que no pueden permanecer de pie en forma erguida o que se encuentran hospitalizados.

Sin embargo, estos métodos presentan algunas limitaciones, como por ejemplo que no todos se han estimado para el mismo rango de edad, o que se han calculado sobre la base de poblaciones geriátricas de otros países, que no siempre coincidirán con la realidad nacional<sup>6-11</sup>, debido a que existen pocos estudios sobre antropometría y estado nutricional efectuados en Chile o América del Sur que se hayan efectuado con una muestra grande y representativa de la población mayor<sup>12</sup>.

La utilidad de estos parámetros nutricionales en el área de la farmacocinética clínica radica en que, al ser herramientas capaces de entregar información sobre las modificaciones corporales, otorgan datos que pueden ser de gran relevancia en pacientes de edad avanzada, donde existen factores farmacológicos y no farmacológicos que determinan la eficacia y la seguridad de un tratamiento. Dentro de los factores farmacológicos que juegan un rol importante en este aspecto están aquellos que corresponden a las modificaciones farmacocinéticas asociadas al envejecimiento, tales como las alteraciones en la absorción, en la capacidad para metabolizar fármacos, en el comportamiento de los receptores (Tabla N°1), o las interacciones con otros medicamentos; sin embargo, los procesos que más modificaciones sufren en estos pacientes son la distribución y eliminación (metabolismo y excreción) de fármacos<sup>13,14</sup>.

**Tabla N°1. Principales modificaciones en la absorción, distribución, metabolismo y excreción de fármacos asociadas al envejecimiento**

Proceso	Acción	Efecto
<b>Absorción</b>	↑ pH gástrico, ↓ flujo sanguíneo, ↓ motilidad GI, ↓ superficie de absorción.	Se altera la velocidad de disolución, ↓ la biodisponibilidad, posible ↓ de la velocidad de absorción.
<b>Distribución</b>	↓ agua corporal, ↓ tejido magro y ↑ del tejido graso (mujeres ≥ hombres) Unión a proteínas: ↓ albúmina.	↓ Vd de medicamentos polares y ↑ Vd de los lipofílicos, retardo en el inicio de acción, ↑ fracción libre de medicamentos ácidos, acumulación en dosis múltiples.
<b>Metabolismo (hepático)</b>	↓ reacciones de Fase I, ↓ flujo sanguíneo hepático, ↓ tamaño hepático.	↓ aparente del metabolismo y clearance de ciertos medicamentos.
<b>Excreción (renal)</b>	↓ VFG, ↓ secreción activa.	↓ clearance renal, ↑ vida media de los medicamentos excretados por vía renal.
<b>Respuesta</b>	Alteración en el nº de receptores, cambios órgano-específicos por la edad, cambios en la actividad enzimática en el SNC, posible alteración de la función de segundos mensajeros.	Variación en la relación dosis/respuesta, aumento de las reacciones adversas y de los efectos paradójales.

VFG: Velocidad de Filtración Glomerular; SNC: Sistema Nervioso Central; Vd: Volumen de distribución. Extraída de referencia 14.

En cuanto a la distribución de fármacos, se han demostrado varios cambios en la composición corporal que pueden afectar este proceso en los distintos compartimientos del organismo. Existe reducción de la masa magra, aumento del tejido adiposo y disminución del agua corporal total (10 a 15%), lo que significa que los fármacos liposolubles tienen un mayor volumen de distribución, mientras que aquellos hidrosolubles tienen un volumen de distribución reducido, por lo que en este último caso se pueden alcanzar concentraciones plasmáticas más altas a dosis terapéuticas utilizadas en personas más jóvenes. Si no ocurren alteraciones en el aclaramiento plasmático del fármaco, los cambios en el volumen de distribución producen variaciones proporcionales en la vida media de eliminación. También se puede observar una disminución de los niveles de albúmina plasmática, con el consecuente aumento de la fracción libre de fármacos, razón por la cual en aquellos que se unen ampliamente a proteínas, como es el caso de ertapenem, debe esperarse una reducción del margen terapéutico con mayor riesgo de toxicidad<sup>13</sup>.

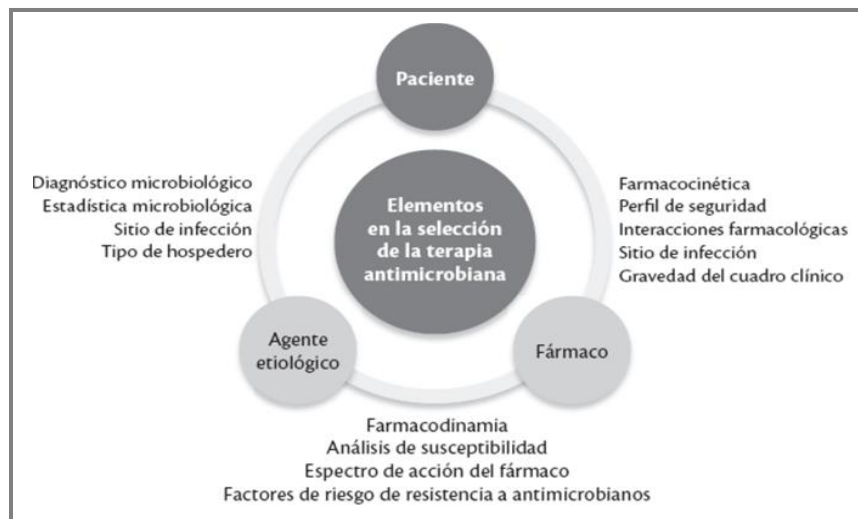
Entre los cambios fisiológicos que tienen lugar en el riñón se observa disminución del flujo sanguíneo renal, de la filtración glomerular y de la excreción tubular. Estudios sobre el tema demuestran una disminución variable de la velocidad de filtración glomerular de entre el 35% y el 40% a los 70 años, respecto de sujetos de 20 años<sup>13</sup>, mientras que otros estiman que a los 75 años puede haber una disminución de hasta el 50% del *clearance* de creatinina<sup>14</sup>. Estos hechos adquieren relevancia principalmente en la utilización de fármacos de margen terapéutico estrecho, ya que la dosificación debe ser ajustada estrictamente de acuerdo con

estas alteraciones, debido a que pequeños cambios en las concentraciones plasmáticas generan variaciones importantes en los resultados clínicos, lo que puede traer como consecuencia que no se logren los objetivos terapéuticos.

## 1.2. TERAPIA ANTIMICROBIANA

La terapia antibiótica ideal tiene como meta alcanzar la resolución del proceso infeccioso, minimizando la toxicidad y resistencia a antimicrobianos, por lo que la selección inicial de la terapia debe basarse en el análisis en conjunto de elementos dependientes del diagnóstico microbiológico, del paciente y de los antibióticos (Figura N°1)<sup>15</sup>. A pesar de esto, los microorganismos resistentes a ciertos tipos de antibióticos se están presentando de manera más habitual, tanto en la comunidad como en el ambiente intrahospitalario, y el aislamiento de estas cepas bacterianas ha permitido conocer cuáles son las que afectan con mayor frecuencia a los pacientes en cada uno de los escenarios. Como ejemplo de esto se encuentran las bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, más conocidas como BLEE (o *ESBL* por sus siglas en inglés), las cuales corresponden a un tipo de microorganismo adquirido en la comunidad capaz de lograr resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos<sup>16,17</sup>. Debido a esto, el uso de antimicrobianos debe estar basado en aquellos con amplio espectro de acción, capaces de cubrir bacterias relacionadas con infecciones clínicamente relevantes, siendo de gran importancia el uso de antibióticos  $\beta$ -lactámicos parenterales como ertapenem, el cual ha demostrado ser estable contra la hidrólisis de variados tipos de  $\beta$ -lactamasas.

Figura N°1. Elementos en la selección de la antibioterapia.



Extraída de referencia 15.

### 1.3. PROPIEDADES DE ERTAPENEM

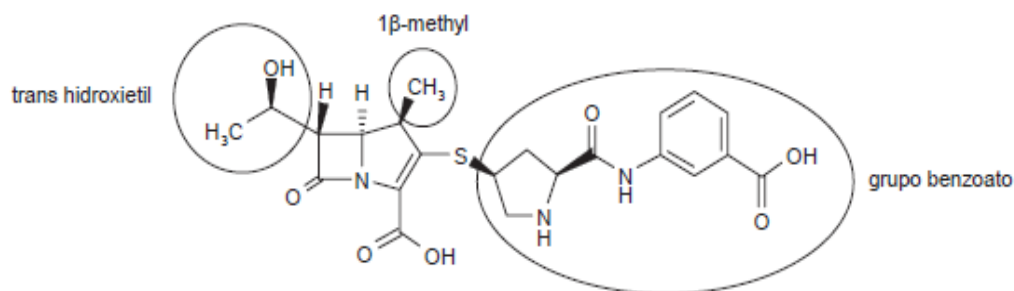
#### I. CARACTERÍSTICAS DE LA MOLÉCULA

Los carbapenémicos son antibióticos  $\beta$ -lactámicos con un muy amplio espectro de acción contra bacterias Gram positivas y Gram negativas aeróbicas y anaeróbicas, y son estables a casi todas las  $\beta$ -lactamasas producidas por bacterias. A este grupo de antibióticos pertenecen imipenem, meropenem, doripenem (comercializado solo en Japón) y ertapenem.

Ertapenem es el antibiótico carbapenémico más nuevo del grupo, de origen sintético y está diseñado para la administración parenteral. Posee ciertas propiedades que lo diferencian de otros carbapenémicos, tales como: ser estable frente a la acción de la deshidropeptidasa (DHP-1), por lo que no necesita ser administrado en conjunto con un inhibidor de esta enzima<sup>18</sup>, tener una vida media prolongada, debido a su alta unión a proteínas, lo que le permite ser administrado en una sola dosis diaria<sup>19,20</sup>, y, a pesar de contar con un amplio espectro de acción, su limitada actividad frente a bacterias Gram negativas no fermentadoras lo hace ser más adecuado para el tratamiento empírico de las infecciones graves adquiridas en la comunidad que para las infecciones intrahospitalarias<sup>21,22</sup>.

Químicamente, ertapenem contiene en su estructura los anillos fusionados característicos del grupo carbapenémico, similares a los de las penicilinas, los que consisten en un anillo  $\beta$ -lactámico y otro anillo tiazolidina con sustitución del azufre de la posición 1 por un carbono y la presencia de un enlace insaturado entre los carbonos de posición 2 y 3<sup>23-26</sup>. En la posición 6 posee un sustituyente trans- $\alpha$ -1-hidroxietil que le confiere mayor estabilidad frente a  $\beta$ -lactamasas, en comparación con la cadena lateral de las penicilinas y cefalosporinas que tienen una configuración *cis*<sup>20,23,25,26</sup>. Además, ertapenem tiene en la posición 1 un sustituyente 1- $\beta$ -metil que explica la mayor estabilidad a las enzimas DHP-1 presentes en las células del túbulo renal proximal<sup>20,24,26</sup>. En la posición 2 posee un grupo ácido benzoico meta-sustituido, el cual sería el responsable de otorgar las propiedades farmacocinéticas y del espectro de acción demostrado por ertapenem que lo diferencian de los otros carbapenémicos<sup>20</sup>. Por un lado, esta sustitución incrementa el peso molecular y lipofilia de la molécula y, por otro, concede una carga negativa global sobre la molécula debido a la ionización del ácido carboxílico del anillo bencénico a pH fisiológico, explicando así la alta unión a proteínas de este antibiótico, lo que provoca, a su vez, una prolongación de la vida media y que sea administrado una vez al día<sup>20,27</sup>.

Figura N°2. Estructura química de ertapenem



## II. MECANISMO DE ACCIÓN Y PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS DE ERTAPENEM

Ertapenem, al igual que otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos, penetra rápidamente a través de la pared bacteriana e inhibe su síntesis uniéndose a las denominadas proteínas de unión a penicilinas (*PBPs* por sus siglas en inglés). Esta unión inactiva a las *PBPs* e impide la transpeptidación de las cadenas de peptidoglicano, lo cual es esencial para la formación de la pared bacteriana. Existen diversos tipos de *PBPs* (1a,1b,2,3,4 y 5) y la acción de ertapenem está determinada por la diferente afinidad que tiene por cada una de ellas, siendo mayor por *PBP2* y seguida por *PBP3*. Al momento de la lisis de la célula bacteriana no existe una filamentación celular, como ocurre con las cefalosporinas de tercera generación, lo que disminuye la liberación de endotoxinas, debido a que el aumento de la biomasa es menor. Todo esto conduce a una acción bactericida rápida y a una escasa liberación de endotoxinas de las bacterias Gram negativas, con menores consecuencias desfavorables en la respuesta del organismo a la acción antibiótica.

Ertapenem se caracteriza por tener un efecto post-antibiótico a concentraciones por debajo de la Concentración Inhibitoria Mínima (*CIM*) frente a bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae*. Esto se traduce en una buena farmacocinética de ertapenem, apoyando el hecho de una sola administración diaria.

Dentro de las indicaciones de ertapenem aprobadas por la *European Medicines Agency* (EMA) y la *Food and Drug Administration* (FDA), actualmente se encuentran: infecciones intraabdominales, neumonía adquirida en la comunidad, infecciones ginecológicas agudas, infecciones del pie diabético que afectan a la piel y tejidos, infecciones urinarias complicadas y profilaxis de la infección en cirugía colorrectal.

Ertapenem se caracteriza por presentar una relación farmacocinética/farmacodinámica (PK/PD) de tipo tiempo-dependiente, lo que significa que la concentración del fármaco libre debe superar el valor de la Concentración Inhibitoria Mínima del agente patógeno al menos el 40%<sup>19,28,29</sup> del tiempo dentro de un intervalo de administración, el que corresponde a 24 horas. También se ha descrito que el valor de la concentración plasmática máxima alcanzada en promedio es de  $154,9 \pm 22,0$  mg/l al final de una infusión intravenosa de 1 gramo durante 30 minutos, de  $9,3 \pm 2,8$  mg/l a las 12 horas; y de  $1,2 \pm 0,6$  mg/l a las 24 horas luego de la administración<sup>19,29</sup>.

En cuanto a otras propiedades farmacocinéticas, ertapenem presenta una alta unión a proteínas plasmáticas, principalmente a albúmina, llegando a valores de entre el 92% y el 95%<sup>19-21,29</sup> de unión; la vida media de eliminación plasmática corresponde a 4 horas en promedio<sup>19,28,29</sup>, y la principal vía de eliminación es la renal, donde el 80%<sup>19,29</sup> del aclaramiento total se produce por este medio, del cual la mitad corresponde a fármaco inalterado y la otra mitad a la forma metabolizada inactiva de ertapenem, mientras que el 10%<sup>19</sup> se elimina por las heces. Además, luego de repetidas dosis únicas diarias de ertapenem, este no ha mostrado acumulación en individuos jóvenes ni ancianos sanos<sup>29</sup>.



#### **1.4. PERFIL FARMACOCINÉTICO DE ERTAPENEM EN EL ADULTO MAYOR**

Se han descrito algunas diferencias en el perfil farmacocinético de ertapenem obtenido de voluntarios jóvenes sanos, en comparación con el de adultos mayores sanos que han participado de estudios. En este último grupo, a altas concentraciones plasmáticas se ha encontrado una disminución general en el aclaramiento plasmático de ertapenem y un ligero incremento de la vida media, los que fueron asociados con un aumento en el Área Bajo la Curva (ABC) promedio comparado con sujetos jóvenes sanos. Adicionalmente, los voluntarios mayores han presentado ligeros aumentos en el porcentaje de la fracción libre de ertapenem, en comparación con más jóvenes<sup>29</sup>.

Como se puede notar, todas estas propiedades se han descrito en sujetos mayores sanos con características similares a un adulto joven, lo cual corresponde a un escenario bastante distinto al perfil de los pacientes que son atendidos en una Unidad Geriátrica de Agudos (UGA). Estos son, en su mayoría, adultos mayores que han experimentado cambios fisiológicos propios de la senescencia, tales como la modificación en la composición corporal, dada fundamentalmente por el aumento del tejido adiposo y por la disminución de la masa muscular y del volumen de agua corporal total; además de la reducción del volumen renal y hepático. Estos factores, sumados a las enfermedades que presentan los pacientes cuando son hospitalizados en unidades como las UGA, los hacen más propensos a desarrollar hipoalbuminemia, sarcopenia o falla renal, condiciones que aumentan las posibilidades de experimentar alteraciones en los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de ciertos medicamentos tales como ertapenem.

Debido a estas razones y, con la finalidad de optimizar la terapia en estos pacientes, es que resulta de gran importancia establecer el perfil farmacocinético de ertapenem en pacientes geriátricos hospitalizados en unidades no críticas, para lo cual previamente es necesario desarrollar y validar una metodología analítica capaz de cuantificar las concentraciones totales alcanzadas por el antibiótico en plasma humano a lo largo de un intervalo de administración.

## **2. HIPÓTESIS**

Los cambios fisiológicos asociados al envejecimiento, sumados a las características de co-morbilidad que presentan los adultos mayores hospitalizados en unidades no críticas, alteran la disposición de ertapenem total y afectan el logro de un índice PK/PD óptimo, por lo que su medición podría ser una herramienta para mejorar la terapia antimicrobiana en estos pacientes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar y optimizar una metodología analítica mediante HPLC acoplado a un detector UV/Vis para cuantificar ertapenem total en plasma humano, para su posterior aplicación en la caracterización del perfil farmacocinético de este antibiótico en adultos mayores hospitalizados en unidades no críticas.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Evaluar la influencia de diferentes condiciones experimentales en la obtención de una metodología analítica apropiada en selectividad y sensibilidad para cuantificar ertapenem en plasma.
- II. Establecer los parámetros necesarios para realizar la validación de la metodología analítica propuesta.
- III. Caracterizar a los adultos mayores hospitalizados desde el aspecto biomédico y antropométrico.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. TIPO DE ESTUDIO, POBLACIÓN Y DURACIÓN

El presente trabajo es parte de un estudio prospectivo observacional no randomizado llamado “Farmacocinética Poblacional de Ertapenem en Adultos Mayores Hospitalizados en Unidades no Críticas”, realizado con pacientes del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH), internados en la UGA durante el periodo comprendido entre noviembre de 2015 y junio de 2017.

### 4.2. ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO

El trabajo fue organizado en dos etapas, cada una de las cuales se realizó en distintos centros:

- I. *Etapa Clínica:* Pasantía en la UGA del HCUCH, donde se participó de una capacitación en mediciones antropométricas de adultos mayores y se llevó a cabo el reclutamiento de pacientes que cumplieran con los criterios de selección y muestreo para el estudio.
- II. *Etapa Analítica:* Desarrollo y optimización de una metodología analítica para la determinación de ertapenem total en las muestras de los pacientes. Fue realizada en el Laboratorio de Biofarmacia de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

## 4.2.1. ETAPA CLÍNICA

### I. CAPACITACIÓN EN MEDICIONES ANTROPOMÉTRICAS

Se realizó una revisión bibliográfica de las ecuaciones para estimar la estatura y peso en adultos mayores de ambos sexos que hubieran sido utilizadas en poblaciones semejantes a la realidad nacional. Esto quiere decir que se seleccionaron aquellas empleadas en personas de origen latinoamericano de edades cercanas a la esperanza de vida en Chile estimada el año 2015 por la Organización Mundial de la Salud (OMS): 77 años para los hombres y 83 años para las mujeres<sup>30</sup>.

Además, fue necesaria una capacitación orientada a la toma de mediciones antropométricas en pacientes geriátricos, la cual fue realizada por profesionales del Servicio de Nutrición del HCUCH encargados del estado nutricional de los pacientes hospitalizados en la UGA. Durante las capacitaciones se emplearon los siguientes instrumentos antropométricos:

- *Cinta antropométrica*: Cinta flexible e inextensible con escala de unidades en centímetros. Se utiliza para medir perímetros, longitudes y para localización del punto medio entre dos puntos anatómicos.



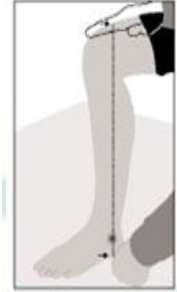
- *Cáliper*: Instrumento para medir el tejido adiposo en determinados puntos de la superficie corporal. Posee una capacidad de medición de hasta 80 mm y una precisión de 1 mm.



- *Lápiz marcador de piel*: Lápiz tipo plumón usado para marcar los puntos anatómicos requeridos.

Con estos instrumentos se tomaron mediciones antropométricas a los pacientes siguiendo las técnicas estandarizadas descritas a continuación<sup>31</sup>:

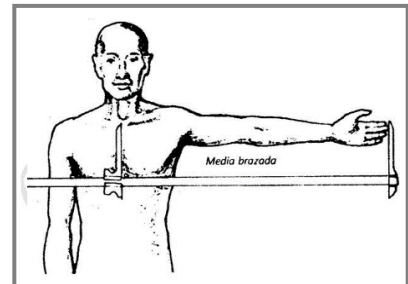
a) **Altura de Rodilla (AR):** Técnica diseñada principalmente para personas de 60 a 90 años de edad<sup>9</sup>. Debe medirse en la pierna izquierda si es posible, con el paciente sentado sin zapatos, con la pierna descubierta y con la rodilla formando un ángulo de 90°, mientras apoya los pies sobre una superficie lisa. Se debe medir la distancia entre la parte más superior de la rodilla y el suelo siguiendo la línea recta que pasa por la prominencia del tobillo. En pacientes postrados es posible hacer la medición en decúbito supino<sup>11</sup>.



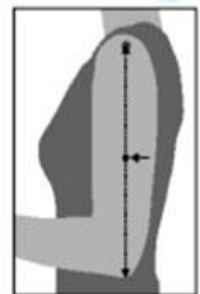
b) **Circunferencia de Pierna (CP):** Siguiendo la técnica para la obtención de la AR, se debe colocar la cinta métrica alrededor de la pantorrilla y deslizarla hasta localizar la circunferencia máxima. Se debe proceder a medirla sin comprimir los tejidos. La medición antropométrica tiene que realizarse por lo menos tres veces, para verificar la precisión de la medida y obtener el valor promedio.



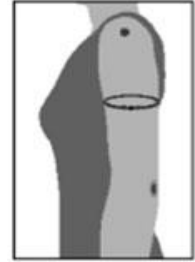
c) **Media Envergadura de Brazo (MEB):** Con el brazo descubierta y extendido hacia el lado con las palmas de las manos apuntando al frente, en posición supina, y dirección perpendicular al eje del cuerpo, se procede a medir con una cinta métrica la distancia entre el punto medio de la horquilla esternal y la punta del dedo índice. El resultado obtenido se multiplica por 2 para obtener la estatura<sup>6</sup>.



d) **Largo del Brazo (LB):** Se debe ubicar al paciente en posición supina con el antebrazo flexionado por encima del tronco, formando un ángulo de 90° y con la palma hacia abajo. Es necesario palpar la esquina superior de la escápula hasta localizar el vértice del acromion y luego medir con la cinta métrica desde este punto anatómico hasta el borde inferior del olécranon, por debajo del codo.



e) **Circunferencia Braquial (CB):** Usando la misma técnica para obtener el LB, se debe calcular el punto medio y marcarlo, usando para ello el lápiz marcador de piel. Luego es necesario elevar un poco el brazo del paciente para permitir que la cinta métrica lo rodee sobre el punto medio que fue marcado sin comprimir los tejidos.



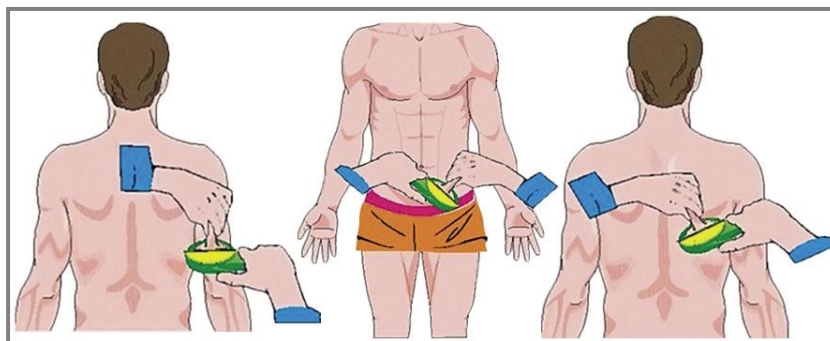
f) **Pliegue Tricipital (PT):** Es el punto medio en la región posterior del brazo, localizado entre el acromion y el olécranon. Hay que levantar el pliegue cutáneo y colocar el calíper sobre este durante aproximadamente cuatro segundos. Repetir dos veces la medición y calcular el valor promedio. Este pliegue se mide para estimar las reservas de grasa del paciente.

g) **Pliegue Bicipital (PB):** Se toma al mismo nivel que el PT, pero en la cara anterior del brazo, siguiendo el eje longitudinal. Se sigue el mismo procedimiento descrito en el punto anterior.

h) **Pliegue Sub-escapular (PSE):** Se mide 1 cm por debajo del ángulo de la escápula, siguiendo una línea paralela a la hendidura natural de la piel (45° de la línea horizontal).

i) **Pliegue Supra-ilíaco (PSI):** Es necesario localizar el ala lateral superior de la cresta ilíaca en su cruce con la línea media axilar. Luego se tracciona el tejido subcutáneo y se sujeta para aplicar el calíper en forma perpendicular al propio eje.

**Figura N°3. Pliegues antropométricos de izquierda a derecha: Pliegue Bicipital y Pliegue Tricipital; Pliegue Supra-ilíaco; Pliegue Sub-escapular.**



Con estos parámetros se procedieron a calcular las medidas antropométricas de los pacientes con las siguientes ecuaciones:

**i. Estatura:**

- A partir de Media Envergadura de Brazo para mujeres y hombres <sup>6</sup>:

$$Estatura (cm) = MEB (cm) \times 2$$

- A partir de la Altura de Rodilla<sup>9</sup>:

$$Estatura mujer (cm) = (1,83 \times AR(cm)) - (0,24 \times edad) + 84,88$$
$$Estatura hombre (cm) = (2,02 \times AR(cm)) - (0,04 \times edad(años)) + 64,19$$

**ii. Peso Corporal:**

- Mediante Altura de Rodilla y Circunferencia Braquial para mujeres y hombres de 60 a 80 años<sup>11</sup>:

$$Peso mujer (kg) = (1,09 \times AR (cm)) + (2,68 \times CB (cm)) - 65,51$$
$$Peso hombre (kg) = (1,10 \times AR (cm)) + (3,07 \times CB (cm)) - 75,81$$

- Estimación por medio de la Circunferencia Braquial, Circunferencia de Pierna, Pliegue Tricipital y Altura de Rodilla<sup>32</sup>:

$$Peso mujer (kg) = (0,98 \times CB) + (1,27 \times CP) + (0,4 \times PT) + (0,87 \times AR) - 62,35$$
$$Peso hombre (kg) = (1,73 \times CB) + (0,98 \times CP) + (0,37 \times PT) + (1,16 \times AR) - 81,69$$



iii. Índice de Masa Corporal (IMC):

$$IMC = \frac{Peso}{(Estatura)^2}$$

iv. Densidad (D) para personas desde 50 años<sup>33</sup>:

$$Densidad (kg/m^3) = C - [M \times \log(PB + PT + PSE + PSI)]$$

Si es mujer: C = 1,1339 y M = 0,0645; Si es hombre: C = 1,1715 y M = 0,0779

v. Peso magro y peso graso<sup>33</sup>:

$$\% Grasa = \left[ \left( \frac{5,053}{D} \right) - 4,614 \right] \times 100\% \quad Peso\ graso = \left( \frac{\% Grasa \times Peso\ total}{100} \right)$$
$$\% Magro = \left( \frac{Peso\ magro}{Peso\ total} \right) \times 100 \quad Peso\ magro = Peso\ total - Peso\ graso$$

vi. Indicadores de masa magra y masa grasa<sup>10</sup>:

$$\begin{aligned} \text{Área Braquial [AB]} (mm^2) &= \frac{CB^3}{4\pi} \\ \text{Área Muscular Braquial [AMB]} (mm^2) &= \frac{PMB^2}{4\pi} \\ \text{Perímetro Muscular Braquial [PMB]} (mm) &= CB - (\pi \times PT) \\ \text{Área Grasa Braquial [AGB]} (mm^2) &= AB - AMB \end{aligned}$$

## **II. RECLUTAMIENTO DE PACIENTES**

Se desarrolló un protocolo de trabajo clínico según lo establecido por la Ley chilena N° 20.584 y la Declaración de Helsinki promulgada por la Asociación Médica Mundial en lo relativo a los principios éticos para llevar a cabo investigaciones científicas que involucran la participación de seres humanos. De acuerdo también con los estándares internacionales de las “Buenas Prácticas Clínicas”<sup>34,35</sup>, el presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética del HCUCH, de manera de garantizar la protección de los derechos, seguridad, integridad y confidencialidad de los voluntarios que formen parte del estudio, asegurando a la vez que los resultados obtenidos sean veraces y precisos. Para esto, a los pacientes o a algún familiar a cargo se les presentó un Consentimiento Informado, mediante el cual confirmaron voluntariamente su deseo de participar, luego de haber sido informados sobre todos los aspectos relevantes para tomar la decisión.

También fue necesario diseñar un protocolo para la recolección y manejo de las muestras y una pauta de horario de muestreo (Anexos N°1 y 2, respectivamente).

### **SELECCIÓN DE PACIENTES**

Se determinó un tamaño de muestra de seis pacientes, quienes fueron reclutados según los criterios de inclusión y exclusión detallados a continuación:

- Criterios de inclusión
  - Pacientes de 65 años o más.
  - Ambos sexos.
  - Hospitalizados en Unidades no Críticas del HCUCH.
  - A quienes se les esté administrando ertapenem por vía intravenosa.
  
- Criterios de exclusión
  - Pacientes en hemodiálisis o peritoneodiálisis.
  - Quienes no puedan otorgar personalmente su consentimiento para participar en el estudio, ni contar con la autorización del familiar responsable que lo haga en su representación.

## **RECOLECCIÓN DE DATOS**

La recolección de información de los pacientes se realizó en una ficha de registro especialmente diseñada para este estudio. Los datos para la caracterización biomédica, antropométrica y farmacoterapéutica durante el tratamiento con ertapenem fueron anotados en dicho formulario, el que se manejó bajo confidencialidad mediante un sistema de códigos (Anexo N°3).

Se empleó como fuente de información la ficha clínica electrónica del paciente, que incluía las intervenciones realizadas por el equipo profesional multidisciplinario de la UGA y entrevistas con el personal médico y de enfermería a cargo del paciente.

En una sección aparte de la ficha de registro se recopiló la información que caracterizó el muestreo farmacocinético de ertapenem durante las 24 horas que duró el procedimiento.

Se utilizó el programa Microsoft Excel 2016 © para el análisis estadístico descriptivo y para las pruebas de significancia de los resultados medidos de más de una forma para los pacientes reclutados. Es por esto, que los resultados se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar o como probabilidad de significancia con el 95% de confianza, según corresponda.

## **TOMA DE MUESTRAS PARA MUESTREO FARMACOCINÉTICO**

Después de la administración intravenosa de ertapenem, se extrajeron muestras sanguíneas a distintos tiempos durante un periodo de 24 horas, empezando con una muestra basal antes de la administración del antibiótico y terminando con una muestra antes de la siguiente dosis de ertapenem. De esta forma se pretendía observar los cambios de concentraciones plasmáticas de ertapenem en el tiempo.

Se tomó una muestra sanguínea de 3 ml en cada tiempo programado, la cual fue extraída por personal de enfermería de la UGA a través de una punción venosa o por medio de una llave de tres pasos que también permitía la administración del antibiótico, y se transfirió a un tubo heparinizado. Cada muestra fue rotulada con el código asignado para identificar al paciente y con el número de muestra correspondiente. En la ficha de recolección de datos de

cada una de las personas se anotó la hora exacta en que fueron extraídas las muestras, así como también cualquier otro dato que se considerara relevante para el muestreo.

Luego de extraer cada muestra, esta se mantuvo a aproximadamente 4 °C dentro de una nevera portátil, para ser transportada inmediatamente al Laboratorio de Endocrinología de esta misma Unidad del HCUCH. Una vez allí, la muestra fue centrifugada por 10 minutos a 2.500 g y 4 °C para separar el plasma, el cual fue transferido a tubos eppendorf debidamente rotulados y posteriormente almacenados a -80 °C hasta su análisis<sup>36</sup>.

Durante la estancia de estos pacientes en la UGA se les tomaron las mediciones antropométricas correspondientes y estas fueron registradas en la ficha de seguimiento de cada voluntario.

## 4.2.2. ETAPA ANALÍTICA

Se desarrolló y optimizó una metodología analítica para la determinación de ertapenem en plasma humano mediante un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) acoplado a un detector Ultravioleta/Visible (UV/Vis). Durante esta etapa se trabajó en el Laboratorio de Biofarmacia del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

### PLAN DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Se desarrolló inicialmente un plan de validación para el diseño experimental basado en la “*Guidance for Industry*”<sup>37</sup> de la FDA y la “*Guideline on Bioanalytical Method Validation*”<sup>38</sup> de la EMA, las cuales corresponden a documentos internacionalmente reconocidos que definen una serie de pruebas normalizadas y experimentales para establecer la validación de métodos bioanalíticos. A continuación, se describe el protocolo de desarrollo de la metodología analítica propuesta para el análisis de muestras utilizando plasma como matriz biológica.

#### I. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para diseñar la metodología analítica se utilizó como referencia el estudio publicado por McWhinney B., et al. en el año 2010, titulado: “*Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection*”<sup>39</sup>. De esta publicación se extrajeron tanto las condiciones cromatográficas como el procedimiento para el tratamiento de las muestras que se utilizaron al inicio de la investigación y aparecen resumidas en el apartado de Resultados y Discusión (Tabla N°6).

Basándose en estas condiciones, el diseño experimental se planteó como se presenta a continuación:

##### a) Reactivos:

El antibiótico fue obtenido de una formulación comercial para administración inyectable correspondiente a ertapenem sódico (Invanz® 1g, laboratorio Merck Sharp and Dohme). El fosfato de sodio monobásico monohidratado (adquirido en Merk Chile) utilizado fue de grado

analítico, mientras que el acetonitrilo (LiChrosolv®, adquirido en Merck Chile) era de grado HPLC. En cuanto al agua, esta correspondió a agua desionizada (18,2 MΩ de resistividad y tamaño de poro de 0,22 μm). El plasma blanco fue donado por el Laboratorio Central del HCUCH.

**Tabla N°2. Reactivos utilizados durante el desarrollo de la metodología.**

Reactivo	Descripción
Ertapenem	ERT. Invanz®, Merck Sharp and Dohme,
Fosfato de sodio monobásico monohidratado	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O, grado analítico, Merck Chile (PM:137,99 g/mol)
Acetonitrilo	LiChrosolv®, grado gradiente para cromatografía líquida, Merck Chile
Agua	Agua desionizada de Tipo I, obtenida con sistema Mili-Q.

**b) Estándares de Referencia:**

El análisis de fármacos en una matriz biológica se realiza usando estándares de calibración, controles de calidad y muestras para determinar la estabilidad del analito, a las que se les adicionan estándares de referencia. Para este estudio no se dispuso de un material certificado de referencia, sin embargo, durante toda la investigación se empleó ertapenem (Invanz®) fabricado por el laboratorio Merck Sharp and Dohme, el cual corresponde a un medicamento innovador que aún no dispone de copias en el mercado y, por lo tanto, es el único disponible en Chile. Invanz® se utilizó tanto en las soluciones utilizadas en el proceso de validación como en el tratamiento de los pacientes que participaron del estudio, por lo que ambos analitos son idénticos.

- N° Serie Invanz® utilizado en validación: MO47795
- Fecha de Elaboración: 09/2016; Fecha de Vencimiento: 08/2018.
- Peso: 475,52 g/mol
- Fórmula: C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>S
- pKa<sub>1</sub>: 3,37; pKa<sub>2</sub>: 4,1; pKa<sub>3</sub>: 9,03

Adicionalmente, se probaron los siguientes fármacos para ser utilizados como estándares internos durante el desarrollo de la metodología analítica:

- Cefotaxima para administración inyectable, Laboratorio Biosano.
- Ranitidina clorhidrato, estándar de potencia 99,7%, Laboratorio Reutter.
- Ketoprofeno inyectable, Laboratorio Genfar.
- Ácido salicílico para síntesis, adquirido en Merck Chile.
- Bencilpenicilina sódica 1.000.000 U.I. para administración inyectable, Laboratorio OPKO.

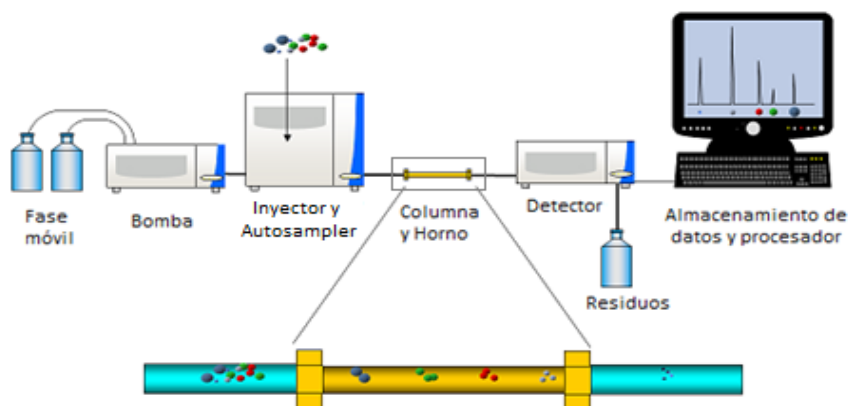
### c) Equipo y condiciones cromatográficas:

Se utilizó un equipo *High Performance Liquid Chromatography* acoplado a un detector de espectrofotometría Ultravioleta-Visible (HPLC-UV/Vis), de marca Perkin Elmer y modelo Flexar®.

El sistema cromatográfico contó con una bomba Flexar Quaternary LC, *autosampler* Flexar, horno de columna Flexar que mantuvo la temperatura a 25 °C, y un detector Flexar UV/Vis. Se utilizó el software *Chromera Chromatography Data system* para la adquisición de los datos.

La separación se llevó a cabo con una columna Waters Spherisorb® ODS 2 C18 (4,6 x 250 mm y tamaño de partícula 5 µm) y con una fase móvil compuesta por *buffer* fosfato y acetonitrilo.

**Figura N°4. Componentes básicos de un equipo de High Performance Liquid Chromatography (HPLC).**



Para la preparación del *buffer* fosfato, se pesó en una balanza analítica exactamente alrededor de 1,38 g de fosfato de sodio monobásico monohidratado, los cuales fueron llevados a un matraz aforado de 1 L al que se le agregó agua desionizada hasta llegar al aforo. La solución se colocó sobre una placa calefactora para ser agitada con un agitador magnético y luego se filtró al vacío en un sistema Millipore® con tamaño de poro 0,22 µm. Posteriormente, la solución filtrada se trasvasió a una botella de laboratorio y se ajustó el pH a 2,4 con gotas de ácido clorhídrico (HCl) 2 M.

**d) Preparación de las soluciones y muestras a medir:**

Se estableció un rango preliminar de concentraciones de trabajo utilizando como referencia farmacocinética la concentración plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) alcanzada por ertapenem tras una única infusión de 1 g durante 30 minutos en sujetos jóvenes y mayores sanos. Se fijó el límite superior de la curva de calibración en el 200% de dicho valor:

$$\begin{array}{l} C_{m\acute{a}x} \text{ ertapenem} \longrightarrow 150 \text{ mg/L (en promedio)} \\ 200\% C_{m\acute{a}x} \text{ ertapenem} \longrightarrow 300 \text{ mg/L} \end{array}$$

El rango preliminar de linealidad abarcó desde 1 mg/L hasta 300 mg/L para la construcción de la curva de calibración y las soluciones controles de calidad. A continuación, se describen los diferentes tipos de soluciones usadas y cómo fueron preparadas:

- Solución stock de ertapenem: Corresponde a la solución madre de alta concentración obtenida a partir de la reconstitución de 1 g de ertapenem Invanz®. Se diluyó el contenido de 1 frasco de ertapenem Invanz® (1g) con agua desionizada. Para esto, se tomaron aproximadamente 8 ml de agua con una jeringa, se introdujeron en el frasco y luego se agitó la solución. Enseguida se procedió a retirar la solución del frasco con la misma jeringa y se llevó a un matraz de 10 ml donde se aforó con agua desionizada y se agitó en vórtex durante 30 segundos, resultando una solución de concentración 100.000 mg/L identificada como solución stock.

$$\begin{array}{l} 1 \text{ g} = 1000 \text{ mg} \\ 1000 \text{ mg} \rightarrow 10 \text{ mL} \\ \frac{1000 \text{ mg}}{10 \text{ mL}} \times \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} = 100.000 \text{ mg/L} \end{array}$$



- Soluciones de trabajo de ertapenem: Fueron obtenidas a partir de diluciones de la solución stock y se utilizaron para generar las soluciones calibrantes. Las concentraciones necesarias se calcularon con la siguiente fórmula:

**Fórmula N°1:**

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Donde:

C<sub>1</sub>: Concentración inicial. Concentración de la solución stock.

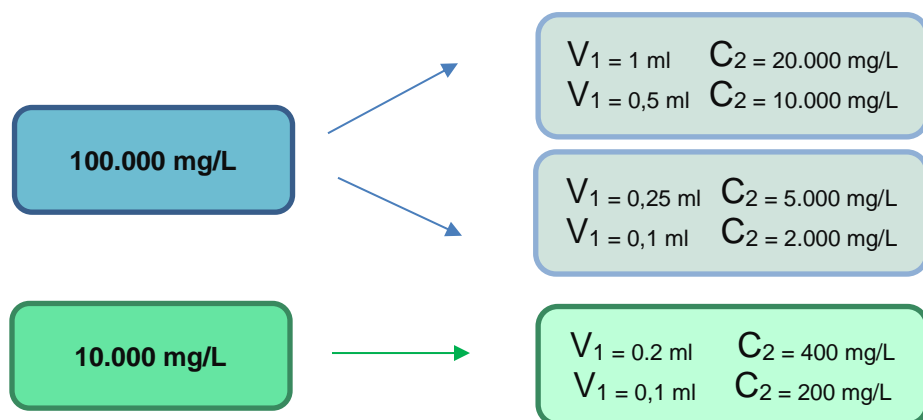
V<sub>1</sub>: Volumen inicial. Volumen de la solución stock.

C<sub>2</sub>: Concentración final. Concentración final de la solución de trabajo.

V<sub>2</sub>: Volumen final. Volumen final de la solución de trabajo.

Siguiendo esta ecuación, con una micropipeta se tomaron alícuotas de diferentes volúmenes que se llevaron a matraces aforados de 5 ml, donde se completó el volumen con agua desionizada, resultando soluciones de trabajo de concentraciones 20.000 mg/L, 10.000 mg/L, 5.000 mg/L, 2.000 mg/L, 400 mg/L y 200 mg/L.

**Esquema N°1. Concentraciones de trabajo de ertapenem.**



- Soluciones calibrantes: Batería de diferentes soluciones de ertapenem en plasma, cuyas concentraciones permiten establecer la curva de calibración. Para su elaboración se tomaron los volúmenes necesarios de la solución de trabajo requerida, plasma blanco y acetonitrilo, generando así un conjunto de soluciones de distinta concentración plasmática de ertapenem. La cantidad de ertapenem adicionada a las soluciones calibrantes siempre fue menor al 10% del plasma. Dichos volúmenes y soluciones finales de ertapenem se calcularon siguiendo la Fórmula N°1 y se presentan en Tabla N°3.

**Tabla N°3. Preparación de las soluciones calibrantes a partir de las soluciones de trabajo, plasma y acetonitrilo (ACN).**

C <sub>1</sub> ERT TRABAJO (mg/L)	V <sub>1</sub> ERT TRABAJO (ml)	V PLASMA BLANCO (ml)	V ACN (ml)	C <sub>2</sub> ERT FINAL (mg/L)
20.000	0,090	1,910	4	300
10.000	0,120	1,880	4	200
10.000	0,108	1,892	4	180
5.000	0,120	1,880	4	100
5.000	0,090	1,910	4	75
2.000	0,150	1,850	4	50
2.000	0,120	1,880	4	40
2.000	0,060	1,940	4	20
400	0,150	1,850	4	10
400	0,120	1,880	4	8
200	0,150	1,850	4	5
200	0,090	1,910	4	3
200	0,060	1,940	4	2
200	0,030	1,970	4	1
---	---	2,000	4	Plasma Blanco

- Soluciones de control de calidad (Quality Control, QC): Soluciones fabricadas para evaluar la calidad de la curva de calibración. Se prepararon los controles de calidad siguiendo la misma forma de elaboración de las soluciones calibrantes. Según la FDA<sup>37</sup> y la EMA<sup>38</sup>, se deben incorporar al menos 3 QCs en la curva, según el siguiente criterio:

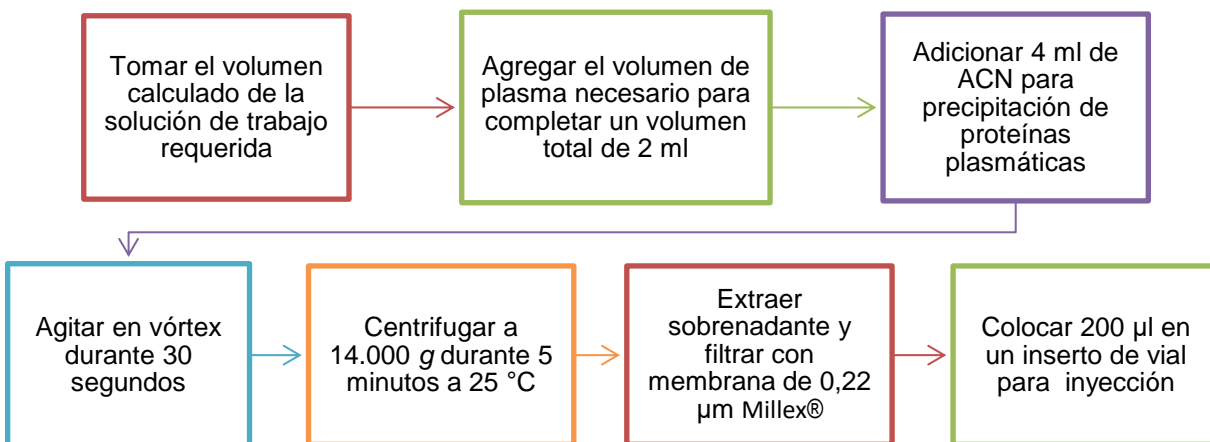
- QC bajo: Dentro de 3 veces el LOQ; QC bajo = 30 mg/L.
- QC medio: Entre el 30% y el 50% del rango de la curva; QC medio = 125 mg/L
- QC alto: Al menos el 75% del rango superior de la curva; QC alto = 250 mg/L.

**Tabla N°4. Volúmenes y soluciones de trabajo utilizados para preparar los controles de calidad.**

$C_1$ ERT TRABAJO (mg/L)	$V_1$ ERT TRABAJO (ml)	$V$ PLASMA BLANCO (ml)	$V$ ACN (ml)	$C_2$ QC (mg/L)
10.000	0,150	1,850	4	250
5.000	0,150	1,850	4	125
2.000	0,090	1,910	4	30

Para la elaboración de las soluciones calibrantes y controles de calidad, el plasma fue sometido a un proceso de purificación con acetonitrilo con la finalidad de precipitar las proteínas. Para esto, las muestras se prepararon en tubos de centrifugación de polipropileno de 15 ml y el sobrenadante obtenido se pasó por un filtro de jeringa Millex® de tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$ , el cual fue recogido en tubos eppendorf para su posterior almacenamiento. Parte del filtrado fue transferido a un inserto que se colocó dentro de un vial para ser medido por cromatografía y el resto se almacenó a -80 °C. Las etapas del proceso de preparación de las muestras se resumen en el siguiente esquema:

**Esquema N°2. Metodología para el tratamiento de las muestras y extracción.**



**e) Conservación de las muestras:**

Todas las muestras fueron trasvasiadas a tubos eppendorf y rotuladas con su nombre, concentración y fecha de elaboración. Posteriormente se almacenaron en un refrigerador a - 80 °C hasta el momento de su análisis.

## II. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

El plan de validación incluyó la determinación de los parámetros de validación exigidos por los manuales “*Guidance for Industry*”<sup>37</sup> y “*Guideline on Bioanalytical Method Validation*”<sup>38</sup>, en los que, de cumplirse con éxito, se demuestra que el método analítico es idóneo para el uso previsto y se asegura que los resultados entregados por dicho método son confiables. Las pruebas de validación incluyeron la demostración de los siguientes parámetros: selectividad, linealidad, límites de detección y cuantificación, exactitud, precisión, recuperación y estabilidad.

### a) Selectividad:

Es la capacidad de un método analítico de diferenciar y cuantificar un analito en presencia de otros componentes de la muestra<sup>37</sup>. Para esto, se utilizan al menos 6 fuentes diferentes de plasma blanco que son analizadas y evaluadas por separado en búsqueda de posibles interferentes. Normalmente, se acepta la ausencia de componentes interferentes cuando la respuesta es inferior al 20% del límite de cuantificación para el analito y del 5% para el estándar interno<sup>38</sup>.

Para analizar la selectividad del método, todas las muestras fueron procesadas según el Esquema N°2, pero sin la adición del analito. Aquellos plasmas que no tuvieran señales de interferencia a los tiempos de retención de ERT fueron utilizados para generar las muestras en el proceso de validación.

### b) Curva de calibración:

Es la relación proporcional que existe entre una respuesta o resultado que entrega un método analítico y la cantidad de analito que se mide en un determinado rango de concentraciones. Idealmente, antes de llevar a cabo la validación ya se debe conocer el rango de concentraciones esperado, el cual tiene que ser cubierto por la curva de calibración, que está definida por: un mínimo de 6 muestras calibrantes (incluyendo a los límites inferior y superior de cuantificación), una muestra blanco y una muestra cero<sup>37,38</sup>, de manera de abarcar todo el intervalo de trabajo hasta 200% el valor de la  $C_{m\acute{a}x}$  plasmática de ertapenem. Los estándares de calibración deben ser preparados en la misma matriz biológica prevista para el estudio.

Las muestras blanco y cero no deben ser consideradas para calcular los parámetros de la curva de calibración.

Para cada concentración calculada con la ecuación de la recta, el promedio de los valores debe estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal, excepto para la concentración más baja, donde se permite que esté dentro del  $\pm 20\%$ . Al menos el 75% de los estándares de calibración deben cumplir con este criterio<sup>37,38</sup>, incluyendo el límite de cuantificación y el calibrante de mayor concentración<sup>37</sup>. Deben reportarse un mínimo de tres curvas de calibración que hayan sido obtenidas durante la validación.

La ecuación de la recta que aparece en la siguiente fórmula, se establece construyendo un gráfico de área promedio para cada calibrante en función de su concentración, dando origen así a la curva de calibración.

**Fórmula N°2:**

$$Y = m \times a + b$$

Donde:

Y: Eje de las ordenadas. Indica el área o respuesta de cada solución calibrante.

a: Concentración plasmática del analito ERT en mg/L.

m: Pendiente de la recta.

b: Intercepto en la ordenada.

**c) Exactitud:**

Corresponde al grado de cercanía entre el promedio de los resultados de un ensayo y el valor de referencia -también denominado valor nominal-, considerado como verdadero. Esto se realiza por medio de una comparación entre los valores de concentración entregados por la curva de calibración para las muestras medidas y el valor de referencia de cada una de ellas<sup>37,38</sup>. Se calculó a través del error relativo porcentual (ERP), según la Fórmula N°3.

La exactitud de las mediciones se evaluó en cada nivel de concentración y en las muestras QC, realizando 5 determinaciones para cada una de ellas.

**Fórmula N°3:**

$$\% ERP = \frac{|C_i - C_n|}{C_n} \times 100 \quad \rightarrow \quad \% Exactitud = 100\% - \% ERP$$

Donde:

C<sub>i</sub>: Concentración obtenida del analito.

C<sub>n</sub>: Concentración de referencia del analito.

La exactitud debe ser evaluada en las muestras QC y límite de cuantificación (LOQ) dentro de una corrida (exactitud intra-día) y entre diferentes corridas (exactitud inter-día)<sup>37</sup>:

- Exactitud intra-día: Se analiza con un mínimo de 5 muestras por nivel en un mínimo de 4 niveles de concentración, los cuales cubren el rango de la curva de calibración. Los promedios de las concentraciones deben estar dentro del 15% del valor de referencia para las muestras QC, excepto para el LOQ que debe estar dentro del 20% del valor nominal<sup>37,38</sup>.
- Exactitud inter-día: Se deben analizar las muestras LOQ y los QC bajo, medio y alto para un mínimo de 3 corridas en, al menos, 2 días diferentes. Los promedios de las concentraciones deben cumplir el mismo criterio del caso anterior.

**d) Precisión:**

Expresa el grado de dispersión entre una serie de mediciones individuales del analito, cuando las mismas condiciones prescritas son aplicadas repetidamente. La precisión debe demostrarse para cada nivel de concentración usando al menos 5 determinaciones por cada una<sup>37,38</sup>. Se expresa como el coeficiente de variación (CV) entre las mediciones, según la Fórmula N°4:

**Fórmula N°4:**

$$\% CV = \frac{DE}{\bar{x}} \times 100 \quad \rightarrow \quad DE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Donde:

DE: Desviación estándar de las áreas obtenidas.

$\bar{x}$ : Promedio de las áreas para una muestra.

La precisión debe evaluarse en las muestras QCs y LOQ dentro de una corrida (precisión intra-día) y entre diferentes corridas (precisión inter-día)<sup>37,38</sup>:

- Precisión intra-día: Se analiza en las muestras LOQ y los QCs bajo, medio y alto. El valor del CV de las mediciones no debe exceder el 15% para las muestras QCs y el 20% para la muestra LOQ.
- Precisión inter-día: Se deben analizar las muestras LOQ y los QCs bajo, medio y alto para un mínimo de 3 corridas en, al menos, 2 días diferentes. Los valores de los CV de las mediciones deben cumplir el mismo criterio del caso anterior.

**e) Límite de detección (LOD) y Límite de Detección (LOQ):**

El LOD corresponde a la más baja cantidad de analito presente en una muestra que puede ser detectada, mediante una señal analítica, y diferenciada estadísticamente de una muestra blanco, pero no necesariamente puede ser cuantificada con un valor exacto.

El LOQ es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser cuantificada con una adecuada exactitud y precisión. El LOQ se considera el estándar de calibración más bajo si dicho estándar cumple que la respuesta del analito es al menos 5 veces la respuesta de una muestra blanco y si su *peak* es identificable, discreto y reproducible con una precisión dentro del 20% y con una exactitud dentro del  $\pm 20\%$ <sup>37,38</sup>.

Para conocer ambos límites existen varias fórmulas matemáticas, sin embargo, básicamente todas consisten en determinar el valor promedio del blanco analítico ( $Y_{\text{blanco}}$ ) y la desviación estándar ( $s$ ) de la medición.

**Fórmula N°5:**

$$Y_{\text{lod}} = Y_{\text{blanco}} + 3s \quad \rightarrow \quad LOD = \frac{Y_{\text{lod}} - b}{m}$$

**Fórmula N°6:**

$$LOD = \frac{3,3 \times S}{m}$$

**Fórmula N°7:**

$$Y_{loq} = Y_{blanco} + 10 \times s \rightarrow LOQ = \frac{Y_{loq} - b}{m}$$

**Fórmula N°8:**

$$LOQ = \frac{10 \times S}{m}$$

**Fórmula N°9:**

$$S_a = S_{y/x} \left( \sqrt{\frac{\sum_i^n X_i^2}{n \sum_i^n (X_i - \bar{x})^2}} \right)$$

La desviación estándar puede corresponder a la desviación obtenida tras la medición de al menos 5 muestras blanco (se recomienda medir de 5 a 10 blancos analíticos) o a la desviación arrojada por el intercepto de la curva de calibración ( $S_a$ ); esto va a depender de qué método se utilice para la obtención del LOD y el LOQ.

#### **f) Recuperación:**

Se refiere a la respuesta obtenida para una cantidad de analito agregada y extraída de una matriz biológica, comparada con la respuesta obtenida para la concentración verdadera del estándar de referencia. Es decir, corresponde a la eficiencia de extracción de un método analítico dentro de los límites de la variabilidad. La recuperación del analito puede no ser del 100%, pero el grado de recuperación de un analito y del estándar interno debe ser consistente, preciso y reproducible. Deben compararse los resultados de las muestras extraídas a 3 concentraciones (baja, media y alta) con estándares no extraídos que representan una recuperación del 100%<sup>37</sup>. Es recomendable realizar a lo menos 6 mediciones para cada muestra. Se calcula como porcentaje con la siguiente fórmula:

**Fórmula N°10:**

$$\text{Recuperación (\% R)} = \left( \frac{C_e - C_o}{C_a} \right) \times 100$$

Donde:

Ce: Concentración del analito en la muestra enriquecida.

Co: Concentración del analito en la muestra sin fortificar.

Ca: Concentración del analito adicionado a la muestra enriquecida.



### **g) Estabilidad:**

Debe ser medida para asegurar que todos los pasos tomados durante la preparación, análisis y almacenamiento de las muestras no afecten la concentración del analito en la matriz estudiada<sup>38</sup>. La estabilidad debe evaluarse en muestras de baja y alta concentración y en la solución stock de ertapenem<sup>37</sup>. La concentración promedio obtenida para cada muestra debe estar dentro de  $\pm 15\%$  de la concentración nominal<sup>38</sup>.

- Estabilidad durante ciclos de congelamiento y descongelamiento: Al menos tres alícuotas de concentraciones altas y bajas deben almacenarse a la temperatura de almacenamiento durante 24 horas y luego descongelarse a temperatura ambiente, para después ser re-congeladas por otras 12 a 24 horas bajo las mismas condiciones. Este proceso debe repetirse dos veces más y luego del tercer ciclo las muestras deben ser analizadas.
- Estabilidad de temperatura a corto plazo: Tres alícuotas de cada una de las concentraciones deben descongelarse a temperatura ambiente y mantenerse así durante 4 a 24 horas para posteriormente ser analizadas.
- Estabilidad de temperatura a largo plazo: Se mide al menos en tres alícuotas de cada concentración. El tiempo de almacenamiento debe superar el tiempo entre el primer y el último análisis realizado a las muestras, y debe llevarse a cabo en las mismas condiciones que el resto de las muestras. Los resultados obtenidos deben compararse con el promedio de los valores calculados el primer día del test.
- Estabilidad de la solución stock: Debe evaluarse a temperatura ambiente durante al menos 6 horas. Si la solución stock se refrigera o congela durante el período pertinente, la estabilidad debe ser registrada. Una vez cumplido el tiempo de almacenamiento deseado, se debe probar la estabilidad comparando la respuesta entregada por la solución stock con la respuesta obtenida de soluciones recién preparadas.
- Estabilidad post-preparación: La estabilidad de las muestras procesadas también debe ser evaluada. Para esto, se toma en consideración el tiempo que las muestras se encuentran en el *autosampler* durante la ejecución de la corrida para una cierta cantidad de muestras y se comparan las mediciones arrojadas por estas con las de los estándares de calibración originales.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. ETAPA CLÍNICA

La capacitación en mediciones antropométricas y el reclutamiento de los pacientes se llevaron a cabo simultáneamente. Una vez obtenida la firma del consentimiento informado para cada uno de ellos, se procedió con el muestreo farmacocinético y las mediciones antropométricas.

Se encontraron algunos inconvenientes para el análisis de las características antropométricas y la evaluación del estado nutricional de los pacientes adultos mayores hospitalizados en la UGA, debido a diversos factores que influyen en sus mediciones y que dificultan que el proceso se lleve a cabo con exactitud. Estos abarcan desde el impedimento para tomar las medidas antropométricas de manera directa, principalmente el peso y la estatura, hasta la escasa cantidad de investigaciones en el área de la nutrición que estén basadas en este tipo de población. Dentro de los trabajos disponibles que se pueden encontrar también existen limitaciones para llegar a resultados certeros. Como ejemplo de esto se puede mencionar el hecho de que ciertos estudios se han realizado en personas hasta los 72<sup>33</sup> y 74 años<sup>10</sup>, mientras que otros abarcan desde los 60 hasta los 90 o más años de edad<sup>7-9,12</sup>. Al no existir el mismo rango de edad para las mediciones, se hace difícil la interpretación de los resultados, pero al no haber más investigaciones de este tipo, se deben utilizar de igual forma, asumiendo valores de referencia que pertenecen a otro grupo etario.

Otro ejemplo de las limitaciones es que la mayoría de estos estudios se han llevado a cabo en poblaciones diferentes a la de los adultos mayores chilenos, ya que gran parte de ellos se han basado en voluntarios de otros países, con los que se han determinado valores estándares de referencia para la población mundial. Por último, otra dificultad que se encuentra al momento de estimar las mediciones es que no existen investigaciones actualizadas al respecto, ya que, por ejemplo, los valores estándares entregados por la OMS provienen de estudios como los de Frisancho<sup>10</sup> y Durnin<sup>33</sup>, que fueron publicados en los años 1981 y 1974, respectivamente, y las ecuaciones que hasta hoy se usan para estimar el peso o la estatura son parte de trabajos realizados por Chumlea<sup>9,32</sup> durante los años 80.

A pesar de todo esto, se estimó la composición corporal para cada uno de los tres pacientes reclutados a lo largo del periodo del estudio, de los cuales el 66,7% correspondieron

a hombres y la edad promedio fue de  $82,3 \pm 8,0$  años, con un rango que abarcó de 74 a 90 años de edad.

Para las medidas de la pierna, se encontró una Altura de Rodilla promedio de  $45,7 \pm 5,1$  cm y una Circunferencia de Pierna promedio de  $31,7 \pm 1,5$  cm; y para las medidas del brazo, el promedio fue de  $82,3 \pm 3,5$  cm y  $26,0 \pm 4,4$  cm para la Media Envergadura de Brazo y la Circunferencia Braquial, respectivamente.

En cuanto a los pliegues cutáneos, se obtuvo un promedio de  $8 \pm 5$  mm para el Pliegue Bicipital,  $8 \pm 3$  mm para el Pliegue Tricipital,  $9 \pm 3$  mm para el Pliegue Sub-escapular y  $9 \pm 4$  mm para el Pliegue Supra-ilíaco.

En solo el 66,7% de los pacientes se pudo obtener el peso real mediante una balanza de silla y el promedio fue de  $59,2 \pm 15,4$  kg; mientras que, para el total de los pacientes, el peso<sub>1</sub> promedio fue de  $54,5 \pm 8,1$  kg, y el peso<sub>2</sub> promedio fue de  $49,8 \pm 3,8$  kg. Al comparar los pesos estimados entre sí y con el peso real, se puede ver que en todos los casos  $p > 0,05$ , por lo que las diferencias entre las mediciones no son estadísticamente significativas.

La estatura no pudo ser registrada de manera directa, debido a que ninguno de los pacientes podía mantener la bipedestación. Por lo tanto, se procedió a estimarla a partir de la Media Envergadura de Brazo (estatura<sub>1</sub>) y de la edad más la Altura de Rodilla (estatura<sub>2</sub>). Los promedios fueron de  $1,65 \pm 0,1$  m y  $1,52 \pm 0,1$  m, respectivamente. Al comparar ambos resultados se tiene que el primero es mayor, lo que indica que al usar la medida del brazo se obtienen estaturas superiores a las calculadas con el otro método, sin embargo, los resultados no presentan una diferencia significativa entre ellos ( $p > 0,05$ ).

El Índice de Masa Corporal fue medido con las dos estaturas estimadas en el caso anterior y con el peso real de los pacientes (a excepción de ID#1 que se estimó con el peso<sub>1</sub>). El IMC<sub>1</sub> se calculó usando la estatura<sub>1</sub> y el IMC<sub>2</sub> usando la estatura<sub>2</sub>, dando un promedio de  $20,9 \pm 2,4$  y de  $25,4 \pm 8,3$ , respectivamente. Para IMC<sub>2</sub> se obtuvo un promedio mayor, ya que para su determinación se usaron los valores entregados por la ecuación basada en la edad y la Altura de Rodilla de los pacientes, la cual arroja valores menores que los dados por la otra ecuación de estatura. A su vez, si se compara la información entregada por ambos IMC sobre la evaluación del estado nutricional, el IMC<sub>1</sub> indica que la muestra posee un déficit de peso y el IMC<sub>2</sub> establece que el estado nutricional es normal, esto de acuerdo a la clasificación que entrega el Ministerio de Salud<sup>11</sup> para los adultos mayores (Anexo N°4). A pesar de ello, la diferencia estadística entre ambos IMC no es significativa, dado que  $p > 0,05$ .

En cuanto a la composición corporal de la totalidad de los pacientes, los resultados promedios arrojaron valores de densidad  $1,05 \pm 0,01 \text{ kg/m}^3$ ; peso magro de  $44,9 \pm 8,2 \text{ kg}$ ; y peso graso de  $12,2 \pm 4,1 \text{ kg}$ . Esto entrega un valor del  $78,8 \pm 4,2\%$  de masa magra y del  $21,2 \pm 4,2\%$  de masa grasa. Esta última también se determinó mediante la sumatoria de los cuatro pliegues cutáneos y el uso de la tabla correspondiente de la OMS<sup>40</sup> (Anexos N°11 y 17), resultando un valor promedio del  $22,7 \pm 3,7\%$  de grasa. La diferencia entre ambos promedios de % de grasa no fue estadísticamente significativa, debido a que  $p > 0,05$ .

Para hacer una evaluación de las reservas energéticas y proteicas de los pacientes, se emplearon las ecuaciones y tablas propuestas por Frisancho<sup>10</sup> (Anexo N°5), las cuales, además, forman parte de las tablas de referencia propuestas por la OMS<sup>40</sup> (Anexos N°6 – 10 y 12 – 16) destinadas a estimar los percentiles en que se encuentra cada sujeto según su edad y sexo. Según esto, primero se calcularon los cuatro indicadores de masa magra y masa grasa, los que permitieron conocer a qué percentil pertenecía cada paciente y, de acuerdo a esto, se les clasificó según sus niveles de reservas energéticas (grasa) y proteicas. Para ID#1 se encontró que las reservas energéticas eran bajas, lo cual indica que se encontraba en riesgo de desnutrición, y que las reservas proteicas eran muy bajas, presentando desnutrición; para ID#2, tanto las reservas energéticas como las proteicas se hallaban normales; y para ID#3 las reservas energéticas eran muy bajas, lo que significa que presentaba desnutrición, mientras que las reservas proteicas eran normales.

Las reservas de grasa y de proteínas se estimaron a partir del Pliegue Tricipital y de la Circunferencia Braquial; esto debido a que el primero se emplea para la estimación de la depleción de la masa grasa, mientras que el segundo se usa para estimar la masa muscular susceptible de deteriorarse durante el ayuno o estados hipercatabólicos.

Los resúmenes de las evaluaciones antropométricas y nutricionales se encuentran en la Tabla N°5.

Tabla N°5. Evaluación antropométrica y nutricional de los pacientes del estudio.

Parámetro	ID#1	ID#2	ID#3	$\bar{x} \pm DE$
<b>Sexo</b>	Hombre	Hombre	Mujer	----
<b>Edad (años)</b>	74	90	83	82,3 ± 8,0
<b>Medidas de pierna (cm)</b>				
AR	50	40	47	45,7 ± 5,1
CP	30	32	33	31,7 ± 1,5
<b>Medidas de brazo (cm)</b>				
MEB	82	86	79	82,3 ± 3,5
CB (percentil)	24 (p5)	31 (p50)	23 (<5)	26,0 ± 4,4
<b>Pliegues cutáneos (mm)</b>				
PB	4	13	6	8 ± 5
PT (percentil)	6 (p10)	11 (p50)	8(<5)	8 ± 3
PSE	12	9	6	9 ± 3
PSI	7	14	6	9 ± 4
<b>Peso (kg)</b>				
Peso real	----	70,1	48,3	59,2 ± 15,4
Peso <sub>1</sub> estimado	52,9	63,4	47,4	54,5 ± 8,1
Peso <sub>2</sub> estimado	49,5	53,8	46,2	49,8 ± 3,8
<b>Estatura (m)</b>				
Estatura <sub>1</sub> estimada	1,64	1,72	1,58	1,65 ± 0,1
Estatura <sub>2</sub> estimada	1,62	1,41	1,51	1,52 ± 0,1
<b>IMC</b>				
IMC <sup>1</sup>	19,7 (DP)	23,7 (N)	19,3 (DP)	20,9 ± 2,4 (DP)
IMC <sup>2</sup>	20,1 (DP)	35,1 (S)	21,2 (DP)	25,4 ± 8,3 (N)
<b>Composición corporal</b>				
Densidad (kg/m <sup>3</sup> )	1,06	1,04	1,04	1,05 ± 0,01
Peso graso (kg)	8,7	16,7	11,2	12,2 ± 4,1
Peso magro (kg)	44,2	53,4	37,1	44,9 ± 8,2
% Magro	83,6	76,1	76,8	78,8 ± 4,2
% Grasa	16,4	23,9	23,2	21,2 ± 4,2
% Grasa según OMS <sup>11</sup>	18,5	25,6	24,0	22,7 ± 3,7
<b>Indicadores de masa magra y masa grasa</b>				
AB (mm <sup>2</sup> )	4586	7651	4212	
PMB (mm) (percentil)	221 (p5)	276 (p≈60)	205 (p≈25)	
AMB (mm <sup>2</sup> ) (percentil)	3894 (p<5)	6041 (p≈60)	3342 (p≈20)	
AGB (mm <sup>2</sup> ) (percentil)	692 (p≈8)	1610 (p≈50)	870 (p<5)	
<b>Reservas de grasa y proteínas</b>				
Reserva de grasa por PT	Baja (RD)	Normal	Muy baja (D)	
Reserva de grasa por AGB	Baja (RD)	Normal	Muy baja (D)	
Reserva proteica por AMB	Muy baja (D)	Normal	Normal	

Peso<sub>1</sub>: Estimado mediante AR y CB; Peso<sub>2</sub>: Calculado a través de la sumatoria de los 4 pliegues; Estatura<sub>1</sub>: Estimada usando MEB; Estatura<sub>2</sub>: Medido a través de AR y edad; IMC<sub>1</sub>: Se usó el peso real o peso<sub>1</sub> y estatura<sub>1</sub>; IMC<sub>2</sub>: Medido con peso real o peso<sub>1</sub> y estatura<sub>2</sub>. DP: Déficit de peso; N: Normopeso; S: Sobrepeso; RD: Riesgo de desnutrición; D: Desnutrición.

Según los resultados presentados en la Tabla N°5, se puede concluir que tanto ID#1 como ID#3 tienen un IMC que los clasifica en déficit de peso, siendo este obtenido con cualquiera de los métodos para la estatura. En cuanto a ID#2, se observa que al usar la estatura<sub>1</sub> su IMC se clasifica como normal, mientras que si se calcula con la estatura<sub>2</sub> el IMC resulta en sobrepeso. De esto se concluye que ID#1 e ID#2 presentaron un bajo peso para su edad y que ID#3 se encontró normal o con sobrepeso. Cabe notar que este parámetro se mide de igual forma ya sea en hombres como en mujeres, debido a que no hay una diferencia en la fórmula del IMC según el sexo de la persona.

En cuanto a las reservas energéticas de cada paciente, ID#1 presentó bajas reservas de grasa al ser estimadas a través del PT y del AGB, por lo que se hallaba en riesgo de desnutrición, y las reservas proteicas calculadas a través del AMB estaban muy bajas, presentando desnutrición; en tanto, ID#2 poseía ambas reservas energéticas normales, lo que significa que no tenía exceso ni déficit de grasa o proteínas; y, por último, ID#3 mostró que sus reservas de grasa calculadas con el PT o el AGB estaban muy bajas, por lo que se encontraba en estado de desnutrición, mientras que las reserva proteicas obtenidas por medio del AMB se apreciaban normales.

Es así como, luego de analizar todos los parámetros anteriores, se puede concluir que ID#1 presentó todos sus índices nutricionales bajos o muy bajos para su edad; mientras que ID#2 tuvo todos los índices nutricionales normales; e ID#3 presentó índices de grasa muy bajos pero su reserva proteica se halló normal.

Si se toma en consideración, además, que estos pacientes corresponden a adultos mayores que han experimentado cambios debido al envejecimiento relacionados con la modificación de la composición corporal, tales como reducción de la masa magra, aumento del tejido adiposo y disminución del agua corporal total, se puede esperar como consecuencia que presenten una reducción de la masa proteica y, por lo tanto, de la albúmina plasmática, así como también una disminución en el volumen de distribución de los fármacos hidrosolubles. Además, ya que en este tipo de población ocurren cambios fisiológicos en el riñón e hígado, debido a que su volumen se reduce, es de suponer que también estos pacientes han de sufrir disminución en el aclaramiento de medicamentos.

Todas estas modificaciones pueden conducir a un incremento de la fracción libre de ertapenem y de su vida media, lo que finalmente puede provocar un aumento en la concentración plasmática del fármaco al administrarles dosis utilizadas normalmente en personas más jóvenes. Por lo tanto, se puede esperar que ID#1 sea el paciente que tenga

mayores posibilidades de experimentar alteraciones en los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos de ertapenem, seguido de ID#3 y, por último, de ID#2.

## 5.2. ETAPA ANALÍTICA

### I. DISEÑO EXPERIMENTAL

En un comienzo se trabajó con las condiciones cromatográficas de la metodología analítica propuesta por McWhinney B., et al.<sup>39</sup>, las que luego debieron ser modificadas y optimizadas de acuerdo con las necesidades y contingencias de la investigación. Con estos cambios se obtuvieron las nuevas condiciones cromatográficas utilizadas para la validación del método analítico, las cuales se describen más adelante. En la Tabla N°6 se muestra un resumen comparativo entre ambas metodologías.

**Tabla N°6. Comparación de las condiciones cromatográficas de ambas metodologías.**

Parámetro	McWhinney B., et al.	Condición optimizada
Equipo	HPLC UV/Vis Alliance 2690® Waters	HPLC-UV/Vis Flexar® Perkin Elmer
Columna	Waters X-bridge® C18 (4,6 x 30 mm; 2,5 µm)	Waters Spherisorb® ODS2 C18 (4,6 x 250 mm; 5 µm)
Fase Móvil	Buffer fosfato 50 mM (88%) y acetonitrilo (12%)	Buffer fosfato 10 mM (70%) y acetonitrilo (30%)
pH	2,4	2,4
Velocidad de flujo	1,0 ml/min	0,9 ml/min
Tiempo de retención ertapenem	4,388 minutos	2,923 minutos
Tiempo de retención plasma	0,890 minutos	2,379 minutos
Longitud de onda	304 nm	310 nm
Volumen de inyección	10 µl	10 µl
Temperatura horno de la columna	25 °C	25 °C
Tiempo de corrida	7 minutos	4 minutos

**a) Tipo de columna utilizada:**

La columna utilizada en este estudio fue una Waters Spherisorb® ODS 2 C<sub>18</sub> (4,6 × 250 mm y tamaño de partícula 5 µm), la cual es de mayor largo que la empleada en el estudio de McWhinney, lo que implica que, al compararlas, la presión del sistema que utiliza la columna más larga debe ser mayor, para así mantener la velocidad de flujo y la resolución.

En cuanto al tipo del relleno, el de ambas columnas consistió en octadecilsilano (C<sub>18</sub>) unido a partículas de sílice porosas encapsuladas en forma esférica, pero el tamaño de partícula en la Spherisorb® es de 5 µm y en la XBridge® es 2,5 µm. La importancia de esta diferencia radica en que cuando se requiere una mayor velocidad de análisis y/o mayor resolución, se prefiere trabajar con columnas de un menor tamaño de partícula y que, además, sean más cortas, tal como es el caso de la XBridge®. En resumen, las partículas más pequeñas mejoran la resolución, eficiencia y tiempo de análisis.

Una ventaja de la columna Spherisorb® es que posee un tipo característico de distribución de las cadenas hidrofóbicas (C<sub>18</sub>) sobre la sílice, lo cual le otorga un recubrimiento adicional, conocido como *endcapped*, destinado a disminuir los grupos silanoles libres y así también disminuir interacciones secundarias con estos grupos libres<sup>41</sup>.

**b) Composición de la fase móvil:**

Se realizó un cambio en la proporción de la fase móvil, la cual pasó de estar compuesta por el 88% de *buffer* fosfato 50 mM y el 12% acetonitrilo, al 70% y el 30%, respectivamente. Durante el desarrollo de la metodología se probaron diferentes cantidades de cada uno de los componentes de la fase móvil, con lo que se pudo observar que al disminuir la proporción de *buffer* fosfato, el tiempo de retención también lo hacía. Esto se debe a que, al pH de trabajo, el 90% de ertapenem se encuentra no ionizado, por lo que es más afín al acetonitrilo y eluye más rápido al aumentar la cantidad de este.

También se probó utilizando agua desionizada, en vez de *buffer* fosfato, y acetonitrilo en proporciones del 96% y el 4%, respectivamente. Sin embargo, al no contar con la presencia de algún *buffer* en la fase móvil, no se podía mantener un óptimo control del pH, lo cual es importante cuando el analito es un compuesto ionizable, ya que es una de las principales variables que afectan en su retención<sup>42</sup>.



### c) pH de la fase móvil:

Se evaluó el cambio de pH de la fase móvil para mejorar el tiempo de retención y forma del *peak* de ertapenem, teniendo en cuenta que la columna debía ser operada en un rango de pH de 2 a 8 unidades. Estas condiciones son las que recomienda el fabricante para prolongar su utilidad, debido a que a  $\text{pH} > 8$  la solubilidad del relleno aumenta notablemente y se genera la pérdida del ligando  $\text{C}_{18}$  producto de la hidrólisis de los grupos siloxano y a la disolución del soporte de sílice<sup>41,43</sup>. Aunque actualmente, este tipo de columnas cuenta con un encapsulado que protege a la sílice frente a la disolución.

Considerando esto se debía elegir un *buffer* cuyo valor de  $\text{pK}_a$  permitiera trabajar dentro de este rango de pH. Por lo tanto, se siguió trabajando con *buffer* fosfato debido a que sus valores de  $\text{pK}_a$  son 2,15; 7,20; y 12,33, lo que posibilita trabajar en tres rangos de pH diferentes: 1,1 – 3,1; 6,2 – 8,2; y 11,3 – 13,3<sup>42</sup>. Es así que se probaron los pH 2,4 y 6,5 para el desarrollo de la metodología.

Al ser ertapenem un ácido débil, se encontraría  $> 99\%$  ionizado si el pH estuviera 2 unidades sobre su  $\text{pK}_a$ , o  $> 99\%$  no ionizado cuando el pH fuera menor al  $\text{pK}_a$  en 2 unidades.

Al trabajar con pH 2,4 cerca del 90% de ertapenem está en su forma no ionizada, es decir se encuentra en la forma menos polar o, lo que es lo mismo, más hidrofóbica, por lo que es más fuertemente retenido en un sistema cromatográfico de fase reversa. En cambio, al probar con un pH 6,5, más del 99% de ertapenem se encuentra ionizado y es menos retenido por el sistema, eluyendo más rápido.

### d) Concentración molar del *buffer* fosfato (BF):

Con la finalidad de conseguir óptimas condiciones para la validación y, a su vez, proteger el relleno de la columna, se modificó la concentración molar del *buffer*. Se partió trabajando con BF en concentración 50 mM, pero se trató de disminuir teniendo la precaución de que el *buffer* no perdiera su capacidad amortiguadora del pH. Esta propiedad del *buffer* se fue evaluando experimentalmente mediante dos operaciones: cuando se ajustaba el pH con HCl 2M, ya que se podía notar que a medida que se disminuía la concentración del tampón, más variaba el pH con cada gota de ácido que se agregaba; y al realizar pruebas con una misma composición de fase móvil pero cambiando la concentración molar del *buffer* fosfato, donde se verificó que solo hasta una cierta cantidad se podía disminuir la concentración, ya que luego la eficiencia amortiguadora se perdía y los tiempos de retención de cada componente de la muestra

comenzaban a variar. Es así que entonces se decidió trabajar con BF en una concentración 10 mM.

Este cambio se efectuó principalmente para proteger a la columna de la degradación, puesto que el uso de tampones fosfato en la fase móvil disminuye la vida útil de la columna en comparación con tampones orgánicos, sobre todo cuando se trabaja a pH alto<sup>43</sup>.

En este punto se debía tener especial cuidado con que, al disminuir la concentración molar del *buffer*, no se perdiera su capacidad amortiguadora, dado que esta propiedad depende de la concentración absoluta del sistema *buffer* y de la proporción relativa de las formas disociadas y sin disociar que lo componen. En este caso, aunque se cambie la concentración del *buffer* fosfato, siempre tendrá el mismo pH, pero la capacidad amortiguadora será mayor en el sistema más concentrado.

Lo anterior se explica al conocer que la capacidad amortiguadora de un *buffer* es máxima cuando la relación entre la sal y el ácido que lo conforman es igual a 1, es decir, cuando el pH es igual al  $pK_a$ . Por lo que, en este caso, la eficacia máxima del amortiguador frente a ácidos está a  $pH = pK_a + 1/2$ , donde el porcentaje de la sal varía del 75% al 25%, admitiendo un 50% de ácido para disminuir el pH en 1 unidad.

#### **e) Uso de estándar interno:**

Para obtener una mayor precisión cuantitativa y evitar las incertidumbres asociadas a la inyección de la muestra, se puede incorporar una cantidad conocida de un estándar interno en cada solución calibrante y en las muestras. La relación del analito con las áreas del patrón interno se utiliza como variable analítica<sup>44</sup>, realizando así una calibración relativa o indirecta.

Hay ciertos requerimientos que debe cumplir un buen estándar interno:

- El *peak* del estándar interno debe estar bien separado de los *peaks* de los demás componentes de la muestra (Resolución > 1,25).
- Debe eluir cerca al analito de interés.
- El tiempo de retención del estándar interno debe ser diferente al del analito y se debe mantener constante en todos los cromatogramas.
- Dado que la concentración del estándar interno se mantiene constante en todas las disoluciones del analito y en la muestra, su área debe ser similar en todas las mediciones.

Se probó con diferentes compuestos y con ninguno se obtuvo buenos resultados, algunos de los cuales se presentan a continuación:

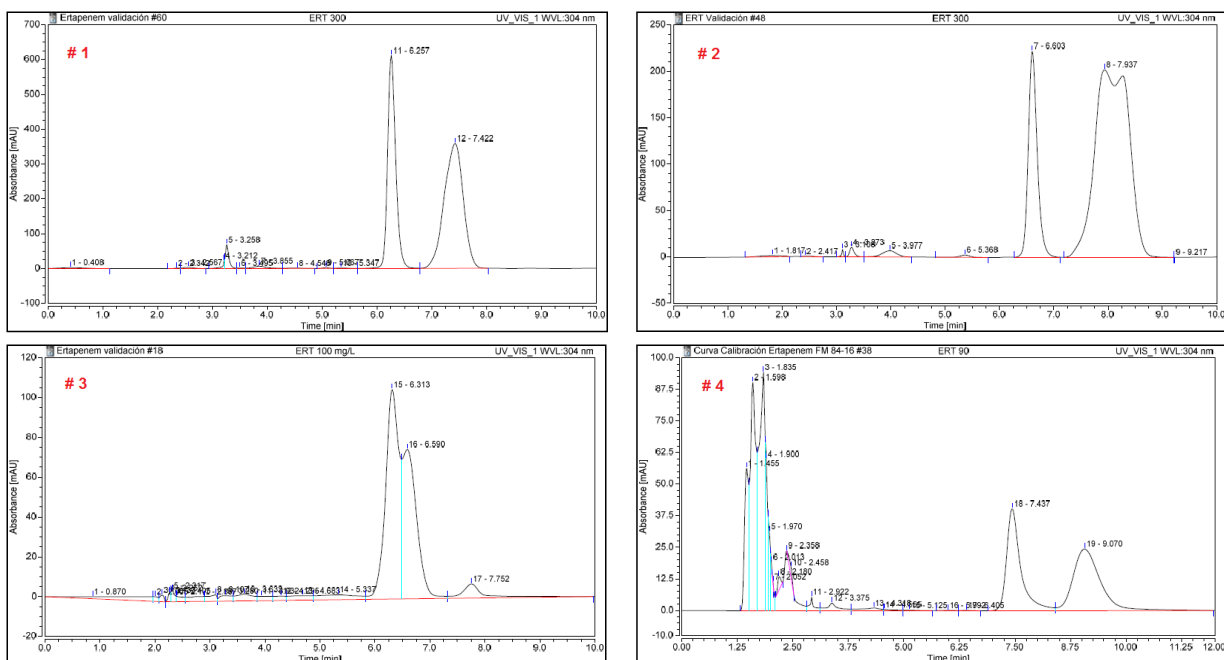
- *Cefotaxima*: Se utilizó como estándar interno debido a que también es un antibiótico  $\beta$ -lactámico y, por lo tanto, posee propiedades estructuras similares a las de ertapenem. Sin embargo, tanto las corridas cromatográficas como los *peaks* de los diferentes compuestos de las muestras no entregaron resultados óptimos.

**Tabla N°7. Tiempos de retención (min) de los componentes de la muestra usando cefotaxima.**

Cromatograma	Fase Móvil	t <sub>R</sub> Plasma	t <sub>R</sub> Cefotaxima	t <sub>R</sub> Ertapenem
Cromatograma #1	82% BF 50 mM – 18% ACN pH 2,4	3,258	6,257	7,422
Cromatograma #2	82% BF 50 mM – 18% ACN pH 2,4	3,273	6,603	7,937
Cromatograma #3	82% BF 50 mM – 18% ACN pH 2,4	2,262	6,313/6,590	7,752
Cromatograma #4	84% BF 50 mM – 16% ACN pH 2,4	1,835	7,437	9,070

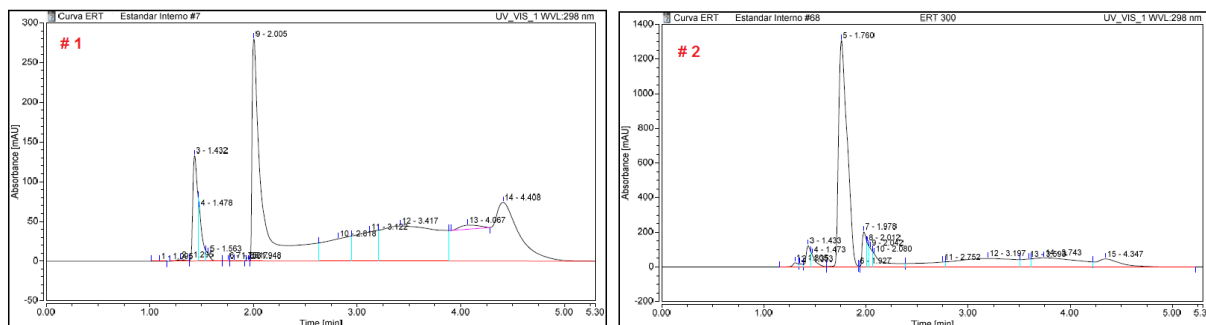
BF: *buffer* fosfato; ACN: acetonitrilo; t<sub>R</sub>: tiempo de retención (expresado en minutos).

**Figura N°5. Cromatogramas con cefotaxima como estándar interno.**



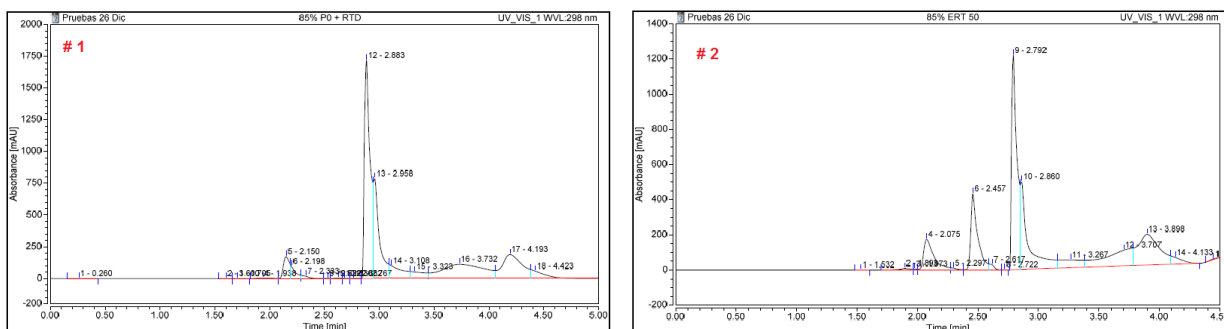
- **Ácido Salicílico:** Se empleó ya que posee un máximo de absorción en el espectro UV a los 297 nm. Se utilizó con una fase móvil compuesta por el 86% de BF 50 mM y 14 % de ACN a pH 6,5. Fue descartado porque arrojaba un *peak* cromatográfico que no se pudo optimizar; sin embargo, al ir disminuyendo su concentración su forma mejoró.

**Figura N°6. Cromatogramas con ácido salicílico como estándar interno.**



- **Ranitidina:** Se usó ranitidina ya que tiene un máximo de absorción en el espectro UV a una longitud de onda cercana a los 300 nm. La fase móvil utilizada consistió en 85% de BF 50 mM y 15% de ACN a pH 6,5. No obstante, el *peak* de ranitidina no se pudo optimizar y nunca fue simétrico, por lo que se descartó su uso.

**Figura N°7. Cromatogramas con ranitidina como estándar interno.**



Debido a que ninguno de los compuestos que se probaron se ajustó a las condiciones que debería cumplir un estándar interno óptimo, es que se siguió trabajando sin el uso de un estándar interno en el desarrollo de la metodología analítica.

**f) Longitud de onda:**

Diversos trabajos en donde se pretende determinar ertapenem en plasma humano por medio de HPLC con detección UV, ya sea solo o en conjunto con otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos, utilizan preferentemente longitudes de onda cercanas a los 300 nm<sup>39,45,46</sup>, esto debido a que el grupo  $\beta$ -lactámico posee su máxima absorción en el espectro UV a dicha longitud de onda. Por tal motivo, se probaron distintas longitudes de onda, tales como: 298, 300, 302, 304 y 310 nm.

Además, como el equipo HPLC con el que se trabajó tiene la función de hacer un barrido del espectro UV para los diferentes analitos de una muestra, se realizó un análisis de los espectros UV de ertapenem y plasma. Según esto, se determinó que a 310 nm ertapenem poseía un máximo de absorción, mientras que el plasma absorbía en menor cantidad, por lo que a esa longitud de onda se facilitaba aún más la separación entre ambos compuestos.

**g) Velocidad de flujo:**

Como es de esperarse, al aumentar la velocidad de flujo de la fase móvil, los tiempos de retención de los diferentes componentes de la muestra disminuyen. Sobre una fase móvil compuesta por el 70% BF 10 mM y 30% ACN y pH 2,4, se hicieron varias pruebas respecto a este punto, escogiendo finalmente una velocidad de flujo de 0,9 ml/min.

**Tabla N°8. Tiempos de retención ( $t_R$ ) a distintas velocidades de flujo.**

Velocidad de flujo	$t_R$ Plasma (min)	$t_R$ Ertapenem (min)
0,8 ml/min	2,648	3,209
0,9 ml/min	2,370	2,912
1,0 ml/min	2,133	2,643
1,2 ml/min	1,744	2,086

#### h) Volumen de inyección:

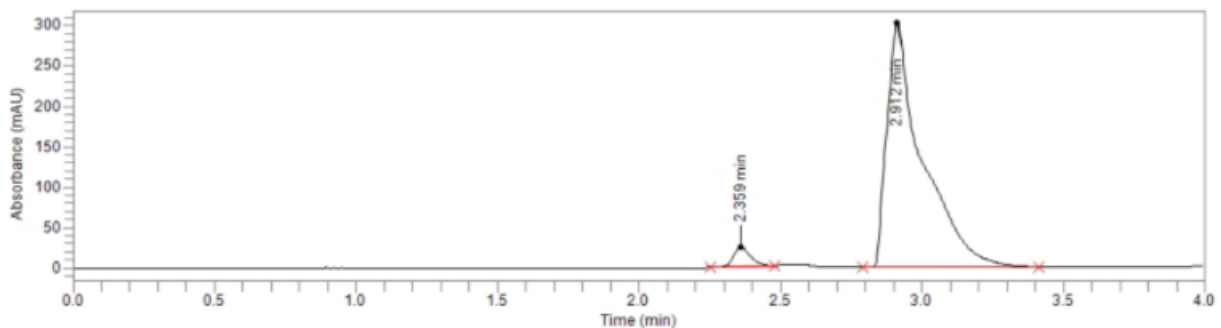
Después de probar con diferentes volúmenes, se determinó que al inyectar 10  $\mu\text{l}$  de la muestra se obtenían mejores resultados en comparación con volúmenes menores, ya que tanto el CV como la exactitud para cada calibrante mejoraron, ajustándose más a los rangos aceptados.

Con volúmenes superiores a 10  $\mu\text{l}$  también se obtuvieron buenos resultados, pero algunas formas de los *peaks* perdían la simetría, sobre todo a las concentraciones más altas de la curva.

### CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS OPTIMIZADAS

Finalmente, luego de optimizar las condiciones analíticas, se midieron las muestras preparadas y se obtuvieron los cromatogramas correspondientes, tal como se puede apreciar en la Figura N°8.

**Figura N°8. Cromatograma obtenido con las condiciones cromatográficas optimizadas para una muestra de ertapenem 50 mg/L en una matriz de plasma humano.**



A partir de esta figura, se determinaron los parámetros cromatográficos de Resolución, Número de platos teóricos y Altura del plato teórico:

- *Resolución (Rs)*: La resolución de una columna señala qué tan separadas se encuentran dos bandas en relación con sus anchos, por lo que proporciona una medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar dos analitos. Cuando la resolución alcanza valores desde 1,5 se considera que la separación entre dos analitos es esencialmente completa, ya que sólo existe un traslape del 0,3% entre los *peaks* de A y B (los cuales corresponden al primer y segundo analito en orden de elución, respectivamente); y cuando la resolución es 1,0, significa que el *peak* de A contiene alrededor del 4% del *peak* de B<sup>44</sup>.

$$\text{Resolución (Rs)} = \frac{2 (t_{RB} - t_{RA})}{W_A + W_B} = \frac{2 (2,912 - 2,359)}{0,2 + 0,25} = 2,5$$

La resolución de la columna al iniciar el proceso de validación es de 2,5, estableciéndose así que existe una óptima separación entre el plasma y ertapenem.

- *Número de platos teóricos (N)*: Corresponde a una manera de medir cuantitativamente la eficiencia de una columna cromatográfica, la cual aumenta cuanto mayor es el número de platos teóricos, ya que se supone que en cada plato teórico se establece un equilibrio del analito entre las fases móvil y estacionaria.

$$N_{PLASMA} = 16 \times \left(\frac{t_{RA}}{W_A}\right)^2 = 16 \times \left(\frac{2,359}{0,2}\right)^2 = 2.226 \quad N_{ERT} = 16 \times \left(\frac{t_{RB}}{W_B}\right)^2 = 16 \times \left(\frac{2,912}{0,25}\right)^2 = 2.171$$

$$N_{promedio} = \frac{2.226 + 2.171}{2} = 2.198$$

- *Altura del plato teórico (H)*: Es otra forma de medir cuantitativamente la eficiencia de una columna, la que aumentará cuanto menor sea la altura del plato teórico.

$$N = \frac{L}{H} \quad \rightarrow \quad H = \frac{L}{N} = \frac{250 \text{ mm}}{2.198} = 1,14 \times 10^{-1} \text{ mm}$$

Donde:

$t_R$ : Tiempo de retención.

W: Ancho del *peak* en la base.

L: Largo de la columna.

1: Plasma. 2: Ertapenem.

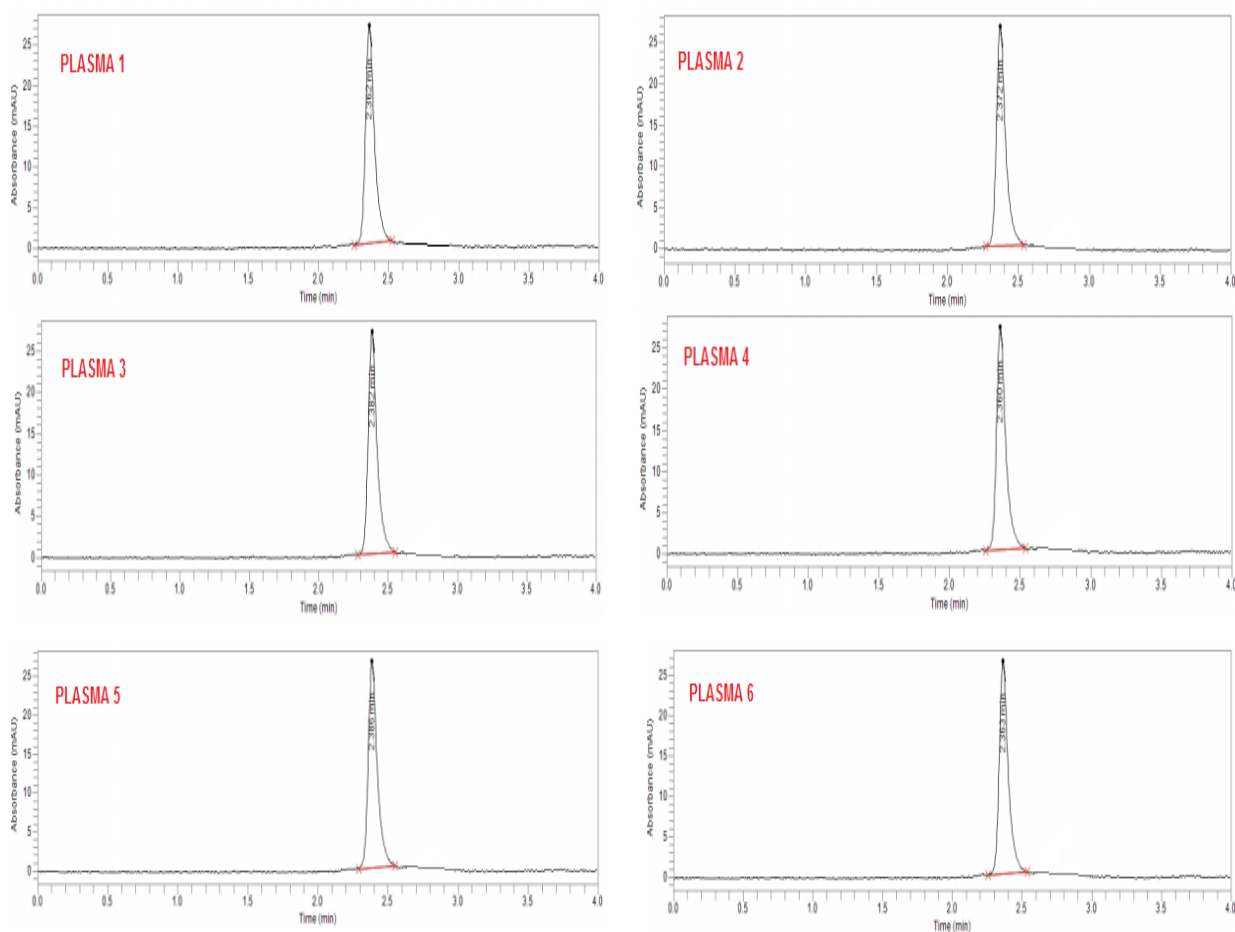
## II. VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Los resultados que se presentan a continuación fueron obtenidos a partir de muestras preparadas el mismo día de la medición con un nuevo frasco de ertapenem Invanz®.

### a) Selectividad respecto a la matriz:

En la Figura N°9 se muestran las señales cromatográficas arrojadas por cada uno de los 6 plasmas utilizados para la validación y en la Tabla N°9 se muestran las características de estos. A los tiempos de retención de ertapenem, se observa que ningún plasma presentó señales que podrían interferir en el análisis, por lo que todos eran aptos para su uso.

Figura N°9. Plasma blanco para selectividad.





**Tabla N°9. Caracterización de los plasmas utilizados en la validación.**

N° Plasma	Factor Rh	Grupo Sanguíneo	Factor F VIII	Fecha Extracción	Fecha Expiración	T <sub>R</sub> (min) Plasma
1	+	A	No	28/03/16	28/03/17	2,362
2	+	O	No	04/04/16	04/04/17	2,372
3	+	B	No	08/04/16	08/04/17	2,382
4	+	A	No	13/04/16	13/04/17	2,360
5	+	A	No	13/05/16	13/05/17	2,386
6	+	A	No	16/05/16	16/05/17	2,363

**b) Curva de calibración: Linealidad y rango del sistema**

Se midió la respuesta para cada una de las soluciones calibrantes preparadas, con las que se construyó una curva de calibración, pero esta no se ajustó a las condiciones impuestas por las guías de validación utilizadas como referencia. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla.

**Tabla N°10. Precisión y exactitud de todas las soluciones calibrantes preparadas.**

[ERT] calibrante (mg/L)	Área promedio	% CV	[ERT] calculada promedio (mg/L)	% Exactitud
2,0	97.487,7	0,6	0,5	24,6
3,0	103.254,6	1,3	0,6	20,2
5,0	148.170,2	0,5	1,5	29,9
8,0	362.557,6	0,3	5,7	71,7
10,0	601.606,2	2,4	10,5	104,7
20,0	1.069.554,6	0,2	19,7	98,6
40,0	2.149.286,8	0,5	41,1	102,7
50,0	2.742.307,9	0,1	52,8	105,6
75,0	4.051.953,3	0,3	78,7	105,0
100,0	5.266.083,1	0,3	102,8	102,8
180,0	9.341.224,4	0,3	183,4	101,9
200,0	10.185.862,0	0,1	200,1	100,0
300,0	15.012.424,4	0,2	295,6	98,5

Ecuación de la recta:  $\text{Área} = 50.542 [ERT] + 72.580 \quad r^2 = 0,9992$

Las concentraciones desde 2 hasta 8 mg/L cumplían con el criterio de precisión (todas con un CV < 15%), pero la exactitud se encontraba entre el 7,1 y el 67,5%, siendo 10,0 mg/L la concentración más baja que se ajustaba a los criterios de la FDA y la EMA. Es por esto que se redefinió el rango del sistema, el cual finalmente abarcó desde los 10,0 hasta los 300,0 mg/L. Los resultados finales que permitieron establecer el rango lineal de concentraciones plasmáticas de ertapenem se muestran en la Tabla N°11 y la Figura N°10.

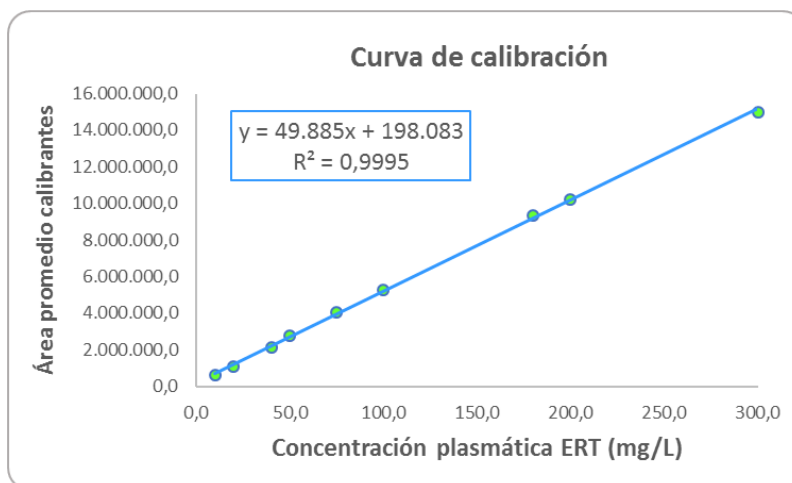
**Tabla N°11. Linealidad promedio del sistema considerando solo las concentraciones que cumplen los criterios de validación.**

[ERT] calibrante (mg/L)	Área promedio	% CV	[ERT] calculada promedio (mg/L)	% Exactitud
10,0	601.606,2	2,4	8,1	80,9
20,0	1.069.554,6	0,2	17,5	87,3
40,0	2.149.286,8	0,5	39,1	97,8
50,0	2.742.307,9	0,1	51,0	102,0
75,0	4.051.953,3	0,3	77,3	103,0
100,0	5.266.083,1	0,3	101,6	101,6
180,0	9.341.224,4	0,3	183,3	101,8
200,0	10.185.862,0	0,1	200,2	100,1
300,0	15.012.424,4	0,2	297,0	99,0

La Figura N°10 muestra la relación lineal entre la concentración plasmática total de ertapenem y el área promedio obtenido tras las mediciones. A partir de este gráfico, se deduce la curva de calibración del sistema:

$$\text{Área} = 49.885 [ERT] + 198.083 \quad r^2 = 0,9995$$

**Figura N°10. Representación gráfica de la linealidad del sistema.**



**c) Límite de Detección:**

Se determinó a través de la desviación estándar de la ordenada de la curva de calibración y la pendiente de esta, estableciéndose así que el LOD es igual a 4,0 mg/L.

Como la señal del blanco debe coincidir con el valor de la ordenada en la curva de calibración, puesto que representa el área que se obtendría a una concentración de analito igual a cero, se utiliza la desviación estándar de este parámetro para estimar la desviación estándar de la muestra blanco. La desviación estándar de la ordenada se calculó según la Fórmula N°9 y el LOD mediante la Fórmula N°6:

$$LOD = \frac{3,3 \times 60.820}{49.885} = 4,0 \text{ mg/L}$$

Con este valor se preparó un calibrante de ertapenem de concentración igual a 4,0 mg/L (siguiendo el Esquema N°2) y se midió cinco veces su área, obteniendo un resultado promedio de 145.404 unidades de absorbancia. Como se ha establecido que el LOD debe ser al menos 3 veces la señal de ruido, se comparó esta señal promedio con la señal promedio obtenida del ruido del equipo al tiempo de retención de ertapenem:

$$\frac{\text{Área LOD experimental}}{\text{Área muestra blanco}} = \frac{145.404,1}{18.012,4} = 8,1$$

Como la relación es mayor a 3, se aceptó a la concentración 4,0 mg/L como el LOD.

#### d) Límite de Cuantificación:

Fue determinado mediante la evaluación de las respuestas entregadas por los calibrantes siguiendo las diferentes condiciones que indican las guías de validación, esto es: el LOQ debe corresponder a la concentración del calibrante de más baja concentración que entrega una señal identificable, discreta y reproducible con una precisión y exactitud dentro del 20%. Según esto, el LOQ es igual a 12,0 mg/L, dado que el CV de las mediciones fue del 2,4% y la exactitud de la concentración calculada promedio fue del 80,9%. También dicha concentración entregó una respuesta de más de 5 veces la respuesta del blanco. Los resultados se detallan en la Tabla N°12.

Tabla N°12. Precisión y exactitud del límite de cuantificación.

[ERT] calibrante (mg/L)	Área	[ERT] calculada (mg/L)	% Exactitud
<b>10,0 mg/L</b>	591.693,0	7,9	78,9
	598.494,8	8,0	80,3
	596.321,8	8,0	79,8
	594.754,7	8,0	79,5
	626.766,9	8,6	85,9
<b>Promedio</b>	<b>601.602,2</b>	<b>8,1</b>	<b>80,9</b>
<b>DE</b>	<b>14.281,8</b>	----	----
<b>% CV</b>	<b>2,4</b>	----	----

Según lo que se ha establecido, el LOQ debe ser al menos 10 veces la señal del ruido. Para comprobar esto se comparó la señal promedio obtenida por el ruido del equipo al tiempo de retención de ertapenem con la señal promedio obtenida para el LOQ:

$$\frac{\text{Área LOQ}}{\text{Área muestra blanco}} = \frac{601.606,2}{18.012,4} = 33,4$$

Dado que se cumplen todos los criterios, se confirma que el LOQ es igual a 10 mg/L.

**e) Precisión y exactitud intra-día:**

Se evaluó la precisión y exactitud intra-día, mediante la extrapolación de las áreas obtenidas para el LOQ (ver resultados en la Tabla N°12) y cada QC (Tabla N°13). Para esto se utilizó la curva de calibración presentada anteriormente, dado que estas muestras se midieron el mismo día de la construcción de la curva.

Los resultados demuestran que el CV fue menor al 15% para todos los niveles, y la exactitud se encontró dentro del 80 al 120% para el LOQ y dentro del 85 al 115% para los QC. Por lo tanto, esta corrida se ajustó a los criterios de validación.

**Tabla N°13. Precisión y exactitud intra-día para muestras controles de calidad.**

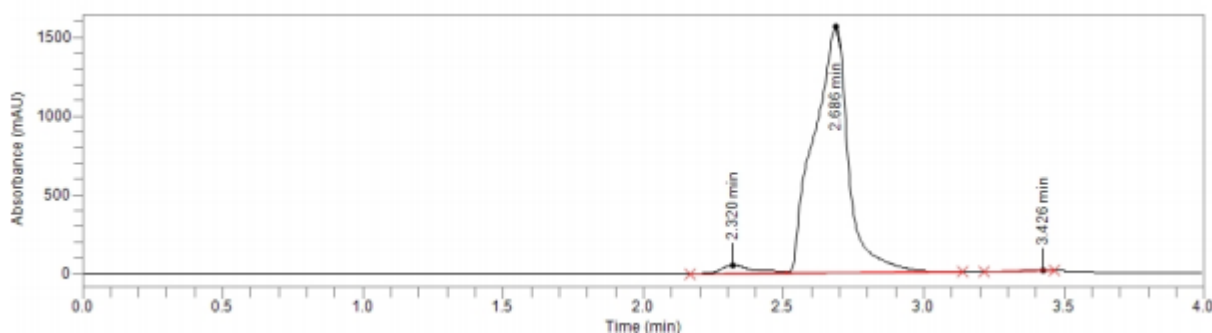
QC (mg/L)	Área	[ERT] calculada (mg/L)	% Exactitud
<b>30,0 mg/L QC bajo</b>	1.624.485,2	28,6	95,3
	1.618.032,0	28,5	94,9
	1.623.499,9	28,6	95,2
	1.628.600,2	28,7	95,6
	1.620.768,9	28,5	95,1
<b>Promedio</b>	<b>1.623.077,2</b>	<b>28,6</b>	<b>95,2</b>
<b>DE</b>	<b>3.982,7</b>	----	----
<b>% CV</b>	<b>0,2</b>	----	----
<b>125,0 mg/L QC medio</b>	6.613.452,6	128,6	102,9
	6.604.342,4	128,4	102,7
	6.609.978,4	128,5	102,8
	6.584.339,0	128,0	102,4
	6.552.904,8	127,4	101,9
<b>Promedio</b>	<b>6.593.003,4</b>	<b>128,2</b>	<b>102,6</b>
<b>DE</b>	<b>25.089,2</b>	----	----
<b>% CV</b>	<b>0,4</b>	----	----
<b>250,0 mg/L QC alto</b>	12.592.919,0	248,5	99,4
	12.553.444,6	247,7	99,1
	12.558.580,0	247,8	99,1
	12.498.778,8	246,6	98,6
	12.512.327,8	246,9	98,7
<b>Promedio</b>	<b>12.543.210,0</b>	<b>247,5</b>	<b>99,0</b>
<b>DE</b>	<b>37.880,8</b>	----	----
<b>%CV</b>	<b>0,3</b>	----	----

**f) Precisión y exactitud inter-día:**

Se realizó una curva de calibración para calcular las concentraciones de las muestras LOQ y QCs. Los resultados muestran que, para la menor concentración, el QC bajo y el QC alto, los criterios de validación se cumplen, puesto que para todos esos niveles el CV fue menor al 15% y la exactitud se encontró dentro del  $\pm 15\%$ . Sin embargo, para el QC medio el CV fue del 20,1% y la exactitud fue del 82,7%, lo cual indica que este QC presentó una desviación mayor a la permitida entre las repetidas mediciones y la exactitud de la concentración calculada fue menor a la aceptada por las guías.

Además, durante la realización de esta corrida se presentaron ciertas anomalías en los cromatogramas, por lo que se decidió hacer 10 determinaciones por nivel. Por ejemplo, en tres mediciones del QC medio apareció un tercer *peak* con un tiempo de retención de 3,4 minutos y en todas las mediciones del QC alto apareció este mismo *peak* al mismo tiempo, tal como se muestra en la Figura N°11.

**Figura N°11. Cromatograma obtenido de muestra control de calidad alto.**



Por otro lado, sólo el LOQ se pudo medir con la fase móvil previamente establecida (70% BF 10 mM y 30% ACN), ya que fue la única concentración en la que se obtuvieron *peaks* medianamente simétricos y con áreas cercanas al valor esperado, aunque el tiempo de retención para ertapenem pasó de ser en promedio 2,923 minutos a 2,791 minutos. Para el resto de las concentraciones se trabajó con una fase móvil compuesta por el 65% de *buffer* fosfato 10 mM y el 35% de acetonitrilo, lo cual produjo que cambiaran nuevamente los tiempos de retención y demostró que la columna no estaba realizando una óptima separación de los analitos, lo cual quedó en evidencia al calcular nuevamente la resolución y la eficiencia de la columna.

$$\text{Resolución } (R_s) = \frac{2 (t_{RB} - t_{RA})}{WA + WB} = \frac{2 (2,685 - 2,321)}{0,31 + 0,29} = 1,2$$

$$N_{PLASMA} = 16 \times \left(\frac{t_{RA}}{WA}\right)^2 = 16 \times \left(\frac{2,321}{0,31}\right)^2 = 897 \qquad N_{ERT} = 16 \times \left(\frac{t_{RB}}{WB}\right)^2 = 16 \times \left(\frac{2,685}{0,29}\right)^2 = 1.372$$

$$N_{promedio} = \frac{897 + 1.372}{2} = 1.134$$

$$N = \frac{L}{H} \quad \rightarrow \quad H = \frac{L}{N} = \frac{250 \text{ mm}}{1.372} = 1,82 \times 10^{-1} \text{ mm}$$

Como se puede ver, la resolución de la columna disminuyó de 2,5 a 1,2, lo que demuestra que, aunque el plasma y ertapenem continúan siendo separados, esta separación se redujo considerablemente y existe un cierto solapamiento entre las señales. En cuanto al número de platos teóricos, estos disminuyeron en un 48%, pasando de ser en promedio 2.198 a ser 1.134 platos teóricos.

Además, tal como se aprecia en la Figura N°11, en todos los cromatogramas de muestras QC alto el *peak* de ertapenem mostró el fenómeno de *fronting*, el cual es característico de cuando existen problemas físicos al interior de la columna que distorsionan la trayectoria de paso del analito.

Por todas estas razones, esta corrida fue descartada y la precisión y exactitud inter-día no pudo ser determinada. Los resultados experimentales se presentan en la Tabla N°14.

Tabla N°14. Precisión y exactitud inter-día para muestras límite de detección y controles de calidad.

Muestra (mg/L)	Área		[ERT] calculada (mg/L)		% Exactitud	
<b>10,0 mg/L LOQ</b>	551.341,8	556.104,8	9,5	9,6	95,1	96,0
	553.383,5	548.414,0	9,5	9,5	95,5	94,5
	555.542,3	552.777,4	9,6	9,5	95,9	95,4
	549.830,4	557.231,3	9,5	9,6	94,8	96,2
	555.275,9	555.415,1	9,6	9,6	95,8	95,9
<b>Promedio</b>	<b>553.531,7</b>		<b>9,5</b>		<b>95,5</b>	
<b>DE</b>	<b>2.910,1</b>		----		----	
<b>% CV</b>	<b>0,5</b>		----		----	
<b>30,0 mg/L QC bajo</b>	1.733.370,7	1.795.344,5	32,5	33,7	108,3	112,4
	1.773.937,4	1.787.947,4	33,3	33,6	111,0	111,9
	1.776.705,4	1.783.948,3	33,3	33,5	111,1	111,6
	1.780.662,0	1.784.673,6	33,4	33,5	111,4	111,7
	1.780.038,3	1.779.832,2	33,4	33,4	111,4	111,4
<b>Promedio</b>	<b>1.777.646,0</b>		<b>33,3</b>		<b>111,2</b>	
<b>DE</b>	<b>16.676,7</b>		----		----	
<b>% CV</b>	<b>0,9</b>		----		----	
<b>125,0 mg/L QC medio</b>	8.098.192,5	5.474.760,7	156,3	105,3	125,1	84,2
	8.055.724,1	5.388.270,2	155,5	103,6	124,4	82,9
	7.964.134,6	5.531.251,5	153,7	106,4	123,0	85,1
	5.374.882,9	5.502.572,7	103,3	105,8	82,7	84,7
	5.387.406,1	5.506.718,9	103,6	105,9	82,9	84,7
<b>Promedio</b>	<b>6.228.391,4</b>		<b>119,9</b>		<b>82,7</b>	
<b>DE</b>	<b>1.251.276,2</b>		----		----	
<b>% CV</b>	<b>20,1</b>		----		----	
<b>250,0 mg/L QC alto</b>	12.972.322,1	12.901.161,6	251,1	249,8	100,5	99,9
	12.945.606,3	13.182.362,5	250,6	255,2	100,2	102,1
	12.982.152,7	13.382.291,3	251,3	259,1	100,5	103,6
	12.734.299,4	13.223.661,2	246,5	256,0	98,6	102,4
	12.771.398,0	13.143.739,8	247,2	254,5	98,9	101,8
<b>Promedio</b>	<b>13.023.899,5</b>		<b>252,1</b>		<b>100,9</b>	
<b>DE</b>	<b>205.762,6</b>		----		----	
<b>%CV</b>	<b>1,6</b>		----		----	



### III. CUIDADOS Y MANTENCIÓN DE LA COLUMNA CROMATOGRÁFICA

Durante todo el periodo de trabajo en el laboratorio se notaron fluctuaciones en el desempeño de la columna. Al inicio de la investigación esta funcionó en óptimas condiciones, pero luego comenzó a fallar bajo algunas circunstancias; después nuevamente entregó buenos resultados, hasta que por último falló completamente. Por ello, se tuvo que profundizar en los cuidados y mantención de las columnas cromatográficas.

Los fabricantes de columnas recomiendan ciertos cuidados que se deben seguir para asegurar, durante el mayor periodo posible, el funcionamiento óptimo del instrumento. Las siguientes recomendaciones se extrajeron del “*Care and use manual*”<sup>41</sup> de la columna Waters Spherisorb®:

#### **Instalación de la columna:**

1. Purgar el sistema de bomba para eliminar cualquier *buffer* que pueda quedar como residuo del uso anterior y conectar el extremo de entrada de la columna a la salida del inyector.
2. Lavar la columna con fase móvil 100% orgánica, como metanol o acetonitrilo, ajustar la velocidad de flujo de la bomba a 0,1 ml/min y aumentar a 1 ml/min en, a lo menos, 5 min.
3. Cuando la fase móvil fluya libremente desde la salida de la columna, parar el flujo y conectar la salida de la columna al detector. Esto previene la entrada de aire dentro del sistema de detección y da mayor rapidez para lograr el equilibrio de la línea de base.
4. Incrementar el flujo tal como se indica en el punto 2.

Siempre antes de comenzar a utilizar la columna la bomba se purgó al menos 5 minutos para asegurar la eliminación total del *buffer* del uso anterior. Durante gran parte del inicio de la investigación, la columna no fue lavada o no se hacía como correspondía. Luego se diseñó un protocolo de limpieza estándar para todos los usuarios del HPLC, el cual establecía que, tanto la columna como el equipo, se debían limpiar solo con agua y luego solo con acetonitrilo a flujo de 1 ml/min. Dicho protocolo no se ajustaba a lo que realmente se debía utilizar ni respetaba los incrementos en la velocidad de flujo que establece el manual de esta columna. Aunque la velocidad de flujo no se fue aumentando tan lentamente como se recomendaba, sí se esperaba que la presión se equilibrara antes de modificar nuevamente el flujo.

### **Equilibrio de la columna:**

1. Para evitar precipitaciones del *buffer* dentro de la columna o del sistema cromatográfico, se debe lavar la columna con 5 volúmenes de columna de una solución de agua/solvente orgánico, usando la misma cantidad de solvente que la contenida en la fase móvil.
2. Se aconseja partir con una velocidad de flujo de 0 ml/min e ir aumentando la velocidad en 0,1 ml/min cada 1 minuto. Luego, purgar la columna con la fase móvil hasta obtener una línea de base estable y, por último, verificar que los tiempos de retención y las áreas de los *peaks* de un estándar son estables al comparar 2 a 3 inyecciones consecutivas.

Para este caso en particular, se debería haber lavado la columna y el sistema HPLC con al menos 200 mL de una solución compuesta por 30% de acetonitrilo en agua, antes de introducir la fase móvil compuesta por 30% de acetonitrilo y 70% de *buffer* fosfato. Sin embargo, ninguno de estos dos pasos se realizó, ya que, luego del lavado realizado con agua y acetonitrilo, se procedía directamente a utilizar la columna.

### **Cuidados en el uso de la columna:**

1. Se recomienda utilizar, mientras no se vea afectada la resolución analítica, una precolumna entre el inyector y la columna para proteger a esta última y evitar su contaminación.
2. La preparación de las muestras se debe llevar a cabo en un solvente que sea miscible con la fase móvil, a fin de evitar la precipitación de la muestra y/o del *buffer*.
3. Debido a que las impurezas de las muestras pueden contaminar la columna, estas se deben filtrar usando membranas de tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ . Además, se aconseja realizar una centrifugación por 20 minutos a 8.000 rpm, y seguir trabajando con el sobrenadante.
4. Para mantener la máxima funcionalidad de la columna se deben utilizar solventes de grado cromatográficos de alta calidad. Además, se debe filtrar y desgasificar el *buffer* antes de su uso.
5. La columna puede resistir presiones de hasta 6.000 psi (400 bar), aunque a largo plazo presiones rutinarias de trabajo sobre los 4.000 – 5.000 psi deberían evitarse para maximizar la vida de la columna y del equipo.
6. La columna debe ser operada en un rango de pH de 2 a 8, ya que así se evita la desintegración de esta.

7. El rango de temperatura recomendado para operar esta columna y lograr una buena selectividad y baja viscosidad del solvente es de 20 – 40 °C.
8. Al almacenar la columna, esta se debe sellar completamente para evitar la evaporación y secado. Para periodos más largos de cuatro días a temperatura ambiente, se deben hacer fluir por la columna 10 volúmenes de columna de agua grado HPLC y luego almacenar la columna en 100% de acetonitrilo a temperatura ambiente. El agua se utiliza para evitar la precipitación del *buffer* en la columna cuando esta es introducida en acetonitrilo.

Durante todo el desarrollo, optimización y validación de la metodología no se utilizaron precolumnas, dado que la metodología en la que se basó esta investigación no las empleaba, lo que podría haber causado que la columna estuviera expuesta directamente a la contaminación. Además, los aumentos de presión que presentaba el sistema sobre el límite constante establecido (alrededor de los 2.000 psi o 120 bar dependiendo del HPLC utilizado), al igual que los *peaks* que repentinamente aparecían divididos o alteraban su forma, las modificaciones en los tiempos de retención o resolución u otros cambios atípicos observados en los cromatogramas, apuntaban a que la columna debía ser reemplazada por estar contaminada.

Todas las muestras fueron preparadas utilizando solo agua desionizada y acetonitrilo, los que eran miscibles en la fase móvil compuesta por estos mismos reactivos. Siempre se utilizaron solventes de grado cromatográfico de alta calidad, los cuales fueron filtrados y desgasificados siempre que se pudo, es decir, cuando el sistema de filtración al vacío estaba en buenas condiciones operativas y había filtros de membrana disponibles.

Las muestras durante la preparación sí fueron centrifugadas, aunque por 5 minutos a 14.000 rcf, y solo se siguió utilizando el sobrenadante. Pero durante las primeras pruebas que se hicieron para el desarrollo del método no se filtraron las muestras plasmáticas, por lo que podría haber sido inyectada en el HPLC algún tipo de impureza o proteína que contaminara la columna cromatográfica o, incluso, la aguja de inyección del equipo

Para resguardar la columna, todas las pruebas se hicieron a pH entre 2 y 7 y a lo largo de todo el periodo de trabajo se utilizó una temperatura de 25 °C.

Para periodos de trabajo entre una semana y otra, los cuales por lo general siempre eran mayores a cuatro días, al comienzo de la investigación no se tomó la precaución de lavar con agua y luego acetonitrilo la columna antes de guardarla. Al no haber realizado este paso, es muy probable que el *buffer* haya precipitado adentro, afectando su posterior rendimiento.

## 6. CONCLUSIONES

La metodología analítica desarrollada para cuantificar ertapenem en plasma humano mediante HPLC acoplado a un detector UV/Vis se validó según la “*Guidance for Industry*” de la FDA y la “*Guideline on Bioanalytical Method Validation*” de la EMA. De todos los parámetros exigidos en dichas guías, se lograron determinar con éxito los ensayos de selectividad, límites de detección y cuantificación, linealidad y exactitud y precisión intra-día, y el resto de las pruebas no cumplieron con los criterios establecidos. Como no se logró evaluar satisfactoriamente la precisión y exactitud inter-día, no se continuó con el proceso de validación y, por consiguiente, no se determinaron el resto de parámetros. Debido a estas razones, se concluyó que la metodología propuesta para cuantificar ertapenem en plasma humano no era capaz de entregar resultados confiables, válidos y coherentes, por lo que se descartó.

Entre los factores que pudieron influir en el fracaso del desarrollo y optimización de la metodología analítica se encuentran algunos errores relacionados con un deficiente control de calidad interno del laboratorio, como son: mantención y limpieza del HPLC debido al manejo por diferentes usuarios, material de laboratorio descalibrado o en mal funcionamiento y refrigeración deficiente de las soluciones stock. Por ello, es recomendable siempre asegurarse primero de que el lugar de trabajo cuente con las condiciones óptimas para llevar a cabo procedimientos analíticos. Pero lo que más influyó negativamente en los resultados obtenidos fue el uso y mantenimiento de la columna, ya que no siempre se le dieron los cuidados recomendados por el fabricante durante el tiempo que se trabajó con ella, causando así la disminución de su vida útil.

Por otro lado, en cuanto a la caracterización de los adultos mayores desde el aspecto biomédico y antropométrico, sí se lo logró determinar la composición corporal y el estado nutricional de los pacientes estudiados utilizando la metodología propuesta.

Esto permitió conocer las diferencias nutricionales que existían entre ellos al momento del estudio y tener una idea sobre los cambios fisiológicos asociados al envejecimiento que habían sufrido. A pesar de esto, no se pudo establecer si dichos cambios, sumados a las características de co-morbilidad que presentaban debido a que se encontraban hospitalizados en una unidad no crítica, podrían alterar la disposición de ertapenem y afectar el logro de un índice PK/PD óptimo, puesto que la investigación no se pudo finalizar como se tenía esperado.

Sin embargo, si se lograra validar una metodología analítica capaz de determinar la concentración de ertapenem en plasma humano, podría establecerse la relación entre los cambios fisiológicos propios de la senescencia y las co-morbilidades de los adultos mayores con la disposición de ertapenem, y se facilitaría el éxito de la terapia antimicrobiana.

Este punto es de gran relevancia para un profesional Químico Farmacéutico, puesto que su deber es velar por el uso racional de los medicamentos. Sin lugar a dudas, la inclusión de este profesional en las investigaciones farmacocinéticas es fundamental, dado que puede ser un gran aporte en la optimización de los tratamientos farmacológicos, a fin de lograr la máxima eficacia terapéutica con la mínima incidencia de efectos adversos.

Dado que no siempre es posible utilizar fármacos partiendo de criterios preestablecidos o de métodos empíricos basados en la respuesta clínica o bioquímica en relación con la presencia de dichos fármacos, como sería en este caso la mejoría de una infección, a veces es necesario usar otros métodos aplicados a la situación individual de cada paciente. Este es el objetivo al que apunta la farmacocinética clínica, ofreciendo, además, una importante proyección clínica para el farmacéutico que trabaja en hospital y que cuenta con una sólida base científica.

## 7. REFERENCIAS

### LISTADO DE ABREVIACIONES

AB	Área Braquial
AGB	Área Grasa Braquial
AMB	Área Muscular Braquial
AR	Altura de Rodilla
bar	Unidad de presión
CB	Circunferencia Braquial
CMB	Circunferencia Muscular Braquial
CP	Circunferencia de Pierna
ERT	Ertapenem
CIM	Concentración Inhibitoria mínima (en mg/L)
C <sub>máx</sub>	Concentración plasmática máxima (en mg/L)
CV	Coeficiente de variación
D	Densidad
DE	Desviación estándar
EMA	Del inglés <i>European Medicines Agency</i> . Agencia reguladora europea de Medicamentos
FDA	Del inglés <i>Food and Drug Administration</i> . Agencia reguladora de alimentos y medicamentos de Estados Unidos
H	Altura del plato teórico
HCUCH	Hospital Clínico de la Universidad de Chile
HPLC	Del inglés <i>High Pressure Liquid Chromatography</i> . Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
IMC	Índice de Masa Corporal
L	Litro
LB	Largo del Brazo
LOD	Límite de Detección, del inglés <i>Limit of Detection</i> .

LOQ	Límite de Cuantificación, del inglés <i>Limit of Quantification</i> .
MEB	Media Envergadura de Brazo
N	Número de platos teóricos
PBP	Proteínas de unión a Penicilinas, del inglés <i>Protein Binding Penicilin</i> .
PB	Pliegue Bicipital
PK/PD	Farmacocinético/Farmacodinámico, del inglés <i>Pharmacokinetics/Pharmacodynamics</i> .
PMB	Perímetro Muscular Braquial
pH	Índice que indica el grado de acidez o basicidad de una disolución.
PSI	Pliegue Supra-ilíaco
psi	Unidad de presión, del inglés <i>pounds-force per square inch</i> .
PSE	Pliegue Sub-escapular
PT	Pliegue Tricipital
OMS	Organización Mundial de la Salud.
QC	Control de calidad, del inglés <i>Quality Control</i> .
rcf	Unidad de medida de la fuerza de aceleración de una centrífuga, del inglés <i>relative centrifugal force</i>
Rs	Resolución
UGA	Unidad Geriátrica de Agudos.
UV/Vis	Ultravioleta/Visible.
mg/L	miligramos/litro.
nm	Nanómetros
U.I.	Unidades Internacionales
$\lambda$	Longitud de onda

## BIBLIOGRAFÍA

1. SENAMA, Servicio Nacional del Adulto Mayor, Gobierno de Chile. Política del Adulto Mayor. Disponible en: <http://www.senama.cl/PoliticaAM.html>. Año 2014. Accedido 3 mayo 2017.
2. Álvarez J, Montesinos GI, Rodríguez JM. Envejecimiento y nutrición. *Nutr Hosp Suplementos*. 2011; 4(3): 3-14.
3. Galbán AP, Sansó FJ, Díaz-Canel AM, Carrasco M, Oliva T. Envejecimiento poblacional y fragilidad en el adulto mayor. *Rev Cubana Salud Pública*. 2007; 33(1): 235–239.
4. Zorrilla AE. El Envejecimiento y el estrés oxidativo. *Rev Cubana Invest Bioméd*. 2002; 21(3): 178-185.
5. Pinilla B. Neumonía en los ancianos institucionalizados. *An Med Interna*. 2003; 20(11): 555-557.
6. Borba de Amorim R, Coelho-SantaCruz MA, Borges de Souza-Júnior PR, Corrêa da Mota J, González-H C. Medidas de estimación de la estatura aplicadas al índice de masa corporal (IMC) en la evaluación del estado nutricional de adultos mayores. *Rev Chil Nutr*. 2008; 35(1): 272–279.
7. Bernal-Orozco MF, Vizmanos B, Hunot C, et al. Equation to estimate body weight in elderly Mexican women using anthropometric measurements. *Nutr Hosp*. 2010; 25(4): 648–655.
8. Díaz de León E, Tamez HE, Hermsillo HG. Estimación del peso en adultos mayores a partir de medidas antropométricas del Estudio SABE. *Nutr Hosp*. 2011; 26(5): 1067–1072.
9. Chumlea WC, Roche AF, Steinbaugh ML. Estimating stature from knee height for persons 60 to 90 years of age. *J Am Geriatr Soc*. 1985; 33(2): 116–120.
10. Frisancho AR. New norms of upper limb fat and muscles areas for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr*. 1981; 34(11): 2540–2545.
11. Benavides X. Nutrición del Adulto Mayor. DIVAP. Subsecretaría de Redes Asistenciales, Ministerio de Salud. 2013. Disponible en: [http://ssmaule.redsalud.gob.cl/index.php/component/jdownloads/send/136-presentacion-de-videos-minsal-2013/474-mal-nutricion-nut?option=com\\_jdownloads](http://ssmaule.redsalud.gob.cl/index.php/component/jdownloads/send/136-presentacion-de-videos-minsal-2013/474-mal-nutricion-nut?option=com_jdownloads). Accedido 25 agosto 2016.
12. Santos JL, Albala C, Lera L, et al. Anthropometric measurements in the elderly population of Santiago, Chile. *J Nutrition*. 2004; 20(5): 452–457.
13. Valenzuela A. Uso de fármacos en el adulto mayor. Programa de geriatría de la Escuela de Medicina, PUC. 2015. Disponible en: <http://medicina.uc.cl/vision-geriatria/uso-de-farmacos>. Accedido 26 junio 2017.
14. Arriagada L, Jirón M, Ruiz I. Uso de medicamentos en el adulto mayor. *Rev Hosp Clín Univ Chile*. 2008;19(1):309–317.
15. Gulias A. Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. En: Pérez I, ed. *Manual de terapéutica médica y procedimientos de urgencias*. 7ª ed. México, D.F.: McGraw-Hill Medical; 2016: capítulo VIII.



16. Hernandez W, Ramos A, Nodarse R, Padrón A, De Armas E. Resistencia bacteriana en las Bacterias Productoras de Betalactamasas Extendidas (BLEE). *Rev Cubana Med Intensiva y Emergencias*. 2006;5(1):256–264.
17. García-Hernández AM, García-Vázquez E, Hernández-Torres A, et al. Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): Significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter*. 2011;24(2):57–66.
18. Curran M, Simpson D, Perry C. Ertapenem: A review of its use in the management of bacterial infections. *Drugs*. 2003;63(17):1855–1878.
19. Burkhardt O, Derendorf H, Welte T. Ertapenem: the new carbapenem 5 years after first FDA licensing for clinical practice. *Expert Opin Pharmacother*. 2007;8(2):237–256.
20. Hammond ML. Ertapenem: A group 1 carbapenem with distinct antibacterial and pharmacological properties. *J Antimicrob Chemother*. 2004; 53 Suppl 2: ii7–ii10.
21. Pramod S, Robin I. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(4):538–542.
22. Goldstein EJC, Snyderman DR. Intra-abdominal: Review of the bacteriology, antimicrobial susceptibility and the role of ertapenem in their therapy. *J Antimicrob Chemother*. 2004;53 Suppl 2: ii29–ii36.
23. Moellering RC, Eliopoulos GM, Sentochnik DE. The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*. 1989; 24(1):1–7.
24. Kattan JN, Villegas M V, Quinn JP. Review of new developments in carbapenems. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14(12):1102–1111.
25. Ayalew K, Nambiar S, Yasinskaya Y, Jantusch BA. Carbapenems in pediatrics. *Ther Drug Monit*. 2003;25(5):593–599.
26. Mouton JW, Touw DJ, Horrevorts AM, Vinks AA. Comparative pharmacokinetics of the carbapenems: Clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2000; 39(3):185–201.
27. Cunha BA. Ertapenem: A review of its microbiologic, pharmacokinetic and clinical aspects. *Drugs Today*. 2002; 38:195–213.
28. Guillian M, Perry K, Perry C. Ertapenem: A Review of its Use in the Treatment of Bacterial Infections. *Drugs*. 2005;65(15):2151–2178.
29. Zhanel GG, Johanson C, Embil JM, et al. Ertapenem: review of a new carbapenem. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2005; 3(1):23–39.
30. OMS, Organización Mundial de la Salud. Países: Chile. WHO. 2017. Disponible en: <http://www.who.int/countries/chl/es/>. Accedido: 17 mayo 2017.
31. Vázquez CG. *Guía de mediciones antropométricas para pacientes adultos postrados*. Santiago, Chile: Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Unidad de Nutrición; 2009.
32. Chumlea WC, Guo S, Roche AF, Steinbaugh ML. Prediction of body weight for the nonambulatory elderly from anthropometry. *J Am Diet Assoc*. 1988; 3(5):564–568.

33. Durnin JVGA, Womersley J. Body fat assessed from total body density and its estimation from skinfold thickness: measurements on 481 men and women aged from 16 to 72 years. *Br J Nutr.* 1974;32(1):77–97.
34. ANAMED, Agencia Nacional de Medicamentos. Guía de Buenas Prácticas Clínicas. Instituto de Salud Pública. 2015. Disponible en: [http://www.ispch.cl/sites/default/files/Resolucion\\_460\\_Buenas\\_Practicas\\_Clinicas\\_13022015.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/Resolucion_460_Buenas_Practicas_Clinicas_13022015.pdf). Accedido: 18 marzo 2017.
35. Grupo Experto de Trabajo de la Conferencia Internacional de Armonización (CIARM). *Normas de Buenas Prácticas Clínicas (BPC)*. Guía tripartita armonizada de la conferencia internacional de armonización. 1997-1998.
36. Frasca D, Marchand S, Petitpas F, Dahyot-Fizelier C, Couet W, Mimoz O. Pharmacokinetics of ertapenem following intravenous and subcutaneous infusions in patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(2):924–926.
37. FDA, Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>. Publicado: mayo 2001. Accedido: 16 enero 2016.
38. EMA, European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. Disponible en: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf). Publicado: 2011. Accedido: 16 enero 2016.
39. McWhinney BC, Wallis SC, Hillister T, Roberts JA, Lipman J, Ungerer JPJ. Analysis of 12 beta-lactam antibiotics in human plasma by HPLC with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(22):2039–2043.
40. Barrera G. *Evaluación Nutricional del Crecimiento y del Riesgo Cardiovascular y Metabólico*. 2ª Ed. Santiago, Chile; 2013.
41. Waters Corporation. Waters Spherisorb Columns: Care and use manual. 2012. Disponible en: <http://www.waters.com/waters/support.htm?locale=129&cid=51377&lid=10077655>. Accedido: 22 septiembre 2017.
42. Dolan J. A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection. ACE. 2014. Disponible en: [http://www.hplc.eu/Downloads/ACE\\_Guide\\_BufferSelection.pdf](http://www.hplc.eu/Downloads/ACE_Guide_BufferSelection.pdf). Accedido: 4 abril 2016.
43. William Long A. Estabilidad a pH bajo y alto de una columna Agilent Poroshell HPH C18. 2015. Disponible en: <http://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-6525ES.pdf>. Accedido: 22 septiembre 2017.
44. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. Introducción a las separaciones cromatográficas. En: Cervantes S, ed. *Principios de análisis instrumental*. 6ª ed. México, D.F.: Cengage Learning; 2008: 762-787.
45. Briscoe SE, McWhinney BC, Lipman J, Roberts JA, Ungerer JPJ. A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2012;907(1):178–184.
46. Musson DG, Birk KL, Kitchen CJ, et al. Assay methodology for the quantitation of unbound ertapenem, a new carbapenem antibiotic, in human plasma. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2003;783(1):1–9.

## ANEXOS DISPONIBLES EN CD

1. Protocolo de recolección y manejo de las muestras plasmáticas de ertapenem obtenidas de los pacientes.
2. Pauta de muestreo para estudio farmacocinético de ertapenem.
3. Ficha de registro de mediciones antropométricas y tratamiento farmacológico.
4. Tabla de Clasificación de los valores del IMC utilizada por el MINSAL para la evaluación del estado nutricional de los adultos mayores chilenos<sup>11</sup>.
5. Tabla de Reservas de grasa y proteínas según estándares de Frisancho<sup>10</sup>.
6. Tabla de Pliegue Tricipital para hombres entre 1 – 74,9 años (percentiles – mm.) utilizada por la OMS<sup>40</sup>.
7. Tabla de Circunferencia Braquial para hombres entre 1 – 74,9 años (percentiles – mm.) utilizada por la OMS<sup>40</sup>.
8. Tabla de Circunferencia o Perímetro Muscular Braquial para hombres entre 1 – 74,9 años (percentiles – mm.) utilizada por la OMS<sup>40</sup>.
9. Tabla de Área Grasa Braquial para hombres entre 1 – 74,9 años (percentiles – mm<sup>2</sup>.) utilizada por la OMS<sup>40</sup>.
10. Tabla de Área Muscular Braquial para hombres entre 1 – 74,9 años (percentiles – mm<sup>2</sup>.) utilizada por la OMS<sup>40</sup>.
11. Tabla de contenido de grasa por sumatoria de 4 pliegues para hombres entre 17 – 50+ años utilizada por la OMS<sup>40</sup>.
12. Tabla de Pliegue Tricipital para mujeres entre 1 – 74,9 años (percentiles – mm.) utilizada por la OMS<sup>40</sup>.
13. Tabla de Circunferencia Braquial para mujeres entre 1 – 74,9 años (percentiles – mm.) utilizada por la OMS<sup>40</sup>.
14. Tabla de Circunferencia o Perímetro Muscular Braquial para mujeres entre 1 – 74,9 años (percentiles – mm.) utilizada por la OMS<sup>40</sup>.
15. Tabla de Área Grasa Braquial para mujeres entre 1 – 74,9 años (percentiles – mm<sup>2</sup>.) utilizada por la OMS<sup>40</sup>.
16. Tabla de Área Muscular Braquial para mujeres entre 1 – 74,9 años (percentiles – mm<sup>2</sup>.) utilizada por la OMS<sup>40</sup>.
17. Tabla de contenido de grasa por sumatoria de 4 pliegues para mujeres entre 17 – 50+ años utilizada por la OMS<sup>40</sup>.

## **RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS PLASMÁTICAS DE ERTAPENEM**

### **Muestreo para estudio farmacocinético**

1. Extraer 3 mL de sangre venosa y transferir a un tubo heparinizado.
2. Llevar la muestra inmediatamente a un cooler a 4°C.
3. Centrifugar por 10 minutos a 2500 x g para separar el plasma.
4. Transferir el plasma a viales de almacenamiento (eppendorf).
5. Almacenar las muestras a -80°C hasta el análisis.

**PAUTA DE MUESTREO PARA ESTUDIO FARMACOCINÉTICO  
DE ERTAPENEM**

**Identificación:** ID#

**Servicio de origen:**

**Fecha de muestreo:**

<b>Tiempo definido muestreo (hora)</b>	<b>Tiempo real de muestreo (hora)</b>	<b>Observaciones</b>
0		
0,5		
1		
2		
3		
6		
12		
24		

**FICHA DE REGISTRO DE MEDICIONES ANTROPOMÉTRICAS Y  
TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO**

Datos pacientes			Medidas pierna (cm)		Medidas brazo (cm)			Pliegues cutáneos (mm)			
IDENT	Sexo	Edad	AR	CP	MEB	LB	CB	PB	PT	PSE	PSI
ID#											
ID#											
ID#											
ID#											
ID#											
ID#											

	Peso (Kg) y Talla (m)					IMC		Composición corporal				
IDENT	Peso real	Peso est <sup>1</sup>	Peso est <sup>2</sup>	Talla est <sup>1</sup>	Talla est <sup>2</sup>	IMC <sup>1</sup>	IMC <sup>2</sup>	Densidad	% Grasa	Peso grasa	% Magro	Peso magro
ID#												
ID#												
ID#												
ID#												
ID#												
ID#												

**Medicamentos administrados durante la hospitalización en la UGA**

FÁRMACO	POSOLOGÍA	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	HORARIO

**Tabla de Clasificación de los valores del IMC utilizada por el MINSAL para la evaluación del estado nutricional de los adultos mayores chilenos**

<b>Clasificación nutricional</b>	<b>IMC</b>
Déficit de peso (DP)	$\leq 23$
Normal (N)	23,1 – 27,9
Sobrepeso (S)	28 – 31,9
Obesidad (O)	$\geq 32$

**Tabla de Reservas de grasa y proteínas según estándares de Frisancho**

<b>Percentil</b>	<b>Pliegue Tricipital (Reserva Energética)</b>	<b>Área Grasa Braquial (Reserva Energética)</b>	<b>Área Muscular (Reserva Proteica)</b>
< 5	Muy Baja (D)	Muy Baja (D)	Muy Baja (D)
> 5 ≤ 10	Baja (RD)	Baja (RD)	Baja
>10 ≤ 90	Normal	Normal	Normal
>90 ≤ 95	Alta (RO)	Alta (RO)	Alta
>95	Muy Alta (O)	Muy Alta (O)	Muy Alta

D: Desnutrición; RD: Riesgo de Desnutrición; RO: Riesgo de Obesidad; O: Obesidad

**TABLA 116**  
**PLIEGUE TRICIPITAL (percentiles-mm.)**  
**1 - 74,9 años**

EDAD	HOMBRES						
	5	10	25	50	75	90	95
1 - 1.9	6	7	8	10	12	14	16
2 - 2.9	6	7	8	10	12	14	15
3 - 3.9	6	7	8	10	11	14	15
4 - 4.9	6	6	8	9	11	12	14
5 - 5.9	6	6	8	9	11	14	15
6 - 6.9	5	6	7	8	10	13	16
7 - 7.9	5	6	7	9	12	15	17
8 - 8.9	5	6	7	8	10	13	16
9 - 9.9	6	6	7	10	13	17	18
10 - 10.9	6	6	8	10	14	18	21
11 - 11.9	6	6	8	11	16	20	24
12 - 12.9	6	6	8	11	14	22	28
13 - 13.9	5	5	7	10	14	22	26
14 - 14.9	4	5	7	9	14	21	24
15 - 15.9	4	5	6	8	11	18	24
16 - 16.9	4	5	6	8	12	16	22
17 - 17.9	5	5	6	8	12	16	19
18 - 18.9	4	5	6	9	13	20	24
19 - 24.9	4	5	7	10	15	20	22
25 - 34.9	5	6	8	12	16	20	24
35 - 44.9	5	6	8	12	16	20	23
45 - 54.9	6	6	8	12	15	20	25
55 - 64.9	5	6	8	11	14	19	22
65 - 74.9	4	6	8	11	15	19	22

Frisancho, R. Am. J. Clin. Nutr. 1981; 34: 2540-2545



**TABLA 117**  
**CIRCUNFERENCIA BRAQUIAL (percentiles-mm.)**  
**1 - 74,9 años**

EDAD	HOMBRES						
	5	10	25	50	75	90	95
1- 1.9	142	146	150	159	170	176	183
2- 2.9	141	145	153	162	170	178	185
3- 3.9	150	153	160	167	175	184	190
4- 4.9	149	154	162	171	180	186	192
5- 5.9	153	160	167	175	185	195	204
6- 6.9	155	159	167	179	188	209	228
7- 7.9	162	167	177	187	201	223	230
8- 8.9	162	170	177	190	202	220	245
9- 9.9	175	178	187	200	217	249	257
10-10.9	181	184	196	210	231	262	274
11-11.9	186	190	202	223	244	261	280
12-12.9	193	200	214	232	254	282	303
13-13.9	194	211	228	247	263	286	301
14-14.9	220	226	237	253	283	303	322
15-15.9	222	229	244	264	284	311	320
16-16.9	244	248	262	278	303	324	343
17-17.9	246	253	267	285	308	336	347
18-18.9	245	260	276	297	321	353	379
19-24.9	262	272	288	308	331	355	372
25-34.9	271	282	300	319	342	362	375
35-44.9	278	287	305	326	345	363	374
45-54.9	267	281	301	322	342	362	376
55-64.9	258	273	296	317	336	355	369
65-74.9	248	263	285	307	325	344	355

Frisancho, R. Am. J. Clin. Nutr. 1981; 34: 2540 - 2545

**TABLA 118**  
**CIRCUNFERENCIA MUSCULAR BRAQUIAL (percentiles-mm.)**  
**1 - 74,9 años**

EDAD	HOMBRES						
	5	10	25	50	75	90	95
1-1.9	110	113	119	127	135	144	147
2-2.9	111	114	122	130	140	146	150
3-3.9	117	123	131	137	143	148	153
4-4.9	123	126	133	141	148	156	159
5-5.9	128	133	140	147	154	162	169
6-6.9	131	135	142	151	161	170	177
7-7.9	137	139	151	160	168	177	190
8-8.9	140	145	154	162	170	182	187
9-9.9	151	154	161	170	183	196	202
10-10.9	156	160	166	180	191	209	221
11-11.9	159	165	173	183	195	205	230
12-12.9	167	171	182	195	210	223	241
13-13.9	172	179	196	211	226	238	245
14-14.9	189	199	212	223	240	260	264
15-15.9	199	204	218	237	254	266	272
16-16.9	213	225	234	249	269	287	296
17-17.9	224	231	245	258	273	294	312
18-18.9	226	237	252	264	283	298	324
19-24.9	238	245	257	273	289	309	321
25-34.9	243	250	264	279	298	314	326
35-44.9	247	255	269	286	302	318	327
45-54.9	239	249	265	281	300	315	326
55-64.9	236	245	260	278	295	310	320
65-74.9	223	233	251	268	284	298	306

Frisancho, R. Am. J. Clin. Nutr. 1981; 34: 2540-2545

**TABLA 119**  
**AREA GRASA BRAQUIAL (percentiles-mm<sup>2</sup>.)**  
**1 - 74,9 años**

EDAD	HOMBRES						
	5	10	25	50	75	90	95
1-1.9	452	486	590	741	895	1036	1176
2-2.9	434	504	578	737	871	1044	1148
3-3.9	464	519	590	736	868	1071	1151
4-4.9	428	494	598	722	859	989	1085
5-5.9	446	488	582	713	914	1176	1299
6-6.9	371	446	539	678	896	1115	1519
7-7.9	423	473	574	758	1011	1393	1511
8-8.9	410	460	588	725	1003	1248	1558
9-9.9	485	527	635	859	1252	1864	2081
10-10.9	523	543	738	982	1376	1906	2609
11-11.9	536	595	754	1148	1710	2348	2574
12-12.9	554	650	874	1172	1558	2536	3580
13-13.9	475	570	812	1096	1702	2744	3322
14-14.9	453	563	786	1082	1608	2746	3508
15-15.9	521	595	690	931	1423	2434	3100
16-16.9	542	593	844	1078	1746	2280	3041
17-17.9	598	698	827	1096	1636	2407	2888
18-18.9	560	665	860	1264	1947	3302	3928
19-24.9	594	743	963	1406	2231	3098	3652
25-34.9	675	831	1174	1752	2459	3246	3786
35-44.9	703	851	1310	1792	2463	3098	3624
45-54.9	749	922	1254	1741	2359	3245	3928
55-64.9	658	839	1116	1645	2236	2976	3466
65-74.9	573	753	1122	1621	2199	2876	3327

Frisancho, R. Am. J. Clin. Nutr. 1981; 34: 2540-2545

**TABLA 120**  
**AREA MUSCULAR BRAQUIAL (percentiles-mm<sup>2</sup>.)**  
**1 - 74,9 años**

EDAD	HOMBRES						
	5	10	25	50	75	90	95
1 - 1.9	956	1014	1133	1278	1447	1644	1720
2 - 2.9	973	1040	1190	1345	1557	1690	1787
3 - 3.9	1095	1201	1357	1484	1618	1750	1853
4 - 4.9	1207	1264	1408	1579	1747	1926	2008
5 - 5.9	1298	1411	1550	1720	1884	2089	2285
6 - 6.9	1360	1447	1605	1815	2056	2297	2493
7 - 7.9	1497	1548	1808	2027	2246	2494	2886
8 - 8.9	1550	1664	1895	2089	2296	2628	2788
9 - 9.9	1811	1884	2067	2288	2657	3053	3257
10 - 10.9	1930	2027	2182	2575	2903	3486	3882
11 - 11.9	2016	2156	2382	2670	3022	3359	4226
12 - 12.9	2216	2339	2649	3022	3496	3968	4640
13 - 13.9	2363	2546	3044	3553	4081	4502	4794
14 - 14.9	2830	3147	3586	3963	4575	5368	5530
15 - 15.9	3138	3317	3788	4481	5134	5631	5900
16 - 16.9	3625	4044	4352	4951	5753	6576	6980
17 - 17.9	3998	4252	4777	5286	5950	6886	7726
18 - 18.9	4070	4481	5066	5552	6374	7067	8355
19 - 24.9	4508	4777	5274	5913	6660	7606	8200
25 - 34.9	4694	4963	5541	6214	7067	7847	8436
35 - 44.9	4844	5181	5740	6490	7265	8034	8488
45 - 54.9	4546	4946	5589	6297	7142	7918	8458
55 - 64.9	4422	4783	5381	6144	6919	7670	8149
65 - 74.9	3973	4411	5031	5716	6432	7074	7453

TABLA 121

## CONTENIDO DE GRASA POR SUMATORIA DE 4 PLIEGUES (bíceps, tríceps, subescapular, suprailíaco)

PLIEGUES CUTANEOS	VARONES (Edad)			
	17-29	30-39	40-49	50 +
15	4.8	-	-	-
20	8.1	12.2	12.2	12.6
25	10.5	14.2	15.0	15.6
30	12.9	16.2	17.7	18.6
35	14.7	17.7	19.6	20.8
40	16.4	19.2	21.4	22.9
45	17.7	20.4	23.0	24.7
50	19.0	21.5	24.6	26.5
55	20.1	22.5	25.9	27.9
60	21.2	23.5	27.1	29.2
65	22.2	24.3	28.2	30.4
70	23.1	25.1	29.3	31.6
75	24.0	25.9	30.3	32.7
80	24.8	26.6	31.2	33.0
85	25.5	27.2	32.1	34.8
90	26.2	27.8	33.0	35.8
95	26.9	28.4	33.7	36.6
100	27.6	29.0	34.4	37.4

Durnin, J. and Womersley J., Br. J. Nutr. 1974; 32: 77-97

**TABLA 122**  
**PLIEGUE TRICIPITAL (percentiles-mm.)**  
**1 - 74,9 años**

EDAD	MUJERES						
	5	10	25	50	75	90	95
1- 1.9	6	7	8	10	12	14	16
2- 2.9	6	8	9	10	12	15	16
3- 3.9	7	8	9	11	12	14	15
4- 4.9	7	8	8	10	12	14	16
5- 5.9	6	7	8	10	12	15	18
6- 6.9	6	6	8	10	12	14	16
7- 7.9	6	7	9	11	13	16	18
8- 8.9	6	8	9	12	15	18	24
9- 9.9	8	8	10	13	16	20	22
10-10.9	7	8	10	12	17	23	27
11-11.9	7	8	10	13	18	24	28
12-12.9	8	9	11	14	18	23	27
13-13.9	8	8	12	15	21	26	30
14-14.9	9	10	13	16	21	26	28
15-15.9	8	10	12	17	21	25	32
16-16.9	10	12	15	18	22	26	31
17-17.9	10	12	13	19	24	30	37
18-18.9	10	12	15	18	22	26	30
19-24.9	10	11	14	18	24	30	34
25-34.9	10	12	16	21	27	34	37
35-44.9	12	14	18	23	29	35	38
45-54.9	12	16	20	25	30	36	40
55-64.9	12	16	20	25	31	36	38
65-74.9	12	14	18	24	29	34	36

Frisancho, R. Am. J. Clin. Nutr. 1981; 34: 2540 - 2545

**TABLA 123**  
**CIRCUNFERENCIA BRAQUIAL (percentiles-mm.)**  
**1 - 74,9 años**

EDAD	MUJERES						
	5	10	25	50	75	90	95
1- 1.9	138	142	148	156	164	172	177
2- 2.9	142	145	152	160	167	176	184
3- 3.9	143	150	158	167	175	183	189
4- 4.9	149	154	160	169	177	184	191
5- 5.9	153	157	165	175	185	203	211
6- 6.9	156	162	170	176	187	204	211
7- 7.9	164	167	174	183	199	216	231
8- 8.9	168	172	183	195	214	247	261
9- 9.9	178	182	194	211	224	251	260
10-10.9	174	182	193	210	228	251	265
11-11.9	185	194	208	224	248	276	303
12-12.9	194	203	216	237	256	282	294
13-13.9	202	211	223	243	271	301	338
14-14.9	214	223	237	252	272	304	322
15-15.9	208	221	239	254	279	300	322
16-16.9	218	224	241	258	283	318	334
17-17.9	220	227	241	264	295	324	350
18-18.9	222	227	241	258	281	312	325
19-24.9	221	230	247	265	290	319	345
25-34.9	233	240	256	277	304	342	368
35-44.9	241	251	267	290	317	356	378
45-54.9	242	256	274	299	328	362	384
55-64.9	243	257	280	303	335	367	385
65-74.9	240	252	274	299	326	356	373

**TABLA 124**  
**CIRCUNFERENCIA MUSCULAR BRAQUIAL (percentiles-mm.)**  
**1 - 74,9 años**

EDAD	MUJERES						
	5	10	25	50	75	90	95
1-1.9	105	111	117	124	132	139	143
2-2.9	111	114	119	126	133	142	147
3-3.9	113	119	124	132	140	146	152
4-4.9	115	121	128	136	144	152	157
5-5.9	125	128	134	142	151	159	165
6-6.9	130	133	138	145	154	166	171
7-7.9	129	135	142	151	160	171	176
8-8.9	138	140	151	160	171	183	194
9-9.9	147	150	158	167	180	194	198
10-10.9	148	150	159	170	180	190	197
11-11.9	150	158	171	181	196	217	223
12-12.9	162	166	180	191	201	214	220
13-13.9	169	175	183	198	211	226	240
14-14.9	174	179	190	201	216	232	247
15-15.9	175	178	189	202	215	228	244
16-16.9	170	180	190	202	216	234	249
17-17.9	175	183	194	205	221	239	257
18-18.9	174	179	191	202	215	237	245
19-24.9	179	185	195	207	221	236	249
25-34.9	183	188	199	212	228	246	264
35-44.9	186	192	205	218	236	257	272
45-54.9	187	193	206	220	238	260	274
55-64.9	187	196	209	225	244	266	280
65-74.9	185	195	208	225	244	264	279

Frisancho, R. Am. J. Clin. Nutr. 1981; 34: 2540-2545



**TABLA 125**  
**AREA GRASA BRAQUIAL (percentiles-mm<sup>2</sup>.)**  
**1 - 74,9 años**

EDAD	MUJERES						
	5	10	25	50	75	90	95
1 - 1.9	401	466	578	706	847	1022	1140
2 - 2.9	469	526	642	747	894	1061	1173
3 - 3.9	473	529	656	822	967	1106	1158
4 - 4.9	490	541	654	766	907	1109	1236
5 - 5.9	470	529	647	812	991	1330	1536
6 - 6.9	464	508	638	827	1009	1263	1436
7 - 7.9	491	560	706	920	1135	1407	1644
8 - 8.9	527	634	769	1042	1383	1872	2482
9 - 9.9	642	690	933	1219	1584	2171	2524
10 - 10.9	616	702	842	1141	1608	2500	3005
11 - 11.9	707	802	1015	1301	1942	2730	3690
12 - 12.9	782	854	1090	1511	2056	2666	3369
13 - 13.9	726	838	1219	1625	2374	3272	4150
14 - 14.9	981	1043	1423	1818	2403	3250	3765
15 - 15.9	839	1126	1396	1886	2544	3093	4195
16 - 16.9	1126	1351	1663	2006	2598	3374	4236
17 - 17.9	1042	1267	1463	2104	2977	3864	5159
18 - 18.9	1003	1230	1616	2104	2617	3508	3733
19 - 24.9	1046	1198	1596	2166	2959	4050	4896
25 - 34.9	1173	1399	1841	2548	3512	4690	5560
35 - 44.9	1336	1619	2158	2898	3932	5093	5847
45 - 54.9	1459	1803	2447	3244	4229	5416	6140
55 - 64.9	1345	1879	2520	3369	4360	5276	6152
65 - 74.9	1363	1681	2266	3063	3943	4914	5530

Frisancho, R. Am. J. Clin. Nutr. 1981; 34: 2540-2545

**TABLA 126**  
**AREA MUSCULAR BRAQUIAL (percentiles-mm<sup>2</sup>.)**  
**1 - 74,9 años**

EDAD	MUJERES						
	5	10	25	50	75	90	95
1 - 1.9	885	973	1084	1221	1378	1535	1621
2 - 2.9	973	1029	1119	1269	1405	1595	1727
3 - 3.9	1014	1133	1227	1396	1563	1690	1846
4 - 4.9	1058	1171	1313	1475	1644	1832	1958
5 - 5.9	1238	1301	1423	1598	1825	2012	2159
6 - 6.9	1354	1414	1513	1683	1877	2182	2323
7 - 7.9	1330	1441	1602	1815	2045	2332	2469
8 - 8.9	1513	1566	1808	2034	2327	2657	2996
9 - 9.9	1723	1788	1976	2227	2571	2987	3112
10 - 10.9	1740	1784	2019	2296	2583	2873	3093
11 - 11.9	1784	1987	2316	2612	3071	3739	3953
12 - 12.9	2092	2182	2579	2904	3225	3655	3847
13 - 13.9	2269	2426	2657	3130	3529	4081	4568
14 - 14.9	2418	2562	2874	3220	3704	4294	4850
15 - 15.9	2426	2518	2847	3248	3689	4123	4756
16 - 16.9	2308	2567	2865	3248	3718	4353	4946
17 - 17.9	2442	2674	2996	3336	3883	4552	5251
18 - 18.9	2398	2538	2917	3243	3694	4461	4767
19 - 24.9	2538	2728	3026	3406	3877	4439	4940
25 - 34.9	2661	2826	3148	3573	4138	4906	5541
35 - 44.9	2750	2948	3359	3783	4428	5240	5877
45 - 54.9	2784	2956	3378	3858	4520	5373	5964
55 - 64.9	2784	3063	3477	4045	4750	5632	6247
65 - 74.9	2737	3018	3444	4019	4739	5566	6214

TABLA 127

CONTENIDO DE GRASA POR SUMATORIA DE 4 PLIEGUES  
(bíceps, tríceps, subescapular, suprailíaco)

PLIEGUES CUTANEOS	MUJERES (Edad)			
	17-29	30-39	40-49	50 +
15	10.5	-	-	-
20	14.1	17.0	19.8	21.4
25	16.8	19.4	22.2	24.0
30	19.5	21.8	24.5	26.6
35	21.5	23.7	26.4	28.5
40	23.4	25.5	28.2	30.3
45	25.0	26.9	29.6	31.9
50	26.5	28.2	31.0	33.4
55	27.8	29.4	32.1	34.6
60	29.1	30.6	33.2	35.7
65	30.2	31.6	34.1	36.7
70	31.2	32.5	35.0	37.7
75	32.2	34.4	35.9	38.7
80	33.1	34.3	36.7	39.6
85	34.0	35.1	37.5	40.4
90	34.8	35.8	38.3	41.2
95	35.6	36.5	39.0	41.9
100	36.4	37.2	39.7	42.6

Durnin, J. and Womersley J., Br. J. Nutr. 1974; 32: 77-97