



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN
MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFÍA
DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN PARA
CUANTIFICAR CITRATO DE SILDENAFIL EN
PLASMA HUMANO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:
LUIS ALBERTO VALLEJO CASTILLO**

**DIRECTORA / ASESORA:
Dra. En C. LETICIA CRUZ ANTONIO**

Agradecimiento al proyecto PAPIIT IN 209810





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La luna.

La luna se puede tomar a cucharadas
o como una cápsula cada dos horas.
Es buena como hipnótico y sedante
y también alivia
a los que se han intoxicado de filosofía.

Un pedazo de luna en el bolsillo
es mejor amuleto que la pata de conejo:
sirve para encontrar a quien se ama,
para ser rico sin que lo sepa nadie
y para alejar a los médicos y las clínicas.

Se puede dar de postre a los niños
cuando no se han dormido,
y unas gotas de luna en los ojos de los ancianos
ayudan a bien morir.

Pon una hoja tierna de la luna
debajo de tu almohada
y mirarás lo que quieras ver.

Lleva siempre un frasquito del aire de la luna
para cuando te ahogues,
y dale la llave de la luna
a los presos y a los desencantados.

Para los condenados a muerte
y para los condenados a vida
no hay mejor estimulante que la luna
en dosis precisas y controladas.

Jaime Sabines.

Dedicatoria.

Éste trabajo, mi carrera y mi vida entera la dedico ***a mis padres***, Ma. Elena Castillo y Alberto Vallejo. Agradezco infinitamente al ser que los designo como mis padres. Son un ejemplo a seguir, usted mamá tan incansable y comprensiva, y usted papá mi mejor amigo y mi fuente de consejos.

A mis hermanos, Mario y Saúl, por cumplir obligaciones que eran más cuando estaba ocupado estudiando. Gracias por darle color y alegría a mi vida desde que los conozco.

A mis abuelitos, Marciano Castillo y Dominga Florín. Usted abuelita, la persona más sabia que conozco y la más graciosa de las abuelitas. A usted abuelito, tan responsable e inteligente. Los admiro. A ustedes les dedico también este trabajo porque desde hace años comenzaron a construir los cimientos donde hoy estoy yo, que tal vez no lo vean, pero no estaría aquí si no hubieran tenido esas ganas de salir adelante.

A mi abuelita Ofelia Rubio (Marina) y a mi abuelito Sixto Vallejo. Me hubiera gustado conocerla más y a usted verlo solo una vez. También yo represento parte de esos principios que siguieron en vida y esfuerzos que dieron en su existencia.

Agradecimientos.

A usted mi Dios y a su mamá Lupita. Gracias infinitas por ayudarme en esos momentos de decisión, gracias por guiarme en mi camino, gracias por darme la luz para ver en dónde estoy, gracias por darle asilo a mi alma cuando no puedo dejarla en otro lugar. Perdón porque muchas veces solo te hablo cuando estoy en problemas o estoy confundido.

Mi más sincero y profundo agradecimiento a la **Dra. Leticia Cruz Antonio**, por dejarme realizar éste trabajo con ella, por ser tan amable y paciente conmigo, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y ponerme frente a la primera oportunidad de ejercer mi carrera. No sé como pagarle.

A mis amigos de la facultad, a ustedes que me conocen como compañero de estudios y ojalá me conozcan como colega. Gracias por darme lo mejor de ustedes y por apreciarme más de lo que merezco. Especialmente a ti, que compartiste por un buen tiempo tu vida conmigo, gracias por haber sido mi guía, mi sonrisa y mi meta a alcanzar (Aunque no lo logré). Te deseo lo mejor.

A mis nuevos compañeros de trabajo y jefes, amigos todos. Gracias por recibirme con los brazos abiertos y darme la oportunidad de comenzar a crecer. Gracias por mostrarme que antes que mis compañeros de trabajo son personas con las que puedo reír e intercambiar trozos de nuestras vidas. Gracias por empujarme hacia adelante.

A mis maestros de la universidad, personas que día a día confían en nosotros sus conocimientos y esfuerzos, muchas veces sin saber en que se convertirá el tiempo que invierten en nosotros. Gracias a los malos maestros, a los buenos maestros y a los maestros que ante todo saben ser amigos antes que una autoridad. Gracias a mis sinodales que prestaron su valioso tiempo para la revisión de este trabajo. Y también a ti **Lulú**, gracias por tu apoyo, consejos y guía.

Gracias, muchas gracias UNAM, no sabes cuánto has hecho por mí. En ustedes las universidades públicas, y particularmente en ti, residen las esperanzas de los mexicanos que queremos salir adelante. Gracias por ser tan noble con nosotros. Te seré leal y cuidaré de ti. Buscaré la forma de retribuirte.



ÍNDICE GENERAL

	<i>Página</i>
Introducción.	I
1. Marco teórico.	1
1.1. El recién nacido.	1
1.1.1. Periodo embrionario.	1
1.1.2. Periodo fetal.	1
1.1.3. Durante los primeros minutos después del parto.	2
1.2. Padecimientos respiratorios del recién nacido.	2
1.2.1. Síndrome de distrés respiratorio del recién nacido.	2
1.2.1.1. Tratamiento.	3
1.2.2. Hipertensión Pulmonar Persistente del recién nacido.	3
1.2.2.1. Tratamiento.	4
1.3. Citrato de Sildenafil.	7
1.3.1. Propiedades químicas y físicas.	8
1.3.2. Farmacodinamia.	8
1.3.3. Farmacocinética.	8
1.3.3.1. Constantes farmacocinéticas.	10
1.3.4. Presentaciones y Dosis.	10
1.3.5. Interacciones medicamentosas.	10
1.3.6. Efectos adversos.	10
1.3.7. Métodos analíticos empleados para cuantificar sildenafil.	11
1.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR).	12
1.4.1. Definición.	12
1.4.2. Mecanismos generales del proceso cromatográfico.	12
1.4.2.1. Cromatografía de adsorción.	12
1.4.2.2. Cromatografía de reparto.	13
1.4.2.2.1. Cromatografía de fase normal y reversa.	13
1.4.2.3. Cromatografía de intercambio iónico	14
1.4.2.4. Cromatografía de exclusión molecular	14
1.4.2.5. Cromatografía de afinidad	14
1.4.2.6. Cromatografía quiral	15
1.4.3. Instrumental.	15
1.4.3.1. Recipientes para fase móvil.	15
1.4.3.2. Bombas.	16
1.4.3.3. Inyectores.	16
1.4.3.4. Detectores.	17
1.4.3.5. Fase móvil.	19
1.4.3.6. Columnas y fases estacionarias.	20
1.5. Parámetros cromatográficos.	21
1.6. Desarrollo / Validación de métodos bioanalíticos.	22
1.7. Parámetros de la validación.	23
1.7.1. Selectividad.	23
1.7.2. Rango.	23
1.7.3. Linealidad.	23



1.7.4.	Exactitud del método.	23
1.7.5.	Precisión.	23
1.7.6.	Recuperación absoluta.	23
1.7.7.	Estabilidad de la muestra analítica.	23
1.7.8.	Límite de cuantificación.	23
1.7.9.	Límite de detección.	23
2.	Planteamiento de problema.	24
3.	Objetivos.	24
3.1.	Objetivo general.	24
3.2.	Objetivos particulares.	24
4.	Hipótesis.	24
5.	Lugar de desarrollo.	25
6.	Material y equipo.	25
6.1.1.	Material biológico.	25
6.1.2.	Estándares y reactivos.	25
6.1.3.	Equipo.	25
6.1.4.	Material y equipo cromatográfico.	26
7.	Metodología.	26
7.1.	Desarrollo del método analítico.	26
7.1.1.	Preparación de soluciones.	26
7.1.1.1.	Soluciones estock.	26
7.1.1.2.	Fase móvil.	26
7.1.2.	Selección de la longitud de onda.	27
7.1.3.	Ubicación del pico de citrato de sildenafil.	27
7.1.4.	Selección del Estándar Interno (E.I.).	27
7.1.5.	Método de extracción.	27
7.1.6.	Propuesta del rango de trabajo.	28
7.1.7.	Preparación de soluciones para la curva de calibración propuesta.	28
7.2.	Validación.	30
7.2.1.	Sistema.	30
7.2.1.1.	Linealidad.	30
7.2.1.2.	Precisión.	30
7.2.1.3.	Adecuabilidad.	30
7.2.1.4.	Selectividad.	30
7.2.2.	Método.	30
7.2.2.1.	Linealidad.	31
7.2.2.2.	Recuperación absoluta.	31
7.2.2.3.	Precisión.	31
7.2.2.3.1.	Repetibilidad.	31
7.2.2.3.2.	Reproducibilidad Intralaboratorio.	31
7.2.2.4.	Exactitud.	31
7.2.2.5.	Límite de cuantificación.	31
7.2.2.6.	Límite de detección.	31
7.2.2.7.	Selectividad.	32
7.2.2.8.	Estabilidad.	32
7.2.2.8.1.	Soluciones stock (Congelación a -20°C).	32
7.2.2.8.2.	Estabilidad a largo plazo (Congelación -20°C).	32



7.2.2.8.3 Ciclos de congelación – descongelación.	32
7.3 Reto de análisis de muestras con distinta matriz (Sangre y plasma).	32
7.4 Análisis de muestras (Estándar adicionado).	33
8. Resultados.	34
8.1. Desarrollo.	34
8.1.1. Ubicación del pico de citrato de sildenafil y proporción de la fase móvil.	34
8.1.2. Selección del Estándar Interno.	34
8.1.3. Método de extracción.	36
8.1.4. Condiciones finales del método analítico.	37
8.1.5. Método de extracción final.	38
8.2. Validación.	39
8.2.1. Sistema.	39
8.2.1.1. Linealidad.	39
8.2.1.2. Precisión.	41
8.2.1.3. Adecuabilidad.	41
8.2.1.4. Selectividad.	41
8.3. Método.	42
8.3.1. Linealidad.	42
8.3.2. Recuperación absoluta.	43
8.3.3. Precisión y Exactitud.	44
8.3.3.1. Repetibilidad.	44
8.3.3.2. Reproducibilidad.	44
8.3.4. Límite de cuantificación.	44
8.3.5. Límite de detección.	44
8.3.6. Selectividad.	45
8.3.7. Estabilidad.	46
8.3.7.1. Soluciones de sildenafil.	46
8.3.7.2. Estabilidad a largo plazo.	47
8.3.7.3. Ciclos de congelación – descongelación.	48
8.4. Reto de análisis de muestra con distinta matriz (Sangre y plasma).	48
8.5. Análisis de muestras.	49
9. Análisis de resultados.	50
10. Conclusiones.	55
11. Sugerencias.	55
12. Aplicación.	55
13. Referencias.	56



Introducción

El sildenafil (Viagra®), generalmente administrado como citrato o maleato de sildenafil, es un inhibidor potente y selectivo de las Fosfodiesterasas tipo 5 (PDE5), por sus siglas en inglés) (1), las cuáles se encuentran en la pared del músculo liso del cuerpo cavernoso del pene. La PDE5 regula la concentración del óxido nítrico (NO) presente en sangre, el cual a su vez regula a la enzima guanilato ciclasa (GMPC), la encargada de la relajación del músculo liso. En consecuencia la cantidad de PDE5 regula el flujo de sangre que transita por el músculo liso, incluido el cuerpo cavernoso del pene (1, 2, 3)

Debido a ello, se convirtió en el medicamento más popular para el tratamiento de la disfunción eréctil masculina, permitiendo tener relaciones sexuales más satisfactorias. Es el medicamento más empleado para el tratamiento de dicho padecimiento desde 1999 hasta la fecha, a pesar de que se han reportado varios efectos adversos en todo el mundo, incluyendo muerte cardíaca súbita asociada a la administración de sildenafil (4).

En investigaciones posteriores, se ha descubierto que en las paredes arteriales pulmonares también se localizan las PDE, y en el 2003 Pauvert O. y col. demostraron que la interacción PDE-GMPC se debe principalmente a la PDE5. Desde entonces, el sildenafil comenzó a emplearse como vasodilatador pulmonar para contrarrestar los efectos de algunos padecimientos pulmonares como Hipertensión Pulmonar, Síndrome de Distrés Respiratorio y embolia pulmonar aguda severa (2, 5, 6, 7)

En México, el citrato de sildenafil está siendo administrado a niños recién nacidos prematuros (Dosis de 2 mg/Kg), con el fin de contrarrestar la hipoxia debido a la vasoconstricción de las arterias pulmonares, ocasionada por su corto periodo de gestación. Para monitorear la concentración del fármaco en dichos pacientes se toman muestras de sangre total y es necesario un método analítico lo suficientemente sensible para cuantificar concentraciones mínimas de 0.01µg/mL y que se pueda llevar a cabo empleando sangre como matriz biológica.

En el presente trabajo se desarrolló y validó un método por CLAR (Tomando como referencia la NOM-177-SSA1-1998 y el Manual de Validación de Métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos) para cuantificar sildenafil en plasma humano. La detección fue mediante luz UV a 273nm. El método emplea como estándar interno Carbamacepina y se lleva a cabo mediante una extracción líquido – líquido utilizando Benceno como extrayente.

El método resultó ser lineal, reproducible, preciso y exacto en el rango de concentración de sildenafil de 0.01 a 3 µg/mL, y las muestras plasmáticas ser estables por 15 días a -20°C y a un ciclo de congelación – descongelación. Aunque el método no es preciso o exacto empleando sangre humana como matriz biológica (por arriba de 0.2µg/mL), es útil en el monitoreo de sildenafil en pacientes recién nacido prematuros tratados con dicho fármaco, cuando sus concentraciones estén por debajo de 0.20 µg/mL.



1. Marco teórico.

1.1. El recién nacido.

1.1.1. Periodo embrionario.

La generación de la vida sigue siendo una tarea pendiente para la ciencia, no así el proceso que conlleva la formación física del nuevo ser. En el caso del ser humano, seis días después de la etapa postconseptual, el embrión consiste en una esfera de células con una cavidad interior, el blastocito. Hacia las dos semanas la implantación se ha completado, y hacia la tercera se han formado un par de tubos cardiacos y han comenzado a bombear sangre. Durante la tercera semana comienza a formarse un primitivo Sistema Nervioso Central (SNC) y las células neuroectodérmicas se diferencian en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales (8).

De la semana cuatro a la ocho, el embrión ya tiene forma humanoide. En esta etapa aparecen los precursores del: músculo esquelético, las vértebras, las mandíbulas, el maxilar, el paladar, el oído externo, las cuencas oculares y otras estructuras del cuello. Hacia el final de esta etapa ya se han formado los rudimentos de los sistemas de órganos principales y aparecen las primeras contracciones musculares. Y todo lo anterior está dentro de un ser de tan solo 5 cm de largo y 9 g de peso (8).

1.1.2. Periodo fetal.

Este periodo comienza a partir de la novena semana y consiste básicamente en la remodelación estructural de diversos sistemas de órganos. El intestino grueso toma su lugar en el abdomen, junto con el intestino delgado y el estómago. A las 12 semanas es distinguible el género del feto y comienza el desarrollo pulmonar con la división de las yemas de los bronquios (8).

Entre las 13 y 14 semanas aparecen los movimientos de respiración y deglución, y la estimulación táctil provoca movimientos naturales. Entre las semanas 20 y 24, se han formado unos primitivos alveolos pulmonares y se han comenzado a producir surfactantes en los mismos. A partir del tercer trimestre el feto triplica su peso y duplica su tamaño al almacenar grasa, hierro, proteínas y demás nutrientes. Hacia la semana 26 el feto puede abrir los ojos y es capaz de responder a estímulos auditivos (8).

La morbilidad y la mortalidad son más altas durante esta etapa. Alrededor del 30% de los embarazos termina en aborto espontáneo y aproximadamente el 2% de los recién nacidos vivos presenta malformaciones congénitas importantes. Muchas anomalías mentales y físicas macroscópicas son atribuibles a microorganismos (toxoplasmosis, sífilis y rubeola), sustancias químicas (etanol, tabaco, drogas, medicamentos antiepilépticos, mercurio, etc) y agentes físicos (radiación) (8).

El daño depende de la predisposición del huésped, tiempo de exposición y el periodo del embarazo donde ocurrió la exposición. Algunas manifestaciones de daños fetales en el periodo prenatal son evidentes en el transcurso de la vida del niño (8).



1.1.3. Durante los primeros minutos después del parto.

Una vez que se le ha pinzado el cordón umbilical al recién nacido, este necesita de muchos cuidados para adaptarse a su nuevo entorno. Por otro lado, es necesario someter al recién nacido a una inspección general para conocer sus condiciones físicas. Para ello se aplica el test de *Apgar* que evalúa 5 puntos: frecuencia cardíaca, respiración, tono muscular, color y respuesta a estímulos (9).

El test se aplica a los 0, 5 y 10 minutos del nacimiento del neonato. Y en base a sus resultados, se tomarán, si es que son necesarias, medidas médicas para corregir los posibles problemas fisiológicos del neonato. Finalmente se identifican malformaciones y se aplican medidas profilácticas como la aplicación de colirios de eritromicina en los ojos (9).

1.2. Padecimientos respiratorios del recién nacido.

En el momento del nacimiento se pueden presentar varios problemas de salud, y estos se acentúan en los recién nacidos de alto riesgo, cuya característica principal es que se trata de recién nacidos prematuros. Esto nos dice, que incluso los recién nacidos que transcurrieron un periodo fetal satisfactorio no están exentos de posibles complicaciones al momento de su nacimiento, ya que pueden presentar padecimientos como la Hipertensión Pulmonar Persistente, que se origina en el lapso de acomodamiento del neonato a su nuevo ambiente (9).

Los problemas del recién nacido prematuro están relacionados con la inmadurez de uno o varios de sus órganos y sistemas. En el caso del sistema respiratorio de un neonato prematuro, sus pulmones tienen una deficiencia de surfactantes pulmonares, padecimiento conocido como *enfermedad de la membrana hialina* o *distrés respiratorio*. Otro padecimiento que puede afectar a los neonatos recién nacidos es la Hipertensión Pulmonar Persistente (9).

1.2.1. Síndrome de distrés respiratorio del recién nacido.

La enfermedad de la membrana hialina o síndrome de distrés respiratorio (SDR) es propia de los niños prematuros. Se debe a un déficit de surfactantes pulmonares a nivel de la interfase aire – líquido en el alveolo pulmonar que conduce a un aumento de la tensión superficial. La característica fisiopatológica más importante es la atelectasia alveolar difusa que causa hipoxemia y obliga a un gran esfuerzo respiratorio (9, 10).

Aunque la prematuridad es el factor que predispone la aparición del distrés respiratorio, este también puede aparecer a causa de una asfixia, infección, diabetes materna, nacimiento por cesárea y en los gemelos que fueron los segundos en nacer. También contribuyen a la enfermedad un alto contenido de agua, los mecanismos inmaduros del aclaramiento del líquido pulmonar y la reducida superficie pulmonar para el intercambio gaseoso (9, 10, 11).



Pero la causa fundamental de este síndrome es que, debido a la inmadurez de los sistemas enzimáticos, no se permite sintetizar cantidades suficientes de surfactantes en los neumocitos. El surfactante pulmonar se encuentra recubriendo la superficie alveolar de los pulmones. Su principal función es reducir la tensión superficial de la interfase líquida. Cuando no hay surfactante, la tensión superficial es muy alta, y cuando hay en cantidad suficiente, es casi cero. En general, el surfactante pulmonar está compuesto por un 90% de fosfolípidos y un 10% de proteínas. (11)

1.2.1.1. Tratamiento.

Existen dos tratamientos principales a los cuáles son sometidos los neonatos prematuros con SDR. Estos son:

a. Administración de surfactantes.

En diversos ensayos clínicos se ha revelado que el tratamiento sustitutivo con surfactantes es satisfactorio para mejorar y resolver el SDR. En dichos ensayos se investiga los efectos de la administración endotraqueal de preparados de surfactantes (De origen humano, porcino o sintético) ya sea como tratamiento profiláctico después del nacimiento o como tratamiento de rescate al detectar los síntomas del SDR. La administración de surfactantes ha demostrado resultados muy positivos en la evolución del recién nacido con SDR. Puede administrarse conjuntamente un inhibidor de las fosfodiesterasas (10).

La administración del surfactante se debe efectuar cuando se ha detectado el SDR, antes de que se produzca una lesión pulmonar. El tratamiento profiláctico está justificado en neonatos muy prematuros y estos presentan distintas respuestas a la administración del biomedicamento. El tratamiento repetido con surfactantes da lugar a un aumento de la oxigenación y ventilación. El medicamento surfactante (Survanta®, Infasurf® o Curosurf®) es administrado teniendo en cuenta la vigilancia de los parámetros fisiológicos del recién nacido así como el cambio de su posición de manera regular para asegurar la correcta distribución del medicamento (10).

b. Oxigenación.

La provisión de oxígeno debe ser suficiente para mantener presiones arteriales parciales de 50 – 80 mmHg. Es preciso evitar niveles de fracciones de oxígeno inspirado (F_{iO_2}) mayores de lo necesario debido al riesgo de favorecer el desarrollo de una lesión pulmonar. El oxígeno se calienta, humidifica y se administra en forma de un mezclado aire – oxígeno (10).

1.2.2. Hipertensión Pulmonar Persistente del recién nacido.

En 1969 Gerson y colaboradores fueron los primeros en utilizar el término “persistencia de la circulación fetal”, que más tarde se terminó de definir como Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido (HPPRN (10, 12) o PPHN por sus siglas en inglés (13) en un par de lactantes con características fisiológicas



persistentes de circulación fetal en ausencia de enfermedad reconocible cardiaca, pulmonar, hematológica o del sistema nervioso (12).

La HPPRN es consecuencia de una alteración en la transición circulatoria perinatal fetal-neonatal normal. También es conocida como circulación fetal persistente. Este evento está caracterizado por un aumento persistente de la resistencia vascular pulmonar (RVP) al nacer, es decir, la circulación del recién nacido se convierte nuevamente en circulación fetal y gran parte del flujo sanguíneo elude los pulmones (10, 13).

Este padecimiento afecta a aproximadamente de 1 a 2 neonatos de cada 1000 nacidos vivos (10). La aplicación de tratamientos ventilatorios como óxido nítrico inhalado (iNO) y la oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) han dado lugar a una mayor supervivencia de neonatos con HPPRN. Sin embargo, los supervivientes de estos procesos corren riesgo de sufrir secuelas adversas como neumonía crónica, discapacidades del desarrollo neurológico, deterioro auditivo y hemorragia intracraneal, incluso infarto cerebral, y todo ello debido a la exposición a condiciones de respiración mecánicas cuando sus organismos son aún muy sensibles a los estímulos físicos (10).

1.2.2.1. Tratamiento

Un recién nacido cianótico se considera una urgencia médica, por lo que una intervención inmediata trata de prevenir o mejorar la HPPRN y es decisiva para evitar lesiones hipóxicas-isquémicas. El objetivo principal al invertir una hipoxia es reducir la RVP, mejorar la oxigenación y optimizar la presión arterial sistémica (10).

a. Oxígeno suplementario

La hipoxia es uno de los eventos vasoconstrictores pulmonares más potentes, por ello el uso de oxígeno suplementario (Oxígeno al 100%, para obtener una tensión de oxígeno arterial elevada o normal) es el tratamiento preferentemente utilizado para disminuir la RVP elevada (10).

b. Incubación y respiración mecánica

Se instituyen medidas de soporte ventilatorio cuando la hipoxia persiste a pesar de la administración máxima de oxígeno (10).

c. Óxido nítrico inhalado (iNO)

El iNO, administrado mediante ventilación convencional o en alta frecuencia, en dosis de 5 a 40 ppm disminuye selectivamente la RVP. El iNO, producido naturalmente dentro de las células endoteliales incluido el endotelio pulmonar, difunde en las células musculares lisas incrementando la cantidad de guanosín monofosfato cíclico (cGMP) intracelular, relaja el complejo miosina-actina y da lugar a la vasodilatación pulmonar (10).

Se recomienda el uso de iNO en recién nacidos con o menos 34 semanas de gestación y con confirmación de HPPRN mediante una ecocardiografía. La metahemoglobinemia es el resultado de la intoxicación por la administración del iNO, es por ello que se deben monitorear continuamente los niveles de metahemoglobina.



d. Oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO)

Cuando la terapéutica convencional o el óxido nítrico no pueden romper el ciclo de hipoxia y vasoconstricción pulmonar, y más aún cuando la probabilidad de supervivencia es mínima, se debe de considerar la utilización de la oxigenación extracorpórea mediante membrana (ECMO). La ECMO es una modificación del *bypass* cardiopulmonar en la cirugía a corazón abierto, el cuál causa poca hemólisis pudiéndose utilizar durante varios días.

La ECMO es una ayuda excelente ya que descomprime la circulación pulmonar, a la vez que mantiene la circulación sistémica. También suprime el shunt izquierda – derecha. La hipoxia y la hipercarbía se corrigen a la vez que disminuyen las presiones ventilatorias y la concentración de oxígeno inspirado. La ECMO permite la atención directa de los dos componentes principales de la HPPRN: El intercambio gaseoso y la hipertensión pulmonar (10, 12).

e. Sedación y analgesia

Dado que la liberación de catecolaminas activa los receptores α -adrenérgicos pulmonares, en la manifestación de dolor aumenta la RVP. Un tratamiento adyuvante útil es la administración de un analgésico opiáceo como el sulfato de morfina o el fentanilo. Este agente es un potente opiáceo de acción corta que reduce el dolor y el malestar y disminuye a un mínimo la actividad del sistema nervioso simpático. En raras ocasiones se utiliza un bloqueador neuromuscular como pancuronio para obtener una relajación muscular con el objetivo de sincronizar la respiración del neonato con la ventilación mecánica.

f. Alcalosis metabólica

Después de la oxigenación, el tratamiento para HPPRN se debe de enfocar en la alcalosis. La alcalosis es el estímulo fisiológico que reduce la RVP. La alcalosis puede obtenerse con una ligera hiperventilación, optimizando la presión arterial y/o con un tratamiento metabólico con bicarbonato de sodio. El pH recomendado en neonatos con HPPRN es de 7.35 a 7.45 (10).

g. Medidas de soporte hemodinámica

Es necesario un gasto cardiaco adecuado para incrementar al máximo la oxigenación tisular y el contenido de oxígeno venoso mixto. La optimización de la presión arterial sistémica para contrarrestar la RVP elevada es un objetivo terapéutico a corto plazo (10).

h. Corrección de otras anomalías metabólicas

Las anomalías bioquímicas pueden contribuir al shunt derecha-izquierda a través del deterioro del gasto cardiaco. En el tratamiento de neonatos con HPPRN es especialmente importante la corrección de la hipoglucemia y la hipocalcemia para proporcionar los sustratos adecuados para la función miocárdica y la respuesta a los agentes farmacológicos (10).

i. Corrección de la policitemia

La hiperviscosidad, asociada con policitemia, aumenta la RVP y se acompaña de la liberación de sustancias vasoactivas a través de la activación plaquetaria. Se considerará una exanguinotransfusión parcial para disminuir el hematocrito al 50-55% en neonatos con HPPRN cuyo hematocrito central supera el 65% (10).



j. Agentes farmacológicos adicionales

El tratamiento farmacológico es complementario, y se dirige simultáneamente hacia la optimización del gasto cardiaco, aumentar la presión arterial sistémica y disminuir la RVP. Actualmente se ha respaldado, mediante estudios clínicos, el uso de sulfato de magnesio, prostaciclina inhalado o nitrito de etilo inhalado. Se están investigando los inhibidores de fosfodiesterasas que aumentan la concentración de cGMP reduciendo su degradación, tal como el sildenafil (10).



1.3. Citrato de Sildenafil

El sildenafil, administrado como citrato o maleato de sildenafil, es un inhibidor potente e irreversible principalmente de la fosfodiesterasa tipo 5 (PDE-5, por sus siglas en inglés), siendo capaz de aumentar el flujo sanguíneo del cuerpo cavernoso del pene al relajar el músculo liso del mismo. Es un medicamento ampliamente prescrito para el tratamiento de la disfunción eréctil. Este fármaco no aumenta ni afecta la erección en varones que no tienen impotencia sexual (1, 2, 14).

El mecanismo fisiológico responsable de la erección del pene implica la liberación de óxido nítrico (NO) en el cuerpo cavernoso durante el estímulo sexual. En consecuencia, el NO activa la enzima guanilato ciclasa (GMPc), ocasionando la relajación del músculo liso (3). Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, las cuales hidrolizan a la AMPc y a la GMPc, representan la única vía de degradación de estos compuestos intracelulares. En músculo liso de mamífero, al menos, 5 isoenzimas de PDE (PDE1 – PDE5) han sido identificadas mientras que otras posibles isoenzimas siguen estudiándose (2). El sildenafil, no es selectivo a las PDE5, pero sí es mucho más potente sobre ésta fosfodiesterasa que sobre las otras (3).

Por otra parte, los problemas fisiológicos relacionados con la circulación pulmonar desarrollan una respuesta directa a hipoxia, es decir, generan una vasoconstricción. La hipoxia debido a una vasoconstricción se puede presentar desde el nacimiento hasta la edad adulta y generalmente son problemas que comprometen la vida del paciente. Entre ellas está el Síndrome de distrés respiratorio y la Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido y la Hipertensión Pulmonar en el adulto, la cuál puede ser presentada en pacientes con enfermedades pulmonares obstructivas, como por ejemplo bronquitis crónica o embolia pulmonar aguda severa. En esta última no existe tratamiento curativo, excepto el trasplante de corazón – pulmón (2).

Desde que se descubrió que las PDE's están presentes en las paredes de la arteria pulmonar y que en la actividad GMPc – PDE en dicho tejido principalmente interviene la PDE5, en los últimos años algunos inhibidores de esta isoenzima han sido administrados para contrarrestar la hipertensión pulmonar tanto en animales como en humanos (2). En este campo se han realizado incontables investigaciones, entre las que sobresalen Pauvert O. y Col., que demostraron la alta sensibilidad de la interacción Sildenafil–PDE5 en tejido de arteria pulmonar en rata y Diaz C. que demostró que el sildenafil inhibe selectivamente la hipertensión arterial inducida. Actualmente se están realizando muchos estudios para evaluar la factibilidad del uso de inhibidores de PDE5 para el tratamiento de enfermedades asociadas a Hipertensión Pulmonar tanto en menores como en adultos (6, 7, 14, 15, 16).



1.3.1. Propiedades químicas y físicas

Estructura química del citrato de sildenafil.

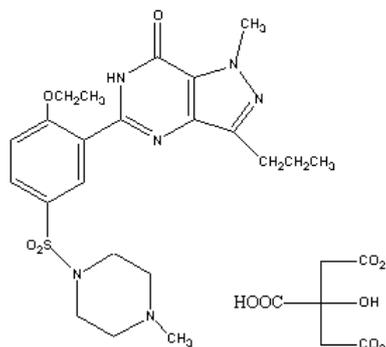


Figura 1. Estructura química del citrato de sildenafil.

Fórmula condensada: $C_{22}H_{30}N_6O_4S \cdot C_6H_8O_7$ (17)

Nombre químico: citrato de 5-[etoxi-5-(4-metilpiperazin-1-ilsulfonil)fenil]-1,6-dihidro-1-metil-3-propil-pirazolo-[4,3-d]pirimidin-7-ona (17)

Categoría química: Derivado de pirazolopirimidona (18)

Peso molecular: 666.7 g/mol (Citrato de sildenafil) (19) y 474.6 g/mol (Sildenafil) (20)

Nombre comercial en México: Viagra® (19)

Apariencia: Es un polvo cristalino de color blanco a blanco pálido (20)

Punto de fusión: 187 a 189 °C (20)

pKa: 6.5 y 9.2 (Citrato de sildenafil) (17); 8.7 (Sildenafil) (20)

Solubilidad: El citrato de sildenafil tiene una solubilidad de 3.5 mg/mL en agua (17)

Longitud de onda de máxima absorción: 230 nm (21, 22, 23)

Log D_{7.4} = 2.7 (24)

1.3.2. Farmacodinamia

El sildenafil es un inhibidor competitivo de la fosfodiesterasa tipo 5, encargada de la degradación de la GMPc. La tumefacción peneana ocurre de 15 a 20 minutos si hay estimulación sexual o en 40 minutos después de su ingestión. En un porcentaje elevado de casos de disfunción eréctil produce erecciones más persistentes, relaciones sexuales más satisfactorias y orgasmo (25). Su farmacodinamia en otros padecimientos está en estudio.

Las dosis de citrato de sildenafil usualmente prescritas, equivalen a 50 y 100mg de sildenafil base (20). Su efecto es más potente sobre la PDE5 que sobre otras fosfodiesterasas conocidas (10 veces sobre la PDE6, > 80 veces para la PDE1, > 700 veces para las PDE2, PDE4, PDE7 – PDE11) (3).

1.3.3. Farmacocinética

El sildenafil es rápidamente absorbido después de la administración oral, aproximadamente el 92% de la dosis administrada (26). La concentración pico en plasma se alcanza dentro de 30 a 120 minutos. La velocidad de absorción es reducida cuando se toma con alimentos. Sufre efecto de primer paso, y es mucho más alto que el porcentaje de fármaco no absorbido. Es ampliamente distribuido a los tejidos y metabolizado en el hígado principalmente por el CYP3A4. Una parte es metabolizada por el CYP2C9. El fármaco no penetra en las células sanguíneas (20, 26).



1.3.3.1. Constantes farmacocinéticas.

Biodisponibilidad: 40% (20)

Vida media en plasma: de 3 a 5 horas para sildenafil y de 4 horas para N-desmetilsildenafil. (20)

Depuración plasmática: 41 L/h (20)

Volumen de distribución: Aproximadamente 105 L (20)

Enlace a proteínas: 96% para sildenafil y N-desmetilsildenafil (20)

Dosis: 50 y 100 mg (20)

Dosis máxima: 100 mg/día (20)

Cmax. 1044 ng (Dosis de 100 mg) (22)

1.3.4. Presentaciones y Dosis

Caja con 1 o 4 tabletas en dosis de 50 o 100mg. Laboratorios Pfizer (25). La dosis máxima es de 100 mg/día y ésta debe ajustarse en pacientes con cirrosis hepática o daño renal severo y aquellos que están siendo tratados con inhibidores potentes del citocromo P-450 3A4 (18). En el mercado se cuenta con Sildenafil GI.

1.3.5. Interacciones medicamentosas

El sildenafil y otros inhibidores de las fosfodiesterasas tipo 5 pueden potenciar los efectos hipotensivos de nitratos orgánicos y del nicorandil, por lo que están contraindicados en pacientes que están bajo la administración de dichos fármacos (4).

En general, el sildenafil tienen interacciones medicamentosas con fármacos y alimentos cuyo metabolismo esté ligado al citocromo P450 isoenzima CYP3A4. La cimetidina, delavirdina, eritromicina, itraconazol y ketoconazol prolongan el efecto del sildenafil; los inhibidores de las proteasa incrementan el efecto del sildenafil mientras que el rifampin lo decremanta. El jugo de uva debe ser evitado cuando se administra cualquier inhibidor PDE5 (4, 18).

1.3.6. Efectos adversos

Los efectos adversos mas comúnmente reportados del sildenafil son dolor de cabeza, rubor y dispepsia. También se presentan disturbios visuales (Visión borrosa, alteraciones de la percepción de los colores y sensibilidad a la luz), vértigo y congestión nasal. Otros efectos adversos son diarrea, vómito, dolor y enrojecimiento de los ojos, epistaxis, dolor muscular y de espalda, enrojecimiento de la piel, infección del tracto urinario, sincope, hemorragia cerebro vascular, y ataque isquémico (4, 18).

Se han reportado palpitaciones y serios eventos vasculares, incluyendo muerte cardiaca súbita asociada al uso de sildenafil. Además, el paciente con disfunción eréctil tratado con sildenafil, debe informar si sus erecciones se prolongan más de 4 horas y si se presenta dolor en las mismas, pues estos eventos pueden desencadenar disfunción eréctil permanente (4, 18).



1.3.7. Métodos analíticos empleados para cuantificar sildenafil.

En la literatura existen varios métodos analíticos para cuantificar sildenafil. Las condiciones de los métodos se resumen en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones cromatográficas de algunos métodos por CLAR para cuantificar Citrato de Sildenafil en plasma humano.

Autor	Columna	Detector y temperatura	Fase móvil y velocidad de flujo.	Estándar Interno	Extrayente / Observaciones
Ghazawi M. A., et al., 2006. (1)	Hipersil C8,150 x 4.6 mm, 5µm.	Detector electroquímico (27°C)	Acetonitrilo:Metanol: Buffer de fosfatos 0.05M (18.5:34.5:47) pH 7.68. 1.3 mL/min	Roxitromicina	ter-butil metil eter
Wang Y., et al., 2005. (14)	C18, 50 x 4.6 mm	Detector de Masas. Temp. Ambiente.	Metanol : 10mM Acetato de amonio (85:15) pH 7; 0.7 mL/min	Diazepam	Eter - diclorometano (3:2)
Sheu M. T., et al., 2003. (21)	Intersil 5 ODS-2, 4.6x150 mm, 5µm	UV, 230 nm, Temp. ambiente	Acetonitrilo : 30mM de fosfato de potasio monobásico (55:45) pH 6. 0.5 mL/min	Butilparabeno	Acetato de etilo
Flores F., et al., 2000. (22)	C18	UV, 230 nm, Temp. ambiente	Fosfato de sodio monobásico 0.02M : Acetonitrilo (70:30); 1 ml/min	No reportado	Benceno
Cooper J., et al., 1996. (23)	Kromasil C4, 100 x 4.6 mm, 5µm	UV 230 nm. Temp. 40°C	Acetonitrilo clorhidrato de dietilamina 10 mM : bufer de fosfatos 500 mM (28:4:68) pH 4.5. 1.5 mL/min	UK-108, (Metabolito de sildenafil)	302 de concentración ASTED
Osman M., et al., 2006. (27)	C18, 150 x 3.9 mm	UV 230 nm. T. ambiente.	20 mM de fosfato de sodio monobásico: acetonitrilo (65:35). 1.3 mL/min	Dexametazona	Éter
Daraghmeh et al. (28)	Waters µBondapak C18, 300x3.9 mm, 10µm.	UV 240nm.	0.2 M de acetato de amonio (pH 7.0) y acetonitrilo (1:1vol/vol). 1mL/min	No emplea E.I.	Método indicativo de estabilidad y detección de compuestos relacionados.
Segal et. Al. (29)	Merck LiChrospher 100RP18, C18, 250 x 4mm, 5µm.	UV 225nm.	Buffer 70mM de potasio de fosfato monobásico y 100mM de trietilamina. pH 3 ajustado con ácido fosfórico.	No emplea E.I	Método indicativo de estabilidad y detección de compuestos relacionados.



1.4. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR)

La medición y cuantificación de sustancias químicas es una parte vital de la ciencia. Esta no puede concebirse sin la existencia de la Química Analítica, que incluso ha permitido la identificación y cuantificación de los elementos del suelo marciano. En esta disciplina, a lo largo de la historia, se han desarrollado numerosas técnicas analíticas, tanto físicas como químicas, y unas mucho más versátiles y con un campo de aplicación más amplio que otras. Este es el caso de la Cromatografía (30).

Durante el siglo XX la Cromatografía cambió la forma en la cual las sustancias naturales y químicas son investigadas, convirtiéndose en una herramienta analítica indispensable en todas las áreas de la ciencia y la tecnología, incluso en la bioquímica y las ciencias de la vida. El impacto de la cromatografía en la bioquímica y la biotecnología se ha acentuado en las últimas dos décadas y su evolución será aún más importante en los años venideros. Es seguro que en las próximas décadas la cromatografía buscará nuevos campos de aplicación y encontrará nuevas formas de llevar a cabo sus objetivos (30).

1.4.1. Definición.

La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR o *HPLC* por sus siglas en inglés) es una técnica analítica de separación, basada en un flujo, que involucra la distribución de los analitos presentes en una mezcla a separar entre dos fases inmiscibles entre sí. Una de ellas es la fase estacionaria (no móvil), mientras que la fase móvil es un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que se usa como portador de la mezcla, cuyos componentes se separan por procesos de partición, adsorción o intercambio iónico, según el tipo de fase estacionaria empleada (30, 31, 32).

1.4.2. Mecanismos generales del proceso cromatográfico.

Los procesos cromatográficos pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de equilibrio involucrado en el mismo, que es dependiente del tipo de fase estacionaria. Los más comunes son: adsorción, reparto, intercambio iónico, penetración en poro, afinidad, y en los últimos años la cromatografía quiral (31).

1.4.2.1. Cromatografía de adsorción

La adsorción es un fenómeno físico de superficie, dependiente de fuerzas de Van der Waals débiles, fuerzas de London y de puentes de hidrógeno. La adsorción conocida como de intercambio iónico involucra interacciones eléctricas (31).

La fase estacionaria es un sólido, comúnmente sílica o alúmina, y la separación ocurre mediante un proceso de adsorción-desorción, lográndose una separación de los compuestos gracias al distinto grado de afinidad entre estos y la fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas. La Cromatografía de Capa Fina es un ejemplo de este mecanismo (31).



1.4.2.2. Cromatografía de reparto

El fundamento de la cromatografía de reparto líquido – líquido es la distribución de los solutos entre una fase móvil y otra estacionaria inmisible soportada sobre un sólido inerte; es decir, la causa de discriminación entre solutos se encuentra en la diferencia de solubilidad (31).

1.4.2.2.1. Cromatografía de fase normal y reversa.

Existen dos tipos de cromatografía de reparto, la cromatografía en fase normal y cromatografía en fase reversa. *Fase normal* significa que la polaridad de la fase estacionaria es tan alta como la fase móvil, por ejemplo el uso de sílice en la cromatografía de adsorción, de trietilenglicol o agua con un disolvente relativamente no polar, como el hexano o *i*-propil éter. Por otro lado, la *fase reversa* significa que la polaridad de la fase estacionaria es mucho menor que la fase móvil, en muchos casos hidrocarburos, mientras que la fase móvil es un disolvente relativamente polar (como el agua, metanol, acetonitrilo o Tetrahidrofurano). La elución de los compuestos químico será en su respectivo orden de polaridad y comenzará con el menos polar (fase normal) o el más polar (fase reversa). En la tabla 2 se resumen las características de ambas técnicas (31, 33)

Tabla 2. Características de los dos tipos de cromatografía de reparto.

Característica	Tipo de cromatografía	
	Fase normal	Fase reversa
Polaridad de la fase estacionaria.	Alta	Baja
Polaridad de la fase móvil.	Media – Baja	Media – Alta
Fase móvil típica.	Heptano/Cloroformo	Metanol/Agua
Orden de elusión.	Primero el menos polar	Primero el más polar
Aumento de retención de solutos.	Decremento de la polaridad de la fase móvil	Aumento de la polaridad de la fase móvil.

La cromatografía de fase reversa es la más popular. Se estima que más de tres cuartas partes de las separaciones en CLAR se realizan por dicho método, debido a que presenta las siguientes ventajas: (31, 33)

- Puede separar muestras que contienen compuestos de una gran amplitud de polaridad.
- Hay posibilidad de usar una gran variedad de fases enlazadas.
- Se emplean fases móviles relativamente baratas además de que se equilibran rápidamente con la fase estacionaria.
- Puede ser aplicada en la separación de compuestos iónicos.
- Es un método fácil, rápido y muy reproducible en comparación con otros métodos CLAR.

Sin embargo, también tiene limitaciones. Las más importantes son: (31)



- El intervalo de trabajo de muchas fases enlazadas de sílica es de un pH 3 a 8. Menor a 3 los grupos enlazados son removidos y mayor a 8 se solubiliza la sílica en la fase móvil.
- La presencia de grupos silanoles no enlazados en la superficie de la sílica puede causar a menudo coqueo, tiempo de retención excesivo y un comportamiento no reproducible.

1.4.2.3. Cromatografía de intercambio iónico

Este mecanismo se caracteriza porque se lleva a cabo en adsorbentes especiales que contengan grupos intercambiadores de iones. La cromatografía de intercambio iónico utiliza como soportes al sílice o a resinas constituidas por una mezcla enlazada de estireno – divinil benceno (SDB), la cuál contiene grupos químicos capaces de intercambiar cationes (grupo enlazado sulfónico) o aniones (grupo enlazado amonio cuaternario) (31).

La cromatografía de intercambio iónico es el método de selección para el análisis de iones inorgánicos así como la separación de macromoléculas cargadas. Los compuestos ácidos pueden separarse de acuerdo a su fuerza con intercambiadores aniónicos fuertes (El ácido más débil emerge primero). El mecanismo de retención más común es el intercambio simple de los iones de la muestra y de la fase móvil con el grupo cargado de la fase estacionaria (31).

1.4.2.4. Cromatografía de exclusión molecular

En este tipo de cromatografía, las moléculas solvatadas son separadas de acuerdo a su tamaño, es decir por su habilidad de penetrar a una estructura tipo tamiz. Se usa ampliamente para la separación preparativa de macromoléculas de origen biológico además de la purificación de polímeros naturales y/o sintéticos. Existen dos variantes: permeación en gel y filtración en gel. La primera se lleva a cabo cuando los solutos son solubles en disolventes de mediana polaridad y la segunda cuando los solutos son solubles en agua. En este tipo de cromatografía, los solutos de mayor tamaño emergen primero (31)

1.4.2.5. Cromatografía de afinidad

Es la cromatografía más selectiva y en algunos casos específica debido a que se fundamenta en interacciones antígeno – anticuerpo, enzima – sustrato. La fase estacionaria está compuesta por biomoléculas altamente específicas (ligando de afinidad) enlazadas covalentemente o atrapadas físicamente en un soporte poroso. Entre los ligandos de afinidad más comunes están anticuerpos e inhibidores enzimáticos enlazados reversible y selectivamente (31, 33).

La fase estacionaria es sólida y puede ser de agarosa o de vidrio poroso. En este método, la fase estacionaria retiene selectivamente al compuesto, el cuál es lavado al seguir el flujo de la fase móvil para finalmente modificar el pH y el compuesto de



interés sea liberado. Por otra parte, la fase móvil debe, al inicio, favorecer el enlace analito – ligando y posteriormente debilitarlo (31, 33).

1.4.2.6. Cromatografía quiral

En los últimos años se ha avanzado en la separación de compuestos especulares no superponibles, los compuestos quirales. Para ello se requieren fases estacionarias quirales o aditivos a la fase móvil quirales (En ambos casos conocidos como agentes de resolución quiral). Los mecanismos de interacción posibles son fuerzas de tracción, como los enlaces π , puentes de hidrógeno y dipolos (33).

1.4.3. Instrumental

Un sistema instrumental estándar para una elución isocrática en CLAR consiste básicamente en:

- Un reservorio de disolvente
- Una bomba capaz de bombear el disolvente a presiones de hasta 6000 psi y a flujos de 0.1 a 10mL/min, además de tener un bombeo constante (libre de pulsos), reproducibilidad de 0.5% relativo o mejor y componentes resistentes a la corrosión.
- Un inyector loop, el cual puede ser alimentado con un volumen de 1 a 200 μ L (20 μ L es usado como estándar).
- Una columna, la cuál es un tubo de acero inoxidable empacado con la fase estacionaria y con un tamaño de partícula promedio de 3, 5 o 10 μ m.
- Un detector, que usualmente es un detector UV/VIS, pero para aplicaciones especiales existe un amplio rango de detectores disponibles.
- Un sistema de captura de datos, el cual puede ser un integrador o una PC con un software adecuado para el procesamiento de los datos cromatográficos.
- La columna se conecta al inyector y al detector mediante tubos de diámetro interno estrecho (0.2 mm) con el objeto de minimizar el “Volumen muerto” (Espacio vacío donde la cromatografía no está ocurriendo y las bandas de los compuestos puedan ensancharse por difusión)
- Instrumentos más avanzados pueden tener sistemas automáticos de inyección de muestras, un horno para columna y un sistema capaz de mezclar dos o más disolventes en proporciones variables con el tiempo para producir un gradiente de fase móvil (34, 35).

1.4.3.1. Recipientes para fase móvil

Los cromatógrafos de líquidos actuales, por lo general están equipados con uno o más recipientes de vidrio que contienen 500 mL o más un disolvente, además de un sistema degasificador que elimina los gases disueltos y un sistema que elimina las partículas en suspensión de la fase móvil. A pesar de que el equipo cuente con dichos aditamentos, es necesario filtrar y degasificar la fase móvil antes de bombearla por el equipo (34, 35).



1.4.3.2. Bombas

En cromatografía de líquidos se utilizan principalmente dos tipos de bombas, a saber, la del tipo de jeringa accionada por tornillo y la del tipo recíprocante. Esta última se usa en casi todos los tipos de cromatógrafos comerciales modernos (35).

- **Bombas recíprocantes (De una y doble cabeza).** Consisten en una pequeña cámara en la que el disolvente es impulsado por el vaivén de un pistón, y dos válvulas de globo unidireccionales permiten la salida y entrada del disolvente. La desventaja es que una bomba recíprocante produce un flujo pulsado, el cuál es reducido con una cabeza doble o levas elípticas. Tiene la ventaja de tener un volumen interno pequeño, su fácil adaptación a los gradientes y que son prácticamente independientes del contraflujo proveniente de la columna y de la viscosidad del disolvente (31, 35, 36).
- **Bombas de tipo jeringa o desplazamiento.** Se llaman así porque poseen una cámara similar a la de una jeringa, además de estar equipada con un émbolo que se activa por un mecanismo de tornillo accionado por un motor de etapas. Estas operan por desplazamiento directo del disolvente por la acción del émbolo que se desplaza mecánicamente a velocidad constante. Su desventaja es que poseen una capacidad de volumen limitada y muchas dificultades cuando este se tiene que cambiar (31, 35).
- **Bombas de presión constante.** En estas bombas, la presión de un cilindro de gas que es suministrada a través de un pistón grande impulsa la fase móvil, mientras de manera eléctrica se vacía la cámara de otro pistón (31).

1.4.3.3. Inyectores

A menudo el factor limitante de la precisión en las mediciones cromatográficas es la reproducibilidad con la que se pueden introducir las muestras en el empaque de la columna. Por consiguiente es necesario inyectar volúmenes pequeños sin despresurizar el sistema. Para introducir la muestra al sistema se emplean inyectores que inyectan desde 1 hasta 100 μL a presiones de hasta 7000 psi (35). Las características de un inyector son las siguientes:

- Permitir introducir volúmenes pequeños y reproducibles de muestra.
- Debe originar la menor dispersión física posible de volumen mezclado en el sistema hidrodinámico para evitar que los picos cromatográficos se ensanchen.
- Su funcionamiento no debe de alterar las características hidrodinámicas del sistema
- La inserción de la muestra en la columna presurizada debe ser en forma de un pulso fino de manera que el ensanchamiento del pico debido a este paso sea despreciable.
- El sistema de inyección en sí mismo, no debe de tener volumen muerto (31).



Existen diferentes tipos de inyectores:

- **Válvulas y loops (rizos) de muestreo.** Son los más empleados. El loop calibrado, se llena lavándolo profusamente con una solución de la muestra. El giro del rotor de la válvula coloca el lazo lleno de muestra en la corriente de fase móvil sin interrupción significativa del flujo (31).
- **Flujo suspendido.** En este tipo de sistema de inyección, la bomba se detiene hasta que la presión en la entrada de la columna es esencialmente la **atmosférica**. Luego se inserta la jeringa, la muestra se inyecta en la forma normal y la bomba se activa (31).
- **Septa.** Son inyectores semejantes a los empleados en cromatografía de gases. Son usados a presiones de 60 a 70 atm. La septa no es compatible con todos los disolventes empleados en CLAR. Además, las pequeñas partículas de gotas en la septa pueden provocar problemas al entrar (36).

Actualmente los equipos comercialmente disponibles poseen automuestreadores, los cuales son compartimentos en donde se almacena un número limitado de muestras dentro de un rango de temperatura requerida, para después ser inyectadas de acuerdo a una secuencia de computadora (35).

1.4.3.4. Detectores

A diferencia de los detectores de cromatografía de gases, que fueron creados específicamente para detectar pequeñas cantidades del analito en un flujo de un gas, los detectores para la cromatografía de líquidos han sido instrumentos analíticos tradicionales adaptados a celdas de flujo para medir concentraciones bajas de solutos en fluidos líquidos (35).

Los detectores para CLAR son de dos tipos básicos. Los *detectores basados en una propiedad de la solución* (generales) son sensibles a una propiedad de la fase móvil, como el índice de refracción, la constante dieléctrica o la densidad, la cuál es modulada por la presencia de solutos. En cambio los *detectores basados en una propiedad del soluto* (selectivos) responden a alguna de las propiedades de este último, como la absorbancia en el UV, fluorescencia o corriente de difusión, que no son inherentes a la fase móvil (31, 35).

Las características ideales que debe poseer un detector para CLAR son:

- Sensibilidad alta y respuesta constante a la muestra.
- Responder a todos los solutos y tener especificidad constante.
- Tener un rango amplio de linealidad.
- No ser afectado por cambios de temperatura y flujo de la fase móvil.
- Responder independientemente de la fase móvil.
- No contribuir al ensanchamiento del pico
- Ser confiable, conveniente, fácil de usar y económico.
- Respuesta que se incremente linealmente con el soluto.



- No destruir al soluto.
- Proveer información cuantitativa del pico detectado.
- Respuesta rápida (31)

Existen diferentes tipos de detectores y se emplean de acuerdo a la característica del sistema fase móvil–fase estacionaria–analito adecuada para cuantificar la sustancia de interés. Estos son:

a. Detector de absorción ultravioleta (UV)

Estos detectores, generalmente de doble haz, tienen una forma de Z y poseen un volumen interno pequeño (1 a 10 μ l) para no ensanchar la banda cromatográfica. Los primeros fueron fotómetros de filtro con una lámpara de mercurio como fuente, la cual solo podía trabajar a 254, 250, 313, 334 y 365 nm (Longitud de onda fija). Actualmente son detectores de absorción con capacidad de barrido y arreglo de diodos que permiten tener un cromatograma completo a una sola longitud de onda. Cuando los picos están suficientemente separados, se puede elegir distinta longitud de onda para cada pico (35).

b. Detectores Infrarrojos.

Ya sea por sistema de filtros o basados en el sistema de la transformada de Fourier, son celdas que se parecen mucho a los detectores UV. Su limitante es que muchos de los disolventes empleados en CLAR poseen baja transparencia al detector IR, además de que las fases móviles compuestas de agua deterioran las paredes de la celda IR hechas de cloruro de sodio o fluoruro de calcio (35).

c. Detector de índice de refracción.

Este detector es diferencial, pues el solvente en su camino a la columna pasa a través de una mitad de la celda y el eluyente que provienen de la misma columna pasa a través de la otra mitad. La celda esta separada por una placa de vidrio que es capaz de desviar un haz de luz incidente si las soluciones tienen distintos índices de refracción (35).

Son detectores *universales*, pues responden a casi todos los solutos. Su desventaja radica en su alta sensibilidad cambios de temperatura, por lo que es necesario controlarla incluso hasta milésimas de grado centígrado (35).

d. Detector de fluorescencia.

Funcionan y están diseñados de manera muy similar los empleados en otras aplicaciones. Su ventaja es su alta sensibilidad y por solucionar de la detección de compuestos que no absorben luz UV. Para ello es necesario derivatizar el compuesto no fluorescente con otro que si lo sea, como es el caso del cloruro de dansilo, que al reaccionar fácilmente con grupos fenoles y amino, se emplea para al cuantificación de amino ácidos (35).

e. Detector electroquímico

Se basan en la amperometría, voltamperometría, coulombimetría y conductimetría. Son sistemas reductores u oxidantes compuestos por dos electrodos: el indicador y el de referencia. Sus ventajas es que son muy sensibles, sencillos además de tener una amplia aplicabilidad. Su desventaja principal es su inutilidad en métodos analíticos por gradientes (35).



f. Detectores de masas.

Un detector de masas acoplado a un equipo CLAR sonaría un método ideal, sin embargo, se tienen problemas en su acoplamiento debido a que el espectrómetro de masas (MS) necesita una muestra en fase gaseosa. Por ello, se necesita evaporar el solvente y eliminar su exceso, generalmente por la técnica de ionización a presión atmosférica (35).

El acoplamiento LC/MS ocasiona una alta selectividad porque los picos no resueltos se pueden aislar al supervisar solo una masa seleccionada, además de proporcionar huellas dactilares de un producto particular, proporcionar la masa molecular, información estructural y análisis cuantitativo exacto. En caso de algunas mezclas complejas, la combinación cromatografía líquida – espectrometría de masas no proporciona la resolución adecuada, por lo que es necesario acoplar dos o más analizadores de masa en “tándem”. Cuando se combina un cromatógrafo de líquidos con un detector de masas en tándem, recibe el nombre de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas-espectrometría de masas o LC/MS/MS (35).

1.4.3.5.Fase móvil

Aún cuando la fase móvil no es parte del instrumental, el control del flujo, la presión y la composición de la misma son muy importantes. Los disolventes que componen a la fase móvil deben de tener las siguientes características:

- Ser puro.
- No reactivo con el empaque de la columna.
- Ser compatible con el detector.
- Disolver la muestra.
- Baja viscosidad y bajos puntos de ebullición.
- No reaccionar con el analito.
- Miscibles entre ellos.
- Polaridad adecuada para permitir la retención conveniente del analito en la columna.
- No interferir con el sistema de detección.
- Seguros (31, 35, 36)

Cuando un químico está desarrollando un nuevo método analítico por CLAR, este gasta un tiempo considerable en la elección de la columna. También lo debe de hacer en su elección de fase móvil. En el caso de trabajar con un detector UV, es importante a que longitud de onda absorbe el disolvente pretendido a ser usado, así también como su viscosidad, miscibilidad, solubilidad, volatilidad, polaridad, inestabilidad y reactividad (37).

El orden de polaridad de los disolventes comúnmente empleados en CLAR es el siguiente: agua > acetonitrilo > metanol > etanol > tetrahidrofurano > propanol > ciclohexano > hexano. En la tabla 3 se muestra la longitud de onda a la cuál absorben algunos disolventes usados en CLAR (33, 37).



Tabla 3. Longitud de onda a la cual los disolventes más comúnmente empleados en CLAR absorben luz UV (Valores de Cut off).

Disolvente o clase de disolvente	Rango de absorción (nm)
Acetonitrilo y agua	< 190
Alcanos	190-205
Alcoholes alquílicos	205-220
Éteres alquílicos	210-220
Cloruros alquílicos	220-270
Freones	225-245
Acetatos alquílicos	250-260
Amidas alquílicas	260-270
Benceno y bencenos alquílicos	270-290
Cloruros de bencilo	280-310
Cetonas alquílicas	320-340

1.4.3.6. Columnas y fases estacionarias

Una columna es la parte esencial del cromatógrafo de líquidos, ya que en ella tiene lugar la separación entre analitos e interferentes. Los tipos generales de columnas en CLAR se mencionan en la figura 3.

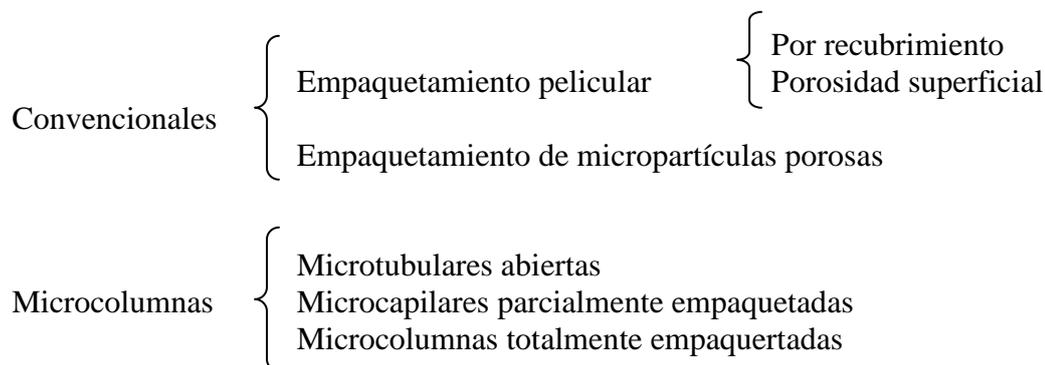


Figura 3. Tipos generales de columnas en CLAR

La columna está constituida por un tubo de pared gruesa encamisada interiormente con vidrio o tubo de acero inoxidable para resistir las altas presiones y la acción química de la fase móvil. El interior del tubo debe ser liso con un calibre muy uniforme. Los conectores terminales de la columna deben de diseñarse con volumen muerto de cero. El relleno usualmente se retiene insertando discos de acero inoxidable poroso al final de la columna (31).

El empaque de una columna es esencial, y la selección de esta dependerá de las propiedades fisicoquímicas del analito de interés. El orden creciente de la polaridad de los grupos orgánicos comúnmente empleados en fases estacionarias es el siguiente: hidrocarburos alifáticos < olefinas < haluros < sulfuros < éteres < compuestos nitro < ésteres ≈ aldehídos ≈ cetonas < alcoholes ≈ aminas < sulfonas < sulfóxidos < amidas < ácidos carboxílicos < agua (33).



1.5. Parámetros cromatográficos

Los componentes de una muestra, separados en la columna cromatográfica, son representados por un *cromatograma*, que es una gráfica de tiempo vs respuesta. En la figura 4 se muestra un cromatograma así como los parámetros más importantes empleados para describir la cromatografía de los picos cromatográficos de los analitos,

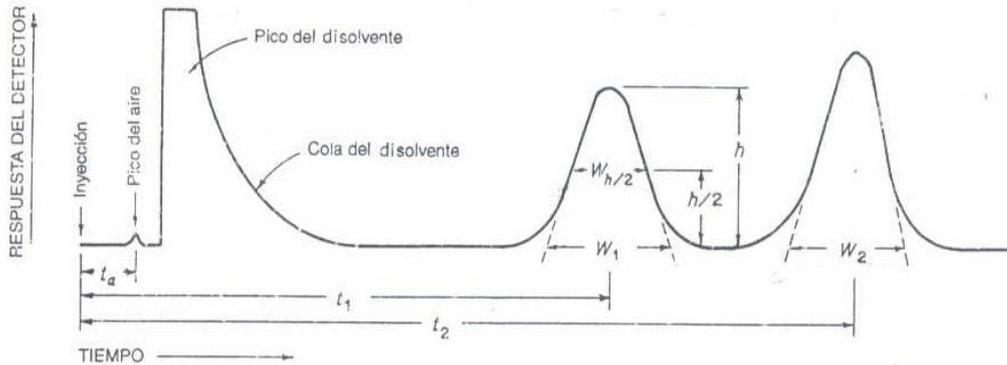


Figura 4. Representación de una separación cromatográfica típica de dos sustancias 1 y 2. Donde t son los tiempos de retención; h , $h_{1/2}$ y W son la altura, la mitad de la altura y el ancho del pico cromatográfico.

Los picos cromatograficos característicos de las entidades químicas analizadas por CLAR deben de ser de forma simétrica y poseen un *tiempo de retención* (t_r) característico, pero no son únicos pues pueden ser presentados por otros compuestos y dependen de las condiciones cromatográficas; es por ello que las comparaciones se hacen generalmente en términos de tiempos de retención relativos R_r , como lo indica la siguiente fórmula (32).

$$R_r = \frac{t_2}{t_1}$$

Respecto a la simetría, esta está dada por el *factor de coleo* (T), definido como el cociente del ancho del pico, W , entre dos veces la distancia, f , del máximo del pico hacia el lado izquierdo del pico. Estas distancias deben medirse a un punto que corresponda a un 5% de la altura del pico ($W_{0.05}$) partiendo de la línea base (38).

$$T = \frac{W_{0.05}}{2f}$$

Una medida de la eficiencia de una columna cromatográfica es el *número de platos teóricos* (N). Para los picos gaussianos se calcula mediante la siguiente formula (32):

$$N = 16 \left(\frac{t}{W} \right)^2$$



El valor de N depende de la sustancia cromatografiada, así como de las condiciones cromatográficas. La separación entre dos picos o resolución, depende tanto de la selectividad como de la *eficiencia cromatográfica* (N). La selectividad es una función de la retención que la molécula tiene a lo largo del proceso de separación y está reflejado por el *factor de capacidad* (k) en la ecuación siguiente (38).

$$k' \frac{t}{t_0} - 1$$

Finalmente, la *selectividad* de una columna, también referida como retención relativa o separación entre picos (α), es la relación entre los factores de capacidad de dos picos adyacentes, descrita matemáticamente como sigue:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}$$

1.6. Desarrollo / Validación de métodos bioanalíticos.

Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a acabo el análisis de un componente específico de la muestra. Para desarrollarlo es necesario contar con la cantidad y calidad de información necesaria para obtener resultados satisfactorios (39).

En primer lugar, se deben conocer las propiedades de la sustancia que se va a cuantificar. En base a ellas gira el desarrollo del método, pues la naturaleza del analito y su farmacocinética definirán desde la matriz de análisis hasta el rango de concentración que cubrirá la curva de calibración, pasando por el método de extracción, la fase móvil, fase estacionaria y demás parámetros cromatográficos.

Una parte importante del desarrollo de un método cromatográfico es la optimización del mismo. Esta comienza desde el desarrollo mismo y puede estar dirigida hacia uno o más de los siguientes puntos (40):

- Mejorar la separación (Una mejor resolución)
- Separar más rápido (Acortar los tiempos de retención)
- Detectar más (Disminuir el límite de detección/cuantificación)
- Separar los compuestos a bajo costo (Economizar)
- Separar más (Selectividad)

Los métodos analíticos para la evaluación cuantitativa de fármacos y sus metabolitos (analitos), son críticos para llevar a cabo satisfactoriamente los estudios preclínicos y/o biofarmacéuticos y estudios farmacológicos clínicos. La validación de métodos bioanalíticos se define como todos los procedimientos que demuestran que un método en particular, usado para la medición cuantitativa de analitos en una matriz biológica dada, tal como sangre, plasma, suero u orina, es confiable y reproducible para el propósito para el cual es empleado. Los parámetros fundamentales para esta validación incluye: exactitud, precisión, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad (41, 42).



1.7. Parámetros de la validación.

La validación de los métodos bioanalíticos, en México, está regulada por la NOM – 177 – SSA – 1998, la cuál considera como parámetros de validación a los siguientes:

1.7.1. Selectividad

Es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra (39, 43).

1.7.2. Rango

Es el intervalo de un método analítico definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles superior e inferior del compuesto, en el cuál se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal (43).

1.7.3. Linealidad

Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra (43).

1.7.4. Exactitud del método

Es la concordancia obtenida entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia (39, 43).

1.7.5. Precisión

Se le llama precisión al grado de concordancia entre los resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto; se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad (43).

1.7.6. Recuperación absoluta

Es la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica (43)

1.7.7. Estabilidad de la muestra analítica

Es la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características desde el momento del muestreo hasta su análisis (43)

1.7.8. Límite de cuantificación

Es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método (39, 43).

1.7.9. Límite de detección

Es la mínima concentración de un compuesto en una muestra, la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones establecidas en el método (39, 43).



2. Planteamiento de problema

En México, el citrato de sildenafil está siendo administrado a niños recién nacidos prematuros en dosis de 2 mg/kg, con el fin de contrarrestar su hipoxia debido a su corto periodo de gestación. A estos pacientes se les toman muestras de 50 μ L de sangre total para monitorear la concentración del fármaco.

Actualmente, están disponibles en la literatura científica varios métodos cromatográficos para cuantificar sildenafil en plasma humano. Sin embargo, todos han sido desarrollados a partir de plasma humano y con una cantidad de muestra que oscila entre 100 y 500 μ L. Un problema al que se han enfrentado todos ellos es la sensibilidad, por lo que se han desarrollado métodos por detección de masas y electroquímica, incluso se han empleado sistemas automatizados de concentración de muestras, como el sistema ASTED (1, 14, 21, 22, 23, 27).

Ninguno de dichos métodos puede ser aplicado al monitoreo del sildenafil por estar desarrollados con cantidades y matrices biológicas distintas a las requeridas en el laboratorio. Por ello es necesario desarrollar y validar un método analítico que sea capaz de analizar las muestras de sildenafil provenientes de niños recién nacidos prematuros, cuyo reto es cuantificar al fármaco en volúmenes pequeños de la matriz biológica (50 μ L).

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

- Desarrollar y validar un método analítico por CLAR para cuantificar sildenafil en plasma aplicado al monitoreo de su concentración en recién nacidos prematuros.

3.2. Objetivos particulares

- Obtener las condiciones cromatográficas idóneas para cuantificar sildenafil en plasma humano.
- Validar el método desarrollado para cuantificar sildenafil
- Aplicar el método validado para la cuantificación de sildenafil en muestras de pacientes.
- Comparar la cuantificación de sildenafil en sangre total y plasma como matrices biológicas.

4. Hipótesis

El desarrollo y validación de un método analítico por CLAR, para la cuantificación de sildenafil en plasma servirá como punto de referencia para determinar si él mismo es capaz de ser empleado para el monitoreo de la concentración plasmática de sildenafil en niños recién nacidos prematuros.



5. Lugar de desarrollo.

La parte experimental se desarrolló en las instalaciones de “CAMINA, proyecto para curar la parálisis”, ubicadas en Av. Tlálpán 4430, Col. Toriello Guerra, Delegación Tlálpán, Ciudad de México.

6. Material y equipo.

6.1.1. Material biológico.

Para el desarrollo del método se empleó plasma proveniente de 6 ratas hembras raza wistar, de 270 a 320 g de peso. Para la validación y reto del método analítico, se empleó sangre y plasma humano donado por el laboratorio No. 36 de la división farmacológica del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) unidad norte del Instituto Politécnico Nacional.

6.1.2. Estándares y reactivos.

Para este proyecto se emplearon los siguientes estándares:

- Citrato de Sildenafil (Hetero Drugs Limited, Lote SFC 040406)
- Acemetacina (Bayer, Lote 011116161)
- Diclofenaco Sódico (Sigma – Aldrich, Lote 058K0810)
- Ibuprofeno (Estándar de referencia USP. Lote 33550J)
- Indometacina.
- Klaricid IV® 500 mg (Laboratorios Abbot. Frasco ampula con Lactobionato de claritromicina equivalente a 500 mg de Claritromicina. Lote 77905MC)
- Pentoxifilina (J. T. Baker. Lote 967)

Los disolventes y demás reactivos empleados fueron:

- Acetato de etilo, Merck. Grado analítico (99.5%). Lote 509528.
- Acetonitrilo, J. T. Baker. Grado cromatográfico (99.9%). Varios lotes.
- Benceno Cromasolv®, Sigma - Aldrich. Grado cromatográfico (99.9%). Lote 19196BK.
- Éter anhidro, J. T. Baker. Grado analítico. Lote V10H00.
- Metanol, J. T. Baker. Grado cromatográfico (99.96%). Lote E35C15.
- Acetato de etilo. J. T. Baker. Grado analítico.
- Dicloro metano. J. T. Baker. Grado analítico.
- Éter etílico. J. T. Baker. Grado analítico.
- Agua grado HPLC.
- Fosfato monobásico de sodio monohidratado (cristales), J. T. Baker. Grado analítico (99.6%). Lote C23126.
- Nitrógeno grado reactivo (Infra México)

6.1.3. Equipo

Agitador IKA® digital, modelo MS 3 digital.

Agitador Vortex®, modelo 2 – genre.

Baño de agua.



Bomba de vacío CSA modelo DDA-V152.
Centrífuga Fisher Scientific modelo Maraton 26 KM.
Potenciómetro Hanna.
Sonicador Quantex L&R
Placa de agitación IKA.
Espectrofotómetro UV/Vis Perkin Helmer
Balanza Ohaus modelo GA200.
Sistema de agua grado cromatográfico marca Millipore.
Equipo de filtración Millipore Milli – Q®.
Congelador Nieto (-20 °C)
Registrador Servugor

6.1.4. Material y equipo cromatográfico

Inyector manual con loop fijo de 20 µL
Bomba para equipo CLAR marca Waters, modelo 510
Detector UV/VIS marca Waters, modelo 486.
Integrador marca Varian, modelo 4270.
Columna cromatográfica Waters Symetry® C18, de 150 mm x 4.6 mm y 5 µm de tamaño de partícula.
Precolumna cromatográfica Waters C18.
Jeringa de vidrio para inyección manual de 100 y 250 µL marca Hilton.
Membranas de filtración Millipore de 0.45 µm de tamaño de poro.

7. Metodología

7.1. Desarrollo del método analítico.

7.1.1. Preparación de soluciones.

7.1.1.1. Soluciones stock.

Se preparó una solución acuosa de citrato de sildenafil con una concentración equivalente a 1 000 µg/mL de sildenafil base. Para lograr la completa disolución del estándar, la solución stock se sonicó por 5 minutos, se llevo a aforo con el mismo disolvente y se guardo a -20°C. De la solución anterior se prepararon dos soluciones de trabajo, I y II, de 10 y 1 µg/mL respectivamente. Para la preparación de las soluciones se empleó agua grado CLAR.

7.1.1.2. Fase móvil.

Se preparó una solución amortiguadora de fosfato de sodio monobásico monohidratado a una concentración de 20 mM empleando agua grado cromatográfico. La solución anterior se empleó para preparar una fase móvil de NaH₂PO₄ 20mM : Acetonitrilo en proporción 70:30 v/v. Esta última se filtro por una membrana de 0.45 µm de tamaño de poro y sonicó por 10 minutos. La fase móvil se guardó en congelación (-20 °C) mientras esta no estaba en uso.



7.1.2. Selección de la longitud de onda.

Para determinar la longitud de onda adecuada para la detección del analito, se realizó un barrido de la solución de trabajo I. El barrido se realizó desde los 200 hasta los 300 nm empleando el espectrofotómetro Perkin Elmer.

7.1.3. Ubicación del pico de citrato de sildenafil.

Para identificar el pico, su forma y su tiempo de retención, se inyectaron a distintas velocidades de flujo (0.8, 1.0 y 1.2 mL/min) alícuotas de la solución trabajo I, empleando como condiciones iniciales la fase móvil anteriormente descrita; una columna Symetry C18 de 4.6 x 150 mm de longitud y 5 µm de tamaño de partícula; una longitud de onda de 230 nm; y una precolumna Waters C18.

7.1.4. Selección del Estándar Interno (E.I.)

Para la selección del E.I. se probaron varias sustancias (acetaminofén, claritromicina, diclofenaco sódico, pentoxifilina, acetaminofén, carbamacepina, indometacina e ibuprofeno). De cada una de ellas se prepararon soluciones stock de 1000 y 1 µg/mL. Todas las soluciones fueron acuosas, excepto las de indometacina e ibuprofeno que fueron preparadas en metanol.

7.1.5. Método de extracción

Debido a sus propiedades farmacocinéticas y la bibliografía revisada, solo se evaluó el método de extracción líquido – líquido. Los disolventes empleados fueron Eter etílico, acetato de etilo, benceno, metiliterbutil éter y una mezcla de éter – diclorometano 50 : 50 % v/v.

Para la elección del extrayente adecuado, se evaluaron muestras de plasma cargadas con el analito y sometidas a los dos procesos de extracción siguientes:

Proceso A.

En un vial Eppendor se colocaron 350 µL de agua grado CLAR. Se adicionaron 50 µL de plasma de rata y 100 µL de la solución de trabajo I de sildenafil. Las muestras se agitan en vortex por 10 segundos y luego se adicionaron 500 µL del extrayente. Se agitan nuevamente en vortex por 100 segundos y posteriormente se centrifugan a 10 000 rpm durante 10 minutos.

Se separó la fase orgánica de la fase acuosa y se coloca en tubos de vidrio de fondo angosto para llevar a cabo la evaporación en baño de agua a 30°C bajo un flujo de nitrógeno. La muestra se reconstituye en 100 µL de fase móvil y se inyecta al equipo.

Proceso B.

En un vial Eppendorf se colocan 100 µL de plasma y se adicionan 100 µL de la solución de trabajo I de sildenafil. Se adicionan 800 µL del extrayente y se continúa con el método de extracción A. El método y disolvente de extracción se eligieron en base al grado de remoción de impurezas de la muestra obtenido y al porcentaje de recobro del analito.



7.1.6. Propuesta del rango de trabajo.

En base a la bibliografía, y considerando el C_{max} de 1.044 $\mu\text{g/mL}$ reportado en la misma a partir de una administración del principio activo, se decide establecer un rango de trabajo desde un 1% hasta un 300 % del mismo. Por consiguiente, se establece una curva semilogarítmica, la cual se muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones y puntos propuestos para la curva de calibración, donde las abreviaturas son las siguientes: P# Punto de la curva, CB control bajo, CM control medio, CA control alto.

Punto	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
P1 (LC)	0.01
CB	0.02
P2	0.03
P3	0.1
CM	0.2
P4	0.3
P5	1.0
CA	2.0
P6	3.0

7.1.7. Preparación de soluciones para la curva de calibración propuesta.

Una vez determinado el rango de trabajo, ubicados los picos cromatográficos de interés, el método de extracción, seleccionado el E.I. y las demás condiciones cromatográficas, se procedió a preparar las soluciones stock de sildenafil y E.I. para llevar a cabo la validación. Las soluciones preparadas son las siguientes:

Solución I de E.I. (Concentración 1 mg/mL)

Se pesaron con precisión 10 mg del E.I. y se disolvieron en un matraz volumétrico de 10 mL empleando metanol grado cromatográfico como disolvente.

Solución II de E.I. (Concentración 45 $\mu\text{g/mL}$)

Usando una micropipeta, se tomaron 1.125 mL de la solución I de E.I. y se colocaron en un matraz aforado de 25 mL. Se llevó a volumen de aforo con fase móvil.

Solución de sildenafil A (Concentración 1 mg/mL)

Se pesaron con precisión 10 mg de sildenafil base y se disolvieron en un matraz volumétrico de 10 mL empleando agua grado cromatográfico. Se llevó a aforo con el mismo disolvente.

Solución de sildenafil B (Concentración 10 $\mu\text{g/mL}$)

Se colocó un volumen de 0.1 mL de la solución A en un matraz aforado de 10 mL y llevado a aforo con fase móvil.



Solución de sildenafil C (Concentración 30 µg/mL)

Se tomó un volumen de 0.3 mL de la solución A y se colocó en un matraz aforado de 10 mL. Se llevó a aforo con fase móvil.

Solución de sildenafil P6 (Concentración de sildenafil 30 µg/mL y E.I. de 1.8 µg/mL)

De la solución A de sildenafil se tomaron 0.3 mL y se depositaron en un matraz volumétrico de 10 mL junto con 0.4 mL de la solución II de E.I. Se llevaron a aforo con fase móvil.

Solución de sildenafil P5 (Concentración de sildenafil 10 µg/mL y 1.8 µg/mL del E.I.)

Se colocó un volumen de 0.1 mL de la solución A y uno de 0.4 mL de la solución II en un matraz volumétrico de 10 mL. Se llevó a aforo con fase móvil.

Solución de sildenafil P4 (Concentración de 3 µg/mL de sildenafil y 1.8 µg/mL del E.I.)

Se tomó 1 mL de la solución C y 0.4 mL de la solución II en un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a aforo con fase móvil.

Solución de sildenafil P3 (Concentración de 1 µg/mL de sildenafil y 1.8 µg/mL del E.I.)

En un matraz volumétrico de 10 mL se colocó 1 mL de la solución B y 0.4 mL de la solución II. Se llevaron a la marca de aforo con fase móvil.

Solución de sildenafil P2 (Concentración de 0.3 µg/mL de sildenafil y 1.8 µg/mL del E.I.)

Se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL 0.1 mL de la solución C y 0.4 mL de la solución II. Se llevó a volumen de aforo con fase móvil.

Solución de sildenafil P1 (Concentración de 0.1 µg/mL de sildenafil y 1.8 µg/mL del E.I.)

De la solución B se tomaron 0.1 mL y se depositaron en un matraz volumétrico de 10 mL. En el mismo se adicionaron 0.4 mL de la solución II y finalmente se llevó a la marca de aforo con fase móvil.

Solución de sildenafil PCA (Concentración de 20 µg/mL de sildenafil y 1.8 µg/mL del E.I.)

De la solución A se tomaron 0.2 mL y se depositaron en un matraz volumétrico de 10 mL. En el mismo se adicionaron 0.4 mL de la solución II y finalmente se llevó a la marca de aforo con fase móvil.

Solución de sildenafil PCM (Concentración de 2 µg/mL de sildenafil y 1.8 µg/mL del E.I.)

De la solución PCA se tomaron 1 mL y se depositaron en un matraz volumétrico de 10 mL. En el mismo se adicionaron 0.4 mL de la solución II y finalmente se llevó a la marca de aforo con fase móvil.

Solución de sildenafil PCB (Concentración 0.2 µg/mL de sildenafil y 1.8 µg/mL del E.I.)

Se tomó un volumen de 0.1 mL de la solución PCA y se colocó en un matraz aforado de 10 mL. Se llevó a aforo con fase móvil.



7.2 Validación

La validación se llevó a cabo empleando plasma humano donado por el laboratorio No. 34 de la unidad de farmacología del CINVESTAV. El plasma, la fase móvil y las soluciones stock fueron guardadas en congelación (-20 °C) mientras no estaban en uso.

7.2.1 Sistema

7.2.1.1 Linealidad

A partir de una curva de calibración en solución acuosa de sildenafil (0.01 – 3.0 µg/mL), con cada punto de la misma inyectado por triplicado, se determinó la linealidad del sistema. Se obtuvo una gráfica de conc. vs Rel. Alt., una gráfica f y los intervalos de confianza para m y b de la ecuación que describe el comportamiento de la curva de calibración.

Los criterios de aceptación son $r \geq 0.99$ y un $r^2 \geq 0.98$; Coeficiente de Variación (CV) global (gráfica f) menor de 1.5 % y el valor de $b \approx 0$.

7.2.1.2 Precisión

Se inyectaron por sextuplicado el punto 3 de la curva de calibración. Se obtuvo su CV el cuál no debió ser mayor a 1.5 %.

7.2.1.3 Adecuabilidad

Se inyectó por quintuplicado el punto 3 de la curva y se determinaron los siguientes parámetros: tiempo de retención (t_r) el cuál no debe exceder un CV mayor al 2%, la resolución (R) que debe ser mayor a 1.5 y el Factor de coeio (T) que debe ser menor a 2. Los cálculos se realizaron empleando las ecuaciones del numeral 1.6.

7.2.1.4 Selectividad

Para determinar la selectividad se inyectaron por duplicado las siguientes muestras:

- Fase móvil
- Benceno (En este caso, un volumen igual al empleado en el proceso de extracción fue evaporado en un ambiente de nitrógeno en baño de agua y posteriormente reconstituido en FM, para finalmente inyectarse al equipo)
- Sildenafil (0.1 µg/mL)
- E.I. (1.8 µg/mL)
- Punto 3 de la curva

El criterio de aceptación es no observar en cada una de ellas posibles interferencias en los t_r del analito o del E.I.



7.2.2 Método

7.2.2.1 Linealidad

Se prepararon seis curvas en plasma, procesándose conforme al método analítico previamente desarrollado. De estos resultados se obtuvo la gráfica *concentración vs. Relación de alturas*, así como el CV de cada nivel. Los criterios de aceptación son los siguientes: un $CV \leq 15\%$ a excepción del límite de cuantificación el cuál debe ser menor o igual a 20%; en la curva de la gráfica obtenida, $r^2 \geq 0.98$, así como $b \approx 0$ (22, 23).

7.2.2.2 Recuperación absoluta

Se analizaron por triplicado los puntos control (PC). El valor de la relación de alturas se comparó con el obtenido en las inyecciones de soluciones stock de sildenafil de la misma concentración. En este caso no existe un porcentaje de la cantidad del analito a recuperar, lo que si es necesario es que este porcentaje sea constante (22, 23).

7.2.2.3 Precisión

7.2.2.3.1 Repetibilidad

Se analizaron el mismo día y por quintuplicado los PC obtenidos de forma independiente. El coeficiente de variación para los puntos no debe ser mayor del 15% (43).

7.2.2.3.2 Reproducibilidad Intralaboratorio

Se analizaron por triplicado los PC durante tres días consecutivos obtenidos de forma independiente. El coeficiente de variación global de las concentraciones determinadas en la matriz biológica no debe ser mayor al 15% (43).

7.2.2.4 Exactitud

A partir de los datos de precisión y reproducibilidad intralaboratorio se calculó el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración. El valor nominal de las concentraciones debe de estar dentro del $\pm 15\%$ (43).

7.2.2.5 Límite de cuantificación

Se analizó por quintuplicado el punto más bajo de la curva (Límite de cuantificación LC). Los criterios de aceptación son $CV \leq 20\%$ y un $\pm 20\%$ del valor nominal ($0.01\mu\text{g/mL} = 100\%$).

7.2.2.6 Límite de detección

Este se calculó en base a la señal de ruido. Se analizaron por quintuplicado blancos de plasma y muestras preparadas con concentraciones de $0.001\mu\text{g/mL}$, $0.004\mu\text{g/mL}$ y $0.01\mu\text{g/mL}$ analizadas por triplicado. El límite de cuantificación es la



concentración cuya respuesta sea la inmediatamente superior a tres veces la respuesta obtenida en los blancos (ruido).

7.2.2.7 Selectividad

Se analizaron por duplicado las siguientes muestras, observando posibles interferencias al t_r del analito y/o del E.I.

Plasma con una concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de sildenafil.

Plasma con una concentración de 0.18 $\mu\text{g/mL}$ del E.I.

Plasma con una concentración de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de sildenafil y 0.18 $\mu\text{g/mL}$ del E.I.

7.2.2.8 Estabilidad

7.2.2.8.1 Soluciones stock (Congelación a -20°C)

Se analizaron por triplicado las soluciones stock empleadas para la preparación de las muestras y se reanalizaron a los 0, 7, 14, 21 Y 28 días de su preparación. El criterio de aceptación es que el promedio de la respuesta tenga un CV menor al 15% respecto al valor inicial.

7.2.2.8.2 Estabilidad a largo plazo (Congelación -20°C)

Se prepararon cinco series de PC, se almacenaron en congelación y se analizaron a los 7, 21 y 28 días de su preparación. El criterio de aceptación para cada lote es cumplir con el la precisión y exactitud.

7.2.2.8.3 Ciclos de congelación – descongelación

Se prepararon seis series de puntos control. Se guardaron en congelación. 24 horas después de su almacenamiento se descongelaron (Primer ciclo de congelación – descongelación). Tres series fueron analizadas y las restantes se guardaron nuevamente en las mismas condiciones de almacenamiento. 48 horas posteriores a su preparación, las tres series restantes se descongelaron y se analizaron (Segundo ciclo de congelación – descongelación).

El criterio de aceptación para el primer y segundo ciclo de congelación – descongelación es cumplir con los criterios de precisión y exactitud.

7.3 Reto de análisis de muestras con distinta matriz (Sangre y plasma)

Por sextuplicado se prepararon los PC (alto medio y bajo) utilizando sangre humana como matriz biológica. Se analizaron empleando el mismo método analítico desarrollado en plasma humano y se obtuvo el promedio de la relación de altura *analito/E.I.* Por otro lado se preparó el mismo número de muestras de PC empleando plasma como matriz biológica. Para determinar si el promedio de la relación de altura de los PC (con la misma concentración nominal) preparados en sangre y plasma eran iguales se empleó una prueba t, cuya fórmula es la siguiente:

$$t_c = \frac{y_{\text{media}} - \mu}{S / n^{1/2}}$$



Donde:

Y_{media} es el promedio de la relación de alturas de cada PC en sangre

μ es el promedio de la relación de altura de cada PC en plasma

S es la desviación estándar de la relación de altura de cada PC en sangre

n es el número de repeticiones

La H_0 a probar es $\mu = Y_{media}$ mientras que H_a es $\mu \neq Y_{media}$.

7.4 Análisis de muestras (Estándar adicionado)

Se analizaron por duplicado 18 muestras sanguíneas provenientes de 6 pacientes distintos. De cada muestra se tomaron 100 μ L, se colocaron en un micro vial eppendorf y se les adicionaron 100 μ L de la solución P2 y 200 μ L de metanol. Se agitaron por 30 segundos en vortex y posteriormente la agitación continuó por 150 seg en el agitador IKA®. Las muestras se centrifugaron por 10 minutos a 10 000 rpm.

Del sobrenadante se tomaron 200 μ L, se colocaron en otro micro vial eppendorf. Se adicionaron 800 μ L de benceno grado HPLC y se continuó con el procedimiento de análisis descrito en 1.1.1 B.

Las concentraciones se obtuvieron al interpolar la relación de altura (*analito / E.I.*) de cada muestra en una curva estándar preparada en plasma. Para obtener la concentración real se restó la concentración adicionada (0.03 μ g/mL de sildenafil).



8. Resultados

8.1. Desarrollo

8.1.1. Ubicación del pico de citrato de sildenafil y proporción de la fase móvil.

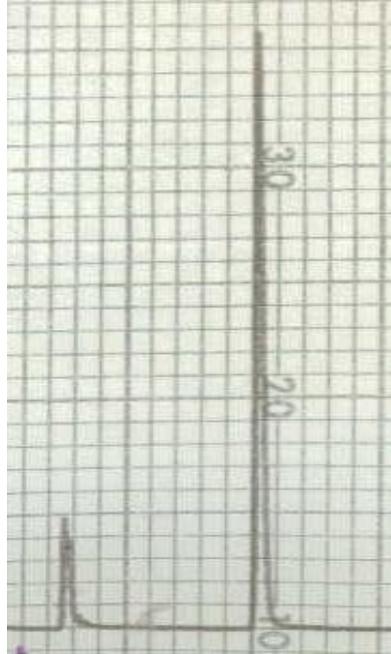
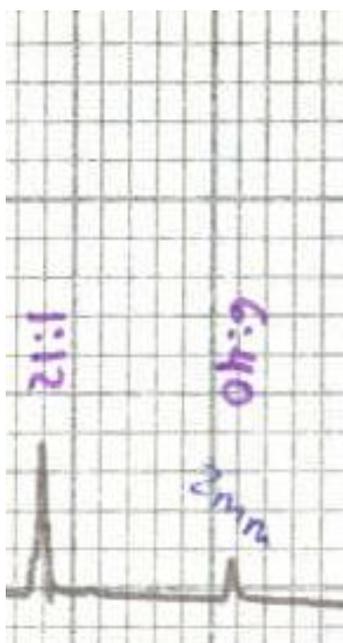


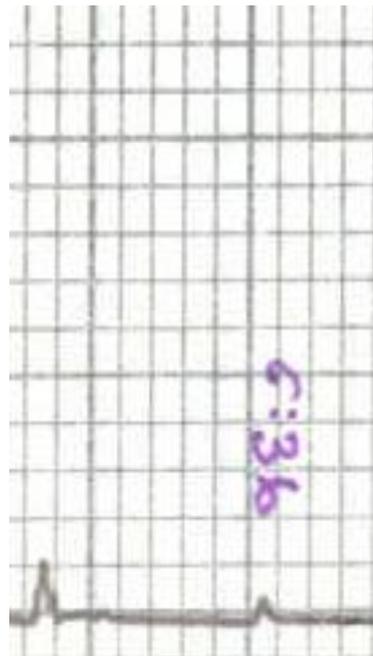
Figura 5. Pico cromatográfico de sildenafil empleando una longitud de onda de 230 nm, una columna symetry C18 150 x 4.6 mm (5 μ m), una velocidad de flujo de 1.2 mL/min y un fase móvil de buffer de fosfato de sodio monobásico 20 mM : Acetonitrilo 70:30 v/v %. Tiempo de retención aproximado de 6.5 min.

8.1.2. Selección del Estándar Interno.

a)



b)



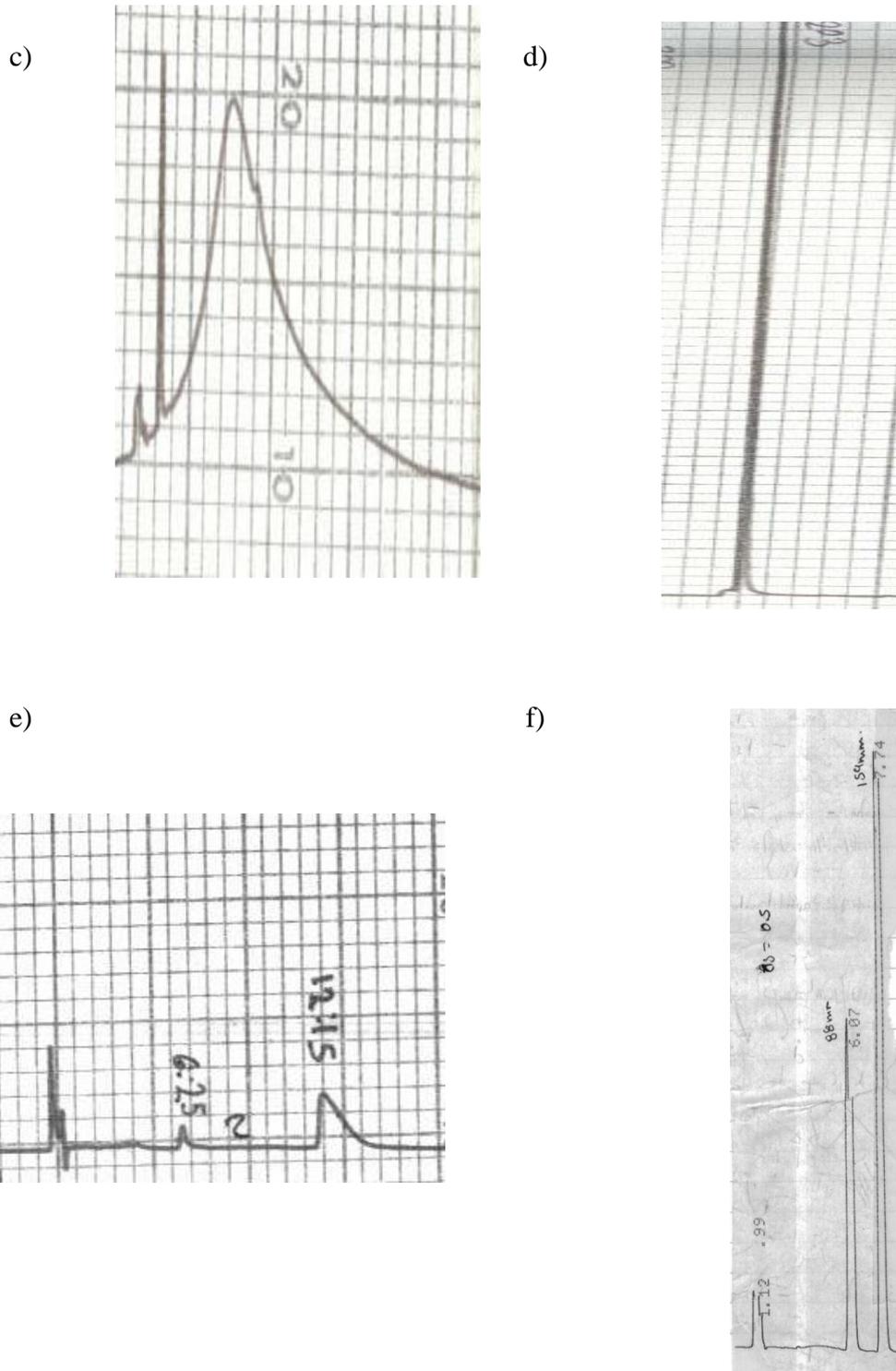


Figura 6. Cromatogramas obtenidos en inyecciones de soluciones de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de (a) Ibuprofeno (tr 6:40min), (b) Indometacina (tr 6:36 min), (c) Pentoxifilina (tr 4 min), (d) ciprofloxacina (tr 1:15 min), (e) Claritromicina (tr 12.15) y (f) Carbamacepina (tr 7.74) bajo las mismas condiciones cromatográficas de la figura 7.



8.1.3. Método de extracción.

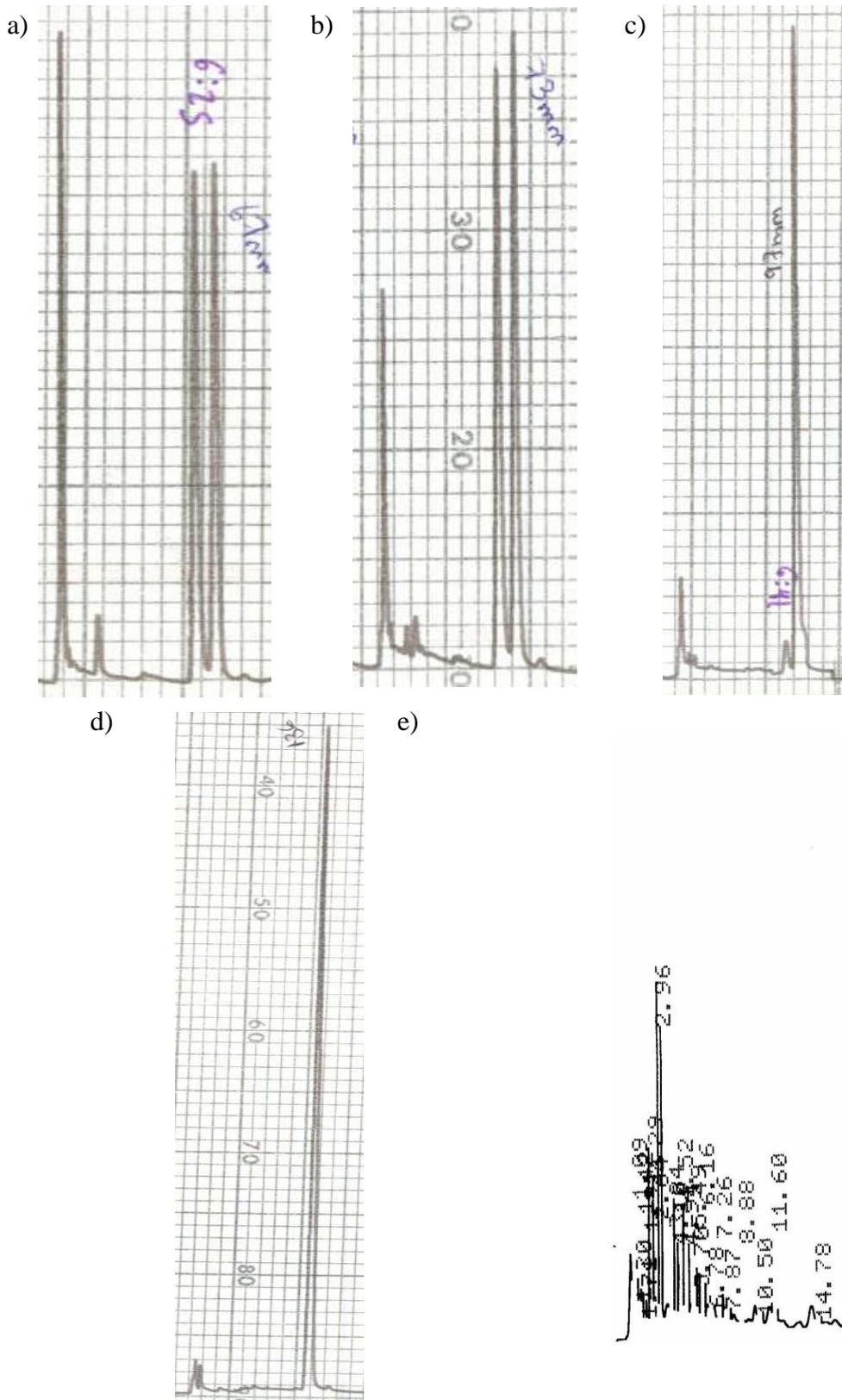


Figura 7. Cromatogramas obtenidos con diferentes extrayentes; a) extracción con éter (Método B), b) Extracción éter – diclorometano 50:50 v/v % (Método B), c) acetato de etilo (Método B), d) Benceno (Método B) y e) metilterbuil éter (Método B).



Tabla 5. Porcentaje recuperado en muestras de plasma con una cantidad de sildenafil conocida (10 µg/mL). Los dos extrayentes evaluados fueron Acetato de Etilo y Benceno, al ser los que mejor limpian las muestras. Como 100% se tomó la respuesta de una inyección de sildenafil de 10 µg/mL de una altura promedio de 180 mm.

Muestra	Altura (mm)	% de recuperación	Promedio	Observaciones
Blanco	0	----		Sin Interferencia
Benceno 1	176	97.78	90.9267	Sin Interferencia
Benceno 2	163	90.56		Sin Interferencia
Benceno 3	152	84.44		Sin Interferencia
Blanco	0	----		Interferencia.
Acet. Et. 1	161	89.44	89.8133	Dos picos
Acet. Et. 2	162	90.00		Dos picos
Acet. Et. 3	162	90.00		Dos picos

8.1.4. Condiciones finales del método analítico.

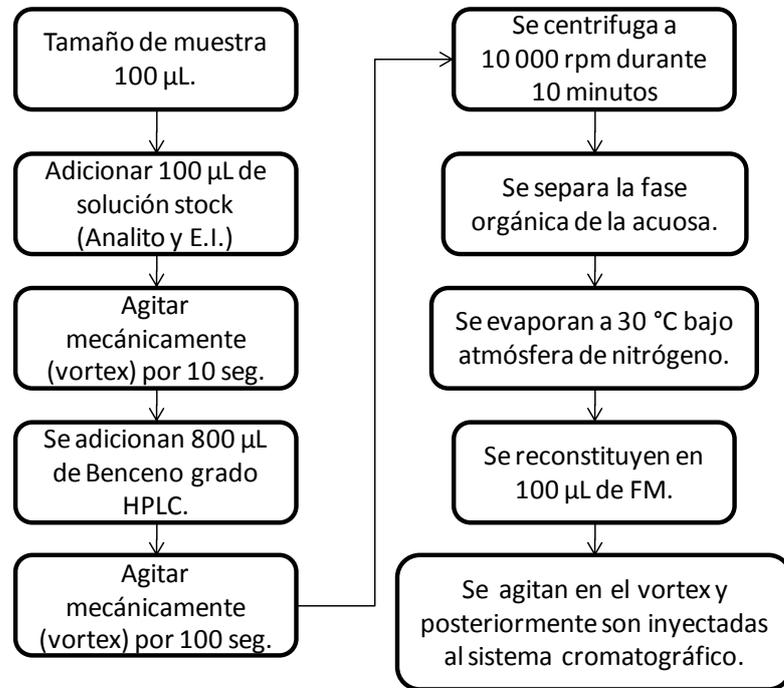
Tabla 6. Condiciones cromatográficas finales determinadas en el desarrollo del método analítico.

Variable	Valor / descripción
Fase móvil.	Solución amortiguadora de fosfato de sodio monobásico 20 mM : Acetonitrilo 70:30 % v/v.
Velocidad de Flujo	1.2 mL/min
Detector	UV (230 nm)
Columna	Symetry C18, de dimensiones 150 x 4.6 mm. 5 µm de tamaño de partícula.
Volumen de inyección	20 µL
Temperatura	Ambiente.
Analitos.	Sildenafil y carbamacepina (E.I.)
Tiempos de retención aproximados.	6.5 minutos para Sildenafil y 9.3 minutos para Carbamacepina.
Tiempo de corrida.	11 minutos



8.1.5. Método de extracción final.

Figura 8. Método de extracción final al que son sometidas las muestras plasmáticas de Sildenafil para la cuantificación del mismo.





8.2. Validación

8.2.1. Sistema

8.2.1.1. Linealidad

Tabla 7. Resultados obtenidos en la evaluación de la linealidad del sistema al analizar tres curvas en solución stock. En esta tabla se incluyen los valores promedios.

Puntos	Conc. Nominal (µg/mL)	Prom. Rel. Alt.	Desv. Est.	CV (%)
1	0.01	0.0467	0.0001	0.1929
2	0.03	0.1396	0.0003	0.1927
3	0.1	0.4700	0.0016	0.3448
4	0.3	1.4295	0.0032	0.2258
5	1	4.7699	0.0163	0.3427
6	3	14.2772	0.0130	0.0909

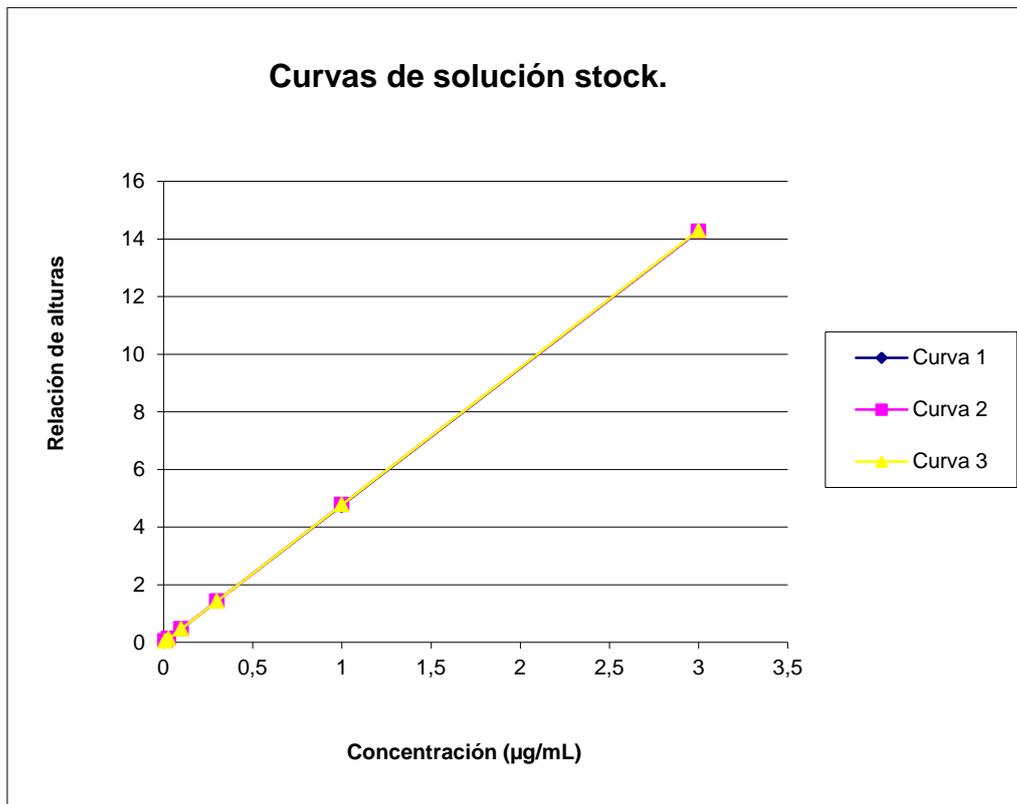


Figura 9. Curvas en solución stock evaluadas para la linealidad del sistema. La ecuación promedio de las curvas obtenidas es $y = 4.7603x - 0.0005$ con un r^2 de 1.0.



Tabla 8. En esta tabla se muestran los valores de la respuesta de cada punto empleado para la gráfica *f*. El valor de los mismos se obtiene al dividir su rel. Alt. entre la concentración nominal. El promedio de la respuesta es 4.7201 y presenta un CV de 1.0369 y una Desv. Est. de 0.0489.

Muestra	Concentración (µg/mL)	Rel. De Alt.	Respuesta
1	0.01	0.0467	4.6667
2	0.01	0.0467	4.6667
3	0.01	0.0468	4.6823
4	0.03	0.1398	4.6600
5	0.03	0.1398	4.6600
6	0.03	0.1393	4.6444
7	0.1	0.4712	4.7120
8	0.1	0.4706	4.7059
9	0.1	0.4681	4.6814
10	0.3	1.4258	4.7526
11	0.3	1.4314	4.7712
12	0.3	1.4314	4.7712
13	1	4.7513	4.7513
14	1	4.7766	4.7766
15	1	4.7819	4.7819
16	3	14.2697	4.7566
17	3	14.2697	4.7566
18	3	14.2921	4.7640

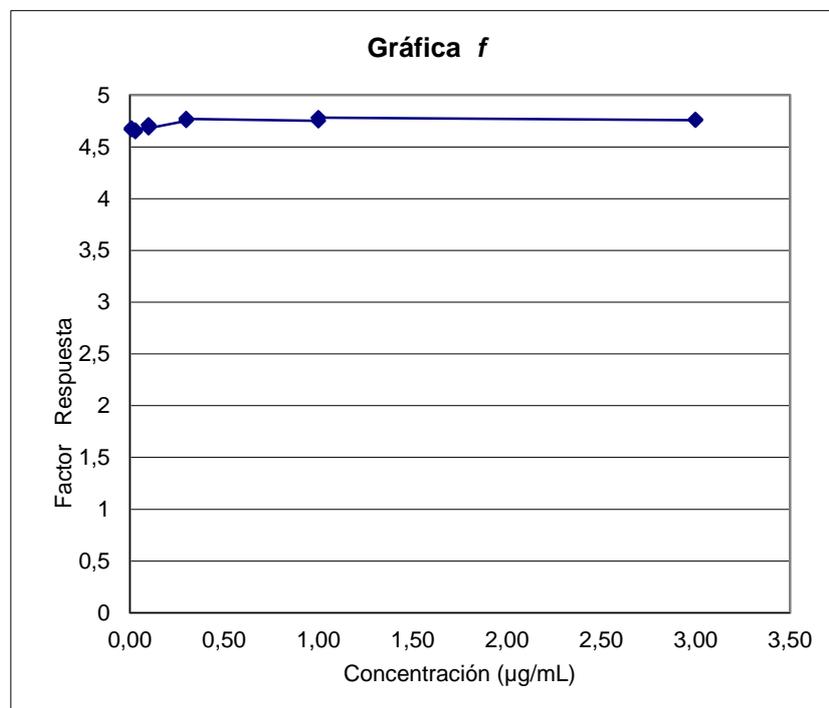


Figura 10. En esta gráfica *f* se observa el comportamiento del cociente de la relación de área entre la concentración nominal en cada muestra.



8.2.1.2. Precisión

Tabla 9. Resultados obtenidos del análisis por sextuplicado de una solución stock de 0.1µg/mL (Punto 3 de la curva).

Repetición	Rel. Alt.	Promedio	Desv. Est.	CV (%)
1	0.4712			
2	0.4706			
3	0.4681			
4	0.4691	0.4694	0.0013	0.2707
5	0.4691			
6	0.4681			

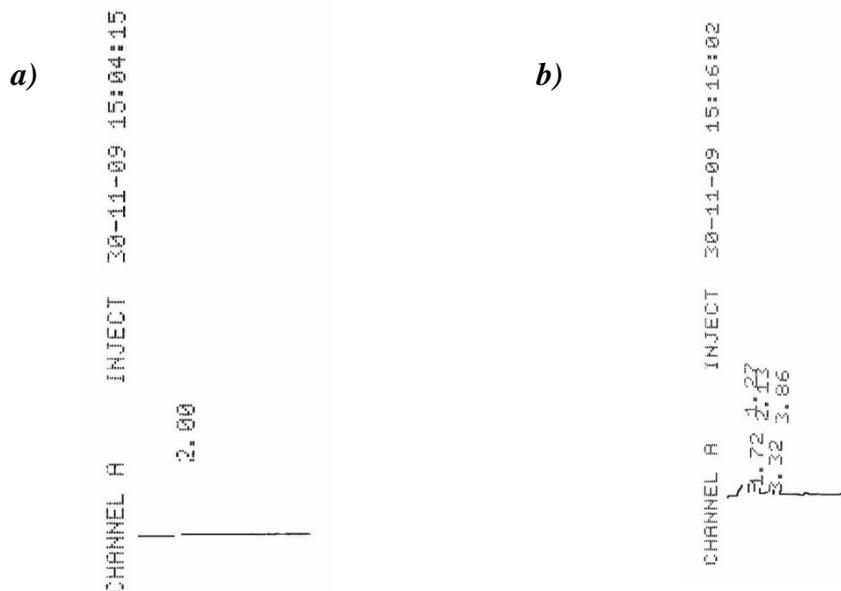
8.2.1.3. Adecuabilidad

Tabla 10. Se observan los parámetros de la inyección por quintuplicado del punto 3 de la curva (concentración 0.1µ). Donde T es el factor de coileo y t_r es el tiempo de retención. La resolución entre los picos del E.I. y de sildenafil es de 2.53. Los platos teóricos para sildenafil son 921.1252 y para el E.I. 1253.6056.

	Rel. Alt.	t_r (min) Sildenafil	T Sildenafil	t_r (min) E.I	T E.I.
Promedio	0.469	6.85	1.22	9.35	1.27
Desv. Est.	0.001	0.04	0.13	0.02	0.11
CV. (%)	0.2134	0.54	10.39	0.27	8.96

8.2.1.4. Selectividad

En los siguientes cromatogramas se muestra el comportamiento de las inyecciones de las sustancias consideradas para evaluar selectividad del sistema.



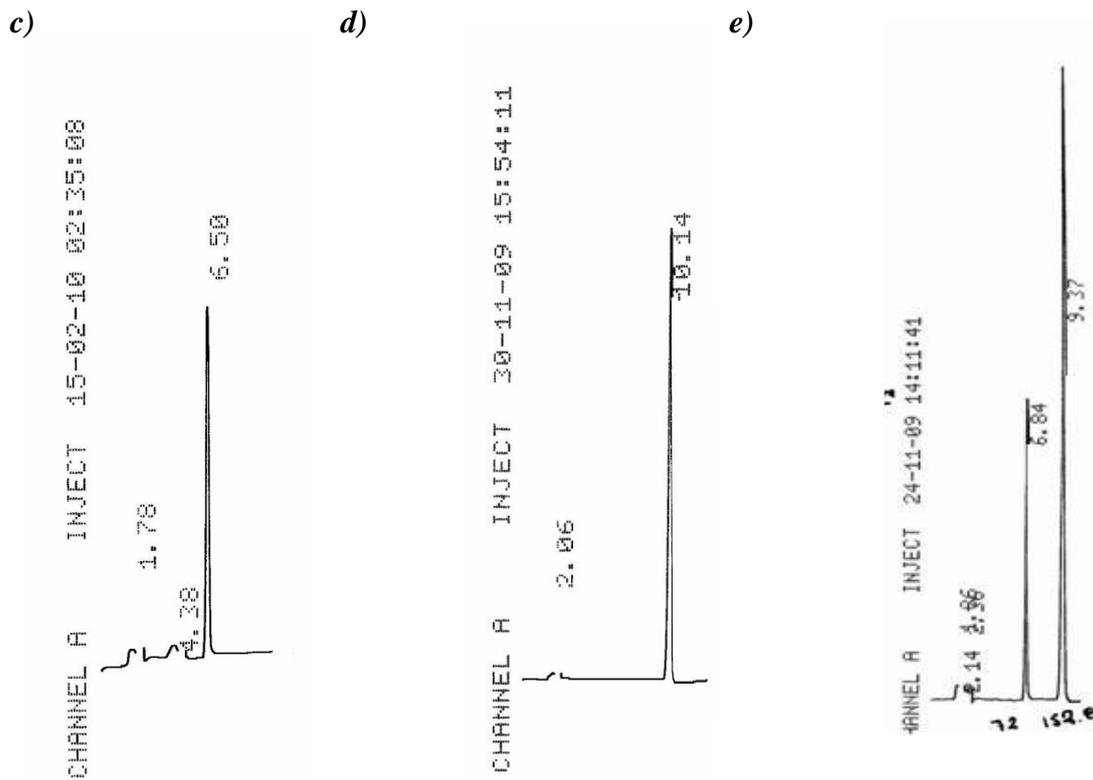


Figura 11. Selectividad del sistema, evaluado por las inyecciones al sistema cromatográfico de (a) fase móvil, (b) una muestra de 800 μL de benceno grado HPLC evaporado y reconstituido con FM, (c) una solución de sildenafil 0.1 $\mu\text{g/mL}$, (d) solución stock del estándar interno con una concentración de 1.8 $\mu\text{g/mL}$ y (e) mezcla de una solución de sildenafil (0.1 $\mu\text{g/mL}$) y E.I. (1.8 $\mu\text{g/mL}$).

8.3. Método

8.3.1. Linealidad

Tabla 11. Valores promedios de los valores obtenidos en la evaluación de la linealidad del método al analizar los puntos de la curva por sextuplicado.

Punto	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Rel. Alt. Prom	Desv. Est. ($\mu\text{g/mL}$)	C.V. (%)
1	0.01	0.052119	0.0055	10.4753
2	0.03	0.127422	0.0040	3.1053
3	0.1	0.371546	0.0097	2.6178
4	0.3	1.153583	0.0267	2.3123
5	2	3.907305	0.1432	3.6653
6	3	12.2908	0.5340	4.3442

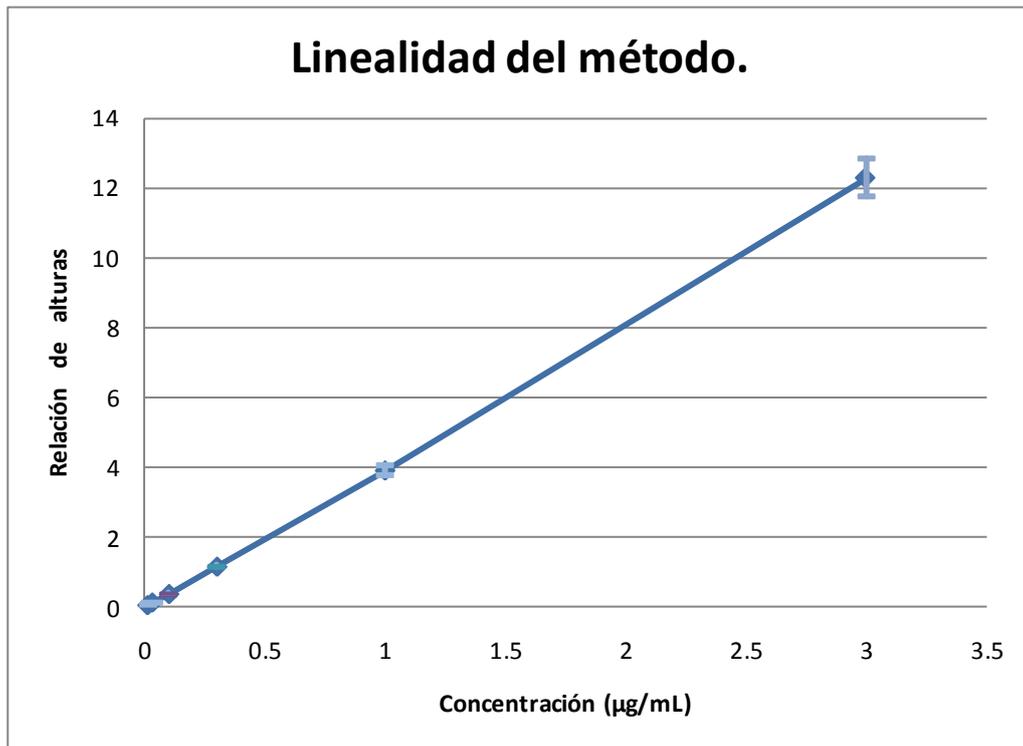


Figura 12. Curva promedio obtenida en la evaluación de la linealidad del método, en cada nivel de concentración se incluye el rango del CV obtenido para cada uno. La ecuación obtenida empleando los datos de las seis curvas es $y = 4.0965x - 0.0476$, con un $IC(\beta_1)$ de 4.0965 ± 0.0712 y un $IC(\beta_0)$ de -0.0476 ± 0.0924 .

8.3.2. Recuperación absoluta.

Tabla 11. Comparación entre los puntos control por triplicado, evaluados en método, con la altura promedio de tres inyecciones en sistema de la misma cantidad nominal. A = alto, B = Medio, B = Bajo. El promedio de la cantidad recuperada es 94.7657%.

PC	Conc. Nominal (µg/mL)	Cant. Recuperada (%)	Promedio Cant. Rec. (%)	Desv. Est. (µg/mL)	CV (%)
B	0.02	97.2382 99.8849 101.0357	99.3863	1.9472	1.9592
M	0.20	92.4125 91.2285 86.6200	88.9243	3.0603	3.4415
A	2.00	99.2538 94.5713 94.1254	95.9835	2.8409	2.9598



8.3.3. Precisión y Exactitud.

8.3.3.1.Repetibilidad

Tabla 12. Resultados de repetibilidad intradía (n=5). A = alto, B = Medio, B = Bajo.

PC	Conc. Nominal (µg/mL)	Conc. Promedio Recuperada (µg/mL)	Exactitud (%)	Desv. Est. (µg/mL)	CV (%)
B	0.02	0.0222	111.1072	0.0006	2.8097
M	0.2	0.1870	93.4962	0.0072	3.8723
A	2	1.9647	98.2352	0.0650	3.3065

8.3.3.2.Reproducibilidad

Tabla 13. Reproducibilidad intralaboratorio, llevando a cabo tres repeticiones de cada punto control durante tres días consecutivos (n=9).

PC	Conc. Nominal (µg/mL)	Conc. Promedio Recuperada (µg/mL)	Exactitud (%)	Desv. Est. (µg/mL)	CV (%)
B	0.02	0.0193	96.4746	0.0026	13.5686
M	0.2	0.1851	92.5472	0.0050	2.6834
A	2	1.9608	98.0393	0.0600	3.0602

8.3.4. Límite de cuantificación.

Tabla 14. Resultados de la evaluación del límite de cuantificación (El punto más bajo de la curva de calibración, en este caso con una n=5)

Conc. Nominal (µg/mL)	Cant. Prom. Rec. (µg)	Desv. Est. (µg)	C.V. (%)
0.01	0.0086	0.0012	14.1496

8.3.5. Límite de detección.

Tabla 15. Valores de las relaciones de altura obtenidas al evaluar muestras de concentraciones inferiores al LC. El LD se estima en 0.001µg debido a que su Rel. De Alt. es el valor inmediatamente superior al triple del obtenido en el análisis de 5 blancos de plasma.

Conc. Nominal (µg/mL)	Rel Alt. Prom.
0.001	0.0286
0.004	0.0431
0.01	0.0516
Blanco Plasma	0.0052 (X3 = 0.0156)



8.3.6. Selectividad

En los siguientes cromatogramas se muestra el comportamiento de las inyecciones de las sustancias consideradas para evaluar selectividad del método (Empleando el método de extracción propuesto).

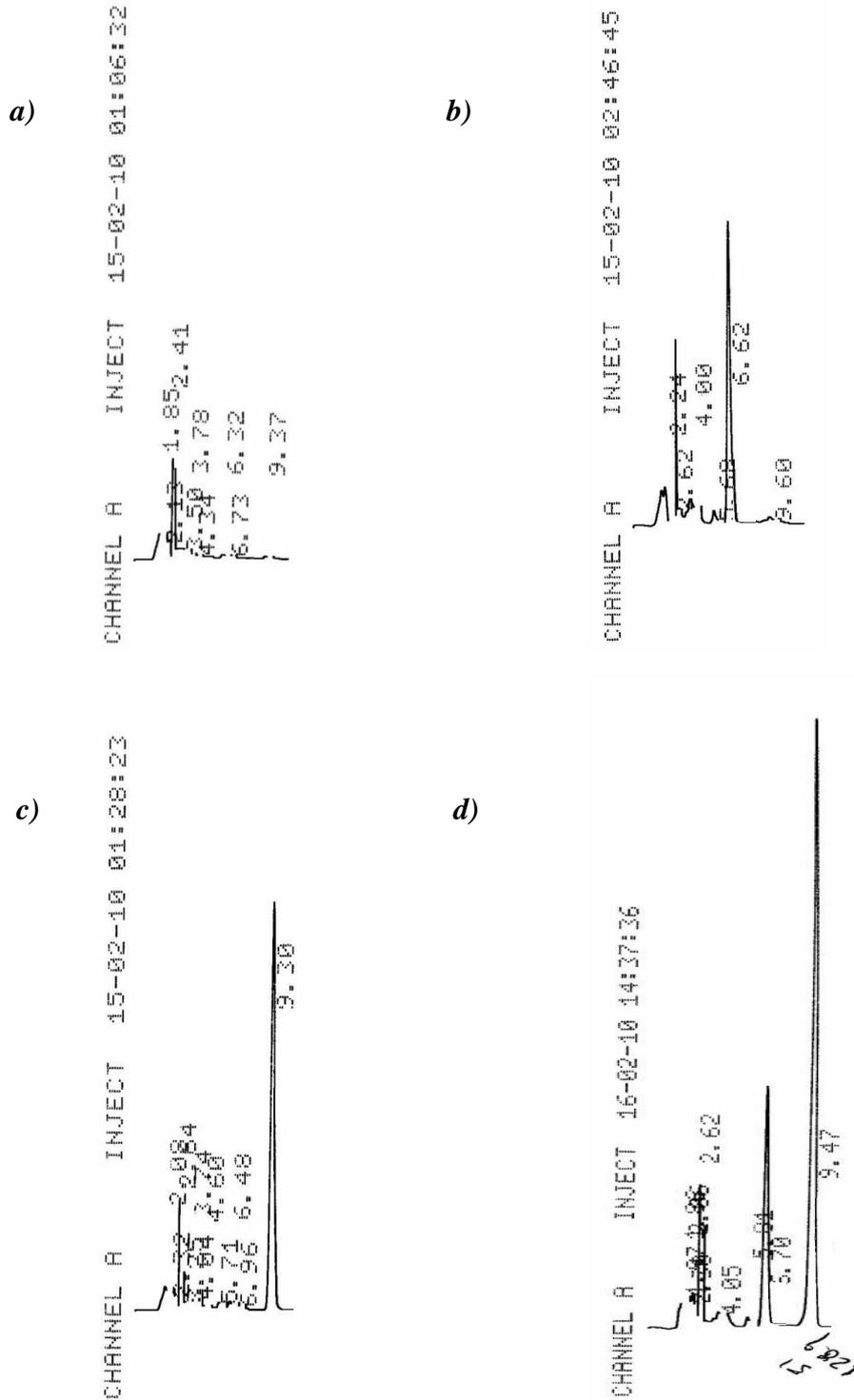


Figura 13. Selectividad del método, evaluada por la inyección de las siguientes muestras sometidas al proceso de extracción: a) blanco de plasma, b) 0.1µg/mL de Sildenafil, c) 0.18µg de E.I y d) mezcla de E.I. (1.8 µg/mL) y producto de interés (0.1 µg/mL)



8.3.7. Estabilidad

8.3.7.1. Soluciones de sildenafil.

Se evaluó la estabilidad de las soluciones principales empleadas para la preparación de la curva de calibración. Esta evaluación se llevó a cabo por cuatro semanas consecutivas.

Tabla 16. Valores promedio (n=3) de la estabilidad de la solución de carbamacepina (E.I.) de concentración 45 µg/mL. En la desviación absoluta se toma como referencia el valor de Alt. Prom. de t₀.

Tiempo (Días)	Alt. Promedio. (mm)	Desv. Est. (mm)	CV (%)	Desv. Abs. (%)
0	111.5667	0.0577	0.0517	0.0000
7	110.6667	0.0577	0.0522	-0.8067
14	117.8000	0.2000	0.1698	5.5871
21	117.1667	0.0577	0.0493	5.0194
28	106.5333	1.8175	1.7060	-4.5115

Tabla 17. Valores promedio (n=3) de la estabilidad de la solución de sildenafil de concentración 10 µg/mL.

Tiempo (Días)	Alt. Promedio. (mm)	Desv. Est. (mm)	CV (%)	Desv. Abs. (%)
0	33.9667	0.0577	0.1700	0.0000
7	33.3667	0.2309	0.6921	-1.7664
14	36.9667	0.0577	0.1562	8.8322
21	33.3333	0.2517	0.7550	-1.8646
28	32.1000	1.8193	5.6677	-5.4956

Tabla 18. Valores promedio (n=3) de la estabilidad de la solución de sildenafil de concentración 20 µg/mL.

Tiempo (Días)	Alt. Promedio. (mm)	Desv. Est. (mm)	CV (%)	Desv. Abs. (%)
0	71.5000	0.0000	0.0000	0.0000
7	68.5667	0.0577	0.0842	-4.1026
14	75.8667	0.2517	0.3317	6.1072
21	71.6667	0.2082	0.2905	0.2331
28	72.9000	1.5620	2.1427	1.9580



Tabla 19. Valores promedio (n=3) de la estabilidad de la solución de sildenafil de concentración 30 µg/mL.

Tiempo (Días)	Alt. Promedio. (mm)	Desv. Est. (mm)	CV (%)	Desv. Abs. (%)
0	107.3333	0.2887	0.2690	0.0000
7	104.4333	0.1155	0.1106	-2.7019
14	113.8000	0.2828	0.2485	6.0248
21	105.6333	2.1079	1.9955	-1.5839
28	106.4333	0.0577	0.0542	-0.8385

8.3.7.2. Estabilidad a largo plazo.

Tabla 20. Resultados promedio de la evaluación de estabilidad a largo plazo de muestras sin procesar de sildenafil en condiciones de congelación (-20°C).

Puntos Control		Días				
		0	7	15	21	28
B	Conc. Prom. (µg/mL)	0.0178	0.0188	0.0174	0.0165	0.0154
	Exactitud (%)	88.9846	94.1743	87.1264	82.6128	77.2041
	CV (%)	7.1028	7.7222	11.9570	2.9164	5.1699
M	Conc. Prom. (µg/mL)	0.1865	0.1934	0.1768	0.1830	0.1880
	Exactitud (%)	93.2297	96.7061	88.3970	91.5157	93.9753
	CV (%)	0.8904	3.7370	3.8123	3.0559	4.2399
A	Conc. Prom. (µg/mL)	1.9106	1.9262	1.8185	1.9027	1.8643
	Exactitud (%)	95.5298	96.3112	90.9263	95.1372	93.2168
	CV (%)	2.1013	2.4323	2.5893	1.9559	4.2812

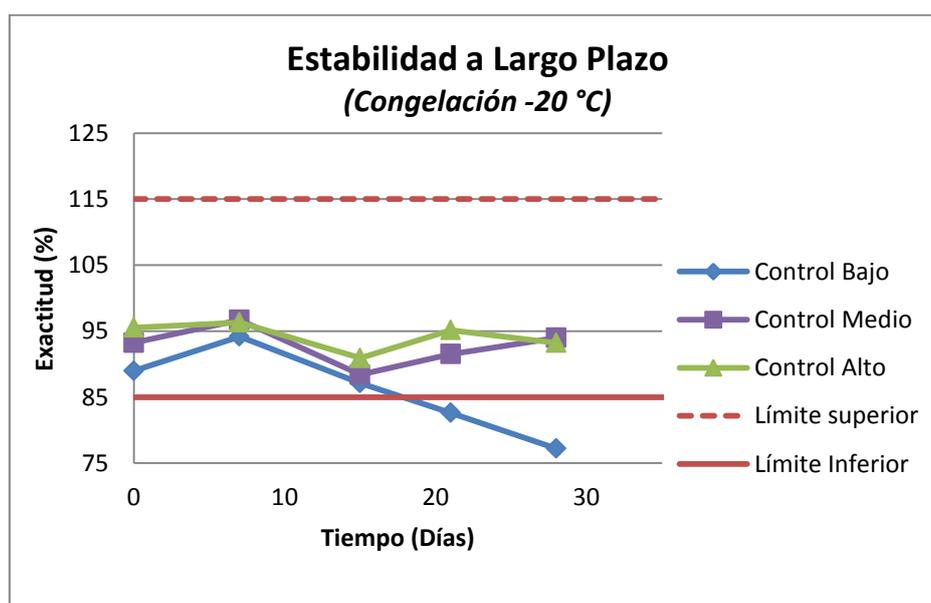


Figura 14. Seguimiento de las concentraciones obtenidas en los puntos control durante la evaluación de estabilidad a largo plazo bajo condiciones de congelación (-20°C)



8.3.8. Ciclos de congelación – descongelación.

Tabla 21. Resultados de la evaluación de los dos ciclos de congelación – descongelación. Cada ciclo tuvo una duración de 24 horas aproximadamente, llevando las muestras a una temperatura de -20°C. Las concentraciones de las muestras fueron obtenidas al interpolar la relación de alturas con una curva estándar preparada el mismo día del análisis de dichas muestras.

	Punto Control	Condición inicial	Primer ciclo	Segundo ciclo
B	Conc. Prom. (µg/mL)	0.0175	0.0228	0.0289
	Exactitud (%)	87.6054	114.1151	144.4619
	CV (%)	4.1494	2.8466	17.9221
M	Conc. Prom. (µg/mL)	0.1891	0.1858	0.1890
	Exactitud (%)	94.5690	92.8953	94.4962
	CV (%)	8.3837	0.8713	1.8269
A	Conc. Prom. (µg/mL)	1.9228	1.8257	1.8248
	Exactitud (%)	96.1398	91.2872	91.2414
	CV (%)	5.1381	1.2512	3.0268

8.4. Reto de análisis de muestra con distinta matriz (Sangre y plasma)

Tabla 22. Resultados obtenidos en el análisis de los puntos control por quintuplicado preparados en plasma y empleados para el reto de matrices.

PC	Conc. Nom. (µg/mL)	Rel. Alt. Promedio	Dev. Est.	CV (%)
Bajo	0.02	0.0884	0.0064	7.2600
Medio	0.20	0.8071	0.0670	8.2981
Alto	2.00	8.3195	0.3169	3.8093

Tabla 23. Resultados obtenidos del análisis de los PC por quintuplicado en sangre. La t de tablas para la prueba t tiene un valor de 4.032 cuando n = 6 y $\alpha = 0.01$. La Ho ($\mu = Y$ media) se rechaza y se acepta Ha ($\mu \neq Y$ media) para los tres PC.

PC	Conc. Nom. (µg/mL)	Y _{media} (Rel. Alt)	S	μ	tc	% Respuesta
Bajo	0.02	0.0985	0.0046	0.0884	5.4104	111.3714
Medio	0.20	0.9236	0.0340	0.8071	8.3947	114.4415
Alto	2.00	10.4561	0.2545	8.3195	20.5631	125.6822

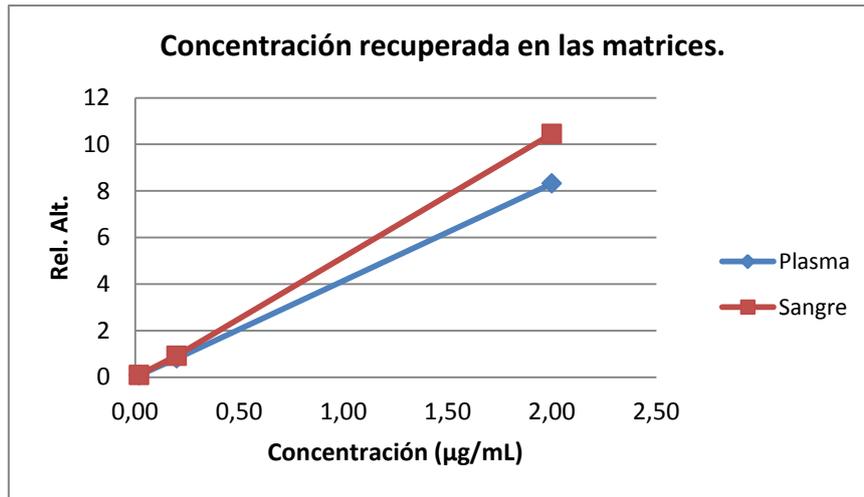


Figura 15. Comparación de las concentraciones obtenidas entre matrices (sangre y plasma), en cada PC.

8.5. Análisis de muestras

Tabla 24. Resultados del análisis de las muestras sanguíneas de sildenafil. La codificación de las muestras está dada por #paciente.#de muestra. La curva empleada para la obtención de las concentraciones tiene la ecuación $y = 5.2148x - 0.1196$, $r^2 = 0.9989$.

Muestra	Concentración promedio (µg/mL)	Observaciones
1.1	0.0127	ninguna
1.2	0.0312	ninguna
1.3	0.0376	Muestra espesa
2.1	0.0183	ninguna
2.2	0.0342	Muestra espesa
2.3	0.0263	ninguna
3.1	0.0214	ninguna
3.2	0.0206	ninguna
3.3	0.0229	ninguna
4.1	0.0305	ninguna
4.2	0.0216	ninguna
4.3	0.0166	ninguna
5.1	0.0255	Muestra Ictérica
5.2	0.0287	Muestra Ictérica
5.3	0.0267	Muestra Ictérica
6.1	0.0275	ninguna
6.2	0.0395	ninguna
6.3	0.0394	ninguna



9. Análisis de resultados.

Desarrollo

El desarrollo y la posterior validación del método analítico se llevaron a cabo teniendo en cuenta los requerimientos que necesita la CLAR, esto es, trabajar con material limpio (Sensibilidad mayor que otras técnicas analíticas), soluciones stock sin partículas en suspensión, y fase móvil filtrada y desgasificada antes de ser bombeada por el sistema cromatográfico. Para que la fase móvil se mantuviera en óptimas condiciones, ésta se mantuvo a -20°C mientras no se estaba ocupando y además mientras se bombeaba por el sistema, el reservorio permaneció en un baño de agua.

De acuerdo a la literatura revisada, se establecieron los parámetros cromatográficos (Fase móvil, temperatura, velocidad de flujo, columna y longitud de onda) para llevar a cabo, primeramente, la ubicación del pico cromatográfico característico de Sildenafil. El barrido de una solución de $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ fue para corroborar la longitud de onda a la cuál se realizaría la detección del analito, pues algunas bibliografías sugieren longitudes de onda de 240 y 225 (Daraghme N et. al., 2001 y Segall AI Edit., 2002). En el espectrofotograma obtenido en la solución propuesta, se identifico un máximo de absorbancia a los 230nm (Ver figura 5)

Se prosiguió a buscar un fármaco con características físico – químicas similares a sildenafil, lo cual permitiera poderlo emplear como E.I. Los fármacos probados fueron Ibuprofeno, Indometacina, Pentoxifilina, Ciprofloxacina, Claritromicina y Carbamacepina. De los anteriores, carbamacepina fue el único que podía fungir como E.I, pues los otros, como se observa en la figura 6, eluían al mismo tiempo que Sildenafil o eran arrastrados en el frente de disolvente o simplemente no se detectaba un pico cromatográfico adecuado debido a las condiciones cromatográficas establecidas para sildenafil. Además, Carbamacepina se extrajo empleando el mismo método definido para sildenafil.

Las pruebas que posteriormente se realizaron fue la selección de un método de extracción. De acuerdo a la bibliografía consultada, se decidió comenzar con una extracción líquido – líquido pues no se encontró literatura donde se mencione que el sildenafil se puede extraer al llevar a cabo una precipitación de proteínas. Se siguió un método A y uno B de extracción (ver numeral 7.1.5) para determinar si la extracción estaba limitada por el volumen de disolvente empleado y si un volumen de $50\ \mu\text{L}$ de la matriz era suficiente para detectar al analito en muestras plasmáticas sometidas a dicho proceso de extracción. Estas pruebas se llevaron a cabo en plasma de rata debido a la limitada cantidad de plasma humano con que se contó.

Los disolventes empleados fueron éter, éter-diclorometano (50:50% v/v), acetato de etilo, metil terbutil éter (MTBE) y benceno. En la figura 7 se observan los cromatogramas obtenidos de muestras procesadas bajo extrayentes propuestos. En dicha figura se observa que el benceno, a diferencia de los demás disolventes, extrae al analito sin acarrear cantidades significativas de interferencias plasmáticas. El acetato de etilo se descartó como extrayente a pesar de su buen recobro, pues acarrea interferencias en el tr de sildenafil. El método elegido fue el B, al ser más limpio y eficiente que el A.



Una vez establecidas las condiciones cromatográficas y de extracción para el analito y para el E.I., se continuó con la optimización, en cuya etapa el registrador Servugor 120 usado para el registro de los cromatogramas fue cambiado por un integrador Varian 4270; como una mejor opción del registro de los mismos. En la optimización se modificaron las condiciones cromatográficas para obtener picos cromatográficos con una adecuada resolución y selectividad, además de obtener un tiempo de corrida adecuado. En dichas pruebas se observó lo siguiente:

- La variación de la temperatura (15 a 30°C) no afecta el tiempo de retención de los picos cromatográficos
- El aumento de la proporción orgánica de la fase móvil disminuye los tiempos de retención.
- La temperatura empleada para la evaporación del extrayente afecta el pico cromatográfico de sildenafil, pues si se evapora a una temperatura superior a los 35 °C se observa un pico antes de la elución del pico de sildenafil.
- Una columna Zorbax SB-C18 4.6x75 mm, 3.5 µm no es adecuada para el método analítico, reduce los tiempos de retención a menos de 5 minutos y, en el caso del método, no se cumple la selectividad para los analitos.

Finalmente, se realizaron pruebas en plasma humano para ver que se obtuvieran los mismos cromatogramas que en plasma de rata, y la naturaleza de las matrices no afectara al analito en lo tocante a la selectividad y recobro en el proceso de extracción. En base a las pruebas realizadas se establecieron las condiciones cromatográficas descritas en el numeral 8.1.4 y el método de extracción detallado en 8.1.5 que conforman el método analítico para cuantificar sildenafil en plasma humano.

Validación.

El rango de trabajo fue definido tomando como base al Cmax de sildafil reportado en la literatura científica, y para el propósito de este estudio se definió desde 0.01 µg/mL hasta 3 µg/mL, estableciendo 6 puntos para la curva y 3 como controles (Concentraciones distintas a las de los puntos de la curva, pero incluidas dentro del rango de trabajo). La concentración del estándar interno se definió en 0.18 µg/mL dado que su respuesta a dicha concentración es similar a la del pico de sildenafil obtenido en una inyección de una solución de 0.3 µg/mL (punto medio de la curva).

El promedio de las tres curvas evalúa la linealidad del sistema. Ésta mostró que el cumplimiento del parámetro evaluado, en el intervalo de concentraciones estudiado, al obtenerse un alto valor del coeficiente de determinación alcanzado ($r^2 > 0.999$) con intercepto de la curva no significativo (0.0005). El valor del porcentaje del coeficiente de variación para el factor respuesta (Relación de altura/concentración) resultó adecuado si se tiene en cuenta que el valor aceptable debe ser menor o igual a 2% (Ver Tabla 8 y figura 9).

La evaluación del sistema evidenció que las condiciones del funcionamiento del equipo y el procesamiento de las soluciones stock están bajo control, y que los errores sistemáticos que puedan influir en la repetibilidad y reproducibilidad de los valores obtenidos en el método no son significativos. Por lo anterior se considera que el equipo



y el rango de trabajo en sistema son confiables. La evaluación de la aptitud del sistema se recomienda para todos los métodos analíticos, ya que permite verificar que el sistema de medición funciona apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales (44).

La adecuabilidad para un sistema cromatográfico involucra establecer parámetros que relacionen al Equipo CLAR – Analito – Fase móvil – Fase estacionaria. Los platos teóricos nos muestran la eficiencia de la columna; el factor de coleo es indicador de la forma del pico, ya que un pico coleado indica que la velocidad de interacción de las moléculas del analito con la fase estacionaria no es la misma durante el proceso de separación; y la resolución provee un criterio para decidir si un pico cromatográfico es o no interferente con el pico del analito. En este estudio se establecieron los valores del Factor de Coleo, Resolución y número de platos teóricos y tiempos de retención para el sildenafil y el estándar interno (carbamecina) los cuáles cumplen con los requisitos para un método cromatográfico (44).

El sistema es selectivo al analito y al E.I., pues como se observa en la figura 11, no hay interferencias observables al tiempo de retención de los mismos, después de realizar inyecciones de fase móvil, benceno grado HPLC evaporado y reconstituido con FM. Por otro lado los picos característicos de los analitos se obtienen al inyectar muestras de una solución de sildenafil (0.1 µg/mL) y solución stock del estándar interno con una concentración de (1.8 µg/mL). La inyección de una solución stock de una mezcla del E.I y el analito demuestran que no hay interacción entre ambos.

Al igual que la linealidad del sistema, el método es lineal en el rango propuesto. Los puntos del promedio de las seis curvas evaluadas cumplen con un CV menor al 15%, incluyendo al punto más bajo de la curva (Límite de cuantificación). El método de extracción tiene un recobro promedio de 94.7657%, siendo este un indicador de la eficiencia de la extracción propuesta. El método también es repetible (n=5 en un solo día) y reproducible (n=9, tres repeticiones durante tres días), como lo muestra las tablas 12 y 13 pues en ambas pruebas el CV de los puntos control es menor al 15%.

Una vez tratada la repetibilidad y reproducibilidad es menester mencionar un punto importante durante la inyección de las muestras: el método de inyección es importante para que los resultados sean reproducibles, sobre todo en métodos donde la introducción de las muestras al sistema cromatográfico no se hace de manera automatizada. La jeringa antes de cada inyección se purgaba dos veces con fase móvil, de lo contrario, el loop queda con trazas de la inyección anterior. El volumen de reconstitución de 100 µL impide realizar una purga de la jeringa, pues se necesitan mínimo 60 µL de muestra para realizar una inyección en un inyector manual con loop de 20 µL. Las inyecciones no son reproducibles si no se tiene una limpieza adecuada de la jeringa de inyección.

El límite de cuantificación propuesto fue de 0.01 µg/mL, el cual es reproducible al obtenerse un CV menor del 20% en cinco inyecciones consecutivas, como lo demuestra la tabla 14. Debido a que la linealidad del método se pierde empleando concentraciones inferiores a 0.01 µg/mL, el LD tuvo que ser determinado con el ruido de la línea base (Ver tabla 15). El LD se definió en 0.001 µg/mL, que es la concentración mínima a la cuál se obtiene una respuesta tres veces superior al ruido de la línea base.



La validación sirve para dos cosas: para ver la linealidad, reproducibilidad y repetibilidad del método; y para ver las condiciones de temperatura y periodo de tiempo en las cuáles las muestras permanecerán con cantidades similares a las que se obtendrían si se analizaran inmediatamente después al momento de su toma. Por ello es de suma importancia evaluar la estabilidad, tanto de las soluciones stock como de las muestras. Las respuestas de las soluciones stock empleadas en el método analítico permanecieron durante 28 días con un CV absoluto menor al 15% respecto a las obtenidas el día de su preparación, tiempo durante el cuál se consideran estables, permitiendo su empleo en la preparación de curvas de calibración.

A lo largo de la validación se observó que la parte baja de la curva es la parte más variable del método, pero siempre sus valores se encuentran dentro de los parámetros de precisión y exactitud establecidos. Esta variabilidad se debe a que se está cuantificando concentraciones muy bajas para el análisis de sildenafil en un sistema CLAR-UV. Este problema ha sido tratado por varios autores, y se ha resuelto empleando un sistema de concentración ASTED o desarrollando métodos en un sistema CLAR-MS-MS.

Las cantidades mínimas cuantificables por el método desarrollado, pueden ser la causa de que en la estabilidad a largo plazo a -20°C y en los ciclos de congelación – descongelación los controles bajos no hayan cumplido con la exactitud requerida. Como lo muestran la tabla 20 y la figura 14, los controles medios y altos, cuya concentración fue determinada en una curva preparada y procesada el mismo día del análisis de las muestras de estabilidad, cumplen con un CV menor al 15% respecto al valor nominal. No así los controles bajos, que solo cumplen con Estabilidad a Largo Plazo a -20°C hasta 15 días después de su preparación.

En el caso de los ciclos de congelación y descongelación, como se observa en la tabla 21, los puntos control medio y alto cumplen con la precisión y exactitud en los dos ciclos. Los puntos control bajos cumplen dichos criterios solo el primer ciclo de congelación – descongelación. Por lo anterior, se ha determinado una estabilidad de muestras plasmáticas de 15 días a -20°C y solo un ciclo de congelación - descongelación. Una forma de aumentar el tiempo de Estabilidad a Largo Plazo (-20°C) y el número de ciclos de congelación – descongelación podría ser la modificación del rango de trabajo, pero no se puede. De hacerlo, el método analítico CLAR-UV no cumpliría uno de sus objetivos de cuantificar cantidades pequeñas en plasma. Por ello, las muestras plasmáticas provenientes de un estudio de sildenafil deben de almacenarse a -20°C no más de 15 días y una vez descongeladas proceder con su análisis.

Análisis de muestras.

Antes de proceder con el análisis de las muestras, fue necesario realizar una comparación entre las respuestas de sildenafil que se obtienen en muestras plasmáticas y muestras sanguíneas. Como se recordará, uno de los objetivos de este estudio es llevar a cabo el análisis de sildenafil en muestras de sangre total provenientes de recién nacidos, que por su cortísima edad, la cantidad limitada de muestra restringió el uso de plasma como matriz biológica de análisis. El desarrollo del método en plasma se realizó debido a que no se tenía un *método analítico base* para el desarrollo en sangre además de no encontrar bibliografía referente al análisis de sildenafil en sangre como matriz biológica.



Para la comparación entre matrices biológicas se prepararon y procesaron, con el método anteriormente desarrollado y validado, cinco series de puntos control (Alto, medio y bajo) en plasma y la misma cantidad de puntos control en sangre. Como se observa en la figura 15, la respuesta es mayor en sangre que en plasma a medida que la cantidad del analito se incrementa, denotándose diferencia significativa en concentraciones superiores a 0.2 $\mu\text{g/mL}$. Una prueba *t de studen* determinó la diferencia entre los valores obtenidos en sangre y plasma en los tres niveles de puntos control, por lo que el método no es aplicable a muestras sanguíneas de sildenafil en concentraciones superiores a 0.20 $\mu\text{g/mL}$.

Finalmente, se procedió a la aplicación del método analítico en el análisis de muestras de pacientes. Al revisar las muestras a analizar, se encontró que ya habían excedido los 15 días de estabilidad determinados por este método. Además, el volumen que en un principio se había fijado como 50 μL de sangre, resultó ser de 500 μL . Por ello se centrifugaron las muestras para separar el plasma, pero éste y el paquete celular no se separaron, posiblemente por el uso o no del anticoagulante idóneo y/o el tiempo de resguardo de las mismas.

Por lo anterior, se trabajó con muestras en sangre total y se analizaron empleando el método descrito en el numeral 7.4. El método de análisis fue mediante estándar adicionado debido a las cantidades que se necesitan detectar. En el procesamiento de muestras sanguíneas, se observó que son muy espesas y a veces no es confiable la cantidad de muestra que se toma debido a su viscosidad. Además en algunas de ellas, el extrayente adquiría un color amarillo al final de la extracción, lo cual demuestra la presencia de bilirrubina justificable por las deficiencias metabólicas de los pacientes al tratarse de recién nacidos prematuros.



10. Conclusiones.

El método analítico desarrollado es adecuado para la cuantificación de Citrato de Sildenafil en plasma humano. El método no es útil en el análisis de muestras de sangre total a concentraciones mayores de 0.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Aún así, la cantidad de muestra recibida provenientes de recién nacidos demuestra que el tamaño de muestra es suficiente para obtener por lo menos 100 μL de plasma.

El método es válido en el intervalo de trabajo 0.01 a 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del analito empleando un método de extracción líquido – líquido con Benceno y utilizando carbamacepina como E.I. Respecto a la estabilidad determinada, las muestras resultaron ser estables no más de 15 días después de su toma, siempre y cuando permanezcan a -20°C . Las muestras no son estables a más de un ciclo de congelación – descongelación. Las soluciones stock son estables por lo menos 28 días después de su preparación.

El límite de cuantificación del método desarrollado lo hace útil en el monitoreo del fármaco en niños recién nacidos prematuros con Hipertensión Pulmonar Persistente, Síndrome de Distress Respiratorio o cualquier otro padecimiento tratado con sildenafil y cuyas concentraciones plasmáticas se estimen dentro del rango de trabajo en el cuál el método demostró ser preciso y exacto.

11. Sugerencias.

- Se sugiere que se lleve a cabo la separación del plasma del paquete celular una vez obtenida la muestra, y que se almacenen las muestras plasmáticas en volúmenes de 100 μL para su posterior análisis.
- Es necesario llevar a cabo la evaluación de la posible interferencia de plasma lipémico y hemolizado en la cuantificación del sildenafil.
- Si en algún momento es necesario llevar a cabo análisis de muestras sanguíneas de sildenafil, se puede realizar una revalidación en sangre total tomando como referencia el método desarrollado y validado empleando plasma humano.

12. Aplicación

El método analítico desarrollado es aplicable al análisis rutinario de muestras plasmáticas de sildenafil, pues demostró ser repetible, reproducible y lineal en un rango de concentración de 0.01 a 3 μg . Su uso es viable en laboratorios y / o clínicas en las cuáles el equipo cromatográfico sea una limitante, pues se trata de un método para CLAR-UV.



13. Referencias

1. Al-Ghazawi M, Tutunji M, AbuRuz S. Simultaneous determination of sildenafil and *N*-desmethyl sildenafil in human plasma by high-performance liquid chromatography method using electrochemical detection with application to a pharmacokinetic study. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2007; (43): 613-618.
2. Pauvert O, Lugnier C, Keravis T, Marthan R, Rousseau E, Savineau JP. Effect of sildenafil on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, vascular tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. *British Journal of Pharmacology*. 2003; (139): 513-522.
3. Thomson PLM. Diccionario de especialidades farmacéuticas. 52^a ed. D.F.: McGraw-Hill; 2006: 3715, 3716.
4. Sweetman S, editor. Martindale. The complete drug reference. 3rd ed. China: Pharmaceutical press; 2007: 1987-1989.
5. Dias-Junior C, Cau SB, Oliveira A, Castro M, Montenegro M, Gerlech R, Tanus-Santos JE. Nitrite or sildenafil. But not BAY 41-2272, blunt acute pulmonary embolism-induced increases in circulating matrix metalloproteinase-9 and oxidative stress. *Thrombosis Research*. 2009; (124): 349-355.
6. Dias-Junior C, Vieira TF, Moreno Jr H, Evora PR, Tanus-Santo JE. Sildenafil selectively inhibits acute pulmonary embolism-induced pulmonary hypertension. *Pulmonary Pharmacological Therapy*. 2005; (18): 181-187.
7. Guazzi M, Myers J, Peberdy MA, Bensimbon D, Chase P, Arena R. Ventilatory efficiency and dyspnea on exertion improvements are related to reduced pulmonary pressure in heart failure patients receiving sildenafil. *International Journal of Cardiology*. 2009.
8. Behrman RE, Kliegman RM, Needman RD. Nelson Tratado de pediatría. 17a edición. Madrid: ELSEVIER; 2006. Pp 23 – 27.
9. Chaure LI, Inarejos MG. Enfermería pediátrica. 1^a Edición. Barcelona: ELSEVIER/MASSON; 2007. Pp. 31, 32, 100.
10. Cloherty PJ, Eichenwald EC. Manual de cuidados neonatales. 4^a edición. Barcelona: Masson; 2004. Pp 438- 445.
11. Cullen PJ, Guzmán B, Martínez MA. Surfactante pulmonar (Artículo de revisión). *Revista Vacunación Hoy*. 2007; 15 (85): 19-28.
12. Ruza F. Tratado de cuidados intensivos pediátricos. 3^a Edición. Volumen I. Madrid: Ediciones Norma – Capitel; 2003. Pp. 509 - 515.
13. Universidad de Virginia [Sede Web]* Charlottesville: Universidad de Virginia; 2006 [Acceso 21 de marzo del 2010] Health topics contact 2010. Hipertensión Pulmonar Persistente del Recién Nacido. Disponible en: http://www.healthsystem.virginia.edu/UVAHealth/peds_hrnewborn_sp/pph.cfm
14. Wang Y, Wang J, Cui Y, Fawcett JP, Gu J. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the quantitation of sildenafil in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2005; (828): 118-121.
15. Baquero H, Soliz A, Venegas ME, Sola A. Oral Sildenafil in infants with persistent Pulmonary Hypertension of the newborn: A pilot randomized blinded study. *Journal of American Academy of Pediatrics*. 2006; 117(4): 1077-1083.
16. Ballard SA, Burslem FSM, Gingell CJG, Price M.E, Tang K, Turner LA, Naylor AM. *In vitro* profile of UK-92,480, an inhibitor of cyclic GMP-specific



- phosphodiesterase 5 for the treatment of male erectile dysfunction. *Journal of Urology*. 1996; (155)
17. Xu QA. Stability indicating HPLC methods for drug analysis. Washington: American pharmaceutical association; 2008: 761.
 18. Blanchard and Loeb Publishes. *Drug Handbook*. USA: Nuvés choice for better care. 2002. Pp.691-692.
 19. Pharma Suisse, editor. *Index nominum international drug directory*. 19th ed. Druckerei: Med Pharm; 2008: 1244, 1245.
 20. Moffat CA, Osselton DM, Widdop B. editors. *Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body and postmortem material*. 3rd ed. London: Pharmaceutical Press; 2004: 1559-1560.
 21. Sheu MT, Wu A, Yeh G, Hsia A, Ho H. Development of a liquid chromatographic method for bioanalytical applications with sildenafil. *Journal of Chromatography B*. 2003; (791): 255-262.
 22. Flores MFJ, Castañeda HG, Granados SV, Herrera JE. Increased bioavailability of sildenafil in Mexican men. *Journal of American Medical Association*. 2000; (283): 1825-1826.
 23. Cooper JDH, Muirhead DC, Taylor JE, Baker PR. Development of an assay for the simultaneous determination of sildenafil (Viagra®) and its metabolite (UK-103,320) using automated sequential trace enrichment of dialysates and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*. 1997; (701): 87-95.
 24. Walker DK, Ackland MJ, James GC, Muirhead GJ, Rance CJ, Watall P. Wrigth PA. Pharmacokinetics and metabolism of sildenafil in mouse, rat, rabbit, dog and man. *Xenobiotica*. 1999; (29): 297-310.
 25. Rodríguez CR. *Vademecum academico de medicamentos*. 4^a ed. D.F.: McGraw-Hill; 2005: 733.
 26. Muirhead G, Rance DJ, Walker D, Wastall P. Comparative human pharmacokinetics and metabolism of sibgle-dose oral and intravenous sildenafil citrate. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2002; (53): 13S-20S.
 27. Osman MA, El-Maghraby GM, Hedaya MA. Intestinal absorption and presystemic disposition of sildenafil citrate in the rabbit: evidence for site-dependent absorptive clearance. *Biopharmaceutics and Drug Disposition* 2006; (27): 93-102.
 28. Daraghmeh N, Al-Omari M, Badwan AA, et al. Determination of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablets dosage form using HPLC. *Journal of Pharmaceutical Biomedical Analytical*. 2001; (25): 283 – 92.
 29. Segall AI, Vitale MF, Perez VL, et al. Reversed-phase HPLC determination of sildenafil citrate in the presence of its oxidative-induced degradation products. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technology*. 2000; (23): 1377 – 86.
 30. Haleen JI, editor. *A century of separation science*. USA: Marcel Dekker Inc.; 2002. Pp. 1-14, 19.
 31. Hernández AVJ, Sánchez EG, Vázquez JC, Mora JA, Mendoza MT. Introducción a las técnicas cromatográficas instrumentales más utilizadas en el análisis farmacéutico. D.F.: Facultad de estudios superiores Zaragoza. UNAM; 2008: 46, 52-56, 60,61, 68-70.
 32. The United States Pharmacopeia Convention, *Farmacopea de los Estados Unidos de América*. Edición 31. Estados Unidos. 2008. pp. 272.



33. Skoog DA, James F. Stanley R. Principios de Análisis Instrumental. 6a Edición. México: Cengage Learning. 2008. Pp 994 – 998.
34. Watson D. Pharmaceutical analysis: a text book for pharmacy students and pharmaceutical chemist. China: Churchill Livingstone; 1999: 239-241.
35. Skoog DA, West DM, Holler FJ. Fundamentos de química analítica. 8ª Edición. México: Cengage Learning; 2005. Pp.763, 816.
36. Rodríguez PG. Optimización y validación de un método analítico por CLAR (Cromatografía líquida de alta resolución) para cuantificar ácido clavulánico en plasma aplicado a un estudio de bioequivalencia [Tesis de licenciatura]. D.F.: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. 2008: 11-14.
37. Sadek PC. The HPLC solvent guide. EUA: John Wiley & Sons Inc. 1996. Pp. 1-5.
38. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 8ª Edición. Secretaría de Salud. México 2004.
39. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. Guía de validación de métodos analíticos. D.F.: Colegio Nacional de Químicos Biólogos A. C.; 2002: 8-12.
40. Stavros K. Editor. HPLC made to measure. A practical handbook for optimization. Federa Republic of Germany: Wiley – VCH. 2006. Pp 3-7.
41. Department of Health and Human Services, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine. Guiance for industry, Bioanalytical method validation. U. S. Food and Drug Administration 2001; 2.
42. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan CT, Cook CE, McDowall RD, Pittman KA, Specto S. Anañtical methods validation: Bioavalaibility, bioequivalence and pharmacokinetic studies. International journal of pharmaceutics. 1992; (82): 1-7.
43. NOM-177-SSA1-1998. Que establece las pruebas y los procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable, requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Diario Oficial de la Federación. Tomo DXLVIII No. 4. Mayo de 1999. P. 7-12.
44. FDA Center for Drug Evaluation and Research. Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods. CDER-FDA, USA; 1994.
45. NOM-031-SSA2-1999. Para la atención a la salud del niño.
46. NOM-007-SSA2-1993. Atención a la mujer durante el embarazo, parto y puerperio y del recién nacido.
47. Aguilar CMJ, Tratado de enfermería infantil. Cuidados pediátricos. 1ª Edición. Madrid: ELSEVIER; 2003. Pp. 72, 73 y 74.
48. Smith FJ, Braithwaite A. Chromatographic methods. 5th Edit. UK: Kluer Academic Publisher. 1996.