



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**TESIS**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO POR  
UPLC-MS/MS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FÁRMACOS  
ANTIRRETROVIRALES EN PLASMA HUMANO**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**MÓNICA ANDREA MARTÍNEZ HERNÁNDEZ**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, 2016**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** M. en C. Juan Manuel Rodríguez \_\_\_\_\_

**VOCAL:** M. EN F. Liz Jannet Medina Reyes \_\_\_\_\_

**SECRETARIO:** M. en C. Jessica Hernández Pineda \_\_\_\_\_

**1er. SUPLENTE:** M. EN C. María De Lourdes Mayet Cruz \_\_\_\_\_

**2° SUPLENTE:** M. en C. Luis Jesús García Aguirre \_\_\_\_\_

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA E  
INMUNOLOGÍA INSTITUTO DE PERINATOLOGÍA ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES**

**ASESOR DEL TEMA:**

\_\_\_\_\_  
**M. en C. Jessica Hernández Pineda**

**SUSTENTANTE:**

\_\_\_\_\_  
**Mónica Andrea Martínez Hernández**



## RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un método analítico mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Eficiencia acoplado a Espectrometría de Masas en tándem (UPLC-MS/MS) para la cuantificación simultánea en plasma humano de lamivudina (LMV), zidovudina (ZDV), ritonavir (RTV) y lopinavir (LPV); fármacos antirretrovirales pertenecientes a la terapia antirretroviral de alta actividad (TARAA) actualmente empleada contra la infección por VIH en mujeres embarazadas.

Para la detección de los compuestos por Espectrometría de Masas se empleó ionización por electrospray en modo positivo. Se definieron las siguientes transiciones para cada uno de los fármacos: LMV (230.12→112.08), ZDV (268.20→127.10), LPV (629.55→ 447.35) y RTV (721.50 →296.20). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna BEH C18 (2.1µm x 50 mm, 1.7 µm) mediante un gradiente (90:10, 50:50, 20:80) empleando como fase móvil ácido fórmico al 0.1% (AF) y acetonitrilo (ACN) con un tiempo de corrida de 3 minutos.

El procedimiento de extracción por precipitación de proteínas con 0.1 % AF en ACN mostró ser rápido, sencillo y reproducible, lo que ofrece la facilidad para procesar un gran número de muestras para fines de monitoreo terapéutico y estudios de farmacocinética poblacional.

El método se validó según los criterios que establece la NOM-177-SSA1-2013 y demostró ser específico, selectivo, lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones: 25-1500 ng/mL, 50-3000 ng/mL, 75-4500 ng/mL y 250-15000 ng/mL para RTV, LMV, ZDV y LPV respectivamente.

Finalmente el método se aplicó en la determinación de las concentraciones mínimas en el estado estacionario de muestras de pacientes con VIH en el tercer trimestre de embarazo.



# ÍNDICE GENERAL

<b>Capítulo</b>	<b>Pág.</b>
<b>Resumen</b>	<i>i</i>
Índice General	<i>ii</i>
Índice de Figuras	<i>v</i>
Índice de Diagramas	<i>v</i>
Índice de Tablas	<i>vi</i>
Abreviaturas y símbolos	<i>vii</i>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1. Marco teórico</b>	<b>3</b>
1.1 Generalidades sobre el Virus de la Inmunodeficiencia Humana	3
1.1.1 Prevalencia y mortalidad del el Virus de la Inmunodeficiencia Humana en México	3
1.1.2 Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)	4
1.2 Mecanismos de transmisión del VIH: un enfoque en la transmisión vertical	4
1.3 Terapia Antirretroviral de Alta Actividad (TARAA) en el embarazo	5
1.3.1 Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN)	6
1.3.2 Inhibidores de la proteasa (IP)	7
1.3.3 Diferencias farmacocinéticas de TARAA durante el embarazo	8
1.4 Metodologías analíticas para la determinación de fármacos antirretrovirales en plasma	11
1.5 Composición del plasma sanguíneo	15
1.6 Métodos de extracción de fármacos	16
1.7 Consideraciones generales de la cromatografía de líquidos como método de separación	17
1.7.1 Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Eficiencia (UPLC)	19
1.8 Acoplamiento a detectores de espectrometría de masas en tándem (MS/MS)	20



1.9 Validación de métodos analíticos	25
<b>Capítulo 2. Justificación</b>	<b>27</b>
<b>Capítulo 3. Objetivos</b>	<b>28</b>
<b>Capítulo 4. Desarrollo Experimental</b>	<b>29</b>
4.1 Materiales, equipos, reactivos y estándares de referencia	29
4.1.1 Material	29
4.1.2 Material Biológico	29
4.1.3 Equipos e instrumentos	30
4.1.4 Reactivos	30
4.1.4 Estándares de Referencia	30
4.2 Desarrollo del método para la cuantificación de LMV, ZDV, LPV y RTV en plasma humano mediante UPLC-MS/MS	31
4.2.1 Detección por espectrometría de masas (MS/MS)	31
4.2.2 Separación cromatográfica mediante UPLC	33
4.2.2.1 Preparación de soluciones	33
4.2.3 Procedimiento de extracción a partir de plasma	35
4.3 Validación del método analítico para la cuantificación de LMV, ZDV, LPV y RTV en plasma humano	36
4.3.1 Preparación de las soluciones de referencia	36
4.3.2 Preparación de la solución de trabajo para el Estándar Interno (EI)	36
4.3.3 Preparación de la solución de trabajo para la curva de calibración	36
4.3.4 Preparación de la curva de calibración en solución	36
4.3.5 Preparación de las concentraciones empleadas como muestras control	38
4.3.6 Validación del método analítico	39
4.3.6.1 Adecuabilidad del sistema	39
4.3.6.2 Selectividad	39
4.3.6.3 Efecto matriz	40
4.3.6.4 Efecto de acarreo	41



4.3.6.5 Límite Inferior de la Curva	41
4.3.6.6 Linealidad	41
4.3.6.7 Precisión	42
4.3.6.8 Exactitud	42
4.3.6.9 Estabilidad	43
4.4 Aplicación del método analítico en la cuantificación de los fármacos antirretrovirales en mujeres embarazadas VIH positivas	45
<b>Capítulo 5. Resultados y Discusión</b>	<b>47</b>
5.1 Desarrollo del método analítico	47
5.1.1 Detección por espectrometría de masas (MS/MS)	47
5.1.2 Condiciones cromatográficas por UPLC	52
5.1.3 Método de extracción a partir de plasma	58
5.2 Validación del método analítico	60
5.2.1 Adecuabilidad del sistema	60
5.2.2 Selectividad	61
5.2.3 Efecto matriz	65
5.2.4 Efecto de acarreo	65
5.2.5 Linealidad	67
5.2.6 Precisión	72
5.2.7 Exactitud	77
5.2.8 Estabilidad	79
5.3 Aplicación del método analítico en la determinación de las concentraciones de los fármacos antirretrovirales en mujeres embarazadas VIH positivas	84
<b>Capítulo 6. Conclusiones y Perspectivas</b>	<b>87</b>
<b>Capítulo 7. Referencias bibliográficas</b>	<b>89</b>



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estimación del porcentaje de mujeres que viven con VIH en México, 2000-2014	3
<b>Figura 2.</b> Estructura del VIH	4
<b>Figura 3.</b> Blancos farmacológicos en el tratamiento de la infección por VIH	5
<b>Figura 4.</b> Composición del plasma sanguíneo	15
<b>Figura 5.</b> Representación de los componentes de un sistema de cromatografía de líquidos	18
<b>Figura 6.</b> Rango óptimo de trabajo según la ecuación de van Demter	20
<b>Figura 7.</b> Formación de gotas cargadas por ESI y fuente de ionización	22
<b>Figura 8.</b> Esquema del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo	24
<b>Figura 9.</b> Optimización de los parámetros mediante espectrometría de masas	48
<b>Figura 10.</b> Espectro de masas del ion producto de LMV (m/z: 230.15 → 112.08)	50
<b>Figura 11.</b> Espectro de masas del ion producto de ZDV (m/z: 268.18 → 127.10)	50
<b>Figura 12.</b> Espectro de masas del ion producto de RTV (m/z: 721.50 → 296.20)	51
<b>Figura 13.</b> Espectro de masas del ion producto de LPV (m/z: 629.55 → 447.36)	51
<b>Figura 14.</b> Espectro de masas del ion producto de SMV (m/z: 419.4 → 199.2)	52
<b>Figura 15.</b> Cromatograma en columna BEH Shield RP18	53
<b>Figura 16.</b> Cromatograma con acetato de amonio 10Mm como fase móvil	54
<b>Figura 17.</b> Cromatograma de LIC en solución	57
<b>Figura 18.</b> Cromatograma representativo de selectividad	63
<b>Figura 19.</b> Linealidad promedio de LMV	68
<b>Figura 20.</b> Linealidad promedio de ZDV	69
<b>Figura 21.</b> Linealidad promedio de LPV	70
<b>Figura 22.</b> Linealidad promedio de RTV	71
<b>Figura 23.</b> Muestra de paciente embarazada VIH positiva al tercer trimestre de embarazo	86

## Índice de Diagramas

<b>Diagrama 1.</b> Procedimiento para desarrollar el método por espectrometría de masas	32
<b>Diagrama 2.</b> Procedimiento para desarrollar el método mediante UPLC	34
<b>Diagrama 3.</b> Preparación de los estándares de la curva de calibración en solución	37
<b>Diagrama 4.</b> Preparación de las soluciones de trabajo empleadas como puntos control	38
<b>Diagrama 5.</b> Evaluación de efecto matriz	40
<b>Diagrama 6.</b> Método de extracción de los fármacos antirretrovirales a partir de plasma	59





## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Propiedades farmacocinéticas de los fármacos antirretrovirales	8
<b>Tabla 2.</b> Estudios farmacocinéticos en mujeres embarazadas con VIH	10
<b>Tabla 3.</b> Métodos bioanalíticos para la determinación de los fármacos antirretrovirales	13
<b>Tabla 4.</b> Propiedades fisicoquímicas de los fármacos antirretrovirales	14
<b>Tabla 5.</b> Métodos de extracción de fármacos a partir de plasma	16
<b>Tabla 6.</b> Concentraciones empleadas como estándares en la curva de calibración	38
<b>Tabla 7.</b> Concentraciones empleadas como muestras control	39
<b>Tabla 8.</b> Resumen de los criterios de aceptación para la validación del método analítico	44
<b>Tabla 9.</b> Parámetros dependientes de los analitos	49
<b>Tabla 10.</b> Gradiente de elución	55
<b>Tabla 11.</b> Adecuabilidad del sistema	60
<b>Tabla 12.</b> Selectividad del método	61
<b>Tabla 13.</b> Selectividad frente a fármacos concomitantes	62
<b>Tabla 14.</b> Efecto matriz	65
<b>Tabla 15.</b> Efecto de acarreo	66
<b>Tabla 16.</b> Parámetros de la regresión lineal de las curvas de calibración	67
<b>Tabla 17.</b> Exactitud de las curvas de calibración de LMV	68
<b>Tabla 18.</b> Exactitud de las curvas de calibración de ZDV	69
<b>Tabla 19.</b> Exactitud de las curvas de calibración de LPV	70
<b>Tabla 20.</b> Exactitud de las curvas de calibración de RTV	71
<b>Tabla 21.</b> Repetibilidad de LMV	72
<b>Tabla 22.</b> Repetibilidad de ZDV	73
<b>Tabla 23.</b> Repetibilidad de LPV	73
<b>Tabla 24.</b> Repetibilidad de RTV	74
<b>Tabla 25.</b> Reproducibilidad de LMV	75
<b>Tabla 26.</b> Reproducibilidad de ZDV	75
<b>Tabla 27.</b> Reproducibilidad de LPV	76
<b>Tabla 28.</b> Reproducibilidad de RTV	76
<b>Tabla 29.</b> Evaluación de la exactitud de LMV	77
<b>Tabla 30.</b> Evaluación de la exactitud de ZDV	78
<b>Tabla 31.</b> Evaluación de la exactitud de LPV	78
<b>Tabla 32.</b> Evaluación de la exactitud de RTV	79
<b>Tabla 33.</b> Evaluación de la estabilidad de LMV	80
<b>Tabla 34.</b> Evaluación de la estabilidad de ZDV	81
<b>Tabla 35.</b> Evaluación de la estabilidad de LPV	81
<b>Tabla 36.</b> Evaluación de la estabilidad de RTV	81
<b>Tabla 37.</b> Evaluación de la estabilidad en solución	82
<b>Tabla 38.</b> Resumen de los resultados de la validación del método analítico	83
<b>Tabla 39.</b> Resultados de la corrida analítica en la aplicación del método	84
<b>Tabla 40.</b> Determinación de la concentración de antirretrovirales en mujeres embarazadas VIH+	85



## Abreviaturas y símbolos

<b><math>\alpha</math>:</b>	Selectividad cromatográfica
<b>ACN:</b>	Acetonitrilo
<b>AF:</b>	Ácido fórmico
<b>ADME:</b>	Procesos de absorción-distribución-metabolismo-excreción
<b>b:</b>	Intercepto
<b>%CV:</b>	Coefficiente de variación
<b>CYP450:</b>	Citocromo P450
<b>DE:</b>	Desviación Estándar
<b>%DEA:</b>	Desviación Estándar Absoluta
<b>EI:</b>	Estándar interno
<b>ESI:</b>	Ionización por electrospray
<b>FDA:</b>	Food and Drug Administration
<b>FMN:</b>	Factor de matriz normalizado
<b>H:</b>	Platos teóricos de una columna cromatográfica
<b>HPLC-UV/Vis:</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectroscopia Ultravioleta/Visible
<b>IP:</b>	Inhibidores de la proteasa
<b>ITIAN:</b>	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos
<b>ITINN:</b>	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos
<b>LIC:</b>	Límite Inferior de la Curva
<b>LC-MS:</b>	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas
<b>LC-MS/MS:</b>	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tandem
<b>LMV:</b>	Lamivudina
<b>Log P:</b>	Logaritmo del coeficiente de reparto
<b>LPV:</b>	Lopinavir
<b>LPV/r:</b>	Combinación lopinavir-ritonavir
<b>m/z:</b>	Relación masa-carga
<b>m:</b>	Pendiente
<b>MC:</b>	Muestra Control
<b>MCA:</b>	Muestra Control Alta
<b>MCB:</b>	Muestra Control Baja
<b>MCD:</b>	Muestra Control Diluida
<b>MCM:</b>	Muestra Control Media
<b>MeOH:</b>	Metanol
<b><math>\mu\text{g}/\mu\text{L}</math>:</b>	microgramos/microlitros
<b>mg/mL:</b>	miligramos/mililitros
<b>MRM:</b>	Monitoreo de reacción múltiple
<b>MS/MS:</b>	Espectrometría de masas en tandem
<b>MTF:</b>	Monitoreo terapéutico de fármacos
<b>N:</b>	Eficiencia cromatográfica
<b>ng:</b>	Nanogramos
<b>NOM:</b>	Norma Oficial Mexicana



<b>pH:</b>	Potencial de hidrógeno
<b>Q1:</b>	Primer cuadrupolo del analizador de iones
<b>Q2:</b>	Segundo cuadrupolo del analizador de iones
<b>Q3:</b>	Tercer cuadrupolo del analizador de iones
<b>r:</b>	Coefficiente de correlación
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinación
<b>RNA:</b>	Ácido ribonucleico (ARN)
<b>Rpm:</b>	Revoluciones por minuto
<b>Rs:</b>	Resolución cromatográfica
<b>RTV:</b>	Ritonavir
<b>S/N:</b>	Relación señal/ruido
<b>SIDA:</b>	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
<b>SMV:</b>	Simvastatina
<b>TARAA:</b>	Terapia Antirretroviral de Alta Actividad
<b>tR:</b>	Tiempo de retención
<b>UPLC®:</b>	Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia (por sus siglas en inglés)
<b>UPLC-MS/MS:</b>	Cromatografía de líquidos de Ultra Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas en tándem
<b>VIH:</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humana
<b><math>\bar{X}</math>:</b>	Media
<b>ZDV:</b>	Zidovudina
<b><math>\sigma</math>:</b>	Desviación estándar



## INTRODUCCIÓN

La epidemia del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) continúa siendo uno de los retos más grandes para la salud pública en todo el mundo, de manera que para el año 2015 el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA junto con el Centro Nacional para la prevención y el Control del VIH/SIDA (ONUSIDA/CENSIDA) reportaron que existían en el mundo 35.9 millones de personas infectadas con VIH <sup>[1]</sup>.

En el mismo año, en México se reportaron 190 mil casos de adultos viviendo con VIH de los cuales las mujeres representaron el 21 por ciento. Dicha proporción ha crecido de manera sostenida, y ha sido atribuido a múltiples factores, entre ellos, fisiológicos y sociales <sup>[1]</sup>. El problema se ha potencializado considerando que la mayoría de las mujeres infectadas se encuentra en etapa de reproducción, con el riesgo de quedar embarazadas y transmitir el virus al recién nacido en ausencia de cualquier terapia antirretroviral, fenómeno conocido como transmisión vertical <sup>[2]</sup>.

Un recurso importante en la prevención de la transmisión vertical es la terapia antirretroviral de alta actividad (TARAA) que involucra la combinación de dos fármacos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN: lamivudina y zidovudina) y dos inhibidores de proteasa del virus (IP: ritonavir y lopinavir). Sin embargo, es bien sabido que durante el embarazo se modifican considerablemente los procesos de absorción-distribución-metabolismo-excreción (ADME) de una gran cantidad de fármacos, dando lugar a cambios significativos en las concentraciones plasmáticas <sup>[3,4]</sup> lo que puede comprometer su seguridad y eficacia.

En tales situaciones, el monitoreo de las concentraciones plasmáticas de estos fármacos durante el embarazo se convierte en un factor importante, por lo que su determinación puede aportar información relevante sobre la distribución, niveles sistémicos y su asociación con la respuesta terapéutica para formular dosificaciones óptimas en este tipo de población <sup>[4]</sup>.



Aunado a ello, cada año miles de mujeres embarazadas son enfrentadas a diversos problemas médicos y de salud debido a la escasa evidencia científica, que por cuestiones éticas, impiden que sean incluidas en protocolos de investigación, y por lo tanto, son tratadas en función de esquemas ya prescritos para otras poblaciones <sup>[3]</sup>.

Bajo ese contexto, es que surge la necesidad de implementar técnicas que permitan monitorear las concentraciones plasmáticas de los fármacos que conforman esta terapia a fin de profundizar sobre los efectos farmacocinéticos durante el embarazo. En este sentido, y debido a que el Instituto Nacional de Perinatología es un centro de referencia en el tratamiento de estas pacientes, resulta imprescindible el desarrollo y validación de métodos de bioanálisis cuyo objetivo principal sea que el resultado reportado concuerde con el propósito requerido, y además, sea lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en ésta pueda tomarse con seguridad <sup>[5]</sup>.

Es por eso que la aportación de este trabajo se enfoca en desarrollar un método analítico mediante UPLC-MS/MS que sea capaz de cuantificar simultáneamente esta combinación de fármacos en plasma humano. A la fecha, pocos son los métodos descritos en la literatura que cuantifican simultáneamente la gama de fármacos pertenecientes a la TARAA actualmente recomendada contra la infección por VIH en mujeres embarazadas.

Para garantizar la confiabilidad del método, este se sometió a validación mediante el cumplimiento de los criterios establecidos por la Norma Oficial Mexicana (NOM-177-SSA1-2013) que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.

Cabe hacer notar, que esta metodología analítica desarrollada y validada podría emplearse en la determinación de las concentraciones plasmáticas para el monitoreo terapéutico de fármacos antirretrovirales, así como en la construcción un modelo de farmacocinética poblacional en mujeres VIH-positivo en etapa gestación del Instituto Nacional de Perinatología.



## Marco teórico

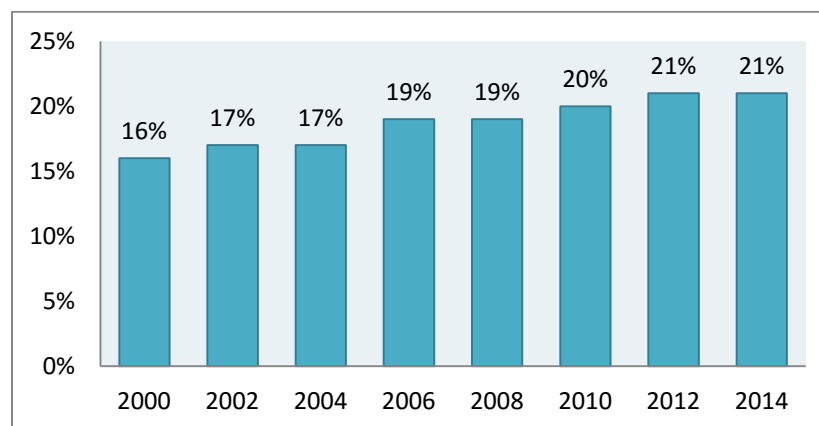
### 1.1 Generalidades sobre el Virus de Inmunodeficiencia Humana

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el virus que provoca el caso más extremo de supresión inmunitaria causada por un patógeno, lo que conduce a una pérdida gradual de la competencia inmunitaria de la subpoblación de células portadoras del marcador CD4 y provoca un deterioro progresivo del sistema inmune.

Clínicamente se caracteriza por una infección asintomática durante un período variable debido al equilibrio entre la replicación viral y la respuesta inmunológica del paciente; sin embargo, eventualmente este equilibrio se rompe aumentando la carga viral lo que lleva a la aparición de diversas infecciones que eventualmente progresan al síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA)<sup>[6]</sup>.

#### 1.1.1 Prevalencia y mortalidad del Virus de Inmunodeficiencia Humana en México

Según estimaciones realizadas por ONUSIDA-CENSIDA, a finales de 2015 existían 190 mil adultos viviendo con VIH en México, de los cuales 36 000 (21%) fueron mujeres. Dicha proporción ha crecido de manera sostenida en los últimos años, ya que en el 2000 las mujeres representaban únicamente el 16% de las infecciones<sup>[1]</sup>.

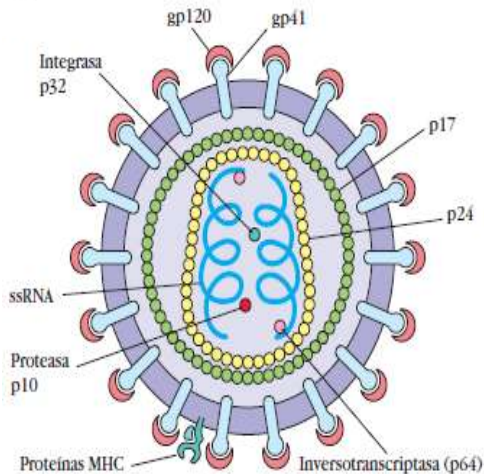


**Figura 1.** Estimación del porcentaje de mujeres que viven con VIH en México, 2000-2014<sup>[1]</sup>.



### 1.1.2 Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El VIH pertenece a la familia *retroviridae* y se clasifica como un lentivirus. Este tipo de virus producen un largo periodo de latencia, replicación viral persistente y afectaciones a nivel sistémico <sup>[7]</sup>. El VIH es un retrovirus, cuya estructura se muestra en la *Figura 2*.



**Figura 2.** Estructura del VIH <sup>[7]</sup>

Cada partícula de virus contiene dos copias de RNA y enzimas esenciales que son necesarias para llevar a cabo la infección y replicación en una nueva célula. El genoma vírico se transcribe de manera inversa hacia DNA en la célula infectada mediante la *transcriptasa inversa* vírica, después el DNA es integrado en la célula hospedadora con la ayuda de la *integrasa* vírica. Las transcripciones de RNA que se producen a partir del DNA vírico para dirigir la síntesis de proteínas sirven como

RNAm para dirigir la síntesis de proteínas de nuevas partículas víricas que eventualmente se liberan de la célula con la capacidad de infectar otras células <sup>[6]</sup>.

### 1.2 Mecanismos de transmisión del VIH: un enfoque en la transmisión vertical

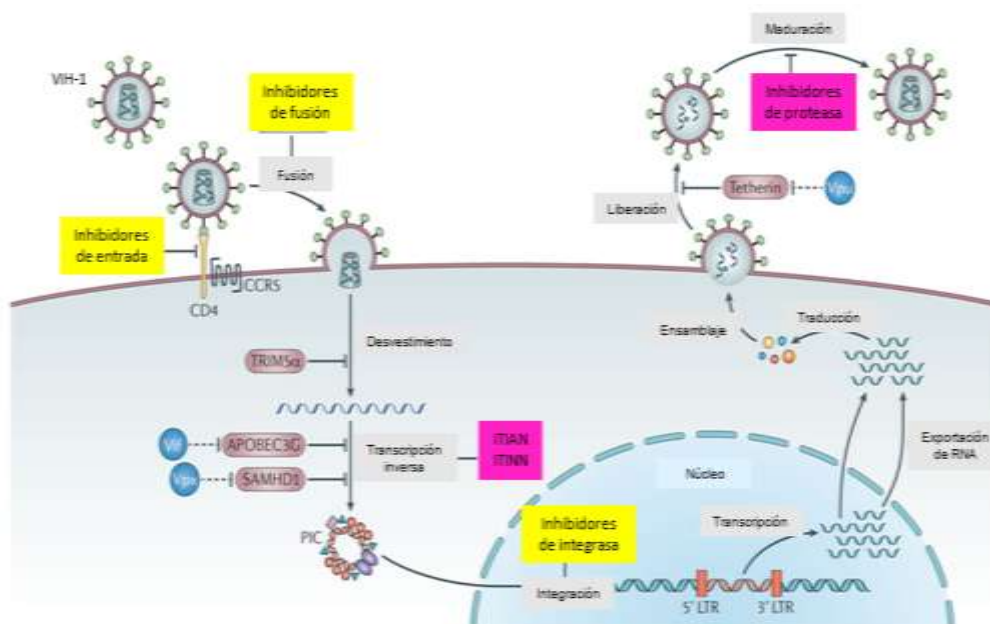
El VIH se transmite mediante el contacto sexual con una persona infectada, a través de la sangre en individuos que comparten agujas contaminadas y quienes reciben transfusiones de sangre o hemoderivados igualmente contaminados. Particularmente, la *transmisión vertical* es aquella que se transmite de la madre al hijo durante el embarazo, el parto, o la lactancia. En ausencia de algún tratamiento antirretroviral las tasas de transmisión varían de un 15%-45%, siendo esta la primer causa de infección por VIH en niños mientras que intervenciones eficaces permiten reducir la transmisión a niveles inferiores al 5% <sup>[1,2]</sup>.



### 1.3 Terapia Antirretroviral de Alta Actividad (TARAA) en el embarazo

Con el conocimiento de la estructura y el ciclo de replicación del virus, actualmente se emplea un régimen altamente activo que combina una serie de fármacos, al menos tres, que gracias a su acción sinérgica suprimen la replicación del virus de un modo máximo y duradero mejorando la calidad de vida y reduciendo la mortalidad hasta en un 70% [9]. Este régimen multifarmacológico se conoce como terapia antirretroviral de alta actividad (TARAA) y representa la terapia estándar en mujeres embarazadas con VIH [2].

Se conocen cinco mecanismos farmacológicos que tienen como blanco el bloqueo de un determinado proceso en el ciclo viral: inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN), inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINN), inhibidores de la proteasa (IP), inhibidores de entrada o fusión (IF) e inhibidores de la integrasa (II). (Ver Figura 3).



**Figura 3.** Blancos farmacológicos en el tratamiento de la infección por VIH [10].





Actualmente la recomendación por parte de las diferentes Guías Internacionales en mujeres embarazadas infectadas con VIH es administrar dos ITIAN con un IP o un ITINN <sup>[8,9]</sup>. Particularmente la combinación Combivir<sup>®</sup> (ZDV/LMV 300 mg/150 mg) Kaletra<sup>®</sup> (LPVr 400 mg/100 mg) es la sugerida, no obstante, la elección de la terapia más adecuada se basa en la eficacia, toxicidad, así como el riesgo teratogénico para el recién nacido. En este sentido, la FDA ha clasificado a estos medicamentos en la categoría C de riesgo teratogénico en el embarazo, es decir, no se han realizado estudios controlados en mujeres embarazadas por lo cual estos medicamentos solo deben administrarse si el beneficio justifica y supera el riesgo potencial en el feto <sup>[8]</sup>.

### **1.3.1 Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN) <sup>[10,11]</sup>**

Los ITIAN son análogos de nucleósidos endógenos que carecen de un grupo hidroxilo. Una vez dentro de la célula son fosforilados por diversas enzimas celulares para convertirse en el análogo trifosfato correspondiente que es incorporado al DNA vírico por medio de la transcriptasa inversa del virus. Al carecer del grupo hidroxilo, el enlace 3'-5'fosfodiéster entre el trifosfato de nucleósido que se incorpora a la cadena creciente de ADN no puede formarse finalizando la elongación de la cadena viral creciente.

Este tipo de fármacos tienen buena biodisponibilidad oral y un tiempo de vida en circulación de una hora, aunque esos tiempos se triplican intracelularmente. La mayor parte se metaboliza por el hígado y se excreta por vía renal a través de la orina.

#### **a) Zidovudina (ZDV)**

Representa el primer fármaco análogo de la pirimida (3'azido-3'desoxitimidina) disponible para el tratamiento de la infección por VIH. Su uso está permitido en niños y adultos así como en la prevención de la transmisión vertical durante el embarazo.

#### **b) Lamivudina (LMV)**

Es el análogo de la citidina (2'-desoxi-3'-tiacidina) recomendada para el tratamiento contra la infección en combinación con ZDV. Este fármaco pone fin a la síntesis de la cadena pro-vírica de ADN e inhibe la transcriptasa inversa del VIH.



### 1.3.2 Inhibidores de la proteasa (IP) <sup>[10,11]</sup>

Todos los fármacos pertenecientes a este grupo son inhibidores reversibles de la proteasa del VIH, la enzima vírica responsable de la escisión de la poli proteína vírica en una serie de enzimas esenciales y proteínas estructurales. La inhibición impide que las estructuras víricas maduren y da lugar a la producción de viriones no infectantes.

Con respecto a su farmacocinética, la mayoría de los IP presentan escasa biodisponibilidad por vía oral, todos son sustratos de la isoforma CYP3A4 del citocromo P450, su metabolismo es extenso y una cantidad muy pequeña se elimina sin cambios por la orina. Estos fármacos se unen sustancialmente a la glicoproteína ácida y son eliminados por vía renal. Dentro de las interacciones farmacológicas, un problema común con los IP es que además de funcionar como sustratos de la isoforma CYP3A4, funcionan como potentes inhibidores para algunos fármacos que se metabolizan por esta vía de manera que pueden acumularse a niveles tóxicos. Además los inductores de estas isoformas pueden disminuir las concentraciones plasmáticas de estos fármacos a niveles subóptimos lo cual contribuye al fracaso del tratamiento.

#### a) Lopinavir (LPV)

Es un péptido inhibidor de la proteasa cuya biodisponibilidad intrínseca aumenta sustancialmente al incluir en la formulación una dosis baja de ritonavir. Como miembros de esta familia, LPV puede inhibir el metabolismo de otros fármacos por lo cual es importante monitorear su concentración y modificarla si es necesario o evitar su uso en conjunto con inhibidores enzimáticos.

#### b) Ritonavir (RTV)

Es un potente inhibidor de la isoforma CYP3A4, por lo que su administración conjunta es empleada como reforzador farmacocinético aumentando la concentración del IP utilizado ayudando a prevenir la aparición de resistencias.



En la Tabla 1 se presentan condensados los parámetros farmacocinéticos reportados en la literatura de los fármacos antes descritos.

**Tabla 1.** *Propiedades farmacocinéticas de los fármacos antirretrovirales* <sup>[4,11]</sup>.

Fármaco	Absorción	Distribución	Metabolismo	Eliminación
<b>ZDV</b> 300 mg b.i.d.	<b>C<sub>max</sub></b> : 2.29µg/mL <b>t<sub>max</sub></b> : 0.5-1 h	<b>Vd</b> : 1.4 a 1.7 L /kg adultos <b>Biodisponibilidad</b> : 65% <b>Unión a proteínas</b> : < 38% <b>t<sub>1/2</sub></b> : 0.8-1.2 h	Presenta <i>metabolismo de primer paso</i> hasta metabolitos inactivos	Vía renal <b>Cl</b> : 6.0 L/h
<b>LMV</b> 150 mg b.i.d.	<b>C<sub>max</sub></b> : 1.5-1.8µg/mL <b>t<sub>max</sub></b> : 1-1.5h	<b>Vd</b> : 0.9 a 1.7 L/kg <b>Biodisponibilidad</b> : 55% <b>Unión a proteínas</b> : <36% <b>t<sub>1/2</sub></b> : 6 h	68 a 71% sin cambios en orina	Vía renal <b>Cl</b> : 5.0 L/hr
<b>RTV</b> 100 mg b.i.d.	<b>C<sub>max</sub></b> : 0.89µg/mL en combinación LPV/r <b>t<sub>max</sub></b> : 4 a 6 h	<b>Vd</b> : 0.41 ± 0.25 L/kg <b>Unión a proteínas</b> : : 99% <b>t<sub>1/2</sub></b> 3-5 h	Inhibidor de CYP3A4 y se excreta menos del 3% sin cambios	Vía renal <b>Cl</b> : 2.1 mL/hr
<b>LPV</b> 400 mg b.i.d.	<b>C<sub>max</sub></b> : 9.6 ± 4.4µg/mL en combinación LPV/r <b>t<sub>max</sub></b> : 4 a 6 h	<b>Vd</b> : 0.41 ± 0.25 L/kg <b>Biodisponibilidad</b> : 37% <b>Unión a proteínas</b> : 99% <b>t<sub>1/2</sub></b> : 5-6 h	Se metaboliza completamente por el CYP3A4	Vía renal <b>Cl</b> : 1.4-1.6 mL/hr

\*b.i.d. dos veces al día; C<sub>max</sub>: concentración plasmática máxima; t<sub>max</sub>: tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima; Vd: volumen aparente de distribución; t<sub>1/2</sub>: tiempo de vida media; Cl: depuración o aclaramiento; LPV/r: combinación lopinavir/ritonavir.

### 1.3.3 Diferencias farmacocinéticas de TARAA durante el embarazo <sup>[2, 3,12]</sup>.

Es un hecho que la condición fisiológica inducida por el embarazo conduce a cambios significativos en la farmacocinética de los fármacos antirretrovirales, sugiriendo la existencia de una gran variabilidad de concentraciones plasmáticas, con lo cual la relación observada entre la eficacia o la toxicidad adquiere mayor relevancia. Algunos de estos cambios farmacocinéticos se mencionan a continuación:

- Un retardo en el vaciamiento gástrico debido al aumento en los niveles de progesterona tiende a afectar la absorción.



- La absorción se ve incrementada para los fármacos básicos que se encuentran en su forma no ionizada por efecto en el aumento del pH debido a la disminución en la producción de ácido gástrico.
- La distribución es modificada por el aumento de agua y grasas, los cuales incrementan el volumen de distribución de fármacos hidrofílicos y lipofílicos respectivamente.
- Los niveles de proteínas plasmáticas (albúmina y  $\alpha$ -glicoproteína ácida principalmente) se ven disminuidas durante el embarazo debido a la hemodilución, lo que afecta la unión a proteínas y en consecuencia se determina una mayor fracción de fármaco libre.
- La expresión de las diferentes isoformas del citocromo P450 durante el embarazo tienen efecto en el metabolismo de los IP e ITIAN. En éste sentido, algunos estudios farmacogenéticos para diversos fármacos metabolizados por este sistema en población mexicana han identificado diferentes polimorfismos en los genes que codifican para estas enzimas, poniendo de manifiesto que los mexicanos poseen un metabolismo deficiente mediado por CYP450 lo que se expresaría en mayores concentraciones de ciertos fármacos en comparación con otras poblaciones como la caucásica.
- El incremento en el flujo sanguíneo aumenta la excreción renal y la filtración glomerular.

Aunado a lo anterior las complicaciones relacionadas a los medicamentos, lo cual compromete la adherencia al tratamiento<sup>[9]</sup> en conjunto a los escasos estudios durante el embarazo, que *per se*, son realizados en poblaciones diferentes a la mexicana, muestran datos contradictorios que sugieren la necesidad de implementar técnicas que permitan monitorear las concentraciones plasmáticas a fin de profundizar sobre los efectos farmacocinéticos de estos fármacos durante el embarazo. En la Tabla 2 se enumeran algunos de estos estudios realizados en diferentes poblaciones y las diferencias encontradas en los parámetros farmacocinéticos en las diferentes etapas de la gestación.



**Tabla 2. Estudios farmacocinéticos en mujeres embarazadas con VIH** <sup>[13-16]</sup>

Estudio	N	Esquema y población de estudio	Resultado	Significancia
Moodley J, <i>et al.</i> (1998)	20	LMV/ZDV (150mg/300mg b.i.d.) Sudáfrica	ABC: 4.93 y 5.082 µg/h/mL; C <sub>max</sub> : 1.31 y 1.21 µg/mL; t <sub>max</sub> : 1.0 y 1.5 h; Cl: 0.44 y 0.46 L/h/kg; t <sub>1/2</sub> 2.3 y 6.6 h durante la semana 38 de gestación y después del parto respectivamente	No existe diferencia en los parámetros farmacocinéticos de mujeres embarazadas con VIH bajo el régimen de dosificación LMV/ZDV a las 38 semanas de gestación y después del parto.
Stek A, <i>et al.</i> (2006)	17	LPV/RTV (400mg/100mg b.i.d.) E.U.A	Disminuye el ABC <sub>0-12</sub> durante el tercer trimestre de embarazo, en comparación con ABC <sub>0-12</sub> después del parto. C <sub>max</sub> y C <sub>12</sub> también disminuyen durante el embarazo.	Sólo el 18% de las pacientes embarazadas alcanzó la C <sub>min</sub> estimada en adultos no embarazadas.
Manavi, <i>et al.</i> (2007)	26	LPV/RTV (400mg/100mg b.i.d.) + ZDV/LMV (300 mg/150 mg) b.i.d. Reino Unido	4 mujeres (15.4%) presentaron niveles subterapéuticos de LPV y una carga viral de menos de 50 copias/ml.	La exposición de LPV se reduce durante el embarazo, a pesar de que las pacientes presentan niveles indetectables de carga viral.
Best, B, <i>et al.</i> (2010)	33	LPV/RTV (533 mg/133 mg b.i.d.) E.U.A.	ABC de LPV: 72.96 y 133 µg h/mL y C <sub>min</sub> : 3.4, 4.9, y 6.9 µg/mL durante el segundo trimestre (n = 11), tercer trimestre (n = 33), y después del parto (n = 27) respectivamente.	Un aumento de la dosis durante el tercer trimestre proporciona las C <sub>min</sub> durante el embarazo similares a las observadas en mujeres adultas no embarazadas con un régimen LPV/r (400/100 mg b.i.d.)

\*\* b.i.d. dos veces al día; C<sub>max</sub>: concentración plasmática máxima; ABC<sub>0-t</sub>: área bajo la curva desde la administración hasta el tiempo t; C<sub>min</sub>: concentración mínima.



Como se observa, los cambios farmacocinéticos se van acentuando a medida que el embarazo progresa, sobre todo durante el tercer trimestre donde las concentraciones pueden presentar niveles subterapéuticos como se muestra en el estudio de Steck y Manavi <sup>[14,15]</sup>. En tales situaciones, el monitoreo terapéutico de fármacos (MTF) se convierte en un factor importante ya que la farmacocinética de los antirretrovirales durante el embarazo es compleja e impredecible, por lo que la determinación de las concentraciones en plasma puede aportar información relevante sobre los niveles sistémicos alcanzados, su distribución y su asociación con la respuesta terapéutica con la finalidad de aportar herramientas de apoyo para el médico tratante y la toma de decisiones ante un posible ajuste de dosis para prevenir eventos adversos y formular dosificaciones óptimas para este tipo de población <sup>[4,16]</sup>.

#### **1.4 Metodologías analíticas para la cuantificación de fármacos antirretrovirales en plasma**

La medición precisa de los niveles plasmáticos de los fármacos es crucial para el análisis farmacocinético y farmacodinámico; así como para el MTF en aquellos fármacos donde existe una asociación entre las concentraciones plasmáticas y la respuesta terapéutica. Conjuntamente resulta un marcador útil para la evaluación del cumplimiento a la terapia durante el embarazo <sup>[3,4]</sup>.

Para alcanzar dicho objetivo resulta imprescindible el desarrollo y validación de métodos de análisis, cuyo objetivo principal es que el resultado reportado concuerde con el propósito requerido. Indiscutiblemente para obtener resultados confiables es esencial el desarrollo de un método analítico, bien caracterizado y totalmente validado para cuantificar el fármaco en la matriz biológica adecuada.

Bajo este contexto, la tecnología disponible para desarrollar este tipo de métodos ha evolucionado constantemente, de manera que en años recientes se han reportado metodologías analíticas para la cuantificación individual o por grupo farmacológico de la TARAA empleando diversas tecnologías que van desde Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplada a UV/Vis (HPLC-UV/Visible, por sus siglas en inglés), Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas (LC-MS) y más



recientemente Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas en tándem (UPLC-MS/MS)<sup>[5]</sup>.

En la Tabla 3 se muestran algunos de los métodos desarrollados para la determinación de los fármacos antirretrovirales incluidos en la TARAA. Se pueden visualizar las diferentes condiciones cromatográficas y de detección empleadas, así como la sensibilidad de los fármacos pertenecientes a la TARAA, el tiempo de análisis y la técnica de extracción empleada para su cuantificación.



**Tabla 3. Métodos bioanalíticos para la determinación de los fármacos antirretrovirales** <sup>[17-24]</sup>

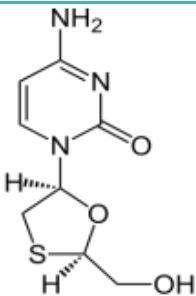
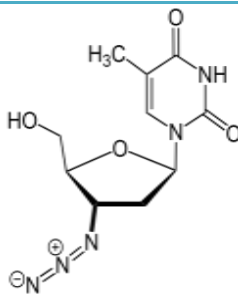
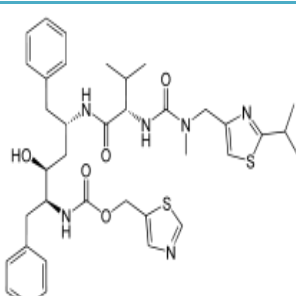
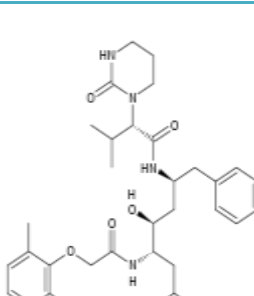
Fármacos identificados y rango de concentración	Condiciones de detección	Condiciones cromatográficas			Método de extracción	Ref.
		Columna	Fase móvil y condiciones de elución	Tiempo de corrida		
LMV: 50-3000 ng/mL	HPLC-UV a 270 nm	C8 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm)	Fosfato de sodio 10 mM, ACN, MeOH 94:3:3 (v/v/v)	12 min	Precipitación de proteínas	Kano, <i>et al.</i> (2005)
RTV, LPV, LMV y ZDV: 5-500 ng/mL (17 fármacos ITIAN, ITIIN e IPs)	LC-MS/MS ES+ y ES-	C18 (50 mm x 2.1 mm, 5 µm)	0.05% ácido fórmico en agua + MeOH en gradiente a 0.5 mL/min	17 min	Extracción Líquido-Líquido + Precipitación de proteínas	Jung, <i>et al.</i> (2007)
RTV: 5-2500 ng/mL LPV: 30-15000 ng/mL (12 fármacos IPs)	LC-MS ES+	C18 (150mm x 2.1 mm, 3 µm)	0.05% ácido fórmico en agua + 0.05% ácido fórmico en ACN en gradiente	25 min	Precipitación de proteínas	D'Avolio, <i>et al.</i> (2007)
RTV: 3-1450 ng/mL LPV: 30-14 500 ng/mL	UPLC-MS/MS ES+	BEH C18 (50 mm x 2.1 mm, 1.7 µm)	Formiato de amonio 10mM, pH 4.0 y MeOH 10:90 (v/v) a 0.3 mL/min	1.2 min	Extracción en fase sólida	Yadav, <i>et al.</i> (2009)
RTV: 12.5-2000 ng/mL LPV: 62.5-10000 ng/mL ZDV: 40-6400 ng/mL LMV: 20-3200 ng/mL (7 fármacos ITIAN e IPs)	LC-MS/MS ES+	C18 (150 mm x 4.6 mm, 5 µm)	0.1% ácido fórmico en agua y 0.1% ácido fórmico en MeOH 20:80 (v/v) a 0.5 mL/min	13 min	Precipitación de proteínas + Extracción Líquido-Líquido	Zhang, <i>et al.</i> (2010)
ZDV: 25-4022 ng/mL LMV: 25-4024 ng/mL (3 fármacos ITIAN)	LC-MS/MS ES+	C18 (50 mm x 4.6 mm, 5 µm)	ACN/ 0.1% ácido fórmico en agua 76:24 (v/v) a 0.8 mL/min	3.5 min	Extracción en fase sólida	Matta, <i>et al.</i> (2012)
RTV: 8-2000 ng/mL LPV: 78-20,000 ng/mL (16 fármacos ITIAN, ITIIN e IPs)	UPLC-MS/MS ES+	HSS T3 (50 mm x 2.1 mm, 1.7 µm)	0.1% ácido fórmico en agua/0.1% ácido fórmico en ACN en gradiente a 0.6 mL/min	4.2 min	Precipitación de proteínas	Djerada, <i>et al.</i> (2013)





No obstante a la fecha, pocos son los métodos por LC-MS/MS que han sido reportados en la literatura para la cuantificación simultánea de la combinación de fármacos empleados en la TARAA durante el embarazo, esto debido posiblemente a la marcada diferencia entre las propiedades fisicoquímicas, la estructura y la variabilidad de concentraciones entre los distintos grupos farmacológicos. Dichas diferencias puede evidenciarse en la Tabla 4 donde se muestra una diferencia marcada entre grupos farmacológicos en el peso molecular, la solubilidad y el coeficiente de reparto.

**Tabla 4.** *Propiedades fisicoquímicas de los fármacos antirretrovirales.*

Fármaco	 <b>LMV</b> $C_8H_{11}N_3O_3S$	 <b>ZDV</b> $C_{10}H_{13}N_5O$	 <b>RTV</b> $C_{37}H_{48}N_6O_5S_2$	 <b>LPV</b> $C_{37}H_{48}N_4O_5$
<b>Peso molecular</b>	229.3 g/mol	267.24 g/mol	720.94 g/mol	628.80 g/mol
<b>Solubilidad en agua</b>	70 mg/mL	20,1 mg/mL	0.0018 mg/mL	0.00192 mg/mL
<b>LogP</b>	-1.4	0.05	3.9	3.91
<b>pka</b>	14.29	9.96	13.68	13.39

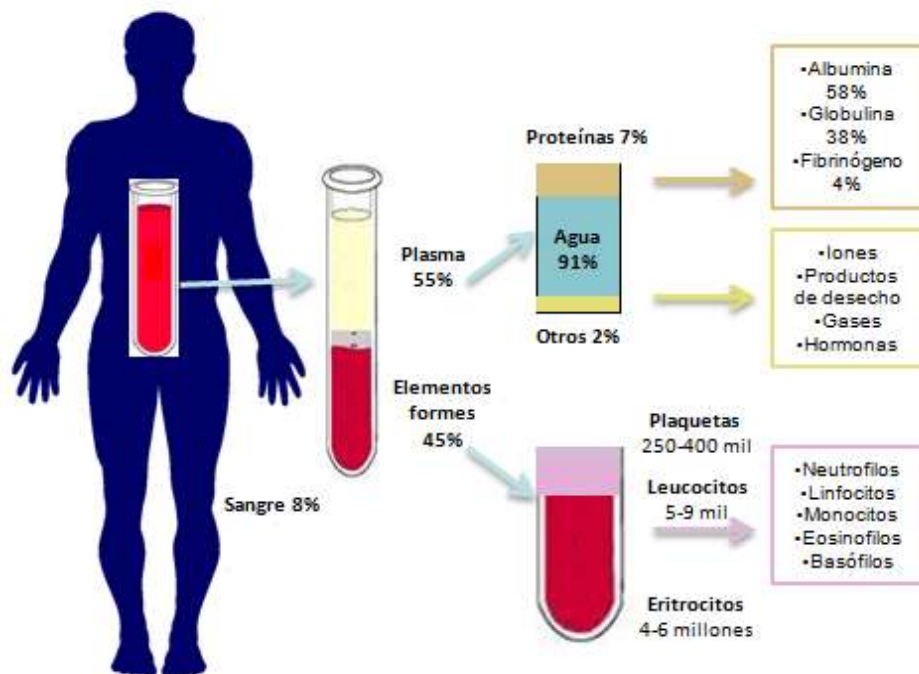
Fuente: <http://www.chemicalize.org/>; <http://www.drugbank.ca/>

Por lo tanto, el desarrollo de un método analítico que sea capaz de cuantificar de manera simultánea, precisa, selectiva y con la sensibilidad necesaria los diferentes fármacos antirretrovirales pertenecientes a la TARAA en un solo procedimiento se convierte en una tarea primordial.



## 1.5 Composición del plasma sanguíneo

Dentro de la composición sanguínea, el plasma representa la parte líquida donde se encuentran disueltos una gran variedad de solutos. Es un líquido amarillento que se obtiene después de sedimentar, mediante centrifugación los elementos formes de la sangre no coagulada. Está compuesto por agua en su mayoría (90%) y disuelta en ella, se encuentran sales, compuestos orgánicos no proteicos como lípidos, glucosa, vitaminas, gases y proteínas, las cuales representan la mayor parte (5 -8 g/dL)<sup>[25]</sup>.



**Figura 4.** Composición del plasma sanguíneo<sup>[25]</sup>

La preparación de la muestra es fundamental para garantizar la sensibilidad y reproducibilidad del ensayo. El propósito de la extracción es la remoción de los componentes endógenos a partir de la matriz biológica que pudieran interferir con la señal cromatográfica, contaminar la columna cromatográfica o causar el fenómeno de supresión iónica. Para lograr este objetivo es necesario seleccionar un método de extracción óptimo.



## 1.6 Métodos de extracción de fármacos a partir de plasma

Algunas de las técnicas comúnmente empleadas para la extracción de fármacos a partir de plasma se describen en la Tabla 5:

**Tabla 5.** *Métodos de extracción de fármacos a partir de plasma* <sup>[5,26-28]</sup>.

	Fundamento	Ventajas	Desventajas
<b>Precipitación de proteínas</b>	Las proteínas se vuelven insolubles mediante la adición de un solvente orgánico, modificación del pH o temperatura. La adición de un solvente incrementa las fuerzas de atracción entre cargas opuestas debido a que el solvente presenta una constante dieléctrica menor a la del agua, la cual es desplazada por el solvente disminuyendo la solubilidad de las proteínas y en consecuencia su precipitación.	Rápido, de bajo costo y dispone de una diversidad de agentes precipitantes	Solo es efectivo para la remoción de proteínas, por lo que otros componentes endógenos de la matriz pueden interferir con el análisis. No concentra la muestra por lo que la sensibilidad en analitos a bajas concentraciones podría verse afectada.
<b>Extracción líquido-líquido</b>	La distribución del compuesto entre dos disolventes inmiscibles. El éxito de este método depende de la diferencia de solubilidad y la afinidad del compuesto a uno de los disolventes. Una vez extraído, el compuesto debe recuperarse evaporando el disolvente o mediante el uso de agentes desecantes.	Permite la concentración de los analitos eliminando interferencias, es eficiente y ligeramente selectivo.	La elección del disolvente que sea capaz de solubilizar la mayor cantidad de analito sin las impurezas que lo acompañan es complicada. Requiere un mayor número de pasos por tanto, una mayor manipulación de la muestra y el riesgo de formar emulsiones.
<b>Extracción en fase sólida</b>	El analito de interés es extraído mediante la interacción con un adsorbente y el resto de los componentes son desechados con un disolvente que no interfiera con la retención del analito de interés para al final obtener un concentrado con el analito en un disolvente adecuado. Emplea metodologías específicas según la naturaleza del compuesto a extraer.	Se obtienen extractos selectivos y concentrados del analito con alto porcentaje de recobro mejorando la detección y el análisis.	Son difíciles de optimizar, requiere de equipos especiales y los cartuchos son costosos. Algunas veces el procedimiento requiere un pretratamiento lo que deriva en un mayor número de pasos.



## 1.7 Consideraciones generales de la cromatografía de líquidos como método de separación <sup>[29-31]</sup>.

La cromatografía es una técnica que permite la separación de analitos que se encuentran en una mezcla a través de un proceso de distribución entre dos fases. Los componentes de la mezcla son transportados a través de una fase móvil e interaccionan con la fase estacionaria, la cual se mantiene fija en una columna o lecho cromatográfico. Debido a la diferencia de distribución y afinidad por la fase estacionaria, los componentes eluyen a diferente velocidad, de tal forma que aquellos que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de fase móvil, mientras que los que se retiene débilmente avanzan con más rapidez.

La cromatografía de líquidos en su modalidad de fase reversa ha resultado ser una herramienta muy poderosa y eficiente para la separación de mezclas debido a su idoneidad para la separación de especies no volátiles, termolábiles, sensibilidad y sobre todo sus múltiples aplicaciones, por lo cual de todos los métodos analíticos e instrumentales la cromatografía es la que tiene el mayor campo de aplicación permitiendo la separación, identificación y cuantificación de mezclas complejas.

Un cromatógrafo de líquidos consta de una serie de elementos indispensables: suministro de fase móvil, bombas de alta presión, sistema de inyección, columna y detector (*Figura 5*).

1) **Sistema de suministro de fase móvil:** Contiene los disolventes elegidos para la separación cromatográfica filtrados y desgasificados.

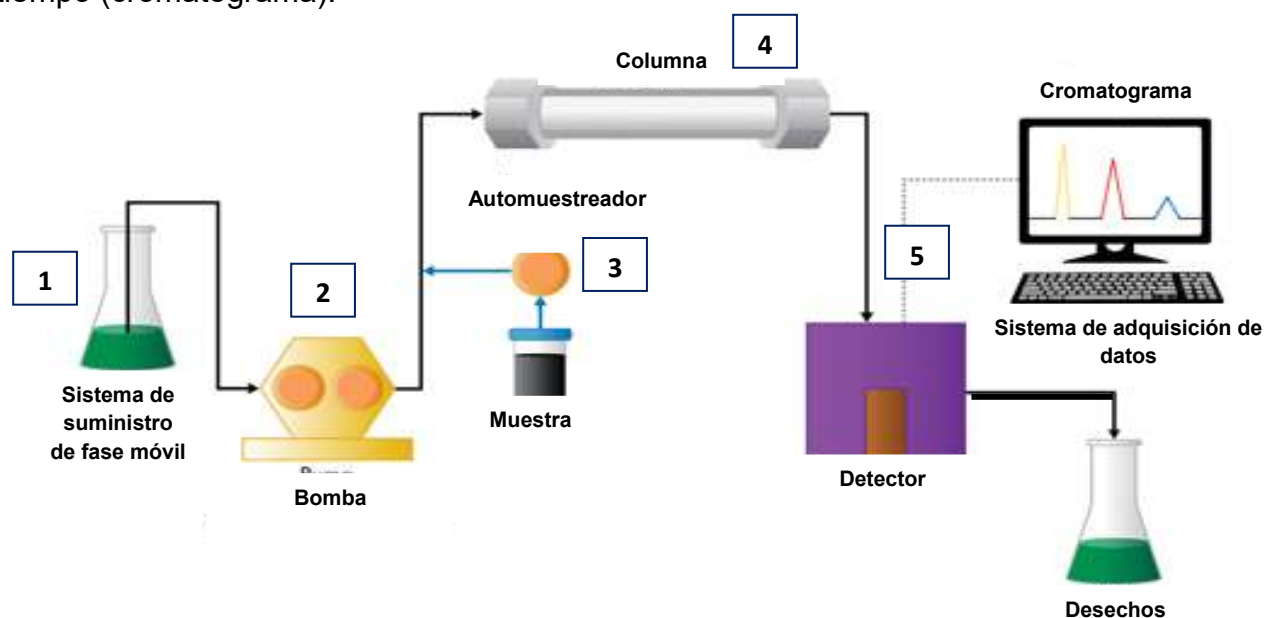
2) **Bombas:** Se encarga de succionar la fase móvil y tiene la capacidad para trabajar a altas presiones, lo que genera el caudal para realizar la mezcla de la composición de la fase móvil que se indique. Si la elución es isocrática (fase móvil constante) se utiliza un solo canal de disolvente. Si la elución es en gradiente (la composición de la fase móvil se va modificando a lo largo del tiempo durante la separación) normalmente se necesita una bomba con un sistema de dosificación para cada uno de los eluyentes.



**3) Sistema de inyección:** Se encarga de introducir y tomar volúmenes exactos de la muestra sin tener que parar el flujo. Son automáticos y de volumen variable.

**4) Columna:** La columna o fase estacionaria consiste en una matriz porosa e insoluble, en su mayoría sílice, mecánicamente resistente a la que se le han unido químicamente silanoles (SiOH) y grupos funcionales que le confieren una hidrofobicidad y una interacción química diferente. Es en la fase estacionaria donde se lleva a cabo la separación cromatográfica, por lo cual su correcta elección en función del tipo de analitos a separar determina el tipo de interacción molecular que se llevará a cabo <sup>[30]</sup>. Las columnas C8 y C18 son consideradas columnas de primera elección para la separación cromatográfica debido su amplio rango de pH y múltiples aplicaciones, no obstante existen otro tipo de columnas que incorporan diferentes ligandos que proveen una selectividad alternativa dependiendo la naturaleza de los compuestos a identificar.

**5) Detector:** El detector responde a alguna propiedad característica de los compuestos a analizar. El cromatógrafo de líquidos se puede acoplar a diversos tipos de detectores como UV/Visible, fluorescencia, arreglo de diodos y más recientemente espectrometría de masas. Estos transforman la señal en una representación gráfica en función al tiempo (cromatograma).



**Figura 5.** Representación de los componentes de un sistema de cromatografía de líquidos <sup>[31]</sup>.



### 1.7.1 Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Eficiencia (UPLC) <sup>[31-33]</sup>.

El análisis por cromatografía de líquidos ha evolucionado constantemente con la finalidad de lograr separaciones más rápidas, sensibles y con un incremento en la resolución introduciéndonos a la Cromatografía Líquida de Ultra Alta Eficiencia (UPLC<sup>®</sup> por sus siglas en inglés).

La metodología de separación convencional mediante HPLC ofrece ventajas como la robustez, la facilidad de uso y la selectividad, sin embargo su principal limitación es la falta de eficiencia debido a los bajos coeficientes de difusión en fase líquida y la lenta difusión de los analitos en la fase estacionaria.

La tecnología UPLC<sup>®</sup> emplea columnas con un material de empaque menor a 2  $\mu\text{m}$  que mejora la velocidad, resolución y sensibilidad del análisis incrementando la eficiencia de la separación cromatográfica. La capacidad del sistema para suministrar un caudal de fase móvil a alta presión y con una mínima dispersión, produce picos más estrechos que incrementan el rendimiento, reducen el consumo de disolventes así como el tiempo de las corridas analíticas.

El mecanismo de la separación puede describirse mediante la ecuación de *Van Deemter*, la cual describe la influencia del caudal en la fase móvil y la eficiencia de la columna. Esta ecuación relaciona la altura equivalente de plato teórico (H) con la velocidad lineal media de la fase móvil (v):

$$H = A + \frac{B}{v} + Cv$$

Se comprueba que para cada columna existe un caudal óptimo, correspondiente al mínimo de la curva representativa de la ecuación donde se obtiene la máxima eficacia de la separación. (ver *Figura 6*)

A, B y C son constantes que contribuyen al ensanchamiento de banda disminuyendo la eficacia de la separación y se describen a continuación:

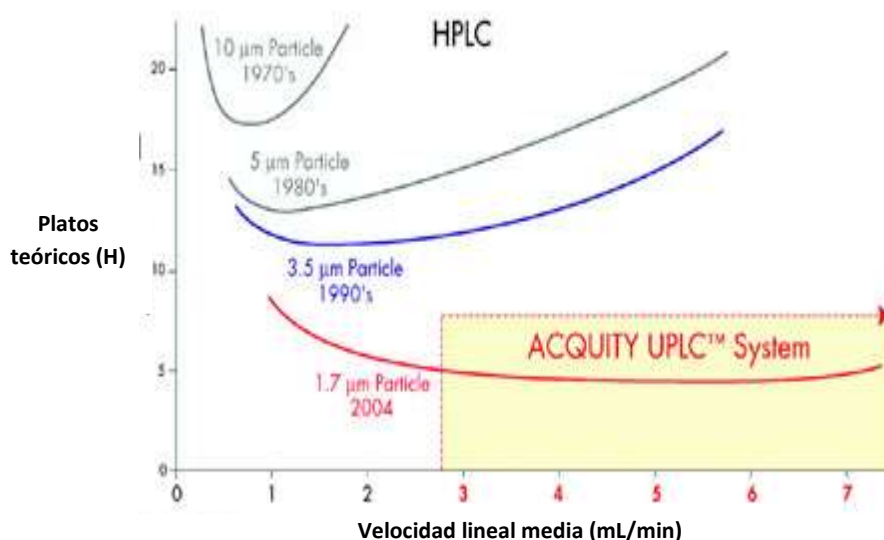


- **Difusión turbulenta (A):** El tamaño de partícula de la fase estacionaria, su distribución por tamaños y su irregularidad originan la formación de diversos caminos preferentes. Al disminuir el tamaño de partícula se recorren trayectorias uniformes.

- **Difusión longitudinal ( $B/v$ ):** El soluto tiende a difundir hacia los bordes de la zona, cuanto menor es el caudal de fase móvil mayor es el ensanchamiento por difusión.

- **Transferencia de masa ( $C_v$ ):** El soluto requiere cierto tiempo para transferirse entre ambas fases, cuando el caudal es demasiado rápido no puede alcanzarse el equilibrio.

Por lo tanto es posible incrementar la resolución y la velocidad de análisis sin afectar el rendimiento cromatográfico empleando una nueva metodología de análisis con una mayor capacidad de separación donde la eficiencia es proporcional a la longitud de columna e inversamente proporcional al tamaño de partícula.



**Figura 6.** Rango óptimo de trabajo según la ecuación de van Demter para columnas con diferente tamaño de partícula.

## 1.8 Acoplamiento a detectores de espectrometría de masas <sup>[34,35]</sup>.

Mientras la cromatografía de líquidos combina el poder de separación de diversas mezclas de compuestos con gran eficiencia, la espectrometría de masas tiene la capacidad de detectar selectivamente la identidad molecular del compuesto.



La asociación de ambas técnicas analíticas permite llevar a cabo análisis más sensibles y específicos en menor tiempo empleando un volumen menor de muestra.

La espectrometría de masas es una técnica analítica de alta sensibilidad y especificidad que permite determinar la composición molecular de una gran variedad de compuestos a través del análisis de iones determinando su relación masa-carga ( $m/z$ ). Los compuestos ionizados son acelerados y seleccionados a través de un campo eléctrico-magnético en condiciones de vacío donde finalmente son detectados.

Los espectrómetros de masas constan de cuatro partes básicas: el sistema de introducción de la muestra, la fuente de ionización, el analizador de iones y el detector.

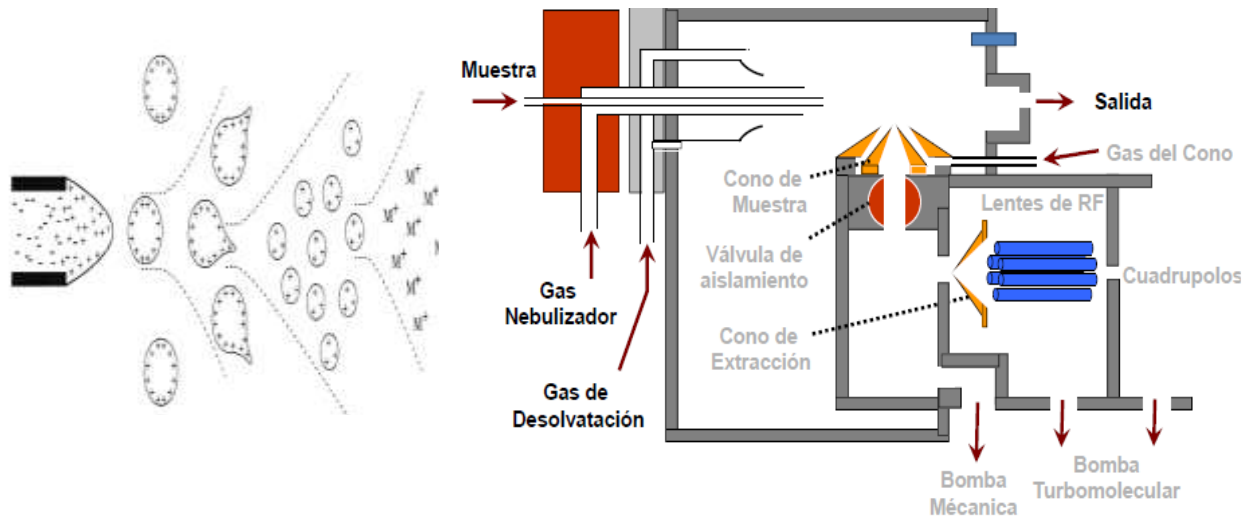
- 1) **Introducción de la muestra:** La muestra puede provenir del sistema cromatográfico o bien a partir de la infusión directa lo que permite realizar el ajuste y la optimización del espectrómetro de masas (*tunning*).
- 2) **Fuente de ionización:** En esta se originan los iones a partir de la muestra. La técnica de ionización a presión atmosférica mediante electrospray (ESI) permite el análisis de moléculas no volátiles y termolábiles mediante la formación de iones en solución mediante la aplicación de altos voltajes y un flujo de nitrógeno de manera que el eluyente se convierte en un aerosol cargado (ver *Figura 7*).

En general, ESI comprende tres etapas: formación de gotas cargadas, evaporación del solvente (fisión de la gota) y la formación de los iones en fase gaseosa. El flujo proveniente del cromatógrafo de líquidos entra en la interfase a través de la sonda capilar mediante la aplicación de altos voltajes y en presencia de un gas de desolvatación de manera que el flujo se convierte en un aerosol cargado en función del potencial aplicado al capilar. El flujo de nitrógeno ayuda a la evaporación del disolvente a través de la fuente y como consecuencia las gotas emitidas por el capilar de electrospray disminuyen su tamaño mientras la carga de la gota permanece constante. La disminución del radio de la gota a carga constante supone un aumento de la repulsión de cargas en la superficie de la gota que supera la tensión superficial y produce la ruptura de ésta. Esta secuencia se repite muchas veces formando gotas en





forma de spray que dirigen a los iones a través del cono de muestra, cono de extracción y las lentes RF (octopolo) hasta el analizador mediante la aplicación de voltajes y diferencias de presión.



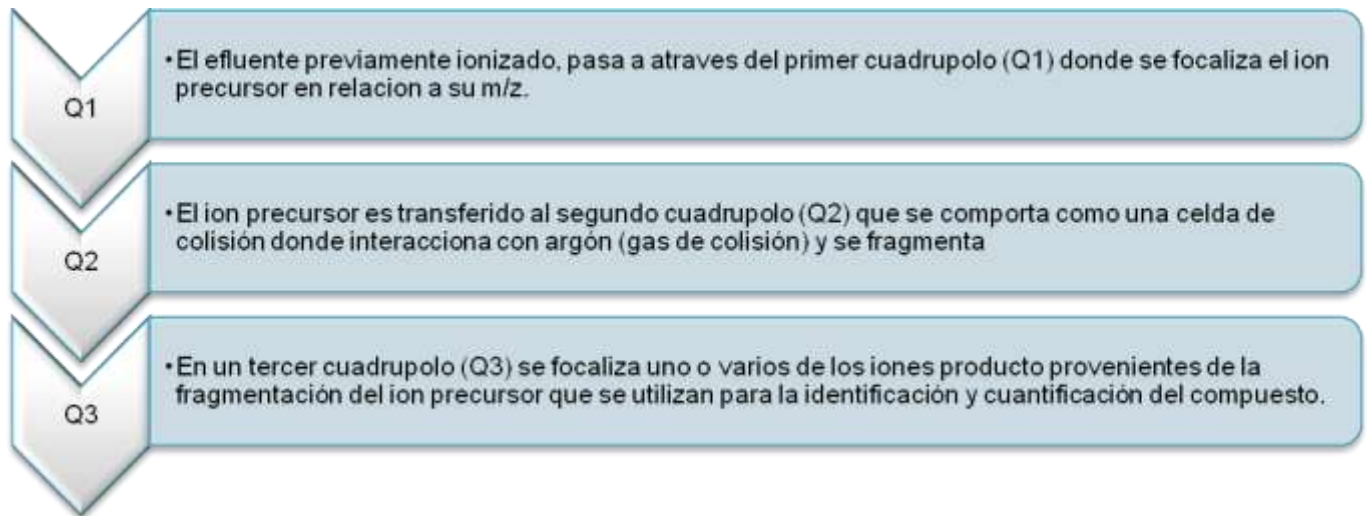
**Figura 7.** Formación de gotas cargadas por ESI y fuente de ionización.

Una vez ionizada la molécula de interés, esta es filtrada en relación a su  $m/z$ . Los equipos de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) tienen la capacidad de analizar de manera secuencial una muestra mediante su fragmentación, obteniendo información estructural de la molécula de interés. Lo anterior le confiere a la técnica un alto grado de especificidad.

3) **Analizador de iones:** Se encarga de separar los iones de acuerdo a su relación  $m/z$ . Para este estudio, el analizador es de triple cuadrupolo.

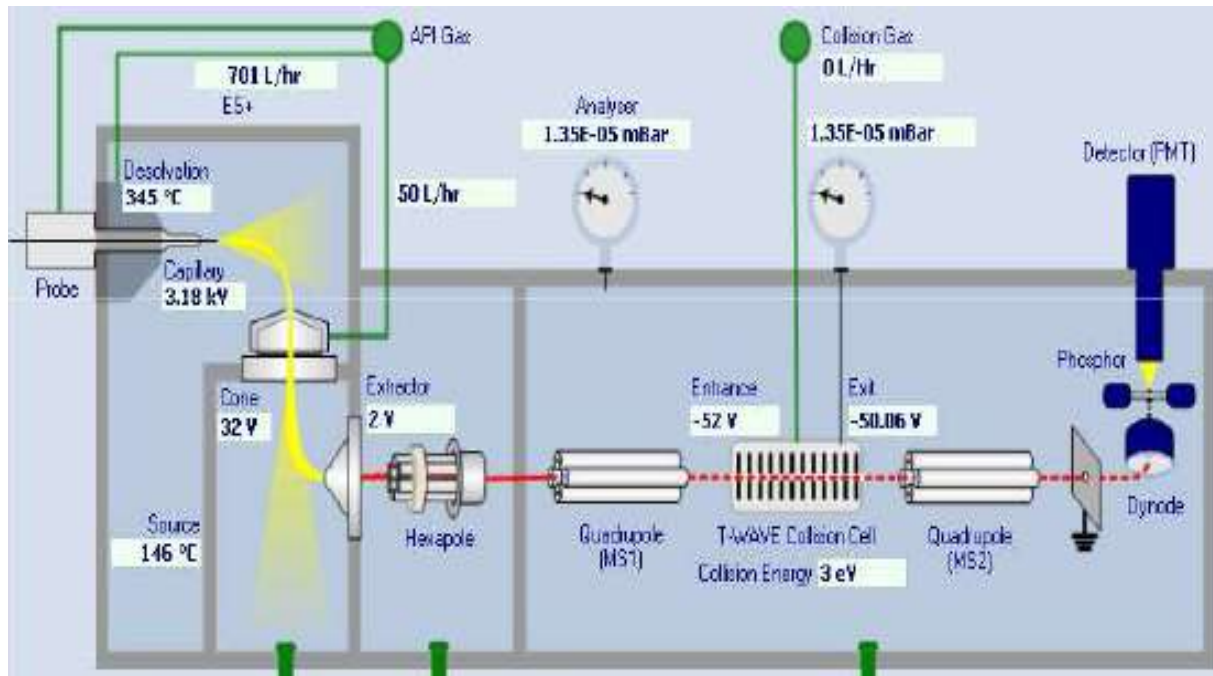
Este tipo de analizador está formado por cuatro electroimanes que generan campos eléctricos oscilantes, los cuales interactúan con los iones y los separan según su relación  $m/z$ . Para las condiciones de voltaje introducidas en el equipo, solo los iones con determinada relación  $m/z$  adquieren una trayectoria estable a través del filtro del cuadrupolo.

El analizador de triple cuadrupolo funciona como se describe a continuación:



4) **Detector dinolito:** Los iones separados son caracterizados y generan una señal eléctrica proporcional a la intensidad de iones en la muestra, la cual es amplificada y detectada por el fotomultiplicador y un dínodo de conversión de alto voltaje para conseguir alta sensibilidad, tanto en modo positivo como en modo negativo. Cada uno de los iones es detectado y representado en un espectro de masas de acuerdo a su abundancia relativa. En un espectro de masas, el pico más intenso es conocido como pico base y se le asigna arbitrariamente una abundancia del 100%. La abundancia del resto de los iones se asigna comparando su proporción contra la del pico base. Las señales de estos fragmentos proporcionan información acerca de la estructura de la molécula precursora.

El objetivo del desarrollo por espectrometría de masas fue evaluar la respuesta del compuesto mediante su relación  $m/z$ , así como desarrollar una metodología de monitoreo de reacción múltiple (MRM) la cual filtra los iones seleccionados y tiene la capacidad de monitorear simultáneamente fragmentaciones definidas para la detección de los analitos de interés. En esta etapa fue necesario evaluar la forma de ionización de acuerdo a la estructura química de los compuestos, esta podía ser en modo positivo si en la estructura existían sitios susceptibles a protonación, o bien, en modo negativo si estos eran susceptibles a quedar cargados negativamente.



**Figura 8.** Esquema del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo

Las ventajas que se obtienen al realizar análisis mediante UPLC-MS/MS son:

- ✓ Selectividad, resolución y sensibilidad del equipo.
- ✓ Empleo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) como método para la cuantificación simultánea de diferentes compuestos.
- ✓ Incremento de la especificidad en la detección.
- ✓ Incrementa la relación señal/ruido (S/N), con lo cual los análisis son más sensibles y los límites de cuantificación alcanzan el orden de picogramos (pg).
- ✓ Se enfoca en los iones de interés y no en estar adquiriendo datos.
- ✓ Emplea menores volúmenes de muestra por análisis.

Las limitaciones que se deben tomar en consideración son:

- ✓ Solo es posible diferenciar entre compuestos con una diferencia de 1.0 Da.
- ✓ Si no hay una adecuada limpieza de la muestra se corre el riesgo de generar problemas de acarreo y/o supresión iónica que generan resultados imprecisos.
- ✓ El espectrómetro de masas no es compatible con fases móviles que contengan sales no volátiles.
- ✓ La disponibilidad del equipo es limitada.



## 1.9 Validación de métodos analíticos <sup>[36-41]</sup>

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados obtenidos por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método, se determina con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos, es decir, se demuestra mediante estudios de laboratorio y evidencia documentada que el procedimiento analítico permite la obtención de resultados exactos y precisos <sup>[36]</sup>.

Los parámetros que evaluarán el desempeño de este método analítico se encuentran establecidos en la Norma Oficial Mexicana (NOM-177-SSA1-2013) en la cual se especifican los parámetros que deben ser evaluados con sus respectivos criterios de aceptación y se describen a continuación:

- **Selectividad:** Es la capacidad del método para diferenciar al analito de interés de otros componentes presentes en la muestra que pudiesen interferir en la cuantificación por medio de la demostración de la no interferencia de compuestos endógenos en matriz biológica normal, lipémica y hemolizada. También evalúa el análisis en presencia de fármacos de uso común, anticoagulantes, etc.
- **Efecto matriz:** Los métodos desarrollados por espectrometría de masas tienen que evaluar si el efecto de alguno de los componentes de la matriz afecta la ionización de los analitos. Este fenómeno, observado a menudo como una reducción en la respuesta se conoce como supresión iónica y es causada por la presencia de solutos no volátiles que llegan a la fuente de ionización junto con los analitos de interés saturando la concentración y alterando la formación de las gotas cargadas en la interfase. <sup>[5,29]</sup> Para evaluar el efecto matriz se compara la respuesta analítica obtenida en la matriz con respecto a la respuesta en solución.
- **Efecto de acarreo:** El efecto de arrastre es un tipo de contaminación atribuido al remanente de la muestra analizada anteriormente que contiene una mayor concentración de analito que la muestra siguiente a esta. Representa uno de los problemas más importantes que compromete la exactitud y la precisión de los resultados. Este tipo de contaminación debe ser evaluado y eliminado durante el desarrollo del método ya que el remanente puede absorberse en los diversos



componentes del sistema cromatografico y comprometer los resultados durante la validación del método.<sup>[41,42]</sup>

- **Linealidad:** Es la capacidad del método, dentro de un determinado intervalo, de asignar una respuesta proporcional a la cantidad del analito que se busca determinar. Con el fin de determinar el rango lineal se realizan gráficos de concentración versus respuesta, de manera que la confiabilidad de estos son evaluados por medio del grado de relación entre la variable concentración (X) y la variable respuesta (Y). Para una curva de calibración, un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) cuyo valor se aproxime a uno, indica una probabilidad elevada de correlación entre los datos según el modelo elegido.
- **Límite inferior de la Curva (LIC):** Es la cantidad más baja de analito en la muestra que es posible determinar cuantitativamente con precisión y exactitud. El valor del LIC debe corresponder a un valor no mayor al 5% de la Cmax.
- **Precisión:** Es el grado de dispersión entre una serie de medidas obtenidas del muestreo múltiple de la misma concentración de muestra. Es expresado como el coeficiente de variación (%CV) y se evalúa como repetibilidad (cuando en un solo día se realizan análisis independientes bajo las mismas condiciones establecidas de muestras control) y como reproducibilidad (cuando hay variación en diferentes días, analistas, equipos, composición de la fase móvil) para asegurar que en cada análisis las muestras evaluadas serán confiables.
- **Exactitud:** Determina el grado de concordancia entre el valor medio obtenido a partir del método con respecto al valor de referencia determinado como el por ciento de desviación absoluta (%DEA).
- **Estabilidad:** Es la capacidad de una sustancia para conservar sus propiedades fisicoquímicas dentro de los límites especificados a lo largo de su periodo de almacenamiento o manipulación. Se evalúan las condiciones de tiempo, temperatura y almacenamiento en solución y en la matriz biológica antes, durante y después del procesamiento de la muestra.



### Justificación

La terapia antirretroviral de alta actividad (TARAA) en mujeres embarazadas es un recurso importante en el control de la transmisión vertical de la infección por VIH. TARAA involucra la combinación de cuatro fármacos antirretrovirales: lamivudina (LMV), zidovudina (ZDV), lopinavir (LPV) y ritonavir (RTV). Sin embargo, durante el embarazo los procesos farmacocinéticos (ADME) se modifican considerablemente, dando lugar a cambios significativos en las concentraciones plasmáticas, lo que pone en riesgo la seguridad y eficacia terapéutica.

Aunado a la escasa evidencia científica en este tipo de población surge la necesidad de desarrollar metodologías analíticas que permitan monitorear las concentraciones plasmáticas de esta combinación de fármacos a fin de profundizar sobre los efectos farmacocinéticos durante el embarazo.

Para cubrir este objetivo es indispensable el desarrollo y validación de un método analítico rápido, sensible y confiable que sea capaz de cuantificar simultáneamente esta combinación de fármacos en plasma humano. Bajo este contexto, la tecnología disponible para desarrollar este tipo de metodologías ha evolucionado para la cuantificación específica y sensible de estos fármacos mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Eficiencia acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS).



# Objetivos

### Objetivo general

Desarrollar y validar un método analítico eficiente, rápido y sensible para la cuantificación simultánea de LMV, ZDV, LPV y RTV en plasma humano empleando UPLC-MS/MS.

### Objetivos particulares

- Establecer las condiciones de detección, cromatográficas y un procedimiento de extracción a partir de plasma humano para desarrollar el método analítico mediante UPLC-MS/MS.
- Demostrar la confiabilidad del método analítico de acuerdo al cumplimiento de los criterios que establece la Norma Oficial Mexicana (NOM-177-SSA1-2013).
- Cuantificar las concentraciones mínimas en el estado estacionario de LMV, ZDV, LPV y RTV en muestras de plasma de mujeres embarazadas con VIH al tercer trimestre de embarazo.



### Desarrollo Experimental

La parte experimental se divide en tres apartados. En el primero se describe el desarrollo del método analítico mediante UPLC-MS/MS. El segundo apartado se refiere a la validación del método analítico y finalmente el tercer apartado presenta la aplicación clínica para la cuantificación simultánea de LMV, ZDV, LPV y RTV en muestras de pacientes VIH+ al tercer trimestre de embarazo.

#### 4.1 Materiales, equipos, reactivos y estándares de referencia

##### 4.1.1 Material

- Matraces volumétricos clase A (5 mL y 10 mL)
- Espátulas
- Frascos para fase móvil de 1000 mL
- Pipetas semiautomáticas (10-100  $\mu$ L y de 100-1000  $\mu$ L)
- Puntas para pipetas semiautomáticas
- Probetas 100 mL
- Tubos de microcentrífuga (2 mL)
- Sistema de filtración para fase móvil
- Membranas de nitrocelulosa para filtración de fase móvil, 2  $\mu$ m.
- Vasos de precipitados de 250 mL
- Insertos de vidrio con capacidad de 0.20 mL
- Viales para automuestreador de 2 mL

##### 4.1.2 Material Biológico

- 7 unidades de plasma humano fresco y congelado obtenido en el Banco de Sangre del Instituto Nacional de Perinatología.
- 1 unidad de plasma lipémico obtenida después de una ingesta rica en grasas y carbohidratos.





- 1 unidad de plasma hemolizado obtenida a partir de un voluntario sano y sometida a choque térmico.

#### 4.1.3 Equipos e instrumentos

- Cromatógrafo de Líquidos de Ultra Alto Rendimiento Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> H-Class System acoplado a detector de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) Xevo TQ-S.
- Sistema de procesamiento de datos *Maslynk* versión 14.1
- Columna ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C18 (2.1  $\mu\text{m}$  x 50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )
- Columna ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH Shield RP18 (2.1  $\mu\text{m}$  x 50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ )
- Baño de ultrasonido *Cole-Parmer*.
- Balanza semi-microanalítica *Sartorius*, 0.1 mg.
- Centrifuga eppendorf 5804 R, rotor GE008.
- Sistema de Purificación de Agua *Milipore Synergy UV*.
- Agitador vórtex IKA MS3.

#### 4.1.4 Reactivos

- Metanol (MeOH) grado cromatográfico, J.T. Baker<sup>®</sup>
- Acetonitrilo (ACN) grado cromatográfico, J.T. Baker<sup>®</sup>
- Isopropanol grado cromatográfico J.T. Baker<sup>®</sup>
- Ácido fórmico (AF) grado cromatográfico para espectrometría de masas marca Fluka, Sigma Aldrich<sup>®</sup> (> 98%).
- Agua desionizada grado MiliQ, 18,2 M $\Omega$ .cm a 25 °C.
- Acetato de amonio. Cristales J.T. Baker<sup>®</sup>

#### 4.1.5 Estándares de Referencia

- Ritonavir 200 mg, Estándar Primario, USP, (99.2%). No. de lote: 1604803
- Lopinavir 350 mg, Estándar Primario USP, (99.8%). No. de lote: 1370101
- Lamivudina 200 mg, Estándar Primario USP, (99.7%). No. de lote: 1356836
- Zidovudina 400 mg, Estándar Primario USP, (99.0%). No. de lote: 1724500
- Simvastatina 200 mg, Estándar Primario USP, (99.5%). No. de lote: 159852



- Cafeína 200 mg, Estándar Primario USP, (100%). No. de lote: 1085003
- Paracetamol 400 mg, Estándar Primario USP, (100%). No. de lote: 1003009
- Naproxeno 200 mg, Estándar Primario USP, (100%). No. de lote: 1457301
- Ácido acetilsalicílico 125 mg, Estándar Primario USP, (100%). No. de lote: 1609002
- Bromuro de Butilioscina 125 mg, Estándar Primario USP, (100%). No. de lote: 1078201
- Maleato de Clorfenamina 125 mg, Estándar Primario USP, (100%). No. de lote: 400005163

#### **4.2 Desarrollo del método para la cuantificación de LMV, ZDV, LPV y RTV en plasma humano mediante UPLC-MS/MS.**

El desarrollo del método analítico mediante UPLC-MS/MS, como lo muestra el siguiente esquema, involucró una serie de pasos lógicos y bien esquematizados que permitieron hacer ajustes fácilmente rastreables, como primer punto se definieron las condiciones de detección por espectrometría de masas en tándem, una vez definidas se procedió a desarrollar las condiciones de separación cromatográficas y finalmente desarrollar una metodología apropiada de extracción a partir de plasma humano.



##### **4.2.1 Detección por espectrometría de masas (MS/MS)**

Se prepararon soluciones individuales de 500 ng/mL disueltas en MeOH: H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v) para LMV, ZDV y SMV mientras que LPV y RTV se disolvieron en ACN (100%). Se infundió cada compuesto a través del espectrómetro de masas a una velocidad de 10 µL/min.



La fuente de ionización utilizada fue electrospray (ESI), la cual permite el análisis de analitos que puedan cargarse positiva o negativamente en solución.

Cada uno de los fármacos se infundió en el modo positivo (ES+) y negativo (ES-) y se determinó su modo de ionización, masa del ión precursor y condiciones dependientes de la fuente (voltaje del capilar, voltaje del cono, temperatura y flujo del gas de desolvatación; así como el flujo del gas de cono). Estos parámetros permitieron caracterizar la señal precursora (ión padre).

Posteriormente se fragmentó cada fármaco con un voltaje de colisión característico lo cual le confirió una alta especificidad en la detección para cada compuesto (transición). Los fragmentos seleccionados para cada fármaco (ión hijo) provenían de la relación de señal más abundante a partir del ion precursor, las cuales debían mostrar un comportamiento gaussiano, una señal definida y estable de la mayor intensidad medida a partir del Conteo Total de Iones (TIC) del espectro de masas. El procedimiento llevado a cabo se muestra en el *Diagrama 1*.

Modo de ionización por ESI	•ES+ o ES-
Ión precursor	•Determinar la masa del ion precursor
Optimizar condiciones de la fuente	•Voltajes del capilar y del cono •Temperatura y flujo del gas de desolvatación
Encontrar transiciones	•Encontrar el ion producto a partir del ion precursor
Optimizar las transiciones	•Energía de colisión

**Diagrama 1.** Procedimiento para desarrollar el método por espectrometría de masas.



## **4.2.2 Separación cromatográfica mediante UPLC**

### **4.2.2.1 Preparación de soluciones**

Las soluciones y disolventes empleados como fase móvil se filtraron y desgasificaron en baño de ultrasonido por 15 min para evitar la formación de burbujas en el sistema cromatográfico.

### **4.2.2.2 Preparación de ácido fórmico al 0.1%**

Medir con probeta 500 mL de agua desionizada y adicionar 500  $\mu$ L de ácido fórmico. Ajustar a pH a  $2.9 \pm 0.5$ , filtrar y desgasificar.

### **4.2.2.3 Preparación de la solución de acetato de amonio 10mM**

Se pesaron 0.77 g de acetato de amonio y se disolvieron en agua desionizada ajustando a pH 6 y llevando al aforo hasta 1000 mL, filtrar y desgasificar.

## **4.2.3 Condiciones cromatográficas por UPLC**

Las condiciones cromatográficas se establecieron mediante la elección de posibles candidatos a fase estacionaria y fase móvil. Esta elección se basó principalmente en la naturaleza y la estructura química de los analitos. Considerando que los antirretrovirales evaluados son de dos diferentes familias cuya polaridad esta contrapuesta (LMV y ZDV grupo polar frente a LPV y RTV grupo no polar), se eligió evaluar dos tipos de columna C18 de las mismas dimensiones (2.1 $\mu$ m x 50 mm, 1.7  $\mu$ m). Una de ellas con carácter hidrofóbico intermedio: columna BEH Shield RP18 y la segunda, de carácter propiamente hidrofóbico: columna BEH C18. Conjuntamente se propusieron como modificador orgánico de la fase móvil: acetronitrilo y metanol considerando la solubilidad de los compuestos y como modificadores del pH: ácido fórmico 0.1%, pH: 2.95 y acetato de amonio 10 mM, pH: 6.

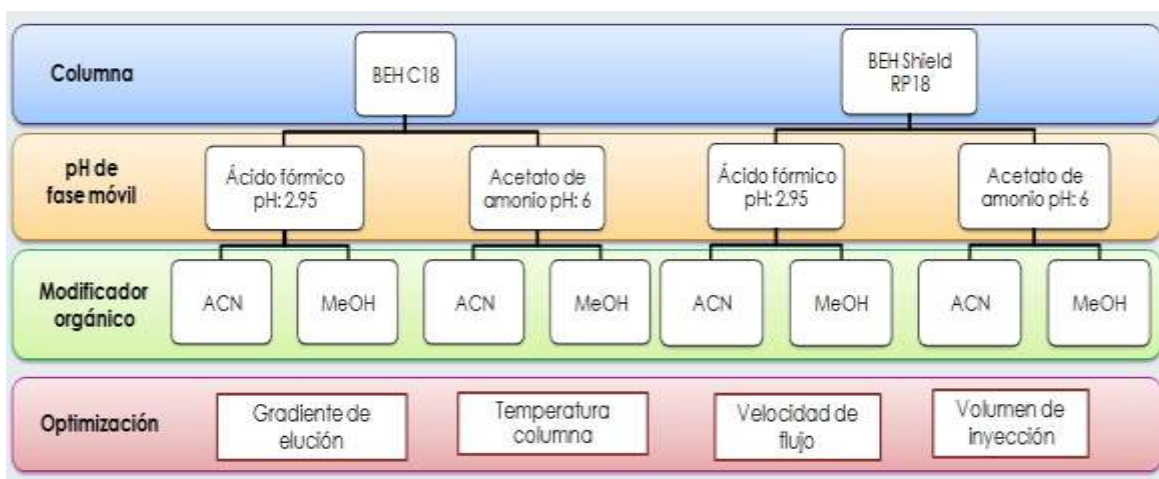


Se preparó una mezcla de los antirretrovirales con el candidato a EI (SMV) a una concentración de 100 ng/mL y se inyectaron en un gradiente que incrementaba gradualmente la parte orgánica en un tiempo de 5 minutos probando los diferentes modificadores orgánicos y de pH para la selección de la fase móvil en cada una de las columnas con las diferentes combinaciones de fase móvil.

Se seleccionó la columna y el pH de fase móvil donde se definieran mejor las señales cromatográficas, considerando la resolución de los picos cromatográficos, la forma y simetría de los picos cromatográficos (factor de asimetría;  $As=1$ ), el tiempo de retención, así como la señal generada a partir del Conteo Total de Iones (TIC) en el cromatograma para elegir las mejores condiciones para la separación cromatográfica.

Una vez elegidas ambas fases, se optimizó el gradiente mediante el ajuste del tiempo y la composición orgánica a partir de la elución de los compuestos así como el flujo de fase móvil, la temperatura de la columna y el volumen de inyección.

Las condiciones cromatográficas que se evaluaron para lograr una adecuada separación e identificación de los analitos se muestra en el *Diagrama 2*.



**Diagrama 2.** Procedimiento para desarrollar el método mediante UPLC.



Una vez planteadas las condiciones cromatográficas se plantearon las curvas de calibración para cada fármaco de tal forma que el intervalo de calibración cubriera un amplio espectro de las concentraciones esperadas en la matriz biológica de acuerdo a lo reportado en la literatura y considerando posibles cambios en las concentraciones plasmáticas durante el embarazo. Finalmente se inyectó una mezcla de los fármacos en solución junto con el EI a la concentración del LIC.

#### **4.2.4 Procedimiento de extracción a partir de plasma**

Para la selección de una metodología adecuada de extracción se tomaron en cuenta las características del plasma humano, sin perder de vista las propiedades fisicoquímicas de los analitos a extraer y la búsqueda bibliográfica previamente consultada.

La primera dificultad fue asegurar que mediante el método de extracción se eliminará la mayor cantidad de impurezas presentes en la matriz biológica para evitar que tuvieran un impacto perjudicial sobre el rendimiento analítico.

Se realizaron pruebas de extracción por precipitación de proteínas y extracción líquido-líquido empleando MEOH y ACN como extrayentes. Una vez elegido el método de extracción, se optimizó el procedimiento a fin de favorecer una mayor remoción de las impurezas.

Se inyectaron las muestras cargadas a la concentración del LIC y extraídas a partir de cada método probado. Se tomó en cuenta la limpieza de la muestra, la reproducibilidad del método, la forma y simetría de los picos cromatográficos (factor de asimetría;  $As=1$ ), así como la señal generada a partir del Conteo Total de Iones (TIC) en el cromatograma para elegir las mejores condiciones de extracción.



### 4.3 Validación del método analítico para la cuantificación de LMV, ZDV, LPV y RTV en plasma humano

#### 4.3.1 Preparación de las soluciones de referencia

Se pesaron con exactitud 5 mg de cada estándar de referencia y se transfirieron a matraces volumétricos de 5 mL llevándolo al aforo en MeOH: H<sub>2</sub>O 50:50 (v/v) para LMV, ZDV y SMV y ACN (100%) para LPV y RTV.

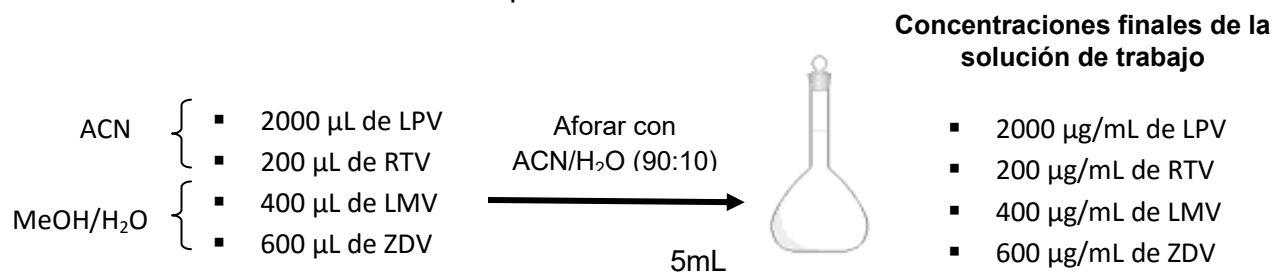
La concentración final para cada solución de referencia fue de 1 mg/mL.

#### 4.3.2 Preparación de la solución de trabajo para el Estándar Interno (EI)

A partir de la solución de referencia de SMV se realizó una dilución con MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50) hasta obtener una concentración final de 5.0 µg/mL.

#### 4.3.3 Preparación de la solución de trabajo para la curva de calibración

A partir de las soluciones de referencia para LMV, ZDV, LPV y RTV se adicionaron los siguientes volúmenes de cada fármaco y se llevaron al aforo de 5 mL para llegar a las concentraciones en solución esperadas:

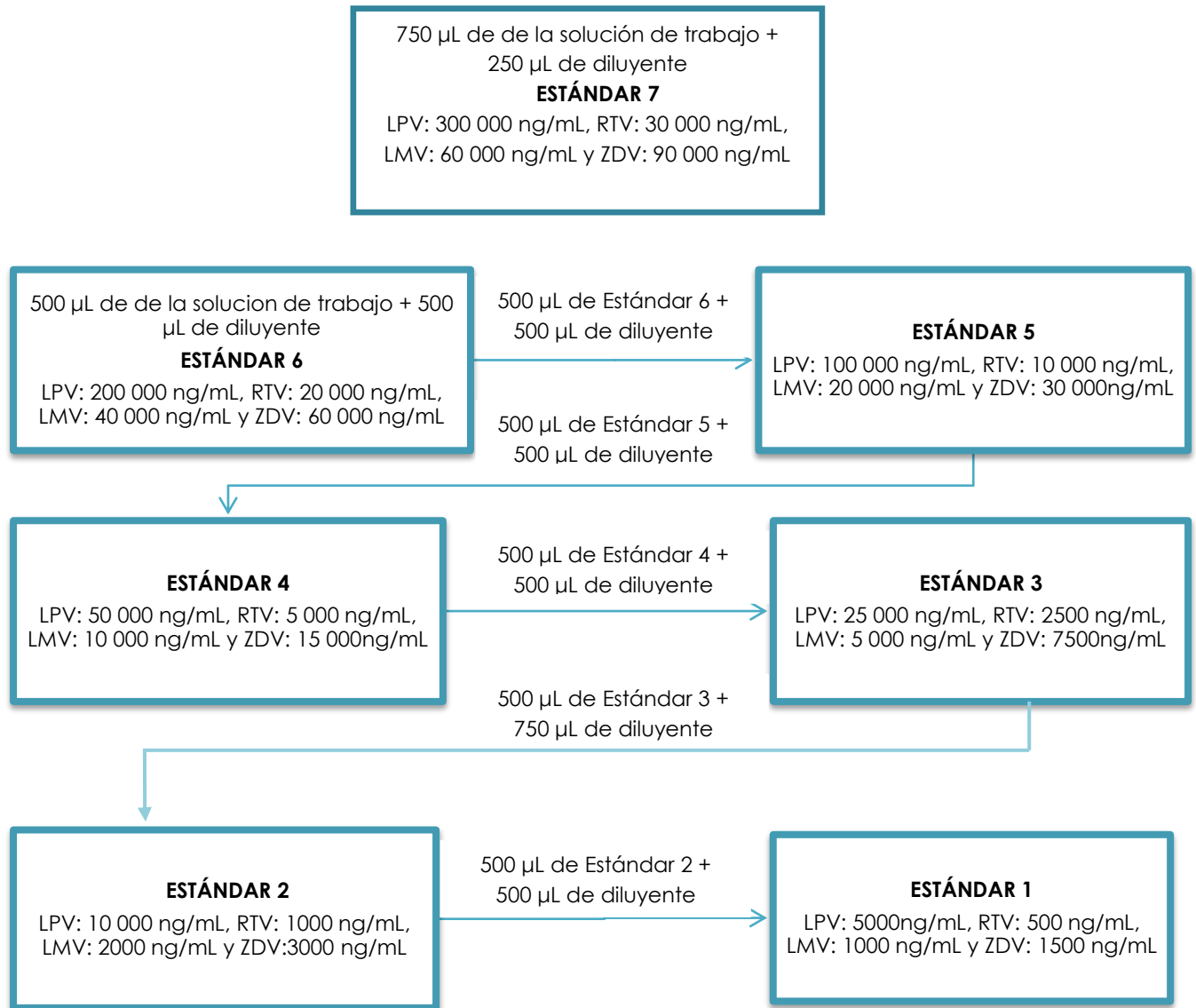


#### 4.3.4 Preparación de la curva de calibración en solución

A partir de la solución de trabajo se tomó una alícuota de 750 µL la cual se completó a 1.0 mL con ACN/H<sub>2</sub>O (90:10) en un microtubo agitando mecánicamente en vórtex hasta homogenizar. La concentración obtenida fue veinte veces mayor a la esperada para el límite superior (LS) de cada analito: 30 000 ng/mL, 60 000 ng/mL, 90 000 ng/mL y 300 000 ng/mL, para RTV, LMV, ZDV y LPV respectivamente.



Las concentraciones siguientes fueron preparadas mediante diluciones sucesivas como se muestra en el Diagrama 3 empleando ACN/H<sub>2</sub>O (90:10) como diluyente.



**Diagrama 3.** Preparación de los estándares de la curva de calibración en solución.

Una vez preparados los estándares en solución se cargaron 25  $\mu$ L de cada uno en 500  $\mu$ L de plasma para preparar la curva de calibración en la matriz biológica, de modo que el rango de calibración establecido en el presente estudio se presenta a continuación:





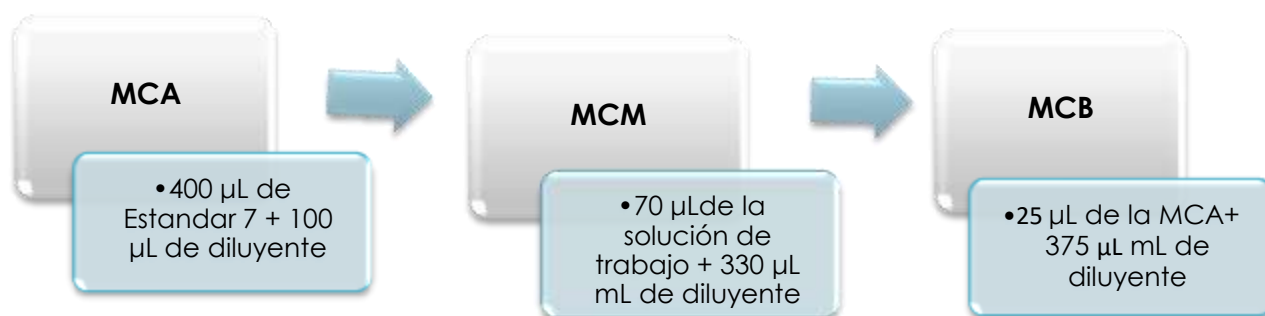
**Tabla 6.** Concentraciones empleadas como estándares en la curva de calibración

Concentracion (ng/mL)	1	2	3	4	5	6	7
LMV	50	100	250	500	1000	2000	3000
ZDV	75	150	375	750	1500	3000	4500
LPV	250	500	1250	2500	5000	10000	15000
RTV	25	50	125	250	500	1000	1500

\*Porcentaje considerando la Cmax como el 100%

#### 4.3.5 Preparación de las concentraciones empleadas como muestras control

Las muestras control (MC) se establecieron a partir del rango de concentraciones para cada fármaco: 3 veces el LIC para la MCB, Entre un 30 y 50% del rango de la curva para la MCM y 80% con respecto al LS de la curva para la MCA. Se prepararon de manera independiente a partir de la solución de trabajo como se muestra en el Diagrama 4.



**Diagrama 4.** Preparación de las soluciones de trabajo empleadas como puntos control.

Se tomó una alícuota de 25  $\mu\text{L}$  de cada una de las soluciones preparadas como se indicó anteriormente y se adicionó cada una a 500  $\mu\text{L}$  de plasma para obtener las concentraciones finales de los controles, los cuales se muestran en la Tabla 7.



**Tabla 7. Concentraciones empleadas como muestras control**

	LMV	ZDV	LPV	RTV
<b>Muestra Control Alta (MCA)</b>	2400 ng/mL	3600 ng/mL	12 000 ng/mL	1200 ng/mL
<b>Muestra Control Media (MCM)</b>	700 ng/mL	1050 ng/mL	3500 ng/mL	350 ng/mL
<b>Muestra Control Baja (MCB)</b>	150 ng/mL	225 ng/mL	750 ng/mL	75 ng/mL

#### 4.3.6 Validación del método analítico <sup>[37-41]</sup>

##### 4.3.6.1 Adecuabilidad del sistema

Para evaluar el adecuado funcionamiento del sistema para las determinaciones analíticas se evaluó la forma y simetría de los picos cromatográficos, la consistencia en la respuesta obtenida y la ausencia de acarreo en cada día de análisis. Previo a la corrida analítica se inyectó por sextuplicado una mezcla de los compuestos a la concentración de la MCB en solución. Se evaluó el %C.V. de las respuestas obtenidas para cada analito.

Criterio de aceptación: El %CV no debe ser mayor al 6%.

##### 4.3.6.2 Selectividad

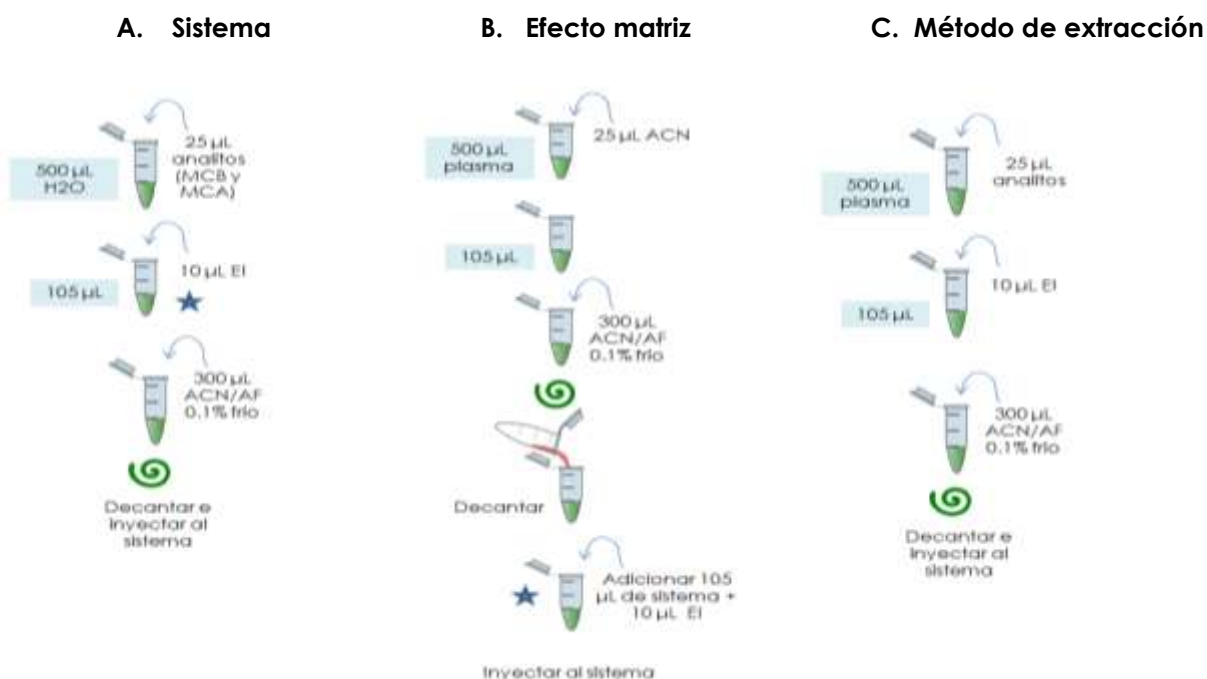
Se analizaron siete unidades blanco de plasma, un blanco de plasma lipémico y un blanco de plasma hemolizado procesados de acuerdo al método de extracción. Se evaluó la ausencia de interferencias en presencia de algunos fármacos concomitantes a la concentración máxima terapéutica: cafeína (2.4-47 µg/mL a una dosis de 35-336 mg), paracetamol (20 µg/mL a una dosis de 1 g), naproxeno (94 µg/mL a una dosis de 500 mg), ácido salicílico ( $2.4 \pm 4.0$  µg/mL a una dosis de 1.2 g), butilioscina (5 ng/mL a una dosis de 500 mg) y clorfenamina (7.6 µg/mL a una dosis de 4 mg).

Criterio de aceptación: La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención de los analitos deben ser menor al 20% para el Límite Inferior de la Curva (LIC) y 5% para el EI.



### 4.3.6.3 Efecto matriz

Se evaluaron siete unidades de blancos de plasma, un blanco de plasma lipémico y un blanco de plasma hemolizado. Se procesaron por sextuplicado de acuerdo al método de extracción propuesto. Al final del proceso de extracción se adicionó la MCB y la MCA en solución (105  $\mu\text{L}$ ) junto con el EI para todos los casos (*Figura 6B*). Cada muestra control se evaluó por triplicado. Conjuntamente se preparó la MCB y MCA en solución para comparar la respuesta obtenida en la matriz con respecto a la obtenida en solución como se muestra en el *Diagrama 6*.



**Diagrama 6.** Evaluación de efecto matriz. Se muestra el procedimiento de preparación del sistema en solución (A), el efecto matriz (B) y el procedimiento de extracción (C).

Para cada unidad analizada se obtuvo un valor de factor de matriz normalizado (FMN) obtenido de la siguiente manera:

$$FMN = \frac{[\text{Respuesta del analito en la matriz}]/[\text{Respuesta del EI en la matriz}]}{[\text{Respuesta del analito en solución}]/[\text{Respuesta del EI en solución}]}$$

**Criterio de aceptación:** El %CV obtenido de los FMN de las unidades analizadas no debe ser mayor al 15%.



#### 4.3.6.4 Efecto de acarreo

Se inyectó una muestra blanco preparada a partir del pool de plasma formado por las siete unidades de plasma, seguida de una inyección del límite superior de la curva de calibración y dos muestras del mismo blanco. La respuesta analítica obtenida se comparó con respecto a la respuesta del LIC.

*Criterio de aceptación:* La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el LIC de cada analito y del 5% para el EI.

#### 4.3.6.5 Límite Inferior de la Curva de Calibración (LIC)

Se evaluó el límite inferior de la curva mediante el análisis de la relación señal-ruido (S/R) para la concentración propuesta en cada una de las curvas de calibración en diferentes blancos de pool de plasma. La concentración planteada representaba un valor menor al 5% de la C<sub>max</sub> para cada fármaco.

*Criterio de aceptación:* La respuesta debe ser al menos cinco veces mayor a la respuesta en los blancos de plasma, además debía cumplir con los criterios de precisión (%CV) y exactitud (%DEA) no mayor al 20%.

#### 4.3.6.6 Linealidad

Se evaluó la relación lineal en el rango de concentraciones que se presentaron en la sección 4.3.4. Se calculó el coeficiente de correlación ( $r$ ), de determinación ( $r^2$ ), la pendiente ( $m$ ) y el intercepto ( $b$ ) para cada una de las tres curvas evaluadas durante el periodo de validación, así como el valor de recuperación obtenido por nivel de concentración.

*Criterio de aceptación:* El modelo matemático elegido será aquel cuya menor suma de cuadrados residuales y/o ajustes estadísticos aplicados describan adecuadamente la relación lineal entre la concentración-respuesta. El porcentaje de desviación con respecto al valor nominal en al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración no debe ser mayor al 15% en el rango de concentraciones evaluadas, con excepción del LIC donde puede ser del 20%. En al menos el 50% de cada nivel de



concentración de las curvas evaluadas se debe cumplir con el criterio del 15% de la concentración nominal y 20% para el LIC.

#### 4.3.6.7 Precisión

##### 4.3.6.7.1 Repetibilidad

Se prepararon y procesaron por quintuplicado las MC, el LIC y la MCD. En el caso de la MCD se prepararon replicas a una concentración 1.5 veces mayor al punto más alto de la curva de calibración. A estas replicas se les aplicó una dilución 1:4 con la matriz biológica exenta de fármaco. La respuesta se interpoló en la curva de calibración preparada el mismo día. Se calculó el %CV para cada muestra evaluada.

##### 4.3.6.7.2 Reproducibilidad

Se prepararon y analizaron por quintuplicado las MC y el LIC durante tres días diferentes. Para calcular el valor de la concentración se interpoló la respuesta en una curva de calibración preparada cada día. Se calculó el %CV para cada una de las concentraciones durante el período de validación.

Criterio de aceptación: Tanto en repetibilidad como en reproducibilidad el porcentaje de diferencia con respecto al valor nominal no debe ser mayor al 15% en el rango de concentraciones evaluadas, a excepción del LIC donde puede ser hasta el 20%.

#### 4.3.6.8 Exactitud

Se calculó el porcentaje de desviación absoluta con respecto al valor nominal (%DEA) para cada nivel de concentración evaluado utilizando los datos obtenidos en la repetibilidad y la reproducibilidad. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\%DEA = \left| \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración nominal}} \right| \times 100$$

Criterio de aceptación: El valor promedio de la desviación no debe ser mayor al 15% a excepción del LIC donde puede ser del 20%.



#### **4.3.6.9 Estabilidad**

Para la evaluación de las pruebas de estabilidad, se prepararon MC por triplicado y se interpolaron en una curva de calibración preparada el mismo día. Se comparó la concentración obtenida con respecto a la concentración nominal. El valor promedio de la DEA no debe ser mayor al 15% para cada MC evaluada.

##### **4.3.6.9.1 Estabilidad de la muestra**

Se prepararon por triplicado tres series de las MC en plasma. La primera serie fue almacenada a temperatura de refrigeración (8°C), la segunda fue almacenada a temperatura de congelación (-84°C) y la tercera fue almacenada a temperatura ambiente (23°C). Al cabo de 24 horas las muestras fueron procesadas según la metodología de extracción.

##### **4.3.6.9.2 Estabilidad a largo plazo**

Se evaluó la estabilidad de la muestra bajo las condiciones de almacenamiento por un periodo de 30 días a -84°C una vez cumplido este tiempo se procesaron y analizaron bajo la metodología correspondiente.

##### **4.3.6.9.3 Estabilidad de la muestra procesada**

Se evaluó la estabilidad de las MC procesadas, decantadas y almacenadas en congelación (-84°C) y a temperatura ambiente durante 24 horas.

##### **4.3.6.9.4 Estabilidad en automuestreador.**

Se evaluó la estabilidad de las MC procesadas y almacenadas en el automuestreador (5°C). Las muestras fueron reinyectadas a las 24 horas.

##### **4.3.6.9.5 Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación.**

Se evaluó la estabilidad de los analitos en tres ciclos de congelación-descongelación donde las MC fueron sometidas a periodos de congelación a -84°C y descongelamiento a temperatura ambiente por periodos de 12 horas entre cada ciclo. En el último ciclo se realizó el procedimiento de extracción y análisis.



#### 4.3.6.9.6 Estabilidad en solución.

Se evaluó la estabilidad de las soluciones de referencia por un periodo de un mes para demostrar la estabilidad de los analitos y EI en condiciones de refrigeración (4°C). La estabilidad de estas soluciones se evaluó a la concentración de la MCB.

**Criterio de aceptación:** La solución se considera estable si la desviación de la respuesta analítica con respecto a una solución recién preparada no es mayor al 10%.

**Tabla 8.** Resumen de los criterios de aceptación para la validación del método analítico

Prueba de validación	Criterio de aceptación
Selectividad	La respuesta analítica de las interferencias debe ser menor al 20% para el LIC y 5% para el EI.
Efecto matriz	El %C.V. obtenido de los FMN no debe ser mayor al 15%.
Efecto de acarreo	La respuesta analítica de las interferencias debe ser menor al 20% para el LIC y 5% para el EI.
Linealidad	El porcentaje de diferencia con respecto al valor nominal no debe ser mayor al 15% en el rango de concentraciones evaluadas, a excepción del LIC (20%) en al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración.
Límite Inferior de la Curva	La respuesta debe ser al menos cinco veces mayor a la respuesta en los blancos de plasma. Debe cumplir con una precisión (%CV) y exactitud (%DEA) no menor al 20%.
Precisión	El porcentaje de diferencia con respecto al valor nominal no debe ser mayor al 15% en el rango de concentraciones evaluadas, a excepción del LIC (20%).
Exactitud	El %DEA no debe ser mayor al 15% en los datos obtenidos en reproducibilidad.
Estabilidad	La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal. En solución el %DEA de la respuesta analítica con respecto a la obtenida con muestras recién preparadas no debe ser mayor al 10%.



#### 4.4 Aplicación del método analítico en la cuantificación de los fármacos antirretrovirales en mujeres embarazadas VIH positivas <sup>[38, 40,41]</sup>

Una vez que el método se validó para su aplicación clínica en la determinación de las concentraciones de los antirretrovirales en plasma, la exactitud y la precisión fueron monitoreadas regularmente para garantizar que el método continuaba arrojando los resultados esperados. Para alcanzar este objetivo, se implementó un número de seis MC preparadas por separado y analizadas junto con las muestras recolectadas de las voluntarias.

Con base en los resultados obtenidos de las MC se decidió aceptar o rechazar la corrida analítica en el día de análisis. Al menos cuatro de cada seis MC debían cumplir con el criterio no mayor al 15% para la determinación de su concentración con respecto al valor nominal y dos de las seis pueden estar fuera de la especificación para su valor nominal, pero no ambas de la misma concentración.

Para asegurar que el sistema se encontraba funcionando adecuadamente y por tanto generaba resultados confiables, se inyectó antes de la corrida analítica:

- **Adecuabilidad:** La inyección por sextuplicado de una mezcla a la concentración de la MCB en solución y la determinación del %CV de las respuestas obtenidas.
- **Efecto de arrastre:** La ausencia de efecto de acarreo entre muestras mediante la inyección una muestra blanco, seguida de una inyección del LS de la curva de calibración y dos muestras del mismo blanco. La respuesta analítica obtenida se comparó con respecto a la respuesta del LIC (menor al 20%).

La corrida analítica, compuesta por:

- **Muestra blanco** (muestra de plasma procesada sin los analitos de interés y sin EI).
- **Muestra cero** (muestra de plasma procesada con EI).
- **Blanco de reactivos** (muestra con las proporciones de disolventes utilizados en el procesamiento de una muestra de plasma: 500 $\mu$ L H<sub>2</sub>O, 25  $\mu$ L ACN y 10 $\mu$ L MeOH).
- **Blanco diluyente** (muestra con el agente precipitante empleado ACN/AF al 0.1%).





- **Curva de calibración** con un mínimo de 6 niveles de concentración en donde puedan interpolarse las concentraciones de las muestras desconocidas.
- **Muestras control** (MCB, MCM y MCA) por duplicado o al menos el 5% del número total de muestras por ser analizadas en la corrida analítica.

Tanto la curva de calibración como las MC fueron preparadas de forma independiente empleando soluciones de referencia frescas.

El mismo ajuste estadístico aplicado durante la validación del método se utilizó para la determinación de las concentraciones interpoladas en la curva de calibración.

- **Muestras de pacientes**

Las muestras de las voluntarias fueron extraídas y procesadas por el personal autorizado para este fin. Dichas muestras fueron tomadas durante el tercer trimestre de gestación y en un periodo no mayor a 12 horas después de la última administración del medicamento. Se aseguró que la paciente llevará por lo menos 2 semanas con el tratamiento antirretroviral Combivir®/Kaletra®.

La fracción plasmática fue fraccionada en microtubos y almacenadas a  $-84^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su análisis.

Se determinaron las concentraciones mínimas en el estado estacionario de la TARAA en diez muestras plasmáticas de ocho voluntarias durante el tercer trimestre de embarazo sometiéndolas al proceso de extracción previamente validado y tomando en cuenta las siguientes consideraciones:

- La muestra siempre se manejó con responsabilidad y seguridad, de acuerdo a las buenas prácticas de laboratorio e indicaciones de bioseguridad.
- Fueron analizadas todas las muestras en la misma corrida analítica.
- Todas las muestras fueron procesadas como un solo lote; al mismo tiempo y en el orden que se indicó anteriormente.



### Resultados y Discusión

#### 5.1 Desarrollo del método analítico

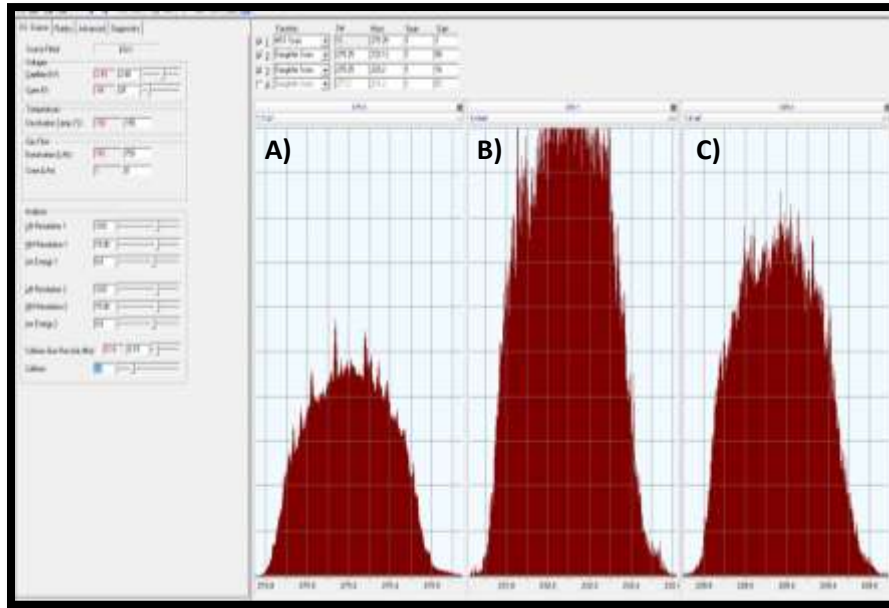
Debido a la creciente demanda para emplear y desarrollar metodologías analíticas con una mayor sensibilidad, así como la necesidad de reducir tiempos de análisis en la determinación de diferentes fármacos que se emplean como terapia combinada en un solo procedimiento, el uso de la cromatografía de líquidos acoplada a detectores de espectrometría de masas se ha convertido en el método analítico más adecuado permitiendo el análisis simultáneo de fármacos en diversas matrices con gran especificidad.

El método desarrollado mediante UPLC-MS/MS abarca la detección por espectrometría de masas, las condiciones de separación mediante UPLC y el desarrollo de un método de extracción eficiente que logre cuantificar simultáneamente cuatro antirretrovirales a partir de plasma humano.

##### 5.1.1 Detección por espectrometría de masas (MS/MS)

Se observó una señal definida y de mayor intensidad por ES+ para todos los compuestos, lo cual sugiere que los compuestos presentan sitios favorables a la protonación en su estructura.

En la figura 9, se observa que los fragmentos seleccionados para cada fármaco (ión hijo) provenían de la relación de señal más abundante a partir del ion precursor, las cuales mostraban un comportamiento gaussiano.



**Figura 9.** Optimización de los parámetros para caracterizar a los compuestos mediante espectrometría de masas. Se muestra el ion precursor de LMV (A) con dos posibles transiciones para su detección después de aplicar la energía de colisión (B y C).

Cabe señalar que para elegir las condiciones de la fuente, las cuales son constantes durante el análisis para todos los fármacos, se le dio prioridad al compuesto que requería mayor sensibilidad, en nuestro caso ZDV. Las condiciones finales de la fuente se muestran a continuación:

- **Parámetros dependientes de la fuente**

- Modo de ionización: Electrospray positivo (ES+)
- Voltaje del capilar: 2.9 kV
- Voltaje del cono: 20 V
- Voltaje de colisión: 15 V
- Temperatura de la fuente: 150°C
- Temperatura de desolvatación: 400°C
- Caudal del gas de desolvatación: 600 L/Hr
- Caudal del gas del cono: 50 L/hr



Una vez establecidas las condiciones de la fuente, se evaluaron los parámetros dependientes de cada analito mediante la aplicación manual de diferentes voltajes de cono y energías de colisión, con la finalidad de favorecer la ruptura característica de cada uno de ellos. Los voltajes en los cuales se presentó un mayor Conteo Total de Iones que llegaron al detector se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 9.** Parámetros dependientes de los analitos

Parámetro	RTV	LPV	ZDV	LMV	SMV (EI)
<b>Transición (m/z)</b>	721.50 → 296.20	629.50 → 447.35	268.20 → 127.10	230.12 → 112.08	419.40 → 199.20
<b>Voltaje de cono (V)</b>	23	20	10	15	20
<b>Energía de colisión (V)</b>	15	15	10	15	15
<b>TIC</b>	4.55e <sup>6</sup>	6.11e <sup>6</sup>	1.18e <sup>6</sup>	1.02e <sup>7</sup>	3.41e <sup>5</sup>

*EI: Estándar Interno; TIC: Total Ion Count*

Como se puede observar la especificidad viene dada por la elección de la transición elegida (ión padre→ión hijo), esta fragmentación es única para cada uno de los compuestos. Finalmente, se muestran los espectros de masas correspondientes a la transición elegida, la flecha indica el sitio en el cual se fragmenta la molécula para dar lugar al ión hijo (*Figuras 10 a 14*).

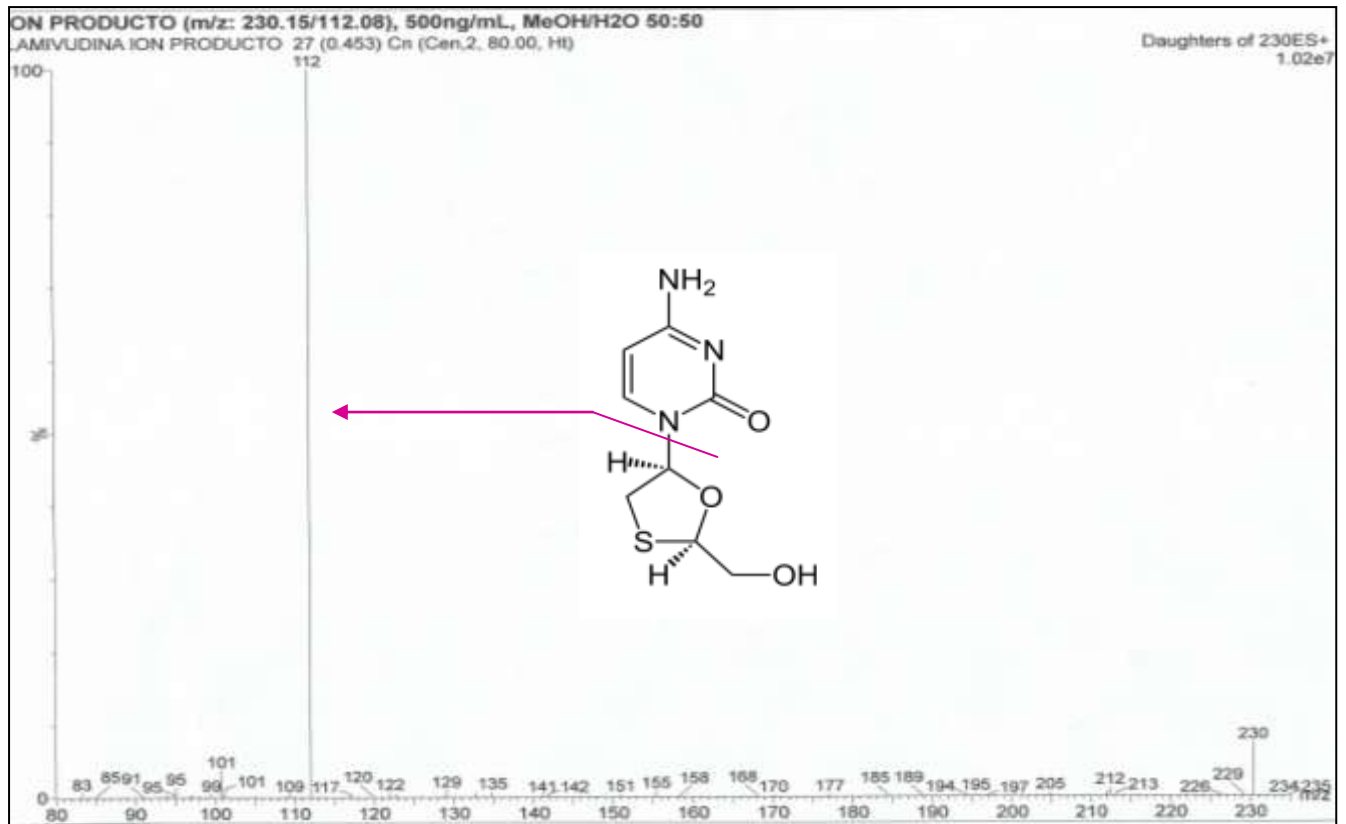


Figura 10. Espectro de masas del ion hijo de LMV (m/z: 230.15 → 112.08), ES+, MeOH/H2O (50:50)

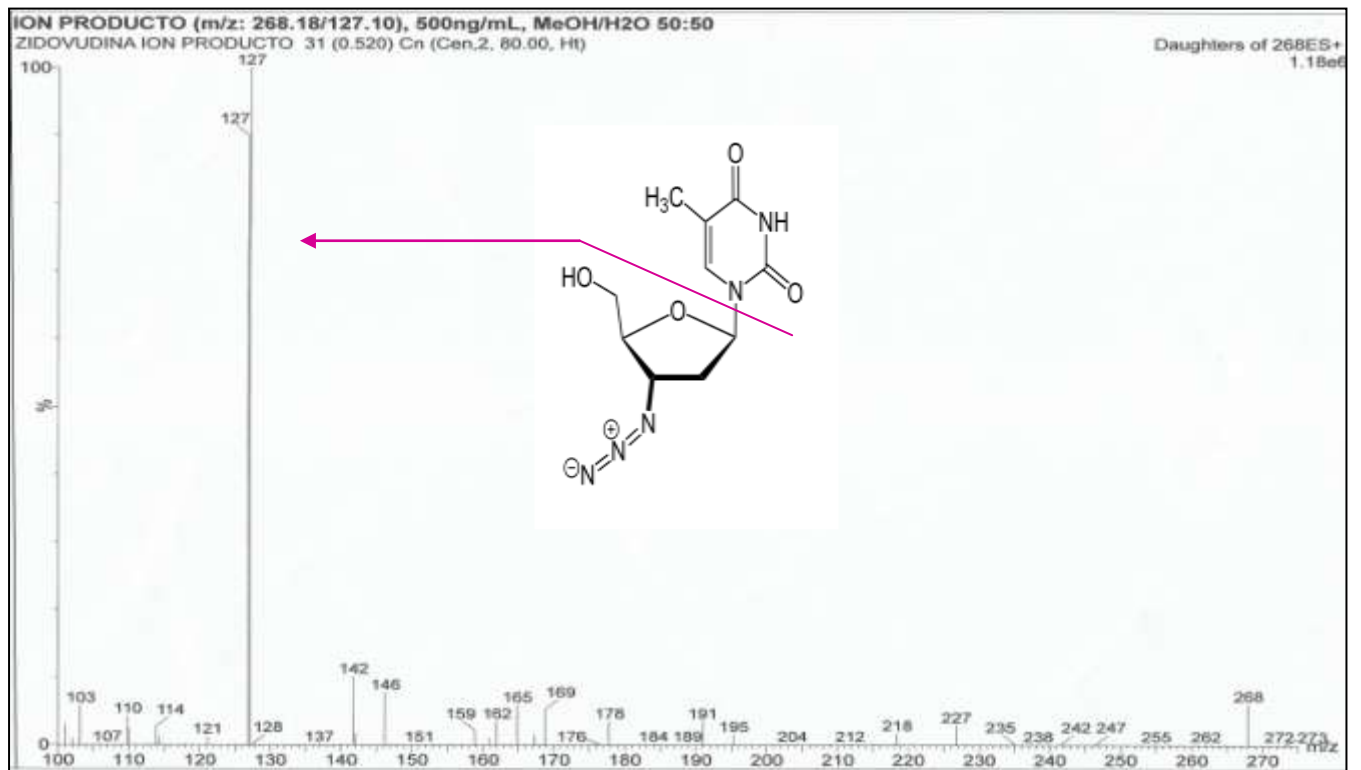
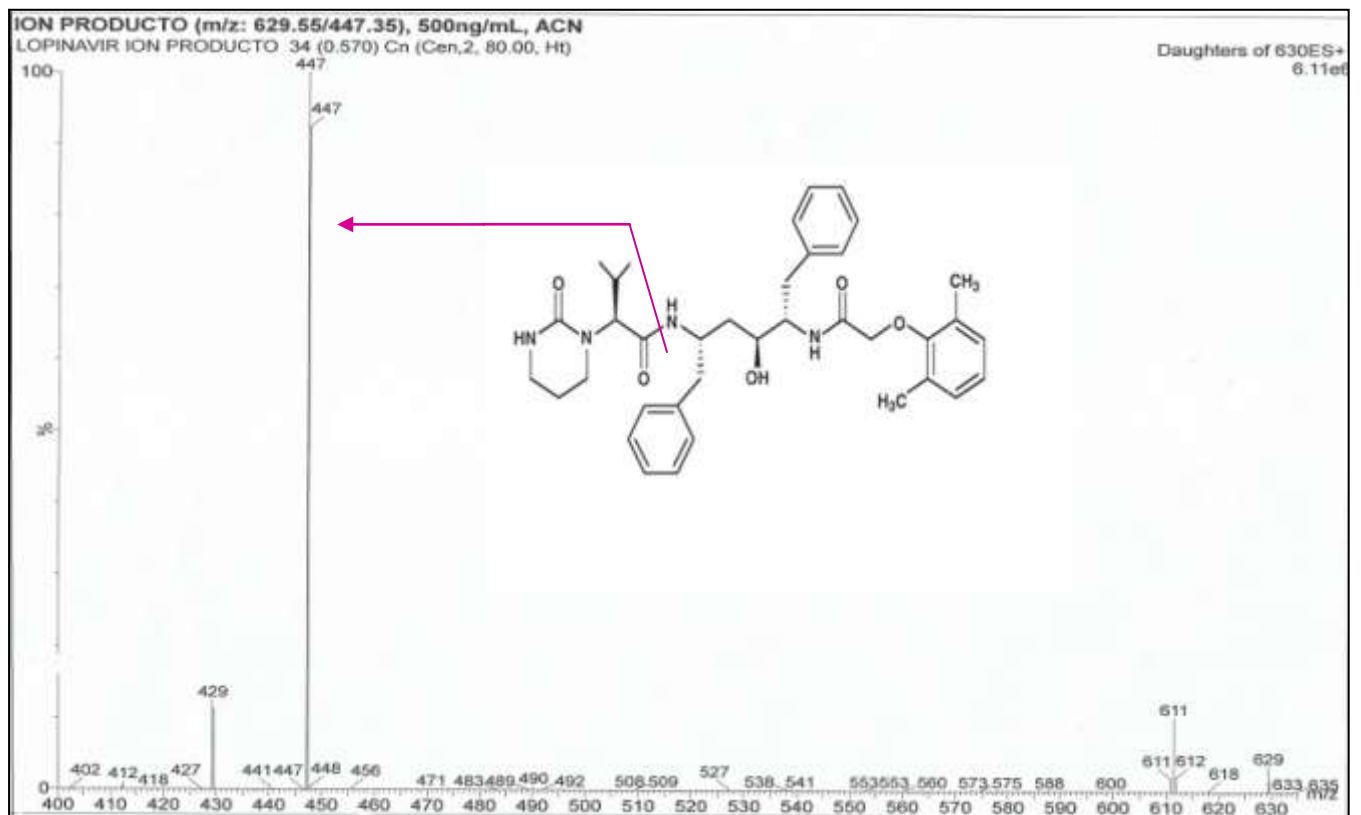
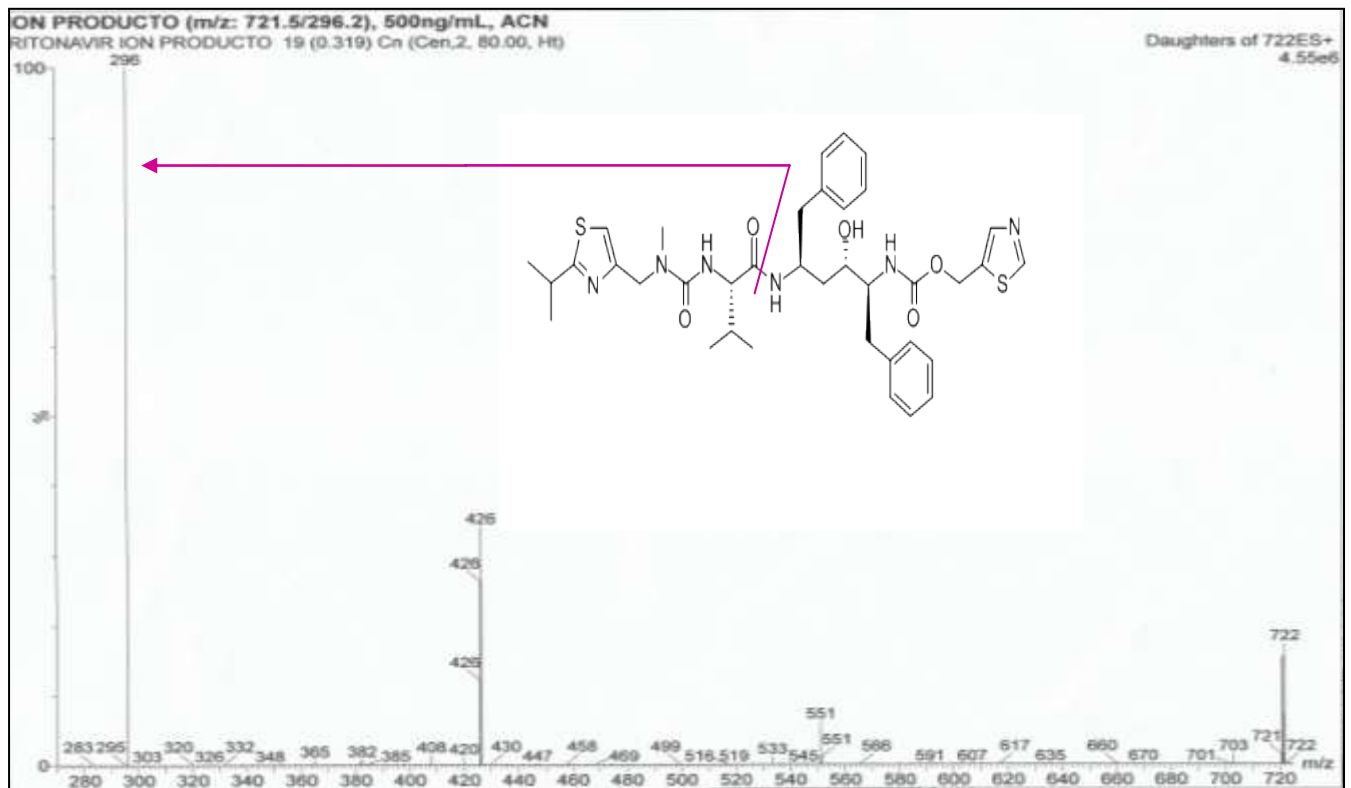


Figura 11. Espectro de masas del ion hijo de ZDV (m/z: 268.18 → 127.10), ES+, MeOH/H2O (50:50)



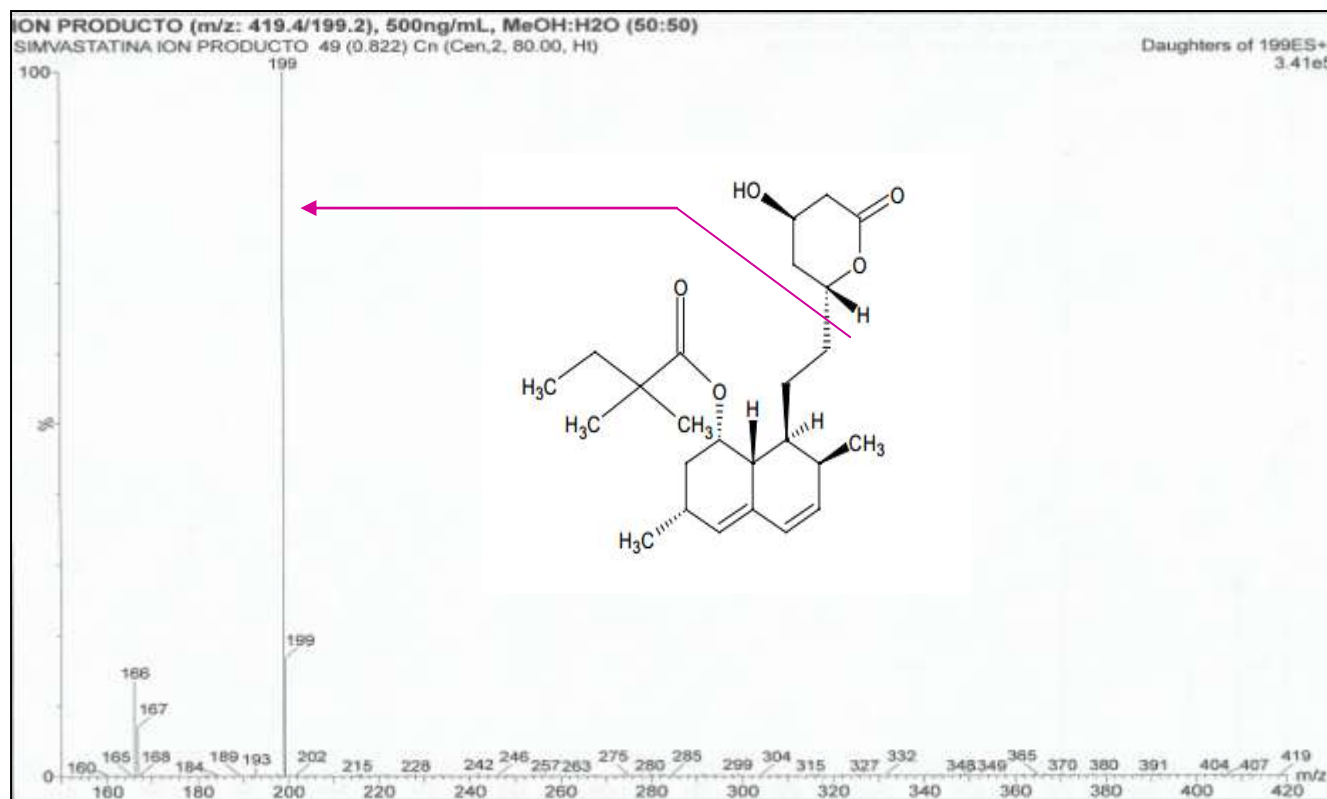


Figura 14. Espectro de masas del ion hijo de SMV (m/z: 419.4 → 199.2), ES+, MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50)

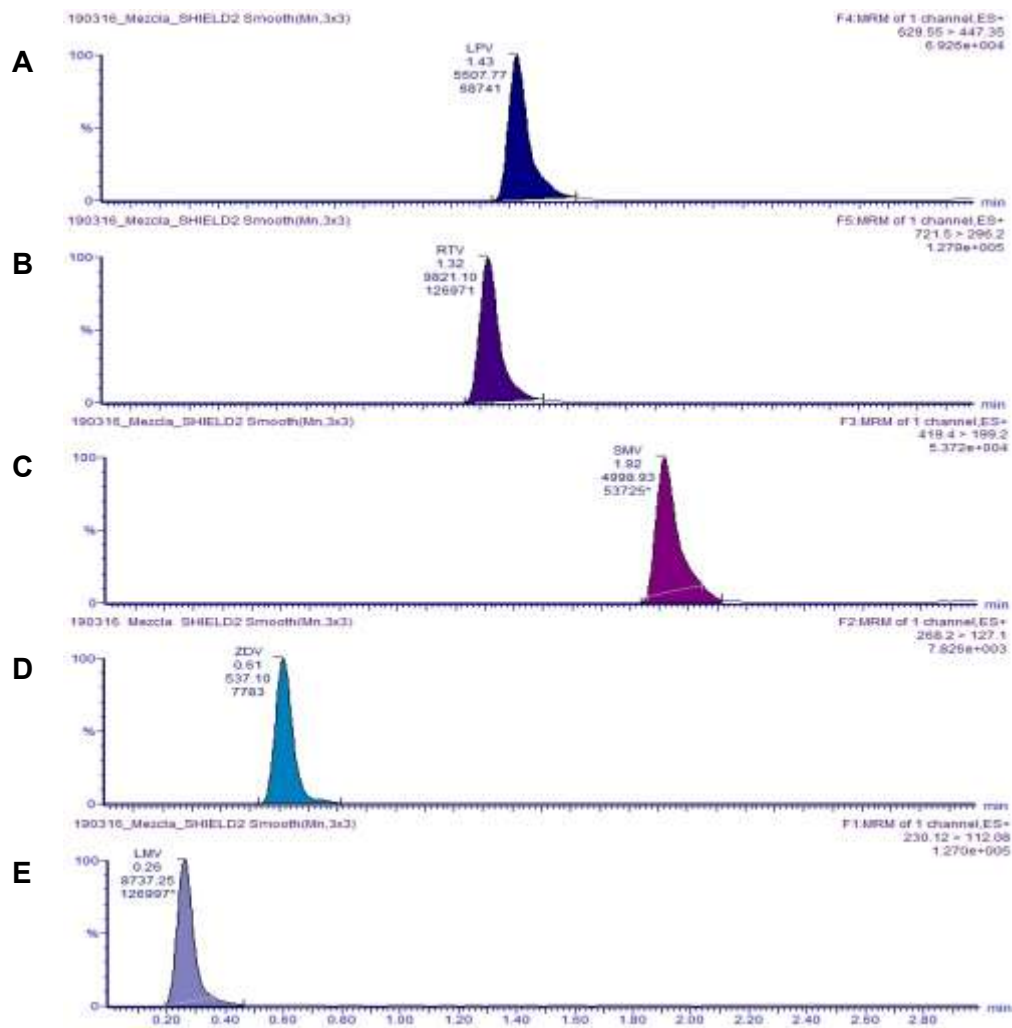
### 5.1.2 Condiciones cromatográficas por UPLC

La cuantificación simultánea de estos fármacos por cromatografía representó un reto considerando que los analitos poseían propiedades fisicoquímicas opuestas (lipofilicidad, solubilidad, pKa) lo que a menudo conllevó a tomar decisiones donde se favoreciera la cuantificación simultánea de cada uno de ellos sin comprometer la determinación de los otros como sería posible si los compuestos fueran analizados individualmente <sup>[43]</sup>.

Para la elección de la columna cromatográfica, se observó que con la columna BEH RP18 Shield se logró la separación cromatografía de los cinco analitos, sin embargo los picos cromatográficos presentaron el fenómeno de coleo ( $As > 1.5$ ) marcado para los IPs y el EI; esto ocurrió con ambos modificadores orgánicos y a ambos pH. Considerando que la naturaleza de la columna BEH Shield RP18 incorpora un grupo carbamato, la hidrofobicidad del ligando alquílico y la hidrofilia del carbamato proporcionan una selectividad alterna para compuestos básicos polares como LMV y ZDV.



Sin embargo, y dado que fueron probados diferentes pH en la fase móvil, es posible que este efecto de coelo en los IPs, se deba a la fuerte interacción entre los analítos y la propia naturaleza de la columna. En contraste, con la columna C18 BEH se observaron picos simétricos ( $As=1$ ) y bien definidos, lo cual sugiere que esta fase estacionaria favorece una interacción adecuada para los cinco analítos conservando además una buena separación.

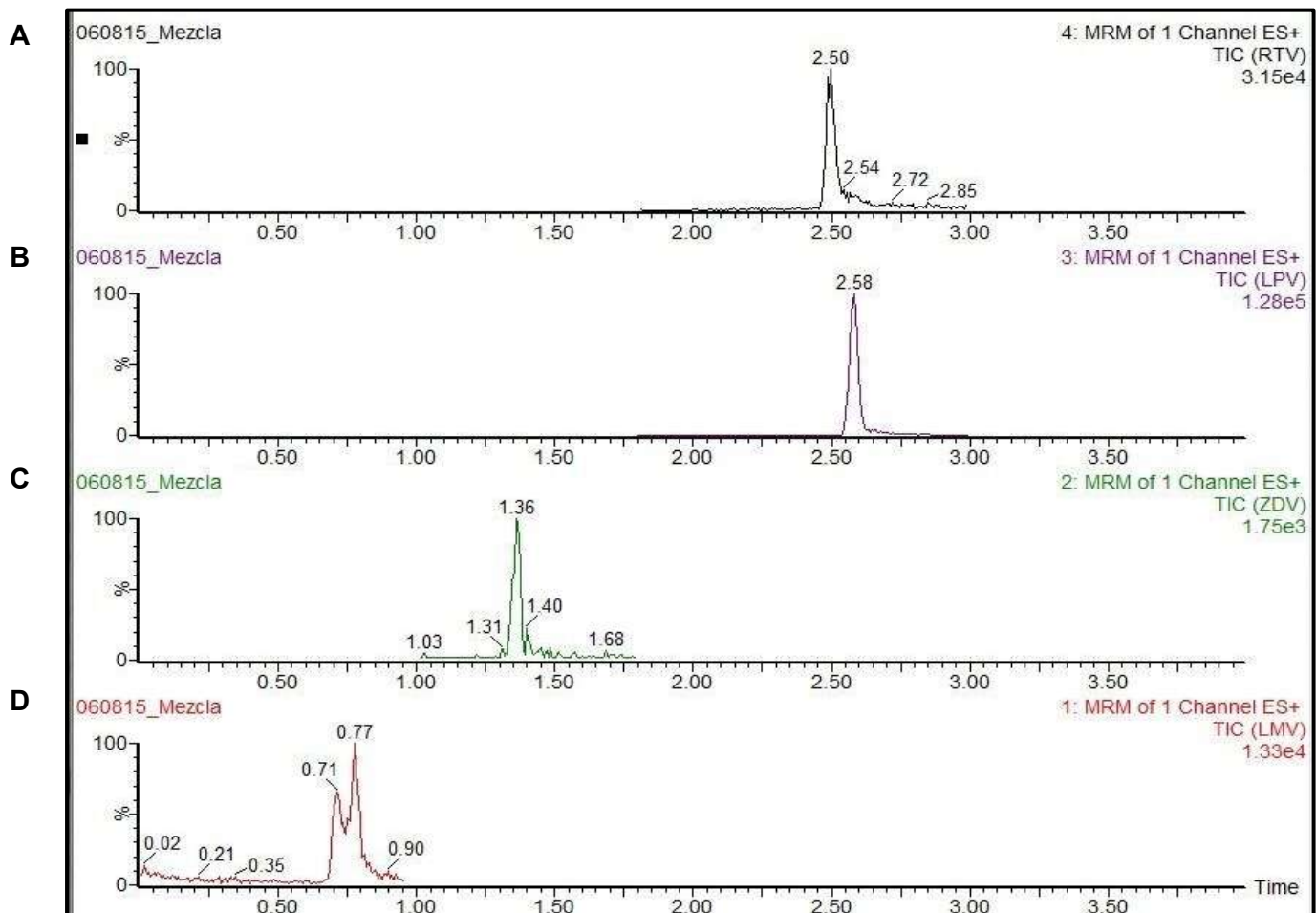


**Figura 15.** Cromatograma en columna BEH Shield RP18  
A. LPV; B. RTV; C. SMV; D. ZDV; E. LMV (todos a una concentración de 100 ng/mL)





En función del pH, se observó que la señal cromatográfica dada por el TIC para los cuatro analitos aumentó a pH ácido y conforme este se iba incrementando dicha señal disminuía. En la *Figura 16* se muestra el comportamiento de los cuatro analitos a pH 6, donde se observa que LMV y ZDV comienzan a perder definición en su señal. En este sentido, para favorecer la ionización de compuestos básicos y en consecuencia su detección, el pH de la fase móvil fue disminuido por debajo del valor de pKa del compuesto. [5]



**Figura 16.** Cromatograma con acetato de amonio 10mM como fase móvil (pH:6) en columna BEH C18  
A. RTV; B. LPV; C.ZDV; D. LMV (todos a una concentración de 100 ng/mL)

La elección correcta de la columna cromatográfica así como la selección del pH de la fase móvil fueron cruciales para la correcta separación de los compuestos ya que estos afectan directamente la capacidad de retención de la separación cromatográfica.



Con respecto al modificador orgánico empleado, el acetonitrilo mostró ventajas sobre la respuesta cromatográfica (TIC) con respecto al metanol; en este último se observaron señales cromatográficas partidas para LPV y RTV. Este comportamiento se corrigió con acetonitrilo. Algunas ventajas adicionales en el uso del acetonitrilo es su relativa asociación con el agua lo cual favorece que la fase móvil mantenga un carácter binario sin comprometer la formación de dos fases. Esto se ve favorecido para los cuatro analitos que presentan una diferencia de polaridad entre grupos. Conjuntamente debido a que el acetonitrilo es de menor viscosidad con respecto al metanol, la presión en el sistema se vio disminuida.

Una vez establecidas la fase estacionaria y la fase móvil, a partir del tiempo de elución de los compuestos se optimizó el gradiente manteniendo la proporción que favorecía la elución de cada compuesto. Además se probaron diferentes flujos de fase móvil con la finalidad de disminuir el tiempo de análisis por inyección, lo cual permitió realizar la separación en un tiempo de corrida de 3.0 minutos. Bajo estas condiciones los tiempos de retención para LMV, ZDV, RTV, LPV y el EI fueron 0.29, 0.60, 1.46, 1.56 y 2.28 respectivamente. Las condiciones de separación se muestran a continuación:

- **Fase estacionaria:** Columna ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH C18 dimensiones 2.1  $\mu\text{m}$  x 50 mm, diámetro de partícula 1.7  $\mu\text{m}$ .
- **Fase móvil:** **A.** ácido fórmico al 0.1% disuelto en agua (pH 2.95) **B.** acetonitrilo
- **Velocidad de flujo:** 0.5 mL/min
- **Volumen de inyección:** 3  $\mu\text{L}$
- **Tiempo de corrida:** 3.0 min
- **Temperatura de la columna:** 35°C
- **Temperatura del automuestreador:** 5°C
- **Condiciones de elución:** gradiente (ver Tabla 10.)
- **Lavado fuerte:** agua, acetonitrilo, metanol e isopropanol en proporción: 10:20:30:40 (v/v/v/v) acidificado al 0.1% con ácido fórmico.
- **Lavado débil:** agua y acetonitrilo 70:30 (v/v) acidificado al 0.1% con ácido fórmico

**Tabla 10.** *Gradiente de elución*

Tiempo (min)	% A	% B
0.15	90	10
0.70	50	50
2.5	20	80
3.0	90	10



Se plantearon las siguientes curvas de calibración para cada fármaco. El intervalo de calibración abarca un amplio espectro de las concentraciones esperadas de acuerdo a lo reportado en la literatura y considerando los posibles cambios en las concentraciones plasmáticas durante el embarazo.

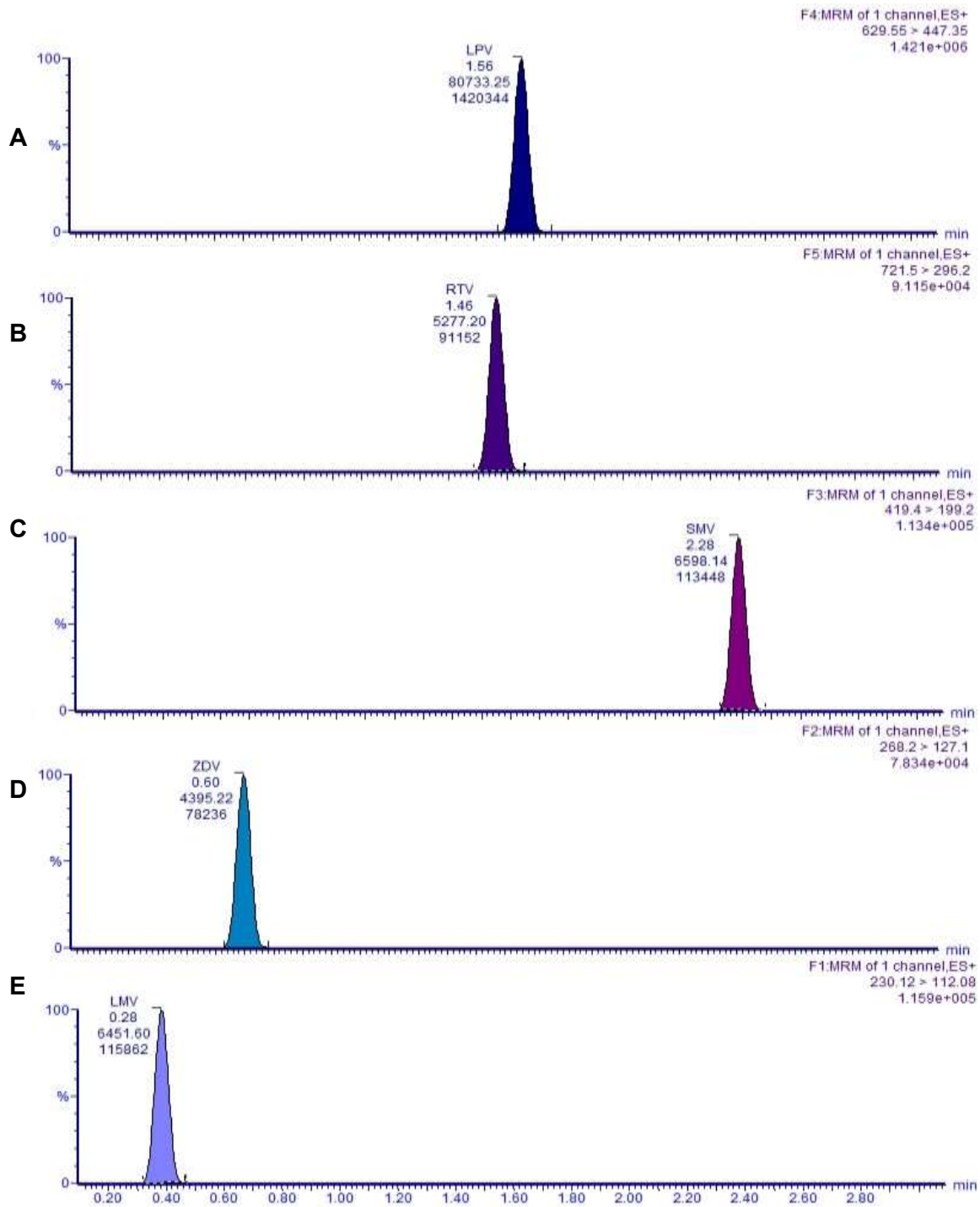
**LMV:** 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000 ng/mL

**ZDV:** 75, 150, 375, 750, 1500, 3000, 4500 ng/mL

**LPV:** 250, 500, 1250, 2500, 5000, 10 000, 15 000 ng/mL

**RTV:** 25, 50, 125, 250, 500, 1000, 1500 ng/mL

Finalmente para probar la sensibilidad en solución se evaluó el LIC para cada analito y se obtuvo el siguiente cromatograma:



**Figura 17. Cromatograma de LIC en solución**

**A. LPV (250 ng/mL) B. RTV (25 ng/mL); C. SMV (EI, 100 ng/mL); D. ZDV (75 ng/mL); E. LMV (50 ng/mL)**



### 5.1.3 Método de extracción a partir de plasma

Se prescindió de un procedimiento de extracción líquido-líquido, como lo refiere la literatura, ya que no se logró encontrar el disolvente o la mezcla de disolventes adecuada que recuperará con éxito a los cuatro fármacos debido a su diferencia de solubilidad y su coeficiente de reparto ( $\log P$ ) entre los analitos.<sup>[44]</sup>

Considerando la composición de la matriz biológica y la diferencia en las propiedades fisicoquímicas de los analitos, se optó por desarrollar un método por precipitación de proteínas empleando un disolvente orgánico. Se probaron dos agentes precipitantes: MEOH y ACN, siendo este último con el cual se obtuvieron mejores resultados cromatográficos y donde el procedimiento fue reproducible para los cuatro analitos. Una vez elegido el agente precipitante, se optimizó el procedimiento de extracción a fin de favorecer una mayor precipitación de las proteínas mediante la adición de ácido fórmico al 0.1% al agente precipitante y adicionándolo con una temperatura de 4°C.

La metodología de extracción que se siguió fue la siguiente:

Se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de plasma en microtubos a los cuales se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de la solución de trabajo del EI (SMV, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se agitó mecánicamente en vórtex durante 5 minutos para posteriormente adicionar 300  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo frío acidificado al 0.1% con ácido fórmico para lograr la precipitación de proteínas, agitando nuevamente en vórtex por 5 minutos. Se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min a 4°C. Finalmente 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante fueron depositados en insertos de vidrio para ser inyectados al sistema cromatográfico. El *Diagrama 6* muestra el procedimiento antes descrito.



105  $\mu\text{L}$  de plasma + 10  $\mu\text{L}$  del EI (SMV, 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).  
Agitar en vórtex durante 5 minutos.

Precipitar proteínas con 300  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo frío al 0.1% de ácido fórmico. Agitar en vórtex por 5 minutos.

Centrifugar a 13 000 rpm por 10 min a 4°C.

Tomar 100  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y colocar en insertos para inyectar al sistema cromatográfico.

**Diagrama 6.** Método de extracción de los fármacos antirretrovirales a partir de plasma.

Se observó un aumento en el TIC así como una mejor definición de los picos cromatográficos al emplear ACN con AF al 0.1% como agente precipitante en frío; esto sugiere que la adición del ácido favorece el rompimiento de la unión fármaco-proteína y ayuda a mantener a los analitos en la forma ionizada, por lo cual el método de extracción por precipitación de proteínas con acetonitrilo acidificado frío fue donde se obtuvo mayor limpieza de la muestra, eficiencia en el procedimiento y el elegido para extraer a los analitos de interés. Además, dicho procedimiento requiere un volumen pequeño de muestra para el análisis (100  $\mu\text{L}$ ) lo cual es adecuado para fines clínicos y de investigación.



## 5.2 Validación del método analítico

Previo a la validación se estableció un protocolo de validación en el cual se definieron las pruebas y parámetros de validación requeridos para diseñar los experimentos con base a los requerimientos del método. Se realizaron ensayos de selectividad, linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud, para los cuales se evaluaron los resultados obtenidos y una vez aceptados se procedió a validar el método desarrollado.

### 5.2.1 Adecuabilidad del sistema

Antes de cada corrida analítica se verificó el adecuado funcionamiento del sistema para las determinaciones analíticas. En la Tabla 11 se muestran los resultados de adecuabilidad de un día de trabajo donde se puede observar que el %C.V. calculado a partir del área y de la respuesta (relación de áreas) para cada uno de los compuestos, fue menor al 6% en todos los casos.

**Tabla 11. Adecuabilidad del sistema**

Inyección	LMV	ZDV	LPV	RTV	SMV	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
	Área	Área	Área	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
1	9568.19	5476.32	127280.85	6439.94	27585.73	0.35	0.19	4.61	0.23
2	10236.65	5598.00	129071.88	6577.42	28122.49	0.36	0.19	4.59	0.23
3	10321.49	5663.17	134522.11	6795.36	29182.59	0.35	0.19	4.61	0.23
4	9878.46	5593.44	134408.95	6515.14	27656.93	0.36	0.20	4.86	0.23
5	9695.89	5571.73	134769.75	6628.59	28824.91	0.34	0.19	4.67	0.23
6	9189.46	5712.51	128469.30	6677.71	27426.35	0.34	0.20	4.68	0.24
<b>PROMEDIO</b>	<b>9815.02</b>	<b>5602.53</b>	<b>131420.47</b>	<b>6605.69</b>	<b>28133.17</b>	<b>0.35</b>	<b>0.19</b>	<b>4.67</b>	<b>0.23</b>
<b>DE</b>	425.38	80.93	3496.58	125.02	721.94	0.012	0.006	0.099	0.005
<b>%CV</b>	<b>4.33</b>	<b>1.44</b>	<b>2.66</b>	<b>1.89</b>	<b>2.56</b>	<b>3.32</b>	<b>2.78</b>	<b>2.13</b>	<b>1.95</b>

Del mismo modo, la forma y la simetría de los picos cromatográficos obtenidos en cada día de análisis indicaba que el sistema se encontraba en condiciones óptimas para iniciar con la corrida analítica. Sin embargo, es recomendable monitorear el funcionamiento del sistema antes, durante y al final de la corrida analítica, esto debido a la variabilidad entre inyecciones obtenidas mediante espectrometría de masas <sup>[41]</sup>.



Finalmente cabe hacer notar que la adecuabilidad del sistema pasó satisfactoriamente durante todos los días de validación.

### 5.2.2 Selectividad

El método demostró ser selectivo para la cuantificación de cada fármaco antirretroviral ya que como se muestra en la Tabla 12 no existen interferencias significativas para la detección de cada uno de los iones en diferentes lotes de plasma, así como en la muestra lipémica y hemolizada.

**Tabla 12. Selectividad del método**

Plasma	LMV	ZDV	LPV	RTV	SMV
	Área promedio	Área promedio	Área promedio	Área promedio	Área promedio
P1	2.87	46.63	128.89	51.98	0.10
P2	26.05	41.79	190.51	56.83	12.01
P3	9.00	42.40	219.83	59.02	5.29
P4	9.06	40.87	136.88	45.06	14.41
P5	10.91	42.13	235.24	55.74	7.31
P6	18.35	47.80	185.59	54.63	10.67
P7	14.80	39.84	295.71	65.10	2.00
PLip*	1.59	45.38	109.50	33.11	10.39
PHem**	9.91	45.91	125.74	56.17	6.29
<b>LIC</b>	<b>685.67</b>	<b>418.40</b>	<b>7664.93</b>	<b>575.45</b>	<b>7852.203</b>
<b>Área permitida (20% LIC)</b>	<b>137.13</b>	<b>83.68</b>	<b>1532.98</b>	<b>115.09</b>	<b>392.61</b>

\*plasma lipémico; \*\*plasma hemolizado

Adicionalmente para cada muestra blanco (*Figura 18a-d*) se obtienen respuestas en los cromatogramas respectivos que no rebasan el 20% permitido por la normativa con respecto al LIC indicado en *Figura 18e*. Esto puede constatarse ya que las señales obtenidas en el TIC no alcanzan a integrarse al ser al menos diez veces más bajas con respecto a la respuesta en el LIC.





Sin embargo, en presencia de posibles fármacos concomitantes de uso frecuente, se sugiere tomar en consideración la cuantificación de RTV, frente a la administración de paracetamol y naproxeno; así como la cuantificación de los cuatro para una administración de cafeína a dosis terapéuticas, es decir, el %DEA en muestras en presencia de cafeína afecta la cuantificación de los cuatro analitos (Ver Tabla 13).

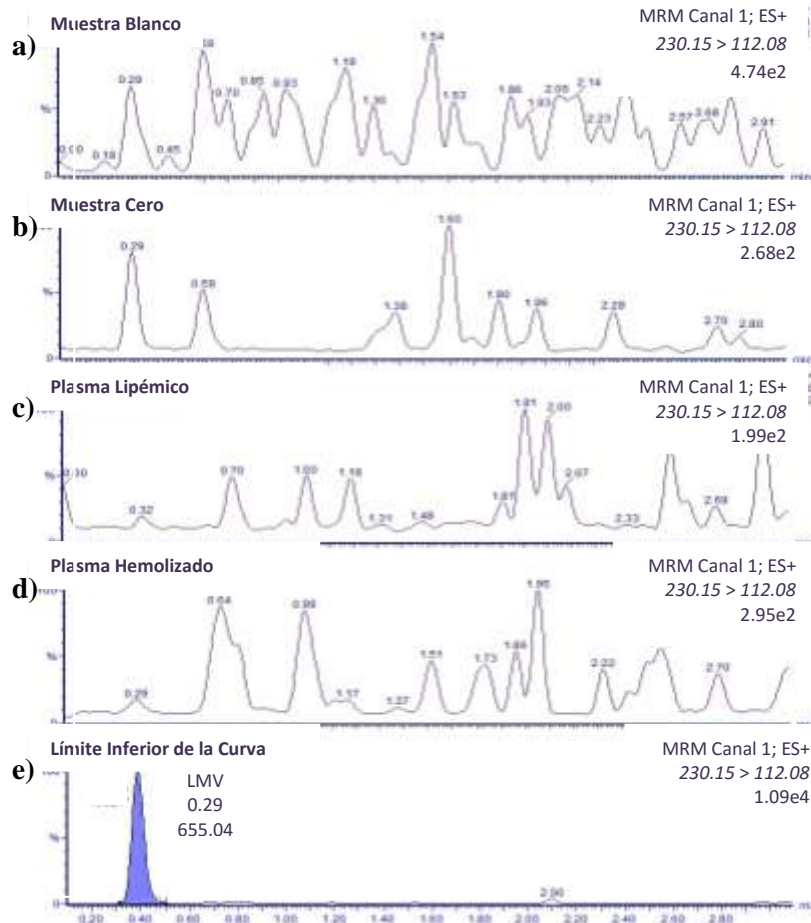
**Tabla 13.** *Selectividad frente a fármacos concomitantes*

Fármaco	LMV	ZDV	LPV	RTV
	%DEA promedio	%DEA promedio	%DEA promedio	%DEA promedio
<b>Cafeína</b>	15.96	25.27	23.70	21.83
<b>Paracetamol</b>	6.83	15.80	14.93	17.26
<b>Naproxeno</b>	11.76	9.80	14.01	15.16
<b>Ácido Salicílico</b>	8.70	2.50	5.83	6.23
<b>Butilhioscina</b>	7.46	9.87	7.76	10.53
<b>Clorfenamina</b>	1.73	4.60	2.03	4.86

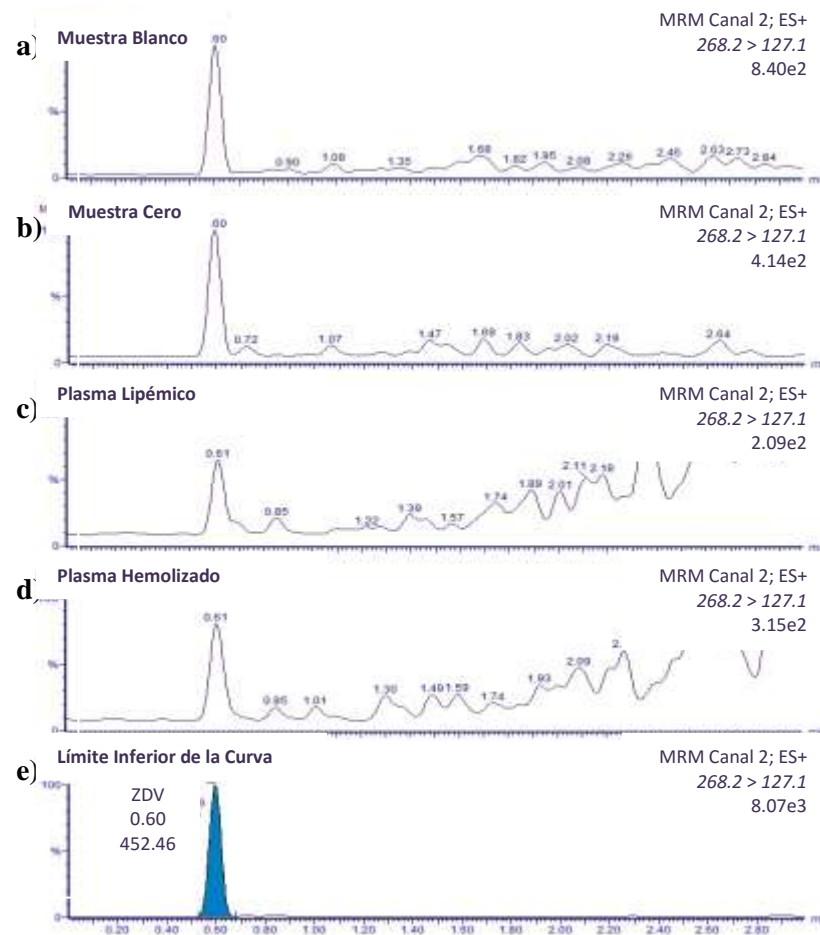
\*a la C<sub>max</sub> terapéutica: Cafeína (2.4-47 µg/mL a una dosis de 35-336 mg), Paracetamol (20 µg/mL a una dosis de 1 g), Naproxeno (94 µg/mL a una dosis de 500 mg), Ácido Salicílico (2.4± 4.0 µg/mL a una dosis de 1.2 g), Butilhioscina (5 ng/mL a una dosis de 500 mg) y Clorfenamina (7.6 µg/mL a una dosis de 4 mg).



### i. LMV



### ii. ZDV



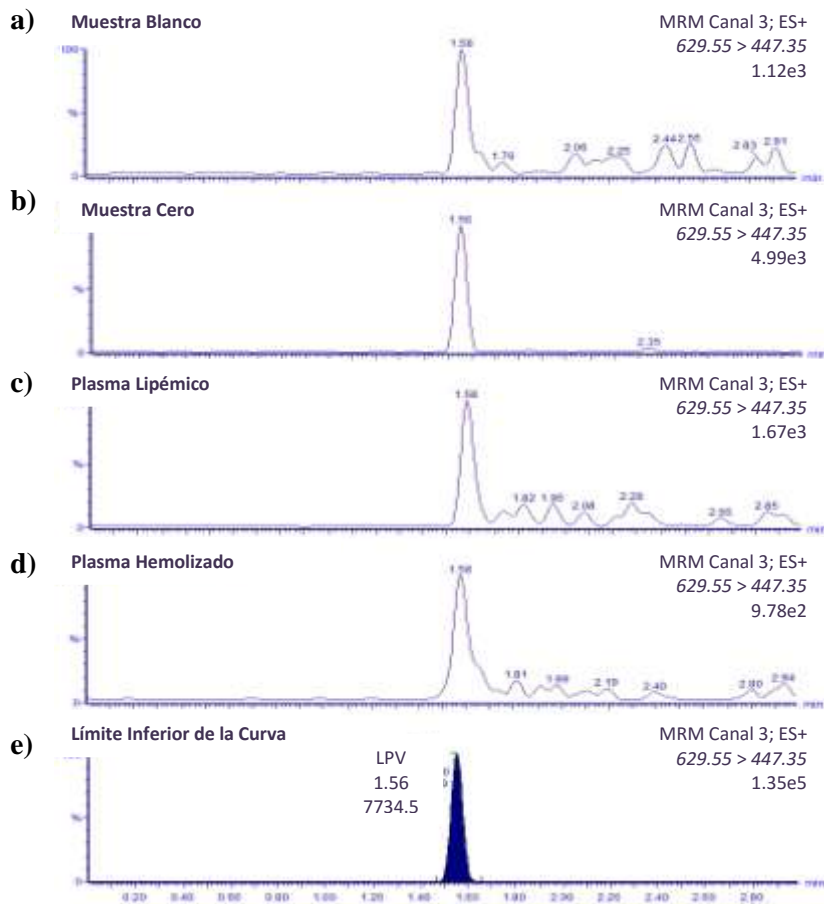
**Figura 18.** Cromatograma representativo de selectividad.

Se muestra la respuesta de cada fármaco en **a)** Blanco de plasma; **b)** Muestra cero con EI (SMV, 500 ng/mL); **c)** Plasma lipémico; **d)** Plasma hemolizado; **e)** Límite Inferior de la Curva en plasma.



Continuación

### III. LPV



### IV. RTV

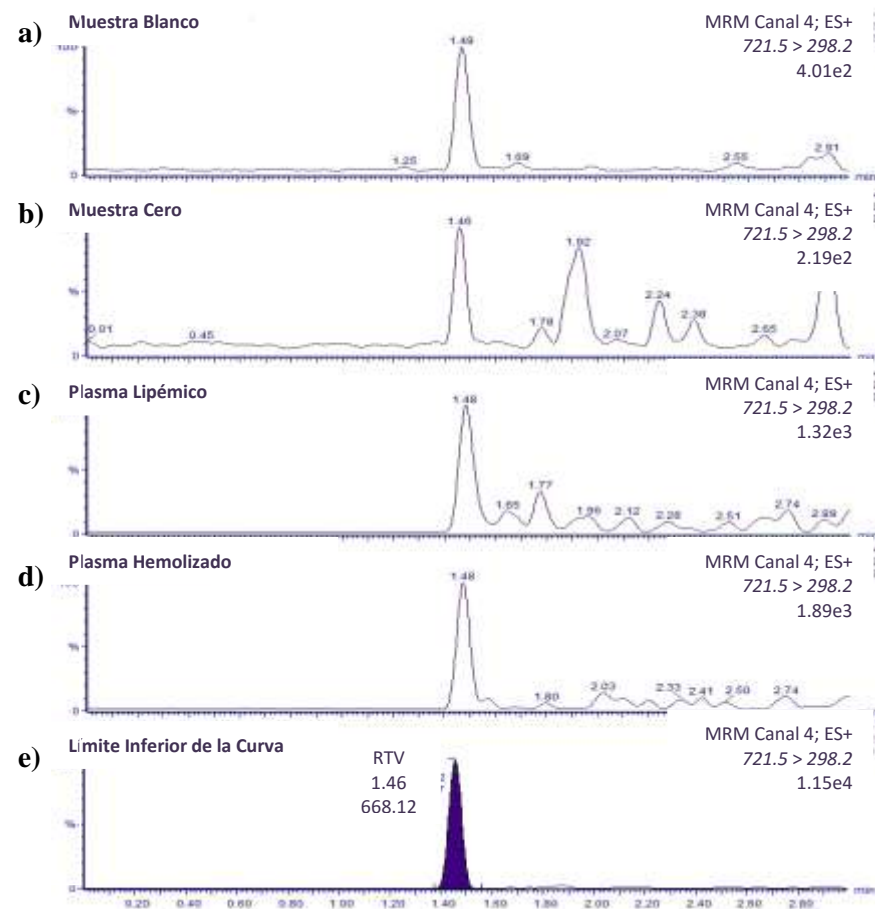


Figura 18. Cromatograma representativo de selectividad.

Se muestra la respuesta de cada fármaco en a) Blanco de plasma; b) Muestra cero con EI (SMV, 500 ng/mL); c) Plasma lipémico; d) Plasma hemolizado; e) Límite Inferior de la Curva en plasma.



### 5.2.3 Efecto matriz

De acuerdo con los resultados obtenidos en la Tabla 14 el FMN promedio calculado en los plasmas evaluados cumple con el criterio establecido no mayor al 15%, con excepción de LMV dónde se ve afectada su cuantificación en la muestra hemolizada.

**Tabla 14. Efecto matriz**

Unidad / Concentración (ng/mL)	LMV		ZDV		LPV		RTV	
	FMN promedio		FMN promedio		FMN promedio		FMN promedio	
	MCB	MCA	MCB	MCA	MCB	MCA	MCB	MCA
<b>P1</b>	0.84	0.96	0.85	0.93	0.83	1.07	0.82	1.14
<b>P2</b>	1.03	1.08	0.98	0.96	1.07	1.11	1.03	1.14
<b>P3</b>	1.02	1.16	1.07	1.06	1.08	1.17	0.99	1.18
<b>P4</b>	1.28	1.22	1.15	1.14	1.17	1.23	1.12	1.22
<b>P5</b>	1.16	1.16	1.08	1.04	1.11	1.14	1.04	1.15
<b>P6</b>	1.07	1.07	1.06	1.04	1.06	1.13	1.01	1.11
<b>P7</b>	0.94	1.12	0.87	1.01	1.01	1.15	0.94	1.14
<b>PLip</b>	1.17	1.13	0.98	1.04	1.06	1.15	1.09	1.16
<b>PHem</b>	0.79	0.76	0.90	0.87	0.93	0.93	0.92	0.95
<b>PROMEDIO</b>	<b>1.03</b>	<b>1.07</b>	<b>0.99</b>	<b>1.01</b>	<b>1.04</b>	<b>1.12</b>	<b>0.99</b>	<b>1.13</b>
<b>DE</b>	0.16	0.14	0.11	0.08	0.10	0.08	0.09	0.08
<b>% C.V.</b>	<b>15.46</b>	<b>12.89</b>	<b>10.58</b>	<b>7.97</b>	<b>9.71</b>	<b>7.23</b>	<b>9.48</b>	<b>6.64</b>

\*plasma lipémico; \*\*plasma hemolizado

El efecto de hemólisis es un tipo de efecto matriz y representa la primera causa de rechazo de muestras en la fase pre-analítica, por lo cual se recomienda evaluar el impacto de dicho efecto a diferentes grados de hemólisis como fue reportado en el estudio llevado a cabo por Hughes, NC y cols, en 2009 en análisis llevados a cabo mediante LC-MS/MS en plasma humano <sup>[45]</sup> o en su defecto tomar con reserva la cuantificación de LMV en este tipo de muestras.

### 5.2.4 Efecto de acarreo

Durante la validación fue posible descartar un efecto de acarreo, sin embargo durante el desarrollo del método se observó que después de numerosas inyecciones dicho efecto repercute en la precisión y exactitud de la respuesta sobre todo en LPV y RTV.



Para controlarlo se implementó un sistema de lavado entre cada inyección que contenía una mezcla de diferentes disolventes (isopropanol, MeOH, ACN y agua al 25:25:25:25 v/v) como lavado fuerte y acetonitrilo/agua 70:30 (v/v) como lavado débil. Aunque el efecto de arrastre se redujo, este no se eliminó por completo debido a que los compuestos básicos-hidrofóbicos tienden a absorberse en su forma ionizada e interactuar con las superficies metálicas y materiales de plástico presentes en el sistema cromatográfico.

El mismo efecto es reportado por *S.M. Illamola y cols* en 2014, dónde al presentarse efecto de acarreo en LPV, este es controlado y eliminado con la adición del 0.2% de ácido fórmico a su solución de lavado. Para el método desarrollado, el empleo de la solución de lavado con la adición de ácido fórmico al 0.1% en ambos lavados disminuyó el efecto de arrastre en su mayor parte ya que con el aumento del componente orgánico LPV y RTV al tener un alto carácter lipofílico son arrastrados de los componentes donde pueden interactuar y la interacción iónica que pudiera existir es disociada.<sup>[45]</sup>

En la Tabla 15 se pueden observar los resultados obtenidos.

**Tabla 15. Efecto de acarreo**

Muestra	LMV Área	ZDV Área	LPV Área	RTV Área	SMV Área
Blanco	11.51	24.74	258.31	11.06	22.01
LS	39326.36	25687.81	535059.25	36602.79	7540.769
Blanco	13.90	37.94	825.16	79.68	6.319
Blanco	10.50	38.63	341.70	46.00	0.983
LIC	<b>677.07</b>	<b>459.70</b>	<b>7931.70</b>	<b>532.78</b>	<b>8136.438</b>
Área Permitida (20% LIC)	135.41	89.32	1474.16	112.83	407.90

Como se observa, aun cuando para LPV existe este efecto de arrastre, este no supera el 20% del área permitida en el LIC cumpliendo con lo estipulado en la NOM 177 como criterio de aceptación.



### 5.2.5 Linealidad

De acuerdo con el principio de Parsimonia, para establecer la linealidad del método analítico se elige aquel modelo que sea el más sencillo y en el cual se obtenga la menor suma de cuadrados residuales. En el presente estudio, el mejor ajuste lineal obtenido mediante el método por mínimos cuadrados se consiguió al relacionar el área del compuesto contra la relación de áreas. La Tabla 16 presenta de manera detallada los valores de la pendiente (m), ordenada al origen (b), el coeficiente de correlación (r) y determinación ( $r^2$ ) así como el porcentaje de error relativo debido a la regresión lineal (%EER). Cada nivel de concentración cumplió con el criterio de exactitud (Tablas 17 a 20) y por último se presenta la curva de linealidad promedio para cada fármaco. (Figuras 19 a 22).

**Tabla 16.** *Parámetros de la regresión lineal de las curvas de calibración de los fármacos antirretrovirales*

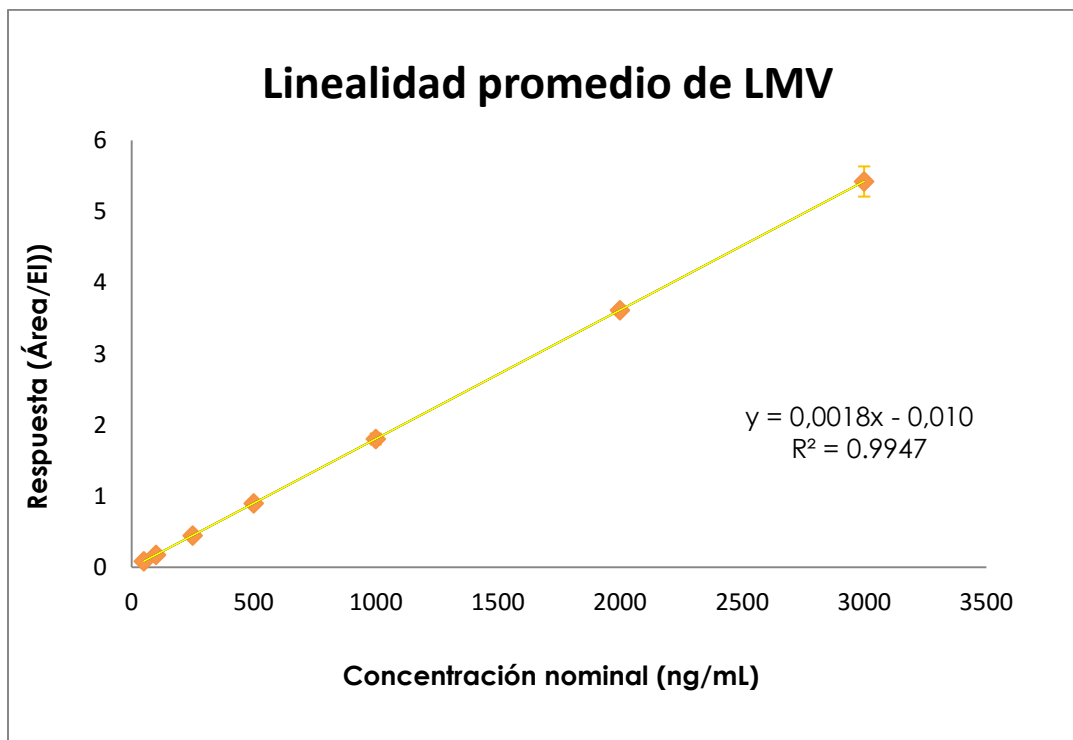
Fármaco	Replica	Pendiente (m)	Ordenada (b)	r	$r^2$	%EER
LMV	1	0.0019	-0.0056	0.9983	0.9966	4.7634
	2	0.0017	0.0027	0.9965	0.9929	3.7179
	3	0.0017	-0.0283	0.9974	0.9948	7.5527
ZDV	1	0.0008	-0.0052	0.9983	0.9967	2.3008
	2	0.0007	-0.0002	0.9972	0.9944	3.8986
	3	0.0007	0.2370	0.9970	0.9940	7.0086
LPV	1	0.0052	-0.3389	0.9998	0.9995	2.2006
	2	0.0049	-0.1264	0.9957	0.9915	10.2196
	3	0.0049	0.2550	0.9976	0.9952	7.9328
RTV	1	0.0034	-0.0144	0.9987	0.9974	4.8235
	2	0.0034	0.0120	0.9974	0.9948	4.4521
	3	0.0034	-0.0188	0.9979	0.9958	4.5934

%EER: Error relativo debido a la regresión lineal



**Tabla 17. Exactitud de las curvas de calibración de LMV**

Concentración nominal (ng/mL)	Curva 1		Curva 2		Curva 3	
	Concentración calculada (ng/mL)	%DEA	Concentración calculada (ng/mL)	%DEA	Concentración calculada (ng/mL)	%DEA
50	49.0	2.0	49.0	2.0	50.7	1.3
100	103.6	3.6	100.0	0.0	100.2	0.2
250	264.7	5.9	279.6	11.8	236.1	5.6
500	458.0	8.4	506.1	1.2	452.1	9.6
1000	980.4	2.0	913.7	8.6	1125.6	12.6
2000	1974.8	1.3	1984.4	0.8	2072.3	3.6
3000	3126.6	4.2	2950.6	1.6	2925.0	2.5

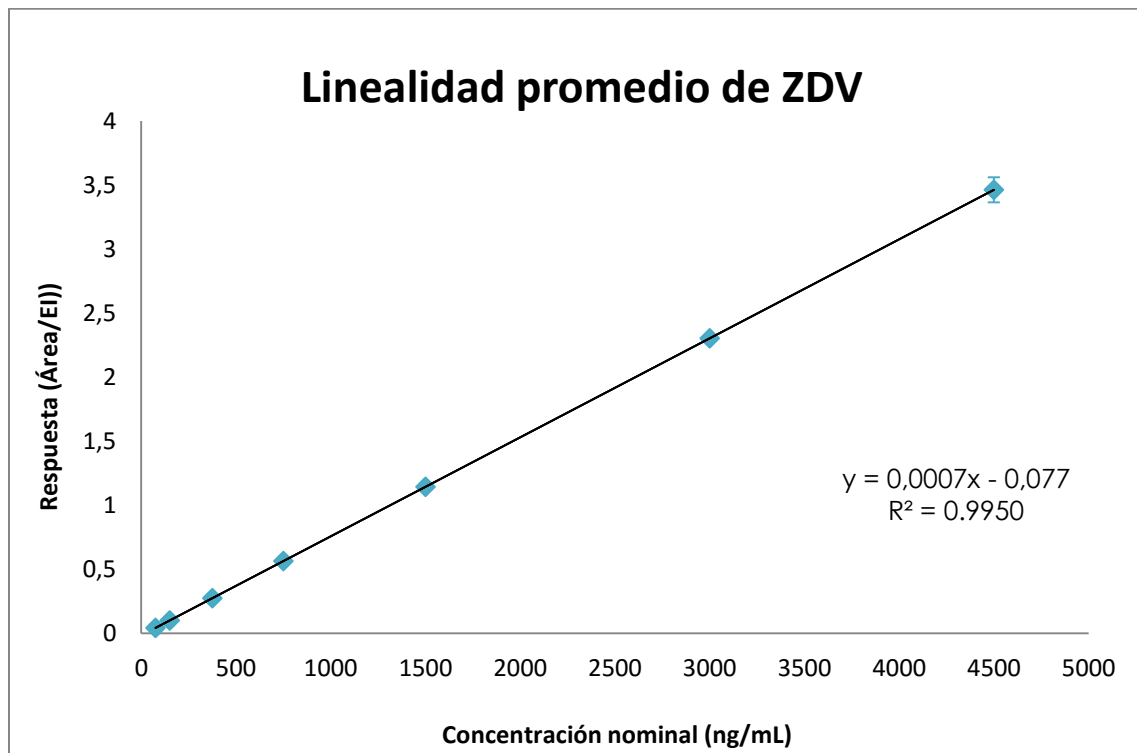


**Figura 19. Linealidad promedio de LMV (50-3000 ng/mL).**



**Tabla 18. Exactitud de las curvas de calibración de ZDV**

Concentración nominal (ng/mL)	Curva 1		Curva 2		Curva 3	
	Concentración calculada (ng/mL)	%DEA	Concentración calculada (ng/mL)	%DEA	Concentración calculada (ng/mL)	%DEA
75	72.2	3.7	70.5	6.0	72.4	3.4
<b>150</b>	160.4	6.9	163.9	9.3	162.7	8.4
<b>375</b>	393.2	4.8	407.6	8.7	369.5	1.5
<b>750</b>	697.0	7.1	746.2	0.5	686.9	8.4
<b>1500</b>	1513.6	0.9	1465.4	2.3	1608.2	7.2
<b>3000</b>	2942.3	1.9	2937.6	2.1	3075.0	2.5
<b>4500</b>	4501.4	0.0	4183.5	7.0	4282.3	4.8



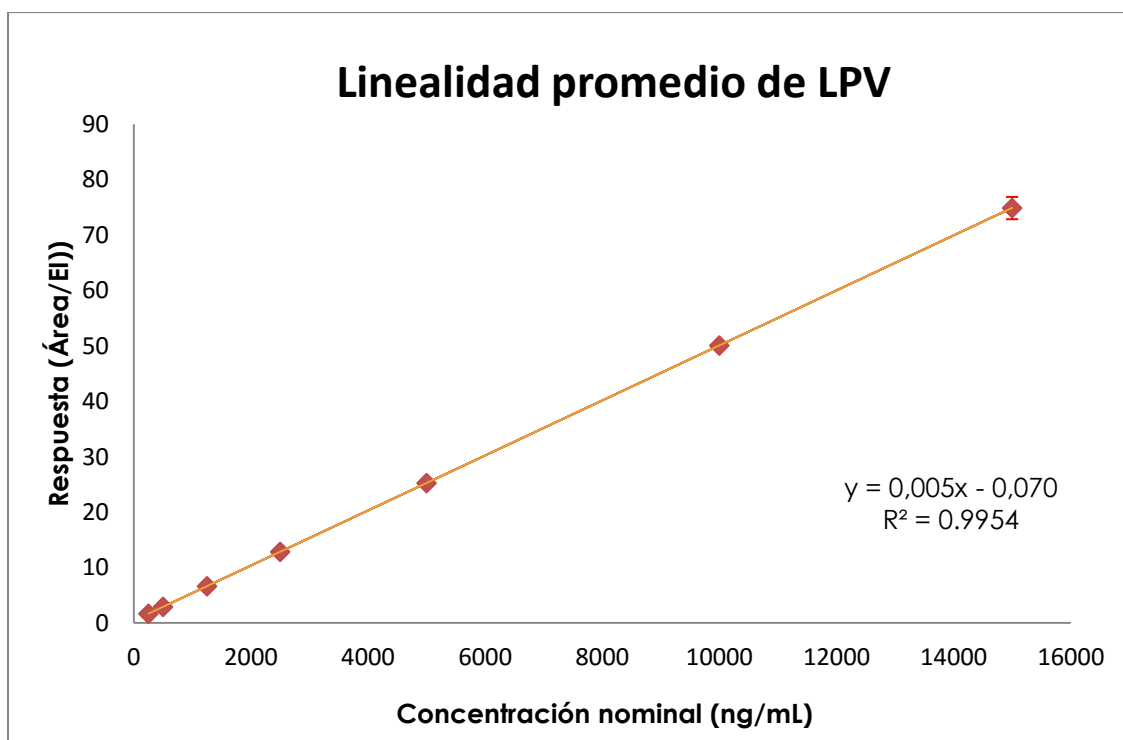
**Figura 20. Linealidad promedio de ZDV (75-4500 ng/mL).**





**Tabla 19. Exactitud de las curvas de calibración de LPV**

Concentración nominal (ng/mL)	Curva 1		Curva 2		Curva 3	
	Concentración calculada (ng/mL)	%DEA	Concentración calculada (ng/mL)	%DEA	Concentración calculada (ng/mL)	%DEA
<b>250</b>	249.2	0.3	245.1	2.0	254.6	1.8
<b>500</b>	502.4	0.5	503.1	0.6	504.7	0.9
<b>1250</b>	1236.6	1.1	1344.6	7.6	1092.7	12.6
<b>2500</b>	2572.4	2.9	2542.7	1.7	2378.8	4.8
<b>5000</b>	5071.1	1.4	5139.5	2.8	5609.2	12.2
<b>10 000</b>	9937.2	0.6	10082.3	0.8	10501.3	5.0
<b>15 000</b>	14583.2	2.8	13267.4	11.6	14618.0	2.5

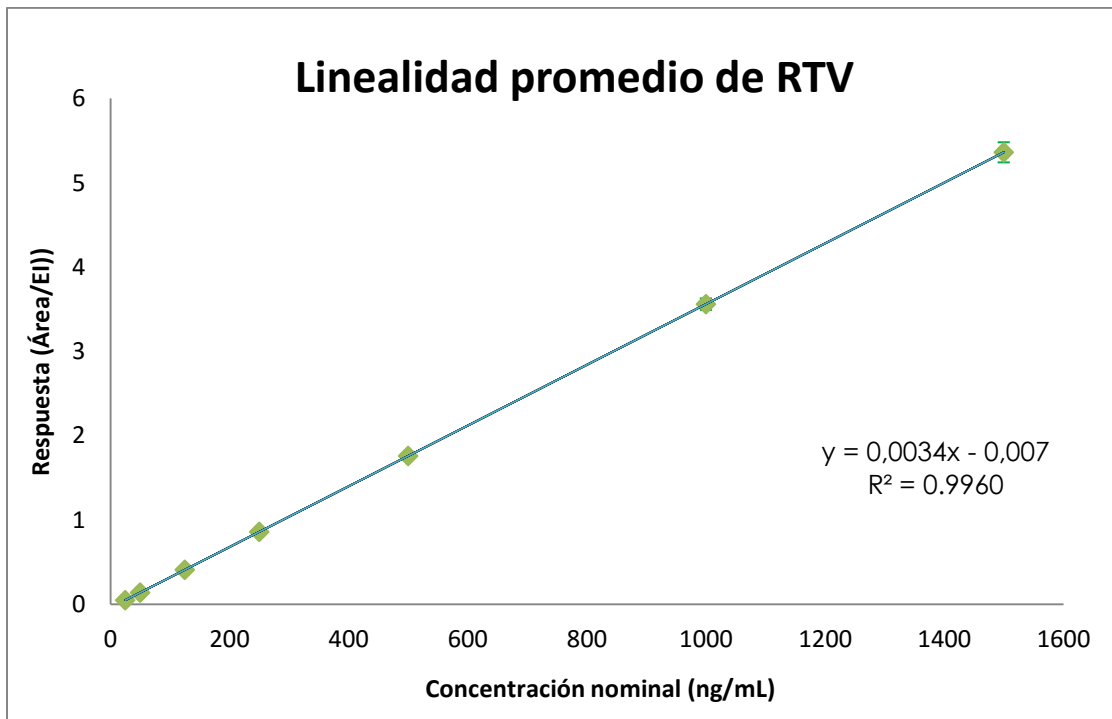


**Figura 21. Linealidad promedio de LPV (250-15000 ng/mL).**



**Tabla 20. Exactitud de las curvas de calibración de RTV**

	Curva 1		Curva 2		Curva 3	
Concentración nominal (ng/mL)	Concentración calculada (ng/mL)	%DEA	Concentración calculada (ng/mL)	%DEA	Concentración calculada (ng/mL)	%DEA
<b>25</b>	25.5	2.1	25.8	3.1	25.4	1.6
<b>50</b>	48.8	2.3	46.2	7.6	50.7	1.3
<b>125</b>	121.5	2.8	132.6	6.1	112.7	9.9
<b>250</b>	239.7	4.1	233.3	6.7	235.1	5.9
<b>500</b>	483.1	3.4	501.2	0.2	503.1	0.6
<b>1000</b>	1029.2	2.9	1052.1	5.2	1084.8	8.5
<b>1500</b>	1613.7	7.6	1494.8	0.3	1556.6	3.8



**Figura 22. Linealidad promedio de RTV (25-1500 ng/mL).**



## 5.2.6 Precisión

### 5.2.6.1 Repetibilidad

Según el criterio de la NOM-177-2013 el %C.V. de la concentración interpolada para el LIC no debe ser mayor al 20%. Asimismo, las MC evaluadas cumplieron con el criterio establecido ya que ninguno de los %C.V. sobrepasa el 15%.

En el caso de la MCD, a las muestras les fue aplicado un factor de dilución de 1:4; como puede observarse en las Tablas 21-24, el %C.V. no fue mayor al 15% para ninguno de los fármacos, por lo que la dilución de la muestra puede efectuarse de forma confiable. Los datos de repetibilidad son reportados en las Tablas 21 a la 24 para LMV, ZDV, LPV y RTV respectivamente.

**Tabla 21. Repetibilidad de LMV**

Replica	LIC (50 ng/mL)	MCB (150 ng/mL)	MCM (700 ng/mL)	MCA (2400 ng/mL)	MCD calculada (ng/mL)	MCD 1:4 (4000 ng/mL)
1	51.1	141.4	638.9	2165.3	866.5	3466.0
2	41.9	135.8	575.0	2059.8	890.6	3562.4
3	43.1	146.1	640.0	2188.1	944.7	3778.8
4	56.2	177.9	652.8	2173.3	924.6	3698.4
5	52.7	141.9	662.5	2305.9	896.4	3585.6
<b>PROMEDIO</b>	49.0	148.62	633.84	2178.48	904.56	3618.24
<b>DE</b>	6.22	16.77	34.30	87.48	30.50	122.03
<b>%C.V.</b>	<b>12.71</b>	<b>11.28</b>	<b>5.41</b>	<b>4.01</b>	<b>3.37</b>	<b>3.37</b>



**Tabla 22. Repetibilidad de ZDV**

Replica	LIC (75 ng/mL)	MCB (225 ng/mL)	MCM (1050 ng/mL)	MCA (3600 ng/mL)	MCD calculada (ng/mL)	MCD 1:4 (6000 ng/mL)
1	70.4	226.0	911.9	3261.7	1368.3	5473.2
2	69.3	199.8	896.6	3116.2	1373.9	5495.6
3	76.6	210.4	1012.3	3420.4	1433.0	5732.0
4	78.3	228.1	967.3	3237.1	1465.5	5862.0
5	77.7	220.0	977.9	3331.3	1288.1	5152.4
<b>PROMEDIO</b>	74.46	216.86	953.2	3273.34	1385.76	5543.04
<b>DE</b>	4.27	11.75	47.98	113.05	68.14	272.56
<b>%C.V.</b>	<b>5.73</b>	<b>5.42</b>	<b>5.03</b>	<b>3.45</b>	<b>4.92</b>	<b>4.91</b>

**Tabla 23. Repetibilidad de LPV**

Replica	LIC (250 ng/mL)	MCB (750 ng/mL)	MCM (3500 ng/mL)	MCA (12 000 ng/mL)	MCD calculada (ng/mL)	MCD 1:4 (20 000 ng/mL)
1	243.9	752.0	3186.9	11215.7	4688.9	18755.6
2	240.9	687.3	3160.9	11153.3	4793.8	19175.2
3	256.8	695.7	3547.0	12098.0	4879.9	19519.6
4	250.8	781.7	3518.0	11197.4	5199.9	20799.6
5	279.5	739.7	3686.5	11604.0	4558.6	18234.4
<b>PROMEDIO</b>	254.38	731.28	3419.86	11453.68	4824.22	19296.88
<b>DE</b>	15.34	39.50	233.57	403.20	241.88	967.52
<b>%C.V.</b>	<b>6.03</b>	<b>5.40</b>	<b>6.83</b>	<b>3.52</b>	<b>5.01</b>	<b>5.01</b>



**Tabla 24. Repetibilidad de RTV**

Replica	LIC (25 ng/mL)	MCB (75 ng/mL)	MCM (350 ng/mL)	MCA (1200 ng/mL)	MCD calculada (ng/mL)	MCD 1:4 (2000 ng/mL)
1	27.6	71.9	308.0	1173.4	482.3	1929.2
2	24.1	71.2	304.3	1167.6	478.1	1912.4
3	23.3	63.5	334.4	1267.5	485.4	1941.6
4	24.5	84.5	332.6	1179.9	531.3	2125.2
5	27.8	78.7	360.1	1279.0	463.6	1854.4
<b>PROMEDIO</b>	25.46	73.96	327.88	1213.48	488.14	1952.56
<b>DE</b>	2.09	7.98	22.66	54.88	25.53	102.12
<b>%C.V.</b>	<b>8.21</b>	<b>10.79</b>	<b>6.91</b>	<b>4.52</b>	<b>5.23</b>	<b>5.23</b>

Los coeficientes de variación oscilaron entre un 3.37-12.71% para LMV, 3.45- 5.42% para ZDV, 3.52- 6.83% para LPV y finalmente 4.52-10.79% para RTV.

### 5.2.5.2 Reproducibilidad

En las Tablas 25 a 28 se reporta la reproducibilidad del método evaluado en tres diferentes días de análisis. Tanto las MC como el LIC cumplen con la especificación, obteniendo un %C.V. menor al 15%.



**Tabla 25. Reproducibilidad de LMV**

	Replica	LIC (50 ng/mL)	MCB (150 ng/mL)	MCM (700 ng/mL)	MCA (2400 ng/mL)
Día 1	1	51.1	141.4	638.9	2165.3
	2	41.9	135.8	575.0	2059.8
	3	43.1	146.1	640.0	2188.1
	4	56.2	177.9	652.8	2173.3
	5	52.7	141.9	662.5	2305.9
Día 2	6	47.7	147.6	659.5	2486.9
	7	41.5	147.2	637.5	2401.7
	8	47.8	162.4	780.7	2388.9
	9	51.3	147.6	686.1	2639.9
	10	50.0	146.8	726.8	2687.6
Día 3	11	48.3	133.9	683.9	2468.1
	12	54.2	142.7	613.7	2181.8
	13	48.0	146.0	648.9	2710.1
	14	51.2	130.4	651.4	2398.9
	15	51.3	144.5	637.4	2427.1
	<b>PROMEDIO</b>	<b>49.13</b>	<b>144.08</b>	<b>672.59</b>	<b>2479.10</b>
	DE	3.40	8.62	49.50	161.42
	<b>%C.V.</b>	<b>6.92</b>	<b>5.98</b>	<b>7.36</b>	<b>6.51</b>

**Tabla 26. Reproducibilidad de ZDV**

	Replica	LIC (75 ng/mL)	MCB (225 ng/mL)	MCM (1050 ng/mL)	MCA (3600 ng/mL)
Día 1	1	70.4	226.0	911.9	3261.7
	2	69.3	199.8	896.6	3116.2
	3	76.6	210.4	1012.3	3420.4
	4	78.3	228.1	967.3	3237.1
	5	77.7	220.0	977.9	3331.3
Día 2	6	67.3	254.6	967.8	3641.8
	7	68.1	228.6	915.1	3773.1
	8	84.1	227.9	1134.6	3662.4
	9	74.6	205.9	975.0	3805.4
	10	74.5	219.8	952.7	3904.6
Día 3	11	70.1	204.9	1064.0	3734.0
	12	75.1	220.9	952.4	3227.3
	13	74.8	220.4	1011.2	4076.3
	14	74.7	211.9	982.2	3676.3
	15	77.7	241.5	951.1	3641.9
	<b>PROMEDIO</b>	<b>74.10</b>	<b>223.64</b>	<b>990.61</b>	<b>3714.31</b>
	DE	4.87	15.48	64.58	218.88
	<b>%C.V.</b>	<b>6.57</b>	<b>6.92</b>	<b>6.52</b>	<b>5.89</b>



**Tabla 27. Reproducibilidad de LPV**

	Replica	LIC (250 ng/mL)	MCB (750 ng/mL)	MCM (3500 ng/mL)	MCA (12 000 ng/mL)
Día 1	1	243.9	752.0	3186.9	11215.7
	2	240.9	687.3	3160.9	11 153.3
	3	256.8	695.7	3547.0	12 098.0
	4	250.8	781.7	3518.0	11 197.4
	5	279.5	739.7	3686.5	11 604.0
Día 2	6	238.3	846.1	3384.2	11 848.0
	7	239.9	769.5	3209.2	12 193.6
	8	245.5	811.2	3870.4	11 374.7
	9	266.1	741.4	3520.0	12 291.8
	10	253.1	751.4	3483.4	12 698.7
Día 3	11	219.9	696.7	3767.5	12 768.9
	12	242.3	739.2	3180.9	11 224.8
	13	235.9	742.8	3486.6	13 884.2
	14	239.9	660.7	3411.7	12 337.4
	15	270.3	816.0	3320.0	12 576.8
	<b>PROMEDIO</b>	<b>245.12</b>	<b>757.50</b>	<b>3463.39</b>	<b>12 319.89</b>
	DE	14.79	55.99	220.15	759.42
	<b>%C.V.</b>	<b>6.03</b>	<b>7.39</b>	<b>6.35</b>	<b>6.16</b>

**Tabla 28. Reproducibilidad de RTV**

	Replica	LIC (25 ng/mL)	MCB (75 ng/mL)	MCM (350 ng/mL)	MCA (1200 ng/mL)
Día 1	1	27.6	71.9	308.0	1173.4
	2	24.1	71.2	304.3	1167.6
	3	23.3	63.5	334.4	1267.5
	4	24.5	84.5	332.6	1179.9
	5	27.8	78.7	360.1	1279.0
Día 2	6	22.2	78.4	335.0	1292.3
	7	26.7	72.3	326.6	1341.7
	8	23.1	84.8	391.9	1292.2
	9	28.5	79.5	349.7	1362.5
	10	27.8	69.8	341.9	1341.6
Día 3	11	21.3	64.4	360.9	1351.9
	12	24.0	70.9	304.7	1188.9
	13	20.3	71.4	331.0	1465.7
	14	21.5	67.0	318.1	1331.8
	15	25.2	76.3	311.4	1317.0
	<b>PROMEDIO</b>	<b>24.06</b>	<b>73.48</b>	<b>337.12</b>	<b>1328.56</b>
	DE	2.88	6.21	25.76	69.23
	<b>%C.V.</b>	<b>11.97</b>	<b>8.45</b>	<b>7.64</b>	<b>5.21</b>



Con base en la evaluación de la repetibilidad y la reproducibilidad se concluye que el método es preciso para cada nivel de concentración evaluado.

### 5.2.7 Exactitud

Según lo establecido en la normatividad mexicana, el método es exacto cuando el promedio del %DEA de los datos de repetibilidad y reproducibilidad no sobrepasa el 15% para las MC mientras que para el LIC no debe ser mayor al 20%. En las Tablas 29 a 32 se puede observar que en algunos días en distintos controles este porcentaje sobrepasa el 15% y al correlacionarlos con la precisión que mostraron en determinado día, podemos constatar que corresponde a controles que tienen un sesgo mayor en su concentración calculada con respecto al promedio de la concentración. Teniendo en cuenta que la exactitud tiene que ver con cuan cerca se está del valor real y la precisión en cuan cerca entre sí están un conjunto de medidas es correcto decir que en cuanto menor sea el sesgo entre las concentraciones calculadas más exacta es una medición.

Sin embargo el promedio del %DEA cumple con el criterio de aceptación para los cuatro fármacos antirretrovirales por lo tanto se concluye que el método es exacto.

**Tabla 29. Evaluación de la exactitud de LMV (%DEA)**

%DEA	Replica*	LIC (50 ng/mL)	MCB (150 ng/mL)	MCM (700 ng/mL)	MCA (2400 ng/mL)
Día 1	1	2.1	5.7	8.5	9.8
	2	16.3	9.5	17.9	14.2
	3	13.8	2.6	8.6	8.8
	4	12.4	18.6	6.7	9.4
	5	5.3	5.4	5.4	3.9
Día 2	6	4.7	1.6	5.8	3.6
	7	17.0	1.9	8.9	0.1
	8	4.3	8.3	11.5	0.5
	9	2.6	1.6	2.0	10.0
	10	0.1	2.2	3.8	12.0
Día 3	11	3.4	10.7	2.3	2.8
	12	8.5	4.9	12.3	9.1
	13	4.0	2.7	7.3	12.9
	14	2.4	13.0	6.9	0.0
	15	2.6	3.7	8.9	1.1
	<b>%DEA PROMEDIO</b>	<b>6.63</b>	<b>6.16</b>	<b>7.78</b>	<b>6.54</b>

\* Datos correspondientes a la reproducibilidad mostrados en la Tabla 25.





**Tabla 30. Evaluación de la exactitud de ZDV (%DEA)**

%DEA	Replica*	LIC (75 ng/mL)	MCB (225 ng/mL)	MCM (1050 ng/mL)	MCA (3600 ng/mL)
Día 1	1	6.1	0.4	13.1	9.4
	2	7.6	11.2	14.6	13.4
	3	2.1	6.5	3.6	5.0
	4	4.4	1.4	7.9	10.1
	5	3.6	2.2	6.9	7.5
Día 2	6	10.3	13.2	7.8	1.2
	7	9.2	1.6	12.8	4.8
	8	12.1	1.3	8.1	1.7
	9	0.5	8.5	7.1	5.7
	10	0.6	2.3	9.3	8.5
Día 3	11	6.5	8.9	1.3	3.7
	12	0.2	1.8	9.3	10.4
	13	0.2	2.0	3.7	13.2
	14	0.4	5.8	6.5	2.1
	15	3.7	7.4	9.4	1.2
	<b>%DEA PROMEDIO</b>	<b>4.50</b>	<b>4.96</b>	<b>8.09</b>	<b>6.52</b>

\* Datos correspondientes a la reproducibilidad mostrados en la Tabla 26.

**Tabla 31. Evaluación de la exactitud de LPV (%DEA)**

%DEA	Replica*	LIC (250 ng/mL)	MCB (750 ng/mL)	MCM (3500 ng/mL)	MCA (12 000 ng/mL)
Día 1	1	2.4	0.3	8.9	6.5
	2	3.6	8.4	9.7	7.1
	3	2.7	7.2	1.3	0.8
	4	0.3	4.2	0.5	6.7
	5	11.8	1.4	5.3	3.3
Día 2	6	4.7	12.8	3.3	1.3
	7	4.1	2.6	8.3	1.6
	8	1.8	8.2	10.6	5.2
	9	6.5	1.2	0.6	2.4
	10	1.3	0.2	0.5	5.8
Día 3	11	12.1	7.1	7.6	6.4
	12	3.1	1.4	9.1	6.5
	13	5.6	1.0	0.4	15.7
	14	4.0	11.9	2.5	2.8
	15	8.1	8.8	5.1	4.8
	<b>%DEA PROMEDIO</b>	<b>4.81</b>	<b>5.11</b>	<b>4.91</b>	<b>5.12</b>

\* Datos correspondientes a la reproducibilidad mostrados en la Tabla 27.



**Tabla 32. Evaluación de la exactitud de RTV (%DEA)**

%DEA	Replica*	LIC (25 ng/mL)	MCB (75 ng/mL)	MCM (350 ng/mL)	MCA (1200 ng/mL)
Día 1	1	10.4	4.1	12.0	2.2
	2	3.5	5.1	13.1	2.7
	3	6.9	15.4	4.4	5.6
	4	2.2	12.7	5.0	1.7
	5	11.0	5.0	2.9	6.6
Día 2	6	11.1	4.6	4.3	7.7
	7	7.0	3.6	6.7	11.8
	8	7.6	13.0	12.0	7.7
	9	13.9	6.0	0.1	13.5
	10	11.1	6.9	2.3	13.2
Día 3	11	14.8	14.2	3.1	12.7
	12	3.8	5.5	13.0	0.9
	13	18.9	4.9	5.4	22.1
	14	13.9	10.7	9.1	11.0
	15	0.8	1.8	11.0	9.8
	<b>%DEA PROMEDIO</b>	<b>9.12</b>	<b>7.56</b>	<b>6.96</b>	<b>8.61</b>

\* Datos correspondientes a la reproducibilidad mostrados en la Tabla 28.

### 5.2.8 Estabilidades

La NOM-177-2013 especifica que una muestra se considera estable a determinadas condiciones cuando al ser interpolada en una curva de calibración recién preparada, la desviación promedio calculada se encuentra dentro del 15%. Se evaluaron estabilidades a 24 horas de las muestras plasmáticas y procesadas en diferentes condiciones de temperatura. En las Tablas 33 a 36 se muestran los resultados para cada MC analizada.

Se puede observar que las muestras plasmáticas son estables a 24 horas ya que presentan un %DEA menor al 15% a temperatura ambiente, refrigeración y congelación, siendo esta última condición de almacenamiento la más recomendable para asegurar la estabilidad de los cuatro analitos. Bajo esta condición de congelación se evaluó la estabilidad de los analitos por un periodo de 30 días, cumpliendo con los



criterios de aceptación establecidos, por lo cual las muestras pueden conservarse y deben ser procesadas dentro de este periodo de tiempo.

Por otro lado las muestras procesadas y almacenadas a temperatura ambiente, en el inyector a una temperatura de 5°C y en congelación muestran una desviación no mayor al 15% por lo tanto las muestras se consideran estables después de 24 horas ante una posible re-inyección.

Ante el posible re-análisis de alguna muestra descongelada con anterioridad, esta puede procesarse sin comprometer la estabilidad de los analitos como se muestra en los resultados de estabilidad bajo tres ciclos de congelación y descongelación, sin embargo, se sugiere probar un menor número de ciclos durante un periodo de tiempo mayor entre ciclos para poder garantizar que no existe evidencia de la degradación de la muestra bajo estas condiciones.

Con todo lo anterior, el análisis de las muestras deberá ser completado durante el periodo y las condiciones de almacenamiento en el cual se ha demostrado estabilidad de las muestras.

**Tabla 33. Evaluación de la estabilidad de LMV**

Muestra	Condición	%DEA promedio		
		MCB	MCM	MCA
Procesada a las 24 h	Temperatura ambiente (23°C)	4.03	3.26	11.40
	Temperatura automuestreador (5°C)	3.82	9.12	8.14
	Temperatura de congelación (-84°C)	7.80	5.16	7.80
Plasmática a las 24 h	Temperatura ambiente (23°C)	13.10	4.20	8.43
	Temperatura de refrigeración (8°C)	4.83	7.33	8.80
	Temperatura de congelación (-84°C)	5.56	1.86	5.00
	Ciclos de congelación y descongelación (3)	7.05	6.28	9.35
	Largo plazo a congelación (30 días)	9.06	7.86	2.02



**Tabla 34. Evaluación de la estabilidad de ZDV**

Muestra	Condición	%DEA		
		MCB	MCM	MCA
Procesada a las 24 h	Temperatura ambiente (23°C)	8.23	4.00	6.96
	Temperatura automuestreador (5°C)	3.46	3.50	2.52
	Temperatura de congelación (-84°C)	8.40	4.26	8.06
Plasmática a las 24 h	Temperatura ambiente (23°C)	8.20	2.10	6.80
	Temperatura de refrigeración (8°C)	3.16	4.36	7.43
	Temperatura de congelación (-84°C)	5.40	4.20	7.40
	Ciclos de congelación y descongelación (3)	3.03	4.29	2.91
	Largo plazo a congelación (30 días)	5.16	4.80	5.81

**Tabla 35. Evaluación de la estabilidad de LPV**

Muestra	Condición	%DEA		
		MCB	MCM	MCA
Procesada a las 24 h	Temperatura ambiente (23°C)	8.50	3.06	7.30
	Temperatura automuestreador (5°C)	5.18	3.10	3.88
	Temperatura de congelación (-84°C)	7.80	4.36	9.83
Plasmática a las 24 h	Temperatura ambiente (23°C)	9.50	2.56	5.76
	Temperatura de refrigeración (8°C)	2.20	7.13	6.70
	Temperatura de congelación (-84°C)	4.30	6.16	6.96
	Ciclos de congelación y descongelación (3)	5.23	7.46	3.31
	Largo plazo a congelación (30 días)	12.47	5.25	3.46

**Tabla 36. Evaluación de la estabilidad de RTV**

Muestra	Condición	%DEA		
		MCB	MCM	MCA
Procesada a las 24 h	Temperatura ambiente (23°C)	10.53	3.56	10.36
	Temperatura automuestreador (5°C)	9.02	5.96	9.02
	Temperatura de congelación (-84°C)	4.53	5.93	7.10
Plasmática a las 24 h	Temperatura ambiente (23°C)	4.83	2.20	5.73
	Temperatura de refrigeración (8°C)	1.96	7.33	13.40
	Temperatura de congelación (-84°C)	6.83	3.66	12.36
	Ciclos de congelación y descongelación (3)	9.63	1.64	4.42
	Largo plazo a congelación (30 días)	7.97	4.02	3.88



**Tabla 37. Evaluación de la estabilidad en solución**

Temporalidad	LMV	ZDV	LPV	RTV	SMV
	%DEA promedio	%DEA promedio	%DEA promedio	%DEA promedio	%DEA promedio
<b>1 semana</b>	5.80	10.89	1.05	2.01	7.18
<b>2 semanas</b>	9.08	12.09	2.03	3.82	9.62
<b>4 semanas</b>	7.64	25.30	9.6	5.67	12.85

Del mismo modo, las soluciones de referencia de cada fármaco almacenadas en refrigeración pueden emplearse con seguridad por hasta un periodo de un mes para el caso de LMV, RTV y LPV, por 15 días para el EI y con cierta reserva hasta por una semana para ZDV.



**Tabla 38. Resumen de los resultados de la validación del método analítico**

Parámetro	Resultado				Especificación
	LMV	ZDV	LPV	RTV	
<b>Selectividad</b>	No existen interferencias significativas en el tiempo de retención de los fármacos.				La respuesta analítica de las interferencias debe ser menor al 20% para el LIC y 5% para el EI.
<b>Efecto matriz</b>	MCB:15.4% MCA:12.9%	MCB:10.6% MCA:7.9%	MCB:9.7% MCA:7.2%	MCB:9.4% MCA:6.6%	El %CV de los FMN <15%.
<b>Efecto de acarreo</b>	No existen interferencias significativas en el tiempo de retención de los fármacos.				La respuesta analítica de las interferencias debe ser menor al 20% para el LIC y 5% para el EI.
<b>Linealidad</b>	$r^2 > 0.99$ en todas las curvas de calibración de los fármacos. %DEA <15% en todos los puntos de la curva.				%DEA <15% en todos los puntos de la curva y < 20% para el LIC
<b>Repetibilidad</b>	LIC:12.7% MCB:11.3% MCM:5.4 % MCA:4.0% MCD:3.3%	LIC: 5.7% MCB: 5.4% MCM: 5.0% MCA: 3.4% MCD: 4.9%	LIC: 6.0% MCB:5.4% MCM: 6.8% MCA: 3.5% MCD:5.0 %	LIC: 8.2% MCB: 10.8% MCM: 6.9% MCA: 4.5% MCD: 5.2%	%C.V. <15% para MCB, MCM, MCA y MCD. Para LIC <20%.
<b>Reproducibilidad</b>	LIC:6.9% MCB:5.9% MCM:7.3% MCA:6.5%	LIC:6.5% MCB:6.9% MCM:6.5% MCA:5.9%	LIC:6.0% MCB:7.4% MCM:6.3% MCA:6.1%	LIC:11.9% MCB:8.4% MCM:7.6% MCA:5.2%	%C.V. <15% para MC y <20% para LIC
<b>Exactitud</b>	LIC:6.6% MCB:6.1% MCM:7.7% MCA:6.5%	LIC:4.5% MCB:4.9% MCM:8.0% MCA:6.5%	LIC:4.8% MCB:5.1% MCM:4.9% MCA:5.1%	LIC:9.1% MCB:7.5% MCM:6.9% MCA:8.6%	El promedio del %DEA <15% de los datos obtenidos en reproducibilidad.
<b>Estabilidad</b>	Las muestras no procesadas son estables a Tamb, en refrigeración (8°C) y congelación (-84°C) por 24 horas. Son estables a 3 ciclos de congelación-descongelación y a largo plazo (1 mes).				La muestra se considera estable a las condiciones probadas si el %DEA<15% de la concentración nominal.
	Las muestras procesadas son estables a Tamb, en automuestreador (5°C) y congelación (-84°C) por 24 horas.				



### 5.3 Aplicación del método analítico en la determinación de las concentraciones de los fármacos antirretrovirales en mujeres embarazadas VIH positivas

Finalmente, una vez validado el método analítico y con base en los resultados obtenidos en la corrida analítica se determinaron las concentraciones mínimas en el estado estacionario de la TARAA en ocho voluntarias durante el tercer trimestre de embarazo. Los resultados obtenidos durante la corrida analítica el día del análisis de las muestras se presentan en la Tabla 39. Como se puede observar, se verificó el buen funcionamiento del sistema mediante los parámetros de adecuabilidad y efecto de arrastre entre inyección. La linealidad y los resultados obtenidos en la precisión y exactitud de las muestras control evaluadas cumplieron con la especificación señalada, por lo cual la corrida analítica y los resultados obtenidos de las muestras de las voluntarias fueron aceptados.

**Tabla 39.** Resultados de la corrida analítica en la aplicación del método

Parámetro	Resultado				Especificación
	LMV	ZDV	LPV	RTV	
<b>Adecuabilidad del sistema</b>	LMV/SMV: 4.92	ZDV/SMV: 3.75	LPV/SMV: 3.99	RTV/SMV: 3.36	%C.V.de la relación de áreas para cada analito debe ser <6%
<b>Efecto de acarreo</b>	No existen interferencias significativas en el tiempo de retención de los fármacos.				La respuesta analítica de las interferencias debe ser menor al 20% para el LIC y 5% para el EI.
<b>Linealidad</b>	$r^2 > 0.99$ en todas las curvas de los fármacos. %DEA <15% en todos los puntos de la curva.				%DEA <15% y en todos los puntos de la curva y < 20% para el LIC.
<b>Precisión</b>	MCB: 11.3% MCM: 5.4% MCA: 4.0%	MCB:5.4% MCM:5.0% MCA:3.4%	MCB:5.4% MCM:6.8 % MCA:3.5%	MCB:10.7 % MCM: 6.9% MCA:4.5%	%C.V. <15% para MCA, MCM y MCB.
<b>Exactitud</b>	MCB: 8.3% MCM: 9.4% MCA: 9.2%	MCB: 4.3% MCM: 9.2% MCA: 9.1%	MCB: 4.3% MCM: 5.1% MCA: 4.8%	MCB:8.6% MCM: 7.4% MCA: 3.7%	El promedio del %DEA <15% en los datos obtenidos en reproducibilidad.

Los resultados de las muestras de las voluntarias se muestran en la Tabla 40, dónde se puede observar que la mayoría de las pacientes muestran concentraciones detectables para LPV y RTV, sin embargo, la concentración de ZDV y LMV en algunas de ellas se encuentra en niveles no detectables en el intervalo de linealidad establecido.



De igual manera en la *Figura 23* se muestra un cromatograma representativo de la voluntaria V3M1 con el esquema de la TARAA a las 34 semanas de gestación.

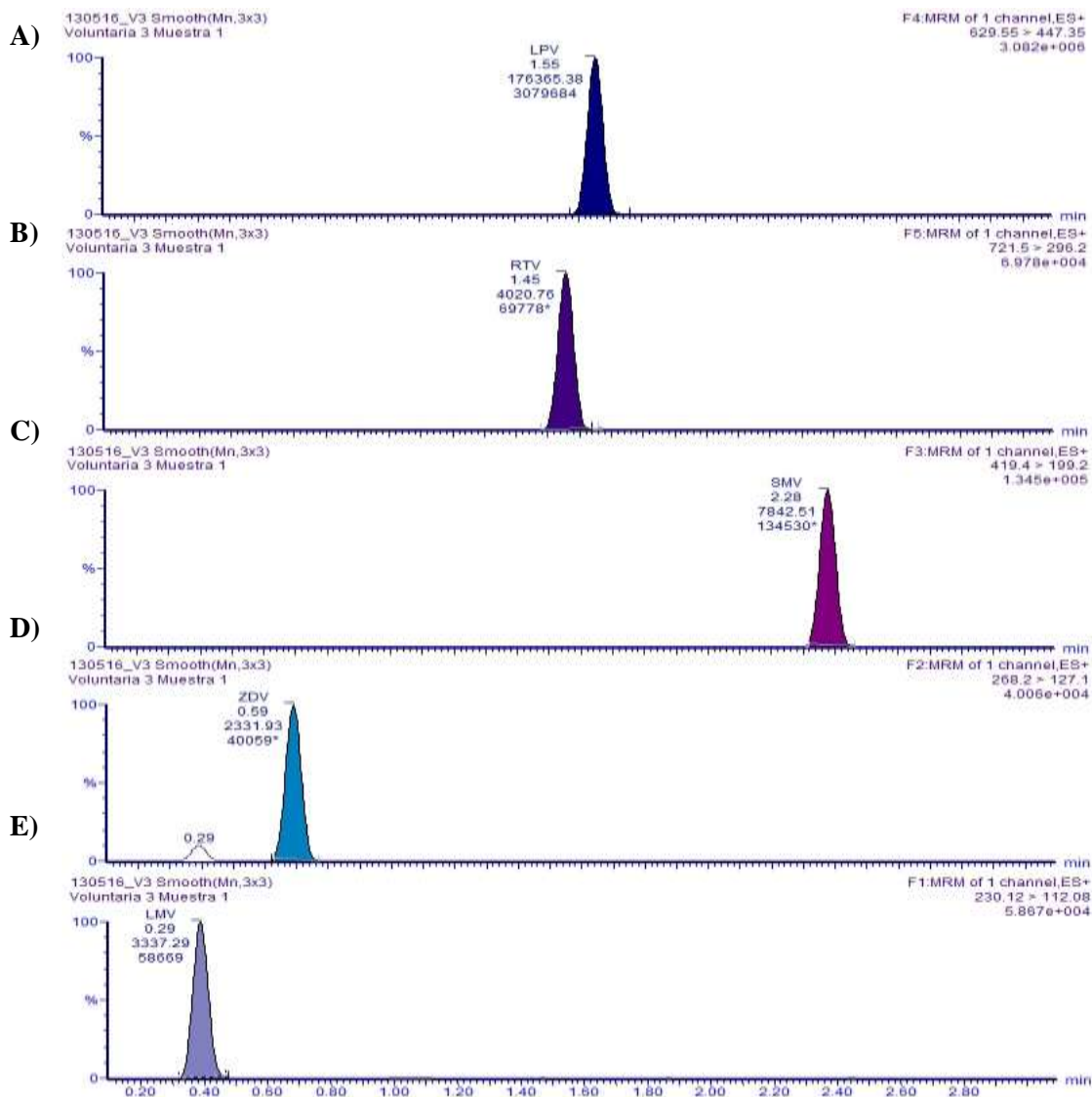
La aplicación del método analítico en este tipo de población representa una valiosa herramienta que puede colaborar en la comprobación de la eficacia de la TARAA evaluando el cumplimiento del tratamiento durante el embarazo. Esta clase de fármacos han demostrado una gran variabilidad farmacocinética que tiene estrecha relación con los efectos tóxicos, la ineffectividad en el tratamiento y la adherencia al mismo, por lo cual el estudio de la farmacocinética de los antirretrovirales y su correlación con la respuesta terapéutica, es clave para la selección de una dosis óptima de los tratamientos. Del mismo modo, la cuantificación de múltiples fármacos en una sola determinación es beneficiosa ya que el tratamiento antirretroviral se administra en combinación.

**Tabla 39.** *Determinación de la concentración de antirretrovirales en mujeres embarazadas VIH+*

Voluntaria	Concentración calculada (ng/mL)				Temporalidad	Esquema
	LMV	ZDV	LPV	RTV		
V1M1	69,9	ND	2992,6	74,1	34 semanas	<i>Kaletra® Combivir®</i>
V1M2	ND	ND	ND	ND	38 semanas	<i>Kaletra® Combivir®</i>
V3M1	223,9	364,4	4321,5	152,4	34 semanas	<i>Kaletra® Combivir®</i>
V7M1	ND	ND	5616,2	237,9	34 semanas	<i>Kaletra® Combivir® Didanosina</i>
V8M1	81,8	ND	5082	154,3	36 semanas	<i>Kaletra® Combivir®</i>
V10M1	364,3	77,2	8265,7	608,5	34 semanas	<i>Kaletra® Combivir®</i>
V11M1	85,3	ND	5405,3	209,2	36 semanas	<i>Kaletra® Combivir®</i>
V12M1	ND	ND	ND	ND	27 semanas	<i>Kaletra® Combivir®</i>
V12M2	ND	ND	ND	ND	38 semanas	<i>Kaletra® Combivir®</i>
V13M1	ND	ND	13426,3	921,7	36 semanas	<i>Kaletra® Combivir®</i>

\*VxMx: Número de voluntaria/Número de muestra; ND: No detectable; Kaletra®: LPV/r; Combivir®: LMV/ZDV





**Figura 23.** Cromatograma representativo de muestra de paciente embarazada VIH+ tratada con la combinación de los cuatro fármacos antirretrovirales (V3M1) **A.** RTV (152.4 ng/mL); **B.** LPV (4321.5 ng/mL); **C.** SMV (EI, 100 ng/mL); **D.** ZDV (364.4 ng/mL); **E.** LMV (223.9 ng/mL)



## Capítulo 6.

### Conclusiones

- Se logró establecer las condiciones de detección y separación para desarrollar el método analítico mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Eficiencia acoplada a Espectrometría de Masas en tándem (UPLC-MS/MS) para la cuantificación simultánea de LMV, ZDV, LPV y RTV.
- El procedimiento de extracción mediante precipitación de proteínas mostró ser eficiente, rápido, sencillo a partir de un volumen de muestra pequeño (100  $\mu$ L), lo cual es adecuado para fines clínicos y de investigación, dónde se obtiene poco volumen de muestra o se requieren tomas periódicas como lo es en el MTF, así como, estudios de farmacocinética poblacional para los cuales fue desarrollada esta técnica analítica.
- El método cumplió con los criterios establecidos en la NOM-177-SSA-2013 demostrando selectividad, linealidad, precisión y exactitud en el intervalo de concentraciones: 25-1500 ng/mL, 50-3000 ng/mL, 75-4500 ng/mL y 250-15000 ng/mL para RTV, LMV, ZDV y LPV respectivamente.
- El método fue empleado en la determinación de las concentraciones mínimas en el estado estacionario de la TARAA en pacientes embarazadas VIH positivas en el tercer trimestre de embarazo, mostrando que puede ser una herramienta de utilidad para una aplicación clínica.



## Perspectivas

- Dado que el estudio mostró sensibilidad y especificidad para los cuatro analitos de interés, se propone emplearlo como herramienta en el monitoreo terapéutico de fármacos, así como en la construcción de un modelo de farmacocinética poblacional en mujeres VIH-positivo en etapa gestación del Instituto Nacional de Perinatología.
- De forma técnica, se propone evaluar la estabilidad de las muestras no procesadas por un periodo de 3 meses y 6 meses en condiciones de congelación, así como la estabilidad en ciclos de congelamiento y descongelamiento por un periodo de tiempo mayor a 12 horas entre ciclos.



### Referencias Bibliográficas

1. CENSIDA: Centro Nacional para la prevención y el control del VIH y el sida. *Boletín Día Mundial del sida*. [Actualizado Nov 2015; Consultado Feb 2016]. Secretaria de Salud. Disponible en: [http://www.censida.salud.gob.mx/Boletin\\_DiaMundialSida2015.pdf](http://www.censida.salud.gob.mx/Boletin_DiaMundialSida2015.pdf)
2. Roustit, M., Jlaiel, M., Leclercq, P. y Stanke-Labesque F. (2008). Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of antiretrovirals in pregnant women. *Br J Clin Pharmacol*, 66 (2), 179-195.
3. Dawes, M. y Chowienczyk, P, (2001). Pharmacokinetics in pregnancy, *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 15 (6), 819-826.
4. Burton, M., Shaw, L., Schentag, J. y Evans, W. (2006). *Applied Pharmacokinetics & Pharmacodynamics. Principles of Therapeutic Drug Monitoring*. 4ta Ed. Lippincott Williams & Wilkins. USA, 354.
5. Ayrtton, John. (2008). *A guide to effective method development in bioanalysis*, Milford: Waters Corporation
6. Murphy, K., Travers, P. y Walport M. (2009). *Inmunobiología de Janeway*, 7ma Ed. Mc Graw Hill.
7. Goldsby R., Kindt, T., Osborne, B. y Kuby J. (2007). *Inmunología*. 6ta Ed. Mc Graw Hill.
8. Higgins, N., Tseng, A., Sheehan, NL. y la Porte, Charles. (2009). Antiretroviral Therapeutic Drug Monitoring in Canada: Current Status and Recommendations for Clinical Practice, *Can J Hosp Pharm*, 62 (6), 500-509.
9. Guía de Manejo Antirretroviral de las Personas con VIH, Centro Nacional para la Prevención y Control de VIH/SIDA, Secretaria de Salud, 5ta Ed. México, 2012. Disponible en: <http://www.gesida-seimc.org/contenidos/guiasclinicas/2016/gesida-guiasclinicas-2016-tar.pdf>
10. Barré-Sinoussi, F., Ross AL y Delfraissy JF. (2013). Past, present and future: 30 years of HIV research, *Nat. Rev. Microbiol*, 11(12), 877–883.
11. Harvey, R., Clark, M. y Finkel, R. (2011). *Farmacología*, 5° Ed, Lippincott & Wilkins, 499-513.
12. Michalik, DE., Jackson-Alvarez, JT., Flores, R., Tolentino-Baldrige, C. y Batra JS. (2015). Low Third-Trimester Serum Levels of Lamivudine/Zidovudine and Lopinavir/ Ritonavir in an HIV-Infected Pregnant Woman with Gastric Bypass, *J Int Assoc Provid AIDS Care*, 14 (2), 116-9.
13. Moodley, J., Moodley, D., Pillay, K., Coovadia, H., Saba, J., van Leeuwen, R., et al. (1998). Pharmacokinetics and Antiretroviral Activity of Lamivudine Alone or When Coadministered with



- Zidovudine in Human Immunodeficiency Virus Type 1–Infected Pregnant Women and Their Offspring, *J Infect Dis*, 78, 1327–33.
14. Stek, A., Mirochnick, M., Capparelli, E., Best, B., Hu, C., Burchett, S., *et al.* (2006). Reduced lopinavir exposure during pregnancy, *AIDS*, 20, 1931–1939.
  15. Manavi, K., McDonald, A. y Al-Sharqui, A. (2007). Plasma lopinavir trough levels in a group of pregnant women on lopinavir, ritonavir, zidovudine, and lamivudina, *AIDS*, 21:643–647.
  16. Best, B., Stek, A., Mirochnick, M., Hu, C., Li, H., Burchett, S., *et al.* (2010). Lopinavir tablet pharmacokinetics with an increased dose during pregnancy, *J Acquir Immune Defic Syndr*, 54:381-388.
  17. Kano, E., Reis Serra, C., Koono, E., Andrade, S. y Porta V. (2005). Determination of lamivudine in human plasma by HPLC and its use in bioequivalence studies, *Int J Pharm*, 297 (1-2), 73–79.
  18. Jung, BH., Rezk, NL., Bridges, AS., Corbett, AH. y Kashuba AD. (2007). Simultaneous determination of 17 antiretroviral drugs in human plasma for quantitative analysis with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Biomed Chromatogr*, 21 (10), 95–1104.
  19. D’Avolio, A., Siccardi, M., Sciandra, M., Baietto, L., Bonora, S., Trentini L., *et al.* (2007). HPLC–MS method for the simultaneous quantification of the new HIV protease inhibitor darunavir, and 11 other antiretroviral agents in plasma of HIV-infected patients, *J Chromatogr B*, 859 (2), 234–240.
  20. Yadav, M., Rao, R., Kurani, H., Singhal, P., Goswami, S. y Shrivastav, PS. (2009). Application of a rapid and selective method for the simultaneous determination of protease inhibitors, lopinavir and ritonavir in human plasma by UPLC–ESI-MS/MS for bioequivalence study in Indian subjects, *J Pharm Biomed Anal*, 49 (4), 1115–22.
  21. Yadav, M., Singhal, P., Goswami, S., Pande U., Sanyal, M. y Shrivastav P. (2010). Selective Determination of Antiretroviral Agents Tenofovir, Emtricitabine, and Lamivudine in Human Plasma by a LC–MS–MS Method for a Bioequivalence Study in Healthy Indian Subjects, *J Chromatogr Sci*, 48 (9), 704-713.
  22. Zhang, Li-jun, Yao, Ya-min, Sun, Jian-jun, Chen, Jun, Jia, Xiao-fang, Shen, Fang, *et al.* (2010). An LC–MS/MS Method for Simultaneous Quantification of Seven Anti-HIV Medicines in Plasma of HIV-infected Patients, *Pharma Anal Acta*, 1 (102).
  23. Matta, M., Pilli, N., Inamadugu, J., Burugula, L. y Rao S. (2012). Simultaneous quantitation of lamivudine, zidovudine and nevirapine in human plasma by liquid chromatography–tandem mass spectrometry and application to a pharmacokinetic study, *Acta Pharm Sin B*, 2(5):472–480.
  24. Djerada, Z., Feliu, C., Tournois, C., Vautier, D., Binet, L., Robinet, A., *et al.* (2013). Validation of a fast method for quantitative analysis of elvitegravir, raltegravir, maraviroc, etravirine, tenofovir,



- boceprevir and 10 other antiretroviral agents in human plasma samples with a new UPLC-MS/MS technology, *J Pharm Biomed Anal*, 86, 100–111.
25. Ross, M. y Wojciech P., (2008), *Histología: texto y atlas con biología celular y molecular*, 5ta Ed, Medica Panamericana, 269-270.
  26. Huerta O. (2015), Precipitación, Departamento de Biotecnología, UAM Itztapalapa, [Consultado Dic 2015]. Disponible en: <http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/sho/Precipitacion.pdf>
  27. Angurell, I., Casamitjana, N., Dinare, I., Caubet, A., Llor, N., Muñoz-Torrero, D., et al. Operaciones básicas en el Laboratorio de Química, Universidad de Barcelona, [Consultado Dic 2015]. Disponible en: <http://www.ub.edu/oblq/oblq%20castellano/index1.html#>
  28. CromLab S.L. Extracción en Fase Solida EFS-SPE. [Consultado Dic, 2015]. Disponible en: [http://www.cromlab.es/EFs\\_Principal.htm](http://www.cromlab.es/EFs_Principal.htm).
  29. Esquivel, S. y Leal, G. (2004). *Cromatografía de fase reversa*, Trabajo de investigación, Instituto de Biotecnología, UNAM. [Consultado Dic 2015]. Disponible en: [www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/.../cromatografia\\_de\\_fase\\_reversa.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/.../cromatografia_de_fase_reversa.pdf)
  30. Sacristán, M., Díaz, E., Alarcón, B., Vicente, C. y Legaz, ME. (2011). Curso de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): Prácticas de laboratorio y cuestiones teórico-prácticas. Parte III, *Reduca* (Biología). Serie Técnicas y Métodos. 4 (3): 48-78.
  31. Grumbach, E., Arsenault, J., y McCabe, D. (2012). *Beguiners Guide to UPLC*. Milford: Waters Corporation.
  32. Taleuzzaman, M., Ali, S., Gilani, SJ., Imam, SS., y Hafeez, (2015). A. Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) - A Review, *J Anal Pharm Chem*; 2(6): 1056
  33. Darasanapalli, Meenakshi y Maste, Meenaxi, (2013). A Review on Ultra Performance Liquid Chromatography, *Int. J. Drug Dev. & Res*; 5(2): 29-34.
  34. Giménez, Pérez Ana. (2012). Desarrollo y validación de un método analítico de cromatografía líquida de alta eficacia con detección por espectrometría de masas para la determinación de antiinflamatorios no esteroideos en leche y tejido muscular de origen animal, Tesis de Maestría en Producción Animal, Universidad Politécnica de Valencia.
  35. Griffiths, WJ., Johnson, AP., Liu, S., Rai DK. y Wang, Y. (2001) Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry, *Biochem J*, 355:545-61.
  36. Instituto de Salud Pública. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos. Guía Técnica No. 1
  37. NORMA Oficial Mexicana (NOM-177-SSA1-2013), Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.
  38. Guidance for Industry. Method Validation. (2001) U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration.



39. United States Pharmacopoeia 30, National Formulary 25 (1058) Analytical Instrument Qualification, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, **2006**.
40. European Medicines Agency, (**2011**). Guideline on bioanalytical method validation. Committee for Medicinal Products for Human Use.
41. Briscoe, C., Stiles, M. y Hage, D. (**2007**). System suitability in bioanalytical LC/MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **44**; 484–491.
42. Hughes, NC. Wong, EY. Fan, J. y Bajaj, N. (**2007**). Determination of carryover and contamination for mass spectrometry-based chromatographic assays, *AAPS J.*; 9(3): E353–E360.
43. Else, L., Watson, V., Tjia, J., Hughes, A., Siccardi, M., Khoo S, *et al.* (**2010**). Validation of a rapid and sensitive high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) assay for the simultaneous determination of existing and new antiretroviral compounds, *J Chromatogr B*, **1**; 878(19):1455-65.
44. Kumar, VR, Reddy BP., Kumar, BR, Sreekanth, K. y Babu KN. (**2013**). High throughput LC-MS/MS method for simultaneous determination of zidovudine, lamivudine and nevirapine in human plasma, *J Chromatogr B*, **15**;921-922:9-14
45. Hughes, NC. Bajaj, N., Fan, J. y Wong, EY. (**2009**). Assessing the matrix effects of hemolyzed samples in bioanálisis, *Bioanalysis*; 1(6):1057-66.
46. Illamola, SM, Labat, L, Benaboud, S., Tubiana, R., Warszawski, J., Tréluyer, JM, *et al*, (**2014**). Determination of total and unbound concentrations of lopinavir in plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and ultrafiltration methods, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **15**; 965:216-23.