



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

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

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

**PRESENTA:
Elias Sánchez Serrano**



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., 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:	Dra. Inés Fuentes Noriega	_____
VOCAL:	Dra. Nuria Esturau Escofet	_____
SECRETARIO:	M. en C. Jessica Hernández Pineda	_____
1er. SUPLENTE:	M. en F. Luis Jesús García Aguirre	_____
2° SUPLENTE:	M. en C. Silvia Citlalli Gama González	_____

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Inmunología, Departamento de Infectología e Inmunología, Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes (INPer)”

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Jessica Hernández Pineda

SUSTENTANTE:

ELIAS SÁNCHEZ SERRANO

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo de tesis de Licenciatura. No. de Registro: SALUD-14-01-234292-01-007.

Índice General	Pág.
Índice de abreviaturas	I
Índice de figuras	II
Índice de cuadros	III
1- RESUMEN	1
2- INTRODUCCIÓN	2
3- MARCO TEÓRICO	4
3.1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)	4
3.1.1. Ciclo de replicación del VIH	5
3.1.2. Panorama epidemiológico de la infección por VIH en México y el mundo .	6
3.2. Formas de transmisión del VIH	7
3.2.1. Transmisión vertical del VIH	8
3.3. Terapia antirretroviral de alta actividad (TARAA)	9
3.3.1. Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN). 12	
3.3.1.1. Lamivudina (LMV)	12
3.3.1.2. Zidovudina (ZDV)	13
3.3.2. Inhibidores de la proteasa (IP)	13
3.3.2.1. Lopinavir (LPV).....	14
3.3.2.2. Ritonavir (RTV).....	14
3.4. Farmacocinética de la TARAA durante el embarazo	15
3.5. Lactancia de mujeres VIH+	16
3.6. Excreción de antirretrovirales en leche materna	17
3.7. Metodologías analíticas para la cuantificación de fármacos antirretrovirales en leche materna	19
3.8. Composición de la leche materna	21

3.9. Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) como método de separación	22
3.10. Acoplamiento de detectores de espectrometría de masas.....	27
3.11. Desarrollo del método analítico	29
3.12. Validación del método analítico	30
3.12.1. Adecuabilidad	30
3.12.2. Efecto de acarreo	31
3.12.3. Selectividad.....	31
3.12.4. Efecto matriz.....	31
3.12.5. Límite de detección	32
3.12.6. Límite inferior de cuantificación (LIC)	32
3.12.7. Linealidad.....	32
3.12.8. Rango de las curvas de calibración.....	32
3.12.9. Curva de calibración.....	33
3.12.10. Exactitud	33
3.12.11. Precisión	33
3.12.12. Repetibilidad	33
3.12.13. Reproducibilidad	34
3.12.14. Recuperación absoluta.....	34
3.12.15. Estabilidad	34
4- JUSTIFICACIÓN.....	36
5- OBJETIVO	37
6- DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	38
6.1. Material	38
6.2. Reactivos y sustancias de referencia	39
6.2.1. Reactivos	39
6.2.2. Sustancias de referencia	40
6.3 Equipos e Instrumentos	41
6.4. Material biológico.....	41
6.5. Preparación de soluciones	41
6.5.1. Ácido fórmico al 0.1% (AF).....	41

6.5.2. Acetonitrilo (ACN)	42
6.5.3. Preparación de las soluciones de trabajo	42
6.5.4. Soluciones de referencia de los fármacos antirretrovirales	42
6.5.5. Soluciones de trabajo de la curva de calibración	42
6.5.6. Solución de referencia de estándar interno	45
6.5.7. Solución de trabajo de estándar interno	45
6.5.8. Preparación de la curva de calibración en leche materna	45
6.5.9. Preparación de los puntos control de la curva de calibración	47
6.6. Desarrollo del método analítico	49
6.6.1. Detección por medio de (MS/MS)	51
6.6.2. Condiciones cromatográficas	51
6.7. Método de extracción a partir de leche materna	54
6.8. Validación del método analítico	55
6.8.1. Adecuabilidad del sistema	55
6.8.2. Efecto de acarreo	56
6.8.3. Selectividad	56
6.8.4. Efecto matriz	57
6.8.5. Límite inferior de cuantificación (LIC)	59
6.8.6. Linealidad y curva de calibración	59
6.8.7. Precisión	60
6.8.7.1. Precisión intra-día. Repetibilidad	60
6.8.7.2. Precisión inter-día. Reproducibilidad	60
6.8.8. Exactitud	61
6.8.9. Recuperación absoluta	61
6.8.10. Estabilidad de la muestra	62
6.8.10.1. Estabilidad a corto plazo	62
6.8.10.2. Estabilidad a largo plazo	62
6.8.10.3. Estabilidad de la muestra procesada	62
6.8.10.4. Estabilidad del automuestreador	63
6.8.10.5. Estabilidad de los ciclos de congelación-descongelación	63
6.8.10.6. Estabilidad en solución	63
7- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	64
7.1 Detección por espectrometría de masas (MS/MS)	64
7.2. Separación cromatográfica por UPLC	69
7.3. Método de extracción	80

7.4. Validación.....	83
7.4.1. Adecuabilidad del sistema.....	83
7.4.2. Efecto acarreo.....	86
7.4.3. Selectividad.....	87
7.4.4. Efecto matriz.....	91
7.4.5. Linealidad.....	92
7.4.6. Precisión.....	97
7.4.6.1. Precisión intra-día. Repetibilidad.....	97
7.4.6.2. Precisión inter-día. Reproducibilidad.....	98
7.4.7. Exactitud.....	101
7.4.8. Recuperación absoluta.....	104
7.4.9. Estabilidad.....	105
8- CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVA.....	109
9- REFERENCIAS.....	110
10-ANEXOS.....	115

Índice de abreviaturas

Abreviatura	Significado
°C	Grados Celsius
%CV	Porcentaje del coeficiente de variación
%DEA	Desviación estándar absoluta
µm	micrómetros
µg/mL	Microgramos entre mililitro
ABC	Área bajo la curva
ACN	Acetonitrilo
AF	Ácido fórmico
ARV	Antirretrovirales
b.i.d.	Dos veces al día
C _{max}	Concentración máxima
CV	Carga viral
DE	Desviación estándar
EI	Estándar interno
ESI	ionización por electrospray
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de Norteamérica (por sus siglas en ingles)
FMN	Factor matriz normalizado
H ₂ O	Agua
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (por sus siglas en ingles)
IF	Inhibidores de la fusión
II	Inhibidores de la integrasa
IP	Inhibidores de proteasa
ITIAN	Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos
ITINN	Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos
LIC	Límite inferior de cuantificación
LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (por sus siglas en ingles)
LLE	Extracción líquido-líquido (por sus siglas en ingles)
LPV	Lopinavir
m	Pendiente
m/z	Relación masa/carga
MCA	Muestra control alta
MCB	Muestra control baja
MCD	Muestra control diluida
MCM	Muestra control media
MeOH	Metanol
MRN	Monitoreo de raciones múltiples
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
ng/mL	Nanogramos entre mililitro
NOM	Norma Oficial Mexicana

OMS	Organización mundial de la salud
pH	Potencial de hidrogeno
r	Coefficiente de correlación
r ²	Coefficiente d determinación
rpm	Revoluciones por minuto
RTV	Ritonavir
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SMV	Simvastatina
SNC	Sistema nervioso central
SPE	Extracción en fase sólida (por sus siglas en ingles)
T1/2	Tiempo de vida media
TARAA	Terapia antirretroviral de alta actividad
TIC	Conteo total de iones
UPLC	Cromatografía líquida de ultra alta resolución (por sus siglas en ingles)
USP	Convención de la Farmacopea de Estados Unidos (por sus siglas en ingles)
Vd	Volumen de distribución
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
ZDV	Zidovudina

Índice de figuras

No. Figura	Descripción	Pág.
Figura 1.	Estructura general del VIH	4
Figura 2.	Ciclo de replicación del VIH	6
Figura 3.	Principales vías de transmisión de VIH	8
Figura 4.	Porcentaje de las diferentes vías de transmisión vertical	8
Figura 5.	Sitios de acción de las familias de antirretrovirales en el ciclo de replicación del VIH	10
Figura 6.	Categorías de la FDA de acuerdo al daño teratogenico	11
Figura 7.	Composición de la leche materna	21
Figura 8.	Esquema de los componentes en el cromatógrafo de líquidos	24
Figura 9.	Rango óptimo de trabajo según la ecuación de Van Deemter para columnas con diferente tamaño de partícula	26
Figura 10.	Partes del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo	29
Figura 11.	Diagrama de preparación de los puntos de curva de calibración en solución	43
Figura 12.	Diagrama de preparación de la solución de estándar interno	45
Figura 13.	Diagrama de la preparación de los puntos control en solución	47
Figura 14.	Proceso lógico en el desarrollo del método analítico	49
Figura 15.	Procedimiento para desarrollar el método mediante UPLC	53
Figura 16.	Pasos del método de extracción de leche materna	55
Figura 17.	Diagrama del procedimiento de efecto matriz	58
Figura 18.	<i>Tunning</i> de ZDV	64
Figura 19.	Espectro de masas de lamivudina	66
Figura 20.	Espectro de masas de zidovudina	67
Figura 21.	Espectro de masas de lopinavir	67
Figura 22.	Espectro de masas de ritonavir	68
Figura 23.	Espectro de masas de simvastatina	68
Figura 24.	Cromatograma de la columna ACQUITY UPLC BEH Shield RP18	70
Figura 25.	Cromatograma de la columna ACQUITY UPLC BEH C8	71
Figura 26.	Cromatograma de la columna ACQUITY UPLC BEH C18	72
Figura 27.	Resultados de los modificador de pH	74, 75
Figura 28.	Cromatogramas del modificador orgánico	77
Figura 29.	Cromatograma de la extracción en fase sólida	81
Figura 30.	Cromatograma de la extracción por el método Dried breast milk spot	82
Figura 31.	Cromatograma de la extracción mediante precipitación de proteínas previo tratamiento con hexano	83
Figura 32.	Cromatograma representativo de selectividad en LMV y ZDV	89
Figura 33.	Cromatograma representativo de selectividad en LPV y RTV	90
Figura 34.	Curva de calibración de LMV con la ponderación $\log[C] / \log[\text{respuesta}]$	93
Figura 35.	Curva de calibración de ZDV con la ponderación $\log[C] / \log[\text{respuesta}]$	94
Figura 36.	Curva de calibración de LPV con la ponderación $\log[C] / \log[\text{Área}]$	95
Figura 37.	Curva de calibración de RTV con la ponderación $\log[C] / \log[\text{Área}]$	96

Índice de cuadros

No. Cuadro	Descripción	Pág.
Cuadro 1.	Principales propiedades farmacocinéticas de LMV, ZDV, LPV y RTV	15
Cuadro 2.	Estudios en mujeres embarazadas con VIH	18
Cuadro 3.	Antecedentes de la metodología para la cuantificación de antirretrovirales en leche materna	20
Cuadro 4.	Reactivos utilizados en el desarrollo y validación del método analítico	39
Cuadro 5.	Sustancias de referencia utilizadas	40
Cuadro 6.	Equipos e instrumentos utilizados en el desarrollo y validación del método analítico	41
Cuadro 7.	Preparación de los puntos de la curva de calibración y su concentración en solución	44
Cuadro 8.	Preparación de los puntos de la curva de calibración y su concentración en leche materna	46
Cuadro 9.	Preparación de las muestras control en solución y su concentración	47
Cuadro 10.	Preparación de los puntos control en leche materna y su concentración final	48
Cuadro 11.	Concentración final de los puntos de la curva de calibración y los puntos control	49
Cuadro 12.	Propiedades fisicoquímicas de LMV, ZDV, LPV y RTV	50
Cuadro 13.	Resultados de la transición ion precursor → ion producto de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV	66
Cuadro 14.	Proporciones de la fase móvil en gradiente	79
Cuadro 15.	Adecuabilidad de LMV	84
Cuadro 16.	Adecuabilidad de ZDV	84
Cuadro 17.	Adecuabilidad de LPV	85
Cuadro 18.	Adecuabilidad de RTV	85
Cuadro 19.	Ejemplo del efecto de acarreo durante la validación del método analítico	87
Cuadro 20.	Selectividad de LMV, ZDV, LPV y RTV en leche materna	88
Cuadro 21.	Selectividad frente a los fármacos concomitantes	88
Cuadro 22.	%CV del efecto matriz normalizado de los diferentes tipos de leche materna	91
Cuadro 23.	Exactitud del método analítico de las curvas de calibración de LMV	93
Cuadro 24.	Parámetros de la regresión lineal de la curva de calibración de LMV	93
Cuadro 25.	Exactitud del método analítico de las curvas de calibración de ZDV	94
Cuadro 26.	Parámetros de la regresión lineal de la curva de calibración de ZDV	94
Cuadro 27.	Exactitud del método analítico de las curvas de calibración de LPV	95
Cuadro 28.	Parámetros de la regresión lineal de la curva de calibración de LPV	95
Cuadro 29.	Exactitud del método analítico de las curvas de calibración de RTV	96
Cuadro 30.	Parámetros de la regresión lineal de la curva de calibración de RTV	96
Cuadro 31.	Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de LMV	97
Cuadro 32.	Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de ZDV	97
Cuadro 33.	Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de LPV	98
Cuadro 34.	Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de RTV	98
Cuadro 35.	Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de LMV	99
Cuadro 36.	Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de ZDV	99
Cuadro 37.	Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de LPV	100

Cuadro 38.	Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de RTV	100
Cuadro 39.	Exactitud del método analítico para la cuantificación de LMV	102
Cuadro 40.	Exactitud del método analítico para la cuantificación de ZDV	102
Cuadro 41.	Exactitud del método analítico para la cuantificación de LPV	103
Cuadro 42.	Exactitud del método analítico para la cuantificación de RTV	103
Cuadro 43.	Valores promedio de la recuperación absoluta en los puntos control n=5, para LMV, ZDV, LPV y RTV	104
Cuadro 44.	Pruebas de estabilidad de LMV, ZDV, LPV y RTV	106
Cuadro 45.	Pruebas de estabilidad en solución de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV	107
Cuadro 46.	Resumen de los resultados de la validación del método analítico	108

1- RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló y validó un método analítico por medio de cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS), para cuantificar en leche materna y de forma simultánea la terapia antirretroviral de alta actividad (TARAA). Dicha terapia involucra la combinación de lamivudina (LMV), zidovudina (ZDV), lopinavir (LPV) y ritonavir (RTV), antirretrovirales de primera elección durante el embarazo para evitar la transmisión vertical del VIH. Los cuatro fármacos fueron detectados mediante electrospray positivo (ESI+); las transiciones (m/z) del ion precursor → ion producto fueron las siguientes: LMV (230.18 →112.08), ZDV (268.22 →127.10), LPV (629.55 → 447.35) y RTV (721.50 → 296.20). La separación cromatográfica de los analitos se llevó a cabo en fase reversa sobre una columna ACQUITY UPLC® BEH C18, (1.7 µm, 2.1 mm X 50 mm); se diseñó un gradiente de acetonitrilo (ACN) y ácido fórmico (AF) al 0.1%, la velocidad de flujo fue 0.5 mL/min y el volumen de inyección de 3 µL en modo parcial, la temperatura de la columna se fijó en 35°C y la temperatura del automuestreador en 5°C, obteniendo un tiempo de corrida de 2.50 minutos. El método de extracción consistió en una precipitación de proteínas con ácido fórmico al 0.1% en ACN, previa eliminación de las grasas con hexano, el sobrenadante obtenido se filtró a través de una membrana de 0.2 µm. El método fue validado cumpliendo con los criterios de aceptación presentes en la NOM-177-SSA1-2013, en el rango de concentraciones de: LMV (100-3000 ng/mL), ZDV (25-750 ng/mL), LPV (200-6000 ng/mL) y RTV (10-300 ng/mL).

2- INTRODUCCIÓN

En la actualidad la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, VIH, sigue siendo uno de los grandes problemas de salud pública a nivel mundial. En México se estima que hay 190 000 casos de VIH, de los cuales el 21% corresponden a mujeres (CENSIDA, 2015). El problema se ha visto incrementado debido a que la mayoría de estas mujeres se encuentran en edad reproductiva, estado que va acompañado del riesgo de quedar embarazadas y transmitir el virus a su recién nacido, lo que se conoce como transmisión vertical. Dentro de las principales vías de transmisión vertical se encuentra la lactancia como la fuente más importante de infección por VIH en los neonatos (Rezk, 2008).

Como estrategia para controlar la transmisión vertical, la madre es tratada con la terapia antirretroviral de alta actividad, TARAA, (zidovudina, lamivudina, lopinavir y ritonavir), la cual ha demostrado una reducción en la transmisión vertical por debajo del 5%, algunos otros autores han reportado una transmisión por debajo del 2% (Shapiro, *et. al.*, 2010). No obstante, durante el embarazo se producen una serie de cambios fisiológicos que modifican la farmacocinética de estos antirretrovirales, por ejemplo: aumento del agua y grasa corporal, disminución de proteínas plasmáticas, aumento de los niveles de progesterona, variaciones en la expresión del citocromo P450, aumento de la filtración glomerular, difusión de las concentraciones de los fármacos a través de placenta y un hecho que ha tomado relevancia: la excreción de los mismos a través de la leche materna (Roustit, 2008).

La excreción de antirretrovirales a través de la leche materna ha marcado la diferencia en el dilema en el cual, se plantea si los hijos de madres VIH+ pueden ser alimentados con la leche de su propia madre. Esta premisa se ha justificado en dos importantes hechos: los altos índices de morbilidad y mortalidad infantil derivados de las enfermedades diarreicas observados en infantes con alimentación con fórmula y la supresión eficiente de la carga viral en leche

materna en aquellas pacientes con una buena adherencia al tratamiento, lo que les brindaría la posibilidad de que el neonato pueda ser alimentado con la leche de su propia madre (Slater, *et. al.*, 2010; Morales, s.f.). A la fecha existe poca evidencia científica al respecto, sin embargo, algunos estudios han mostrado, que la TARAA en mujeres VIH+ durante la lactancia ha reducido efectivamente la transmisión, no obstante, estos estudios han sido no aleatorizados y con relativamente pocas participantes. Adicionalmente, la profilaxis infantil, que se administra de forma imperativa en neonatos nacidos de madres infectadas ha mostrado una tasa de transmisión menor al 1.2% en ensayos controlados (Slater, *et.al.*, 2010).

Bajo este contexto, la Organización Mundial de la Salud, OMS, ha emitido opiniones al respecto, en la cual recomienda la lactancia materna durante los primeros seis meses de edad, para aquellas pacientes en las cuales por cuestiones culturales y de acceso a la alimentación con fórmula sea limitada. Además de los indiscutibles beneficios de la leche materna en el desarrollo del neonato. En este sentido, se ha reportado, de igual manera, que la alimentación con fórmula predispone mayormente a la transmisión de la infección por VIH.

El panorama aún resulta controversial, por lo que es de interés el explorar las concentraciones de estos fármacos en la leche materna y asociarlos con su respuesta terapéutica y supresión de la carga viral. Por tales motivos el propósito de este trabajo se enfocó en el desarrollo y validación de una metodología de cuantificación simultánea de la TARAA en leche materna de mujeres VIH+. Esta metodología empleó la Cromatografía Líquida de Ultra-alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem, UPLC-MS/MS, la cual permitió alcanzar alta sensibilidad y especificidad hacia los analitos de interés.

Los criterios de aceptación del proceso de validación, fueron consultados en la NORMA Oficial Mexicana (NOM-177-SSA1-2013), así como en guías de consenso internacional como la Food and Drug Administration, FDA.

3- MARCO TEÓRICO

3.1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) pertenece al género *Lentivirus* de la familia *Retroviridae*. A la fecha se han descrito dos tipos principales: el VIH tipo 1 (VIH-1) y el VIH tipo 2 (VIH-2), este último presenta menor virulencia y esta geográficamente limitado al oeste del continente africano (Levy, 2009). La estructura del VIH está conformada por glicoproteínas de membrana tales como gp 120 y gp 41, dos copias de ácido ribonucleico (ARN) y diversas enzimas como la integrasa, la proteasa y la transcriptasa inversa, necesarias para el ciclo de replicación del virus (**Figura 1**).

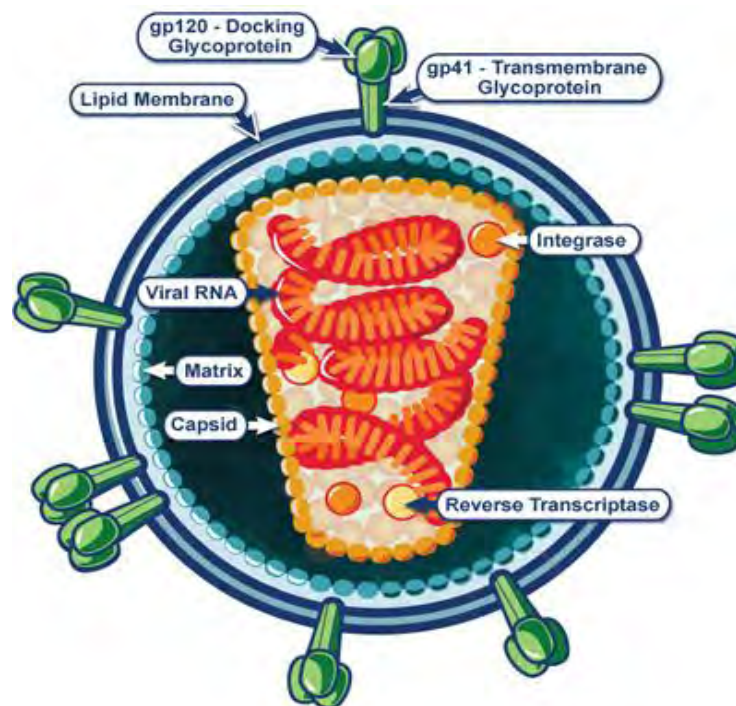


Figura 1. Estructura general del VIH. En la figura se esquematiza algunas de las estructuras que componen al VIH como por ejemplo: el ARN, las glicoproteínas de membrana y las enzimas necesarias para el ciclo de replicación del virus.

El síndrome de la inmunodeficiencia humana (SIDA), es la evolución de la enfermedad producida por el VIH y se caracteriza por una profunda inmunodepresión acompañada de infecciones oportunistas y tumores malignos; además de una emaciación y degeneración del sistema nervioso central (SNC). El VIH infecta a diversas células del sistema inmunitario como los linfocitos T cooperadores (linfocitos T CD4⁺), los macrófagos y las células dendríticas (Abbas, 2008), los cuales se encuentran presentes tanto en sangre, secreciones del aparato reproductor y fluidos como la leche materna. Otra característica específica que es determinante en la compleja patogenia de la infección por VIH es la gran diversidad genética del virus debido a una tasa muy alta de mutaciones y recombinación genética (Pachón, 2003).

3.1.1. Ciclo de replicación del VIH

En la **Figura 2** se esquematiza el ciclo de replicación del VIH. El primer evento (**2a**) es la entrada del virus a la célula hospedera, mediante un reconocimiento entre la glicoproteína de envoltura gp 120 y el receptor CD4, esta unión permite la fusión de la membrana viral y celular que posteriormente genera la entrada de la cápside viral a la célula (Fanales, *et.al.*, 2010).

Posteriormente las dos hebras ARN que forman el genoma viral, así como sus proteínas asociadas invaden el interior celular y mediante la enzima transcriptasa inversa que porta el virus se transcriben los ARN virales a dos moléculas de ADN monocatenario, las cuales se asocian dando lugar al ADN de doble hebra con las mismas características bioquímicas que el que portan las células del individuo infectado (**2b**). Tras la penetración en el núcleo de la célula, el ADN viral se integra en el ADN celular ayudado por la integrasa (**2c**). En este punto la enfermedad se ha hecho permanente y la propia maquinaria de la célula se encarga de formar proteínas del virus. En cada célula infectada se ensamblan miles de nuevos viriones, propagándose así la infección (**2d**) (infoSIDA, s.f.).

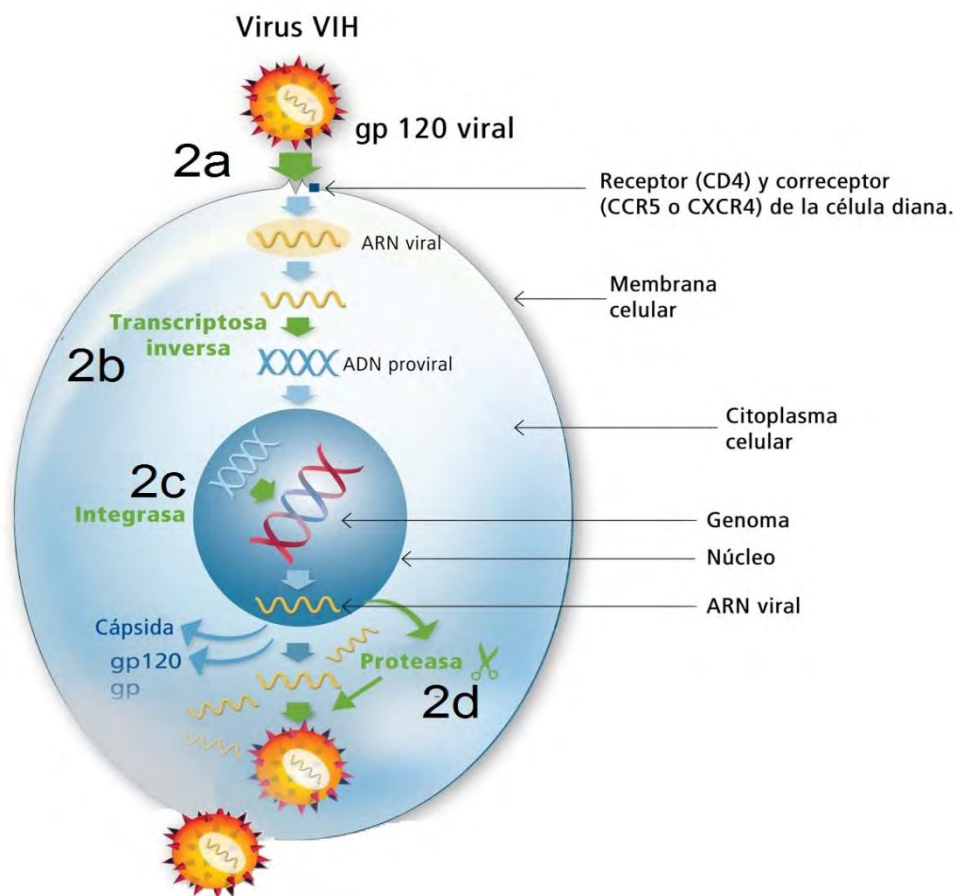


Figura 2. Ciclo de replicación del VIH. El virus entra a la célula por medio del receptor gp 120 (2a), el RNA viral se transcribe por medio de la transcriptasa inversa (2b) y es integrado al genoma del núcleo por la integrasa (2c) donde por medio de la maquinaria celular se producen las proteínas necesarias para la formación del virus (2d) (Imagen de InfoSIDA.es, consulta 2016).

3.1.2. Panorama epidemiológico de la infección por VIH en México y el mundo

Se estima que a nivel mundial existen 36,9 millones (34,3–41,4 millones) de personas viviendo con VIH, de las cuales 17,4 millones (16,1–20,0 millones) son mujeres y 2,6 millones (2,4–2,8 millones) niños menores de 15 años (ONUSIDA, 2014). Sin embargo, de acuerdo con la Organización Mundial de la salud, OMS, se calcula que solo el 54% de las personas con VIH conocen su estado serológico, (OMS, 2015).

En México, las personas infectadas suman cerca de 190,000; los estados con mayor número de casos acumulados son Ciudad de México, Estado de México, Veracruz y Jalisco. De este total aproximadamente 40,000 (21 %) son mujeres de 15 años o más que se encuentran en edad reproductiva (CENSIDA, 2015), estado que va acompañado con el riesgo de quedar embarazada y transmitir el virus a su recién nacido, lo que se conoce como transmisión vertical. (Posadas, *et.al.*, 2015).

Desde el primer caso de transmisión vertical de VIH que se registró en el año de 1989, el número de nuevas infecciones se ha incrementado; por ejemplo, en el periodo de 1994 a 1998 la cifra de nuevos casos se duplicó y en el siguiente periodo de 1999 a 2003 se quintuplicó con respecto a los ya existentes. Este incremento se puede atribuir a varios factores, entre ellos la baja percepción de riesgo de VIH en las mujeres, favorecida en parte por la focalización de campañas a la población masculina y a grupos vulnerables; así como problemas estructurales y de organización institucional que no han favorecido la oferta de detección oportuna del VIH a toda mujer embarazada y como consecuencia a la falta de abordaje profiláctico con el fin de evitar la transmisión vertical (CENSIDA, s. f.).

3.2. Formas de transmisión del VIH

Para que el VIH pueda completar con éxito la infección en una persona, ésta debe recibir una cantidad suficiente de virus, de modo que las partículas virales finalmente superen las barreras naturales del cuerpo. Entre los principales modos de transmisión del virus se encuentran: la transmisión sexual (95%); a través del contacto sexual no protegido con personas infectadas. La transmisión sanguínea (2.9%); a través de transfusión de sangre contaminada, del trasplante de órganos o tejidos contaminados y del uso de agujas u otros instrumentos punzo cortantes contaminados. Y la transmisión vertical (2.0%); a través de la vía transplacentaria, por sangre o secreciones en el canal del parto, o por medio de leche materna si la madre es portadora del VIH (**Figura 3**). Aun cuando la transmisión vertical

aparentemente no representa una fuente importante de transmisión, es la principal causa de infecciones en niños menores de 10 años (CENSIDA, 2014).

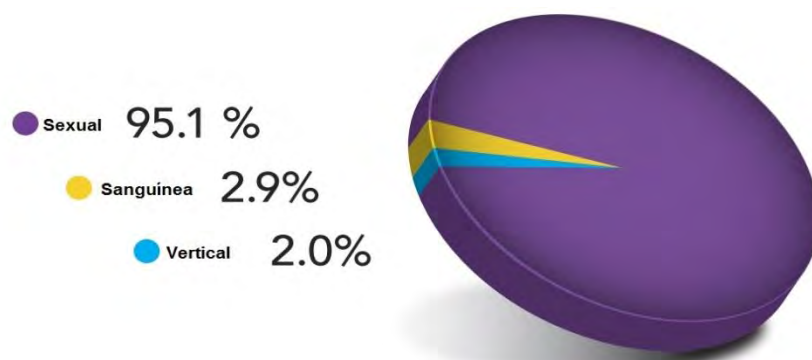


Figura 3. Principales vías de transmisión del VIH. La infección por VIH se divide en tres vías principales de transmisión sexual (95.1%), sanguínea (2.9%) y vertical (2.0%).

3.2.1. Transmisión vertical del VIH

La transmisión vertical, es la transmisión de la infección de la madre a su hijo. Se encuentran documentadas tres vías principales de transmisión; la vía intrauterina (18%), durante el periodo de gestación. En el parto (40%), por medio de las secreciones de la madre en el parto y mediante la lactancia materna (42%) (**Figura 4**). Siendo la lactancia materna la fuente más importante de infección por VIH en niños (Rezk, 2008).

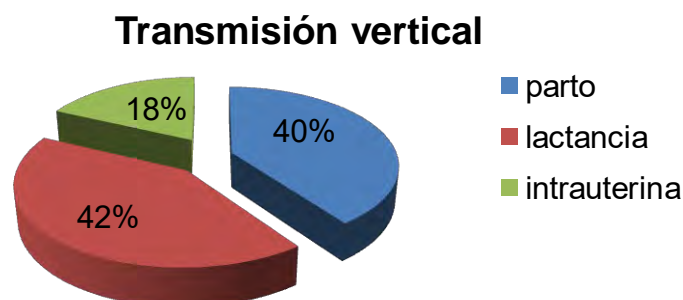


Figura 4. Porcentaje de las diferentes vías de transmisión vertical. La transmisión vertical se divide en tres vías: durante el parto (40%), intrauterina (18%) y por medio de la lactancia (42%).

3.3. Terapia antirretroviral de alta actividad (TARAA)

La terapia más utilizada en el mundo para el tratamiento del VIH es la llamada TARAA, que consiste en la combinación de 3 o 4 fármacos de por lo menos dos familias diferentes (InfoSIDA, 2015). Se ha demostrado que la administración conjunta de diversos fármacos antirretrovirales, aumenta la eficacia de la terapia y se controla adecuadamente la progresión de la infección comparado con la monoterapia (Jevtovic, *et.al.*, 2010). Dicha terapia disminuye la tasa de replicación viral y en consecuencia reduce la carga viral en plasma por debajo de los límites de detección más sensibles (<40 copias de ARN/mL) (Widdrington, *et.al.*, 2011), además, aumenta el conteo de linfocitos T CD4+ y disminuye la hiperactivación de las células del sistema inmune (Evans, *et.al.*, 1998).

Hasta el momento se cuenta con 5 familias de fármacos antirretrovirales con diferente mecanismo de acción en el ciclo de replicación del virus (**Figura 5**): los inhibidores de la fusión (IF), evitan que el VIH penetre en las células sanas del cuerpo, son agonistas de los receptores CCR5 (**5a**). Los inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN) e Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINN), inhiben la transcriptasa inversa por un mecanismo competitivo, se incorporan a la cadena de ADN viral, interrumpiendo la elongación de la misma y como consecuencia, la replicación viral (**5b**). Los inhibidores de la integrasa (II), actúan sobre la enzima integrasa que es la responsable de la integración del material genético viral (ya traducido a ADN por la transcriptasa inversa) en el material genético de la célula infectada (**5c**). Y por último los Inhibidores de proteasa (IP), bloquean la proteasa del VIH, impidiendo la maduración de las proteínas virales e inhibiendo de forma potente la replicación viral (**5d**) (InfoSIDA, s.f.).

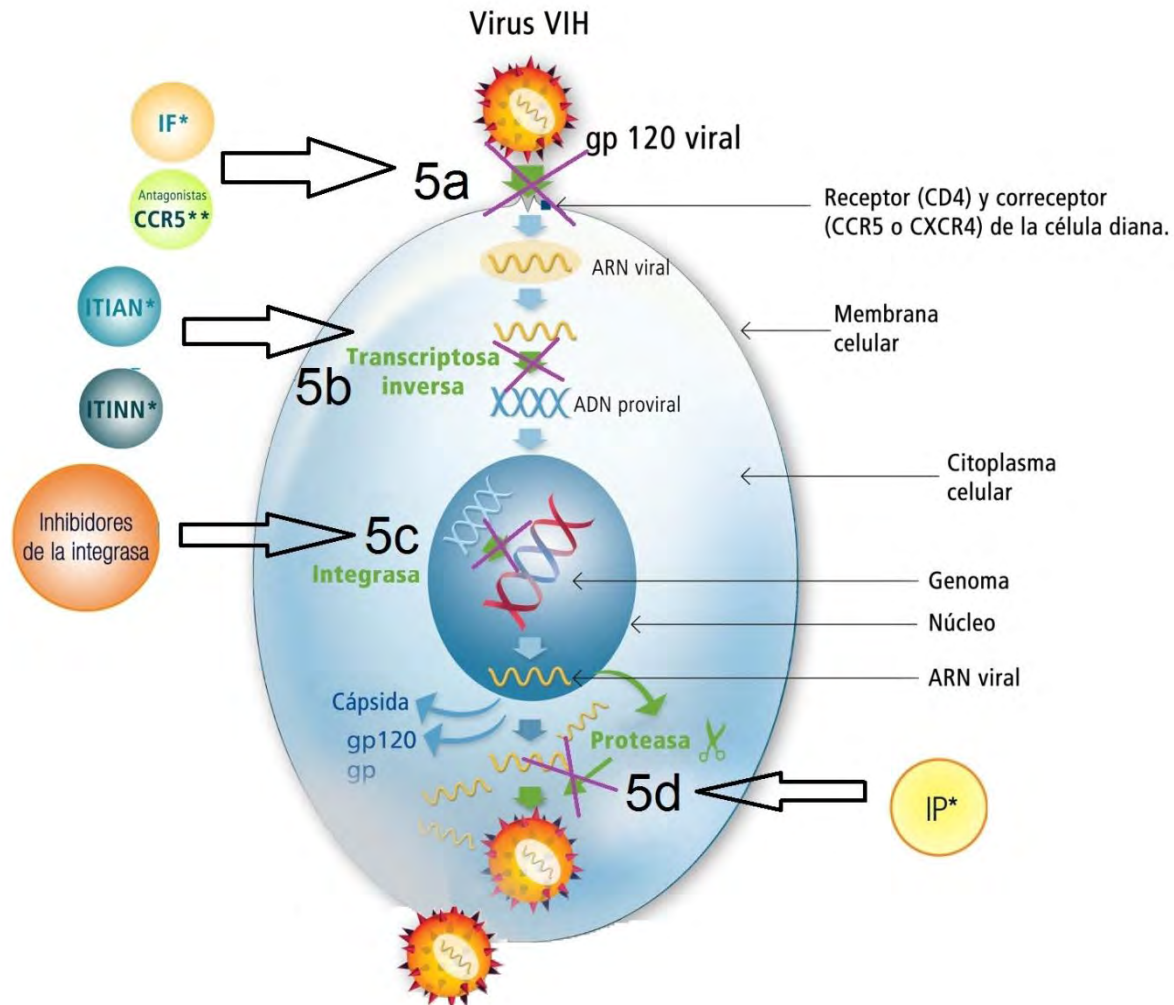


Figura 5. Sitios de acción de las familias de antirretrovirales en el ciclo de replicación del VIH. Los IF impiden la entrada del VIH (5a), los ITIAN e ITINN inhiben la transcriptasa inversa (5b), los II inhiben la integrasa evitando así que el ADN viral se integre a la célula (5c), y los IP inhiben la proteasa evitando la formación de nuevos virus (5d) (Imagen modificada de InfoSIDA.es, consulta 2016).

La mayoría de las guías terapéuticas a nivel internacional recomiendan la combinación de dos ITIAN, más un ITINN, o un IP reforzado con Ritonavir (CENETEC-salud, 2016). En el caso específico de las mujeres embarazadas, la TARAA está conformada por Combivir® 1 tableta cada 12 h (ZDV 300 mg/LMV 150 mg) y Kaletra® 2 tabletas cada 12 h (LPV 300 mg/RTV 150 mg), no obstante, la elección de la terapia más adecuada se basa en la eficacia, toxicidad, así como el riesgo teratológico sobre el neonato. En este sentido, la Administración de

Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos de Norteamérica (Food and Drug Administration, FDA) ha clasificado a estos medicamentos en la categoría C de acuerdo al riesgo teratogénico que tienen sobre el feto, en la **Figura 6** se muestra un listado de fármacos antirretrovirales con su respectiva clasificación siendo los que están subrayados los fármacos que componen la TARAA en mujeres embarazadas, así como el paso placentario, carcinogenicidad y teratogenicidad en estudios preclínicos (Figuroa, 2002).

Fármaco	Categoría *	Paso placentario	Carcinogenicidad (en animales)	Teratogenicidad (en animales)
<u>Zidovudina</u>	C	Sí	Positiva (tumores epiteliales en roedores)	Positiva (roedores)
Zalcitabina	C	Sí	Positiva (linfomas tímicos en roedores)	Positiva (hidrocefalia en roedores)
Didanosina	B	Sí	Negativa	Negativa
Estavudina	C	Sí	No completada	Negativa (disminución en el calcio esternal en roedores)
<u>Lamivudina</u>	C	Sí	Negativa	Negativa
Abacavir	C	Sí	No completada	Positiva (anasarca y malformaciones esqueléticas en roedores)
Nevirapina	C	Sí	No completada	Negativa
Delavirdine	C	Desconocido	No completada	Negativa
Efavirenz	C	Sí	No completada	Positivo (anencefalia, anoftalmia y microftalmia en monos)
Indinavir	C	Sí	No completada	negativa (costillas extras en roedores)
<u>Ritonavir</u>	B	Sí	Adenoma y carcinoma hepático en roedores	Negativo (criptorquidia en roedores)
Saquinavir	B	Mínima	No completada	Negativo
Nelfinavir	B	Desconocido	No completado	Negativo
Amprenavir	C	Desconocido	No completado	Negativo (osificación deficiente y mayor crecimiento tímico en roedores)
<u>Lopinavir/ritonavir</u>	C	Desconocido	No completado	Negativo (osificación esquelética retardada)

Figura 6. Categorías de la FDA de acuerdo al daño teratogénico. En la imagen se puede observar la lista de algunos antirretrovirales disponibles, si tienen paso placentario, carcinogenicidad, teratogenicidad así como su categoría dada por FDA:

B. Los estudios reproducidos en animales no muestran riesgo para el feto y no se han realizado estudios bien controlados de mujeres embarazadas.

C. La seguridad en el embarazo humano no se ha determinado, los estudios en animales son positivos para un riesgo fetal o no se han conducido, el fármaco no debe usarse a menos de que el beneficio potencial supere el riesgo para el feto.

3.3.1. Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósidos (ITIAN)

Los ITIAN son fármacos que inhiben la transcriptasa inversa del VIH por un mecanismo competitivo con los nucleósidos fisiológicos, esto se debe a que difieren en algún grupo funcional de la molécula de ribosa, esto hace que se incorporen a la cadena de ADN viral, interrumpiendo la elongación de la misma y, como consecuencia, la replicación viral. En su metabolismo no interviene el sistema enzimático del citocromo P450, por lo cual, son poco susceptibles de padecer interacciones metabólicas relevantes (Dickinson, 2010).

Algunos de los efectos adversos más característicos de los ITIAN aparecen a largo plazo y se relacionan con su toxicidad mitocondrial (McComsey, 2002), debido a que muestran afinidad por la ADN-polimerasa mitocondrial, por lo que pueden producir disfunciones mitocondriales que se pueden manifestar como cardiomiopatía, neuropatía, acidosis láctica, pancreatitis o esteatosis hepática. Es fácil confundir los cuadros asociados a estos fármacos con afecciones propias de la gestación, como el síndrome HELLP. El cuadro tóxico es potencialmente más grave en la gestante, frecuentemente en tratamientos de larga duración y es reversible al cesar el tratamiento (SEGO, 2007).

3.3.1.1. Lamivudina (LMV)

LMV se recomienda en combinación con otro ITIAN con la finalidad de atacar diferentes puntos en el ciclo de replicación del virus ya que posee una barrera genética baja, esto reduce la supresión selectiva y como consecuencia la posibilidad de mutación del virus a cepas más resistentes, LMV es un fármaco bien tolerado y difícilmente se le pueden atribuir efectos adversos (Vademecum, 2012).

3.3.1.2. Zidovudina (ZDV)

La ZDV fue el primer fármaco disponible para el tratamiento de la infección por el VIH (Wilde y Langtry, 1993), es activa contra retrovirus y algunas bacterias, pero su principal indicación es para el tratamiento y la prevención de la infección del VIH en adultos y niños, debido al desarrollo de resistencia no se recomienda la monoterapia (Vademecum, 2012). Sus principales efectos adversos son la mielotoxicidad, especialmente la anemia reversible. Otros efectos menos frecuentes son manifestaciones de toxicidad mitocondrial, como por ejemplo, la miopatía y la cardiopatía (Ribera, 2011).

3.3.2. Inhibidores de la proteasa (IP)

La proteasa es una enzima que actúa fragmentando las proteínas precursoras de los genes *gag* y *gag-pol*, encargadas de formar los componentes polipeptídicos virales funcionales. La inhibición de esta enzima no impide que se sinteticen los polipéptidos virales, pero al no fragmentarse, no son funcionales y no se producen virus con capacidad infectiva (Curran, *et.al.*, 2009).

Los IP tienen una estructura química parecida a los péptidos virales sustrato de la proteasa, con una elevada afinidad para el dominio activo de la misma, inhibiendo su actividad catalítica. Actúan de forma directa, sin necesitar ninguna transformación en la célula (Curran, *et.al.*, 2009), se metabolizan fundamentalmente a través del CYP3A4 y son transportados por proteínas como la glicoproteína P. En la mayoría de las ocasiones se utilizan potenciados con ritonavir, este se comporta como inhibidor de CYP3A4 y de otras isoenzimas y proteínas transportadoras. Por este motivo se producen interacciones farmacocinéticas muy relevantes con importantes aumentos de las concentraciones de fármacos tales como los inmunodepresores (ciclosporina, tacrolimus, sirolimus), las estatinas o los antagonistas del calcio, entre otros. Una característica importante de los IP potenciados es su elevada barrera genética

para el desarrollo de resistencias, debiendo acumularse múltiples mutaciones para que el virus sea resistente (Ribera *et.al.*, 2011).

3.3.2.1. Lopinavir (LPV)

El LPV impide la escisión de la poliproteína *gag-pol*, lo que resulta en la producción de partículas virales inmaduras, no infecciosas, se metaboliza completamente por la isoenzima CYP3A4 del citocromo P450. Sus principales efectos adversos son las alteraciones gastrointestinales y metabólicas (Curran, *et.al.*, 2009),

3.3.2.2. Ritonavir (RTV)

El RTV es un inhibidor competitivo de la proteasa del VIH, en comparación con otros IP, tiene una mejor biodisponibilidad oral, la combinación del RTV con inhibidores de la transcriptasa inversa mejora la supresión de la replicación y limita la aparición de resistencia viral, debido a que son diferentes los enzimas diana involucradas, además, no existe resistencia cruzada entre RTV y los inhibidores de la transcriptasa inversa. Por otra parte puede aumentar al doble la concentración de los fármacos metabolizados por la isoenzima CYP2D6 (Vademecum, 2012).

En el **Cuadro 1** se presentan los parámetros farmacocinéticos de estos antirretrovirales, donde se puede observar ciertos contrastes entre los dos grupos de fármacos, como la unión a proteínas, el tiempo máximo (t_{max}) y el volumen de distribución (V_d). Todos ellos son eliminados vía renal y tienen una biodisponibilidad menor al 50% (University of Liverpool, s.f.).

Cuadro 1. Principales propiedades farmacocinéticas de LMV, ZDV, LPV y RTV.

Parámetro	Fármaco			
	LMV	ZDV	LPV	RTV
Dosis (mg/ 2 veces al día)	150	300	400	100
Biodisponibilidad	55%	38%	37%	ND
Unión a proteínas	< 36%	< 38%	99%	99%
C _{max} (µg/mL)	1.5-1.8	2.29	9.6 ± 4.4	0.89
T _{max} (h)	1-1.5	0.5-1	4-6	4-6
Vd (L/kg)	0.9 a 1.7	1.4 a 1.7	0.41± 0.25	0.41± 0.25
Eliminación	vía renal	vía renal	vía renal	vía renal
t _{1/2} (h)	5-7	0.8-1.2	5-6	3-5

C_{max}: concentración máxima, ND: no disponible, T_{max}: tiempo máximo, t_{1/2}: tiempo de vida medio, Vd: volumen de distribución.

3.4. Farmacocinética de la TARAA durante el embarazo

Durante el embarazo se producen una serie de cambios fisiológicos en el organismo de la mujer que podrían afectar la farmacocinética de los fármacos antirretrovirales. El aumento del nivel de progesterona afecta la absorción mediante la reducción de vaciado gástrico y la motilidad intestinal. La absorción de los antirretrovirales puede verse afectada por el aumento del pH gástrico. La distribución se modifica por el aumento en la grasa y agua corporal, aumentando el volumen de distribución. La disminución de las proteínas plasmáticas puede elevar la fracción libre (activa) de LPV y RTV quienes se unen fuertemente a estas proteínas. Así mismo, el metabolismo de los IP también puede verse afectado, ya que la expresión de las isoformas del citocromo P450 es muy variable durante la gestación. La excreción cambia por aumento en el filtrado glomerular (orina), además de que estos antirretrovirales pueden ser excretados por leche materna (Roustit, 2008). Este último proceso ha marcado un parte aguas en el área de investigación en pacientes gestantes con VIH y como consecuencia un nuevo campo de estudio en el cual se plantea si es posible que una mujer VIH+ pueda amamantar a su recién nacido sin el riesgo de transmitir la infección (Anexo A).

3.5. Lactancia de mujeres VIH+

La OMS recomienda la lactancia materna a libre demanda debido a los indiscutibles beneficios en el desarrollo del bebe, además de tener un alto valor nutricional, le confiere protección frente a diversos microorganismos, debido a que contiene más de 200 oligosacáridos humanos (HMOs), de los cuales se alimentan ciertas bacterias intestinales, dándole ventaja competitiva frente a otras especies patógenas, Por otra parte, algunas HMOs pueden inhibir las bacterias y virus dañinos directamente. La leche materna ofrece algunos microorganismos directamente al intestino del lactante (Bacterias de ácido láctico), la mayoría de estas especies inhiben bacterias patógenas mediante la secreción de peróxido de hidrógeno y compuestos llamados bacteriocinas (Petherick, 2010).

Sin embargo existe controversia sobre la lactancia de mujeres con VIH, debido a que se corre el riesgo de transmisión vertical hacia el bebe; en contraste, se ha observado que la alimentación con fórmula aumenta el riesgo de morbilidad y mortalidad infantil durante los primeros 6 meses después del parto (Corbett, 2014). El problema ha sido encontrar un equilibrio entre el riesgo de que el lactante adquiera el VIH a través de la lactancia materna y el riesgo mayor de fallecimiento por otras causas distintas del VIH, en particular la malnutrición y las enfermedades graves como la diarrea o la neumonía, cuando no se alimentan con la leche materna (OMS, 2011).

Bajo este contexto, algunos grupos de investigación han planteado la premisa de que una buena adherencia a la TARAA y una carga viral indetectable, puede reducir drásticamente el riesgo de transmisión del VIH por medio de la lactancia materna, hasta el 1–2% durante un periodo de 12 meses, esto daría posibilidad de amamantar con escaso riesgo de transmisión del VIH (OMS, 2011). No obstante debido a la complejidad en la farmacocinética de los antirretrovirales durante el embarazo, así como los niveles excretados a través de la leche materna resulta de

interés el determinar las concentraciones en leche con la finalidad de establecer su asociación con la respuesta terapéutica: supresión de carga viral.

3.6. Excreción de antirretrovirales en leche materna

Existen pocos datos sobre el paso de antirretrovirales a leche materna, ya que se requiere un manejo adecuado de la gestante en el tratamiento de la enfermedad, con el objetivo de minimizar el riesgo de transmisión vertical y los posibles efectos secundarios del tratamiento, por tal motivo, las mujeres embarazadas están poco representadas en los ensayos clínicos (Tellez, 2014).

En el **Cuadro 2** se enumeran algunos de los estudios que involucran a mujeres embarazadas con tratamiento antirretroviral y el paso de estos a través de la leche materna. Se puede observar que los estudios se realizaron en población africana, con dosificaciones semejantes entre ellos. En general, estos estudios mostraron una mayor concentración de los ITIAN en leche materna comparados con sus resultados en plasma, en el caso de los IP su concentración fue mayor en plasma que en leche.

Cuadro 2. Estudios en leche materna de mujeres embarazadas con VIH.

Estudio	Tipo de población	N	Dosificación (2 veces al día)	Resultado		Conclusión
Shapiro, <i>et. al.</i> , 2005	Africana (Botswana)	20	3TC/ZDV (150mg/300mg)	Plasma	Leche	Concentraciones más altas en la leche que en el suero. Se necesitan más estudios para comprender el impacto del tratamiento antirretroviral
				Media: 0.678 y 0.058 µg/mL	Media: 1.828 y 0.207 µg/mL	
Mirochnick, <i>et.al.</i> , 2009	Africana (Kenia)	66	3TC/ZDV (150mg/300mg)	Media: 0.508 y 0.023 µg/mL	Media: 1.214 y 0.014 µg/mL	Concentración de 3TC mas alta en leche que en plasma, y concentración de ZDV mas alto en plasma que en leche
Corbett, <i>et.al.</i> , 2014	Africana (Malawi)	30	3TC/ZDV (150mg/300mg) LPV/RTV (400mg/100m)	Cmax: 0.945, 0.197, 10.13 y 0.489 µg/mL	Cmax: 1.112, 0.263, 2.07 y 0.112 µg/mL	Las concentraciones de 3TC y ZDV son menores en plasma que en leche materna, y las concentraciones de LPV y RTV son mayores en plasma.

Adicionalmente, ensayos en mujeres embarazadas con la TARAA durante la lactancia han sugerido una reducción efectiva de la transmisión del VIH, con y sin profilaxis en el neonato. Paralelamente la profilaxis infantil exclusiva con TARAA ha mostrado una disminución en la tasa de transmisión menor al 1.2 %. Por lo cual la OMS recomienda la lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses de edad. No obstante, la mayoría de los estudios sobre excreción de agentes en la leche materna se han realizado en animales (SAP, 2002).

Ya que hasta la fecha existe poca evidencia científica respecto a la excreción de estos antirretrovirales en la leche materna, es de interés el explorar esta vía de excreción. Lo cual nos permite abordar este campo de estudio y su relación con la lactancia materna de pacientes con VIH.

3.7. Metodologías analíticas para la cuantificación de fármacos antirretrovirales en leche materna

Con la finalidad de obtener resultados confiables en la cuantificación de fármacos antirretrovirales en leche materna, es indispensable contar con técnicas bioanalíticas sensibles, específicas y validadas, para lo cual las técnicas cromatográficas han mostrado ser robustas para dicho fin, además de ser aceptadas como métodos de cuantificación en estudios clínicos.

En el **Cuadro 3** se enlistan las metodologías validadas para cuantificar antirretrovirales en leche materna. En la primera columna los tres primeros estudios cuantifican los fármacos de interés, en las siguientes columnas de la tabla se evalúan las condiciones de detección por HPLC acoplado a MS/MS, la columna cromatográfica utilizada, su fase móvil, el tiempo de corrida y por último el método de extracción, los cuales emplean generalmente precipitación de proteínas y extracción en fase sólida. En estudios más actuales de 2014 y 2015, se proponen métodos de extracción mediante una nueva técnica denominada Dried breast milk spot. Sin embargo, esta técnica no ha sido evaluada para extracción de los fármacos de interés.

Debido a que la leche materna es una matriz muy compleja, el desarrollo y la validación de los métodos analíticos resulta una tarea complicada, principalmente a las dificultades para lograr la precisión y la exactitud requerida, además de una buena limpieza en el método de extracción y las posibles repercusiones con el efecto matriz en métodos por espectrometría de masas (Rezk, 2008).

Cuadro 3. Antecedentes de metodologías analíticas para la cuantificación de antirretrovirales en leche materna.

Fármacos identificados y rango de concentración	Condiciones de detección	Condiciones cromatográficas			Método de extracción	Referencia
		Columna	Fase móvil y condiciones de elución	Tiempo de corrida		
LMV, ZDV, NVP, D4t 20-20 000 ng/mL	ND	Atlantis dC18 (150 x 3.0 mm, 3.0 µm) Atlantis dC18 (20 x 3.9 mm, 5.0 µm)	A: acetato de amonio 10 mmol/L pH:6.3 B: 60% ACN y 40% MeOH	23 min	Precipitación de proteínas y extracción en fase sólida	Rezk, <i>et.al.</i> , 2007
LMV, D4t, ZDV, NVP, NFV, RTV, LPV 10-10 000 ng/mL	HPLC-MS/MS ESI (+) y (-)	Aquasil C18, columna de 50 x 2,1 mm, 5 µm	Modo positivo: acetato de amonio /metanol Modo negativo: acido fórmico / metanol	18 min	Precipitación de proteínas y extracción en fase sólida	Rezk, <i>et.al.</i> , 2008
3TC, ZDV, RTV, LPV 10-10 000 ng/mL	HPLC-MS/MS ESI (+) y (-)	Aquasil C18, columna de 50 x 2,1 mm, 5 µm	Modo positivo: acetato de amonio /metanol Modo negativo: acido fórmico / metanol	ND	Precipitación de proteínas y extracción en fase sólida	Corbett, <i>et.al.</i> , 2014
efavirenz 50-7 500 ng/mL	HPLC-MS/MS ESI (-)	C18 columna: 100 mmx2.1 mm, 3 µm	A: acetato de amonio 1 mmol/L en agua B: acetato de amonio 1 mmol/L en ACN	5 min	Dried breast milk spot	Olagunju, <i>et.al.</i> , 2014
nevirpina 50-10 000 ng/mL	HPLC-MS/MS ESI (+)	C18 columna: 100 mmx2.1 mm, 3 µm	A: acido fórmico 0.1% B: ACN	5 min	Dried breast milk spot	Olagunju, <i>et.al.</i> , 2015

ND: no determinado.

3.8. Composición de la leche materna

La leche materna es un líquido producido por la glándula mamaria, de gran complejidad biológica, constituido por nutrimentos, sustancias inmunológicas, hormonas, enzimas, factores de crecimiento, células inmunoprotectoras, entre otros (**Figura 7**), que la hacen nutricional e inmunológicamente apta para que un niño sea alimentado con ella en forma exclusiva durante los primeros seis meses de vida ya que estimula el desarrollo adecuado del lactante (García, 2011), es por eso que la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la lactancia materna para todas las mujeres.

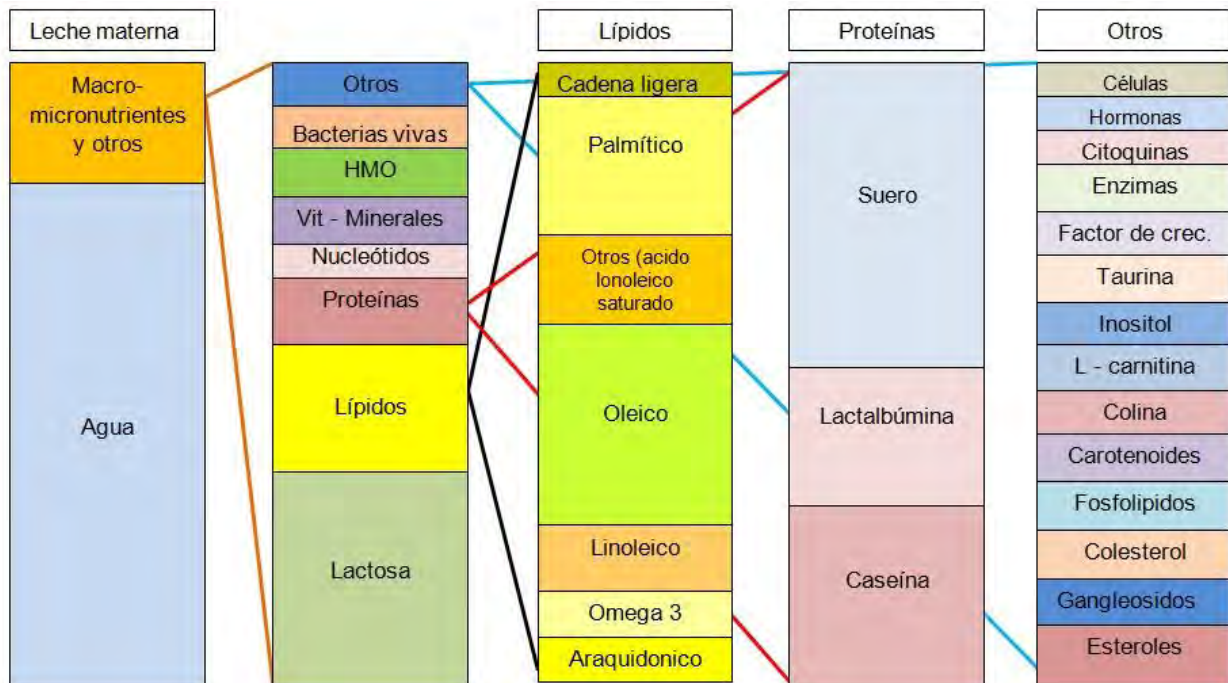


Figura 7. Composición de la leche materna. La leche materna es una mezcla compleja que contiene muchos macro y micronutrientes: proteínas, lípidos, carbohidratos, células vivas, hormonas, vitaminas etc.

La lactancia materna en el humano tiene diferentes etapas (a través del tiempo) y cada una varía en relación a volumen, duración y composición (Sabillón, 1997).

- **El precalostro:** se produce a partir de la semana 16 de embarazo, es rica en proteínas, nitrógeno total, inmunoglobulinas, ácidos grasos, magnesio, hierro, sodio y cloro, tiene bajas concentraciones de lactosa.
- **El calostro:** se secreta cinco a siete días después del parto, aunque en las mujeres multíparas puede presentarse al momento del nacimiento de los bebés, tiene una consistencia pegajosa y es de color amarillento por la presencia de β -carotenos, protege contra infecciones y alergias ya que transfiere inmunidad pasiva.
- **La leche de transición:** su producción se inicia después del calostro y dura entre cinco y diez días progresivamente se elevan sus concentraciones de lactosa, grasas, aumento de colesterol y fosfolípidos y vitaminas hidrosolubles, disminuyen las proteínas, las inmunoglobulinas y las vitaminas liposolubles, su color es blanco esto se debe a la emulsificación de grasas y a la presencia de caseinato de calcio.
- **La leche madura:** comienza su producción a partir del día 15 postparto y puede continuar por más de 15 meses. Su volumen promedio es de 750 mL/día, pero puede llegar hasta 1,200 mL/día en madres con embarazo múltiples (García, 2011).

3.9. Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) como método de separación

En cromatografía de líquidos, los analitos se separan por medio de la distinta velocidad de desplazamiento, cuando son arrastrados por una fase móvil a través de un lecho cromatográfico que contiene una fase estacionaria.

La muestra se disuelve en la fase móvil y se hace pasar a través de la fase estacionaria, que se mantiene fija en una columna. Las dos fases se eligen de tal modo que los componentes de la muestra se distribuyen de manera distinta entre las dos fase. Aquellos que son fuertemente retenidos por la fase estacionario se mueven lentamente con el flujo de fase móvil, mientras los que se retienen débilmente avanzan con más rapidez. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una herramienta analítica versátil y muy útil en la identificación y cuantificación de concentraciones baja de fármacos y metabolitos en matrices biológicas complejas (Pushpa, *et.al.*, 2014). No obstante, la tecnología disponible para bioanálisis ha ido evolucionado a lo largo de los años, con la finalidad de hacer más eficientes los procesos de análisis. En este sentido, el análisis mediante HPLC, se ha innovado, llegando a plantear las técnicas de ultra alta resolución UPLC, (Ultra high Performance Liquid Cromatography), sin embargo el fundamento analítico sigue siendo el mismo.

Los componentes más importantes del cromatógrafo de líquidos son (**Figura 8**).

- 1) **Sistema de suministro de disolventes (fase móvil):** contiene los disolventes elegidos para la separación cromatográfica
- 2) **Bomba:** es la encargada de suministrar el flujo adecuado, la elución que suministra deber ser constante a lo largo del tiempo ya que de él depende la reproducibilidad de los tiempos de retención. La elución puede ser de modo isocrático (las proporciones de los disolventes presentes en la fase móvil permanece constante a través del tiempo) o en gradiente (las proporciones de los disolventes presentes en la fase móvil cambia a través del tiempo).
- 3) **Sistema de inyección:** se encarga de introducir y tomar volúmenes exactos de 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 confiere una hidrofobicidad y una interacción química diferente, por lo cual su correcta elección

en función del tipo de analitos a separar determina el tipo de interacción molecular que se lleva a cabo.

5) **Detector:** utiliza 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.

6) **Software:** es el encargado de transformar la señal en una representación grafica en función al tiempo llamada cromatograma (Martínez, 2016).

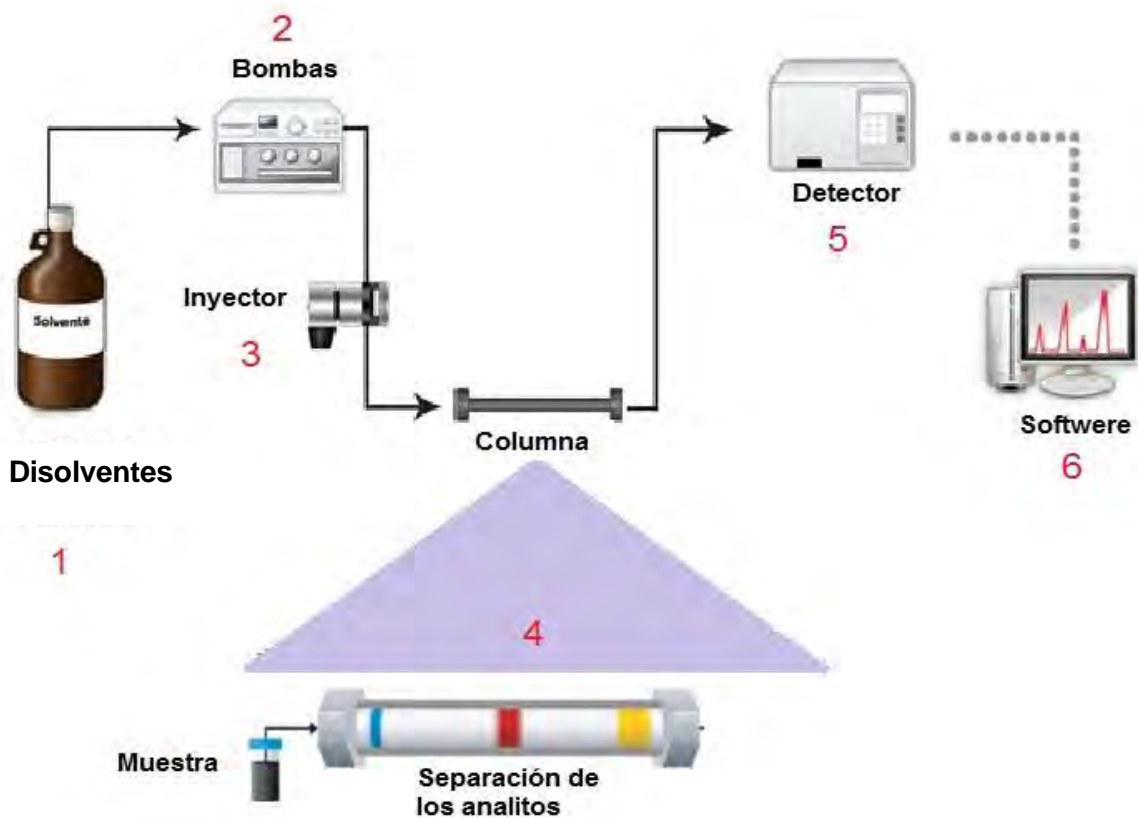


Figura 8. Esquema de los componentes en el cromatógrafo de líquidos. Suministro de disolventes (1), bombas (2), inyector (3), columna cromatográfica (4), detector (5) y el software (6).

El UPLC emplea columnas cromatográficas cuyo tamaño de partícula es menor a 2 micras de diámetro, estas pequeñas partículas hacen que la trayectoria de difusión entre los analitos de la muestra y la fase estacionaria sea más corta lo que da como resultado una mayor eficiencia, sin embargo esta disminución en el tamaño de partícula ocasiona mayor resistencia al flujo de la fase móvil y como consecuencia se incrementa la presión del sistema. En este sentido, los equipos UPLC son capaces de trabajar a altas presiones y suministrar un caudal de fase móvil con una mínima dispersión, lo que produce picos más estrechos que aumentan el rendimiento y reducen el consumo de disolventes y el tiempo de análisis es más corto, sin comprometer los resultados analíticos, (Wu, *et.al.*, 2006).

El mecanismo de 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 los platos teóricos (H) con la velocidad lineal media de la fase móvil.

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

Se comprueba que para cada columna existe un caudal óptimo, correspondiente al mínimo de la curva representativa de la ecuación donde obtiene la máxima eficacia de la separación (**Figura 9**)

A, B, 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 tamaño y su irregularidad originan la formación de diversos

caminos. Al disminuir el tamaño de partícula se corren trayectorias uniformes.

- **Difusión longitudinal (B/v):** el soluto tiende a difundir hacia los bordes de la zona, cuando menor es el caudal de la 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 cual es posible incrementar la resolución y la velocidad de análisis sin afectar el rendimiento cromatográfico empujando 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 (Martínez, 2016).

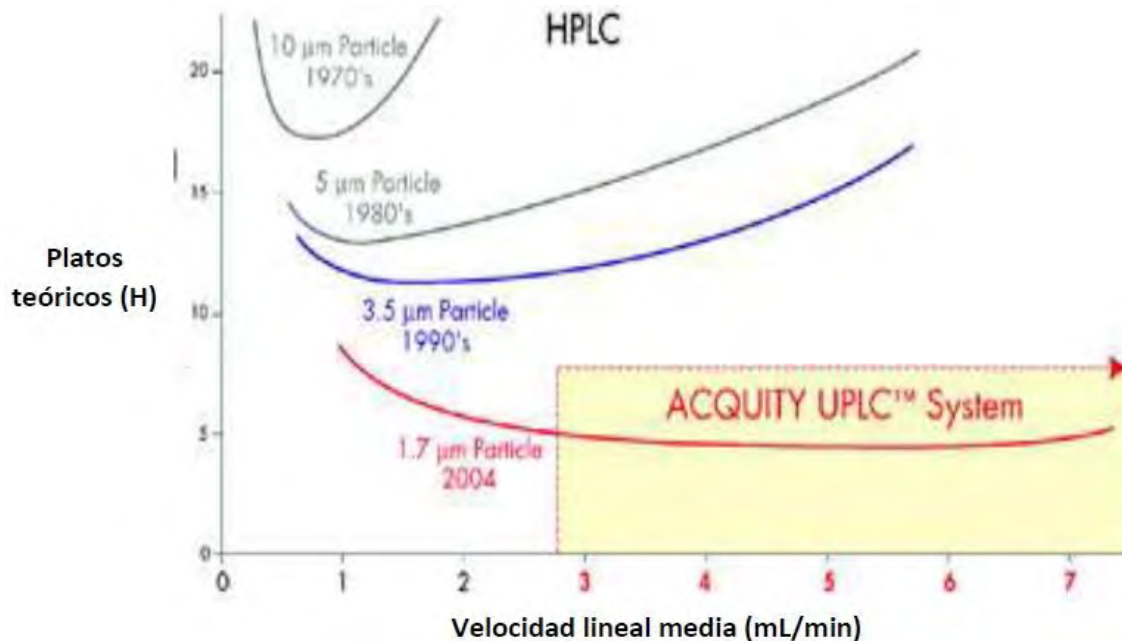


Figura 9. Rango óptimo de trabajo según la ecuación de Van Deemter para columnas con diferente tamaño de partícula. Entre más pequeño es el diámetro de la partícula es menor el tiempo de análisis.

3.10. Acoplamiento de detectores de espectrometría de masas

Mientras la cromatografía de líquidos combina el poder de la 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 permite llevar a cabo análisis más sensibles y específicos en menos tiempo empleando un volumen menor de muestra.

La espectrometría de masas es una técnica que permite la identificación específica y cuantificación de moléculas, basada en su relación masa/carga (m/z). Los compuestos ionizados son acelerados y seleccionados a través de un campo eléctrico-magnético. El equipo encargado de hacer esta función consta de cuatro módulos fundamentales (**Figura 10**):

- 1) **Sistema de introducción de muestra:** puede provenir del sistema cromatográfico o mediante la infusión directa al sistema de espectrometría de masas permitiendo realizar ajuste y optimización del espectro de masas (*tuning*).
- 2) **Fuente de ionización:** la función de la fuente de ionización es aplicar energía a la muestra para generar iones, ya que para medir las moléculas por espectrometría de masas éstas deben estar “eléctricamente cargadas” (iones). 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, aplicando altos voltajes y un flujo de nitrógeno de manera que el eluyente se convierte en un aerosol cargado.
- 3) **Analizador de iones:** 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. El analizador utilizado en este estudio fue el 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 por 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. En el primer cuadrupolo (Q1) se focaliza el analito ionizado (ion precursor) en relación a su m/z . El segundo cuadrupolo (Q2) se comporta como una celda de colisión donde el ion precursor interactúa con argón (gas de colisión) y se fragmenta. Finalmente en el tercer cuadrupolo (Q3) se focaliza uno o varios de los iones producto, provenientes de la fragmentación de ion precursor que se utiliza para la identificación y cuantificación del compuesto.

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 dinodo de conversión de alto voltaje para conseguir alta sensibilidad. 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 (Martínez, 2016).

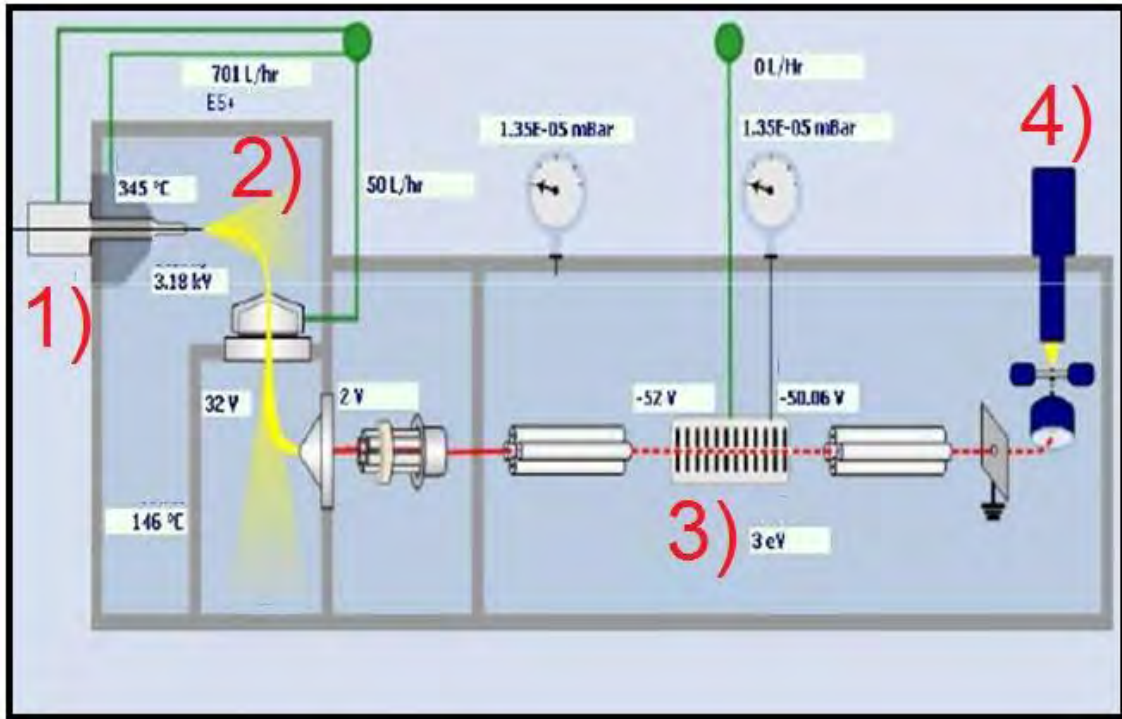


Figura 10. Partes del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Está constituido por un sistema de introducción de la muestra (1), una fuente de ionización (2), un analizador de iones (3) y un detector (4).

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 múltiple de reacciones (MRM) la cual filtra los iones seleccionados y tiene la capacidad de monitorear simultáneamente fragmentaciones definidas para la detección de los analitos de interés

3.11. Desarrollo del método analítico

El uso de UPLC y MS/MS para ensayos de bioanálisis se aceptan como la herramienta analítica de elección para la detección selectiva y sensible de compuestos de interés en matrices complejas.

Para el desarrollo del método analítico se debe de seguir una serie de pasos congruentes y bien esquematizados, el primer paso consiste en la elección de la

instrumentación adecuada para la detección y separación de los analitos de interés por último se propone un método de extracción a partir de la matriz biológica. Para llevar a cabo el desarrollo del método analítico, es necesario conocer las propiedades fisicoquímicas de los analitos así como la composición de la matriz biológica (Waters, 2008).

3.12. Validación del método analítico

La validación de un método analítico es un proceso mediante el cual se demuestra a través de procedimientos experimentales que este es confiable y reproducible, además de que es adecuado para el fin previsto.

Los parámetros fundamentales para la validación de un método analítico involucran: precisión, exactitud, selectividad, sensibilidad, reproducibilidad y estabilidad. Es por esto que la validación de un método implica adicionalmente documentar todos los procedimientos experimentales que comprueben el buen funcionamiento del método (FDA, 2015). Todos los parámetros de evaluación del método analítico, así como los criterios de aceptación, rechazo y ejecución se encuentran en la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 para México y en guías de consenso internacional como la FDA. Estos parámetros se describen a continuación:

3.12.1. Adecuabilidad

Es la evaluación de la aptitud del sistema cromatográfico, esto permite verificar que el sistema de medición funciona apropiadamente, independientemente de las condiciones ambientales.

3.12.2. Efecto de acarreo

Es la cantidad de analito a cuantificar que es retenida en alguna parte del sistema cromatográfico: inyector, bomba, tuberías, columna y/o agujas, esto es un problema cuando esta cantidad es liberada y detectada sumándose a la señal obtenida por la muestra afectando parámetros como la precisión y exactitud (Osnaya, 2015).

Por lo cual es necesario implementar sistemas de lavado inter-corrída, a modo que la precisión y exactitud del método no se vean afectados.

3.12.3. Selectividad

Es la capacidad del método para diferenciar y cuantificar analitos específicos bajo las condiciones dadas en matrices, simples o complejas sin interferencia de otros componentes de la muestra. (IUPAC, 2001).

3.12.4. Efecto matriz

El efecto matriz es un problema común al trabajar con espectrometría de masas, este problema se define como la alteración de la eficiencia de la ionización del analito, por la presencia de sustancias coeluyentes en la muestra, el mecanismo de este fenómeno aun no es conocido, sin embargo, en estudios realizados a compuestos de diversas polaridades se observó que entre mayor sea la polaridad del compuesto a cuantificar el efecto matriz se incrementa. La forma en la que evalúa es mediante la post-extracción que consiste en realizar el proceso de extracción en una muestra de matriz blanco, posterior a esto se adiciona una concentración conocida del analito y se inyecta al sistema cromatográfico, de la misma forma se inyecta el analito en solución en el sistema y se comparan las respuestas (Taylor, 2005).

3.12.5. Límite de detección

Es la menor cantidad o concentración de analito que se puede detectar (no necesariamente cuantificar) con reproducibilidad (Plasencia, et.al., s.f).

3.12.6. Límite inferior de cuantificación (LIC)

Es la mínima cantidad o concentración de analito que es posible determinar cuantitativamente con precisión y exactitud adecuada. El LIC usualmente es considerado el punto más bajo de la curva de calibración; para estudios de bioequivalencia la NOM-177-2013 hace referencia que este se determina con base al 5% de la concentración máxima (C_{max}) reportado para el analito de interés además la señal debe de ser 5 veces mayor a la señal ruido.

3.12.7. Linealidad

Para la cuantificación de un analito es necesario conocer la respuesta del instrumento frente a la molécula en un rango de concentraciones conocidas, esto se hace utilizando una curva de calibración, que tiene una relación concentración-respuesta lo que permite la cuantificación del analito. La relación concentración-respuesta, generalmente se trabaja con expresiones matemáticas sencillas del tipo ecuaciones de una recta ($y=mx+b$), la calidad y confiabilidad de estas son evaluadas por medio del coeficiente de correlación (r) y de determinación (r^2) cual debe tener un valor mayor o igual a 0.99, entre más cercano sea este valor el ajuste de los datos al modelo matemático será mayor (Osnaya, 2015).

3.12.8. Rango de las curvas de calibración

Se debe contar con un intervalo en función de las concentraciones esperadas de los analitos de interés, este se puede determinar basándose en las

concentraciones reportadas en otros estudios (C_{max}), así como en la concentración efectiva reportadas en los análisis clínicos.

3.12.9. Curva de calibración

Es la representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito. Con lo cual el método analítico tiene la capacidad para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración de un compuesto en una muestra, dentro de un determinado intervalo de trabajo (Dosal, *et.al.*, 2008).

3.12.10. Exactitud

Es la capacidad del método analítico para acercarse al valor real o de referencia. Es decir, si realizamos varias mediciones, mide lo cercana entre la media y el valor real.

3.12.11. Precisión

Es el grado de concordancia o dispersión entre una serie de medidas obtenidas del muestreo múltiple de la misma muestra en las mismas condiciones, esto se refiere a la capacidad de dar el mismo resultado en mediciones diferentes. La precisión puede ser considerada en dos niveles: repetibilidad y reproducibilidad. (Osnaya, 2015).

3.12.12. Repetibilidad

Indica el grado de concordancia entre resultados mutuamente independientes, obtenidos utilizando las mismas condiciones de método, material, laboratorio, operador, equipo y habitualmente se realiza en un sólo día de análisis.

3.12.13. Reproducibilidad

Es el grado de concordancia entre resultados interlaboratorios, en diferentes días, analista, equipos, y se realiza con la finalidad de asegurar que en cada día de análisis las muestras evaluadas serán confiables aun cuando una variable como el analista sea cambiada (Ruiz, *et.al.*, 2011).

3.12.14. Recuperación absoluta

Es la respuesta obtenida del detector a partir de una cantidad de analito añadido y extraído de la matriz biológica, en comparación con la respuesta del detector obtenidos de la misma concentración en solución por medio de proceso de post-extracción (Osnaya, 2015).

3.12.15. Estabilidad

Es la capacidad de un fármaco de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas. De este modo las pruebas de estabilidad se realizan con la finalidad de evaluar las propiedades químicas del fármaco en condiciones de almacenamiento, en solución y en la matriz antes, durante y después del tratamiento de la muestra (NOM-177-2013).

La NOM-177-2013 hace hincapié en siete evaluaciones de estabilidad:

- **Estabilidad de la muestra.** Es utilizado para determinar las condiciones de temperatura y tiempo en las que el fármaco permanecerá estable en la matriz biológica durante su manejo, toma de muestra, almacenamiento y procesamiento analítico.

-
- **Estabilidad en los ciclos de congelación / descongelación.** Se realiza con el fin de determinar las condiciones de almacenamiento a largo plazo en situaciones de re-análisis de las muestras.

 - **Estabilidad a corto plazo.** Se almacenan las muestras a temperatura ambiente durante el tiempo necesario para el procesamiento y análisis de muestras, posteriormente se procesan y analizan las muestras.

 - **Estabilidad a largo plazo.** Se evalúan las condiciones de almacenamiento durante el tiempo equivalente al periodo desde la toma de muestra hasta su análisis.

 - **Estabilidad de la muestra procesada.** La evaluación de la estabilidad del fármaco en la muestra procesada a temperatura ambiente o bajo condiciones de almacenamiento utilizadas durante el estudio.

 - **Estabilidad del automuestreador.** Se evalúa la estabilidad del fármaco en la muestra procesada a la temperatura del inyector o automuestreador.

 - **Estabilidad en solución.** Se realiza en caso de que la solución de referencia no sea utilizada inmediatamente, tanto para el fármaco como para el estándar interno (Osnaya, 2015).

4- JUSTIFICACIÓN

El VIH/SIDA sigue siendo uno de los problemas más graves de salud pública del mundo, especialmente en los países de ingresos medios y bajos como lo es México. Una de las poblaciones más vulnerables frente a esta infección son las mujeres embarazadas y sus neonatos (OMS, 2015). En este sentido, la transmisión vertical del virus, es la primera causa de infección del VIH en niños, por lo que una estrategia para evitar esta transmisión es tratar a la madre con fármacos antirretrovirales e inhibir la lactancia (Rezk, 2008). Sin embargo, esta condición predispone al neonato a otro tipo de riesgo, ya que la mayoría de estos bebés nacen con un nivel de inmunodepresión propios del contexto de la madre infectada y su embarazo; además, la alimentación con fórmula ha mostrado una alta tasa de morbilidad y mortalidad infantil debido a enfermedades diarreicas. Así mismo, en algunos lugares en los cuales ha resultado poco accesible la alimentación con fórmula debido a cuestiones económicas y culturales (Slater, *et al.*, 2010; Morales, s.f.). Debido a que el TARAA durante la lactancia ha mostrado una disminución en la tasa de transmisión menor al **1.2 %**, la OMS recomienda la lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses de edad, justificado en los indiscutibles beneficios de esta en el desarrollo del bebé, así como la baja tasa de transmisión de la infección (Slater, *et al.*, 2010).

En contraste, a la fecha existe poca evidencia científica respecto a la excreción de la TARAA, (zidovudina, lamivudina, lopinavir y ritonavir,) en la leche materna, así como su asociación con la carga viral responsable de la transmisión, por lo que resulta de interés el explorar la leche como vía de excreción.

5- OBJETIVO

Desarrollar y validar un método analítico mediante la técnica de cromatografía líquida de ultra alta resolución asociada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) para la determinación simultánea de LMV, ZDV, LPV y RTV en leche materna de mujeres VIH+.

6- DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo el desarrollo experimental del presente trabajo de tesis se plantearon las dos siguientes etapas:

- 1- Desarrollo del método analítico: donde se establecieron las condiciones óptimas de detección, separación, extracción y cuantificación simultánea de los cuatro antirretrovirales.
- 2- Validación del método analítico: donde se sometió a diversas pruebas de confiabilidad bajo los criterios establecidos en la NOM-177-SSA1-2013 y de consenso internacional.

6.1. Material

- Matraz volumétrico clase A de 10 mL
- Matraz volumétrico clase A de 5 mL
- Tubos eppendorf® de 2 mL
- Micropipeta de 1000 µL, 200 µL, 100 µL y 10 µL
- Tubos falcón de 15 mL y 50 mL
- Matraz erlenmeyer
- Vasos de precipitados de 10 y 100 mL
- Tubo de vidrio de 10 mL
- Espátulas
- Puntas para pipeta semiautomática de 1000 µL, 200 µL, 100 µL y 10 µL
- Probeta de 100 mL
- Gradilla para tubos de ensaye
- Guantes de nitrilo
- Naves de pesado
- Piceta
- Sistema de filtración de fases móviles

- Membranas de filtración nitrocelulosa poro de 0.45 µm Merck Millipore®
- Membrana de filtración Fluoropore, poro de 0.22 µm Merck Millipore®
- Cartuchos de extracción Oasis® MCX 3cc (60mg)
- Filtros para jeringa 0.2 µm RC Phenomenex®
- Columna ACQUITY UPLC® BEH C18 (2.1 µm x 50 mm, 1.7 µm)
- Columna ACQUITY UPLC® BEH C8 (2.1 µm x 50 mm, 1.7 µm)
- Columna ACQUITY UPLC® BEH Shield RP18 (2.1 µm x 50 mm, 1.7 µm)

6.2. Reactivos y sustancias de referencia

6.2.1. Reactivos

Cuadro 4. Reactivos utilizados en el desarrollo y validación del método analítico.

Disolvente	Proveedor	Grado
Acetonitrilo (ACN)	J.T. Baker®	HPLC
Metanol (MeOH)	J.T. Baker®	HPLC
Ácido fórmico (AF)	Fluka, Sigma Aldrich® (> 98%)	HPLC
Agua desionizada	MilliQ	18 MΩ·cm
Isopropanol	J.T. Baker®	HPLC
Acetato de amonio	J.T. Baker®	

6.2.2. Sustancias de referencia

Cuadro 5. Sustancias de referencia utilizadas.

Estándar ó materia prima	Proveedor	Grado	Pureza	No. De lote
Lamivudina 200 mg	USP	Estándar primario	99.7%	1356836
Zidovudina 400 mg	USP	Estándar primario	99.0%	1724500
Lopinavir 350 mg	USP	Estándar primario	99.8%	1370101
Ritonavir 200 mg	USP	Estándar primario	99.2%	1604803
Simvastatina 200 mg	USP	Estándar primario	99.5%	159852
Cafeína 200 mg	USP	Estándar primario	100%	1085003
Paracetamol 400 mg	USP	Estándar primario	100%	1003009
Naproxeno 200 mg	USP	Estándar primario	100%	1457301
Ácido acetilsalicílico 125 mg	USP	Estándar primario	100%	1609002
Bromuro de Butilhioscina 125 mg	USP	Estándar primario	100%	1078201
Meleato de Clorfenamina 125 mg	USP	Estándar primario	100%	400005163

6.3 Equipos e Instrumentos

Cuadro 6. Equipos e instrumentos utilizados en el desarrollo y validación del método analítico.

Equipo/Instrumento	Marca	Modelo
ACQUITY UPLC El Software masslynx versión 4.1 1	Waters	UPH
Xevo TQ ESI	Waters	UPH
Agitador vortex	IKA®	PA1024-31
Centrifuga	Eppendorf®	5804 R
Balanza analítica	Sartorius®	CPA225D
Ultrasonicador	Cole-Parmer®	08895-52
sistema de purificación de agua Synergy	Merck Millipore®	CDUFB1001

6.4. Material biológico

Muestras de calostro, leche materna de transición y madura proporcionadas por el banco de leche del INPer.

6.5. Preparación de soluciones

6.5.1. Ácido fórmico al 0.1% (AF)

Medir y transferir cuantitativamente 500 mL de H₂O desionizada y adicionar 500µL de ácido fórmico, filtrar al vacío la mezcla con una membrana de nitrocelulosa (0.45 µm) y desgasificar en baño de ultrasonido por 15 minutos.

6.5.2. Acetonitrilo (ACN)

Colocar 500 mL de ACN en un frasco contenedor de fase móvil filtrar al vacío con una membrana de nitrocelulosa (0.45 μm) y desgasificar en baño de ultrasonido por 15 minutos.

6.5.3. Preparación de las soluciones de trabajo

Todas las soluciones de los fármacos, así como del Estándar interno (EI) se prepararon a una concentración 20 veces mayor de forma que al agregarse a la leche materna estas quedarán a la concentración final requerida.

6.5.4. Soluciones de referencia de los fármacos antirretrovirales

Pesar individualmente y con exactitud 5 mg de cada uno de los estándares de referencia LMV, ZDV, LPV y RTV, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 5 mL, disolver y llevar al aforo con ACN para LPV y RTV, y MeOH/H₂O (50/50) para LMV y ZDV. La concentración final obtenida para cada una de las soluciones fue de 1 mg/mL.

6.5.5. Soluciones de trabajo de la curva de calibración

De las soluciones de referencia de cada uno de los fármacos (1 mg/mL) se tomaron alícuotas de 120 μL , 30 μL , 240 μL y 12 μL para LMV, ZDV, LPV y RTV respectivamente para hacer una mezcla. Posteriormente se adicionó 598 μL de ACN, para llegar a un volumen total de 1 mL, se mezcló mecánicamente en vortex. A partir de esta solución (solución intermedia) se prepararon una serie de diluciones sucesivas para obtener los puntos de la curva de calibración como se muestra en la **Figura 11**. Adicionalmente en el **Cuadro 7** se muestran las concentraciones finales de cada una de estas soluciones.

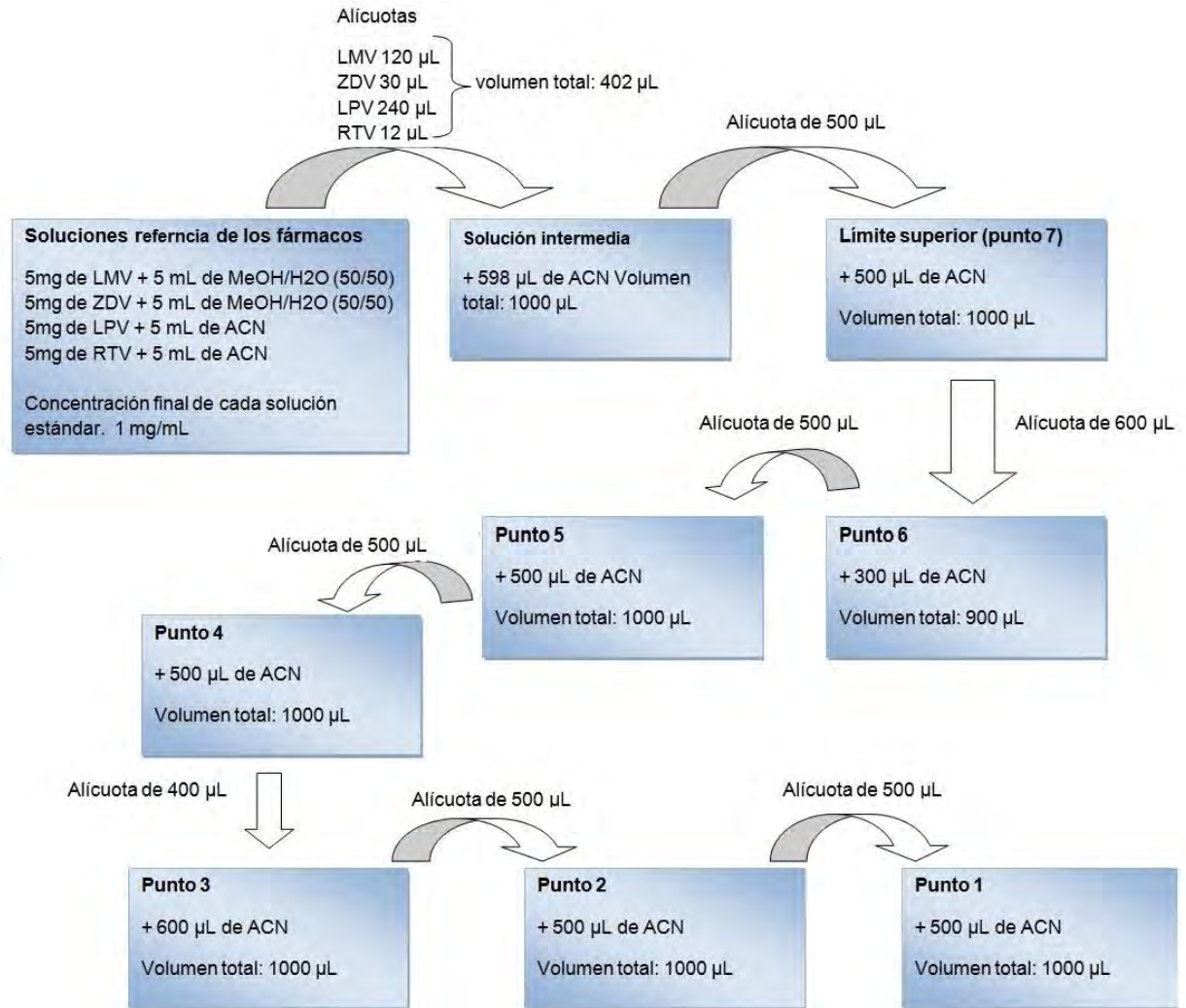


Figura 11. Diagrama de preparación de los puntos de curva de calibración en solución. La preparación de las muestras para los puntos de la curva de calibración se realizó mediante diluciones sucesivas a partir de las soluciones de referencia preparadas.

Cuadro 7. Preparación de los puntos de la curva de calibración y su concentración en solución.

No de solución de trabajo	Solución de procedencia	Alícuota de la solución de procedencia	Volumen total con ACN	Concentración (ng/mL)
7	Solución de trabajo	500 µL	1000 µL	LMV: 60 000 ZDV: 15 000 LPV: 120 000 RTV: 6 000
6	7	600 µL	900 µL	LMV: 40 000 ZDV: 10 000 LPV: 80 000 RTV: 4 000
5	6	500 µL	1000 µL	LMV: 20 000 ZDV: 5 000 LPV: 40 000 RTV: 2 000
4	5	500 µL	1000 µL	LMV: 10 000 ZDV: 2 500 LPV: 20 000 RTV: 1 000
3	4	400 µL	1000 µL	LMV: 4 000 ZDV: 1 000 LPV: 8 000 RTV: 400
2	3	500 µL	1000 µL	LMV: 2 000 ZDV: 500 LPV: 4 000 RTV: 200
1	2	500 µL	1000 µL	LMV: 1 000 ZDV: 250 LPV: 2 000 RTV: 100

6.5.6. Solución de referencia de estándar interno

Pesar con exactitud 5 mg de simvastatina (SMV), trasvasar cuantitativamente en un matraz volumétrico de 5 mL, disolver y llevar al aforo con metanol/agua (50/50) agitar para homogenizar, adicionalmente la muestra se sónica por 5 minutos para una mejor solubilidad, la concentración final obtenida fue de 1 mg/mL.

6.5.7. Solución de trabajo de estándar interno

A partir de la solución de referencia del estándar interno se realizaron diluciones con ACN hasta obtener una concentración final de 10 000 ng/mL de SMV. La preparación de la solución de trabajo del estándar interno se esquematiza en la **Figura 12**.

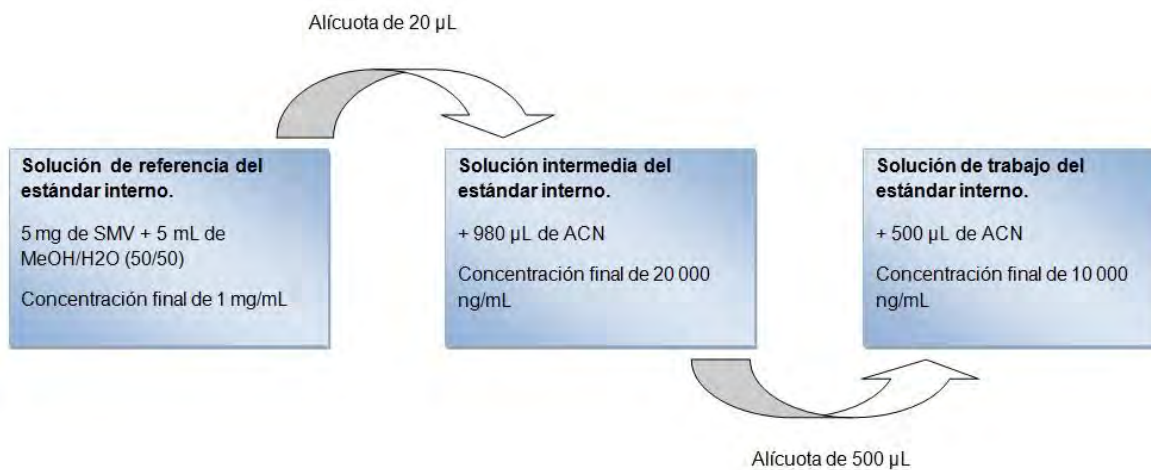


Figura 12. Diagrama de la preparación de la solución de estándar interno. La preparación de la solución de trabajo del EI se realizó mediante diluciones sucesivas a partir de la solución de referencia.

6.5.8. Preparación de la curva de calibración en leche materna

De forma independiente y en microtubos de 2 mL se colocaron 200 µL de leche materna, posteriormente se les adicionó una alícuota de 10 µL de cada uno de los

puntos de la curva en solución y se agitó en vortex durante 3 minutos, posteriormente se le adicionó 10 µL de la solución de trabajo del EI y se mezcló en vortex por 3 minutos. En el **Cuadro 8** se muestra la concentración final para cada uno de los puntos de la curva.

Cuadro 8. Preparación de los puntos de la curva de calibración y su concentración en leche materna.

Punto de la curva en solución	Alícuota de la solución	Volumen de leche	Volumen total	Concentración final (ng/mL)	Volumen del EI
7	10 µL	200 µL	210 µL	LMV: 3 000 ZDV: 750 LPV: 6 000 RTV: 300	10 µL
6	10 µL	200 µL	210 µL	LMV: 2 000 ZDV: 500 LPV: 4 000 RTV: 200	10 µL
5	10 µL	200 µL	210 µL	LMV: 1 000 ZDV: 250 LPV: 2 000 RTV: 100	10 µL
4	10 µL	200 µL	210 µL	LMV: 500 ZDV: 125 LPV: 1000 RTV: 50	10 µL
3	10 µL	200 µL	210 µL	LMV: 200 ZDV: 50 LPV: 400 RTV: 20	10 µL
2	10 µL	200 µL	210 µL	LMV: 100 ZDV: 25 LPV: 200 RTV: 10	10 µL
1	10 µL	200 µL	210 µL	LMV: 50 ZDV: 12.5 LPV: 100 RTV: 5	10 µL

6.5.9. Preparación de los puntos control de la curva de calibración

A partir de las soluciones de referencia de los fármacos se preparó las solución intermedia de manera similar a la descrita en la preparación de los puntos de la curva de calibración, a partir de ella se prepararon las muestras control alta, media y baja por medio de diluciones sucesivas, como se muestran en la **Figura 13**, adicionalmente en el **Cuadro 9** se describen las concentraciones finales de cada muestra control.

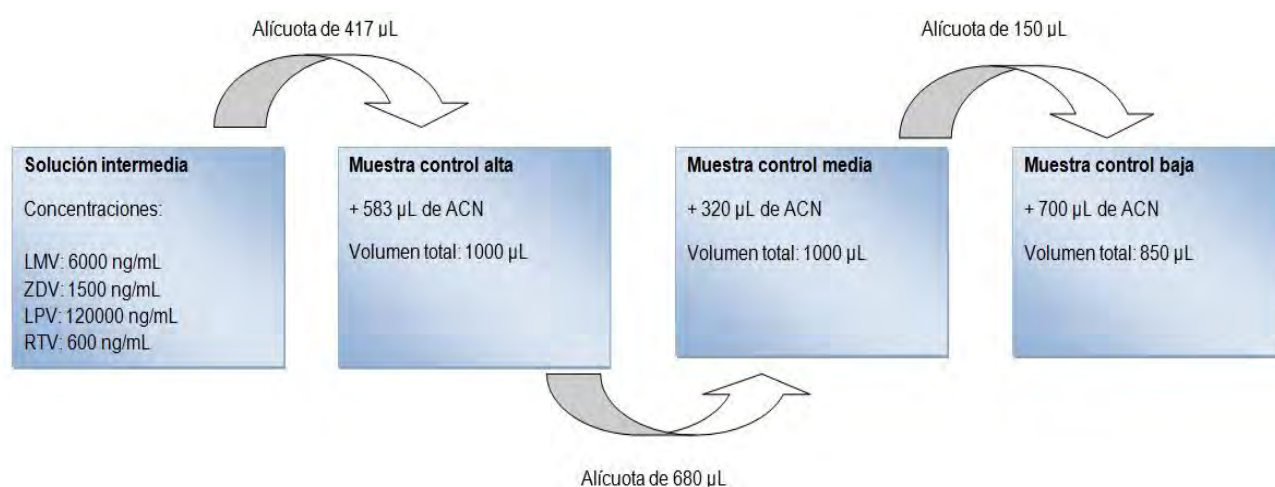


Figura 13. Diagrama de preparación de los puntos control en solución. Los puntos control se realizaron mediante diluciones sucesivas.

Cuadro 9. Preparación de las muestras control en solución y su concentración.

No de solución de trabajo	Solución de procedencia	Alícuota de la solución de procedencia	Volumen total en ACN	Concentración (ng/mL)
MCA	Solución intermedia	417 µL	1000 µL	LMV: 50 000 ZDV: 12 500 LPV: 100 000 RTV: 5 000
MCM	MCA	680 µL	1000 µL	LMV: 34 000 ZDV: 8 500 LPV: 68 000 RTV: 3 400
MCB	MCM	150 µL	1000 µL	LMV: 6 000 ZDV: 1 500 LPV: 12 000 RTV: 600

Posteriormente se prepararon las muestras en leche materna adicionando 10 μ L de las soluciones de los puntos control en 200 μ L de leche materna y se mezcló en vortex durante 3 minutos, posteriormente se le adicionó 10 μ L de la solución de trabajo del EI y se mezcló en vortex por 3 minutos. En el **Cuadro 10** se muestra la concentración final para cada uno de los puntos control en leche materna.

Cuadro 10. Preparación de los puntos control en leche materna y su concentración final.

Punto control	Alícuota de la solución	Volumen de leche	Volumen total	Concentración (ng/mL)	Volumen del EI
MCA	10 μ L	200 μ L	210 μ L	LMV: 2 500 ZDV: 625 LPV: 5 000 RTV: 250	10 μ L
MCM	10 μ L	200 μ L	210 μ L	LMV: 1 500 ZDV: 375 LPV: 3 000 RTV: 150	10 μ L
MCB	10 μ L	200 μ L	210 μ L	LMV: 300 ZDV: 75 LPV: 600 RTV: 30	10 μ L

A manera de resumen en el **Cuadro 11** se presentan las concentraciones finales de la curva de calibración y los puntos control en leche materna, así como los porcentajes que representa cada uno de ellos a partir de la C_{max} , cabe señalar que las concentraciones planteadas para el LIC representan un valor menor al 5% de la C_{max} propuesta para cada fármaco.

Cuadro 11. Concentración final de los puntos de la curva de calibración y los puntos control.

	Puntos de la curva (ng/mL)							Puntos control (ng/mL)		
Nivel	1	2	3	4	5	6	7	CB	CM	CA
Fármaco	2.5%	5%	10%	25%	50%	(C _{max}) 100%	150%	15%	85%	125%
LMV	50	100	200	500	1000	2000	3000	300	1700	2500
ZDV	12.5	25	50	125	250	500	750	75	425	625
LPV	100	200	400	1000	2000	4000	6000	600	3400	5000
RTV	5	10	20	50	100	200	300	30	170	250

6.6. Desarrollo del método analítico

El desarrollo del método analítico mediante UPLC-MS/MS, involucro una serie de pasos lógicos y bien esquematizados (**Figura 14**) que permitieron hacer ajustes fácilmente rastreables, en primer lugar se definieron las condiciones de detección por espectrometría de masas en tándem, una vez definidas se desarrollaron las condiciones de separación cromatográficas y finalmente se desarrollo una metodología apropiada de extracción a partir de leche materna.

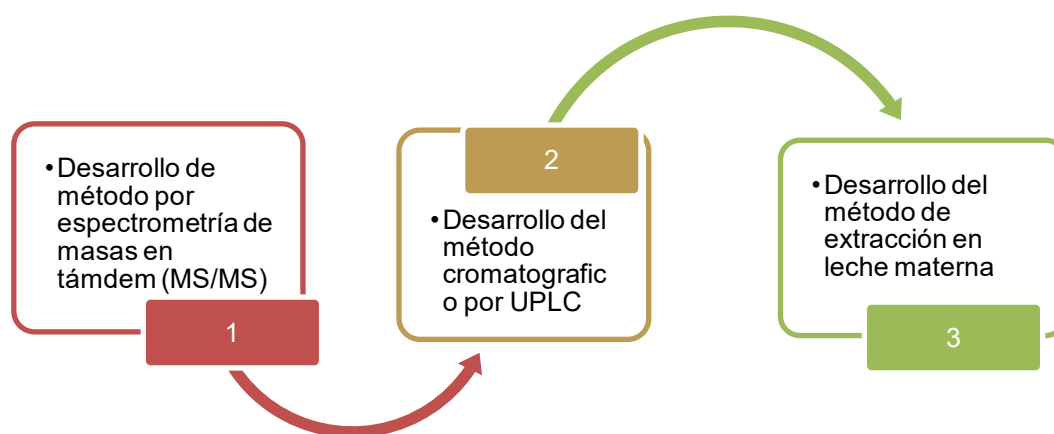
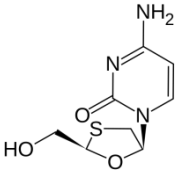
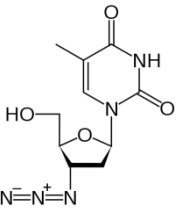
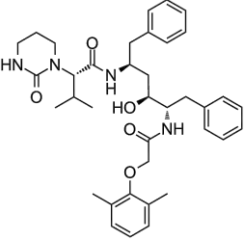
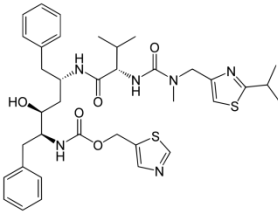


Figura 14. Proceso lógico en el desarrollo del método analítico. Inicia con el desarrollo de la detección por MS (1) seguida de la separación cromatográfica por UPLC (2) y finalmente la extracción de los analitos a partir de la matriz biológica (3).

Para poder realizar los pasos presentes en el desarrollo del método analítico se requiere conocer las propiedades fisicoquímicas de las fármacos antirretrovirales en el **Cuadro 12** se enlistan dichas propiedades, donde se puede observar cierto contraste en algunas de sus propiedades fisicoquímicas tales como peso molecular, solubilidad y logP, lo cual vuelve compleja la determinación simultánea de estos cuatro compuestos, como lo puede indicar la literatura limitada al respecto. Finalmente el método analítico se somete al proceso de validación para demostrar su confiabilidad y posterior aplicación.

Cuadro 12. Propiedades fisicoquímicas de LMV, ZDV, LPV y RTV.

Fármacos	LMV	ZDV	LPV	RTV
Estructura química				
Propiedades fisicoquímicas	Formula: $C_8H_{11}N_3O_3S$ Peso Molecular: 229,3g/mol Solubilidad: 70 mg/mL en H_2O logP: -1.4 pka: 14.29	Formula $C_{10}H_{13}N_5O_4$ Peso Molecular: 267,24 g/mol Solubilidad: 20,1 mg/mL en H_2O LogP: 0.05 pka: 9.96	formula: $C_{37}H_{48}N_4O_5$ Peso Molecular: 628.80 g/mol Soluble en MeOH e insoluble en H_2O Log P: 3.91 pka: 13.39	formula: $C_{37}H_{48}N_6O_5S_2$ Peso Molecular: 720.94 g/mol Soluble en MeOH e insoluble en H_2O Log P: 3.9 pka: 13.68

<http://www.chemicalize.org>

6.6.1. Detección por medio de (MS/MS)

Se infundió directamente al espectro de masas cada una de las soluciones de los estándares a una concentración de 500 ng/mL y un flujo de 10 μ L/min. Se evaluó el modo de ionización mediante electrospray positivo y negativo, corroborando el modo en el cual se formara el m/z característico de cada especie (ion precursor), se ajustaron las condiciones dependientes de la fuente: temperatura de desolvatación, flujo del gas de desolvatación y el voltaje de capilar.

Una vez establecidas las condiciones de la fuente, se evaluó el flujo de gas de colisión con la finalidad de identificar el ion producto. Todos los parámetros se optimizaron basándonos en la mayor abundancia de iones que llegan al detector, es decir, el conteo total de iones (TIC, por sus siglas en ingles) así como una señal que presente forma gaussiana estable para ambas señales (ion precursor \rightarrow ión producto).

6.6.2. Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas se establecieron mediante la propuesta y elección de posibles candidatos a fase estacionaria y fase móvil. La elección se basó principalmente en la estructura química y naturaleza de los analitos.

Tomando en cuenta que los fármacos evaluados pertenecen a dos familias diferentes cuya polaridad es distinta; LMV y ZDV grupo polar frente a LPV y RTV grupo no polar, se optó por evaluar tres tipos de columnas cromatográficas con las mismas dimensiones (2.1 μ m x 50 mm, 1.7 μ m). La columna BEH Shield RP18 de carácter hidrofóbico intermedio, la columna BEH C18 de carácter hidrofóbico y finalmente la columna BEH C8 que difiere en el largo de la cadena con respecto a las C18 lo que le da un carácter menos hidrofóbico frente a esta.

Adicionalmente se propusieron dos modificadores orgánicos para la fase móvil: acetonitrilo y metanol considerando la solubilidad de los analitos y como modificadores de pH: el ácido fórmico 0.1%, pH = 2.95, acetato de amonio 10 mM, pH = 6 y trietilamina 0.1% pH= 10.5.

Se preparó una mezcla de los analitos, junto con el candidato a EI (SMV) todos 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 el pH para seleccionar la fase móvil en cada una de las columnas con las distintas combinaciones de fase móvil.

Se seleccionó la columna, el modificador orgánico y el pH donde se definieran mejor las señales cromatográficas, considerando su forma y simetría (factor de asimetría; $As = 1$), el tiempo de retención, la señal generada a partir del conteo total de iones (TIC), así como el área de los picos en el cromatograma, cabe señalar que los picos cromatográficos son la representación grafica de la señal del ion producto de cada uno de los fármacos antirretrovirales.

Una vez que se seleccionaron 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 la fase móvil, la temperatura de la columna y el volumen de inyección. Posteriormente se inyectó el candidato a EI (SMV, 100 ng/mL) bajo las condiciones planteadas y se verificó que se obtuviera una señal simétrica y un tiempo de retención apropiado para su uso.

En la **Figura 15** se esquematiza las condiciones cromatográficas que se evaluaron para la adecuada separación e identificación de los analitos.

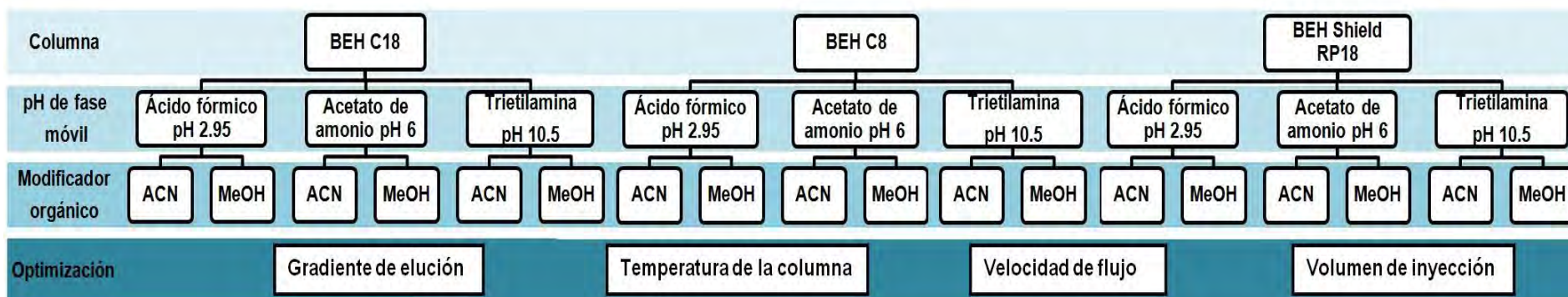


Figura 15. Procedimiento para desarrollar el método mediante UPLC. Para elección de las condiciones cromatográficas se evalúan posibles candidatos y mediante sus resultados se elige la más adecuada para la separación de los fármacos antirretrovirales evaluados.

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas se prepararon las curvas de calibración para cada uno de los fármacos de forma que el intervalo de calibración cubriera el rango de las concentraciones esperadas en leche materna de acuerdo a lo reportado en la literatura.

6.7. Método de extracción a partir de leche materna

Basándonos en la composición de la leche materna, las propiedades fisicoquímicas de los fármacos a extraer así como los métodos encontrados en la literatura, se propuso una metodología adecuada para la limpieza de la matriz biológica. Con el fin de asegurar la eliminación de la mayor cantidad de compuestos que puedan interferir en el rendimiento analítico, se realizaron pruebas de extracción en fase sólida, extracción por medio de papel filtro (Dried breast milk spots) y finalmente mediante precipitación de proteínas previa limpieza de las grasas con hexano (Anexo B).

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 repetibilidad y reproducibilidad del método así como la señal generada a partir del conteo total de iones (TIC) en el cromatograma para elegir las mejores condiciones de extracción. Una vez elegido el método de extracción se optimizó con la finalidad de favorecer tanto la remoción de componentes de la leche, como la recuperación de los antirretrovirales. Dicho método se describe en la **Figura 16**.

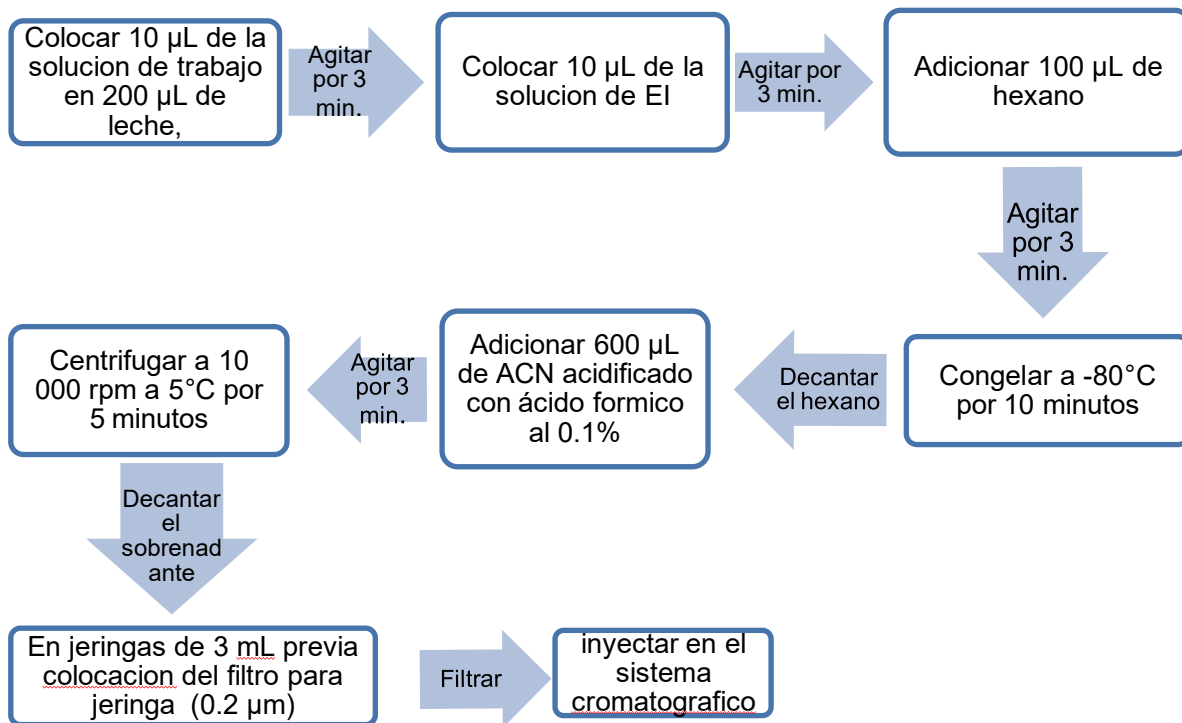


Figura 16. Pasos del método de extracción de leche materna.

6.8. Validación del método analítico

Con la finalidad de demostrar que el método desarrollado cumple con las características para las que fue diseñado, se sometió al proceso de validación estableciendo los lineamientos mínimos necesarios.

6.8.1. Adecuabilidad del sistema

Para evaluar la calidad de la respuesta en el equipo, se analizó un blanco de solución, seguida de la MCB en solución e inyectada por sextuplicado seguida de un blanco de solución. Se calculó el %CV de la respuesta obtenida para cada fármaco.

Criterio de aceptación: El CV% no debe ser mayor al 5%.

6.8.2. Efecto de acarreo

Se realizó un mínimo de 3 inyecciones de la misma muestra blanco siendo una antes y dos después de la inyección del límite superior de cuantificación (LSC). Los resultados deben ser comparados 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 límite inferior de cuantificación de cada uno de los analito y del 5% para el EI.

6.8.3. Selectividad

Se analizaron 6 muestras blanco de leche, cada una de pacientes diferentes, un blanco de calostro y un blanco de leche de transición, se procesaron con el método de extracción anteriormente descrito, y se comparó con el LIC en leche, el método es selectivo si no existe interferencia en el tiempo de retención de las muestras blanco.

Adicionalmente se evaluó la ausencia de interferencias en presencia de algunos fármacos concomitantes a la concentración máxima terapéutica esperada para cada uno de ellos: cafeína (2.4-47 µg/mL a una dosis de 35-336 mg), paracetamol (20 µg/mL a una dosis de 1g), naproxeno (94 µg/mL a una dosis de 500 mg), ácido acetilsalicílico (2.4 ± 4.0 µg/mL a una dosis de 1.2 g), bromuro de butilioscina (5 ng/mL a una dosis de 500 mg) y maleato de 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 debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación y del 5% para el EI, y el %DEA con respecto al LIC sin medicamentos concomitantes debe ser menor al 15%. En caso de pasar la prueba se realizará un pool de las muestras blanco.

6.8.4. Efecto matriz

Se analizaron individualmente, 6 muestras blanco de leche, cada una de pacientes diferentes, un folio de muestra de calostro y un folio de leche de transición. Se procesaron con el método de extracción descrito y se le adicionaron post-extracción los analitos y el EI en solución, esta determinación se realizó para la MCB y MCA por triplicado.

Se comparó las respuestas analíticas obtenidas post-extracción con respecto a las respuestas en solución (sistema), **Figura 17**. Para cada unidad se obtuvo el Factor matriz normalizado (FMN), de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{FMN} = \frac{(\text{Respuesta del analito en la matriz}) / (\text{respuesta del estandar interno en la matriz})}{(\text{Respuesta del analito en solucion}) / (\text{respuesta del estandar interno en solucion})}$$

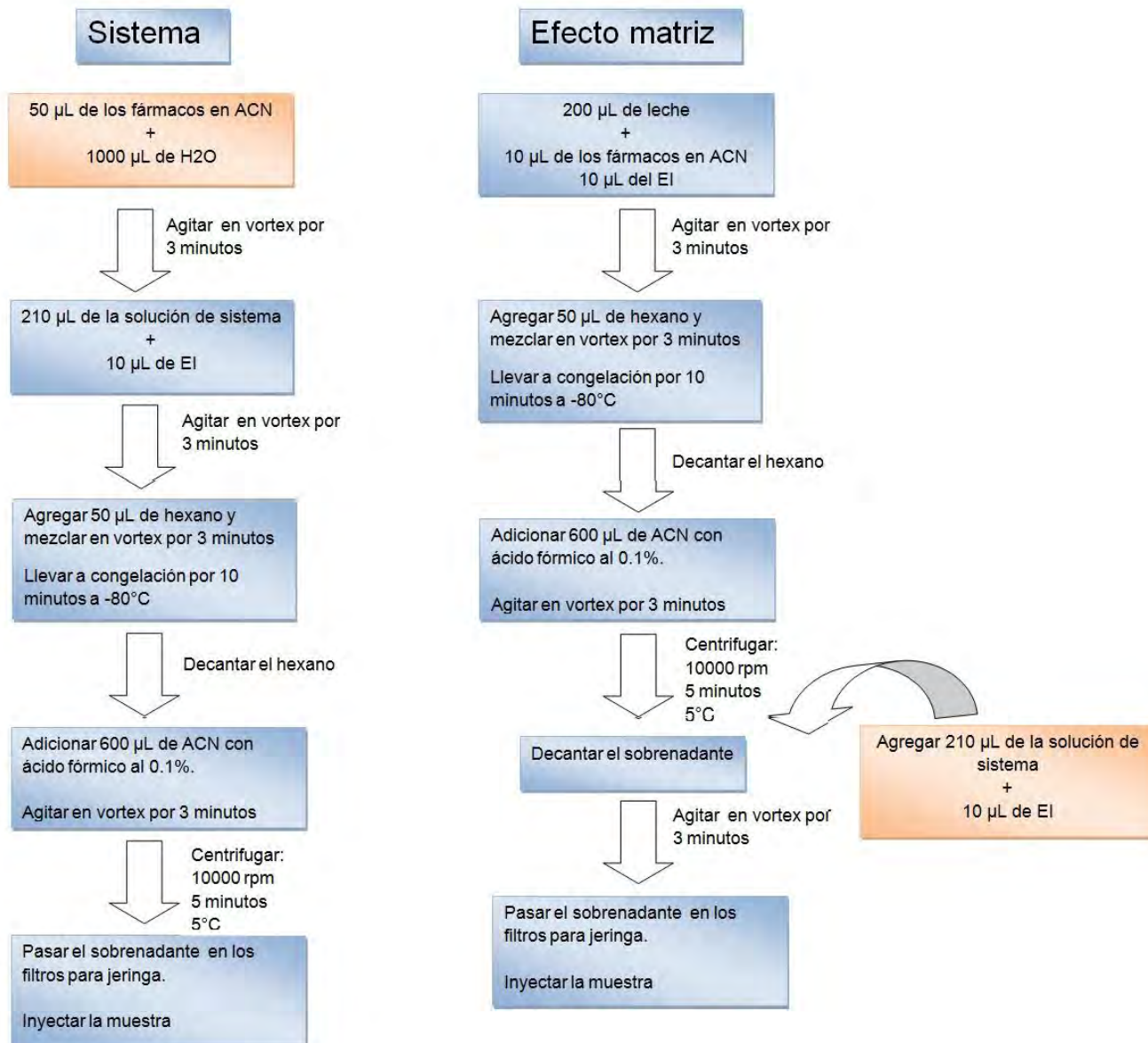


Figura 17. Diagrama del procedimiento de efecto matriz. Para realizar la prueba de efecto matriz se prepara una solución sistema la cual se adiciona al después de la extracción.

Criterio de aceptación: El CV% del FMN calculado de las muestras analizadas no debe ser mayor que el 15%. Esta determinación debe ser realizada con la MCB y MCA.

6.8.5. Límite inferior de cuantificación (LIC)

Se preparó y analizó por quintuplicado el LIC para cada uno de los compuestos, se evaluó la respuesta así como la concentración obtenida mediante la interpolación de la respuesta en una curva de calibración preparada el mismo día.

Criterio de aceptación: La respuesta de los analitos debe ser por lo menos cinco veces mayor que la respuesta del blanco ($S/R > 5$). El valor promedio de la concentración evaluada debe estar del +/- 20% del valor nominal (exactitud) y no debe tener una variación mayor al 20% (precisión).

6.8.6. Linealidad y curva de calibración

Se evaluó la relación lineal concentración vs respuesta analítica en el rango de concentraciones de la curva de calibración por tres días consecutivos. Con los resultados obtenidos se estableció el mejor ajuste de la curva en función de la menor suma de cuadrados residuales, se calculó el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m), el intercepto (b), y el error relativo debido a la regresión (%EER). Se calculó precisión y exactitud para cada nivel de concentración de las curvas.

Criterio de aceptación: El modelo matemático elegido será aquel cuya suma de cuadrados residuales sea el más pequeño con respecto a los otros modelos aplicados y cuyo coeficiente de correlación sea mayor a 0.98. El porcentaje de diferencia 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, a 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.

6.8.7. Precisión

6.8.7.1. Precisión intra-día. Repetibilidad

Se evaluó por quintuplicado los siguientes puntos LIC, MCB, MCM, MCA y MCD, siguiendo el método de extracción. La MCD se evaluó a una concentración 1.5 veces mayor a la del punto más alto de la curva de calibración (LSC), esta se diluyó con leche materna exenta de fármacos en una relación 1:4. Se determinó la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración de ese mismo día. Se calculó la media (\bar{x}), la desviación estándar (σ) y el coeficiente de variación (%CV), para cada analito.

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

6.8.7.2. Precisión inter-día. Reproducibilidad

Se evaluó por quintuplicado los siguientes puntos LIC, MCB, MCM y MCA. Se calculó la concentración recuperada interpolando la respuesta analítica en la curva de calibración preparada ese mismo día. Esta debió ser en tres diferentes días de análisis consecutivos. Se calculó la media (\bar{x}), la desviación estándar (σ) y el coeficiente de variación (%CV), para cada concentración.

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

6.8.8. Exactitud

Se evaluó la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el nominal, usando los datos de repetibilidad y reproducibilidad. Se calculó el porcentaje de desviación estándar absoluta (%DEA), empleando la siguiente ecuación.

$$\%DEA = \frac{(\text{concentracion nominal}) - (\text{concentracion obtenida})}{\text{concentracion nominal}} \times 100$$

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

6.8.9. Recuperación absoluta

Se analizaron por quintuplicado las MCA, MCM y MCB y se comparó la respuesta analítica del método con respecto a la respuesta analítica en sistema de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Respuesta de la muestra en leche materna}}{\text{Respuesta de la muestra en solucion}} \times 100$$

Criterio de aceptación: El porcentaje de las concentraciones recuperadas, no necesariamente debe ser el 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango

Dicho parámetro fue consultado en guías de la FDA

6.8.10. Estabilidad de la muestra

Para cada evaluación de estabilidad fue calculada la concentración recuperada de la MCB, MCM y MCA interpolándolas en una curva de calibración preparada ese mismo día. Se calculó el %DEA con respecto al valor nominal.

Criterio de aceptación: Para cada muestra control evaluada, el valor promedio de la %DEA no debe ser mayor al 15%.

6.8.10.1. Estabilidad a corto plazo

Se preparó por triplicado tres series de la MCB, MCM, MCA en leche, la primera serie fue almacenada a temperatura ambiente (23°C), la segunda a temperatura de refrigeración (8°C) y la tercera a temperatura de congelación (-84°C). Las muestras fueron procesadas en un periodo de 24 horas, con la metodología de extracción en conjunto con una curva de calibración recién preparada.

6.8.10.2. Estabilidad a largo plazo

Se evaluó la MCB, MCM, MCA a la temperatura de almacenamiento -84°C por un periodo de 15 días, pasado ese tiempo se procesaron con el método de extracción en conjunto con una curva de calibración recién preparada.

6.8.10.3. Estabilidad de la muestra procesada

Una vez que la MCB, MCM, MCA fueron procesada por el método de extracción, se almacenaron a temperatura ambiente (23°C) por un periodo de 24 horas, cumplido ese tiempo se analizaron interpolándolas en una curva de calibración recién preparada.

6.8.10.4. Estabilidad del automuestreador

Se evaluó la estabilidad de las MCB, MCM, MCA almacenadas en el automuestreador del sistema cromatográfico (5°C) por un periodo de 24 horas, cumplido ese tiempo se analizaron interpolándolas en una curva de calibración recién preparada.

6.8.10.5. Estabilidad de los ciclos de congelación-descongelación

Se evaluó la estabilidad de la muestra bajo las condiciones de almacenamiento, es decir, bajo congelación a -80°C. Se les aplicó 3 ciclos de congelación-descongelaron; en el último ciclo se procesaron aplicando el método de extracción y se analizaron junto con una curva de calibración recién preparada.

6.8.10.6. Estabilidad en solución

Se evaluó la estabilidad de las soluciones de referencia para cada fármaco, así como la del EI por un tiempo de 1, 2 y 4 semanas a 0°C, se usó la concentración de la MCB para su evaluación.

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

En el Anexo C se resumen en una tabla los parámetros a evaluar y su respectivo criterio de aceptación.

7- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Detección por espectrometría de masas (MS/MS)

Debido a que los fármacos antirretrovirales empleados en la TARAA contienen grupos funcionales capaces de ser protonados para formar especies iónicas, tales como grupos amino y grupos hidroxilo, el método de ionización que mostró mayor respuesta en el detector de masas fue mediante electrospray en modo positivo. Este tipo de ionización fue ideal para compuestos que obtienen múltiples cargas, además de ser una técnica de ionización suave, válida para compuestos de baja, media a muy alta polaridad que se puedan ionizar en solución (Rodríguez, 2008).

En la **Figura 18** se muestra la señal producida por el ion precursor de ZDV, m/z 268.18, (500 ng/mL, infusión directa al espectro de masas), donde se puede observar la caracterización del ión molecular de la especie protonada. La señal obtenida mostró un perfil gaussiano, así como la relación de señal más abundante (TIC, $1.18e^6$).

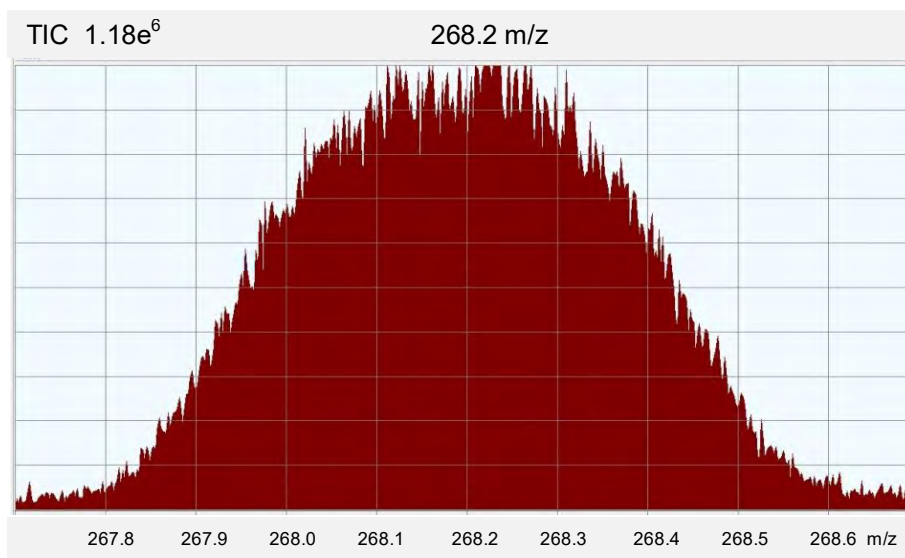


Figura 18. *Tunning* de ZDV. Imagen del *Tunning* de ZDV (500 ng/mL) y su comportamiento gaussiano con una intensidad de señal de $1.18e^6$.

Cabe hacer notar que esta caracterización se hizo de forma individual para cada uno de los antirretrovirales y se obtuvieron parámetros de la fuente para cada señal caracterizada, sin embargo, el parámetro de discriminación para establecer las condiciones finales de la fuente fue favorecer aquel fármaco en el cual se requiriera mayor sensibilidad para su cuantificación así como estabilidad en su señal analítica, en este caso fue ZDV, los parámetros finales de la fuente para la detección son los siguientes:

- Ionización: Electrospray positivo (ESI+)
- Temperatura de la fuente: 150°C
- Temperatura de desolvatación: 400°C
- Flujo del gas de desolvatación: 500 L/Hr
- Flujo del gas de colisión: 50 L/hr
- Voltaje del capilar: 2.9 kV

Una vez que se definió el ion precursor para cada uno de los compuestos, se buscó caracterizar los iones producto a través del monitoreo múltiple de reacción (MRM). Se aplicaron diferentes voltajes de cono y colisión (kV) de tal manera que se enriqueciera la señal observada para la ruptura del ion precursor y la generación del fragmento específico de cada compuesto (TIC). En el **Cuadro 13**, se muestra los valores de voltaje dónde se obtuvo mayor abundancia relativa de la transición ión precursor → ión producto.

Cuadro 13. Resultados de la transición ion precursor → ion producto de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV.

Parámetro	LMV	ZDV	LPV	RTV	SMV (EI)
Transición (m/z) ion precursor → ion producto	230.15 → 112.08	268.18 → 127.10	629.55 → 447.35	721.50 → 296.20	419.40 → 199.20
Voltaje de cono (kV)	15	10	20	23	20
Energía de Colisión (kV)	15	10	15	15	15
TIC	1.02e ⁷	1.18e ⁶	6.11e ⁶	4.55e ⁶	3.41 e ⁵

En la espectrometría de masas en tándem la especificidad está dada por la elección de la transición elegida (ion precursor → ion producto), esta fragmentación es única para cada uno de los analitos. De la **Figura 19 a 23** se muestran los espectros de masas correspondientes a la transición elegida, indicando donde se lleva a cabo dicha fragmentación y su abundancia relativa.

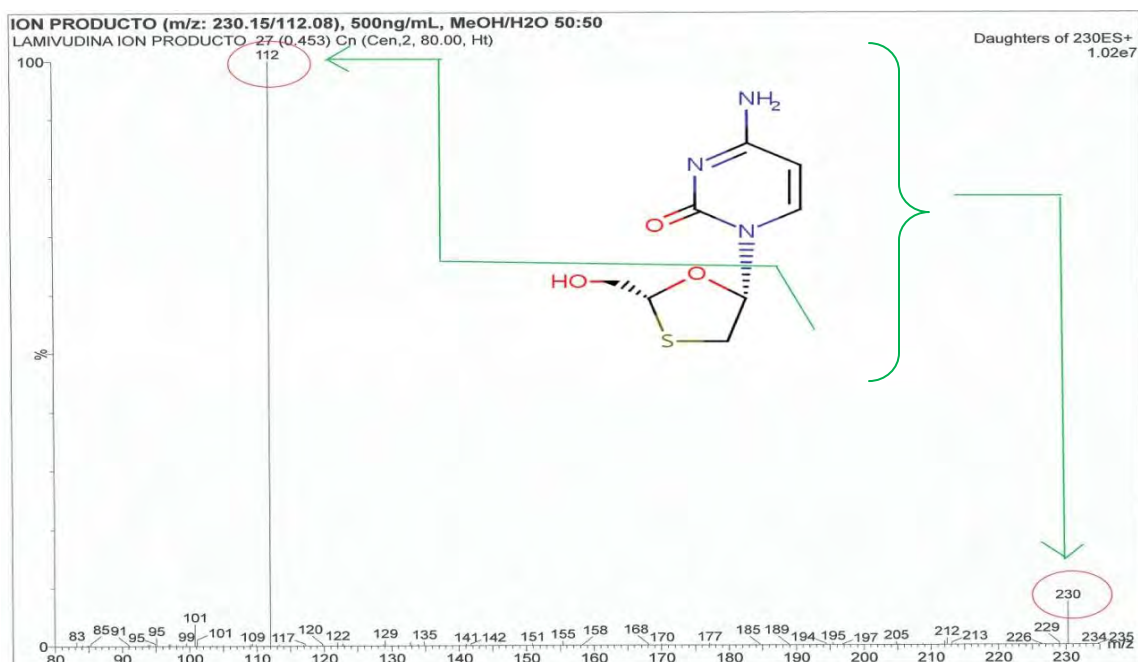


Figura 19. Espectro de masas de lamivudina. Transición ion precursor (230.15m/z) → ion producto (112.08m/z).

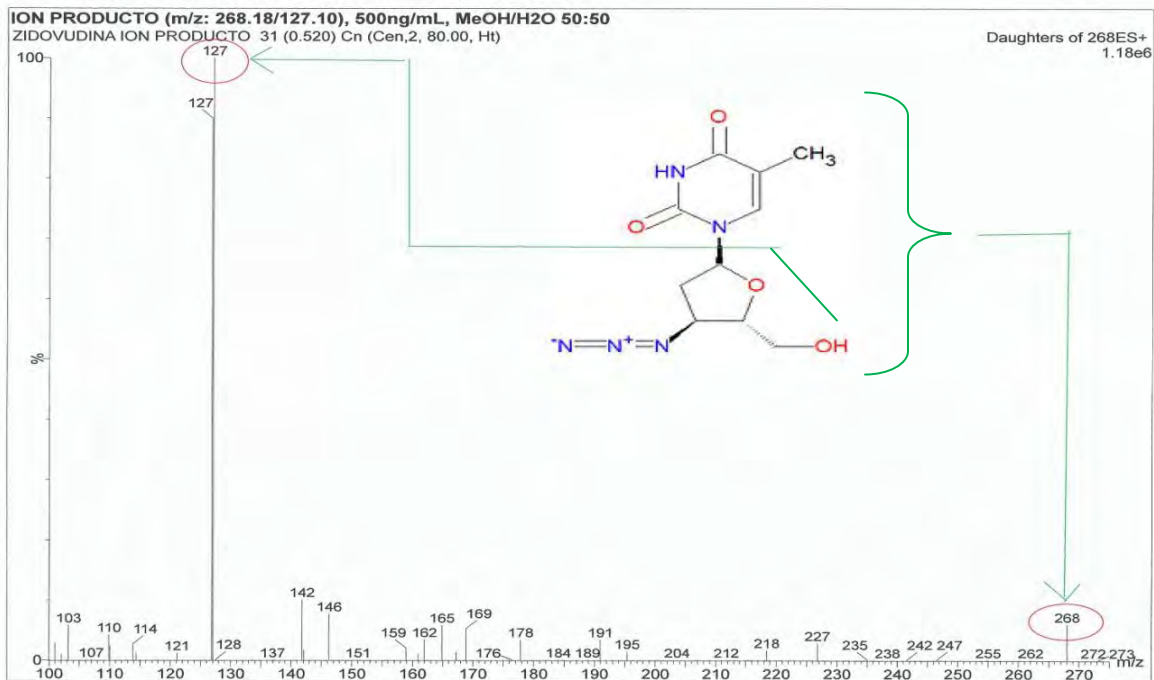


Figura 20. Espectro de masas de zidovudina. Transición ion precursor (268.18m/z) → ion producto (127.10m/z).

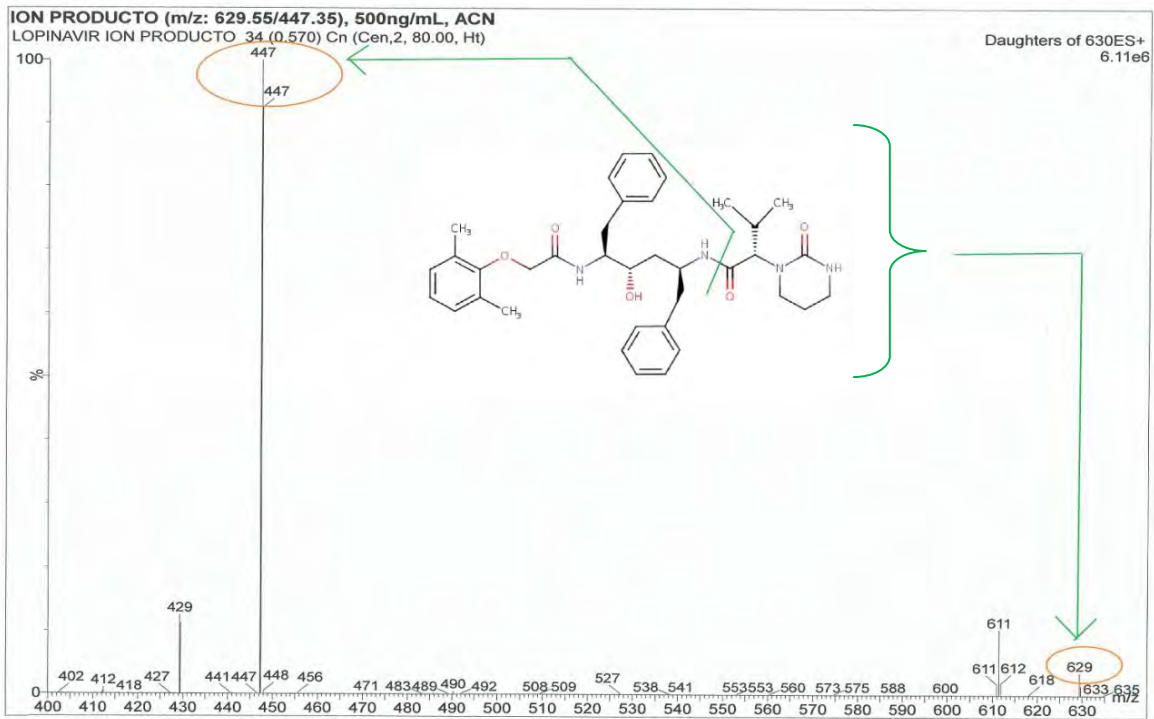


Figura 21. Espectro de masas de lopinavir. Transición ion precursor (629.55m/z) → ion producto (447.35m/z).

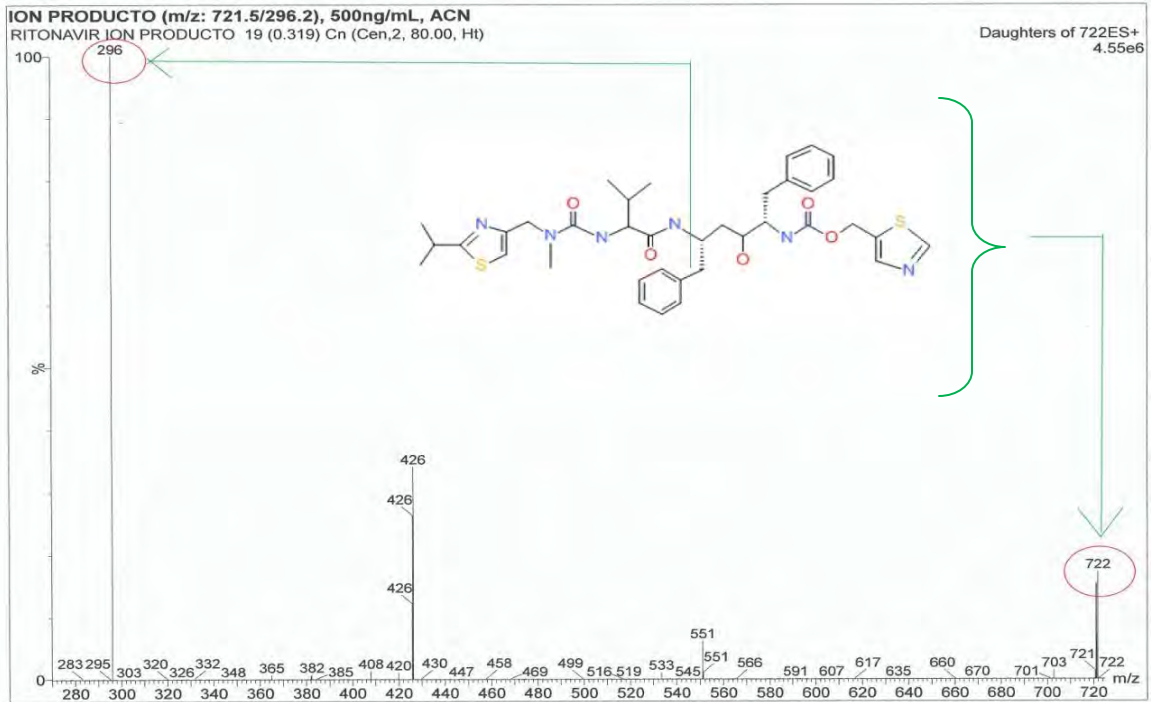


Figura 22. Espectro de masas de ritonavir. Transición ion precursor (721.50m/z) → ion producto (296.20m/z).

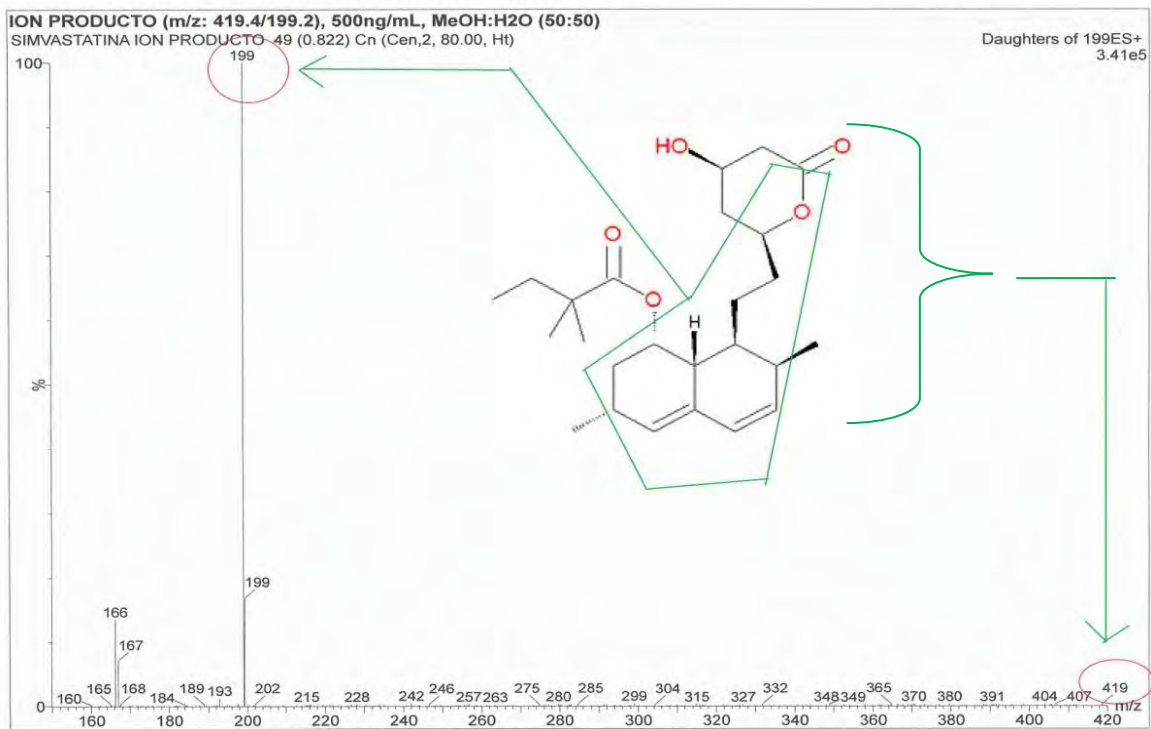


Figura 23. Espectro de masas de simvastatina (EI). Transición ion precursor (419.40m/z) → ion producto (199.20m/z).

El establecer una transición característica para cada antirretroviral le confirió alta especificidad al método desarrollado, lo cual permitió aumentar la sensibilidad de la curva de calibración para cada antirretroviral, especialmente para aquellos antirretrovirales que son pobremente excretados en leche materna. Además, debido a que esta matriz es muy compleja por los múltiples componentes que posee, la alta especificidad de la detección resultó de gran valía en la cuantificación.

7.2. Separación cromatográfica por UPLC

Una vez concluida la identificación de los fármacos por espectrometría de masas, el siguiente paso fue la separación por medio de la cromatografía de líquidos, uno de los retos en el desarrollo del método analítico fue la diferencia significativa en la hidrofobicidad de los ITIAN (LMV y ZDV) y los IP (LPV y RTV) así como del EI (SMV). Mientras que LMV y ZDV son compuestos hidrofílicos y por tanto solubles en agua; LPV, RTV y SMV son hidrofóbico (Koehn, *et.al.*, 2014), esto nos llevó a buscar condiciones analíticas donde se favoreciera la cuantificación simultánea de los cinco compuestos.

Para la elección de la fase estacionaria, se observó que la columna BEH RP18 Shield ofreció una buena separación de los fármacos y el EI, sin embargo, los picos cromatográficos presentaron el efecto de coleo ($As > 1$), este efecto fue mayormente marcado en los IP y el EI. Este comportamiento se presentó con ambos modificadores orgánicos y a los diferentes pH evaluados, lo cual nos sugiere que puede deberse a la naturaleza de la fase estacionaria embebida en la columna, ya que combina la hidrofobicidad de un ligando alquilo y el carácter hidrófilo de un grupo polar (carbamato), lo que le da una hidrofobicidad intermedia que favorece a los ITIAN pero no a los IP que interactúan fuertemente con esta columna. Se ha descrito en la literatura que esta selectividad alterna favorece la retención de compuestos básicos especialmente para aquellos compuestos polifenólicos como son los IP (Waters, 2005), posiblemente esto dio como

resultado una fuerte interacción de los IP con la columna, lo que se tradujo en el coleo de la señal cromatográfica (**Figura 24**).

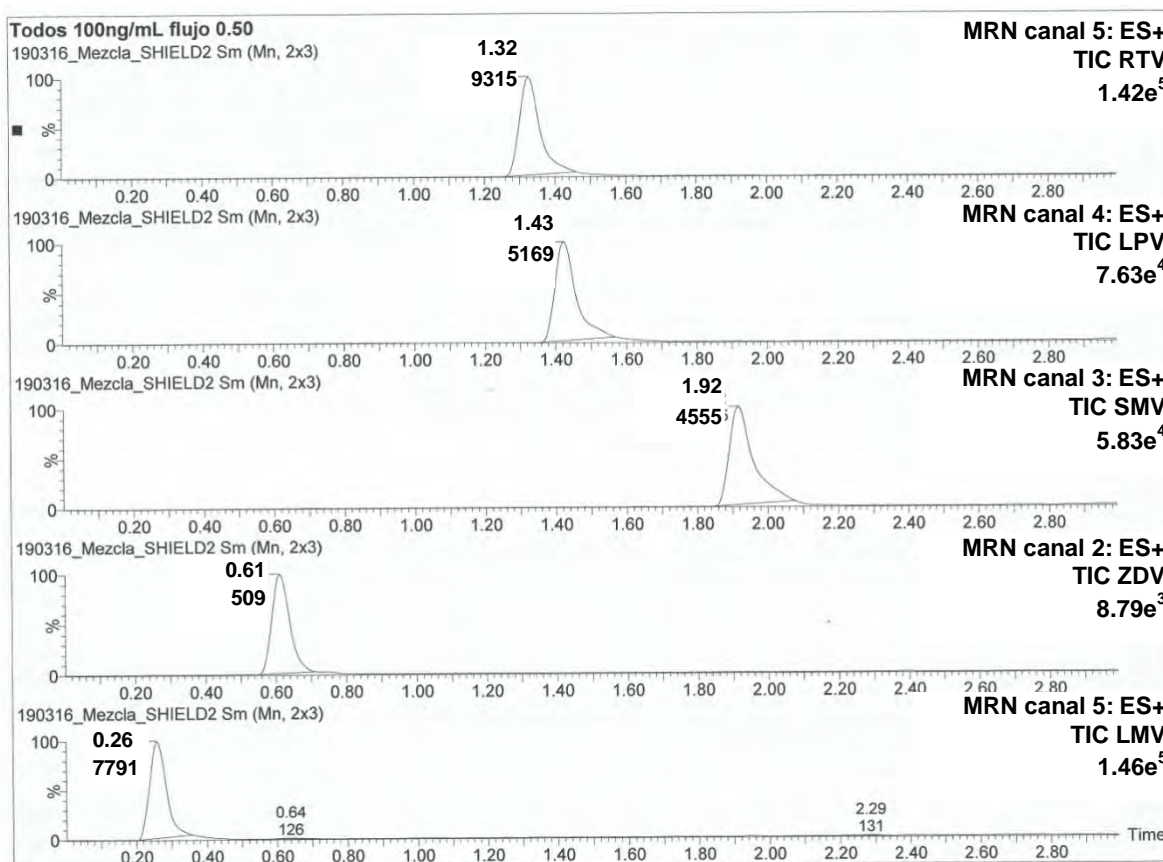


Figura 24. Cromatograma de la columna ACQUITY UPLC BEH Shield RP 18. Evaluación de la separación. TIC y tiempo de retención de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV (EI).

Con la finalidad de encontrar una fase estacionaria con polaridad intermedia se evaluó una columna de cadena hidrofóbica corta, la columna BEH C8, sin embargo, pese a que presentó una buena separación de los picos cromatográficos, ZDV y LMV presentaron efecto de coleo ($As > 1$), lo cual nos sugiere que el hecho de que la cadena sea más corta aumentó de forma importante la retención de compuestos hidrofílicos, es decir, la columna tiene menor hidrofobicidad (Waters, 2005) causando que ZDV y LMV tengan mayor retención en la columna y por consecuencia se observó un ensanchamiento de la señal cromatográfica (**Figura 25**).

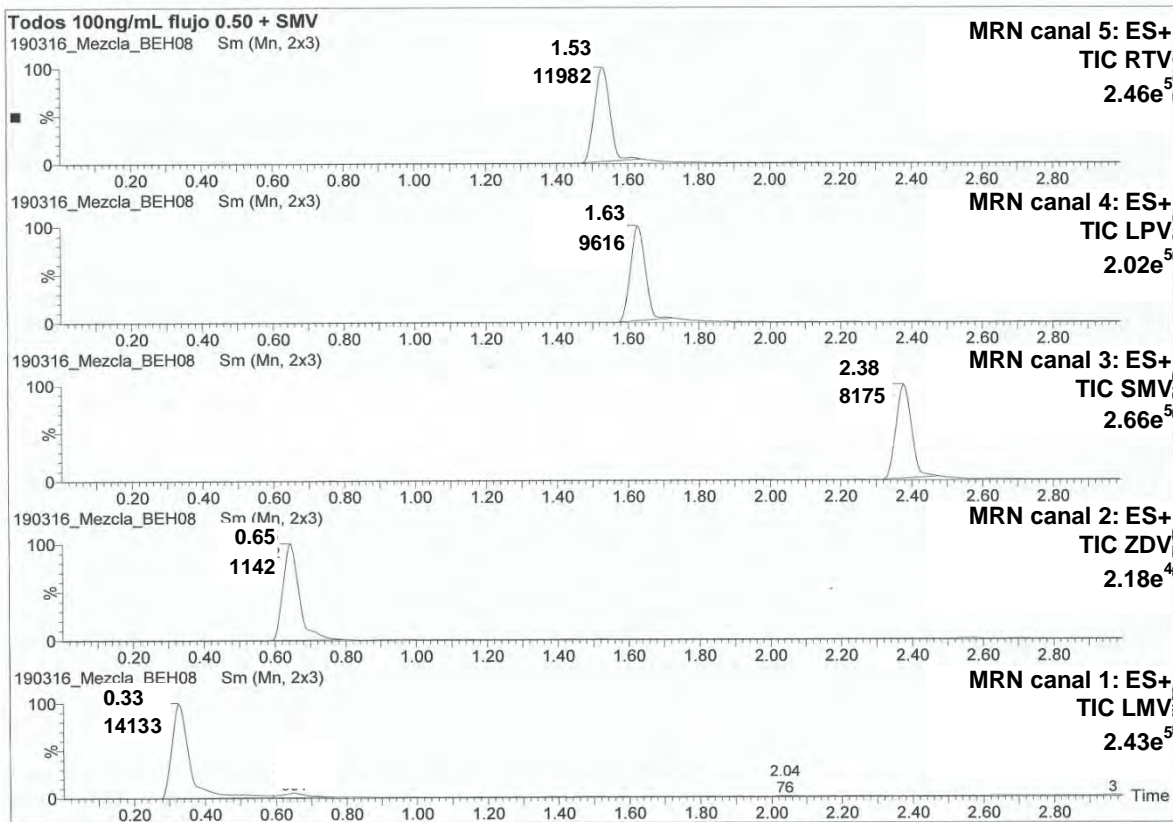


Figura 25. Cromatograma de la columna ACQUITY UPLC BEH C8. Evaluación de la separación. TIC y tiempo de retención de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV (EI).

Finalmente con base en los métodos reportados en la literatura y debido a que la columna BEH C18 es una columna de uso habitual para una gran mayoría de las separaciones cromatográficas, se evaluó como candidata a fase estacionaria.

Los resultados obtenidos para la columna BEH C18 arrojaron una buena separación de los cuatro fármacos antirretrovirales y el EI, además de que los picos presentaron buena simetría; $As=1$ (**Figura 26**). Adicionalmente esta columna ofrece la ventaja de que incorpora químicas de unión de ligandos trifuncionales, que producen una excelente estabilidad a rangos amplios de pH (1-12) y una degradación baja de la columna después de un gran número de inyecciones (Waters, 2005).

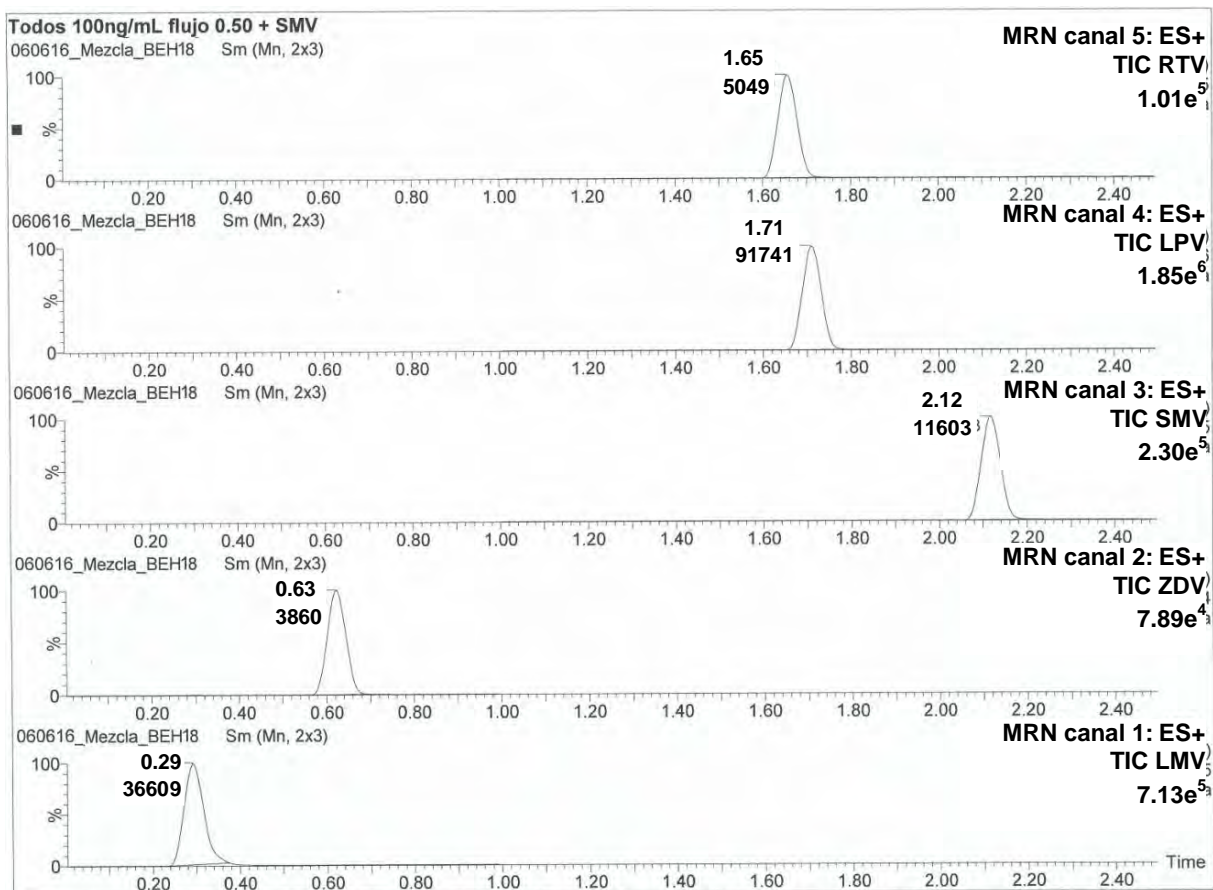


Figura 26. Cromatograma de la columna ACQUITY UPLC BEH C18. Evaluación de la separación. TIC y tiempo de retención de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV (EI).

Con base en los resultados anteriores, se eligió la columna BEH C18 debido a que presentó una buena separación de los picos cromatográficos así como simetría en su señal.

Con respecto al pH, se sabe que este juega un papel importante no solo en la separación cromatográfica de los analitos, sino también en la detección por espectrometría de masas y como consecuencia en la cantidad de iones que puedan llegar al detector (sensibilidad). En este sentido se realizaron pruebas con ácido fórmico al 0.1% (pH= 2.9), acetato de amonio 10mM (pH= 6) y etilendiamina 0.1% (pH= 10.5), cubriendo así un amplio rango de pH.

Se observó que a medida que se incrementó el pH, la forma de las señales cromatográficas perdieron simetría ($As \neq 1$), especialmente para los ITIAN. A pH básico, ZDV ya no fue detectada. Debido a que los cuatro antirretrovirales son especies básicas, a pH bajos se favorece su ionización, lo cual genera una mayor cantidad de iones que llegan al detector y un aumento de la señal cromatográfica (**Figura 27**), como se puede observar en el caso del ácido fórmico al 0.1%.

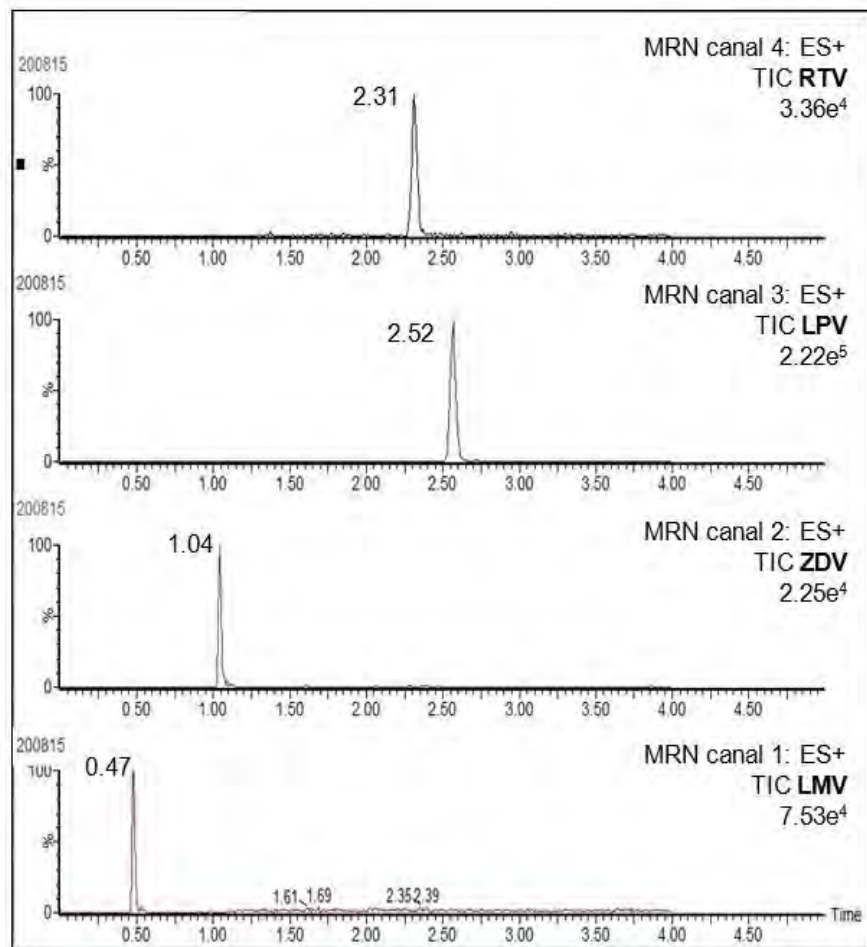
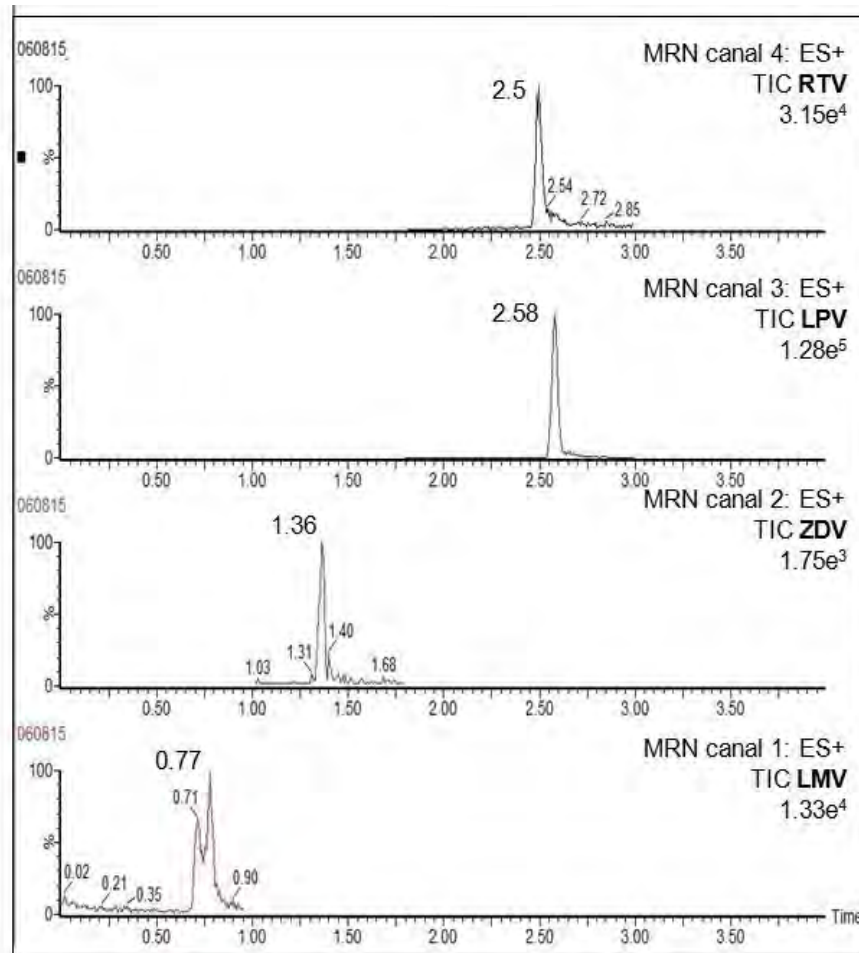
A)**B)**

Figura 27. Resultados de los modificadores de PH. **A)** Ácido fórmico 0.1%, **B)** Acetato de amonio (10 mM) y **C)** Trietilamina (0.1%) de LMV, ZDV, LPV y RTV.

C)

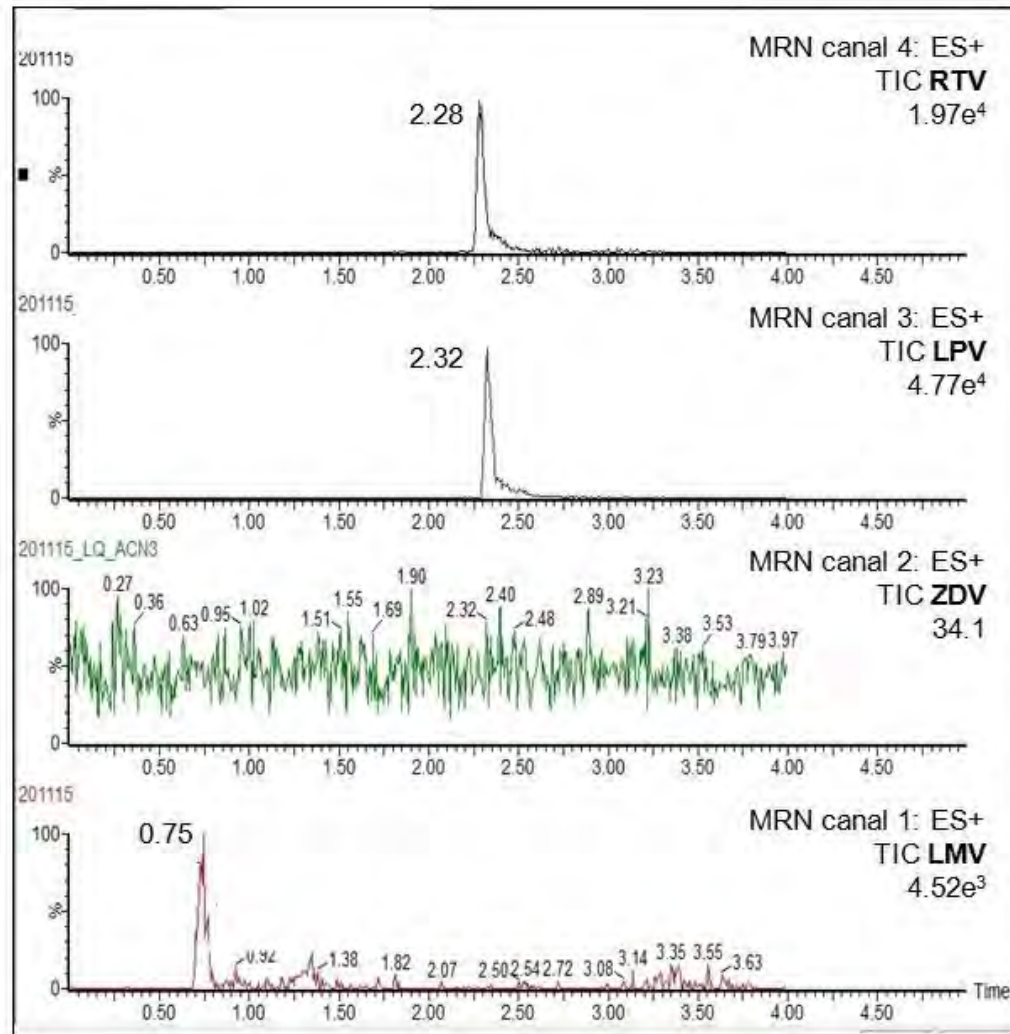


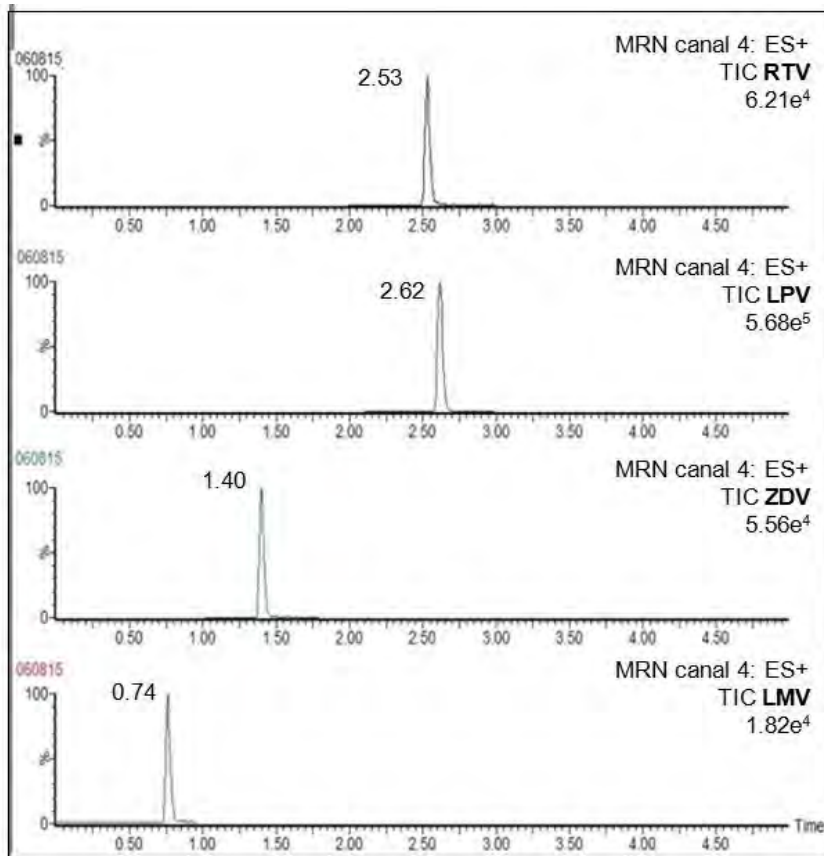
Figura 27. Resultados de los modificadores de PH. A) Ácido fórmico 0.1%, B) Acetato de amonio (10 mM) y C) Trietilamina (0.1%) de LMV, ZDV, LPV y RTV.

Este comportamiento puede corroborarse observando el aumento del TIC a pH ácidos. Con base en lo anterior se eligió el ácido fórmico 0.1%, pH 2.3 como componente de la fase acuosa.

Debido a que en la cromatografía de fase reversa es habitual que la fase móvil tenga un elevado contenido de agua ocasionando que los compuestos cargados se disuelvan perfectamente en ella y por lo tanto disminuya la interacción con la fase estacionaria, lo que en ocasiones provocaría la no retención de los compuestos, en estos casos es necesario contar con un modificador orgánico el cual tendrá la función de amortiguar las cargas del soluto (mncn, 2016). En el presente trabajo se evaluaron dos modificadores orgánicos: metanol y acetonitrilo.

Para la elección del modificador orgánico en la fase móvil se utilizó una combinación de ácido fórmico al 0.1% (fase acuosa) con el modificador orgánico, y aplicando un gradiente aumentando la fase orgánica conforme trascurría el tiempo. El ACN mostró ventaja con respecto al MeOH debido a que en este último las señales cromatográficas de los fármacos no muestran simetría en el pico ($As > 1$) especialmente la señal de ZDV (**Figura 28**). Esto puede deberse a que el ACN tiene una relativa asociación con el agua lo que favorece que la fase móvil mantenga un carácter binario sin comprometer la formación de dos fases. Adicionalmente el ACN presenta menor viscosidad y polaridad con respecto al MeOH (Martínez, 2016).

ACN



MeOH

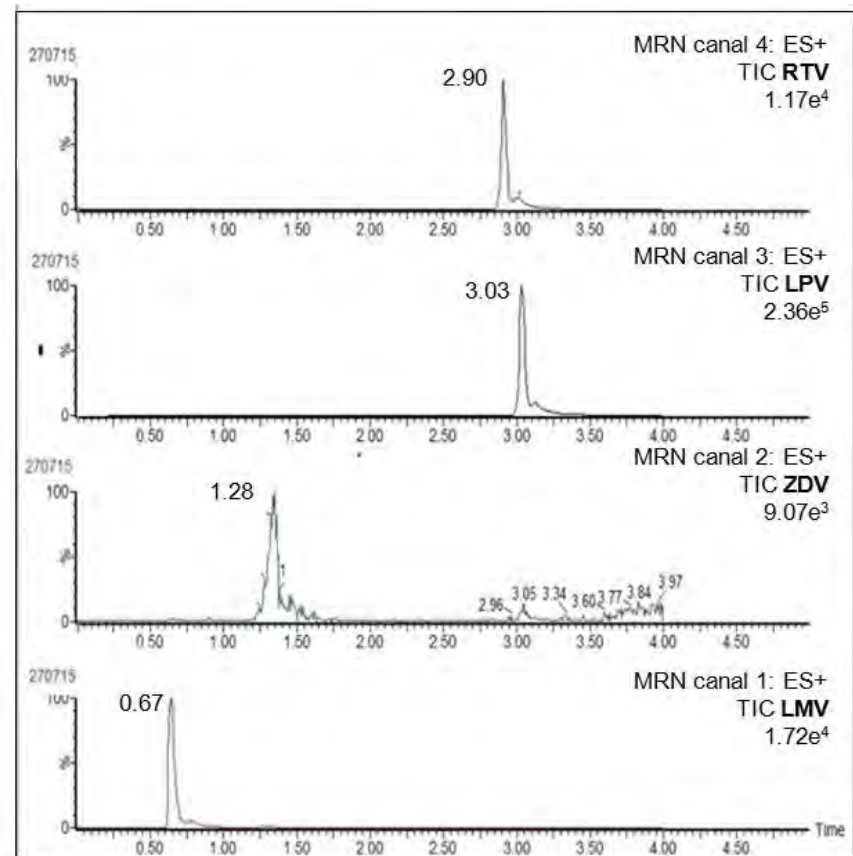


Figura 28. Cromatogramas del modificador orgánico. Resultados de LMV, ZDV, LPV y RTV en presencia de ACN y MeOH.

Observando el comportamiento del modificador orgánico sobre la simetría de las señales se eligió al ACN como modificador orgánico de la fase móvil. Por último se optimizó el gradiente para favorecer la separación de las señales y el tiempo de análisis para los analitos. El gradiente iniciaba con una proporción 90/10 (0.1% ácido fórmico/ACN), esto favoreció a los fármacos afines a la fase acuosa (ZDV y LMV), posteriormente se incrementó la fase orgánica, que tuvo como finalidad favorecer a los analitos no polares (LPV y RTV), dando como resultado una buena separación cromatográfica, cabe señalar que aunque LPV y RTV tienen un tiempo de retención muy cercano, su cuantificación no fue afectada debido a que la técnica de MS/MS permite que se monitoreen en canales independientes.

La velocidad de flujo fue un factor importante para la resolución de moléculas pequeñas, ya que la tendencia de las moléculas a difundirse disminuye al incrementar el flujo, produciendo picos más angostos y por lo tanto, mejora la resolución (Esquivel *et.al.*, 2004), en la práctica se realizaron pruebas a diferentes flujos 0.1 a 0.5 mL/min y se corroboró lo anteriormente descrito, observando que a mayor flujo los picos son más estrechos y el tiempo de retención fue menor, con base en el resultado, se eligió el flujo de 0.5 mL/min dando un tiempo de corrida por muestra de 2.5 minutos. Cabe señalar que los flujos adecuados en sistemas de UPLC son de entre 0.1 a 0.6 mL/min.

Para fijar la temperatura de la columna se realizaron pruebas a 30, 35 y 40 °C, se observó que a mayor temperatura la resolución de los picos cromatográficos aumentó. Dado que el transporte de analitos en solución entre la fase móvil y la fase estacionaria es un proceso controlado por difusión, incrementar la temperatura disminuyó la viscosidad del solvente; esto generalmente favorece la transferencia del analito en ambas fases y por lo tanto, mejora la resolución (Esquivel *et.al.*, 2004). Sin embargo, no se observó cambio significativo entre 35 y 40 °C por lo que se optó por elegir 35°C, como temperatura final de la columna.

Finalmente la temperatura del automuestreador se fija en 5 °C siendo esta la mínima temperatura que maneja el equipo con la finalidad de conservar la estabilidad de los analitos en las muestras evaluadas.

A continuación se muestran las condiciones cromatográficas finales.

- Fase estacionaria: columna BEH C18 2.1µm x 50 mm, 1.7 µm.
- Fase móvil: ácido fórmico al 0.1% (A) y acetonitrilo (B).
- Gradiente, **Cuadro 14**.

Cuadro 14. Proporciones de la fase móvil en gradiente a través del tiempo.

Gradiente			
Tiempo (min)	% A Ácido fórmico	% B Acetonitrilo	Tipo de curva
0.15	90	10	2
0.70	47	53	6
2.5	20	80	11

- Velocidad de flujo: 0.5 mL/min.
- Modo de inyección parcial-loop.
- Volumen de inyección: 3 µL.
- Tiempo de corrida: 2.5 min.
- Temperatura de la columna: 35°C.
- Temperatura del automuestreador: 5°C.
- Lavado fuerte: agua, acetonitrilo, metanol e isopropanol proporción; 25/25/25/25 (v/v/v/v) acidificados al 0.1% con ácido fórmico.
- Lavado débil: agua y acetonitrilo; 70/30 (v/v) acidificado al 0.1% con ácido fórmico.

7.3. Método de extracción

La leche materna es una matriz muy compleja, que tienen como componentes un sin fin de sustancias químicas de suma importancia para el crecimiento y desarrollo del bebé. De forma técnica para eliminar estos componentes, consiguiendo una limpieza adecuada y evitar el fenómeno de efecto matriz, se planteó un diseño combinado basado en las propiedades fisicoquímicas de los fármacos a extraer, sin dejar de lado la rapidez y sencillez para procesar un gran número de muestras.

Inicialmente, se realizaron pruebas mediante una extracción en fase sólida utilizando cartuchos Oasis MCX 3cc (60mg). Las muestras cargadas se pasaron a través de los cartuchos y al realizar la recuperación de los analitos, se observó que la muestra recuperada tenía una tonalidad blanquecina, se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos con la finalidad de separar los componentes presentes en la muestra y se analizó el sobrenadante. Los resultados arrojaron que LPV y RTV muestran señal en el cromatograma mientras que ZDV y LMV no presentaron señal (**Figura 29**), lo cual sugiere que posiblemente se perdieron en los lavados realizados con agua debido a su alta solubilidad en este disolvente.

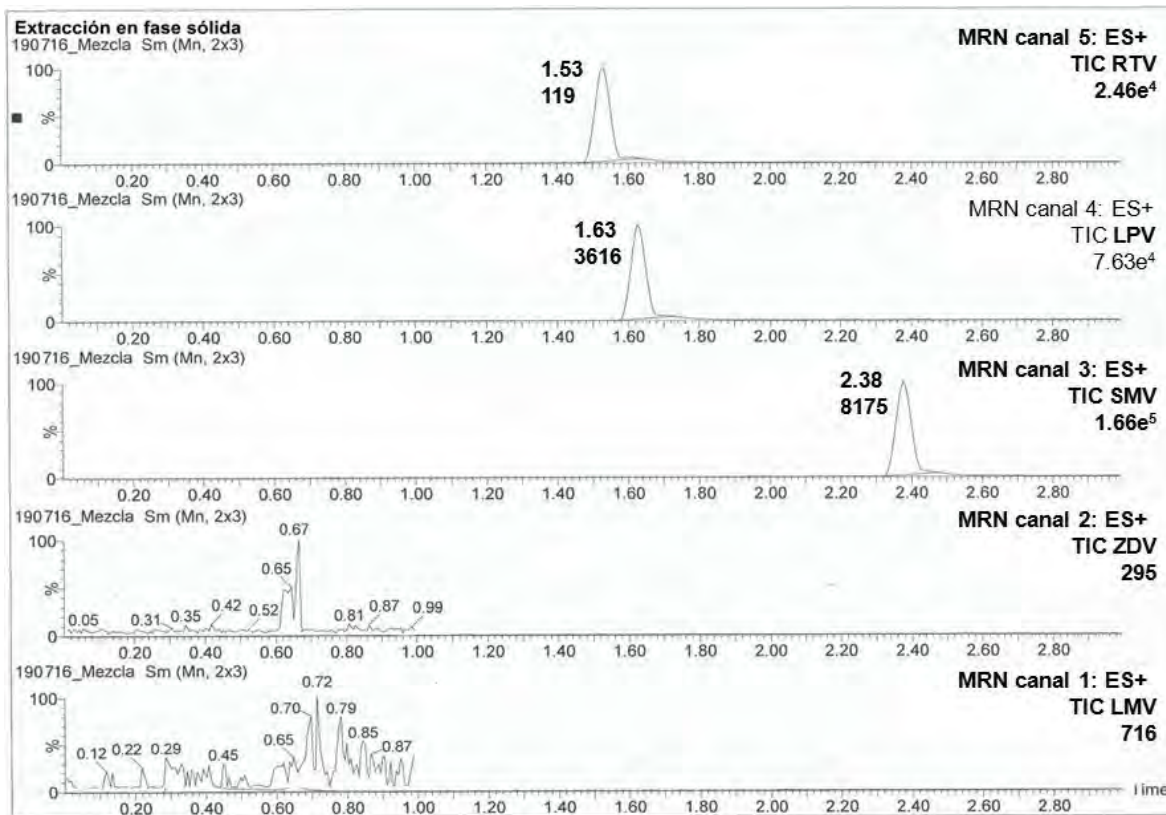


Figura 29. Cromatograma de la extracción en fase sólida empleando cartuchos Oasis MCX 3cc (60mg) para LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV (EI).

Posteriormente se realizaron pruebas con el método Dried breast milk spot (Olagunju *et.al.*, 2014) el cual consistió en colocar una cantidad definida (50 μ L) de la muestra de leche en papel filtro circular con diámetro de 1 cm, se dejó secar a temperatura ambiente y se extrajo con 600 μ L de ACN acidificado con ácido fórmico al 0.1%, se agitó y extrajo el sobrenadante el cual se llevó a sequedad con flujo de nitrógeno, posteriormente se reconstituyó con la fase móvil y se inyectó en el equipo, los resultados arrojaron que hay una extracción de los cuatro fármacos debido a que el cromatograma presenta señal en sus tiempos de retención (**Figura 30**), sin embargo, se observó variación en cada una de los ensayos que se evaluaron, además de que la muestra no tuvo una buena limpieza de los componentes de la leche, ya que se observó que algunas de las muestras presentaron un líquido aceitoso de color amarillento, posiblemente grasas no separadas de la leche.

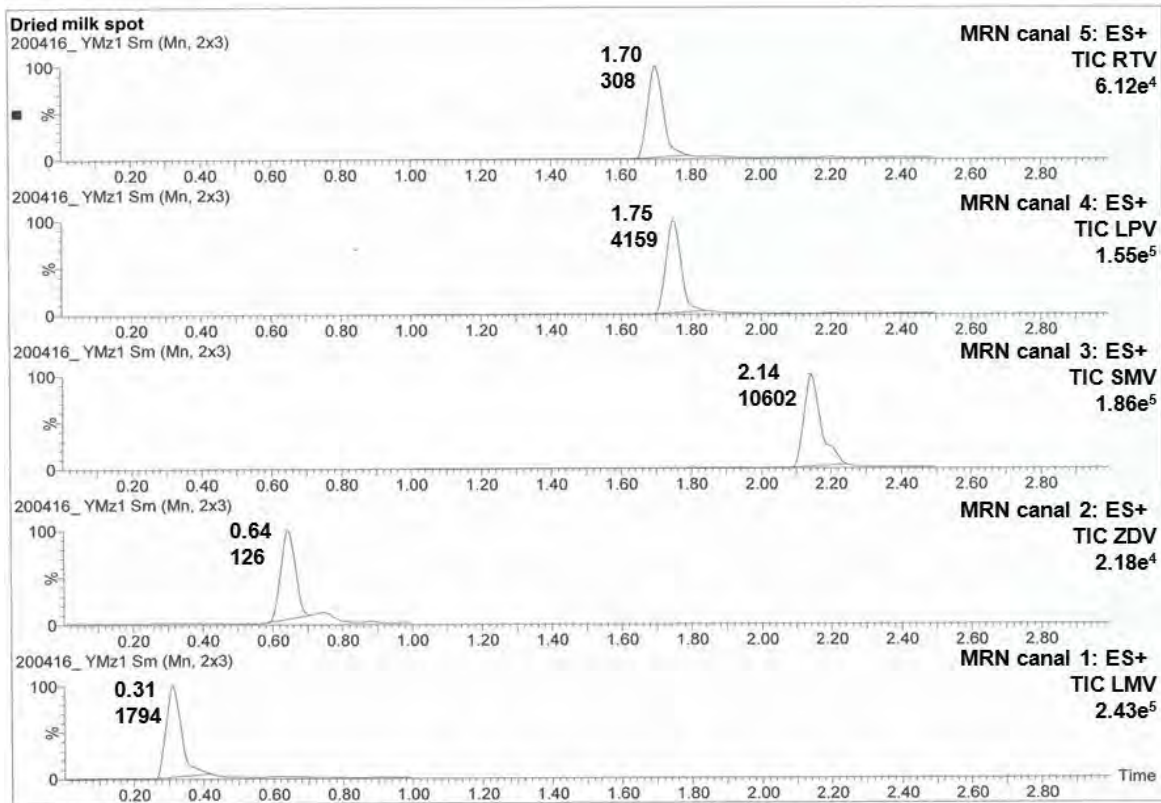


Figura 30. Cromatograma de la extracción por el método Dried breast milk spot para LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV (EI).

Finalmente el método de extracción descrito en la **Figura 15**, arrojó los mejores resultados, consistió en la adición de hexano con la finalidad de limpiar las grasas de la leche debido a su solubilidad en este disolvente, seguida de una precipitación de proteínas por medio de ACN acidificado con ácido fórmico 0.1%, se centrifugó a una temperatura de 5°C por 5 minutos a 10 000 rpm, en este punto el sobrenadante obtenido fue cristalino, sin embargo para asegurar una mayor limpieza de la muestra se pasaron por filtros de jeringa con un diámetro de 0.2 µm. Finalmente el sobrenadante se inyectó en el equipo cromatográfico. Este fue el método de elección para extraer los fármacos ya que además de presentar rapidez y sencillez tiene la mejor limpieza de las muestras comparada con los otros métodos evaluados. En el cromatograma se registro señal en el tiempo de retención de los cuatro fármacos lo cual nos indica, que estuvieron presentes en la muestra (**Figura 31**).

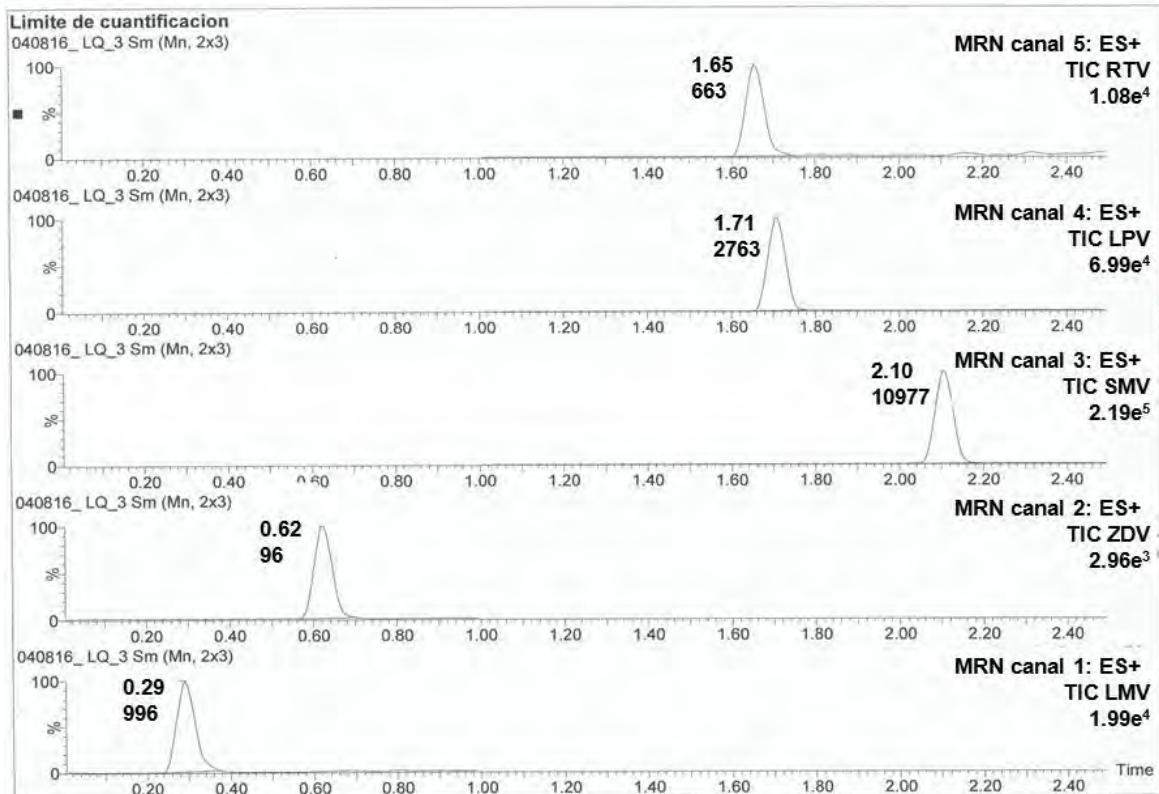


Figura 31. Cromatograma de la extracción mediante el método de precipitación de proteínas previo tratamiento con hexano para LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV (EI).

7.4. Validación

7.4.1. Adecuabilidad del sistema

Antes de cada corrida analítica se evaluó la calidad de la respuesta analítica por medio de la inyección repetida de la MCB en solución, del **Cuadro 15 al 18** se ejemplifica los resultados de adecuabilidad.

Cuadro 15. Adecuabilidad de LMV.

Adecuabilidad LMV					
Inyección	Concentración (ng/mL)	Tiempo de retención	Área	Área EI	Área/Área EI
1	300	0.29	53014.45	35836.58	1.47
2	300	0.29	54085.36	36114.98	1.49
3	300	0.29	51715.38	35876.72	1.44
4	300	0.29	52650.31	37258.80	1.41
5	300	0.29	52818.26	38163.82	1.38
6	300	0.29	51780.80	37728.48	1.37
7	300	0.29	50001.19	37843.44	1.32
Promedio		0.29	52295.10	36974.69	1.41
DE		0	1290.02	1004.78	0.06
CV%		0	2.46	2.71	4.39

Cuadro 16. Adecuabilidad de ZDV.

Adecuabilidad ZDV					
Inyección	Concentración (ng/mL)	Tiempo de retención	Área	Área EI	Área/Área EI
1	75	0.62	1083.60	35836.58	0.030
2	75	0.62	1132.14	36114.98	0.031
3	75	0.62	1158.56	35876.72	0.032
4	75	0.62	1148.66	37258.80	0.030
5	75	0.62	1245.86	38163.82	0.032
6	75	0.62	1184.71	37728.48	0.031
7	75	0.62	1212.30	37843.44	0.032
Promedio		0.62	1166.54	36974.69	0.031
DE		0	53.48	1004.78	0.00084
CV%		0	4.58	2.71	2.68

Cuadro 17. Adecuabilidad de LPV.

Adecuabilidad LPV					
Inyección	Concentración (ng/mL)	Tiempo de retención	Área	Área EI	Área/Área EI
1	600	1.71	65481.92	35836.58	1.82
2	600	1.71	66122.81	36114.98	1.83
3	600	1.71	67541.96	35876.72	1.88
4	600	1.71	68225.69	37258.80	1.83
5	600	1.71	71265.77	38163.82	1.86
6	600	1.71	69297.13	37728.48	1.83
7	600	1.71	69350.42	37843.44	1.83
Promedio		1.71	68183.67	36974.69	1.84407618
DE		0	2002.52	1004.78	0.02
CV%		0	2.93	2.71	1.17

Cuadro 18. Adecuabilidad de RTV.

Adecuabilidad RTV					
Inyección	Concentración (ng/mL)	Tiempo de retención	Área	Área EI	Área/Área EI
1	30	1.65	2224.71	35836.58	0.062
2	30	1.65	2219.95	36114.98	0.061
3	30	1.65	2333.67	35876.72	0.065
4	30	1.65	2338.63	37258.80	0.062
5	30	1.65	2387.04	38163.82	0.062
6	30	1.65	2486.53	37728.48	0.065
7	30	1.65	2523.97	37843.44	0.066
Promedio		1.65	2359.21	36974.69	0.063
DE		0	117.39	1004.78	0.0020
CV%		0	4.97	2.71	3.22

Se puede observar que el %CV de la respuesta obtenida (área/área EI) para cada uno de los fármacos antirretrovirales se encuentra dentro de la especificación menor al 5%, lo que nos indica que el sistema de medición funciona apropiadamente. El parámetro de adecuabilidad se evaluó y cumplió en todos los días de validación, los resultados anteriormente presentados son a manera de ejemplo y corresponden al segundo día del periodo de validación (evaluación de linealidad y repetibilidad).

7.4.2. Efecto acarreo

En las pruebas efectuadas durante el periodo de validación se descartó el efecto de acarreo en LMV, ZDV y LPV, sin embargo, en el caso de RTV se observó interferencias ligeramente mayores al 20% con respecto a su LIC, lo cual fue corregido adicionándole ácido fórmico 0.1% al los sistemas de lavado.

En el desarrollo del método se observó que después de numerosos inyecciones el efecto de acarreo afecta la precisión y exactitud de la respuesta analítica, principalmente en LPV y RTV. Este efecto se controló con un sistema específico de lavados entre cada inyección, para el lavado fuerte se propuso una mezcla de acetonitrilo, metanol, agua e isopropanol, todos a una proporción de 25% v/v y para el lavado débil, acetonitrilo/agua 30/70, v/v, aunque el efecto de arrastre se redujo este no se eliminó en su totalidad debido a que los compuestos básicos hidrofóbicos tienden a absorberse en su forma ionizada e interactuar con las superficies metálicas y material de plástico presentes en el sistema cromatográfico (Martínez, 2016). Como se mencionó anteriormente, para favorecer aún más la eliminación de las interferencias, ambos lavados fueron acidificados con 0.1% de ácido fórmico.

En el **Cuadro 19** a manera de ejemplo se presentan los resultados del efecto de acarreo del segundo día del periodo de validación (evaluación de linealidad y repetibilidad). Se puede observar que el área de los blancos después de la inyección del LSC no es mayor al área permitida (marcado en color amarillo) la cual representa el 20% del área del LIC.

Cuadro 19. Ejemplo del efecto de acarreo durante la validación del método analítico.

	ÁREA				
	LMV	ZDV	LPV	RTV	EI
Blanco	15.8	0	231.2	54.1	74.3
LSC	50574.8	5771.1	188056.4	33311.1	9023.0
Blanco	26.9	6.4	568.3	117.0	113.5
Blanco	18.8	5.0	213.6	104.0	50.6
LIC	947.7	93.1	2763.0	662.9	7367.5
Área Permitida	189.5	18.6	552.6	132.5	1473

7.4.3. Selectividad

El método demostró ser selectivo para la determinación de LMV, ZDV, LPV, RTV y el EI, como se observa en el **Cuadro 20** no hay interferencias significativas cercanas al tiempo de retención, es decir que en los diferentes tipos de leche (madura, de transición y calostro) el área promedio, no es mayor al área permitida (marcada en color amarillo) la cual representa el 20% del área del LIC, en el caso del EI el área permitida representa el 5% de su área.

En la **figura 32-33** se muestran los cromatogramas de los diferentes blancos de leche y el LIC, donde se puede contrastar que las respuestas obtenidas con respecto al TIC de los blancos de leche es mínimo por lo que no existe integración de la señal cromatográfica, siendo esta por lo menos 5 veces menor con respecto a la respuesta del LIC.

Cuadro 20. Selectividad de LMV, ZDV, LPV y RTV en leche materna.

Leche	LMV	ZDV	LPV	RTV	SMV (EI)
	Área promedio n=3	Área promedio n=3	Área promedio n=3	Área promedio n=3	Área promedio n=3
Voluntario 1	13.00	4.17	177.00	46.33	39.66
Voluntario 2	6.26	3.92	132.33	57.00	28.33
Voluntario 3	3.83	5.16	130.66	60.00	14.83
Voluntario 4	8.60	3.43	106.33	50.00	12.00
Voluntario 5	14.66	4.78	176.33	46.33	16.83
Voluntario 6	38.33	5.24	157.00	53.00	9.70
Voluntario 7	29.47	7.06	157.33	49.66	9.73
Leche de transición	4.50	5.70	107.66	51.00	11.55
Calostro	6.02	2.53	169.00	47.66	4.8
LIC	924.5	90.50	2412.00	289.45	12388
Área permitida	189.9	18.10	482.40	57.89	616

En el **Cuadro 21** se muestran los resultados de selectividad frente a fármacos concomitantes de uso frecuente, se puede observar que el promedio del %DEA es menor a 15%, lo cual quiere decir que la cuantificación de los antirretrovirales no es afectada por la presencia de estos fármacos concomitantes.

Cuadro 21. Selectividad frente a los fármacos concomitantes.

Fármaco	LMV	ZDV	LPV	RTV
	%DEA promedio n=3	%DEA promedio n=3	%DEA promedio n=3	%DEA promedio n=3
Cafeína	6.03	8.70	12.56	13.08
Paracetamol	5.19	5.22	11.92	7.06
Naproxeno	7.75	9.28	12.54	6.72
Ácido Salicílico	3.94	4.19	12.54	7.07
Butilhioscina	4.32	7.28	10.60	5.45
Clorfenamina	7.41	8.13	13.25	4.74

A la C_{max} terapéutica: Cafeína (2.4–47 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a una dosis de 35-336 mg), Paracetamol (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a una dosis de 1 g), Naproxeno (94 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a una dosis de 500 mg), Ácido salicílico (2.4 \pm 4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a una dosis de 1.2 g), Butilhioscina (5 ng/mL a una dosis de 500 mg) y Clorfenamina (7.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a una dosis de 4 mg).

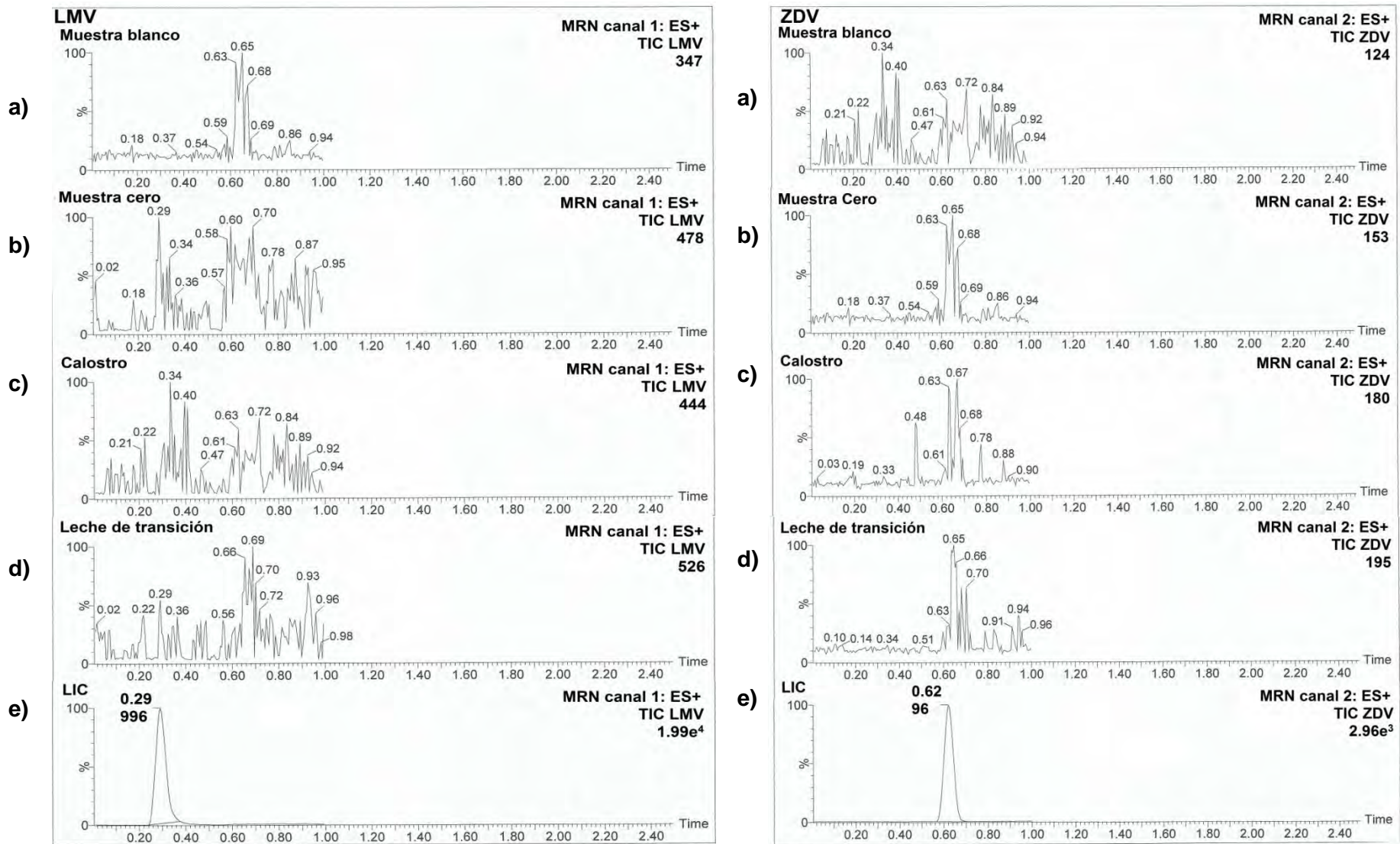


Figura 32. Cromatograma representativo de selectividad en LMV y ZDV. Se muestra la respuesta de cada fármaco en **a)** Blanco de leche; **b)** Muestra cero con EI (SMV 500 ng/mL); **c)** Calostro; **d)** Leche de transición; **e)** Limite inferior de cuantificación (LIC) en leche.

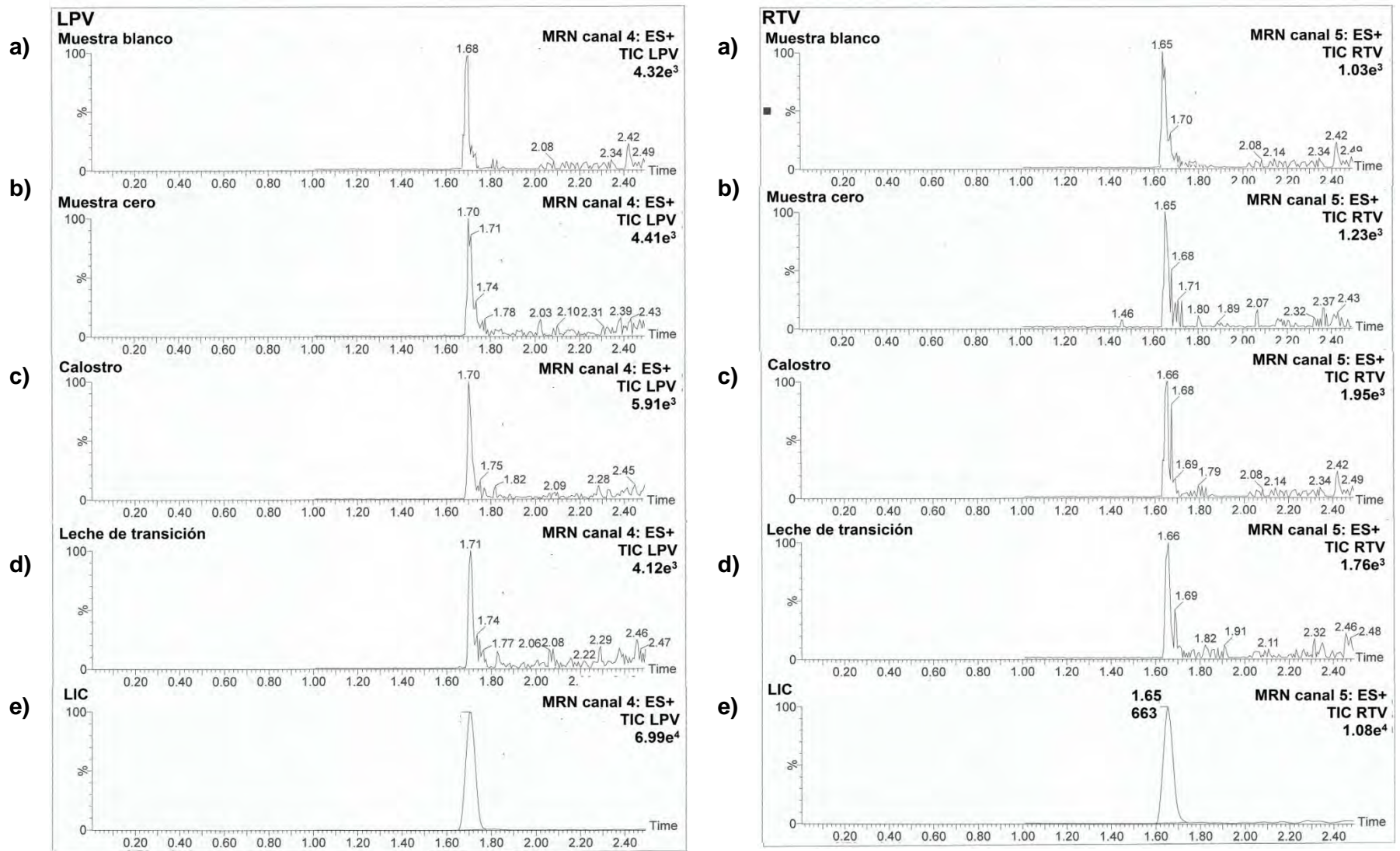


Figura 33. Cromatograma representativo de selectividad en LPV y RTV. Se muestra la respuesta de cada fármaco en **a)** Blanco de leche; **b)** Muestra cero con EI (SMV 500 ng/mL); **c)** Calostro; **d)** Leche de transición; **e)** Limite inferior de cuantificación (LIC) en leche.

7.4.4. Efecto matriz

En el **Cuadro 22** se muestran los promedios del FMN de las MCB y MCA para cada uno de los fármacos evaluados en los diferentes tipos de leche. Se observa que en el caso de ZDV, LPV y RTV el %CV cumple con el criterio de aceptación menor al 15%. En el caso de LMV el promedio de FMN fue mayor al 15% permitido; sin embargo, se puede notar que el FMN de las MCB de LMV es menor comparadas con las MCA, esto se puede atribuir a que en la MCA existe una saturación de la fuente de ionización debido a la concentración de LMV y a los componentes presentes en la leche materna. Además de que se ha reportado que los compuestos más polares, en este caso LMV, suelen tener un mayor efecto matriz ocasionando mayor variación en los resultados (Ahumada, 2010).

Cuadro 22. %CV del efecto matriz normalizado de los diferentes tipos de leche materna.

Matriz	Promedio del FMN n=3				
	Muestras control	LMV	ZDV	LPV	RTV
Leche madura	MCB	0.694	1.169	0.677	0.697
	MCA	0.855	0.960	0.540	0.572
Calostro	MCB	0.528	0.971	0.565	0.584
	MCA	0.655	1.012	0.491	0.490
Leche de transición	MCB	0.381	1.077	0.574	0.587
	MCA	0.469	1.142	0.508	0.519
Promedio		0.597	1.055	0.559	0.575
DE		0.171	0.088	0.065	0.071
%CV		28.756	8.394	11.776	12.372

La sugerencia en este caso, es cuantificar LMV solo en muestras de leche madura y de calostro, ya que promediando estos datos, el promedio del FMN cumple con la especificación.

7.4.5. Linealidad

De acuerdo con el principio de Parsimonia, para establecer la linealidad del método analítico se eligió aquel modelo que mejor ajuste y explique el comportamiento lineal entre la concentración nominal y la respuesta analítica, en el cual se obtenga la menor suma de cuadrados residuales (Hernández, 2011) y corresponda al modelo matemático más sencillo. En el caso de LMV y ZDV el mejor ajuste lineal obtenido mediante el método de mínimos cuadrados fue la ponderación log [concentración] vs log [respuesta (Área del fármaco/Área de EI)] y para LPV y RTV se usó la ponderación log [concentración] vs log [Área del fármaco]. En las **Figuras 34-37** se muestran las curvas de calibración promedio con su respectiva ecuación de la recta y coeficiente de determinación obtenido.

Asimismo, en los **Cuadros 23-30** se muestran los resultados de exactitud y los parámetros de la regresión lineal los cuales cumplen con los criterios establecidos en la norma; el %DEA (< 15% en todos los niveles excepto en el LIC < 20%), el %CV (< 15% excepto en el LIC < 20%). Cabe señalar que en la curva dos de LMV así como en la curva tres de ZDV se prescindió de uno de los puntos ya que no cumplió con el criterio de aceptación, por lo cual se eliminó este valor y la curva fue recalculada con el mismo modelo matemático como lo indica la norma.

Cuadro 23. Exactitud del método analítico 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	49.532	0.935	49.615	0.768	48.958	2.082
100	98.421	1.578	99.085	0.914	101.292	-1.292
200	200.906	-0.453	193.179	3.410	202.610	-1.305
500	503.954	-0.791	528.073	-5.614	494.486	1.102
1000	1117.879	-11.787	1058.507	-5.850	1009.161	-0.916
2000	1741.417	12.929	*	*	2091.702	-4.585
3000	3122.323	-4.077	2830.724	5.642	2861.921	4.602

Cuadro 24. Parámetros de la regresión lineal de la curva de calibración de LMV.

Punto de la curva	Concentración calculada (ng/mL)				DE	%CV
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio		
1	49.532	49.615	48.958	49.369	0.357	0.724
2	98.421	99.085	101.292	99.599	1.503	1.509
3	200.906	193.179	202.610	198.898	5.026	2.527
4	503.954	528.073	494.486	508.837	17.317	3.403
5	1117.879	1058.507	1009.161	1061.849	54.436	5.126
6	1741.417	*	2091.702	1916.559	247.689	12.923
7	3122.323	2830.724	2861.921	2938.322	160.110	5.449
m	0.9664	0.9776	0.9738			
b	-2.6297	-2.7135	-2.3478			
r	0.9987	0.9995	0.9997			
r ²	0.9976	0.9991	0.9996			

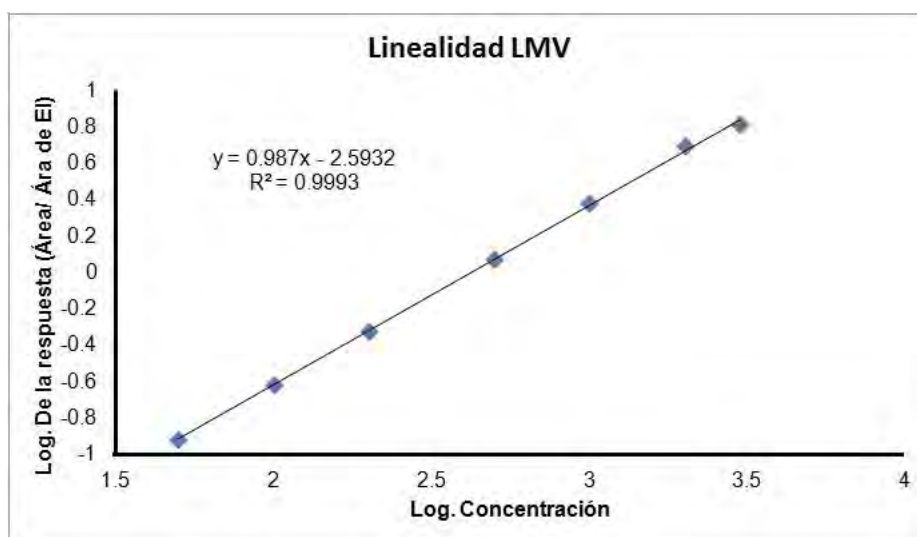


Figura 34. Curva de calibración de LMV con la ponderación $\log[C] / \log[\text{respuesta}]$.

Cuadro 25. Exactitud del método analítico 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
12.5	13.906	11.254	12.367	1.061	14.384	15.078
25	22.628	9.484	26.001	-4.005	*	*
50	46.701	6.596	42.885	14.229	43.477	-13.045
125	128.285	-2.628	138.331	10.664	108.467	-13.225
250	271.844	-8.737	280.164	12.065	255.214	2.085
500	444.401	11.119	525.494	-5.098	544.364	8.872
750	805.683	-7.424	652.524	12.996	776.812	3.574

Cuadro 26. Parámetros de la regresión lineal de la curva de calibración de ZDV.

Punto de la curva	Concentración calculada (ng/mL)				DE	%CV
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio		
1	13.906	12.367	14.384	13.552	1.0543	7.779
2	22.628	26.001	*	24.315	2.384	9.807
3	46.701	42.885	43.477	44.354	2.053	4.630
4	128.285	138.331	108.467	125.028	15.195	12.153
5	271.844	280.164	255.214	269.074	12.703	4.721
6	444.401	525.494	544.364	504.753	53.111	10.522
7	805.683	652.524	776.812	745.006	81.382	10.923
m	0.9723	0.9796	0.9204			
b	- 3.0355	- 3.0946	- 3.0241			
r	0.9981	0.9975	0.9970			
r ²	0.9963	0.9951	0.9942			

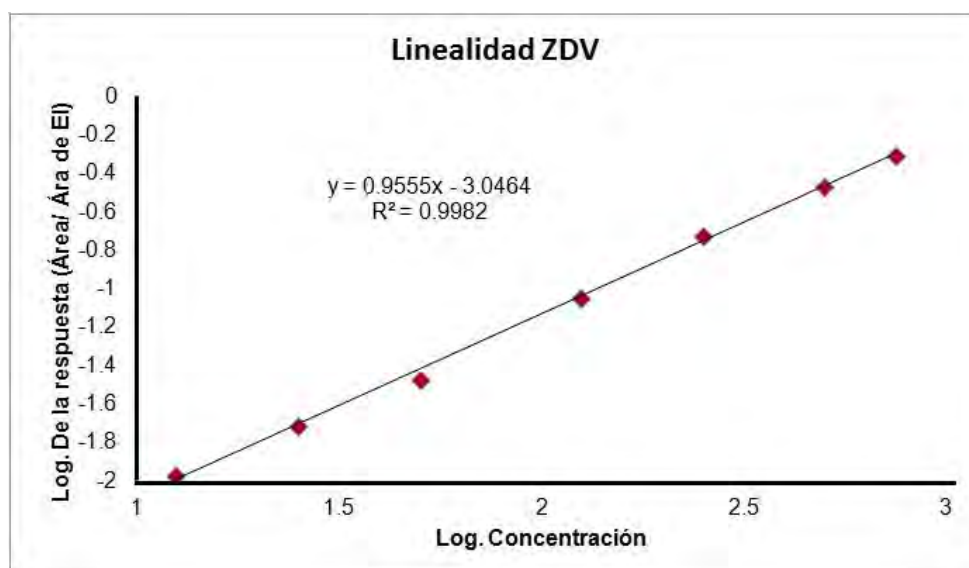


Figura 35. Curva de calibración de ZDV con la ponderación log[C] / log[respuesta].

Cuadro 27. Exactitud del método analítico 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
100	93.035	6.964	94.239	5.760	103.122	-3.122
200	208.339	-4.169	194.050	2.974	197.209	1.395
400	444.861	-11.215	455.633	-13.908	377.212	5.696
1000	946.455	5.354	1062.754	-6.275	1044.538	-4.453
2000	1962.850	1.857	1856.573	7.171	1976.001	1.199
4000	3896.852	2.578	3664.489	8.387	4130.598	-3.264
6000	6156.148	-2.602	6369.959	-6.165	5861.127	2.314

Cuadro 28. Parámetros de la regresión lineal de la curva de calibración de LPV.

Punto de la curva	Concentración calculada (ng/mL)				DE	%CV
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio		
1	93.035	94.239	103.122	96.799	5.508	5.690
2	208.339	194.050	197.209	199.866	7.505	3.755
3	444.861	455.633	377.212	425.902	42.509	9.980
4	946.455	1062.754	1044.538	1017.916	62.553	6.145
5	1962.850	1856.573	1976.001	1931.808	65.486	3.389
6	3896.852	3664.489	4130.598	3897.313	233.054	5.979
7	6156.148	6369.959	5861.127	6129.078	255.493	4.168
m	1.0129	0.9996	0.9469			
b	1.4428	1.316	1.885			
r	0.9991	0.9985	0.9996			
r ²	0.9984	0.9971	0.9994			

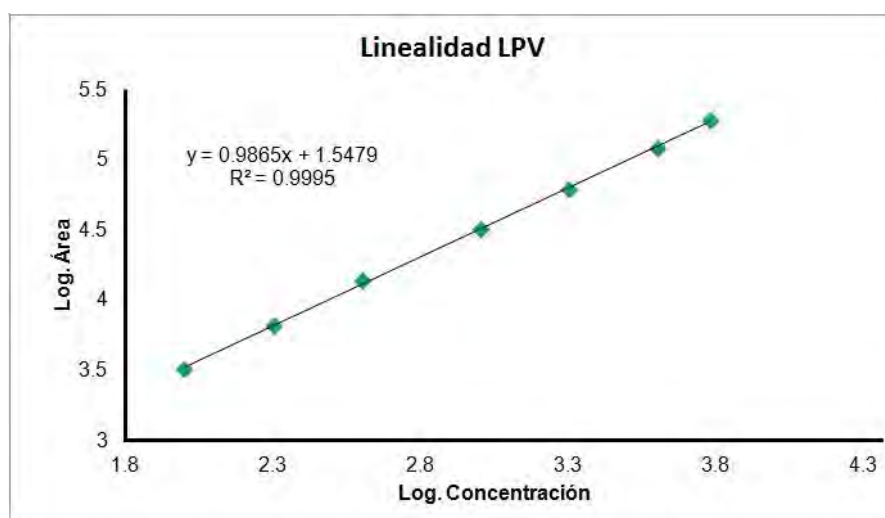


Figura 36. Curva de calibración de LPV con la ponderación $\log[C] / \log[\text{Área}]$.

Cuadro 29. Exactitud del método analítico de las curvas de calibración de RTV.

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
5	5.217	-4.352	5.830	16.613	5.834	-16.695
10	9.454	5.459	8.752	12.470	9.002	9.972
20	21.203	-6.015	19.774	1.126	18.153	9.231
50	46.520	6.958	47.659	4.680	49.410	1.178
100	96.611	3.388	95.218	4.781	97.250	2.749
200	213.333	-6.667	197.310	1.344	218.590	-9.295
300	299.244	0.251	332.111	10.703	298.893	0.368

Cuadro 30. Parámetros de la regresión lineal de la curva de calibración de RTV.

Punto de la curva	Concentración calculada (ng/mL)				DE	%C.V.
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio		
1	5.217	5.830	5.834	5.627	0.355	6.310
2	9.454	8.752	9.002	9.069	0.355	3.923
3	21.203	19.774	18.153	19.710	1.526	7.742
4	46.520	47.659	49.410	47.863	1.455	3.041
5	96.611	95.218	97.250	96.359	1.039	1.078
6	213.333	197.310	218.590	209.744	11.084	5.284
7	299.244	332.111	298.893	310.082	19.077	6.152
m	0.9523	0.9427	0.9369			
b	1.6117	1.4761	2.1698			
r	0.9993	0.9979	0.9981			
r ²	0.9987	0.996	0.9963			

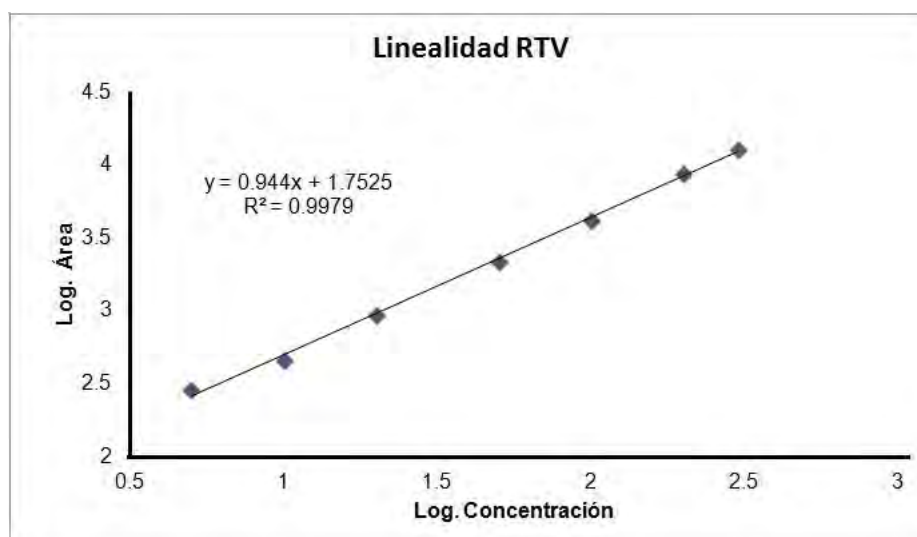


Figura 37. Curva de calibración de RTV con la ponderación $\log[C] / \log[\text{Área}]$.

7.4.6. Precisión

7.4.6.1. Precisión intra-día. Repetibilidad

En el caso de la precisión intra-día el criterio de aceptación nos indica que para el LIC, el %CV de los valores de concentración calculados no debe ser mayor a 20%, y para las MCB, MCM, MCA y MCD (dilución 1:4) no debe ser mayor a 15%. En los **Cuadros del 31-34** se presentan los resultados obtenidos al procesar por quintuplicado cada muestra control; como se puede observar, para los cuatro antirretrovirales se cumple con el criterio de aceptación en los niveles en los cuales se realizó dicha prueba.

Cuadro 31. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de LMV.

Replica	LIC (50 ng/mL)	MCB (300 ng/mL)	MCM (1700 ng/mL)	MCA (2500 ng/mL)	MCD 1:4 (1000 ng/mL)
1	54.863	281.007	1852.551	2616.434	947.803
2	44.520	341.708	1887.817	2729.188	879.983
3	45.463	317.431	1937.7803	2709.751	960.618
4	49.063	296.837	1632.650	2486.968	981.970
5	56.384	308.926	1896.293	2516.296	939.732
Promedio	50.059	309.182	1841.418	2611.727	942.021
DE	5.382	22.761	120.579	109.658	38.174
%CV	10.751	7.361	6.548	4.198	4.052

Cuadro 32. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de ZDV.

Replica	LIC (12.5 ng/mL)	MCB (75 ng/mL)	MCM (425 ng/mL)	MCA (625 ng/mL)	MCD 1:4 (250 ng/mL)
1	13.072	60.331	431.319	656.405	209.329
2	10.423	82.523	425.856	599.957	185.615
3	12.318	77.309	461.845	559.207	215.178
4	11.982	72.300	392.141	601.243	202.800
5	14.105	78.351	466.215	567.545	199.499
Promedio	12.380	74.163	435.475	596.871	202.484
DE	1.364	8.545	30.116	38.247	11.197
%CV	11.021	11.522	6.915	6.407	5.530

Cuadro 33. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de LPV.

Replica	LIC (100 ng/mL)	MCB (600 ng/mL)	MCM (3400 ng/mL)	MCA (5000 ng/mL)	MCD 1:4 (2000 ng/mL)
1	109.676	645.688	3408.855	5302.563	1402.355
2	113.817	640.556	3518.132	5650.658	1398.065
3	112.202	620.560	3829.404	5456.963	1325.382
4	104.203	576.154	3800.001	5761.072	1398.411
5	106.450	616.285	3891.754	5880.659	1426.243
Promedio	109.270	619.848	3689.629	5610.383	1390.091
DE	3.970	27.472	212.613	232.200	38.004
%CV	3.633	4.432	5.762	4.138	2.733

Cuadro 34. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de RTV.

Replica	LIC (5 ng/mL)	MCB (30 ng/mL)	MCM (170 ng/mL)	MCA (250 ng/mL)	MCD (100 ng/mL)
1	5.738	30.186	183.877	288.798	74.244
2	5.021	29.194	187.857	296.444	76.302
3	5.329	30.663	199.766	281.870	74.701
4	5.648	28.273	186.906	308.514	77.819
5	4.530	30.014	207.787	306.096	80.279
Promedio	5.253	29.666	193.239	296.345	76.669
DE	0.493	0.941	10.136	11.287	2.461
%CV	9.391	3.174	5.245	3.808	3.210

7.4.6.2. Precisión inter-día. Reproducibilidad

El parámetro de reproducibilidad es evaluado en tres días diferentes de análisis. En los **Cuadros 35-38** se muestran los resultados de reproducibilidad para los cuatro analitos. En este caso, se puede observar que las muestras control evaluadas cumplen con los criterios de aceptación (%CV no es mayor a 20% para el LIC así como para las MCB, MCM y MCA menor al 15%). No obstante, la MCD no cumplió con este criterio de aceptación, con base en ello se hace la observación de que para este método de extracción, no se debe aplicar diluciones en el caso de que la muestra presente concentraciones arriba del límite superior de la curva para los cuatro analitos. Con la evaluación de la reproducibilidad y repetibilidad se concluye que el método es preciso en cada nivel de concentración evaluado excepto para la MCD.

Cuadro 35. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de LMV.

	Replica	LIC (50 ng/mL)	MCB (300 ng/mL)	MCM (1700 ng/mL)	MCA (2500 ng/mL)	MCD 1:4 (1000 ng/mL)
Día 1	1	54.863	281.007	1852.551	2616.434	947.803
	2	44.520	341.708	1887.817	2729.188	879.983
	3	45.463	317.431	1937.7803	2709.751	960.618
	4	49.063	296.837	1632.650	2486.968	981.970
	5	56.384	308.926	1896.293	2516.296	939.732
Día 2	6	47.181	320.942	1926.029	2828.161	1594.099
	7	51.439	331.399	2137.234	2706.743	1493.840
	8	51.045	301.197	1944.072	2947.484	1483.505
	9	52.625	320.517	1863.704	2707.463	1628.577
	10	56.611	315.240	1841.709	2679.386	1565.200
Día 3	11	49.170	284.378	1552.303	2072.130	943.351
	12	51.813	294.475	1552.303	2279.985	929.500
	13	52.814	304.647	1441.854	2325.653	987.015
	14	54.380	309.310	1448.131	2408.643	934.076
	15	44.200	283.240	1569.522	2419.303	850.851
Promedio		50.772	307.417	1761.269	2562.239	1141.341
DE		4.082	17.751	217.892	232.231	305.086
%CV		8.041	5.774	12.371	9.063	26.730

Cuadro 36. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de ZDV.

	Replica	LIC (12.5 ng/mL)	MCB (75 ng/mL)	MCM (425 ng/mL)	MCA (625 ng/mL)	MCD 1:4 (250 ng/mL)
Día 1	1	13.072	60.331	431.319	656.405	209.329
	2	10.423	82.523	425.856	599.957	185.615
	3	12.318	77.309	461.845	559.207	215.178
	4	11.982	72.300	392.141	601.243	202.800
	5	14.105	78.351	466.215	567.545	199.499
Día 2	6	12.655	73.711	469.449	681.344	378.167
	7	14.486	86.099	405.767	666.569	373.119
	8	13.511	71.889	476.303	690.048	372.388
	9	13.372	79.194	454.016	642.346	383.906
	10	14.709	72.205	438.369	642.984	385.677
Día 3	11	11.559	63.229	376.235	504.852	219.158
	12	14.376	72.871	310.437	542.661	236.851
	13	14.376	72.871	323.151	603.588	224.454
	14	14.376	66.431	365.200	592.125	219.158
	15	10.171	60.041	326.791	590.217	199.826
Promedio		13.033	72.624	408.206	609.406	267.008
DE		1.482	7.632	56.720	53.373	82.634
%CV		11.372	10.510	13.895	8.758	30.948

Cuadro 37. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de LPV.

	Replica	LIC (100 ng/mL)	MCB (600 ng/mL)	MCM (3400 ng/mL)	MCA (5000 ng/mL)	MCD 1:4 (2000 ng/mL)
Día 1	1	109.676	645.688	3408.855	5302.563	1402.355
	2	113.817	640.556	3518.132	5650.658	1398.065
	3	112.202	620.560	3829.404	5456.963	1325.382
	4	104.203	576.154	3800.001	5761.072	1398.411
	5	106.450	616.285	3891.754	5880.659	1426.243
Día 2	6	110.247	755.087	3925.798	7051.037	2120.012
	7	96.933	726.645	4063.255	6432.229	2197.424
	8	112.814	768.993	4434.325	6038.552	2274.935
	9	119.205	775.341	4230.000	6482.228	2503.111
	10	121.916	668.551	4030.090	7277.179	2269.458
Día 3	11	71.022	590.403	3658.800	5575.289	1203.567
	12	96.471	602.557	3815.360	5639.931	1039.960
	13	88.455	568.331	3668.418	5715.526	1189.551
	14	92.791	583.433	3788.412	5404.367	1254.026
	15	89.398	574.346	3650.992	5475.315	1182.817
Promedio		103.040	647.529	3847.573	5942.904	1612.354
DE		13.710	74.273	266.316	603.769	500.246
%CV		13.305	11.470	6.921	10.159	31.025

Cuadro 38. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de RTV.

	Replica	LIC (5 ng/mL)	MCB (30 ng/mL)	MCM (170 ng/mL)	MCA (250 ng/mL)	MCD 1:4 (100 ng/mL)
Día 1	1	5.738	30.186	183.877	288.798	74.244
	2	5.021	29.194	187.857	296.444	76.302
	3	5.329	30.663	199.766	281.870	74.701
	4	5.648	28.273	186.906	308.514	77.819
	5	4.530	30.014	207.787	306.096	80.279
Día 2	6	5.762	34.806	191.245	366.309	110.654
	7	4.478	30.521	177.767	314.633	118.606
	8	5.644	34.849	222.513	312.810	120.984
	9	5.488	35.371	219.712	334.330	127.760
	10	6.115	32.248	233.737	364.272	112.418
Día 3	11	2.828	28.939	164.172	256.578	71.016
	12	5.635	30.521	195.184	320.117	60.327
	13	4.491	27.389	183.786	312.486	66.763
	14	4.777	25.843	190.264	269.323	76.822
	15	4.127	26.331	169.337	277.686	70.411
Promedio		5.041	30.200	194.261	307.351	87.940
DE		0.854	2.995	19.557	31.322	22.867
%CV		16.941	9.918	10.067	10.191	26.002

7.4.7. Exactitud

La exactitud se evaluó con los resultados de repetibilidad y reproducibilidad. La especificación indica que el promedio del %DEA no debe ser mayor a 15% para las muestras control, excepto para el LIC la cual no debe de ser mayor al 20%. En los **Cuadros 39-42** se muestran los resultados de exactitud, los cuales cumplen con dicha especificación, a excepción de la MCD para los cuatro analitos. En este caso y en concordancia con la precisión del método, no se recomienda diluir las muestras de leche materna que se encuentren por arriba del LSC de los intervalos de calibración. Adicionalmente se observa que para los inhibidores de la proteasa (LPV y RTV), la exactitud no cumple para la MCA. Observando los valores de concentración obtenidos en ambos casos, la concentración calculada es mayor a la nominal.

Cabe señalar que la MCA tiene una concentración mayor a la C_{max} encontradas en la literatura para estos fármacos en leche materna (**Cuadro 3**), a manera de sugerencia y considerando que estos fármacos pobremente tiene una baja excreción a través de leche materna se plantearía bajar la el límite superior y la MCA para LPV y RTV, o bien, si no afecta a LMV y ZDV en los límites inferiores de la curva, aplicar una dilución mayor durante el paso de precipitación de proteínas.

Cuadro 39. Exactitud del método analítico para la cuantificación de LMV.

	Replica	LIC (%DEA)	MCB (%DEA)	MCM (%DEA)	MCA (%DEA)	MCD (%DEA)
Día 1	1	9.726	6.330	8.973	4.657	5.219
	2	10.958	13.902	11.048	9.167	12.001
	3	9.072	5.810	13.987	8.390	3.938
	4	1.872	1.054	3.961	0.521	1.802
	5	12.768	2.975	11.546	0.651	6.026
Día 2	6	5.636	6.980	13.295	13.126	59.409
	7	2.878	10.466	25.719	8.269	49.384
	8	2.091	0.399	14.357	17.899	48.350
	9	5.251	6.839	9.629	8.298	62.857
	10	13.223	5.080	8.335	7.175	56.520
Día 3	11	1.658	5.207	8.688	17.114	5.664
	12	3.627	1.841	15.185	8.800	7.049
	13	5.629	1.549	14.815	6.973	1.298
	14	8.761	3.103	7.675	3.654	6.592
	15	11.598	5.586	12.506	3.227	14.914
Promedio de %DEA		6.983	5.141	11.981	7.861	22.735

Cuadro 40. Exactitud del método analítico para la cuantificación de ZDV.

	Replica	LIC (%DEA)	MCB (%DEA)	MCM (%DEA)	MCA (%DEA)	MCD (%DEA)
Día 1	1	4.579	19.557	1.487	5.024	16.268
	2	16.615	-10.030	0.201	4.006	25.753
	3	1.452	-3.078	8.669	10.526	13.928
	4	4.137	3.599	7.731	3.800	18.879
	5	12.843	4.468	9.697	9.192	20.200
Día 2	6	1.243	1.717	10.458	9.015	51.266
	7	15.890	14.799	4.525	6.651	49.247
	8	8.092	4.146	12.071	10.407	48.955
	9	6.982	5.592	6.827	2.775	53.562
	10	17.673	3.725	3.145	2.877	54.271
Día 3	11	7.520	15.693	11.669	19.223	12.336
	12	15.008	2.838	26.955	13.174	5.259
	13	15.008	2.838	23.964	3.425	10.218
	14	15.008	11.424	14.070	5.259	12.336
	15	18.629	19.945	23.107	5.565	20.069
Promedio de %DEA		10.712	3.167	10.959	7.395	27.503

Cuadro 41. Exactitud del método analítico para la cuantificación de LPV.

	Replica	LIC (%DEA)	MCB (%DEA)	MCM (%DEA)	MCA (%DEA)	MCD (%DEA)
Día 1	1	9.676	7.614	0.260	6.051	29.882
	2	13.817	6.759	3.474	13.013	30.096
	3	12.202	3.426	12.629	9.139	33.730
	4	4.203	3.974	11.764	15.221	30.079
	5	6.450	2.714	14.463	17.613	28.687
Día 2	6	10.247	25.847	15.464	41.020	6.000
	7	3.066	21.107	19.507	28.644	9.871
	8	12.814	28.165	30.421	20.771	13.746
	9	19.205	29.223	24.411	29.644	25.155
	10	21.916	11.425	18.532	45.543	13.472
Día 3	11	28.977	1.599	7.611	11.505	39.821
	12	3.528	0.426	12.216	12.798	48.001
	13	11.544	5.278	7.894	14.310	40.522
	14	7.208	2.761	11.423	8.087	37.298
	15	10.601	4.275	7.382	9.506	40.859
Promedio de %DEA		11.697	10.306	13.163	18.858	28.481

Cuadro 42. Exactitud del método analítico para la cuantificación de RTV.

	Replica	LIC (%DEA)	MCB (%DEA)	MCM (%DEA)	MCA (%DEA)	MCD (%DEA)
Día 1	1	14.772	0.622	8.163	15.519	25.755
	2	0.422	2.684	10.504	18.577	23.697
	3	6.593	2.210	17.509	12.748	25.298
	4	12.976	5.753	9.944	23.405	22.180
	5	9.386	0.048	22.227	22.438	19.720
Día 2	6	15.249	16.020	12.497	46.523	10.654
	7	10.433	1.738	4.569	25.853	18.606
	8	12.899	16.165	30.890	25.124	20.984
	9	9.770	17.903	29.242	33.732	27.760
	10	22.314	7.496	37.492	45.708	12.418
Día 3	11	58.343	3.533	3.427	2.631	28.983
	12	12.702	8.702	14.814	28.046	39.672
	13	10.167	13.853	8.109	24.994	33.236
	14	4.441	12.227	11.920	7.729	23.177
	15	17.450	5.437	0.389	11.074	29.588
Promedio de %DEA		14.528	7.626	14.780	22.940	24.115

7.4.8. Recuperación absoluta

Este parámetro es importante para conocer la eficacia de la extracción de un método analítico dentro de los límites de variabilidad (FDA, 2013). No debe ser necesario el 100% pero debe ser preciso y reproducible. En el **Cuadro 43** se muestra el porcentaje recuperado. Se puede observar que la recuperación de los analitos fue por arriba del 70 % en todos los casos y que el %CV fue menor al 15% para cada uno de los fármacos.

Cuadro 43. Valores promedio de la recuperación absoluta en los puntos control n=5, para LMV, ZDV, LPV y RTV.

Muestras	% Recuperación absoluta n=5			
	LMV	ZDV	LPV	RTV
MCB	87.543	79.492	69.993	79.505
MCM	70.425	68.670	69.874	70.691
MCA	84.044	81.696	80.917	86.823
Promedio	80.671	75.619	73.595	79.007
DE	9.044	6.556	6.341	8.077
%CV	11.211	8.670	8.617	10.224

7.4.9. Estabilidad

La NOM-177-2013 especifica que una muestra se considera estable a las condiciones propuestas, si el %DEA es menor al 15% comparando la concentración experimental con respecto a la concentración nominal. Como se puede observar en el **Cuadros 44** los fármacos antirretrovirales son considerados estables a 24 hrs en las condiciones del procesamiento de muestra y bajo almacenamiento. A largo plazo, la evaluación de almacenamiento después de 15 días mostró estabilidad en caso de LMV y ZDV. Sin embargo mostró cierta inconsistencia en el caso de LPV y RTV por lo que se sugiere repetir la prueba a una semana y repetir la prueba después de 15 días. Específicamente, durante la evaluación de los ciclos de congelación para LPV, el %DEA no cumplió con el criterio de aceptación, sin embargo, la sugerencia para este caso es evaluar menos ciclos de congelación, o bien, para prescindir de la descongelación repetida de las muestras en almacenamiento, se propone fraccionar la muestra en volúmenes menores de tal forma que si se requiere re-analizar la muestra, haya suficientes fracciones disponibles para dicho fin.

Cuadro 44. Pruebas de estabilidad de LMV, ZDV, LPV y RTV.

Muestra	Condición	%DEA											
		LMV			ZDV			LPV			RTV		
		MCB	MCM	MCA	MCB	MCM	MCA	MCB	MCM	MCA	MCB	MCM	MCA
Procesada a 24 h	Temperatura ambiente (23°C)	10.00	8.65	5.84	4.50	4.17	5.32	4.28	7.08	5.57	10.31	8.75	9.17
	Temperatura del automuestreador (5°C)	10.14	8.60	10.19	8.90	8.76	14.35	7.73	11.63	12.71	13.93	13.32	22.71
Leche materna a 24 h	Temperatura ambiente (23°C)	2.00	2.92	3.31	4.04	16.88	11.44	14.36	4.66	4.46	29.46	3.88	4.93
	Temperatura del refrigeración (8°C)	5.64	3.48	3.32	11.77	5.12	7.03	5.68	8.94	6.27	8.82	3.00	6.90
	Temperatura de congelación (-84)	5.74	4.05	2.27	4.64	2.59	3.27	14.31	10.23	10.46	20.35	3.69	4.30
Leche materna a largo plazo	Ciclos de congelación-descongelación (3)	3.19	3.26	5.02	12.96	9.71	10.21	28.26	23.51	55.45	5.80	8.01	11.83
	Largo plazo en congelación (15 días)	6.44	1.55	2.63	18.61	9.69	12.43	20.19	10.14	15.31	10.73	8.10	20.15

Adicionalmente en el **Cuadro 45** se muestran las estabildades de las soluciones de referencia almacenadas en refrigeración (8°C). Los resultados mostraron que LMV, LPV y RTV permanecen estables por un periodo de tres semanas. En el caso de ZDV esta muestra ser estable hasta por dos semanas. La evaluación nos asegura que las soluciones pueden ser empleadas con toda seguridad en los periodos de tiempo anteriormente mencionados.

Cuadro 45. Pruebas de estabilidad en solución de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV.

Tiempo	%DEA promedio				
	LMV	ZDV	LPV	RTV	SMV
1 semana	5.80	10.89	1.05	2.01	7.18
2 semanas	9.08	12.09	2.03	3.81	9.62
3 semanas	7.64	25.30	9.6	5.67	12.85

Finalmente, en el **Cuadro 46** se muestra el resumen de todos los parámetros evaluados en el periodo de validación, los resultados obtenidos, así como el criterio de aceptación y el dictamen.

Cuadro 46. Resumen de los resultados de la validación del método analítico.

Parámetros	Resultados				Criterio de aceptación	Dictamen
	LMV	ZDV	LPV	RTV		
Selectividad	No existe interferencia significativa próxima al 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.	Aprobado.
Efecto matriz	28.75%	8.39%	11.77%	12.37%	EI %CV del FMN <15%.	Aprobado. Con reservas en LMV.
Efecto de acarreo	No existe interferencia significativa próxima al 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.	Aprobado.
linealidad	r>0.99; r ² >0.99 en todos los puntos y curvas de calibración de los fármacos. Ponderación de log Concentración/log Respuesta y log Concentración/log Área. %CV <15% en todos los puntos de las curvas.				%CV y %DEA < 15% en todos los puntos de la curva, a excepción del LIC, %CV y %DEA < 20%.	Aprobado.
Repetibilidad	LIC: 10.75% MCB: 7.36% MCM: 6.08% MCA: 4.19% MCD: 4.05%	LIC: 11.02% MCB: 11.52% MCM: 6.26% MCA: 6.40% MCD: 5.53%	LIC: 3.63% MCB: 4.43% MCM: 5.76% MCA: 4.13% MCD: 2.73%	LIC: 9.39% MCB: 3.17% MCM: 5.24% MCA: 3.80% MCD: 3.21%	%CV < 15% para las MC y <20% para el LIC.	Aprobado.
Reproducibilidad	LIC: 8.04% MCB: 5.77% MCM: 12.37% MCA: 9.06% MCD: 26.73%	LIC: 11.37% MCB: 10.51% MCM: 13.89% MCA: 8.75% MCD: 30.94%	LIC: 13.30% MCB: 11.47% MCM: 6.92% MCA: 10.15% MCD: 31.02%	LIC: 16.94% MCB: 9.91% MCM: 10.06% MCA: 10.19% MCD: 26.00%	%CV < 15% para las MC y <20% para el LIC.	Aprobado. Con reservas en la MCD.
Exactitud	LIC: 6.98% MCB: 5.14% MCM: 11.98% MCA: 7.86% MCD: 22.73%	LIC: 10.71% MCB: 3.16% MCM: 10.95% MCA: 7.39% MCD: 27.50%	LIC: 11.69% MCB: 10.30% MCM: 13.16% MCA: 18.85% MCD: 28.48%	LIC: 14.52% MCB: 7.62% MCM: 14.78% MCA: 22.94% MCD: 24.11%	El promedio de %DEA < 15% en los datos obtenidos en reproducibilidad.	Aprobado. Con reservas en las MCA de LPV y RTV.
Recuperación absoluta	Promedio: 80.67% %CV: 11.21	Promedio: 75.62% %CV: 8.67	Promedio: 73.59% %CV: 8.61	Promedio: 79.00% %CV: 10.22	No necesariamente debe ser el 100%, pero debe ser reproducible.	Aprobado.
Estabilidad	Las muestras no procesadas son estables a temperatura ambiente, refrigeración (8°C) , congelación (-84°C) por 24 horas, ciclos de congelación y a largo plazo (15 días) a excepción de LPV para estas dos últimas condiciones.				La muestra se considera estable a las condiciones evaluadas si él %DEA < 15% de la concentración nominal.	Aprobado. Con reservas en los ciclos de congelación-descongelación y la estabilidad a largo plazo.
	Las muestras procesadas son estables a temperatura ambiente, automuestreador (5°C) por 24 horas					

8- Conclusión y Perspectiva

Conclusión:

- Las condiciones propuestas de detección y separación del método analítico mediante UPLC-MS/MS permitieron la cuantificación simultánea de LMV, ZDV LPV y RTV.
- El método de extracción propuesto mostró ser eficiente, rápido y sencillo a partir de un volumen mínimo de muestra (200µL), lo cual favorece la obtención de la misma a nivel clínico, ya que son muestra de alto valor y control en la institución.
- El método analítico que se desarrollo cumplió con los criterios establecidos por la NOM-177-SSA-2013, sin embargo, se deben de tomar en cuenta ciertas consideraciones para LPV y RTV en la exactitud de concentraciones altas. En general para este tipo de muestras no se le puede aplicar diluciones con matriz biológica por lo que durante una exploración de las concentraciones en muestras reales se podría modificar el intervalo de la curva de calibración, o bien, aplicar una dilución mayor durante la precipitación de proteínas de la muestra.

Perspectiva:

Cuantificar la excreción de fármacos antirretrovirales en muestras de leche de pacientes VIH+ y asociarlos con la supresión de la carga viral.

9- Referencias

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. y Pillai, S. (2008). *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier Saunders, 6.a edición. 476-481.
2. Ahumada, D. A. (2010). Reducción del efecto matriz en el análisis de residuos de plaguicidas mediante cromatografía de gases. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. facultad de ciencias.
3. CENSIDA. (2014). La Epidemia del VIH y el sida en México. (consultado Oct 2016). http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/epidemiologia/L_E_V_S.pdf
4. CENSIDA. (2015). La epidemia del VIH y Sida en México, hoja informativa. (consultado Oct 2016). http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/principal/la_epidemia_deVIHysidaMexico.pdf
5. CENSIDA. (s. f.). Causales críticas asociadas a la transmisión vertical del VIH y sífilis congénita. (Consultado Oct 2016) <http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/biblioteca/CausalesTVVIHySC.pdf>
6. CENETEC-salud. (2016). Prevención, diagnóstico y tratamiento en el binomio madre-hijo con infección por el VIH (Consultado Oct 2016). http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/246_GPC_Binomiomadrehijo_VIH/GER_BinomioMadreHijo.pdf
7. Chemicalize. (s.f.). (consultado Oct 2016). <http://www.chemicalize.org/>
8. Corbett, A. H., Kayira, D., White, N. R., Davis, N. L., Kourtis, A. P., Chasela, C., *et.al.* (2014). Antiretroviral pharmacokinetics in mothers and breastfeeding infants from 6 to 24 weeks post partum: results of the BAN Study. *Antivir Ther.* Author manuscript. Vol. 19, Núm. 6. 587-595.
9. Curran, A., Falcó, V. y Ribera, E. (2009). Inhibidores de la proteasa. *Manual de sida* 8ª ed. Barcelona; permanyer. 167-202.
10. Dickinson, L., khoo, S. y Back, D. (2010). pharmacokinetics and drug-drug interaction of antiretrovirals. *Elsevier*, Vol. 85. 176 89.
11. Dosal M. A. y Villanueva M. (2008). Introducción a la Metrología Química: curvas de calibración en los métodos analíticos. Departamento de fisicoquímica FQ. UNAM. 18-26.
12. Esquivel, E. E. y Leal, L. I. (2004). Métodos fisicoquímicos en Biotecnología: cromatografía en fase reversa. instituto de biotecnología, UNAM.
13. Evans, T. G., Bonnez, W., Soucier, H. R., Fitzgerald, T., Gibbons, D. C. y Reichman, R. C., (1998). Highly active antiretroviral therapy result in a decrease in CD8+ T cell activation and preferential reconstitution of the peripheral CD4+ T cell population with memory rather than naïve cell, *Antiviral Research*, Elsevier. Vol. 39. 163-173.
14. Fanales, E., Raimondo, M., Suligoj, B. (2010). *Ann Ist Super Sanità*, Vol. 46, Núm.1. 5-14.
15. FDA. (2013). Guidance for industry, bioanalytical method validation. U.S. Department of health and human services, Food and Drug Administration. (consultado Oct 2016).

<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm388107.pdf>

16. FDA. (2015). Guidance for industry. Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics. (consultado Oct 2016).
<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>
17. Figueroa, L. y Ávila, C. (2002). Efectos adversos de la exposición a antirretrovirales en el embarazo, el feto y el recién nacido. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. Vol. 22, Núm. 4. 175-181.
18. García, G., Hernández R. y López E. (2015). Embarazo y VIH si se puede. D.R© Comisión Nacional de los Derechos Humanos. 12-15.
19. García, R. (2011). Composición e inmunología de la leche humana. *Acta Pediátrica de México*, Vol. 32, Núm. 4. 223-230..
20. Hernández Pineda J. (2011). Estudio farmacocinético d una formulación ternaria conteniendo el compuesto (5-Cloro-2-Metiltio-6-(1-Naftiloxi)-1H-Bencimidazol)- β Ciclodextrina y PVP. (Tesis de maestría). Facultad de Química, UNAM.
21. infoSIDA (s.f.), (consultado Oct. 2016). <http://www.infosida.es/que-es-el-vih/transmision-del-vih> y <http://www.infosida.es/que-es-el-tratamiento-arv>
22. IUPAC. (2001). Selectivity in Analytical Chemistry. *Pure Appl. Chem*. Vol. 73, Núm. 8. 1381–1386.
23. Jevtovic, D., Salemovic, D., Ranin, J., Pesic, I., Korac, M. y Djakovic, O. (2010). The prognosis of patients with dissociated virological and immunological responses to HAART. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Vol. 64. 692-696.
24. Koehn, J., Rodney, J. y Ho, Y. (2014). Novel Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for Simultaneous Detection of Anti-HIV Drugs Lopinavir, Ritonavir, and Tenofovir in Plasma. *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, Vol. 58, Núm. 5. 2675-2680.
25. Levy, J. A. (2009). HIV Pahtogenesis: 25 years of progress and persistent challengers. *AIDS*, vol. 23, 147-160.
26. Martínez Hernández M. A. (2016). Desarrollo y validación de un método analítico por UPLC MS/MS para la cuantificación de fármacos antirretrovirales en plasma humano. (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM.
27. McComsey, G. (2002). Update on mitochondrial toxicity of antiretroviral and its link to lipodystrophy. *AIDS*, Vol. 4 140-147.
28. Mirochnick, M., Thomas, T., Capparelli, E., Zeh, C., Holland, D., Masaba, R., Odhiambo, P., Fowler, M. G., Weidle, P. J. y Thigpen M. C. (2009). Antiretroviral Concentrations in Breast-Feeding Infants of Mothers Receiving Highly Active Antiretroviral Therapy. *Antimicrobial agents and chemo therapy*. 1170–1176.

-
29. mncn, (consultado Oct **2016**). Cromatografía líquida de alta eficiencia. http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf
 30. Morales, D. (s.f.). Lactancia materna y VIH. Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes (INPer)".
 31. NORMA Oficial Mexicana NOM-010-SSA2-2010, Para la prevención y el control de la infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
 32. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.
 33. Olagunju, A., Bolaji, O., Amara, A., Waitt, C., Else, L., Soyinka, J., Adeagbo, B., Adejuyigbe, E., Siccardi M., Back, D., Owen, A. y Khoo, S. (**2014**). Development, validation and clinical application of a novel method for the quantification of efavirenz in dried breast milk spots using LC-MS/MS. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1-7.
 34. Olagunju, A., Amara, A., Waitt, C., Else, L., Penchala, S. D. Bolaji, O., Soyinka, J., Siccardi M., Back, D., Owen, A. y Khoo, S. (**2015**). Validation and clinical application of a method to quantify nevirapine in dried blood spots and dried breast-milk spots. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 70, Núm. 10. 2816-22.
 35. OMS. (**2011**). Alimentación del lactante en el contexto del VIH. (Consultado Oct **2016**) http://www.who.int/elena/titles/bbc/hiv_infant_feeding/es/
 36. OMS. (**2015**). Tratamiento antirretroviral para reducir el riesgo de transmisión vertical de la infección por VIH. (Consultado Sep **2016**) http://apps.who.int/rhl/hiv_aids/jmicom/es/
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs360/es/>
 37. ONUSIDA. Informe sobre la epidemia mundial de SIDA (**2014**). (consultado Oct 2016). http://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/AIDS_by_the_numbers_2015_es.pdf
 38. Osnaya, P. (**2015**). Desarrollo y Validación de Método Bioanalítico para la Cuantificación de Casiopeína III-ia en Plasma Humano por HPLC (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM.
 39. Pachón, J., Pujol, E. y Rivero, A. (**2003**). La infección por el VIH. Guía Práctica. Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas. 29-32.
 40. Petherick, A. (**2010**). Mother's milk: A rich opportunity. *Nature*. Vol. 468. 5-7.
 41. Plasencia, F. J. y Quirasco, M. (s. f.). Estado actual de los métodos de laboratorio para la detección de OGMs. Facultad de Química, UNAM.
 42. Posadas, F. J. y Bravo, E. (**2015**). Mujeres y el VIH y el Sida en México. Hoja informativa 02, versión 2.
 43. Pushpa, E. y Sailaja, B. (**2014**). Bioanalytical Method Development and Validation by HPLC: A Review. *Journal of Medical and Pharmaceutical Innovation*. Vol. 1, Núm. 6S. 1-9.

-
44. Rezk, N. L., White, N., Bridges, A. S., Abdel, M. F., Mohamed, T. M., Moselhy, S. S. y Kashuba, A. D. (2008). Studies on antiretroviral drug concentrations in breast milk: validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of 7 anti-human immunodeficiency virus medications. *Ther Drug Monit* Vol. 30. 611–619.
 45. Ribera, E., Tuset, M., Martín, M. y Del cacho, E. (2011). Características de los fármacos antirretrovirales. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Vol. 29, Núm.5. 362–391.
 46. Rodríguez, J. (2008), Seminario de Espectrometría de masas para usuarios del SUIC. Agilent Technologies.
 47. Roustit, M, Jaiel, M. y Leclercq, P. (2008). Pharmacokinetics and therapeutic drug monitoring of antiretrovirals in pregnant women. *Br J Clin Pharmacol*. Vol. 66. 179–195.
 48. Ruiz, J. C. y Montañez, R. (2011). Validación de la repetibilidad y la reproducibilidad del ensayo bajo carga monótonica en mezclas asfálticas (Tesis de licenciatura). Universidad Industrial de Santander, Facultad de ciencias Físico-Mecánicas. 24-26.
 49. SAP. (2002). Pasaje de Fármacos a la Leche Materna. *Vademécum Pediátrico del Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutiérrez”*
 50. Sabillón, F. y Abdu, B. (1997). Composición de la Leche Materna. *Honduras Pediatría*. Vol. XVÜI, 120-124.
 51. SEGO. (2007). Infección por virus de la inmunodeficiencia humana y gestación. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*. Vol. 50, Núm. 8. 508-518.
 52. Shapiro, R. L., Holland, D. T., Capparelli, E., Lockman, S., Thior, I., Wester, C., *et.al.* (2005). Antiretroviral concentrations in breast-feeding infants of women in botswana receiving antiretroviral treatment. *Journal of infectious diseases*. Vol. 192.
 53. Shapiro, R. L., Hughes, P. D., Ogwu, A., Kitch, D., Lockman, M. D., Molfat, M. B., *et.al.* (2010). Antiretroviral regimens in pregnancy and breast-feeding in botswana. *New england journal of medicine*. 2282-94.
 54. Slater, M., Stringer, E. M. y Stringer, J. S. A. (2010). Breastfeeding in HIV-Positive Women. *Pediatr Drugs*. Vol. 12, Núm.1. 1-9.
 55. Taylor, P.J. (2005). Matrix effects: The achiler heel of quantitative hig-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*. Vol. 38. 328-334.
 56. Tellez, M. J. (2014). Lopinavir/ritonavir en mujeres infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Vo/ 32 Supl 3. 22-25.
 57. University of Liverpool (s.f.). http://www.hiv-druginteractions.org/fact_sheets
 58. Vademecum IQB (2012). (consultado Oct 2016).
<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/l003.htm>
<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/z004.htm>
<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/r020.htm>
-

-
59. Waters (2005) ACQUITY UPLC Columns, 720001140EN. (consultado Oct 2016). <http://www.ecs.umass.edu/eve/facilities/equipment/Acquity/UPLC%20column%20Brochure.pdf>
 60. Waters. (2008). A Guide to Effective Method Development in Bioanalysis. (consultado Oct 2016). <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720002710en.pdf>
 61. Widdrintong, J., Payme, B., Medhi, M., Valappil, M. y Schmid, M. L. (2011). The significance of very low-level viraemia detected by sensitive viral load assays in HIV infected patients on HAART. *Journal of infection*. Vol. 62. 87-92.
 62. Wilde, M.I., Langtry H.D. (1993). Zidovudine. An update of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy. *Drugs*. Vol.46, Núm. 3. 515-578.
 63. Wu, Y., John, R., Engen, W. y Hobbins, B. (2006). Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) Further Improves Hydrogen/Deuterium Exchange Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*. Vol. 17. 163–167.

10-Anexos

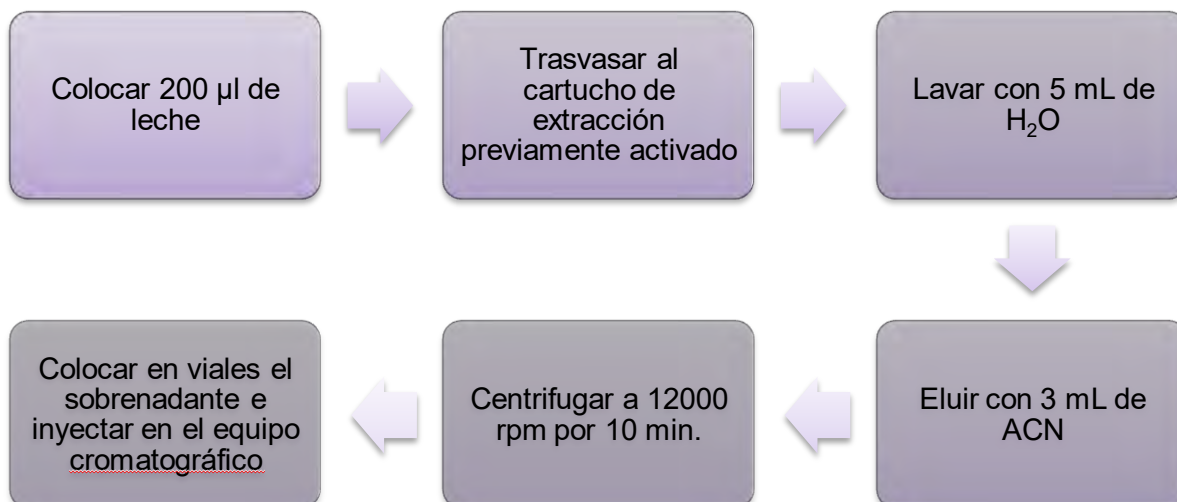
Anexo A. Dilemas éticos de las pacientes infectadas con VIH en etapa de reproductiva

Aún cuando por cuestiones de salud y pronóstico de la infección no se recomienda que las mujeres portadoras de VIH queden embarazadas, propiciando un factor de riesgo en la transmisión de la infección a sus hijos, de acuerdo con el artículo 4º de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, todas las personas tienen derecho a decidir el número y espaciamiento de sus hijos. En este sentido, incluso las mujeres infectadas con VIH tienen derecho a decidir cuántos hijos quieren tener, así como a tener acceso a la información, educación y los medios necesarios para poder ejercer este derecho.

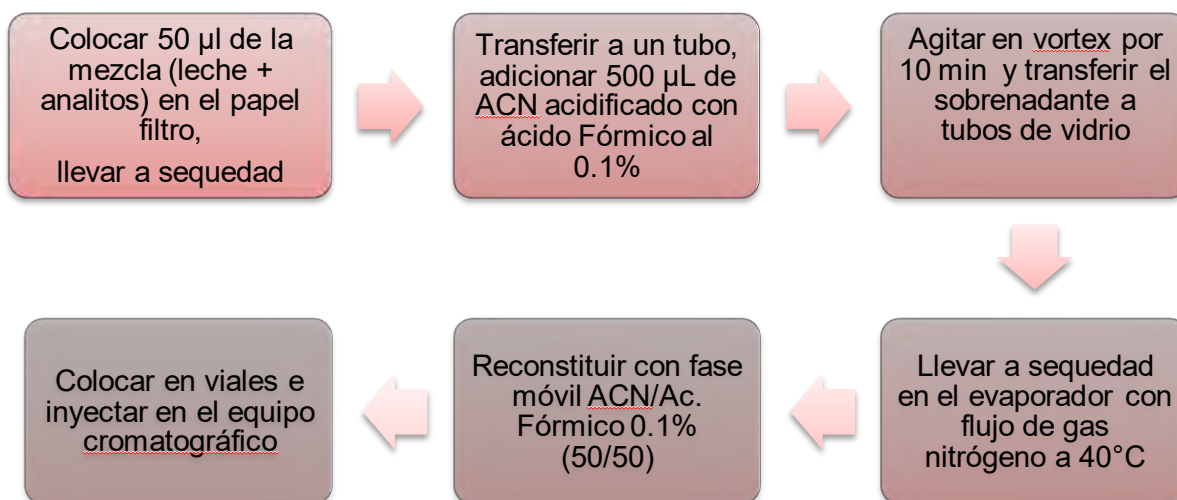
Por otra parte, la NOM-010-SSA2-2010, para la prevención y el control de la infección por VIH garantiza el derecho de las mujeres infectadas, a recibir información científica acerca de la prevención de la transmisión vertical para permitir su derecho a decidir si quieren tener hijos y cuando (García, *et.al.*, 2015). Además las instituciones de salud deben respetar tanto los derechos sexuales y reproductivos de las mujeres infectadas, así como, garantizar su adecuada atención tanto a la madre como del hijo y el acceso al tratamiento antirretroviral.

Anexo B. Métodos de extracción evaluados en leche materna

Extracción en fase sólida.



Dried breast milk spots.



Anexo C. Resumen de los criterios de aceptación descritos en la NOM-177-SSA1-2013

Parámetro	Criterio de aceptación
Adecuabilidad	El CV% de de la respuesta analítica no debe ser mayor que el 5%,
Selectividad	La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5% para el EI. En caso de pasar la prueba se realizara un pool de las muestras blanco.
Efecto matriz	El CV% del FMN calculado de las 6 unidades de la matriz no debe ser mayor que el 15%. Esta determinación debe ser realizada con la MCB y MCA.
Efecto de acarreo	La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5% para el EI.
Límite inferior de cuantificación	La respuesta de los analitos debe ser por lo menos cinco veces mayor que la respuesta del blanco. El valor promedio de la concentración evaluada debe estar del +/- 20% del valor nominal (exactitud) y no debe tener una variación mayor al 20% (precisión).
Curva de calibración	<p>Los datos de concentración recuperada de la curva de calibración deben estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, excepto para el límite inferior de cuantificación, ya que puede ser menor o igual que el 20%. Al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración con un mínimo de 6 puntos deben cumplir con este criterio.</p> <p>Cuando un punto de la curva de calibración no cumpla con el criterio de aceptación, debe ser rechazado y la curva de calibración debe ser recalculada sin modificar el modelo matemático.</p> <p>Del total de las curvas evaluadas, al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir con el criterio del 15% de la concentración nominal y 20% para el límite inferior de cuantificación.</p>
Linealidad	<p>El coeficiente de correlación y determinación debe ser mayor o igual a 0.98.</p> <p>El porcentaje de diferencia con respecto al valor nominal no debe ser mayor al 15% en el rango de concentraciones evaluadas, a excepción del límite de cuantificación donde puede ser del 20% en al menos el 75% de las concentraciones de la curva de calibración</p>
Repetibilidad	El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.
Reproducibilidad	El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20% .
Exactitud	El valor promedio del % de desviación no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.
Recuperación absoluta	El porcentaje de las concentraciones recuperadas, no necesariamente debe ser el 100%, pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del rango
Estabilidad	La muestra se considera estable a las condiciones evaluadas si él %DEA < 15% de la concentración nominal