



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

Optimización, validación y aplicación clínica de una
técnica analítica mediante UPLC-MS/MS para la
cuantificación de antirretrovirales en leche materna

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

P R E S E N T A:

ZAYRA FLORES GARCÍA

ASESOR: M. en C. Jessica Hernández Pineda

CO-ASESOR: Dra. María Gabriela Vargas Martínez

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Optimización, validación y aplicación clínica de una técnica analítica mediante UPLC-MS/MS para la cuantificación de fármacos antirretrovirales en leche materna

Que presenta la pasante: Zayra Flores García

Con número de cuenta: 413032829 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 29 de Enero de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Ladislao Palomares Morales	
VOCAL	Dra. María Gabriela Vargas Martínez	
SECRETARIO	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
1er. SUPLENTE	I.A. Miriam Alvarez Velasco	
2do. SUPLENTE	M. en C. Pablo Hernández Matamoros	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme vida y fortaleza para seguir adelante durante mis estudios de la Universidad.

A mis padres por su apoyo incondicional, porque jamás se rindieron a pesar de todas las adversidades, dándome consejos y apoyo incluso cuando no encontraban en ellos mismos una salida.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, por los conocimientos y herramientas adquiridas para mi desarrollo personal y profesional dentro y fuera de sus aulas y laboratorios.

Al Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” por abrirme las puertas de sus laboratorios, así como brindarme la oportunidad de contribuir en sus investigaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el proyecto con No. De Registro: SALUD-14-01-234292.

A mi asesora M. en C. Jessica Hernández por compartir su conocimiento y brindarme la oportunidad de trabajar en un proyecto de alto nivel académico.

A mi co-asesora la Dra. María Gabriela Vargas por ser mas que una guía académica alentándome a no rendirme, prestándome atención y disposición en todo momento. Gracias por todos sus consejos y su ayuda dentro y fuera del proyecto.

A los Ingenieros Héctor Sánchez y José Juan Mendoza de Waters por su apoyo, asesoría y conocimiento con los equipos utilizados en el Instituto, así como su apoyo para la adquisición de piezas del cromatógrafo.

A las voluntarias portadoras de VIH, las cuales accedieron a la donación de muestras de leche materna. Gracias porque ustedes son la razón de este trabajo.

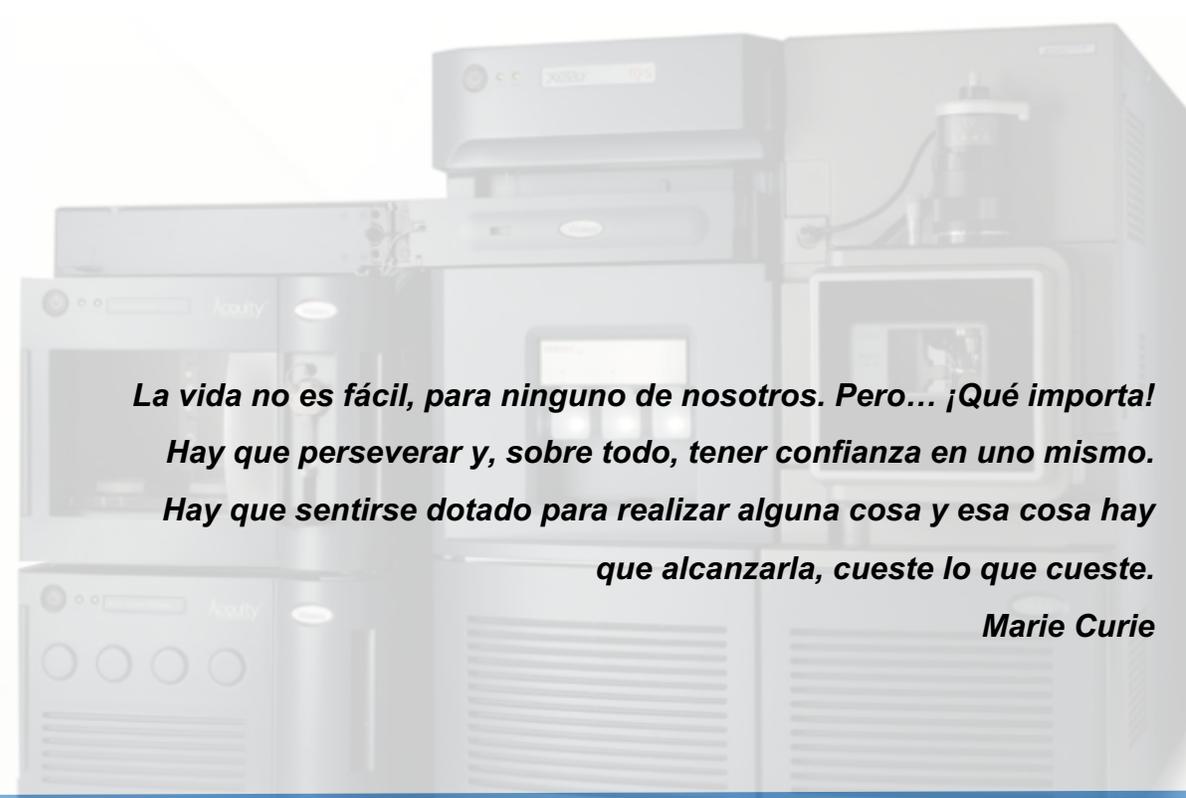
A mi gran amiga y hermana Anahí Ortega por acompañarme en cada paso dentro del Instituto y fuera de él. Por enseñarme a ser paciente y nunca rendirme a pesar

de los obstáculos que se presenten. Admiro tu fortaleza y dedicación para conseguir todo lo que te propones, así como tu humildad y tus valores que siempre demostraste ante cualquier situación.

A mi persona favorita Julia Virique por soportarme y aconsejarme en cada momento de mi vida profesional y personal. Gracias por tus palabras de aliento ante cualquier adversidad y por todo el apoyo que me has brindado para no rendirme y seguir luchando por mis sueños cueste lo que cueste. Del mismo modo a Stephane Virique, Elizabeth Rosas y Julieta Rosas, sin duda alguna ustedes se han convertido en mi segunda familia.

A Karina Trejo, Carlos Romero y Diana Laura por sus consejos y por estar ahí en todo momento dentro y fuera del Instituto

A Abraham Gutiérrez, Alejandro Mendoza, Ángeles Espinobarros, Elvira Torres, Fernanda Díaz, Yazmin Gutiérrez y Yomalli Bahena por ser las mejores amigas, roomates y compañeras de vida que una universitaria puede pedir, por estar siempre conmigo, por apoyarme, regañarme, aconsejarme y principalmente nunca dejarme.



***La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡Qué importa!
Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo.
Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y esa cosa hay
que alcanzarla, cueste lo que cueste.***

Marie Curie

RESUMEN

En el presente trabajo se optimizó el método analítico reportado por Sánchez E., 2016, el cual empleó Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución acoplado a Espectrometría de Masas en tándem (UPLC-MS/MS), para la cuantificación simultánea de lamivudina (LMV), zidovudina (ZDV), lopinavir (LPV) y ritonavir (RTV) en leche materna de pacientes portadoras de VIH que son atendidas en el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”.

La optimización del método se basó en tres pasos importantes. El primero fue la optimización de los parámetros por espectrometría de masas en tándem para la obtención de los iones, en donde se modificaron la temperatura de desolvatación 400 °C a 500 °C, el flujo de gas de desolvatación (500 L/Hr a 1000 L/Hr), el flujo de gas de colisión (50 L/hr a 30 L/hr) y el voltaje del capilar (2.90 kV a 2.91 kV). Del mismo modo, se modificaron las energías de colisión para LMV, LPV y RTV (15 a 5, 15 a 17 y 15 a 17 respectivamente). Como segundo paso se optimizó el método cromatográfico reduciendo el tiempo de análisis y como consecuencia la cantidad de disolvente utilizado. El tercer paso consistió en la optimización del método de extracción de antirretrovirales en leche materna cambiando el volumen de muestra (200 µL a 100 µL) así como cambiando la concentración de ácido fórmico para la precipitación de proteínas (0.1 % a 0.2 %). Aunado a lo anterior el método obtuvo una mayor sensibilidad comparada con el método reportado anteriormente, lo que permitió ampliar el rango de concentraciones para las curvas de calibración de cada antirretroviral.

Posteriormente el método se validó bajo los criterios de la NOM-177-SSA1-2013 siendo éste un método selectivo, preciso, exacto y lineal para todos los antirretrovirales en el rango de concentraciones de [800-60 000 ng/ml], [200-15 000 ng/mL], [3 200–240 000 ng/mL] y [160-12 000 ng/mL] para LMV, ZDV, LPV y RTV respectivamente.

Finalmente, se realizó la determinación de las concentraciones de LMV, ZDV, LPV y RTV en 24 de muestras de calostro de pacientes portadoras del VIH en donde se obtuvo alta variabilidad interindividual incluso en los medicamentos inhibidores de proteasa como LPV y RTV que obtuvieron un porcentaje del coeficiente de variación (% C.V.) de 62 % y 95.24 %.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

CAPITULO	pág.
1. INTRODUCCIÓN	13
2. MARCO TEÓRICO	15
2.1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)	15
2.1.1. Generalidades	15
2.1.2. Ciclo de replicación	16
2.2. Vías de transmisión del VIH	18
2.2.1. Transmisión vertical del virus a través de la lactancia materna	18
2.2.2. Lactancia materna <i>versus</i> alimentación de fórmula en pacientes VIH	19
2.3. Terapia Antirretroviral de Alta Actividad (TARAA)	21
2.3.1. Inhibidores de la Transcriptasa Inversa Análogos a Nucleósidos (ITINs)	22
2.3.1.1. Lamivudina (LMV)	22
2.3.1.2. Zidovudina (ZDV)	23
2.3.2. Inhibidores de la Proteasa (IP)	23
2.3.2.1. Lopinavir (LPV)	24
2.3.2.2. Ritonavir (RTV)	24
2.3.3. La TARAA durante el embarazo y la lactancia materna	26
2.4. Desarrollo de metodologías analíticas para la cuantificación de antirretrovirales	27
2.4.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)	28
2.4.2. Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UPLC)	30
2.4.3. Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución acoplado a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS)	31
2.5. Procesamiento de la leche materna para la cuantificación de antirretrovirales mediante UPLC-MS/MS	37
2.5.1. Composición de la leche materna	37
2.5.1.1. Calostro	37
2.5.1.2. Transición	38
2.5.1.3. Madura	38
2.5.2. Extracción de grasas de la leche materna	38
2.5.3. Precipitación de proteínas de la leche materna	38
2.6. Validación de métodos analíticos	30
2.6.1. Guías y normas para la validación de métodos analíticos	40
2.6.1.1. NOM-177-SSA1-2013	41
3. JUSTIFICACIÓN	43

4.	ANTECEDENTES	45
5.	OBJETIVOS	47
5.1.	OBJETIVO GENERAL	47
5.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
6.	DESARROLLO EXPERIMENTAL	48
6.1.	Materiales, equipos, reactivos y estándares de referencia	48
6.1.1.	Material	48
6.1.1.1.	Material biológico	48
6.1.2.	Equipos e instrumentos	48
6.1.3.	Reactivos	49
6.1.4.	Estándares de referencia	49
6.2.	Preparación de soluciones	49
6.2.1.	Ácido fórmico (AF) 0.1 % (v/v) en acetonitrilo (ACN)	49
6.2.2.	Ácido fórmico (AF) 0.2 % (v/v) en acetonitrilo (ACN)	50
6.2.3.	Acetonitrilo (ACN)	50
6.2.4.	Ácido fórmico (AF) 0.1 % (v/v)	50
6.2.5.	Lavado débil	50
6.2.6.	Lavado fuerte	51
6.2.7.	Lavado de sellos	51
6.2.8.	Solución de referencia de LMV, ZDV, LPV y RTV	51
6.2.9.	Soluciones de trabajo de los niveles de concentración de la curva de calibración	51
6.2.10.	Soluciones de trabajo de las muestras control de la curva de calibración	52
6.2.11.	Solución de estándar interno (E.I.)	54
6.3.	Método analítico para la cuantificación de LMV, ZDV, LPV y RTV en leche materna mediante UPLC-MS/MS	54
6.3.1.	Método de detección por espectrometría de masas en tándem	55
6.3.2.	Método cromatográfico mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución	55
6.3.3.	Método de extracción de fármacos LMV, ZDV, LPV y RTV en leche materna	56
6.3.3.1.	Volumen de hexano para la extracción líquido-líquido de lípidos	57
6.3.3.2.	Uso de hexano y mezcla de hexano con n-hexeno para la extracción líquido-líquido de lípidos	57
6.3.3.3.	Concentración de ácido fórmico para la precipitación de proteínas	58
6.3.3.4.	Evaluación del volumen de muestra mínimo para la cuantificación de antirretrovirales en leche materna	59
6.4.	Validación del método analítico	59
6.4.1.	Adecuabilidad del sistema	60
6.4.2.	Selectividad	60

6.4.3. Efecto matriz	60
6.4.4. Efecto acarreo	62
6.4.5. Límite inferior de la curva de calibración	62
6.4.6. Linealidad	63
6.4.7. Precisión	63
6.4.8. Exactitud	64
6.4.9. Estabilidad	64
6.4.9.1. Estabilidad a corto plazo	65
6.4.9.2. Estabilidad a largo plazo	65
6.4.9.3. Estabilidad de la muestra procesada	65
6.4.9.4. Estabilidad en el automuestreador	65
6.4.9.5. Estabilidad de los ciclos de congelación-descongelación	66
6.4.10. Recobro	66
6.5. Cuantificación de LMV, ZDV, LPV y RTV en pacientes portadoras de VIH	66
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	68
7.1. Método analítico para la cuantificación de LMV, ZDV, LPV y RTV en leche materna mediante UPLC-MS/MS	68
7.1.1. Método de detección por espectrometría de masa en tándem	68
7.1.2. Método cromatográfico mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución	76
7.1.3. Método de extracción de LMV, ZDV, LPV y RTV en leche materna	79
7.1.3.1. Extracción líquido-líquido de lípidos en leche materna	79
7.1.3.2. Extracción líquido-líquido con 100 μ L de hexano y con 100 μ L de mezcla de hexano y n-hexano en leche materna	82
7.1.3.3. Extracción de antirretrovirales con ácido fórmico 0.1 % (v/v) y ácido fórmico 0.2 % (v/v)	85
7.1.3.4. Extracción de antirretrovirales con 50 μ L, 100 μ L y 200 μ L de leche materna	88
7.1.4. Validación del método analítico	92
7.1.4.1. Adecuabilidad del sistema	92
7.1.4.2. Selectividad	94
7.1.4.3. Efecto matriz	97
7.1.4.4. Efecto acarreo	98
7.1.4.5. Límite inferior de la curva de calibración	100
7.1.4.6. Linealidad	100
7.1.4.7. Precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y exactitud	103
7.1.4.8. Estabilidad	106
7.1.4.9. Recobro	108

8. CUANTIFICACIÓN DE LMV, ZDV, LPV Y RTV EN PACIENTES PORTADORAS DE VIH	110
9. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA	113
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
11. ANEXOS	119
Anexo A. Propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de LMV	119
Anexo B. Propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de ZDV	120
Anexo C. Propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de LPV	121
Anexo D. Propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de RTV	122
Anexo E. Pruebas de la validez de los modelos propuestos para las curvas de calibración de los antirretrovirales	123
Anexo F. Índice de figuras	129
Anexo G. Índice de tablas	131

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Porcentaje
% C.V.	Porcentaje de coeficiente de variación
<	Menor que
>	Mayor que
ACN	Acetonitrilo
ACTG	Estudio denominado “Cuestionario de adherencia del grupo clínico de SIDA de Estados Unidos de América”
AF	Ácido fórmico
ARVs	Antirretrovirales
b	Ordenada al origen
CCR5	Quimiocina receptora C-C de tipo 5
CD4	Cómulo de diferenciación 4
CENSIDA	Centro Nacional para la Prevención y el Control del VIH y el SIDA
Cmax	Concentración máxima
CXCR4	Quimiocina receptora C-X-C de tipo 4
D.E.	Desviación estándar
d4T	Estavudina
DNA	Ácido desoxiribonucleico
E.I.	Estándar interno
EFV	Efavirenz
EMA	Agencia Europea de Medicamentos
ESI	Ionización por electrospray
ESI+	Electrospray positivo
FAB	Ionización por bombardeo con iones de elementos ligeros (por sus siglas en inglés)
FDA	Administración de Medicamentos y Alimentos
g	Gramos
gp120	Glucoproteína 120
gp41	Glucoproteína 41
h	Hora
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (por sus siglas en inglés)
ICH	Conferencia Internacional para la Armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano
IgA	Inmunoglobulina A
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
INPer	Instituto Nacional de Perinatología
IP	Inhibidor de Proteasa
ITIN	Inhibidor de la Transcriptasa Inversa Análogos a Nucleósidos
ITINN	Inhibidor de la Transcriptasa Inversa no Análogo a Nucleósidos
kV	Kilovoltio
L	Litro
L-MP	Lamivudina monofosfato
L-TP	Lamivudina trifosfato
L/Hr	Litro por hora de gas de desolvatación
L/hr	Litro por hora de gas de colisión
LIC	Límite inferior de cuantificación

LMV	Lamivudina
LPV	Lopinavir
LSC	Límite superior de cuantificación
m	Pendiente
m/z	Relación masa/carga
MALDI	Ionización por láser asistida en matriz (por sus siglas en inglés)
MCA	Muestra control alta
MCB	Muestra control baja
MCD	Muestra control diluida
MCM	Muestra control media
Min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MPa	Megapascal
MRM	Monitoreo de reacción múltiple
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
NCI	Instituto Nacional de Cancerología (por sus siglas en inglés)
ng	Nanogramos
NOM	Norma Oficial Mexicana
NVP	Nevirapina
°C	Grados Celsius
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
p.I.	Punto Isoeléctrico
pH	Logaritmo negativo de la concentración de H ⁺
pKA	Logaritmo negativo de la constante de acidez
psi	Libra por pulgada cuadrada
r	Coefficiente de correlación
r²	Coefficiente de determinación
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	ARN mensajero
RTV	Ritonavir
SI	Solución intermedia
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SMV	Simvastatina
TARAA	Terapia antirretroviral de alta actividad
TIC	Conteo total de iones
T_R	Tiempo de retención
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UNICEF	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia
UPLC	Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución
UV	Absorción Ultravioleta
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
V_T	Volumen total
ZDV	Zidovudina
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrometro

1. INTRODUCCIÓN

Existen diferentes fuentes de transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), entre las cuales, la transmisión vertical es la primera causa de transmisión de la infección en neonatos (CENSIDA, 2018). Sin embargo, se ha demostrado que la administración de agentes antirretrovirales (ARVs), durante el embarazo y el parto es eficaz para reducir la transmisión del virus de madre a hijo. Por ejemplo, en 1994 el estudio ACTG 076 demostró que es posible reducir la transmisión vertical del VIH de 25 % a 8 %, administrando zidovudina (ZDV) como monoterapia durante la gestación desde la semana 14 y durante el trabajo de parto, así como administrar profilaxis al recién nacido durante seis semanas. Bajo el mismo esfuerzo, en Estados Unidos de America, la ONU ha recomendado la extensión de la terapia antirretroviral de alta actividad (TARAA), la cuál consiste en la combinación de tres o más antirretrovirales, durante el período de lactancia materna, específicamente hasta los 6 meses de edad del infante, como una estrategia para reducir la transmisión del VIH a través leche materna. En cualquiera de los casos, el propósito de la terapia se basa en la reducción de la carga viral en los diversos fluidos y compartimientos biológicos, así mismo se plantea una sinergia entre profilaxis en el lactante y la ingestión de antirretrovirales presentes en la leche materna (Slater M., *et. al.*, 2010). Misma sinergia que debe ser evaluada, al menos en términos de concentraciones para no causar toxicidad en el neonato. Sin embargo actualmente no existe evidencia científica que correlacione las concentraciones de la TARAA en fluidos biológicos como el plasma, el líquido amniótico y/o la leche materna.

En este sentido, prevalece la controversia de que si la adherencia a la TARAA de las mujeres portadoras del VIH es adecuada, entonces la oportunidad de amamantar a los neonatos de forma segura aumentaría debido a que ésto provocaría cargas virales indetectables en compañía con la sinergia antes mencionada.

Por tal motivo, en el Instituto Nacional de Perinatología (INPer) se ha desarrollado un método analítico por cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplado a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) que sea capaz de cuantificar de forma simultánea y con alta sensibilidad los fármacos de la TARAA en plasma (Martinez M., 2016) y en leche materna (Sánchez E. 2016). Sin embargo, el método desarrollado para la cuantificación de la TARAA en leche materna requiere principalmente de una mejora en el proceso de extracción de los antirretrovirales a partir de esta matriz altamente compleja, debido a que presentó problemas de efecto matriz para lamivudina, reproducibilidad para la Muestra Control Diluida (MCD), exactitud para la Muestra Control Alta (MCA) para lopinavir y ritonavir y estabilidad para los ciclos de congelación-descongelación y a largo plazo para los cuatro antirretrovirales. Una vez establecidas las condiciones finales se requiere su validación, cumpliendo los criterios establecidos nacional e internacionalmente. Finalmente, se pretende cuantificar las concentraciones de la TARAA en muestras de leche materna de pacientes portadoras del VIH con lo que se reportará por primera vez la excreción de antirretrovirales a través de esta matriz biológica en población mexicana.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

2.1.1. Generalidades

El VIH infecta a las células del sistema inmunitario atacando a los linfocitos T CD4', los cuales son células encargadas de organizar la respuesta inmunológica del organismo; al ser alterados se provoca una serie de alteraciones o la anulación de su función.

El virus tiene cinco componentes principales (figura 1):

- **RNA del VIH:** Material genético del virus.
- **Cápside del VIH:** Núcleo que contiene el RNA del virus.
- **Envoltura del VIH:** Superficie externa del virus.
- **Enzimas del VIH:** Proteínas que realizan varias funciones en el ciclo de vida del virus.
- **Glucoproteínas del VIH:** Espículas de proteína incorporadas en la envoltura del virus, las cuales son estructuras de fijación a la célula.

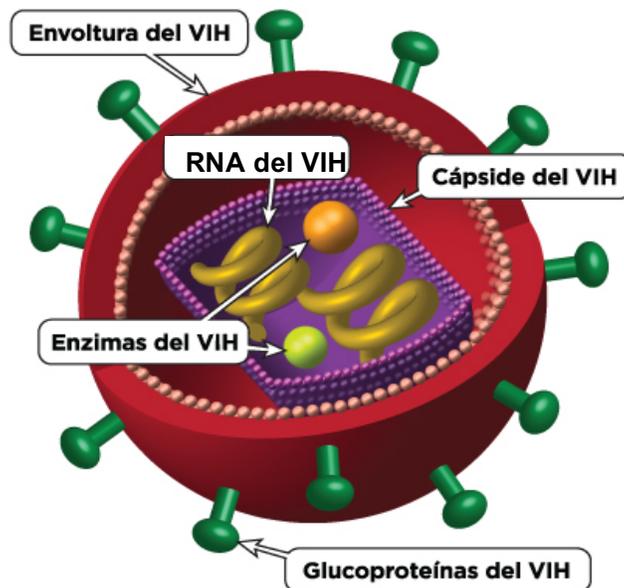


Figura 1. Estructura general del VIH (InfoSIDA, 2017)

La replicación continua del virus en personas sin tratamiento provoca una disminución progresiva de la inmunidad celular hasta su pérdida total, lo cual

produce la consiguiente inmunodeficiencia conocida como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (InfoSIDA, 2017)

2.1.2. Ciclo de replicación

El ciclo de replicación del VIH tiene varias etapas: enlace, fusión, transcripción inversa, integración, multiplicación, ensamblaje y gemación (InfoSIDA, 2016) (Ver figura 2).

- **Enlace:** El VIH se enlaza a los receptores de la superficie del linfocito. Los cuales son receptores CD4 y correceptores CCR5 y CXCR4. Estos receptores interactúan con complejos proteicos que se encuentran inmersos en la envoltura del virus, los cuales están compuestos por dos glicoproteínas, una extracelular llamada gp120 y una transmembrana llamada gp41.
- **Fusión:** Cuando el VIH se acerca a una célula, la glicoproteína gp120 se une a los receptores CD4 lo cual promueve la unión de los correceptores, dicha unión da como resultado un cambio conformacional en la glicoproteína gp120 que permite a la glicoproteína gp41 desplegarse e interactuar sus terminales hidrofóbicas con la membrana celular. Posteriormente, la gp41 vuelve a plegarse sobre si misma acercándose a la célula y facilitando la fusión entre membranas.
- **Transcripción Inversa:** La nucleocápside viral entra a la célula hospedadora y se fragmenta liberando dos hebras de RNA y tres enzimas esenciales de replicación, las cuales son integrasa, proteasa y transcriptasa inversa. La transcriptasa inversa comienza con la transcripción reversa del RNA viral, en donde se encuentran dos dominios catalíticos: El sitio activo de la RNAsa H y el sitio activo de la polimerasa. En el sitio activo de la polimerasa, la única hebra de RNA viral es transcrita a una doble hélice de RNA-DNA. La polimerasa completa a la hebra que queda de DNA para formar una doble hélice de DNA.

- **Integración:** La integrasa corta los nucleótidos de cada extremo 3' del DNA. Posteriormente, la integrasa transfiere el DNA al núcleo de la célula y facilita su integración en el genoma de la célula hospedadora.
- **Multiplicación:** La activación de la célula induce la transcripción del DNA provírico en RNA mensajero (RNAm). El RNAm migra hacia el citoplasma donde se sintetizan componentes de un nuevo virus.
- **Ensamblaje:** Las dos hebras del RNA viral y las enzimas de replicación se agrupan. Esta partícula viral inmadura abandona la célula adquiriendo una nueva envoltura hospedadora y proteínas virales.
- **Gemación:** La proteasa separa las cadenas largas de proteínas y las proteínas víricas más pequeñas se combinan para formar el VIH maduro.

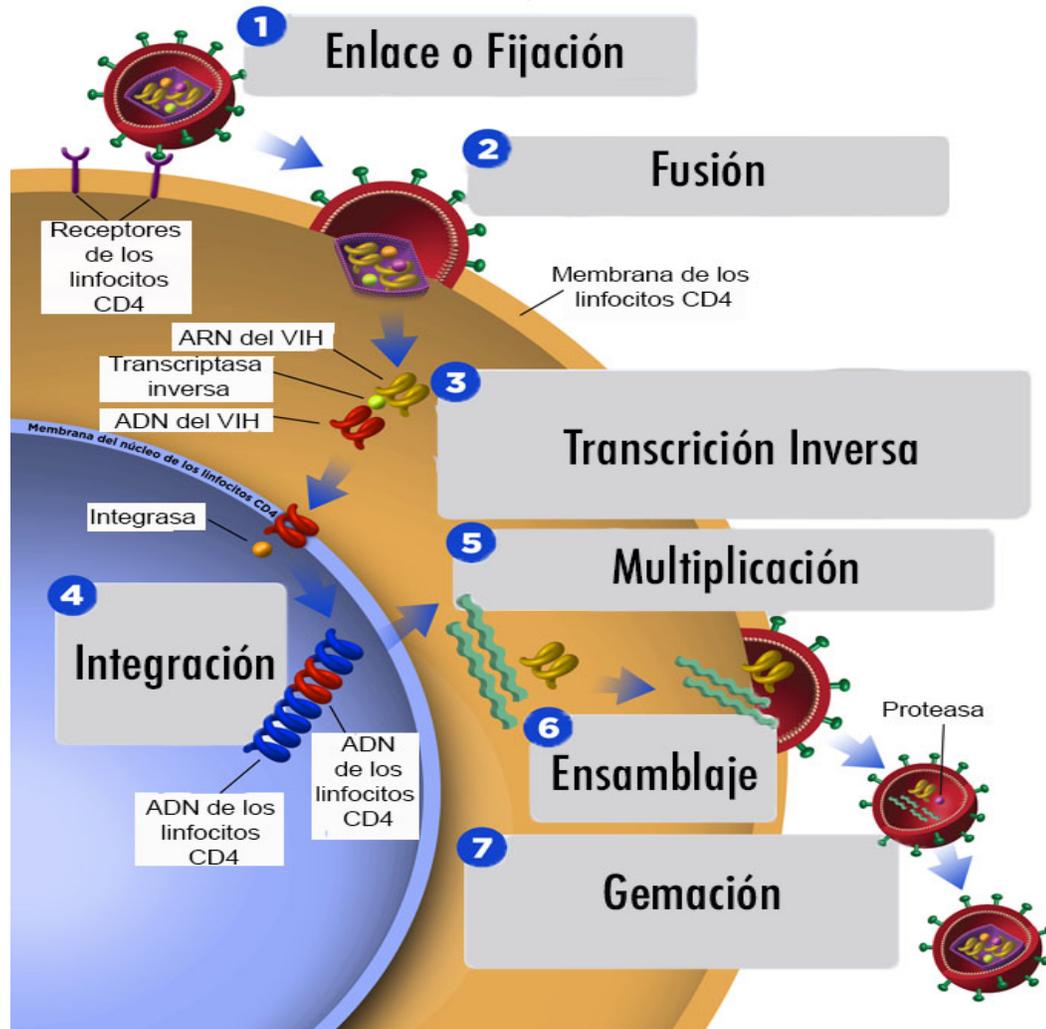


Figura 2. Ciclo de replicación del VIH y blancos potenciales para los fármacos antirretrovirales (InfoSIDA, 2017)

2.2. Vías de transmisión del VIH

Existen tres principales modos de transmisión de VIH: La primera por relaciones sexuales sin protección, la segunda a través de la transfusión a través de sangre infectada y la tercera por transmisión vertical de madre a hijo.

En cuanto a la transmisión por relaciones sexuales, se puede transmitir el virus siempre y cuando al menos una de las personas está infectada y exista intercambio de semen, fluidos vaginales y/o líquido preseminal.

En el caso de la transmisión a través de transfusiones de sangre está prácticamente erradicada en los países desarrollados pero existe riesgo en países con sistemas sanitarios deficientes. Aunado a esto, se puede transmitir cuando se comparte agujas, jeringas u otros elementos punzo cortantes con restos de sangre infectada.

Finalmente la transmisión vertical, es decir la transmisión del virus de madre a hijo, es la primera causa de transmisión del VIH en niños. Dicha transmisión puede ocurrir durante la gestación, contacto entre ambas sangres durante el parto, a través de la placenta, o durante la lactancia materna (InfoSIDA, 2017).

2.2.1. Transmisión vertical del virus a través de la lactancia materna

Los reportes en la literatura mencionan que en ausencia de cualquier régimen antirretroviral la tasa de transmisión oscila entre 15 % y 45 % (OMS, 2016). Sin embargo, cuando la madre recibe tratamiento antirretroviral de manera prenatal y post-natal el porcentaje de transmisión vertical se reduce hasta un 1.2 % (Slater, *et. al.* 2010).

No obstante, en general la lactancia materna es una práctica común en una amplia cantidad de países incluido México. Entre las posibles causas de dicha práctica, se pueden mencionar las culturales, nutricionales, pero también a que el acceso a fórmula en regiones de bajos recursos es poco asequible.

En el sentido nutrimental, diversos estudios han demostrado los indiscutibles beneficios que la lactancia materna brinda al neonato. Entre estos, se encuentra la disminución de morbilidad y mortalidad infantil a causa de diarreas, infecciones respiratorias agudas y/o enfermedades infecciosas, enfermedades crónicas, en especial obesidad, diabetes y cáncer, efectos en la salud materna como lo es cáncer de mama y cáncer de ovario.

No obstante, en el caso de las madres portadoras del VIH la lactancia materna está contraindicada debido al riesgo de transmisión vertical de la infección. Aún con esta intervención, la lactancia materna continúa siendo la primera vía de transmisión vertical alcanzando hasta un 42 % del total de infecciones en niños (Rezk, *et. al.* 2008).

Bajo este contexto, la disyuntiva a nivel clínico, médico y de investigación ha sido evaluar el riesgo/beneficio entre la posible transmisión del VIH a través de la lactancia materna y el riesgo de mortalidad y morbilidad desencadenado por la ausencia de la misma. Por ello, el personal de salud se ha enfrentado al desafío de establecer y promover la práctica de alimentación más idónea de los lactantes expuestos a condiciones de infección, tratamiento y desarrollo gestacional de madres que se encuentran infectadas por el VIH.

2.2.2. Lactancia materna *versus* alimentación de fórmula en pacientes VIH

Como se mencionó anteriormente, la lactancia materna brinda indiscutibles beneficios al lactante. Sin embargo, es necesario profundizar sobre el tipo de alimentación con la de fórmula para establecer y debatir un poco más acerca de cuál es la idónea para este tipo de población.

En la figura 3, se muestra el porcentaje de mortalidad infantil con respecto al tipo de alimentación. En él se compara la lactancia materna *versus* la alimentación de fórmula en hijos de madre portadora del VIH en Botsuana y República Sudafricana. En el estudio reportado por Thior L., *et al.* 2006, se incluyeron 1193 infantes, de los cuales 595 recibieron lactancia materna durante 6 meses con una

dosis de zidovudina de 300 mg dos veces al día y 598 recibieron alimentación con fórmula bajo una dosis de 300 mg de zidovudina dos veces al día durante un mes. El estudio mostró mayor mortalidad infantil (9.3 %) para aquellos niños alimentados con fórmula después del primer mes de vida comparado con aquellos que recibieron lactancia materna (4.9 %).

Por otro lado, Coovadia *et. al.*, 2007 llevó a cabo un estudio semejante, con 1372 infantes. De la misma forma se comparó la alimentación de fórmula *versus* la lactancia materna, llegando a resultados similares y encontrando mayor mortalidad infantil (15.5 %) en aquellos niños que recibieron alimentación de fórmula. Además, reportaron que dicha mortalidad se encontraba asociada principalmente a la baja calidad de agua que consumieron.

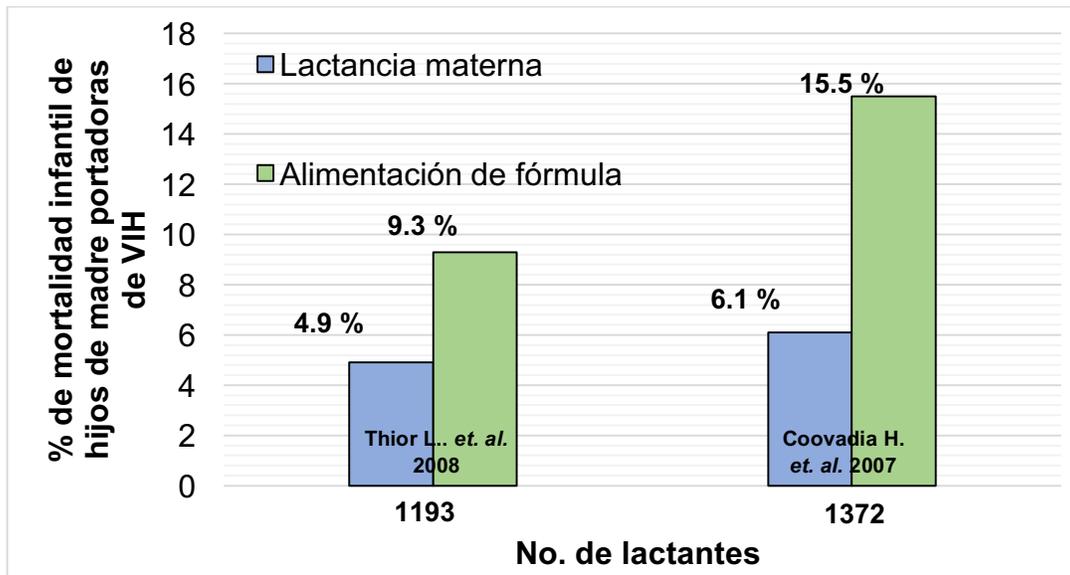


Figura 3. Porcentaje de mortalidad infantil de hijos de madres portadoras de VIH alimentados con lactancia materna y alimentación de fórmula

De manera general, se puede observar que ambos estudios presentan menor mortalidad infantil cuando recibieron lactancia materna de madres portadoras del VIH. Sin embargo es importante resaltar que en ambos estudios los niños y las madres estuvieron sometidos a un régimen antirretroviral. Sin embargo, es importante hacer notar que existen distintos tratamientos antirretrovirales, en

donde el tratamiento más común para personas infectadas por el VIH es la Terapia Antirretroviral de Alta Actividad (TARAA).

2.3. Terapia Antirretroviral de Alta Actividad

La TARAA consiste en la combinación de tres o más antirretrovirales cuyo objetivo es reducir la carga viral en plasma. Cada antirretroviral combate al VIH para detener la multiplicación del virus. Existen cinco clases de antirretrovirales que actúan sobre diferentes enzimas del ciclo de replicación del virus y a continuación se mencionan (Ibarra O., 2002).

- 1) **Inhibidores de la entrada.** Estos fármacos incluyen a los inhibidores de la fusión y a los antagonistas de CCR5, impidiendo que el virus entre al linfocito CD4 huésped.
- 2) **Inhibidores de la fusión.** Esta clase de medicamento antirretroviral que bloquea la envoltura del VIH para impedir su unión a la membrana del linfocito CD4 huésped, evitando así que entre a la célula.
- 3) **Inhibidor de la proteasa (IP).** Esta clase de antirretroviral bloquea la proteasa, la cual es una enzima del VIH. Al bloquearla, se evita que el nuevo VIH inmaduro se convierta en un virus maduro impidiendo así que sea capaz de infectar a otros linfocitos.
- 4) **Inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de los nucleósidos (ITINs).** Esta clase de antirretroviral bloquea la transcriptasa inversa, la cual es una enzima producida por el VIH para su multiplicación. Los ITIN son estructuralmente parecidos a los 2'-desoxinucleósidos naturales, los cuales son fundamentales para la síntesis de otros nucleósidos y estos a su vez son sintetizados a partir de nucleósidos o por el acoplamiento de las bases purínicas y pirimidínicas con el desoxiazúcar (Ibarra O. 2008).
Son profármacos que se fosforilan en el interior del citoplasma convirtiéndose en nucleótidos.
- 5) **Inhibidor de la transcriptasa inversa no análogo de los nucleósidos (ITINN).** Esta clase de antirretroviral se une a la transcriptasa inversa del virus para bloquearla y evitar la multiplicación del virus. A diferencia de los

ITIN estos inhiben la replicación de forma no competitiva mediante la unión al ácido nucleico.

2.3.1. Inhibidores de la Transcriptasa Inversa Análogos de Nucleósidos (ITINs)

Los ITINs son fármacos que inhiben la transcriptasa inversa del VIH. Estos se incorporan a la cadena de ADN viral interrumpiendo su elongación y como consecuencia bloquean la replicación viral (Ibarra O. 2008).

Los ITIN se dividen en:

- 1) Análogos de bases púricas: **adenosina** (didanosina) y **guanosina** (abacavir).
- 2) Análogos de bases pirimidínicas: **timidina** (zidovudina y estavudina) y **citidina** (emtricitabina y lamivudina).

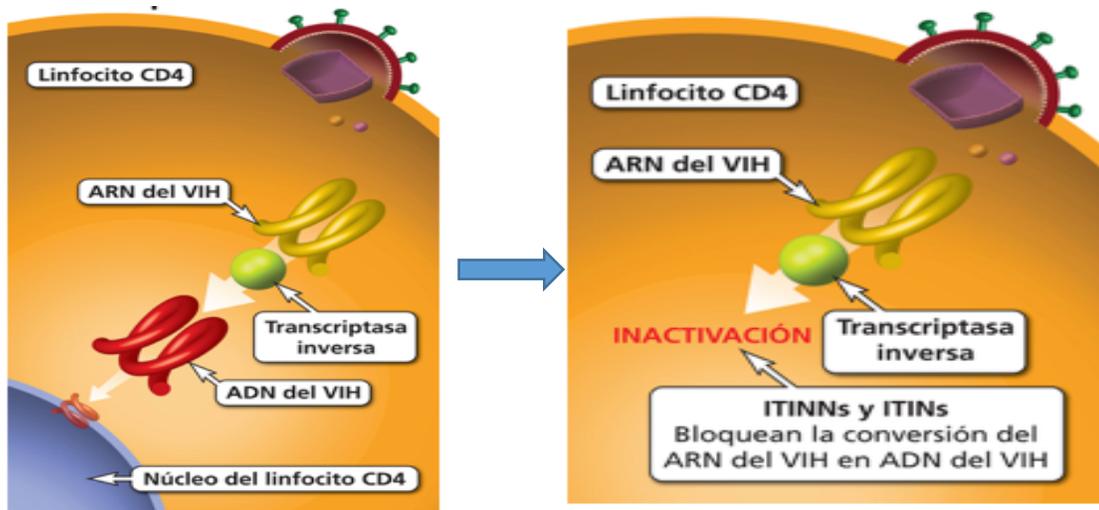


Figura 4. Inactivación de la transcriptasa inversa (InfoSIDA, 2017)

2.3.1.1. Lamivudina (LMV)

la lamivudina es un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido con actividad contra el VIH. LMV se fosforila en sus metabolitos activos: La lamivudina trifosfato (L-TP) y lamivudina monofostato (L-MP). L-TP inhibe la transcriptasa

inversa del VIH mediante la terminación de la cadena de ADN después de la incorporación del análogo de nucleósido en el ADN viral (NCI, 2017).

LMV es un fármaco que no reporta efectos adversos. LMV se elimina principalmente por vía renal y su dosis debe de reducirse en pacientes con insuficiencia renal. La barrera genética del fármaco es muy baja y la mayoría de los pacientes en los que se produce un fallo virológico desarrollan la mutación M184/I que confiere resistencia completa a la misma (Gallardo A. *et. al.* 2011). Las propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de LMV se encuentran en el anexo A.

2.3.1.2. Zidovudina (ZDV)

La zidovudina es un inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósido que después de la fosforilación intracelular, inhibe la DNA polimerasa provocando la inhibición de la replicación del DNA y la muerte celular (Gallardo A. *et. al.* 2011).

ZDV fue el primer fármaco disponible para el tratamiento contra el VIH (Johnson V. *et. al.* 2010). Sus principales efectos adversos son la mielotoxicidad principalmente la anemia y la pérdida de grasa subcutánea (lipoatrofia). Al igual que LMV su barrera genética es baja. Las propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de ZDV se encuentran en el anexo B.

2.3.2. Inhibidores de Proteasa (IP)

Los IP bloquean la proteasa del VIH, evitando que las proteínas virales maduren y por consiguiente inhiben de forma potente la replicación viral. La inhibición de la proteasa no impide que se sinteticen los grandes péptidos virales, pero no son fragmentos funcionales y por lo tanto no se producen virus con capacidad infectiva.

Los IP tienen estructura química parecida a los péptidos virales que tienen una elevada afinidad para el dominio activo de la proteasa inhibiendo así su actividad

catalítica (Gallardo A. *et. al.* 2011). Los IP tienen barrera genética elevada y todos son inhibidores enzimáticos, siendo ritonavir (RTV) el más potente ya que este a dosis bajas inhibe la glicoproteína p y el citocromo CYP3A4, lo que origina que los niveles plasmáticos de otros IP como lopinavir (LPV) aumente, mejorando la farmacocinética de los IP.

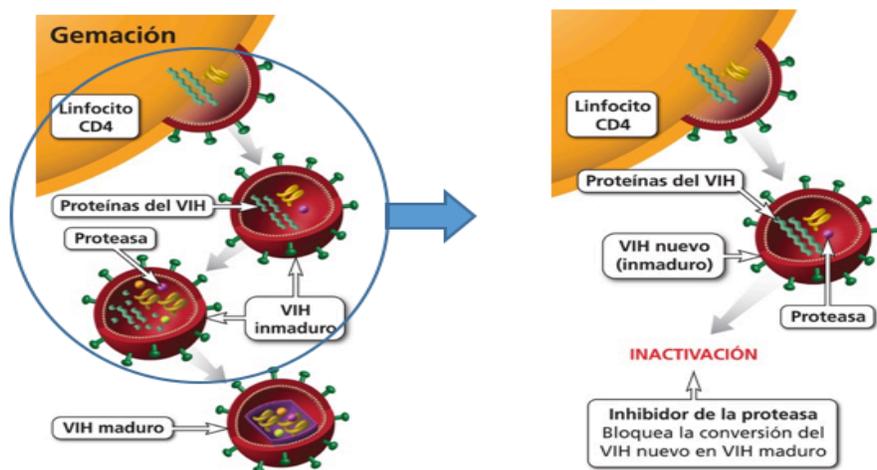


Figura 5. Inactivación de la proteasa (InfoSIDA, 2017)

2.3.2.1. Lopinavir (LPV)

El lopinavir es un fármaco que inhibe la proteasa viral del VIH. Por consiguiente, previene el corte de la proteína gag-pol, lo que conlleva a un ensamblaje viral inadecuado y un virus inmaduro el cual no es infeccioso (Drugbank, 2017). Las propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de LPV se encuentran en el anexo C.

2.3.2.2. Ritonavir (RTV)

El ritonavir es un inhibidor de la proteasa que interfiere en el ciclo de replicación del VIH. Inicialmente era un fármaco antirretroviral independiente, sin embargo, se ha demostrado que presenta mayores ventajas cuando se combina en pequeñas dosis con otros inhibidores de proteasa (Drugbank, 2017). Las propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de RTV se encuentran en el anexo D.

En la tabla 1 se muestra un resumen de las propiedades químicas de LMV, ZDV, LPV y RTV.

Tabla 1. Propiedades químicas de LMV, ZDV, LPV y RTV

Estructura	Fórmula	Peso Molecular	pKa	Cmax
LAMIVUDINA				
	$C_8H_{11}N_3O_3S$	229.2560 g/mol	14.29	2 000 ng/mL
ZIDOVUDINA				
	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	267.2450 g/mol	9.96	500 ng/mL
LOPINAVIR				
	$C_{37}H_{48}N_4O_5$	628.8008 g/mol	13.39	14 300 ng/mL
RITONAVIR				
	$C_{37}H_{48}N_6O_5S_2$	720.9940 g/mol	13.68	600 ng/mL

2.3.3. La TARAA durante el embarazo y la lactancia materna

En pacientes portadoras del VIH provenientes de algunas regiones donde el acceso a fórmula es poco asequible, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) han recomendado la lactancia materna acompañado de la TARAA.

En la tabla 2, se muestran los datos del porcentaje de transmisión vertical a través de la lactancia materna en población africana con diferente tipo de régimen antirretroviral. El estudio analizó los datos recolectados durante un periodo de tiempo de 12 años (2006-2014). En los estudios con mayor porcentaje de transmisión, se encuentra hasta el 10 % de transmisión del virus cuando se administra una dosis única de nevirapina (Kumwenda N, *et. al.* 2008). En contraste, para un régimen antirretroviral que contenía estavudina, lamivudina y nevirapina acompañado de profilaxis infantil con zidovudina y efavirenz por un lapso de tiempo desde la semana 28 de gestación hasta 7 meses de vida del neonato, el porcentaje de transmisión vertical fue menor (1.4 %).

En la tabla 2 se puede observar que el porcentaje de transmisión vertical a través de la lactancia materna, varía en función del tipo y duración del régimen antirretroviral. Sin embargo, otro factor que podría modificar dicho porcentaje, es la cantidad de antirretrovirales excretados a través de la leche materna. Por lo tanto, resulta de interés establecer la asociación que existe entre la cantidad de fármaco excretado en leche materna y la supresión de carga viral en esta misma matriz biológica.

Tabla 2. Datos del porcentaje de transmisión vertical del VIH y tipo de régimen antirretroviral utilizado en la lactancia materna exclusiva

Lugar	No. de lactantes incluidos	% transmisión VIH	Régimen Antirretroviral	Fuente
Botsuana, África	1193	5.6	Administración de ZDV durante sus primeros 6 meses de vida.	<i>Thior L., et al. (2006)</i>
Mozambique, Tanzania y Malawi, África	1150	2.2	Administración de ZDV, LMV y NVP desde la semana 25 de gestación, hasta 6 meses de vida.	<i>Palombi L., et al. (2007)</i>
Malawi, África	3016	10	Única dosis de NVP + 1 semana de ZDV	<i>Kumwenda N., et al (2008)</i>
		4	14 semanas de NVP	
		5	14 semanas de ZDV	
Etiopía, África	2024	9	Única dosis de NVP	<i>Bedri A., et al. (2008)</i>
		6.9	NVP hasta 6 meses de vida	
Tanzania, África	398	4.9	ZDV + LMV durante la primer semana y LMV hasta 6 meses de edad	<i>Kilewo C., et al. (2008)</i>
Mozambique, África	707	5.3	Administración de ZDV y LMV desde la semana 25 de gestación, hasta 6 meses de vida.	<i>Marazzi C., et al. (2008)</i>
Ruanda, África	236	1.4	STV, LMV y NVP desde la semana 28 de gestación, hasta 7 meses de vida.	<i>Arendt V., et al- (2009)</i>
Kenya, África	497	5	Administración de ZDV, LMV y NVP desde la semana 34 de gestación, hasta 6 meses de vida	<i>Masaba R., et al. (2008)</i>

ZDV: zidovudina; NVP: nevirapina; LMV: lamivudina; d4T: estavudina

2.4. Desarrollo de metodologías analíticas para la cuantificación de antirretrovirales

El desarrollo del tratamiento antirretroviral ha transformado la enfermedad del VIH de una enfermedad mortal a un padecimiento crónico-degenerativo, en el que se procura conservar la calidad de vida de las personas que viven con este virus. Las guías de tratamiento de antirretrovirales nacionales e internacionales,

recomiendan las terapias simplificadas, con mayor tolerabilidad y que favorezca la adherencia del tratamiento (Rely, K. *et. al.* 2013).

Como se mencionó en el apartado 2.3.2., el uso de RTV favorece la farmacocinética de los IP y aumenta su barrera genética. Por tal motivo se recomienda el uso de dosis bajas de 100 a 200 mg/día y coformulado con LPV de 33.3 mg/12 h más 133.3 mg/12 h respectivamente. Por otro lado, la vida media plasmática de ZDV es de 1 hora y de 3 horas la vida media intracelular por lo que la frecuencia de su administración es de 2 ó 3 veces al día, siendo la dosis común de 250-300 mg/día. Sin embargo, LMV (pertenecientes a los ITIN al igual que ZDV) tiene una vida media plasmática de 2.5 h, lo que permite que su dosificación sea de 150 mg/12 h.

Por consiguiente, el avance tecnológico ha permitido el desarrollo de nuevas metodologías analíticas las cuales ayudan a la cuantificación de fármacos, marcadores y/o biomarcadores en distintas matrices biológicas. Todo ello ha permitido y permite la aplicación de los principios farmacocinéticos a la práctica clínica, es decir, se apoyan de la correlación entre las concentraciones con su efectividad y/o seguridad. Entre los avances tecnológicos más utilizados en la aplicación clínica se encuentra la utilización de la cromatografía de líquidos de alta resolución.

2.4.1. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) tiene como fundamento que los analitos se hacen pasar a través de una fase estacionaria mediante la corriente de una fase móvil líquida, permitiendo así que estos interactúen con la fase de acuerdo a su polaridad y se logre una separación de ellos (Skoog D. *et. al.* 1997).

Cada equipo de cromatografía líquida incluye (figura 6):

- **Frascos:** Contenedores con la fase móvil. Los frascos se construyen con materiales de vidrio principalmente y es necesario taparlos para evitar que en la fase móvil entre polvo o aire.
- **Sistema de bombeo:** Impulsa la fase móvil dentro del sistema de elución del equipo a un flujo seleccionado. En HPLC se emplean bombas de pistón, las cuales pueden ser de pistón sencillo o de doble pistón montados en serie o paralelo. Estas bombas generalmente monitorizan la presión de la fase móvil en bares, MPa, o psi, en donde trabajan con presiones de 6 000 a 6 500 psi. Estos sistemas permiten establecer límites de presión máxima o de presión mínima. La presión mínima puede ser ocasionada por la falta de fase móvil mientras que la presión máxima puede ser ocasionada por una obstrucción en el sistema.
- **Inyector de muestra:** Se encuentra entre la salida de la bomba y la columna permitiendo introducir la muestra al sistema en un volumen constante, siendo los más comunes los de 10 o 20 μL .
- **Columna:** Retiene los analitos dependiendo de la estructura química de ellos. Existen columnas de longitud de 150 y 250 mm siendo las últimas las más utilizadas. El diámetro interno va de 4 a 10 mm y los tamaños de partículas de los rellenos más comunes son 3, 5, y 10 μm .
- **Detector:** Transductor que tiene como función el registro del paso de componentes de una muestra en el orden que eluyen.
- **Computadora:** Sistema de almacenamiento de datos.

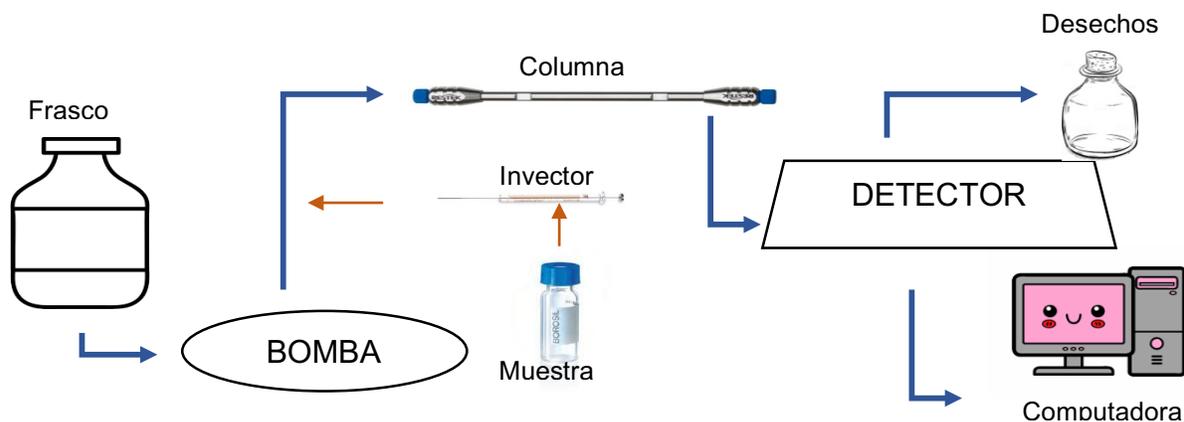


Figura 6. Componentes de un cromatógrafo de líquidos (Modificado de Cárdenas A. *et. al.* 2015)

La cromatografía de líquidos de alta resolución ha llegado a ser una de las técnicas analíticas más importantes para el análisis químico debido a su utilidad para la identificación, cuantificación y separación de componentes de una mezcla (Anaya, L. *et. al.* 2001). Sin embargo, en el 2004 la cromatografía de líquidos revolucionó con la innovación de la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC, por sus siglas en inglés).

2.4.2. Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución (UPLC)

El UPLC surge por la necesidad de hacer más eficiente el proceso de análisis a través de analizar mayor cantidad de muestras en menor tiempo, empleando menor cantidad de muestra y alcanzando mayor sensibilidad, especificidad y eficiencia. Esto originó diseñar una nueva tecnología en el que se utiliza tamaño de partícula inferior a $2\ \mu\text{m}$ en las columnas cromatográficas dando como resultado la existencia de una mayor resistencia al flujo de la fase móvil y por consiguiente alcanzando mayor presión. Sin embargo este efecto origina picos más eficientes (Waters, 2017).

A continuación se muestra una tabla comparativa de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC) (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación entre HPLC y UPLC (Waters, 2017)

Tipo de Cromatografía Parámetro	Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (UPLC)
Presión máxima (psi)	6500	15000
Cantidad de muestra	20 μ L	5 μ L
Longitud de columna	150 y 250 mm	50 mm
Tamaño de partícula	Mayor a 4 μ m	Menor a 2 μ m
Tiempo de análisis	Mayor a 5 minutos	Menor a 5 minutos
Flujo (mL/min)	Mayor a 3.0	Menor a 1.0
Sensibilidad	0.2 μ g/mL	0.54 μ g/mL

2.4.3. Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS)

El acoplamiento de la espectrometría de masas a la cromatografía de líquidos permite detectar bajas concentraciones de analito, además de que suministra información tanto cualitativa como cuantitativa sobre los compuestos que eluyen en una columna cromatográfica y la ventaja más importante de este detector es que puede distinguir diferentes sustancias que tienen el mismo tiempo de retención ya que cada señal es posible detectarla de forma separada a su correspondiente ión molecular (peso molecular) evitando así coeluciones (Gómez C. *et. al.* 2010).

El fundamento de ésta técnica analítica se basa en la formación de iones a partir de moléculas neutras. Los componentes básicos de un espectrómetro de masas en tándem se pueden observar en la figura 7.



Figura 7. Componentes básicos de un espectrómetro de masas en tándem

- **Sistema de introducción de la muestra:** En los equipos UPLC-MS/MS la introducción de la muestra se lleva a cabo del equipo de UPLC que generalmente posee un automuestreador que inyecta la muestra a la columna, que a su vez está conectada a la fuente de ionización.
- **Sistema de producción de iones:** Ya que las moléculas entran a la fuente, estos sufren procesos que son destinados a producir los iones que serán posteriormente analizados. Existe distintas formas para ionizar las muestras como lo son la ionización por impacto electrónico, ionización química, ionización sobre una superficie a elevada temperatura, ionización por bombardeo con iones de elementos ligeros (FAB por sus siglas en inglés), ionización por láser asistida en matriz (MALDI, por sus siglas en inglés) e ionización por electrospray (ESI, por sus siglas en inglés). La forma de ionización mediante espectrometría de masas en tándem se pueden observar en la figura 8.

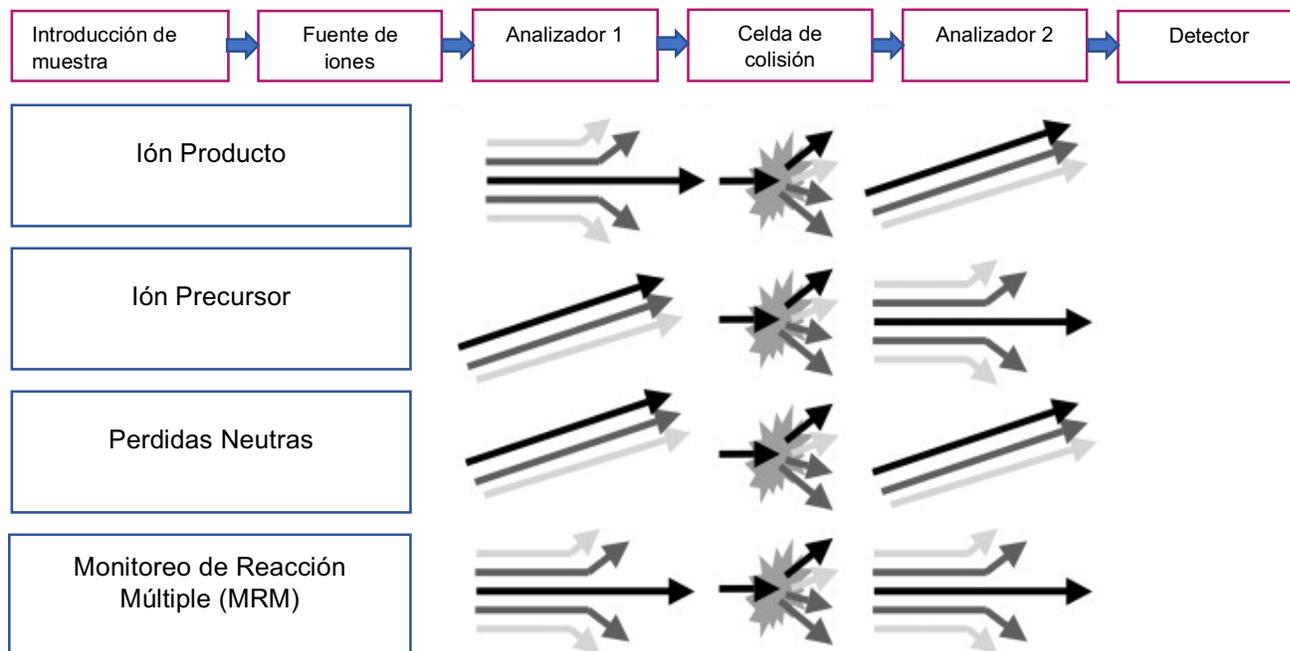


Figura 8. Ionización por espectrometría de masas en tándem (modificado de Fernández C. *et. al.* 2009)

Los analizadores de masas trabajan de dos formas:

- 1) Modo SIM. Las condiciones de detección son fijas de manera que sólo pase un ión con una determinada m/z .
- 2) Modo SCAN. La detección se realiza a través de un barrido entre masas de determinado intervalo de m/z .

En la figura 8 se observa que existen 4 formas diferentes de analizar las masas en un espectrómetro de masas.

- **Ión producto.** El Analizador 1 esta en modo SIM mientras que el Analizador 2 se encuentra en modo SCAN. De está forma solo se ve un barrido de diferentes fragmentos provenientes de un ión precursor.
- **Ión precursor.** El Analizador 1 se encuentra en modo SCAN y el Analizador se encuentra en modo SIM. Se realiza un barrido en un intervalo de m/z y posterior a la celda de colisión se fijan condiciones de manera tal que solo un ión sea analizado.

- **Perdidas Neutras.** Los dos Analizadores trabajan en modo SCAN. De tal forma se detectan todos los compuestos de la fragmentación obtenida en la celda de colisión menos aquellas moléculas neutras, las cuales se quedan en la celda de colisión y no pasan al Analizador 2.
- **Monitoreo de Reacción Múltiple.** Ambos analizadores se encuentran en modo SIM. Esta forma es específica debido a que se fijan las condiciones específicas para que sólo un ión salga del Analizador 1 y a su vez del Analizador 2.

En la ionización por ESI, la transferencia de especies iónicas desde una solución proveniente del sistema cromatográfico a la fase gaseosa implica tres etapas (Gómez C. *et. al.* 2010) que se pueden observar en la figura 9.

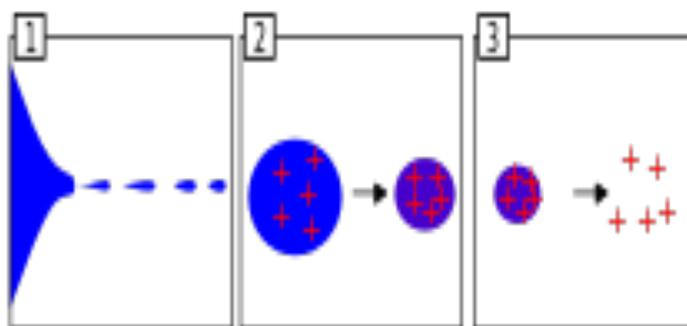


Figura 9. Ionización por Electropray (modificado de García F. 2014)

En donde:

- 1) Dispersión de un spray fino de gotas cargadas.
- 2) Evaporación del solvente.
- 3) Liberación de los iones de las gotas altamente cargadas.

- **Sistema de separación de los iones formados.**

Cuando se tiene la mezcla de diversos iones se deben separar para poder detectarlos de forma individual. Los analizadores más utilizados son el campo magnético, los cuadrupolos, y el analizador de trampa de iones.

El analizador por cuadrupolos está formado por cuatro barras metálicas cilíndricas alineadas paralelamente como se muestra en la figura 10.

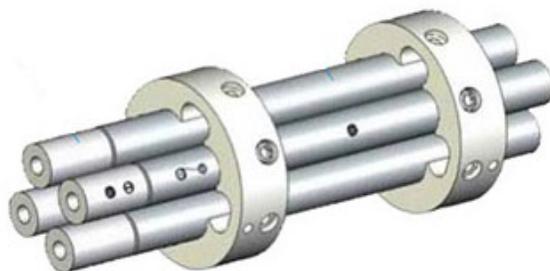


Figura 10. Cuadrupolo (GAELTDA, 2014)

El fundamento de éste es que a dichas barras se le aplica un potencial constante y uno alterno de radiofrecuencia superpuesto, originando que los iones pasen por un “filtro de masas”. Al modificar el potencial de la radiofrecuencia se origina un par de voltajes distintos dónde solo aquellos iones con un valor de m/z específico evitarán colisionar con las barras. Por consiguiente, solo iones específicos procedentes de la fuente de iones pasarán dicho filtro a través del cuadrupolo hasta alcanzar el detector y los demás iones chocarán con las superficies de él.

Los espectrómetros de masas de triple cuadrupolo actúan de la misma forma, sin embargo dan mayor especificidad debido a que su primer cuadrupolo focaliza al ión precursor con un valor de m/z específico, el segundo cuadrupolo colisiona dicho ión provocando que este se fragmente y el tercer cuadrupolo focaliza los iones provenientes de la fragmentación del ión precursor como se observa en la figura 11.

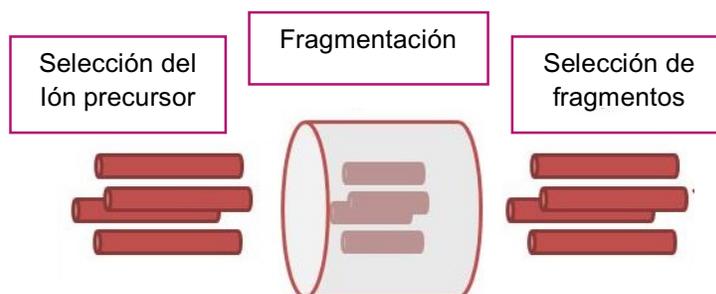


Figura 11. Triple cuadrupolo (Modificado de Artabe A. 2016)

- **Sistema de detección y amplificación de los iones producidos.**

Posterior a la separación de los iones, estos son caracterizados originando una señal eléctrica proporcional a la intensidad de iones en la muestra. Dicha señal es amplificada y detectada por un fotomultiplicador (Martínez, M. 2016).

El fotomultiplicador utiliza la energía de los iones que inciden sobre un dinodo, al chocar los iones con él se emite una gran cantidad de electrones de elevada energía. Estos son acelerados hacia un segundo dinodo y así sucesivamente obteniéndose al final del sistema una amplificación de señal de orden de 10^6 a 10^8 .

- **Sistema de tratamiento de los datos.**

Los datos son recolectados a través de una computadora, la cual emite un espectro de masas. El espectro de masas es una representación en la que en las abscisas se presenta la relación de carga (m/z) de los fragmentos de los iones producidos y en las ordenadas la abundancia relativa (Gómez C. *et. al.* 2010). En dicho espectro se puede observar una señal principal conocida como la señal del ión precursor y/o ión molecular, el cual es unidades arriba o abajo del peso molecular (esto dependerá del tipo de ionización que sea, positiva o negativa). Las demás señales del espectro de masas representan los fragmentos originados por el ión precursor.

Como ya se mencionó anteriormente la técnica de UPLC-MS/MS origina mayor selectividad, sensibilidad y especificidad. Sin embargo, en todos los equipos con un sistema de cromatografía de líquidos es importante la preparación de la muestra. Para ello, es crucial la extracción de los analitos a cuantificar de manera tal que los componentes de la matriz en donde se encuentren dichos analitos no interfieran en su detección y cuantificación. Actualmente, existen distintas técnicas físicas y químicas para el procesamiento de la muestra. Sin embargo, en este trabajo es de principal interés la extracción de los analitos de una matriz altamente compleja como lo es la leche materna.

2.5. Procesamiento de la leche materna para la cuantificación de fármacos antirretrovirales en leche materna

El pretratamiento de las muestras de leche materna implica una serie de experimentos combinados que ayudan a la extracción de uno o varios analitos de interés, en el caso particular del presente trabajo, dicho pretratamiento debe ser capaz de extraer cuatro antirretrovirales y su estándar interno. En este sentido, es necesario conocer la composición de la leche materna para diseñar un método de pretratamiento que permita eliminar las posibles interferencias, garantizar la integridad de los analitos, además de asegurar el adecuado funcionamiento del equipo de UPLC, la columna y el espectrómetro de masas, ya que la presencia de contaminantes, partículas, grasa y proteínas de la leche pueden ser atrapadas en el cabezal de la columna, lo cual origina un efecto en la presión del sistema cromatográfico y con el paso del tiempo se eluyen lentamente provocando arrastre (Waters, 2017).

2.5.1. Composición de la leche materna

La leche materna ayuda a los requerimientos nutricionales e inmunológicos del lactante a medida que crece y se desarrolla. Sin embargo, la composición de ésta varía con respecto a la etapa en la que se produce. La clasificación de leche materna por medio de su composición y del tiempo en el que ésta se produce se divide en tres etapas: 1) Calostro, 2) Transición y 3) Madura

2.5.1.1. Calostro

La leche materna conocida como “calostro” se produce durante los primeros 4 días después del parto. Este tipo de leche tiene la característica de ser un líquido de color amarillo y espeso. El calostro cuenta con: 2 g/100 mL de grasa, 4 g/100mL de lactosa, 2 g/100 mL de proteína (principalmente caseína), 20 g/L de oligosacáridos, $100\ 000\ \text{mm}^3$ de linfocitos y macrófagos y entre 2 a 3 g de Inmunoglobulina A (IgA) y lactoferrina, las cuales son proteínas protectoras que

cubren el revestimiento interior inmaduro del tracto digestivo, previniendo la adherencia de bacterias, virus, parásitos y otros patógenos que pueda adquirir el recién nacido (UNICEF, 1995).

2.5.1.2. Transición

La leche de transición se produce entre el 4 ° y 15 ° día después del parto. Este tipo de leche presenta color blanco, es menos espeso y la cantidad de IgA y lactoferrina disminuye con respecto al calostro. Sin embargo, se elevan las concentraciones de lactosa, grasas y vitaminas hidrosolubles.

2.5.1.3. Madura

La leche madura se produce a partir del día 15 después del parto y presenta un color blanco. Los principales componentes de la leche madura es un 88 % de agua, 0.9 g/100 mL de proteína, de las cuales el 30 % corresponde a caseína cuya composición es por micelas de caseinato y fosfato de calcio, el 70 % corresponde a proteínas de suero, las cuales son alfa-lactoalbúmina, seroalbúmina, beta-lactoglobulinas, inmunoglobulinas, glicoproteínas, lactoferina, lisozimas, enzimas, moduladores de crecimiento, hormonas y prostaglandinas (UNICEF, 1995).

2.5.2. Extracción de grasas de la leche materna

Los solventes comúnmente utilizados para la extracción de grasas en la leche materna son metanol y hexano; esto es debido a la solubilidad que presentan los lípidos con estos.

2.5.3. Precipitación de proteínas de la leche materna

La adición de un solvente orgánico como el metanol y el hexano a una solución acuosa de proteínas, produce agregados de moléculas proteicas que tienden a

precipitar, debido a que el disolvente presenta una constante dieléctrica menor que la del agua, produciendo un incremento en las fuerzas de atracción entre cargas opuestas y una disminución en el grado de ionización de los radicales de la proteína, provocando así que la solubilidad de ésta disminuya. Sin embargo, otro factor que modifica dicha solubilidad es la modificación del pH. El fundamento de ello se debe a que cuando el pH y el punto isoeléctrico son iguales la proteína precipita ya que la carga neta de la misma es cero.

La limpieza de una muestra previo a su análisis mediante cromatografía de líquidos es fundamental para una buena determinación, Además de la precipitación de proteínas se emplean diferentes técnicas como la extracción líquido-líquido y/o la extracción en fase sólida. El método de limpieza que se maneje dependerá de los analitos que se deseen extraer y la matriz en la que se encuentren. Paralelamente, es necesario validar el método con la finalidad de proporcionar confiabilidad del método, de los resultados y su reproducibilidad.

2.6. Validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico es la evidencia documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado (NOM-177-SSA1-1998). La metodología y el objetivo de los procedimientos analíticos deben estar claramente definidos antes de iniciar los estudios de validación debido a que cada método tiene un uso específico. Para ello es necesario definir que guía y/o norma se tomará como referencia para la validación del método analítico.

2.6.1. Guías y normas para la validación de métodos analíticos

Existen varias guías y normas para la validación de métodos analíticos como lo son la de la Administración de Fármacos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés), la Conferencia Internacional para la Armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano (ICH, por sus siglas

en inglés), la Agencia Europea de Medicamentos (EMA, por sus siglas en inglés), la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, entre otras.

A continuación se muestra los criterios de aceptación que abarcan cada una de ellas (Tabla 4).

Tabla 4. Criterios de aceptación de la NOM-177-SSA1-2013, FDA, ICH y EMA

Criterios	NOM-177-SSA1-2013	FDA (Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation)	ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use)	EMA (European Medicines Agency)
Selectividad / Especificidad	✓	✓	x	✓
Efecto matriz	✓	x	x	✓
Límite de cuantificación inferior	✓	✓	✓	✓
Curva de calibración	✓	✓	✓	✓
Linealidad	✓	✓	✓	✓
Precisión: repetibilidad, reproducibilidad	✓	✓	✓ (precisión intermedia)	✓ (precisión intermedia)
Exactitud	✓	✓	✓	✓
Estabilidad de muestra	✓	✓	x	x
Recobro	x	✓	x	x
Robustez	x	x	✓	✓
Sensibilidad	x	✓	x	x

Como se puede observar en la tabla 4, los criterios de aceptación son parecidos en la mayoría de las guías. Sin embargo, la única que considera el efecto matriz es la NOM-177-SSA1-2013. Dicho parámetro es de importancia debido a la complejidad y cantidad de componentes endógenos de la leche materna, lo cual

puede dar supresión o incremento de la señal analítica, por tal motivo es la que se tomará a consideración para la validación de este trabajo.

2.6.1.1. NOM-177-SSA1-2013

La NOM-177-SSA1-2013 establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Sin embargo, en el apartado 9 se describen los criterios para el análisis de muestras biológicas de un estudio de biodisponibilidad o bioequivalencia, lo que conlleva la validación de métodos analíticos para el análisis de este tipo de muestras. Aunque no deseamos en este trabajo evaluar la intercambiabilidad o bioequivalencia de los analitos (fármacos) en estudio, esta guía de validación está aplicada a la cuantificación de fármacos en matriz de muestras biológicas, por lo que evalúa parámetros específicos para este tipo de matrices complejas. Los criterios de validación se describen a continuación:

- **Selectividad:** Es la demostración de la no interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica (NOM-177-SSA1-2013).
- **Efecto matriz:** Es el efecto combinado de todos los componentes de la muestra distintos del analito en la cuantificación de él (IUPAC, 1989).
- **Efecto acarreo:** Es el efecto generado por la aparición o aumento de la señal del analito o estándar interno causado por la contaminación de muestras anteriores (NOM-177-SSA1-2013).
- **Límite inferior de cuantificación:** Es la concentración más baja del analito que puede medirse cumpliendo con la precisión y exactitud, determinada en función de las necesidades de cuantificación del estudio (NOM-177-SSA1-2013).
- **Linealidad:** Es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener una respuesta proporcional a la concentración del compuesto en la muestra (NOM-177-SSA1-2013).

- **Precisión:** Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea; se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio (NOM-177-SSA1-2013).
 - ✚ **Repetibilidad:** Es la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo.
 - ✚ **Reproducibilidad intralaboratorio:** Es la precisión bajo las variaciones que comúnmente pueden ocurrir dentro del laboratorio: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos.
- **Exactitud:** Es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia (NOM-177-SSA1-2013).
- **Estabilidad:** Es la capacidad de un fármaco, biofármaco o un medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil (NOM-177-SSA1-2013).
- **Recobro:** Es la eficiencia del método de extracción de un proceso analítico. Es determinado bajo un valor de porcentaje obtenido de la respuesta del analito a través del método de procesamiento de la muestra con respecto a la respuesta del analito en solución. (FDA, 2018)

3. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, la lactancia materna ésta en madres portadoras de VIH está contraindicada en México sustituyéndola por alimentación de fórmula. Sin embargo, reportes realizados en población africana portadoras de VIH muestran que la alimentación de fórmula lleva consigo mayor índice de morbilidad y mortalidad infantil, además de que el porcentaje de transmisión vertical del virus está relacionado con el régimen antirretroviral utilizado. A pesar de que las poblaciones son diferentes, existe la controversia entre los beneficios y riesgos sobre el tipo de alimentación que reciben los niños de madres portadoras de VIH

Aunado a lo anterior, a nivel nacional y dentro del Instituto Nacional de Perinatología (INPer), se toman como referencia guías mexicanas acerca del régimen antirretroviral a utilizar en mujeres portadoras de VIH en etapa de gestación, entre las cuales, el Centro Nacional para la Prevención y Control del VIH/sida (CENSIDA) en el 2015 y el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en el 2016, recomiendan que el esquema preferente sea la coadministración de zidovudina/lamivudina y ritonavir/lopinavir. Sin embargo, sugieren que la selección de un esquema antirretroviral durante la gestación, debe de ser realizada de manera individualizada de acuerdo a la historia clínica específica de la embarazada, la historia de esquemas antirretrovirales utilizados, estudios de resistencia y la presencia de comorbilidades.

Por consiguiente, resulta de interés la cuantificación de los antirretrovirales en leche materna de manera tal que se pueda determinar las concentraciones que son excretadas a través de ésta matriz biológica. Para ello, es necesario el desarrollo de un método analítico por UPLC-MS/MS, con el que se pueda cuantificar de forma simultánea y con alta sensibilidad los fármacos de la TARAA en leche materna.

No obstante, dicho método analítico fue reportado por Sánchez E., 2016,. Sin embargo dicho método necesita de una optimización, ya que presentó problemas de efecto matriz y la necesidad de la evaluación de parámetros como son la exactitud y precisión para muestras control diluidas. Además, se realizó una

cuantificación pre-eliminar con muestras de pacientes portadoras de VIH del INPer, donde las concentraciones para LPV y RTV resultaron por arriba del límite superior de cuantificación e incluso por arriba de las concentraciones máximas reportadas en la literatura. Por consiguiente, las concentraciones de dichos antirretrovirales no son confiables y es necesario modificar los intervalos de validez para la curva de calibración para LPV y RTV.

4. ANTECEDENTES

En el 2007 en la Universidad de Tanta, Egipto, se desarrolló un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución con detección UV de LMV, d4T, ZDV y NVP, en cuyo procedimiento de limpieza de la muestra, se eliminaron las proteínas y la grasa de la leche materna, a partir de un volumen de muestra de 200 mL de leche materna. El método anterior se validó para la detección simultánea de los cuatro antirretrovirales en el rango de 20 a 20 000 ng/mL (Rezk, *et.al.*, 2007).

Posteriormente, en la misma universidad, se desarrolló un nuevo método de extracción y cuantificación para LMV, d4T, ZDV, NVP en conjunto con nelfinavir, RTV y LPV para ser cuantificados en un intervalo de 10-10 000 ng/mL empleando cromatografía líquida de alta resolución pero esta vez acoplada a espectrometría de masas en tándem (Rezk, *et.al.*, 2008).

Un año más tarde, en Boston se reportó un estudio en el cual se plantea que el efecto de exposición del lactante con la leche materna de madre portadora del VIH, debe ser bien estudiado para evaluar los beneficios y riesgos del uso de antirretrovirales maternos durante la lactancia. En un sub-estudio farmacocinético se obtuvo plasma y leche materna así como gotas de sangre de lactantes tomadas en el día del parto, a las 2, 6, 14 y 24 semanas. Se evaluaron las concentraciones de ZDV, LMV y NVP en lactantes como resultado de la transferencia a través de la leche materna (Mirochnick, *et.al.*, 2009).

En el 2015 en la ciudad de Liverpool, Inglaterra se realizaron dos estudios para la cuantificación de NVP y EFV respectivamente mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Dichas cuantificaciones se llevaron a través de un método validado para investigar la farmacocinética en plasma y en la leche materna de NVP y EFV durante un intervalo de dosificación completo en madres lactantes VIH positivas y sus lactantes amamantados (Olagunju, *et.al.*, 2015).

Finalmente en el 2016 se publicó en la Universidad Nacional Autónoma de México un trabajo de tesis, donde se reporta el desarrollo y validación de un método

analítico por UPLC-MS/MS para la cuantificación de ZDV, LMV, RTV y LPV en leche materna, sin embargo, el procedimiento de extracción de la muestra tuvo algunos inconvenientes mostrando efecto matriz para uno de los fármacos, además de mostrar limitaciones para aplicar una dilución en aquellas muestras cuyas concentraciones cayeran por arriba del límite superior de cuantificación (Sánchez E., 2016). No obstante éste trabajo se toma como principal antecedente para realizar el presente trabajo.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Optimizar y validar un método analítico para la determinación simultánea de lamivudina, zidovudina, lopinavir y ritonavir en leche materna, mediante la técnica de cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS), a fin de monitorear los antirretrovirales en leche materna de mujeres portadoras del VIH bajo tratamiento.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar el método de extracción previamente reportado por Sánchez, E. para la determinación de LMV, ZDV, LPV y RTV a partir de leche materna de mujeres portadoras del VIH.
- Validar el método analítico optimizado cumpliendo criterios nacionales e internacionales, como lo es selectividad, efecto matriz, efecto acarreo, límite inferior de la curva de calibración, linealidad, precisión, exactitud, estabilidad y recobro.
- Cuantificar la concentración de antirretrovirales en muestras de calostro de mujeres portadoras del VIH.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1. Materiales, equipos, reactivos y estándares de referencia

6.1.1. Material

- Columna cromatográfica ACQUITY UPLC® BEH C18 (2.1 μm x 50 mm, 1.7 μm)
- Espátulas
- Gradilla para tubos de ensayo
- Guantes chicos de nitrilo
- Matraz volumétrico clase A de 5 mL y 10 mL
- Membrana de filtración de nitrocelulosa poro de 0.45 μm Merck Millipore®
- Micropipeta de 10 μL , 100 μL , 200 μL y 1 000 μL Eppendorf®
- Piseta
- Probeta de 50 mL y 100 mL
- Sistema de filtración para fase móvil
- Tubos de ensayo de 10 mL
- Microtubos tipo eppendorf de 2 mL
- Vasos de precipitado de 10 mL y 100 mL

6.1.1.1. Material biológico

- Leche materna de tipo calostro obtenida del banco de leche del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”.
- Leche materna de tipo transición obtenida del banco de leche del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”.
- Leche materna de tipo madura obtenida del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”.

6.1.2. Equipos e instrumentos

- Sistema de cromatografía de ultra alta eficiencia ACQUITY UPLC acoplado a un espectrómetro de masas en tandem XEVO TQ ESI, Waters® ambos maniobrados con el software Masslynx versión 4.1.1, Waters® (Milford, Massachusetts, USA)
- Agitador vortex IKA®
- Balanza semi microanalítica Sartorius®
- Sistema de purificación de agua Synergy, Merck Millipore®
- Ultrasonicador, Cole-Parmer®

6.1.3. Reactivos

- Acetonitrilo (ACN) grado HPLC, J.T. Baker®
- Ácido fórmico (AF) grado espectrometría de masas, Fluka, Sigma Aldrich®
- Agua desionizada, 18.2 MΩ.cm MilliQ
- Isopropanol grado HPLC, J.T. Baker®
- Metanol (MeOH) grado HPLC, J.T. Baker®

6.1.4. Estándares de referencia

- Lamivudina (LMV) 200 mg, grado estándar primario, 99.7 % de pureza, USP
- Lopinavir (LPV) 350 mg, grado estándar primario, 99.8 % de pureza, USP
- Ritonavir (RTV) 200 mg, grado estándar primario, 99.2 % de pureza, USP
- Simvastatina (SMV) 200 mg, grado estándar primario, 99.5 % de pureza, USP
- Zidovudina (ZDV) 400 mg, grado estándar primario, 99.7 % de pureza, USP

6.2. Preparación de soluciones

Todas las soluciones posteriores a su preparación se mantuvieron en congelación a -11°C . Las soluciones para fase móvil se filtraron a través de membranas de $0.45\ \mu\text{m}$ y posteriormente se desgasificaron durante 15 minutos antes de colocarse en el sistema cromatográfico.

6.2.1. Ácido fórmico (AF) 0.1 % (v/v) en acetonitrilo (ACN)

Se midió con ayuda de una probeta 20 mL de acetonitrilo. Posteriormente se colocó en un frasco de vidrio de 20 mL y se adicionó 20 μL de ácido fórmico concentrado (figura 12).

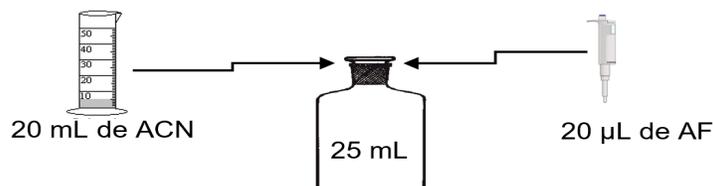


Figura 12. Preparación de AF 0.1 % (v/v) en ACN

6.2.2. Ácido fórmico (AF) 0.2 % (v/v) en acetonitrilo (ACN)

Se midió con ayuda de una probeta 20 mL de acetonitrilo. Posteriormente se colocó en un frasco de vidrio de 20 mL y se adicionó 40 μ L de ácido fórmico concentrado (figura 13).

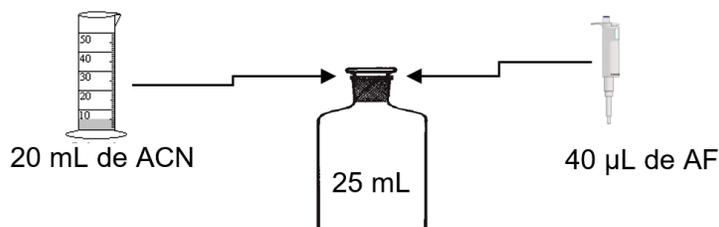


Figura 13. Preparación de AF 0.2 % (v/v) en ACN

6.2.3. Acetonitrilo (ACN)

Se midió 500 mL de ACN con ayuda de una probeta de 500 mL. Se colocó en un reservorio para HPLC.

6.2.4. Ácido fórmico (AF) 0.1 % (v/v)

Se midió 500 mL de agua con ayuda de una probeta de 500 mL. Se colocó en un reservorio para HPLC. Posteriormente se adicionaron 500 μ L de AF y se mezclaron hasta su homogeneidad.

6.2.5. Lavado débil

Se preparó 500 mL de una mezcla de ACN:H₂O (1:9). Posteriormente se adicionó 500 μ L de ácido fórmico.

6.2.6. Lavado fuerte

Se preparó 500 mL de una mezcla de Isopropanol:MeOH:ACN:H₂O (4:3:2:1). Posteriormente se adicionó 500 µL de ácido fórmico.

6.2.7. Lavado de sellos

Se preparó 500 mL de una mezcla de MeOH:H₂O (1:1).

6.2.8. Solución de referencia de LMV, ZDV, LPV y RTV

- *Lamivudina (LMV)*

Se pesó en una balanza analítica 1 mg de Lamivudina (LMV), se disolvió en 1 mL de MeOH:H₂O (1:1) y se colocó en un tubo de ensayo.

- *Zidovudina (ZDV)*

Se pesó en una balanza analítica 1 mg de Zidovudina (ZDV), se disolvió en 1 mL de MeOH:H₂O (1:1) y se colocó en un tubo de ensayo.

- *Lopinavir (LPV)*

Se pesó en una balanza analítica 1 mg de Lopinavir (LPV), se disolvió en 1 mL de ACN y se colocó en un tubo de ensayo.

- *Ritonavir (RTV)*

Se pesó en una balanza analítica 1 mg de Ritonavir (RTV), se disolvió en 1 mL de ACN y se colocó en un tubo de ensayo.

6.2.9. Soluciones de trabajo para los niveles de concentración de la curva de calibración

Se tomaron distintas alícuotas a partir de las soluciones de referencia para obtener una solución intermedia que contenía la mezcla de los cuatro antirretrovirales. Posteriormente se realizaron diluciones sucesivas en la preparación de los puntos de la curva de calibración que ajustó a la concentración deseada para cada antirretroviral. Todos los puntos de la curva de calibración se mezclaron en vortex

durante 30 segundos previo a tomar las alícuotas para las diluciones sucesivas (figura 14).

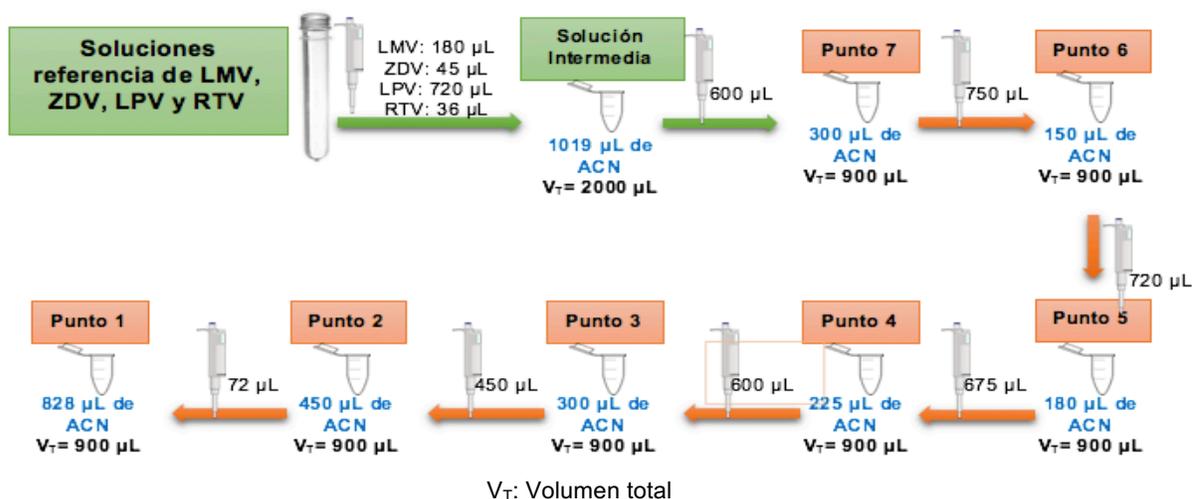


Figura 14. Preparación de niveles de concentración de la curva en solución

En la tabla 5, se muestran las concentraciones de cada uno de los niveles de la curva de calibración en solución y las concentraciones finales en leche materna.

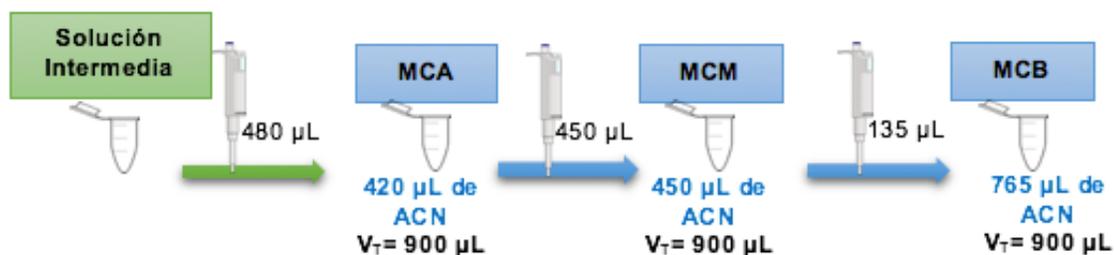
Tabla 5. Concentraciones de la curva de calibración en solución y las finales en leche materna

NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE LA CURVA [ng/mL]								
ARV	Punto Matriz	1	2	3	4	5	6	7
LMV	Solución	800	10 000	20 000	30 000	40 000	50 000	60 000
	Leche Materna	40	500	1 000	1 500	2 000	2 500	3 000
ZDV	Solución	200	2 500	5 000	7 500	10 000	12 500	15 000
	Leche Materna	10	125	250	375	500	625	750
LPV	Solución	3 200	71 500	80 000	120 000	160 000	200 000	240 000
	Leche Materna	160	2 000	4 000	6 000	8 000	10 000	12 000
RTV	Solución	160	2 000	4 000	6 000	8 000	10 000	12 000
	Leche Materna	8	100	200	300	400	500	600

6.2.10. Soluciones de trabajo de las muestras control de la curva de calibración

Se plantearon 4 muestras control: Muestra control baja (MCB), muestra control media (MCM), muestra control alta (MCA) y muestra control diluida (MCD).

Para la MCB, MCM y MCA se tomaron las respectivas alícuotas para realizar diluciones sucesivas. Dichas alícuotas partieron de la solución intermedia reportada en el diagrama 5. Los puntos control de la curva de calibración se mezclaron en vortex durante 30 segundos, Figura 15.



MCA: Muestra control alta; MCM: Muestra control media; MCB: Muestra control baja

Figura 15. Preparación de la MCA, MCM y MCB

La Muestra Control Diluida (MCD) es equivalente a la solución intermedia, la cuál tiene una concentración del 50 % por arriba del límite superior de la curva de calibración para todos los antirretrovirales.

En la tabla 6, se muestran las concentraciones de las respectivas muestras control para cada antirretroviral. Asimismo en la parte superior se reporta el porcentaje (%) al que corresponde cada muestra control con respecto al límite superior de la curva de calibración.

Tabla 6. Concentraciones de la MCA, MCM, MCB y MCD en solución y las finales en leche materna

PUNTOS CONTROL [ng/mL]					
ARV	Punto Matriz	MCB 6 %	MCM 40 %	MCA 80 %	MCD 150 %
LMV	Solución	3 600	24 000	48 000	90 000
	Leche Materna	180	1 200	2 400	1 125
ZDV	Solución	12 000	6 000	900	22 500
	Leche Materna	600	300	45	281.25
LPV	Solución	192 000	96 000	14 400	360 000
	Leche Materna	9 600	4 800	720	4 500
RTV	Solución	9 600	4 800	720	18 000
	Leche Materna	480	240	30	225

Cabe hacer notar hasta aquí, que las concentraciones reportadas para las soluciones de trabajo están 20 veces más concentradas con respecto a las concentraciones finales en las muestras de la leche materna.

6.2.11. Solución de estándar interno (E.I.)

Se pesó cuantitativamente 1 mg de Simvastatina (SMV), se disolvió en 1 mL de MeOH:H₂O (9:1) y se colocó en un tubo de ensayo (Solución 1). Posteriormente se tomó 20 µL de la solución 1 y se aforó a 1 mL (Solución 2). Finalmente se tomó una alícuota de 500 µL de la solución 2 y se aforó a 1 mL (Solución 3), (Figura 16) quedando a una concentración final de 10 µg/mL SMV.



Figura 16. Preparación de la solución de E.I.

La solución 1 se mantuvo en congelación a -11 °C, mientras que las soluciones 2 y 3 se prepararon por cada día de experimentación.

6.3. Método analítico para la cuantificación de LMV, ZDV, LPV y RTV en leche materna mediante UPLC-MS/MS

El método analítico que se tomó como referencia para la cuantificación de los fármacos de la TARAA para pacientes embarazadas portadoras del VIH fue el reportado por Sánchez E., 2016. El método propuesto por él se dividió en tres etapas: 1) desarrollo del método de detección, 2) desarrollo del método

cromatográfico mediante UPLC y 3) desarrollo del método de extracción de antirretrovirales a partir de leche materna. En cada una de las etapas del método analítico se evaluaron los posibles puntos de oportunidad y se realizaron modificaciones con el fin de incrementar y mejorar la señal de los analitos, ya que el método reportado no poseía la sensibilidad suficiente y no estaba validado en su totalidad. Asimismo cada modificación realizada se comparó con el método reportado, esto con la finalidad de determinar si dicha modificación resultó funcional.

6.3.1. Método de detección por espectrometría de masas en tándem

Para la determinación de los nuevos parámetros se infundió directamente al detector de espectrometría de masas 500 ng/mL de cada uno de los antirretrovirales en solución a un flujo de 0.5 mL/min. Se evaluó el modo de ionización, la forma gaussiana de los espectros de masas, las condiciones dependientes de la fuente como lo son la temperatura de desolvatación, el flujo del gas de desolvatación, el voltaje del capilar y el flujo de gas de colisión. Además, se comparó y se evaluó el conteo total de iones (TIC, por sus siglas en inglés) y el área de todos los picos cromatográfico con los determinados anteriormente. Para eso, se realizó por triplicado inyecciones del blanco y de una mezcla de los cuatro antirretrovirales con el estándar interno a una concentración de 100 ng/mL para cada uno.

6.3.2. Método cromatográfico mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución

El método cromatográfico reportado por Sánchez E., 2016, no presentó problemas, sin embargo, se evaluó la modificación de los tiempos en que hace el cambio de proporciones en el gradiente. Esto para minimizar el tiempo y/o disminuir la velocidad de flujo y obtener así menores tiempos de corrida y menor cantidad de solventes.

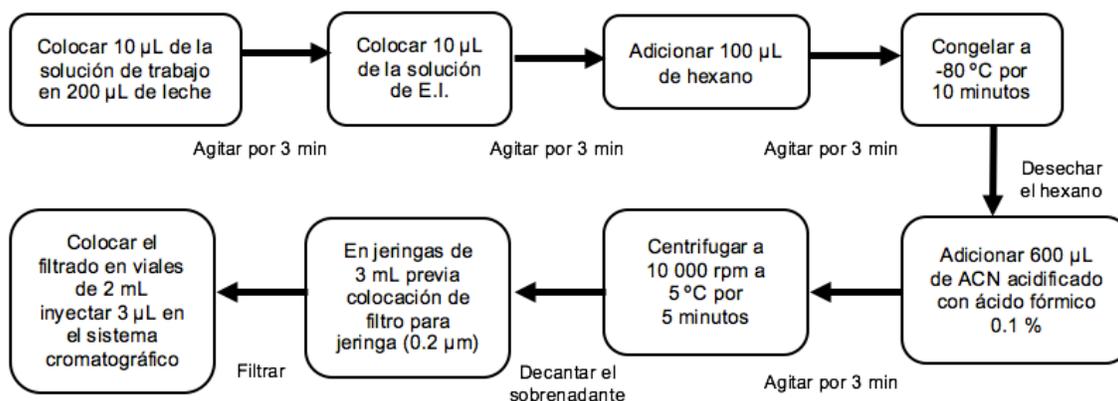
En la tabla 7, se esquematiza el gradiente propuesto por Sánchez E., 2016. Las modificaciones que se hicieron al método fue el porcentaje de las proporciones de acetonitrilo (ACN) y de ácido fórmico (AF) 0.1 %, así como el tiempo de corrida.

Tabla 7. Gradiente propuesto por Sánchez E., 2016

Columna	Gradiente			
	Tiempo	% A (AF 0.1 %)	% B (ACN)	Curva
C18	0	90	10	Inicial
	0.15	90	10	2
	0.7	47	53	6
	2.5	20	80	11

6.3.3. Método de extracción de LMV, ZDV, LPV y RTV en leche materna

Las modificaciones que se hicieron al método de extracción reportado por Sánchez E., 2016, se basaron en la identificación de puntos específicos que pudieron ayudar a la mejora de éste. El diagrama reportado se muestra a continuación (figura 17).



E.I: Estándar Interno; Solución de trabajo: Soluciones de LMV, ZDV, LPV y RTV a diferentes concentraciones dependientes del punto de la curva de calibración y/o controles

Figura 17. Método de extracción propuesto para la extracción de antirretrovirales en leche materna por Sánchez E., 2016

Con base a dicho método de extracción de antirretrovirales se propusieron cuatro modificaciones:

1. Incrementar la cantidad de hexano utilizado en el pre-tratamiento de las muestras de leche materna para favorecer la extracción líquido-líquido de lípidos.
2. Comparar la utilización de hexano y mezcla de hexanos y hexenos utilizado en el pre-tratamiento de las muestras de leche materna para la extracción líquido-líquido de lípidos.
3. Modificar la concentración de ácido fórmico (AF) en el agente precipitante de proteínas de 0.1 % a 0.2 %.
4. Evaluar el volumen de muestra de leche materna mínima a utilizar para la cuantificación de antirretrovirales.

6.3.3.1. Volumen de hexano para la extracción líquido-líquido de lípidos.

Se evaluó por triplicado una serie, las cuales incluían triplicados de blanco, LIC y LSC, para la extracción líquido-líquido de lípidos con 100 μL de hexano y otra serie con 200 μL de hexano. A continuación se muestra el método de extracción de antirretrovirales con la modificación propuesta (figura 18).

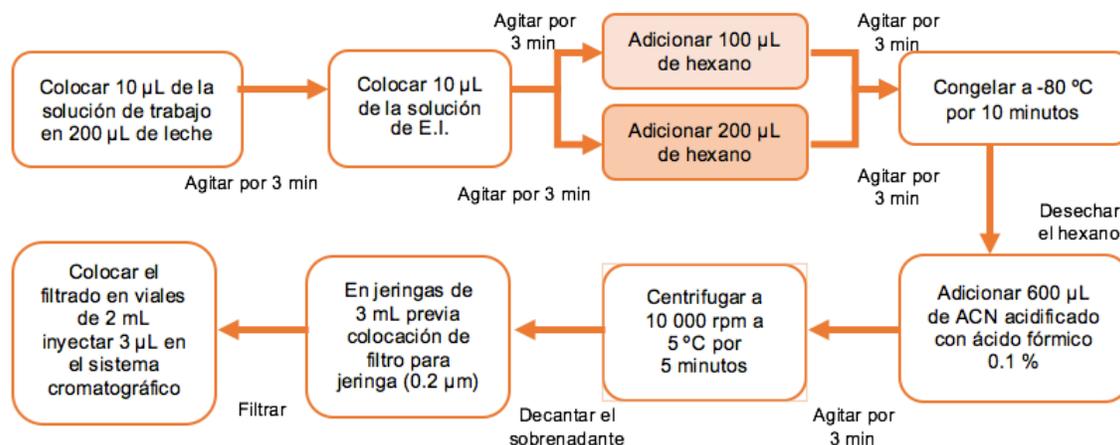


Figura 18. Modificación en el volumen de hexano para la extracción líquido-líquido de lípidos

6.3.3.2. Uso de hexano y mezcla de ciclohexano con n-hexano para la extracción líquido-líquido de lípidos

Del mismo modo, se evaluó por triplicado una serie, la cuál incluía triplicados de blanco, LIC y LSC, para la evaluación de uso de hexano y una serie para una mezcla de ciclohexano y n-hexano,. Esto con la finalidad de determinar que

solvente orgánico resultó más adecuado para la remoción de los lípidos. A continuación se muestra el método de extracción de antirretrovirales con la modificación propuesta (figura 19).

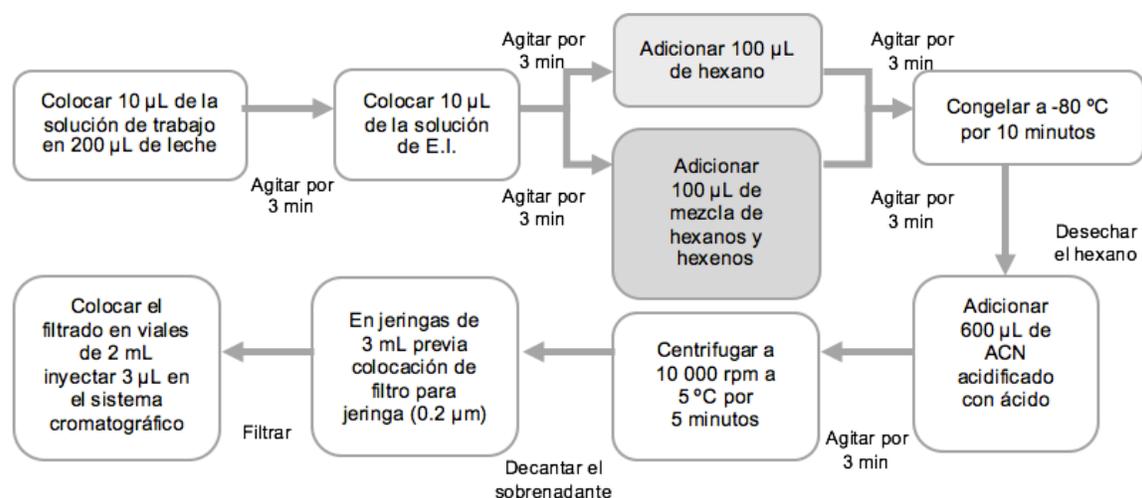


Figura 19. Extracción líquido-líquido de lípidos con hexano y con mezcla de hexano y n-hexeno

6.3.3.3. Concentración de AF para la precipitación de proteínas

Se evaluó una serie por triplicado para el uso de ácido fórmico 0.1 % y ácido fórmico 0.2 % para la precipitación de proteínas. A continuación se muestra el método de extracción de antirretrovirales con la modificación propuesta (figura 20).

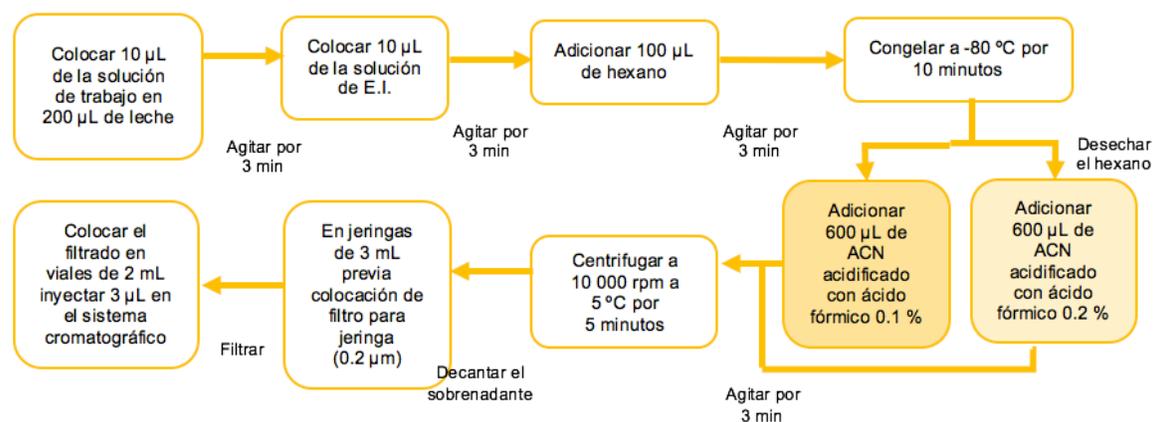


Figura 20. Modificación en la concentración de ácido fórmico para la precipitación de proteínas

6.3.3.4. Evaluación del volumen de muestra mínima para la cuantificación de antirretrovirales en leche materna

Finalmente se evaluó por triplicado una serie para el uso de 100 μL y 200 μL de leche materna. A continuación se muestra el método de extracción de antirretrovirales con la modificación propuesta (figura 21).

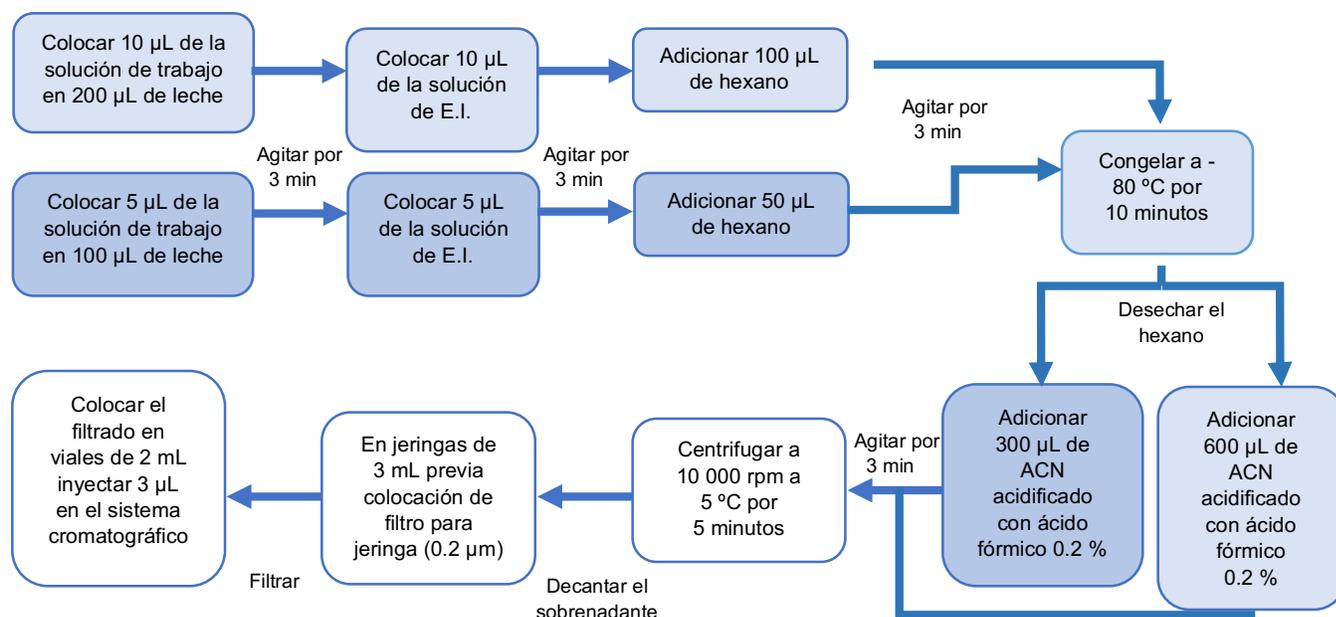


Figura 21. Modificación en el volumen de leche materna para la extracción de antirretrovirales

6.4 Validación del método analítico

Una vez elegida cada condición en la que se observó mejor eficiencia de las señales cromatográficas, el método optimizado se sometió a los criterios de validación de la NOM-177-SSA1-2013 con la finalidad de crear un método analítico que sea capaz de cuantificar de forma confiable los fármacos de la TARAA prescrita para mujeres embarazadas portadoras del VIH en el INPer.

6.4.1. Adecuabilidad del sistema

La adecuabilidad del sistema evalúa la confiabilidad del mismo. Para dicha prueba se analizó un blanco de solución, seguida de 7 inyecciones de la MCB procesada. Se calculó el % C.V. de la respuesta obtenida (área analito/ área EI) para cada antirretroviral de la TARAA.

A pesar de que la NOM-177-SSA1-2013 no indica un criterio de aceptación para dicho parámetro, se consideró que el % C.V. de la respuesta obtenida debe de ser igual o menor al 6 %.

6.4.2. Selectividad

Se analizaron 6 muestras de leche libres de fármacos, las cuales sirvieron como blancos. Además se evaluó un blanco de leche de calostro, uno de leche de transición y uno de leche madura. Todos ellos se compararon con la señal obtenida en los tiempos de retención del límite inferior de cuantificación (LIC) en leche materna.

El criterio de aceptación para este parámetro fue que la respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20 % para el LIC del analito y el 5 % para el E.I.

6.4.3. Efecto matriz

Se procesaron 6 muestras de leche madura, una muestra de leche de tipo calostro y una muestra de leche de transición, todas libres de fármacos con el método de extracción propuesto, además para cada muestra se prepararon triplicados para MCB y para MCA de acuerdo con el siguiente procedimiento descrito (figura 22).

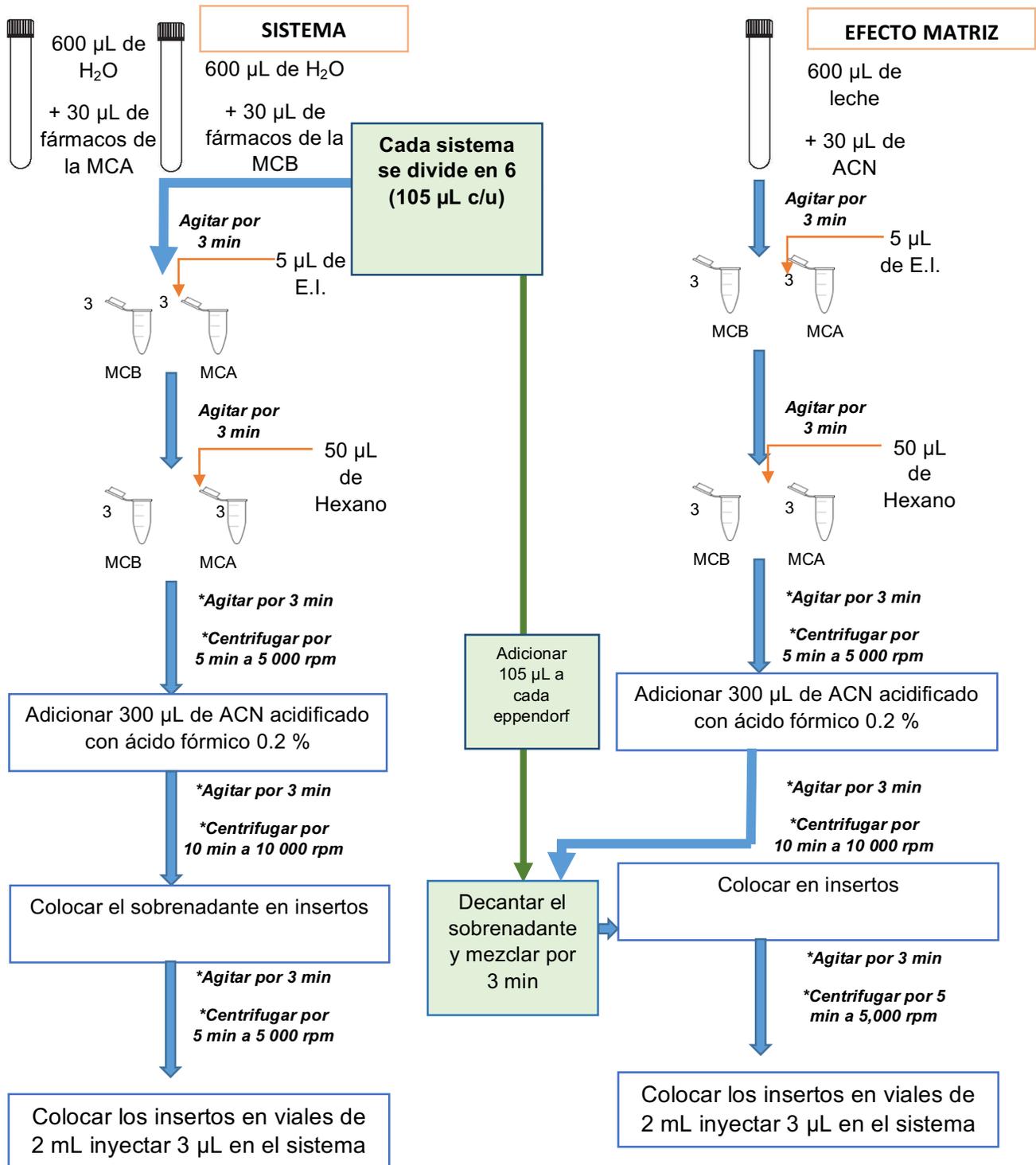


Figura 22. Procedimiento para efecto matriz

Se realizó el método de extracción para cada muestra blanco de matriz y posterior a ello se adicionó el analito y el E.I. como se muestra en la figura 22. Las respuestas obtenidas de ello se compararon con las respuestas obtenidas en solución. Para cada unidad se calculó el factor de matriz normalizado (FMN) conforme a la siguiente fórmula:

$$FMN = \frac{(\text{área del analito en la matriz}) / (\text{área del estándar interno en la matriz})}{(\text{área del analito en solución}) / (\text{área del estándar interno en solución})}$$

El criterio de aceptación es que el % C.V. del FMN no debe ser mayor que el 15 % para la MCB y MCA

6.4.4. Efecto de acarreo

Se realizaron 3 inyecciones de la muestra blanco. Una antes y dos después de la inyección del límite superior de cuantificación. Posterior a las dos últimas inyecciones del blanco se inyectaron dos límites inferiores de cuantificación.

El criterio de aceptación es que el área de los blancos debe de ser menor al 20 % del límite inferior de cuantificación y menos del 5 % del área del estándar interno.

6.4.5. Límite inferior de la curva de calibración

La NOM-177-SSA1-2013 establece que el límite inferior de cuantificación debe de ser al menos el 5 % de la Cmax. Sin embargo, este trabajo propone que el LIC sea el 2 % de la Cmax, esto con la finalidad de ampliar el rango de los intervalos de concentración de cada curva de calibración, además de obtener mayor sensibilidad.

Se evaluaron por quintuplicado el LIC para cada tipo de leche. Para ello, se determinó la respuesta analítica así como la concentración obtenida de la interpolación en la curva de calibración realizada el mismo día.

El criterio de aceptación es que la respuesta analítica debe ser por lo menos 5 veces mayor que la respuesta del blanco. El % DEA (desviación estándar absoluta) debe de ser menor del 20 %.

6.4.6. Linealidad

Se evaluó para cada antirretroviral la relación lineal entre la concentración *versus* la respuesta analítica en el intervalo de concentraciones de la curva de calibración, durante tres días consecutivos. Se determinó el mejor ajuste que describió el comportamiento de los datos y se calculó el coeficiente de correlación (r), el de determinación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b). Además, se calculó la precisión ($n=3$) y la exactitud ($n=3$) para cada nivel de concentración entre los tres días.

El criterio de aceptación es que el coeficiente de correlación sea mayor a 0.99. Además, al menos el 75 % de cada curva de calibración debe de tener una diferencia menor del 15 % en las concentraciones calculadas con respecto a las nominales, a excepción del LIC que la diferencia debe de ser menor al 20 %. Aunado a esto, al menos el 50 % de cada nivel de concentración de las curvas de calibración evaluadas deben de cumplir con el criterio de que la diferencia debe de ser menor del 15 % entre la concentración calculada y la concentración nominal, a excepción del LIC que este debe de ser menor al 20 %. Esto se evaluó en cada día de análisis así como en la validación.

6.4.7. Precisión

La precisión se evaluó intra-día (repetibilidad) e inter-día (reproducibilidad).

- **Repetibilidad:** Se procesó y analizó en un mismo día por quintuplicado el LIC y las MCB, MCM, MCA y MCD. La MCD se diluyó 1:4 con matriz biológica exenta de fármacos previo al proceso de extensión. Se calculó la

concentración obtenida interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración hecha el mismo día.

El criterio de aceptación es que el % C.V. del valor promedio de la concentración obtenida no debe de ser mayor que el 15 %, excepto para el LIC que debe ser menor o igual que el 20 %.

- **Reproducibilidad:** Se analizaron por quintuplicado en tres corridas analíticas diferentes y en 3 días diferentes el LIC, MCB, MCM, MCA y MCD. El criterio de aceptación es que para cada muestra control el % C.V. del valor promedio de la concentración debe de ser menor al 15 % y para el LIC el % CV debe de ser menor o igual al 20 %.

6.4.8. Exactitud

De los datos obtenidos de repetibilidad y reproducibilidad se calculó la desviación estándar absoluta de la concentración obtenida con respecto al valor nominal empleando la siguiente ecuación:

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

El criterio de aceptación es que el valor promedio del % DEA no debe ser mayor del 15 %, a excepción del LIC, el cual debe ser menor o igual que el 20 %. (NOM-177-SSA1-2013).

6.4.9. Estabilidad

Se evaluó por triplicado la respuesta de las MCB y MCA en diferentes condiciones de proceso y almacenamiento. Dicha respuesta fue interpolada en una curva de calibración preparada el mismo día. Las concentraciones obtenidas fueron comparadas con las concentraciones nominales.

El criterio de aceptación es que la concentración promedio de cada nivel debe de estar dentro del 15 % de la DEA.

La NOM-177-SSA1-2013 indica que la estabilidad se debe de ser evaluada a corto y largo plazo, de muestra procesada y no procesada, la estabilidad de la muestra procesada en el automuestreador, de ciclos de congelación-descongelación en muestras procesadas y de las soluciones. Para todas las evaluaciones el criterio de aceptación es el mismo.

6.4.9.1. Estabilidad a corto plazo

Se evaluó por triplicado la respuesta de las MCB y MCA en la matriz biológica a la temperatura y tiempo de procesamiento de la muestra en 4 h.

6.4.9.2. Estabilidad a largo plazo

Se evaluó por triplicado la respuesta de las MCB, MCM y MCA en la matriz biológica bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantuvieron las muestras. Las cuales fueron a dos semanas e interpoladas en curvas de calibración preparadas el mismo día.

6.4.9.3. Estabilidad de la muestra procesada y no procesada

Se evaluó por triplicado la respuesta de las MCB y MCA en la matriz biológica procesada así como no procesada a 23 °C y a 8 °C en un tiempo de 24 h. Las cuales fueron interpoladas en curvas de calibración preparadas el mismo día.

6.4.9.4. Estabilidad en el automuestreador

Se evaluó por triplicado las respuestas de las MCB y MCA en la matriz biológica procesada en el automuestreador del equipo. El cuál, se mantuvo a 5 °C por un tiempo de 24 h.

6.4.9.5. Estabilidad de los ciclos de congelación-descongelación

Se evaluó por triplicado las respuestas de las MCB y MCA en la matriz biológica con tres ciclos de congelación-descongelación. Para ello se almacenaron las MCB y MCA a -84 °C durante 12 h. Posteriormente se descongelaron y se congelaron nuevamente durante 12 horas y así sucesivamente por tres ciclos.

6.4.9.6. Recobro

Se evaluó por quintuplicado la respuesta de las MCB, MCM y MCA en matriz biológica post extracción y se comparó con la respuesta de las MCB, MCM y MCA en solución.

El porcentaje de recobro se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\% \text{ de Recobro} = \frac{(\text{área del analito en la matriz}) / (\text{área del estándar interno en la matriz})}{(\text{área del analito en solución}) / (\text{área del estándar interno en solución})} \times 100$$

El criterio de aceptación es que el porcentaje de recobro sea reproducible en cada muestra control evaluada.

6.5. Cuantificación de LMV, ZDV, LPV y RTV en pacientes VIH+.

La cuantificación de los antirretrovirales en leche materna se realizó en un día de trabajo en donde se procesó una curva de calibración, triplicados de las MCB, MCM y MCA los cuales fueron inyectados entre las muestras de los pacientes.

El protocolo de estudio y la recolección de las muestras de leche materna fueron aprobadas bajo el numero de proyecto (478) 212250-3120771 por el Comité de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Perinatología. Todos los pacientes firmaron una carta de consentimiento informado y recibieron al menos dos de los cuatro antirretrovirales estudiados en el presente trabajo durante el segundo o tercer trimestre del embarazo. Además, algunas recibieron como tratamiento de

profilaxis LPV/RTV [200/150 mg] y ZDV/LMV [300/50 mg], con tres dosis cada tres horas, antes del procedimiento quirúrgico.

Se evaluó adecuabilidad del sistema, efecto acarreo, precisión y exactitud bajo los criterios de la NOM-177-SSA1-2013.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Método analítico para la cuantificación de LMV, ZDV, LPV y RTV en leche materna mediante UPLC-MS/MS

7.1.1. Método de detección por espectrometría de masas en tándem

Se evaluaron y compararon los parámetros de detección reportados por Sánchez E., 2016 y los obtenidos en este trabajo. Esto con la finalidad de seleccionar cuales originaron señales de orden 10^6 o mayores en el conteo total de iones (TIC) para cada antirretroviral. El determinar parámetros con esta intensidad de señal y con perfiles de señal de forma gaussiana originan que al obtener el espectro de m/z en tiempo real de un analito en específico, la determinación del ión molecular sea más precisa y a su vez obtenga una mayor intensidad (altura) de la señal de los iones de una molécula en el cromatograma en modo TIC. Esto permite mayor sensibilidad en el método y mayor precisión en la cuantificación de los analitos a bajas concentraciones.

A continuación se muestra la comparación de los parámetros de la fuente establecidos para la generación de iones reportados por Sánchez E., 2016 y los propuestos en este trabajo (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros de la fuente para la detección de LMV, ZDV, LPV y RTV

Parámetro evaluado	Sánchez E., 2016	Flores Z., 2019
Forma de ionización	Electrospray positivo (ESI+)	Electrospray positivo (ESI+)
Temperatura de la fuente	150 °C	150 °C
Temperatura de desolvatación	400 °C	500 °C
Flujo del gas de desolvatación	500 L/Hr	1000 L/Hr
Flujo del gas de colisión	50 L/hr	30 L/hr
Voltaje del capilar	2.9 kV	2.91 kV

Como se puede observar la forma de ionización para los cuatro antirretrovirales y del estándar interno se mantuvo por electrospray en modo positivo (ESI+) lo cual es razonable debido a que los grupos funcionales predominantes en todas las

moléculas son las aminas, las cuales son fáciles de protonar. En cambio, en una molécula predominante de ácidos carboxílicos la ionización más recomendada sería la negativa ya que los desprotonaría.

Posterior a la determinación del modo de ionización se debe seleccionar la temperatura de la fuente. La fuente fue la encargada de generar los iones y transportarlos de la región de presión atmosférica a la de vacío. En la tabla 6 se puede observar que a una temperatura de 150 °C es suficiente para ionizar las moléculas de interés en este trabajo.

Se modificó la temperatura de desolvatación (400 °C a 500 °C) y el flujo del gas de desolvatación (500 L/Hr a 1 000 L/Hr) debido a que el aumento de estos parámetros permitió disminuir la atracción que existe entre las moléculas de la fase móvil con los iones de los analitos, y esto a su vez favoreció la evaporación y eliminación del disolvente.

Finalmente el voltaje del capilar causa la formación de iones en estado líquido. Dichos iones son expulsados del capilar en forma de un aerosol que contiene gotas de iones. Estas gotas se reducen en tamaño y sufren repulsión electrostáticas entre ellas, lo que a su vez genera una expulsión de las gotas provocando que se generen los iones en estado gaseoso. Dichos iones pasan a través de un cono y a un analizador de iones.

En este trabajo se utilizó un espectrómetro de masas con analizador de triple cuadrupolo. El fundamento de este analizador es que un cuadrupolo tiene 4 cilindros metálicos en paralelo, en donde dos cilindros opuestos tienen el mismo voltaje mientras que los otros dos tienen el voltaje opuesto. Cuando un ión positivo entra a éste analizador, tiene una repulsión con los cilindros con voltaje positivo pero una atracción con aquellos que tienen un voltaje negativo. En nanosegundos las polaridades de los cilindros son intercambiadas y solo aquel ión con una determinada relación de masa/carga será capaz de salir del cuadrupolo sin ser desviado.

En la figura 23, se muestra la señal de detección del ión padre de ritonavir (RTV) obtenida en modo de infusión combinada, es decir, bajo las condiciones de la fuente ya establecidas junto con un flujo de 0.5 mL/min de fase móvil (AF 0.1 %: ACN 9:1).

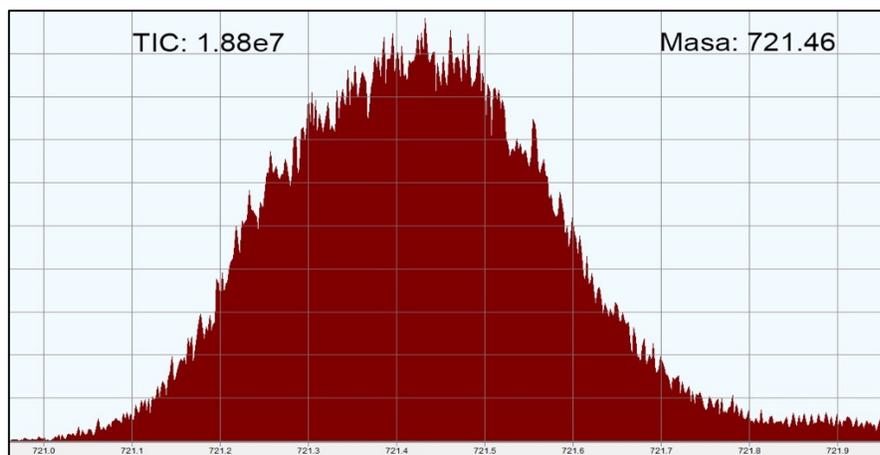


Figura 23. Ión padre de RTV

Ritonavir tiene un peso molecular de 720.994 g/mol, al ionizarlo en modo positivo se buscó centrar la masa en 721.994 g/mol (ión precursor o padre). Se encontró un valor de 721.46 de m/z , se observó una señal con distribución gaussiana que fue estable y alcanzó un conteo total de iones (TIC) de $1.88e^7$.

Dentro de los parámetros analizados, el voltaje de cono permitió que los iones se aceleraran rápidamente entre la región de presión atmosférica y la de vacío (Waters, 2017). Dicho voltaje no fue selectivo sin embargo, si fue efectivo e impactó en la detección de los analitos ya que los iones pasan a través del primer cuadrupolo, en donde son seleccionados aquellos fragmentos con una específica relación de m/z .

Al igual que con el ión padre, se caracterizó un ión fragmento originado por la colisión del ion precursor. La señal obtenida fue estable y con un TIC superior al observado con el método descrito por Elías. A este modo de operación se le llama “Monitoreo de Reacciones múltiples” (MRM), y tiene como característica que es más sensible y específico debido a que solo registra una transición (modo SIM), a comparación de un barrido de MS/MS que es por modo SCAN. Dicha

característica provoca que este método sea utilizado en la cuantificación de compuestos complejos, además de utilizarse en estudios farmacocinéticos y de metabolitos en fármacos, estudios medioambientales, por ejemplo, de pesticidas y herbicidas, y aplicaciones forenses o toxicológicas como la investigación del dopaje en el deporte (Waters, 2017).

En la figura 24b se observa el ión hijo de RTV el cual tiene una masa molecular de 296.20 g/mol y un TIC de $2.86e^6$. La intensidad de señal del ión padre (figura 24a) disminuyó de $1.88e^7$ a $2.47e^6$ debido a la fragmentación que sufre. Del mismo modo se observan señales centradas, estables y de forma gaussiana. En donde el fragmento con masa de 296.20 g/mol resultó ser la más estable y con mayor intensidad comparada con los demás fragmentos observados.

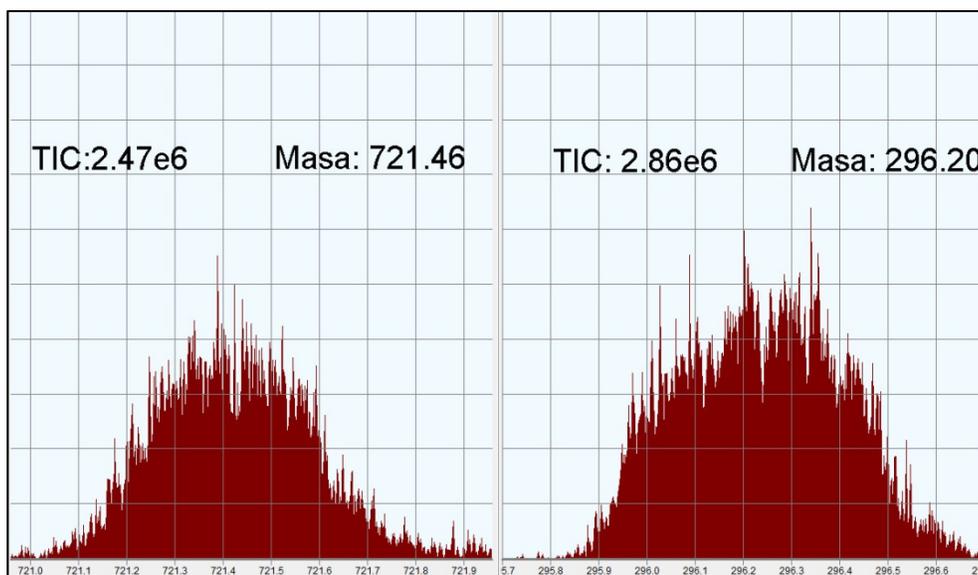


Figura 24a. Ión padre de RTV

Figura 24b. Ión hijo de RTV

Finalmente se realizó una prueba de paternidad. Esta prueba se enfoca en la selección de un ión hijo detectado en el tercer cuadrupolo mientras que se escanean los fragmentos originados en el primero (con parámetros de la fuente específicas). Si el ión padre origina un ión hijo que sea el mismo que se seleccionó en primer instancia entonces se observara una señal con intensidad parecida en la ventana de detección 3 (Waters, 2017). Como se muestra en la figura 25a, 25b y 25c existe una intensidad de señal de 10^6 .

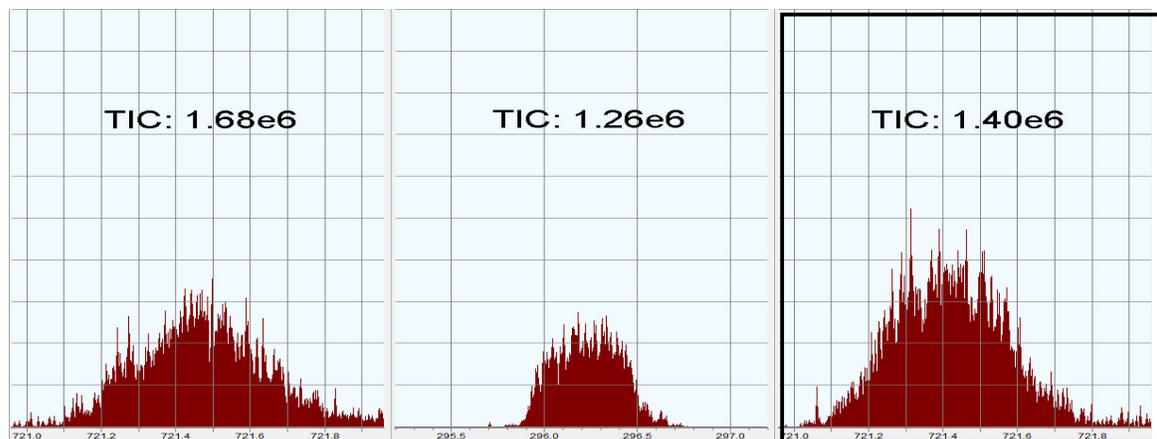


Figura 25a. Fragmento obtenido en el primer cuadrupolo

Figura 25b. Fragmento obtenido en el tercer cuadrupolo

Figura 25c. Comparación de fragmentos de ambos cuadrupolos

Posterior a la determinación de los parámetros de la fuente se procedió con la caracterización de cada antirretroviral a cuantificar. Para ello se buscaron voltajes de cono y colisión específicos para maximizar la señal proveniente de cada uno.

Tabla 9. Parámetros de la caracterización de LMV, ZDV, LPV y RTV

Analito	Analista	Transición (m/z) ión padre → ión hijo	Voltaje de cono (kV)	Energía de colisión	TIC
LMV	Sánchez E., 2016	230.15 → 112.08	15	15	1.02e ⁷
	Flores Z., 2019	230.12 → 112.08	15	5	2.18e⁷
ZDV	Sánchez E., 2016	268.18 → 127.10	10	10	1.18e ⁶
	Flores Z., 2019	268.12 → 127.10	10	10	5.56e⁶
LPV	Sánchez E., 2016	629.55 → 447.35	20	15	6.11e ⁶
	Flores Z., 2019	629.55 → 447.35	20	17	6.11e⁶
RTV	Sánchez E., 2016	721.50 → 296.20	23	15	4.55e ⁶
	Flores Z., 2019	721.46 → 296.20	23	17	7.54e⁶
SMV	Sánchez E., 2016	419.40 → 199.20	20	15	3.41e ⁵
	Flores Z., 2019	419.40 → 199.20	20	17	4.37e⁶

*TIC; Conteo total de iones

En general, se puede observar que el conteo total de iones (TIC) se incrementó en LMV, ZDV, RTV y en el estándar interno. Sin embargo, la elección del ión padre → ión hijo es prácticamente la misma en ambos métodos, lo cual significa que el aumento de señal se debe principalmente a las modificaciones que se realizaron en los parámetros de la fuente.

A continuación se muestra un espectro de masas representativo, el cual corresponde a la fragmentación de un Inhibidor de la Transcriptasa Inversa Análogo de Nucleósido (ITINs), Lamivudina (figura 26).

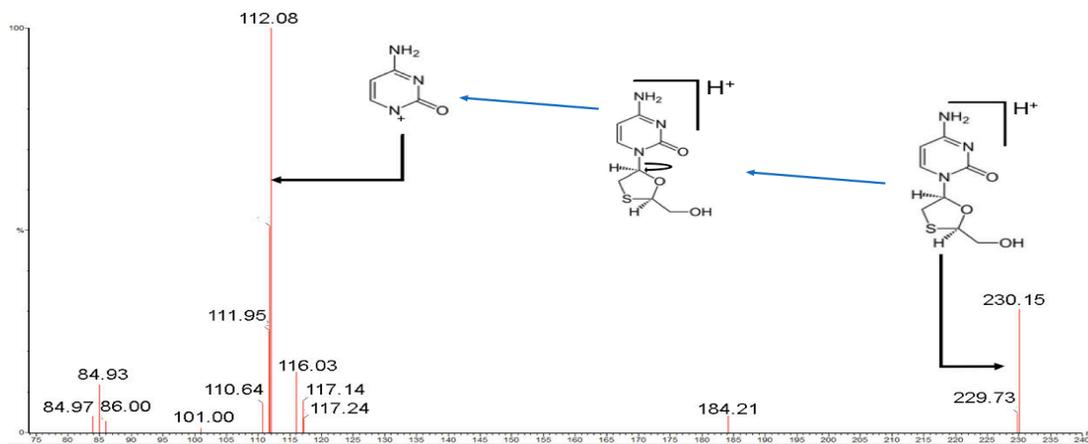


Figura 26. Espectro de masas de LMV

En la figura 26 se puede observar que el ión padre (ión molecular o ión precursor) tiene una masa de 230.15 g/mol. Se propone la protonación de la amina seguida de una fragmentación de tipo homolítica en la parte de la amida, dejando un catión con una masa de 112.08 g/mol siendo este el ión hijo seleccionado para la detección de LMV. Del mismo modo se pueden ver diferentes fragmentos en donde el correspondiente a una masa aproximada de 117.24 g/mol puede corresponder al otro fragmento de la ruptura hemolítica de la molécula.

A continuación se muestra el espectro de masas de un Inhibidor de Proteasa (IP), lopinavir (figura 27).

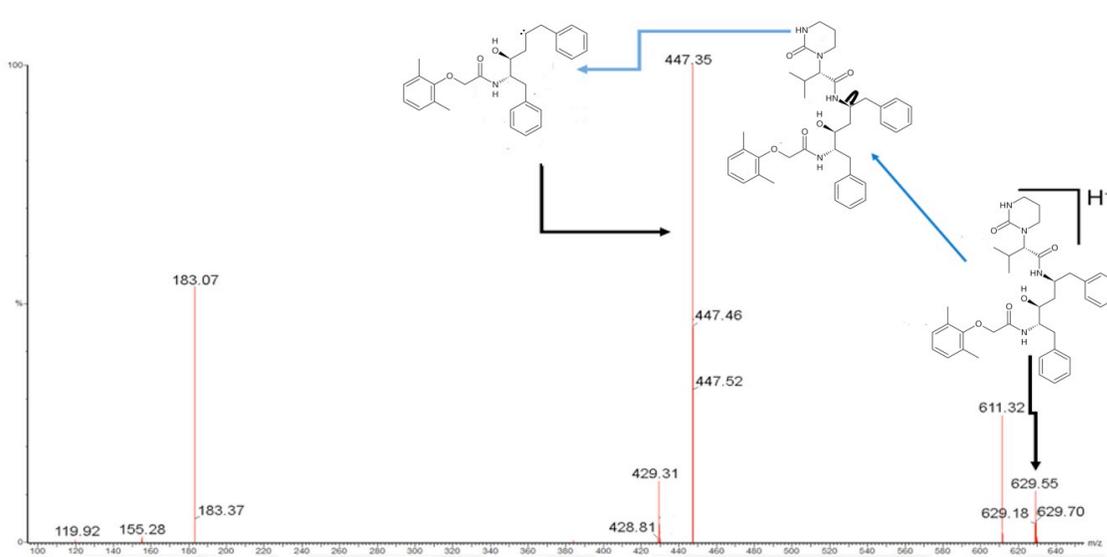


Figura 27. Espectro de masas de LPV

Al igual que en el caso de LMV se propone una ruptura del ión padre (629.55 g/mol) de tipo homolítica pero en este caso en la amina secundaria, donde el ión hijo seleccionado para la detección de LPV es el que tiene una masa de 447.35 g/mol. A pesar de que se observa una señal abundante a una masa de 183.07 g/mol se tomó la de 447.35 g/mol debido a ser la que tiene mayor porcentaje de abundancia relativa.

En la figura 28 se observa la comparación en las señales cromatográficas obtenidas bajo las mismas condiciones de separación pero en ambos métodos de detección por espectrometría, en la figura 28a se puede observar el cromatograma obtenido con las condiciones de detección del método de Sánchez E., 2016, y en la figura 28b se muestra el cromatograma obtenido con las condiciones de detección reportadas en este trabajo. Como se puede observar el área y el TIC de los cuatro antirretrovirales e incluso del E.I. es mayor con las condiciones de detección optimizadas en este trabajo, con hasta un aumento de TIC del 64.80 % en RTV y un aumento del 70.30 % de área en LMV.

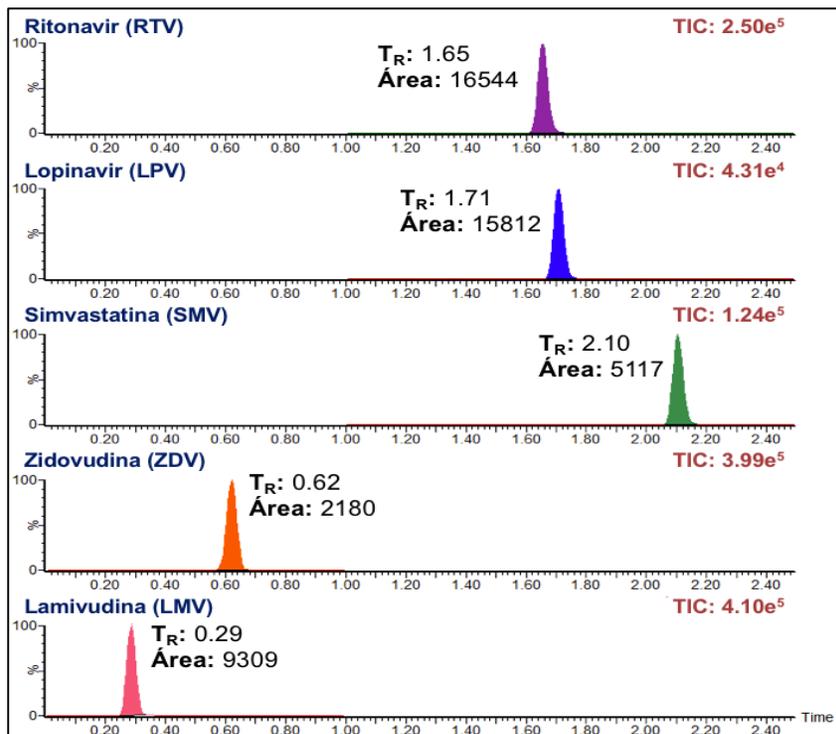


Figura 28a. Cromatograma obtenido con las condiciones de la fuente y de caracterización reportadas por Sánchez E., 2016

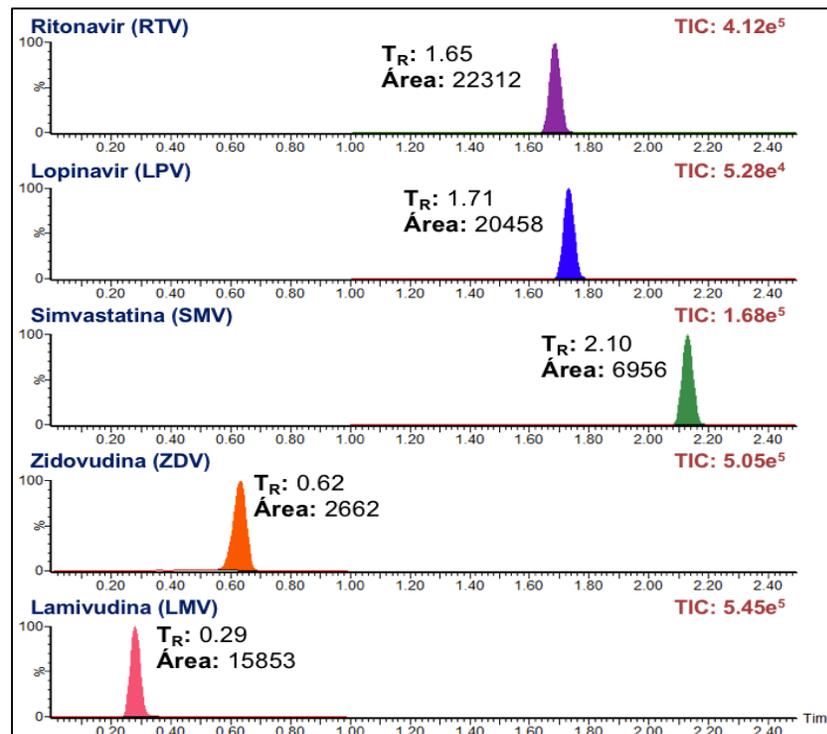


Figura 28b. Cromatograma obtenido con las condiciones de la fuente y de caracterización reportadas en este trabajo

7.1.2. Método cromatográfico mediante Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución

Las modificaciones que se realizaron en el método cromatográfico tuvieron como propósito hacer más eficientes las señales cromatográficas así como disminuir el tiempo de análisis por inyección. De esta forma, los cambios propuestos fueron sobre las proporciones de la fase móvil, la velocidad y el tiempo en que se hacen dichos cambios. En la tabla 10 se muestran las condiciones cromatográficas determinadas en este trabajo.

Tabla 10. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de LMV, ZDV, LPV y RTV

Condiciones Cromatográficas								
Analista	Sánchez E., 2016				Flores Z., 2019			
Columna	BEH C18				BEH C18			
Velocidad de flujo	0.5 mL/min				0.5 mL/min			
Gradiente	Tiempo (min)	% A (AF 0.1 %)	% B (ACN)	Tipo de curva	Tiempo (min)	% A (AF 0.1 %)	% B (ACN)	Tipo de curva
	0.15	90	10	2	0.15	90	10	2
	0.70	47	53	6	0.70	60	40	6
	2.50	20	80	11	1.30	10	90	6
				2.00	90	10	11	
Modo de inyección	Parcial-loop				Parcial-loop			
Volumen de inyección	3 µL				3 µL			
Tiempo de corrida	2.5 min				2.0 min			
Temperatura de la columna	35 °C				35 °C			
Temperatura del automuestreador	5 °C				5 °C			
Lavado fuerte	Agua, Acetonitrilo, Metanol e Isopropanol 1:1:1:1 (v/v/v/v) con ácido fórmico 0.1 %				Agua, Acetonitrilo, Metanol e Isopropanol 1:2:3:4 (v/v/v/v) con ácido fórmico 0.1 %			
Lavado débil	Agua y Acetonitrilo 7:3 (v/v) con ácido fórmico 0.1 %				Agua y Acetonitrilo 9:1 (v/v) con ácido fórmico 0.1 %			

Comparando el gradiente en ambos métodos se puede observar que hay cambios en el tiempo de análisis después de los 0.7 min, agregando un tiempo adicional de 1.3 min y acabando la corrida en 2.0 min. Al hacer un cambio en el tiempo de

corrida se tuvo que modificar las proporciones de ácido fórmico 0.1 % y de acetonitrilo para que los analitos que salían después de 0.7 min (LPV, RTV y SMV) disminuyeran su tiempo de retención pero con una buena eficiencia en los picos cromatográficos.

Dichas condiciones cromatográficas se compararon con el gradiente propuesto por Sánchez E., 2016. Para ello se inyectaron triplicados de la mezcla de los cuatro antirretrovirales y el E.I. (SMV) a una concentración de 100 ng/mL. En la figura 29a se muestra el cromatograma obtenido con el gradiente de Elías y en la Figura 29b se observa el gradiente propuesto en este trabajo. En ambos casos se obtuvo buena resolución de los picos cromatográficos. Sin embargo con el gradiente propuesto en este trabajo, se obtuvo mayor TIC y área.

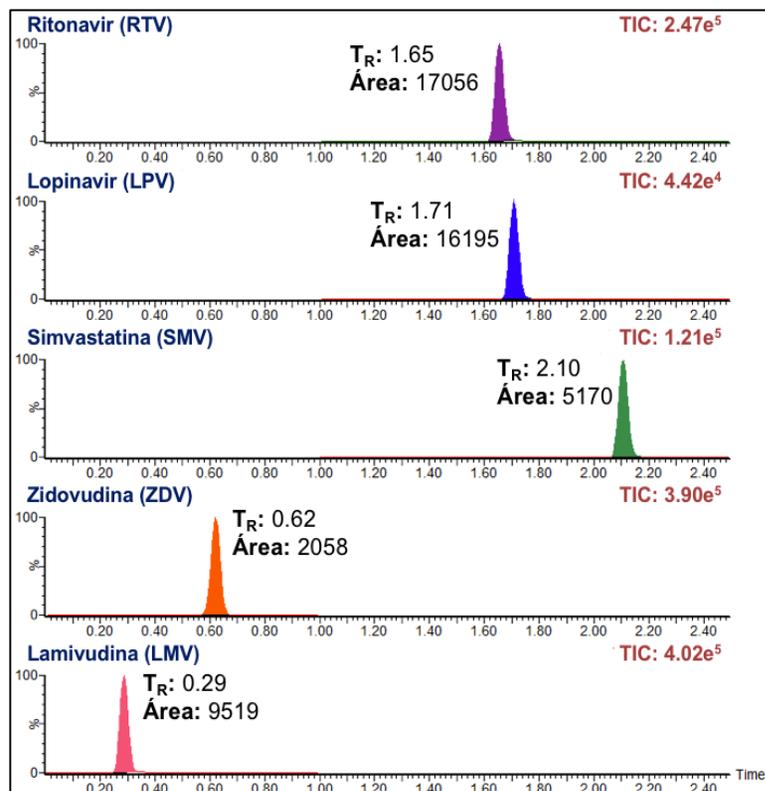


Figura 29a. Cromatograma obtenido con las condiciones cromatográficas reportadas por Sánchez E., 2016

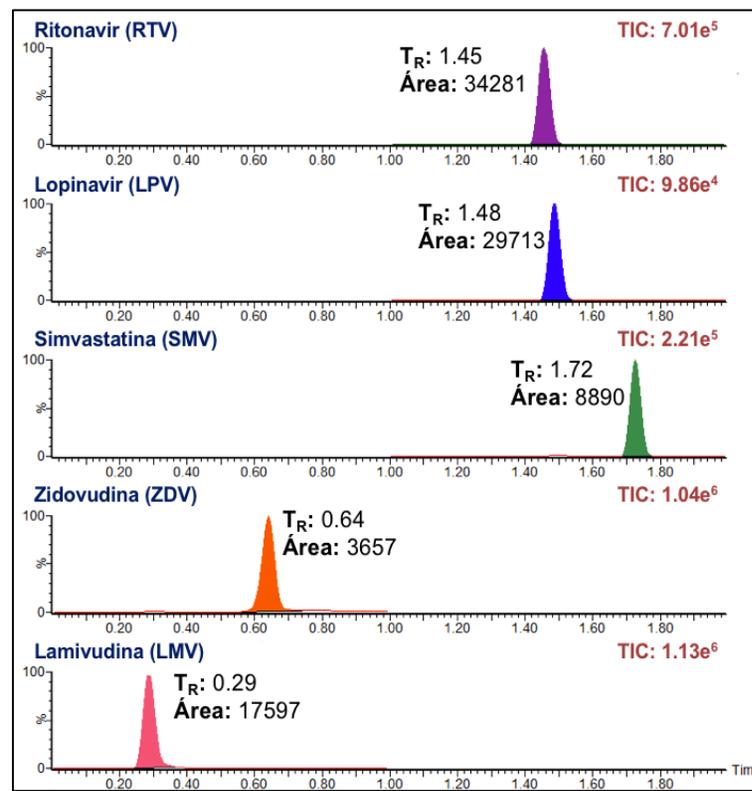


Figura 29b. Cromatograma obtenido con las condiciones cromatográficas reportadas en este trabajo

7.1.3. Método de extracción de LMV, ZDV, LPV y RTV en leche materna

Se realizaron modificaciones al método de Sánchez E., 2016, con la finalidad de cumplir con el criterio de aceptación del efecto matriz bajo la NOM-177-SSA1-2013 y cuantificar a bajas concentraciones Lamivudina en las muestras de leche de transición. Uno de los principales problemas que afectan este parámetro durante la detección y cuantificación de analitos, cuyos tiempos de retención son cortos es la limpieza de la muestra (Waters, 2017). Considerando que los componentes de la leche materna principalmente son proteínas y grasa, las modificaciones propuestas se basaron en la separación y eliminación de estos componentes.

En éste sentido, se propusieron cuatro modificaciones en el método de extracción, para ello se procesaron y analizaron muestras a bajas y altas concentraciones, las cuales incluían triplicados del límite inferior de cuantificación (LIC), triplicados del límite superior de cuantificación (LSC) y triplicados de muestra blanco con la finalidad de observar la precisión del método en los extremos de cuantificación.

7.1.3.1. Extracción líquido-líquido de lípidos en leche materna.

Para la modificación 1, se evaluó la extracción líquido-líquido de lípidos en leche materna mediante el uso de 100 μL de hexano (Tabla 11) y mediante el uso de 200 μL de hexano (Tabla 12).

La adición de hexano a la leche materna permitió que los lípidos se solubilizaran en él y se lograra hacer una extracción líquido-líquido de ellos. De forma sinérgica, la adición de este solvente orgánico a una solución acuosa de proteínas, produce agregados de moléculas proteicas que tienden a precipitar, esto se debe a que el hexano presenta una constante dieléctrica menor (1.9) que la del agua (80), produciendo un incremento en las fuerzas de atracción entre cargas opuestas y una disminución en el grado de ionización de los radicales de la proteína, provocando así que la solubilidad de ésta disminuya.

Tabla 11. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta analítica mediante el uso de 100 μL de hexano para la extracción líquido-líquido de lípidos.

Punto de la curva	Inyección	LMV [50 ng/mL]	ZDV [12.5 ng/mL]	LPV [100 ng/mL]	RTV [5 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LIC	1	626.92	145.22	4320.82	164.45	4843.88	0.13	0.03	0.89	0.03
	2	637.33	128.44	3358.42	132.25	5106.84	0.12	0.03	0.66	0.03
	3	620.94	111.18	3565.63	176.94	4466.23	0.14	0.02	0.80	0.04
	Promedio	628.40	128.28	3748.29	157.88	4805.65	0.13	0.03	0.78	0.03
	Desviación Estándar	8.29	17.02	506.53	23.06	322.01	0.007	0.002	0.12	0.01
	% C.V.	1.32	13.27	13.51	14.60	6.70	5.54	10.74	15.07	20.80
Punto de la curva	Inyección	LMV [3000 ng/mL]	ZDV [750 ng/mL]	LPV [6000 ng/mL]	RTV [300 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área 6000	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LSC	1	32986.19	6513.79	188922.08	5763.33	470.92	7.02	1.38	40.18	1.23
	2	31144.66	6157.82	180942.31	5660.45	4486.32	6.94	1.37	40.33	1.26
	3	31673.90	5846.94	170175.73	5130.34	4197.87	7.55	1.39	40.54	1.22
	Promedio	31934.92	6172.85	180013.37	5518.04	4462.03	7.17	1.38	40.35	1.24
	Desviación Estándar	948.11	333.68	9407.64	339.68	252.90	0.33	0.01	0.18	0.02
	% C.V.	2.97	5.41	5.23	6.16	5.67	4.59	0.74	0.45	1.77

Tabla 12. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta analítica mediante el uso de 200 µL de hexano para la extracción líquido-líquido de lípidos

Punto de la curva	Inyección	LMV [50 ng/mL]	ZDV [12.5 ng/mL]	LPV [100 ng/mL]	RTV [5 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LIC	1	651.73	161.62	3636.31	133.29	4021.52	0.16	0.04	0.90	0.03
	2	609.85	127.68	3858.23	117.18	1612.51	0.38	0.08	2.39	0.07
	3	609.83	128.65	3194.53	105.72	3362.56	0.18	0.04	0.95	0.03
	Promedio	623.80	139.32	3563.02	118.73	2998.86	0.24	0.05	1.41	0.04
	Desviación Estándar	24.19	19.32	337.87	13.85	1245.004	0.12	0.02	0.85	0.02
	% C.V.	3.88	13.87	9.48	11.67	41.52	49.72	43.94	59.79	50.99
Punto de la curva	Inyección	LMV [3000 ng/mL]	ZDV [750 ng/mL]	LPV [6000 ng/mL]	RTV [300 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área 6000	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LSC	1	32365.24	6373.95	178928.41	5372.88	3612.55	8.96	1.76	49.53	1.49
	2	31049.18	5842.07	183271.91	5067.68	4099.78	7.57	1.42	44.70	1.24
	3	32689.32	6373.42	189421.27	5850.33	4319.73	7.57	1.48	43.85	1.35
	Promedio	32034.58	6196.48	183873.86	5430.30	4010.69	8.03	1.55	46.03	1.36
	Desviación Estándar	868.63	306.93	5272.27	394.47	361.91	0.80	0.18	3.06	0.12
	% C.V.	2.71	4.95	2.87	7.26	9.02	9.98	11.78	6.65	9.25

En la tabla 11 se puede observar que el % C.V. de la respuesta entre RTV/SMV sobrepasa el 15 % permitido de acuerdo a la NOM-177-SSA1-2013. Por otro lado, en la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos al adicionar 200 μL de hexano, mostrando un % C.V. de la respuesta analítica superior (59 %) al obtenido utilizando 10 μL . Asimismo se puede atribuir a que dicha variación es proveniente del E.I. ya que los resultados siguieron que fue una mala adición del E.I.. Por lo tanto, el empleo de 100 μL de hexano para la separación de lípidos fue aceptable y mostró repetibilidad en la respuesta analítica.

7.1.3.2. Extracción líquido-líquido con 100 μL de hexano y con 100 μL de mezcla de hexano y n-hexano en leche materna

Para la modificación 2, se evaluó la utilización de una mezcla de hexano y n-hexano (100 μL), con el uso de hexano (100 μL). En la tabla 13 se muestra el % C.V. obtenido de la respuesta analítica de las muestras procesadas con la mezcla de hexanos donde se puede observar que ZDV tanto a bajas como altas concentraciones sobrepasa los criterios de aceptación de la NOM-177-SSA1-2013. Asimismo en la tabla 14 se puede observar que para los cuatro antirretrovirales y el E.I., la respuesta analítica cumple con un % C.V. menor al 15 % para ambas concentraciones. Por tal motivo se mantuvo al hexano como agente de extracción de lípidos de la leche materna.

Tabla 13. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARA, el estándar interno y la respuesta mediante el uso de 100 μL de mezcla de hexano y n-hexeno

Punto de la curva	Inyección	LMV [50 ng/mL]	ZDV [12.5 ng/mL]	LPV [100 ng/mL]	RTV [5 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LIC	1	355.66	8.60	3983.28	239.47	5411.79	0.07	0.003	0.74	0.04
	2	447.52	16.95	4785.15	241.32	5803.24	0.08	0.003	0.82	0.04
	3	432.03	11.19	5944.4	276.99	5564.25	0.08	0.002	1.07	0.05
	Promedio	411.737	12.2467	4904.277	252.593	5593.093	0.073	0.002	0.876	0.04
	Desviación Estándar	49.18	4.27	985.97	21.15	197.31	0.006	0.0007	0.17	0.0042
	% C.V.	11.94	34.90	20.10	8.37	3.53	9.17	31.31	19.64	9.25
Punto de la curva	Inyección	LMV [3000 ng/mL]	ZDV [750 ng/mL]	LPV [6000 ng/mL]	RTV [300 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área 6000	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LSC	1	52259.06	2014.70	558752.56	19662.68	5609.43	9.32	0.36	99.61	3.51
	2	60128.36	2526.43	629042.44	23044.62	6202.66	9.69	0.41	101.41	3.71
	3	68128.98	2718.64	699463.88	27119.32	6965.03	9.78	0.39	100.42	3.89
	Promedio	60172.13	2419.92	629086.29	23275.54	6259.04	9.60	0.39	100.48	3.70
	Desviación Estándar	7935.05	363.86	70355.67	3733.68	679.56	0.25	0.02	0.90	0.19
	% C.V.	13.19	15.04	11.18	16.04	10.86	2.58	6.33	0.90	5.25

Tabla 14. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARA, el estándar interno y la respuesta mediante el uso 100 µL de hexano

Punto de la curva	Inyección	LMV [50 ng/mL]	ZDV [12.5 ng/mL]	LPV [100 ng/mL]	RTV [5 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LIC	1	350.93	9.40	4075.15	255.98	5586.36	0.06	0.002	0.73	0.05
	2	418.76	8.15	5168.75	248.31	6769.92	0.06	0.001	0.76	0.04
	3	400.06	9.24	4862.84	234.21	6261.16	0.06	0.001	0.78	0.04
	Promedio	389.92	8.93	4702.25	246.17	6205.81	0.06	0.001	0.76	0.04
	Desviación Estándar	35.03	0.68	564.21	11.04	593.72	0.001	0.0002	0.02	0.005
	% C.V.	8.99	7.62	11.99	4.49	9.57	1.62	16.51	3.22	12.71
Punto de la curva	Inyección	LMV [3000 ng/mL]	ZDV [750 ng/mL]	LPV [6000 ng/mL]	RTV [300 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área 6000	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LSC	1	54560.36	2130.76	591665.88	21508.96	6189.38	8.82	0.34	95.59	3.43
	2	54896.73	2153.86	569289.69	20632.53	5530.85	9.93	0.39	102.93	3.73
	3	56002.14	2001.05	587369.81	21219.36	6259.13	8.95	0.32	93.84	3.39
	Promedio	55153.08	2095.22	582775.13	21120.28	5993.12	9.23	0.35	97.46	3.53
	Desviación Estándar	754.29	82.37	11874.63	446.54	401.85	0.61	0.04	4.82	0.18
	% C.V.	1.37	3.93	2.04	2.11	6.71	6.57	10.07	4.95	5.01

7.1.3.3. Extracción de antirretrovirales con ácido fórmico 0.1 % (v/v) y ácido fórmico 0.2 % (v/v)

Para la modificación 3, se evaluó la repetibilidad en la respuesta analítica con la utilización de ácido fórmico 0.1 % y con ácido fórmico 0.2 % como agente precipitante de proteínas de la leche materna. Esta modificación propuesta con base en el punto isoelectrico de la caseína (p.I. 4.6), en el cual se sabe que a un pH equivalente al punto isoelectrico de una proteína se garantiza la precipitación de la misma (Borja M. *et. al.* 2010). Así se realizó el cálculo de la concentración de ácido fórmico al cual se obtenía un pH de trabajo que oscilará en este valor para asegurar que al menos la caseína (proteína más abundante de la leche) precipitara en su totalidad. De esta forma el pH experimental al precipitar con ácido fórmico 0.1 % fue de 5.1 mientras que a una concentración de 0.2 % el pH experimental disminuyó a 4.6.

En la tabla 15 y 16 se muestran los resultados obtenidos con ácido fórmico 0.1 % y 0.2 % respectivamente. En ambos casos se puede observar que el % C.V. es menor del 20 % para el LIC y menor que el 15 % para el LSC. Sin embargo, para los resultados obtenidos con ácido fórmico al 0.2 % los % C.V. son inclusive menores al 3.75 % para los cuatro antirretrovirales tanto a bajas como a altas concentraciones, lo que sugiere una mejor limpieza y mayor precisión de la respuesta analítica comparada con la precipitación de proteínas con ácido fórmico al 0.1 %. Por lo tanto, se optó por utilizar ácido fórmico al 0.2 % para la precipitación de proteínas.

Tabla 15. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta mediante el método de precipitación de proteínas con ácido fórmico 0.1 %.

Punto de la curva	Inyección	LMV [50 ng/mL]	ZDV [12.5 ng/mL]	LPV [100 ng/mL]	RTV [5 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LIC	1	610.67	87.21	2111.05	117.86	7979.29	0.08	0.01	0.26	0.01
	2	697.71	89.98	2106.61	100.12	7859.66	0.09	0.01	0.27	0.01
	3	646.60	94.50	2612.53	142.58	8327.05	0.08	0.01	0.31	0.01
	Promedio	651.66	90.56	2276.73	120.19	8055.34	0.08	0.01	0.28	0.01
	Desviación Estándar	43.74	3.68	290.82	21.33	242.79	0.007	0.0002	0.03	0.002
	% C.V.	6.71	4.06	12.77	17.74	3.01	8.36	2.45	9.73	14.74
Punto de la curva	Inyección	LMV [3000 ng/mL]	ZDV [750 ng/mL]	LPV [6000 ng/mL]	RTV [300 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área 6000	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LSC	1	37230.15	4485.65	136252.19	5965.66	7488.95	4.97	0.60	18.19	0.80
	2	35471.89	4169.93	126889.30	5733.35	7924.38	4.48	0.53	16.01	0.72
	3	36913.46	4300.87	135308.17	6198.70	8485.40	4.35	0.51	15.95	0.73
	Promedio	36538.50	4318.82	132816.55	5965.90	7966.24	4.60	0.54	16.72	0.75
	Desviación Estándar	937.19	158.62	5154.81	232.67	499.54	0.33	0.05	1.28	0.04
	% C.V.	2.56	3.67	3.88	3.90	6.27	7.14	8.93	7.65	5.37

Tabla 16. Datos de Repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta mediante el método de precipitación de proteínas con ácido fórmico 0.2 %.

Punto de la curva	Inyección	LMV [50 ng/mL]	ZDV [12.5 ng/mL]	LPV [100 ng/mL]	RTV [5 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LIC	1	727.74	76.04	2225.64	141.58	7132.6	0.10	0.01	0.31	0.02
	2	744.56	72.52	2265.3	138.79	7112.32	0.10	0.01	0.32	0.02
	3	775.98	74.67	2105.56	134.75	7144.75	0.11	0.01	0.29	0.02
	Promedio	749.42	74.41	2198.83	138.37	7129.89	0.10	0.01	0.31	0.02
	Desviación Estándar	24.49	1.77	83.18	3.43	16.38	0.003	0.0002	0.01	0.0005
	% C.V.	3.27	2.38	3.78	2.48	0.23	3.15	2.23	3.99	2.59
Punto de la curva	Inyección	LMV [3000 ng/mL]	ZDV [750 ng/mL]	LPV [6000 ng/mL]	RTV [300 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LSC	1	34349.57	3833.14	111954.98	5570.69	6570.26	5.23	0.58	17.04	0.85
	2	34003.56	3692.80	115300.90	5526.09	6803.02	4.99	0.54	16.95	0.81
	3	34788.05	3847.28	117917.61	5785.9	6701.92	5.19	0.57	17.59	0.86
	Promedio	34380.39	3791.07	115057.83	5627.56	6691.73	5.14	0.57	17.19	0.84
	Desviación Estándar	393.15	85.40	2988.74	138.93	116.71	0.12	0.02	0.35	0.03
	% C.V.	1.14	2.25	2.60	2.47	1.74	2.39	3.75	2.03	3.11

7.1.3.4. Extracción de antirretrovirales a partir de 50 μ L, 100 μ L y 200 μ L de leche materna

Un punto crucial en la optimización del método analítico fue el volumen a partir del cual se podían extraer los cuatro antirretrovirales ya que en algunas ocasiones, el volumen obtenido en la toma de muestra de las pacientes portadoras del VIH no supera los 200 μ L necesarios para el procesamiento. En este sentido, se evaluó la repetibilidad de la respuesta analítica extrayendo los cuatro antirretrovirales a partir de 50 μ L (Tabla 17), 100 μ L (Tabla 18) y 200 μ L (Tabla 19) de muestra. En la tabla 16 se puede observar que el E.I. muestra dificultades en la extracción a partir de un volumen de muestra menor (50 μ L) alcanzando % C.V. superiores a lo establecido, el hecho de que el E.I. sea el que presente dicho problema impacta de forma directa en la respuesta analítica para los cuatro antirretrovirales, como se observa en la misma tabla. Además, experimentalmente al utilizar 50 μ L de leche materna originaba tener un volumen final de 150 μ L, el cual es un volumen difícil de manejar para colocarlo en los insertos e inyectarlo en el sistema cromatográfico originando que esta cantidad de volumen fuera descartado para la elección del volumen de muestra a utilizar. El uso de 100 μ L y de 200 μ L de leche materna dieron resultados aceptables bajo la NOM-177-SSA1-2013, sin embargo se optó por el uso de 100 μ L de leche materna ya que originaba un volumen final fácil de manipular para la inyección en el sistema cromatográfico y disminuye el volumen de material biológico a utilizar para la cuantificación de antirretrovirales en leche materna.

Tabla 17. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta mediante el uso 50 µL de leche materna

Punto de la curva	Inyección	LMV [50 ng/mL]	ZDV [12.5 ng/mL]	LPV [100 ng/mL]	RTV [5 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LIC	1	427.47	92.28	10604.33	157.82	5717.77	0.07	0.02	1.85	0.03
	2	432.93	102.42	10851.18	171.75	5693.07	0.08	0.02	1.91	0.03
	3	539.25	122.56	13966.37	166.62	6968.21	0.08	0.02	2.004	0.02
	Promedio	466.55	105.75	11807.29	165.39	6126.35	0.08	0.02	1.92	0.03
	Desviación Estándar	63.02	15.41	1873.88	7.04	729.18	0.001	0.0009	0.08	0.003
	% C.V.	13.51	14.57	15.87	4.26	11.90	1.73	5.65	3.96	11.55
Punto de la curva	Inyección	LMV [3000 ng/mL]	ZDV [750 ng/mL]	LPV [6000 ng/mL]	RTV [300 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área 6000	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LSC	1	50349.96	11825.91	1168507.63	13215.01	6201.11	8.12	1.91	188.43	2.13
	2	42782.68	10176.45	1030191.69	11383.7	8204.52	5.21	1.24	125.56	1.39
	3	48407.27	12034.79	1161129.88	13877.34	9630.5	5.03	1.25	120.57	1.44
	Promedio	47179.97	11345.72	1119943.07	12825.35	8012.04	6.12	1.47	144.86	1.65
	Desviación Estándar	3930.09	1017.99	77814.46	1291.68	1722.78	1.73	0.38	37.82	0.41
	% C.V.	8.33	8.97	6.95	10.07	21.50	28.33	26.08	26.11	25.09

Tabla 18. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta mediante el uso 100 μ L de leche materna

Punto de la curva	Inyección	LMV [50 ng/mL]	ZDV [12.5 ng/mL]	LPV [100 ng/mL]	RTV [5 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LIC	1	504.69	124.31	11408.88	124.41	5748.26	0.09	0.02	1.98	0.02
	2	478.57	124.50	11028.13	121.02	6027.98	0.08	0.02	1.83	0.02
	3	525.98	133.97	12927.09	140.42	6628.19	0.08	0.02	1.95	0.02
	Promedio	503.08	127.59	11788.03	128.62	6134.81	0.08	0.02	1.92	0.02
	Desviación Estándar	23.75	5.52	1004.65	10.36	449.59	0.005	0.0007	0.08	0.0008
	% C.V.	4.72	4.33	8.52	8.06	7.33	5.92	3.47	4.24	3.84
Punto de la curva	Inyección	LMV [3000 ng/mL]	ZDV [750 ng/mL]	LPV [6000 ng/mL]	RTV [300 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área 6000	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LSC	1	47177.32	10600.56	1022047.56	11590.96	6212.88	7.59	1.71	164.50	1.87
	2	46458.77	10447.76	982534.94	10637.58	5860.18	7.93	1.78	167.66	1.81
	3	43721.36	10402.68	986972.13	10591.23	5876.4	7.44	1.77	167.96	1.80
	Promedio	45785.82	10483.67	997184.88	10939.92	5983.15	7.65	1.75	166.71	1.83
	Desviación Estándar	1823.61	103.71	21645.71	564.29	199.11	0.25	0.04	1.91	0.03
	% C.V.	3.98	0.99	2.17	5.16	3.33	3.26	2.34	1.15	1.83

Tabla 19. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta mediante el uso 200 µL de leche materna

Punto de la curva	Inyección	LMV [50 ng/mL]	ZDV [12.5 ng/mL]	LPV [100 ng/mL]	RTV [5 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LIC	1	505.69	97.28	10422.12	110.75	4317.94	0.12	0.02	2.41	0.03
	2	487.69	133.17	10411.49	114.37	4347.26	0.11	0.03	2.39	0.03
	3	684.08	122.46	10784.29	116.19	5572.25	0.12	0.02	1.94	0.02
	Promedio	559.15	117.64	10539.30	113.77	4745.82	0.12	0.02	2.25	0.02
	Desviación Estándar	108.56	18.42	212.23	2.77	715.86	0.005	0.005	0.27	0.003
	% C.V.	19.42	15.66	2.01	2.43	15.08	4.51	19.35	12.05	12.27
Punto de la curva	Inyección	LMV [3000 ng/mL]	ZDV [750 ng/mL]	LPV [6000 ng/mL]	RTV [300 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área 6000	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
LSC	1	43670.32	10015.86	939165.69	10351.67	4817.35	9.07	2.08	194.95	2.15
	2	45271.57	10519.08	929501.81	10094.94	4654.3	9.73	2.26	199.71	2.17
	3	47383.04	10749.8	969012.50	10417.84	4853.17	9.76	2.22	199.67	2.15
	Promedio	45441.64	10428.25	945893.33	10288.15	4774.94	9.52	2.18	198.11	2.15
	Desviación Estándar	1862.19	375.31	20596.59	170.56	106.001	0.39	0.09	2.73	0.01
	% C.V.	4.10	3.60	2.18	1.66	2.22	4.13	4.31	1.38	0.57

Asimismo, la posibilidad de reducir a la mitad el volumen de muestra necesario para su procesamiento (de 200 μL a 100 μL), tuvo que ver de manera importante con la optimización de los parámetros de detección así como del proceso de limpieza para eliminar interferencias. En la figura 30 muestra el método final que seleccionó después de evaluar las modificaciones propuestas.

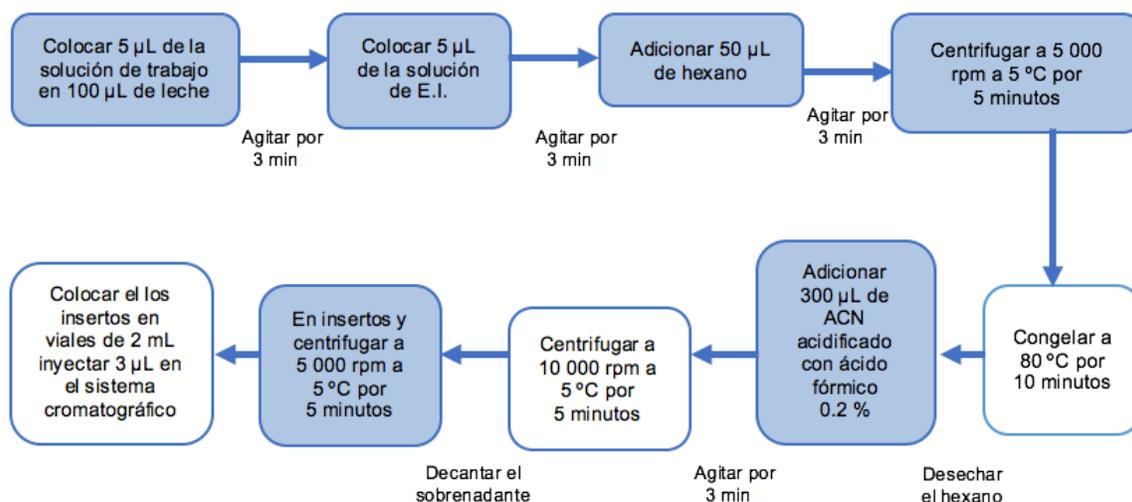


Figura 30. Método seleccionado para la extracción de antirretrovirales en leche materna

Posteriormente se se sometió a validación el método analítico bajo los criterios de la NOM-177-SSA1-2013.

7.1.4. Validación del método analítico

7.1.4.1. Adecuabilidad del sistema

La evaluación del correcto funcionamiento del equipo en cada día de experimentación y antes de cualquier evaluación se monitoreó a través de la adecuabilidad del sistema. En esta prueba, al ser inyectado repetidamente el mismo volumen de un mismo vial, pone en evidencia la variabilidad propia del sistema cromatográfico.

Tabla 20. Adecuabilidad del sistema en el quinto día de validación

Punto de la curva	Inyección	LMV [50 ng/mL]	ZDV [12.5 ng/mL]	LPV [100 ng/mL]	RTV [5 ng/mL]	SMV [455 ng/mL]	LMV/SMV	ZDV/SMV	LPV/SMV	RTV/SMV
		Área	Área	Área	Área	Área	Área/EI	Área/EI	Área/EI	Área/EI
MCB en leche materna	1	797.00	174.43	21955.39	1738.93	4156.72	0.19	0.04	5.28	0.42
	2	845.63	170.21	21779.29	1694.76	4252.39	0.20	0.04	5.12	0.40
	3	875.46	171.64	22004.72	1611.88	4140.25	0.21	0.04	5.31	0.39
	4	842.72	183.70	21818.59	1593.3	4217.72	0.20	0.04	5.17	0.38
	5	839.16	180.25	22667.83	1762.67	4112.4	0.20	0.04	5.51	0.43
	6	838.29	174.05	22541.67	1682.75	4174.28	0.20	0.04	5.40	0.40
	7	846.35	174.16	22398.92	1745.02	4080.07	0.21	0.04	5.49	0.43
Promedio		840.66	175.49	22166.63	1689.90	4161.98	0.20	0.04	5.33	0.41
Desviación Estándar		23.04	4.79	362.36	66.12	59.30	0.006	0.001	0.15	0.02
% C.V.		2.74	2.73	1.63	3.91	1.42	3.16	3.11	2.81	4.79

La tabla 20 muestra la adecuabilidad del sistema en un día de análisis durante la validación, no obstante, dicha prueba fue realizada durante todos los días en los que se ejecutó la validación del método y se analizó para cada uno de los antirretrovirales así como para la relación de áreas con el E.I. Se observa que el % C.V. fue menor al 6 %, tanto de forma individual para la señal de cada antirretroviral como para la relación de áreas en cada caso, constatando que el equipo trabajó adecuadamente y su variabilidad fue mínima entre inyecciones repetidas.

7.1.4.2. Selectividad

Uno de los parámetros esenciales a evaluar fue la selectividad del método, es decir, la capacidad de un método analítico para diferenciar y cuantificar el compuesto a analizar (NOM-177-SSA1-2013). Para la evaluación de éste parámetro se determinó la señal permitida (área) correspondiente al 20 % del LIC para cada analito en su respectivo tiempo de retención. En la tabla 21 se observa que el método fue selectivo para los cuatro antirretrovirales en las diferentes muestras de leche madura, leche de transición y el calostro. De igual forma el área permitida para el E.I. no presentó señal por arriba del 5 %.

Tabla 21. Selectividad de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV (E.I.) en leche materna

LECHE	LMV	ZDV	LPV	RTV	SMV (EI)
	Área promedio (n=3)				
Muestra 1	9.42	9.94	1640.23	66.76	7.04
Muestra 2	11.26	19.54	2740.15	89.51	12.76
Muestra 3	7.60	9.88	1332.73	81.25	1.12
Muestra 4	4.41	3.69	1330.75	63.99	3.72
Muestra 5	4.41	6.25	1294.77	85.76	8.04
Muestra 6	5.73	4.31	1555.49	62.84	6.32
Muestra 7	36.93	15.02	1465.99	95.20	12.30
Muestra 8	10.80	6.66	1695.35	52.03	9.27
Muestra de Transición	9.39	10.02	1280.22	315.04	4.24
Muestra de Calostro	17.67	7.89	1713.77	110.64	7.27
LIC	382.70	108.66	19108.67	583.10	2138.27
Área permitida (20 % del LIC)	76.54	21.73	3821.73	116.62	106.91

El hecho de que el método optimizado sea selectivo, favorece de forma importante en la precisión y exactitud del mismo, ya que se espera que no haya variaciones importantes con respecto a la respuesta analítica en el intervalo de cuantificación. Asimismo, desde el punto de vista de investigación, nos permitiría cuantificar selectivamente estos antirretrovirales en cualquier tipo de leche materna de forma longitudinal. A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos en la prueba de Selectividad para cada uno de los antirretrovirales y de los tipos de leche utilizados (figura 31^a, 31b y 31c) así como los cromatogramas obtenidos en el LIC (figura 31d).

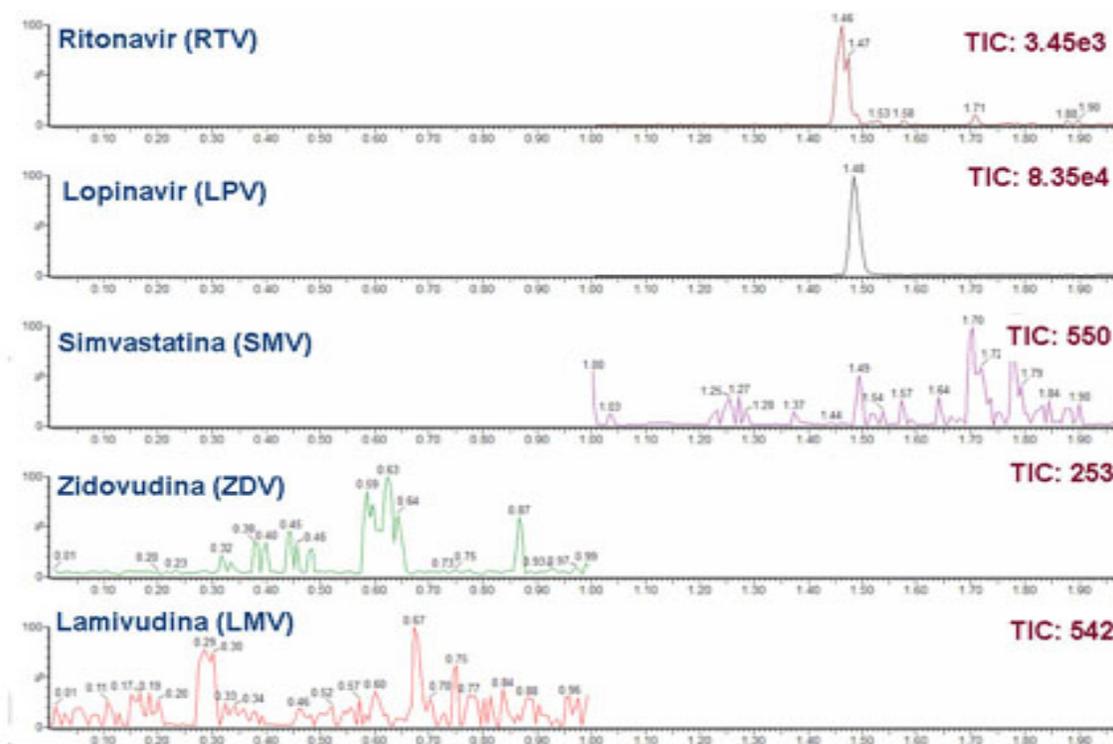


Figura 31a. Cromatogramas de los blancos en leche transición de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV

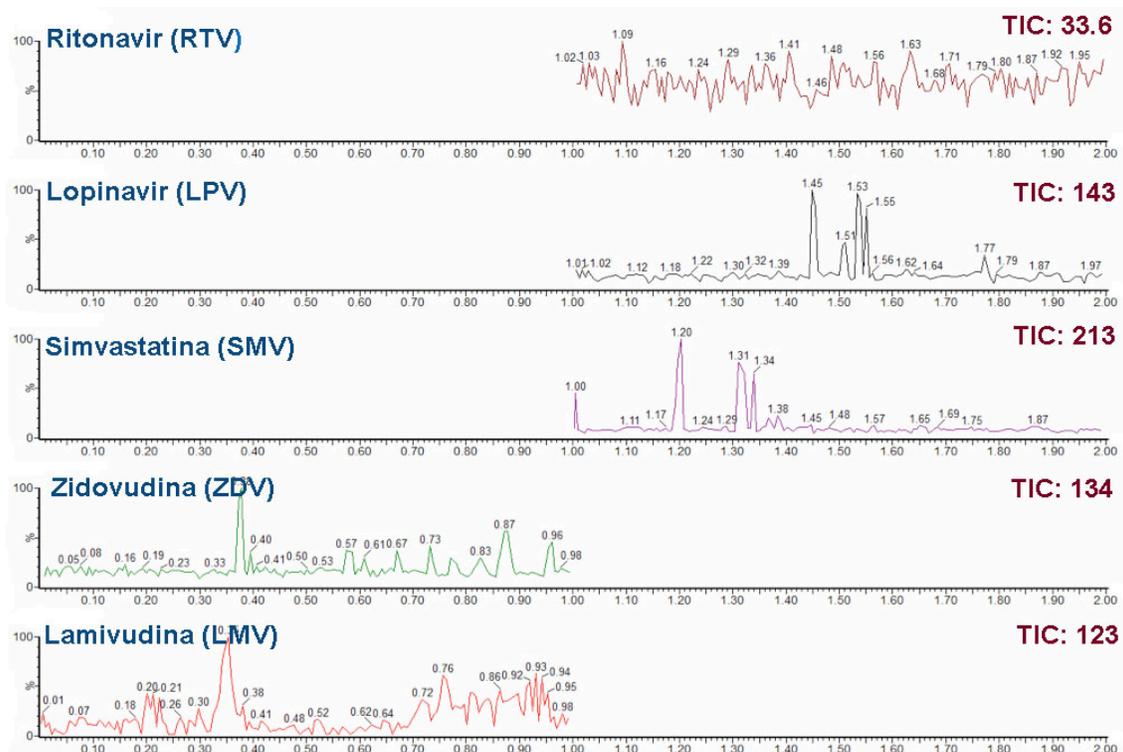


Figura 31b. Cromatogramas de los blancos en leche calostro de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV.

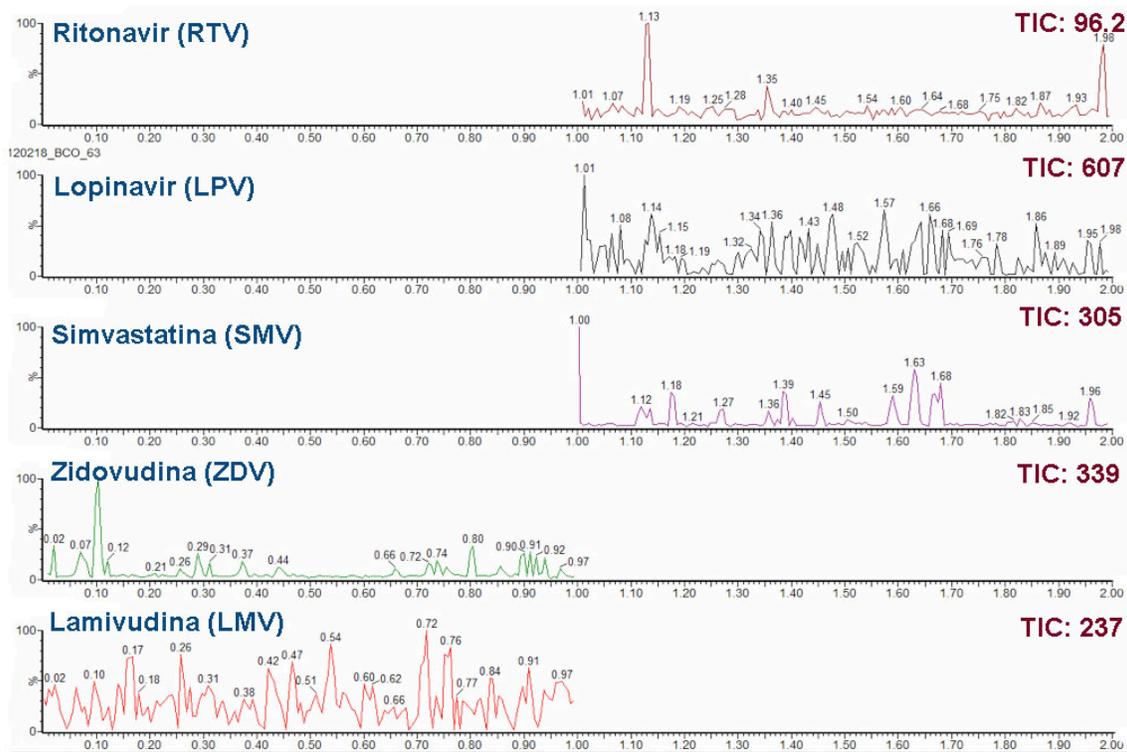


Figura 31c. Cromatogramas de los blancos en leche madura de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV.

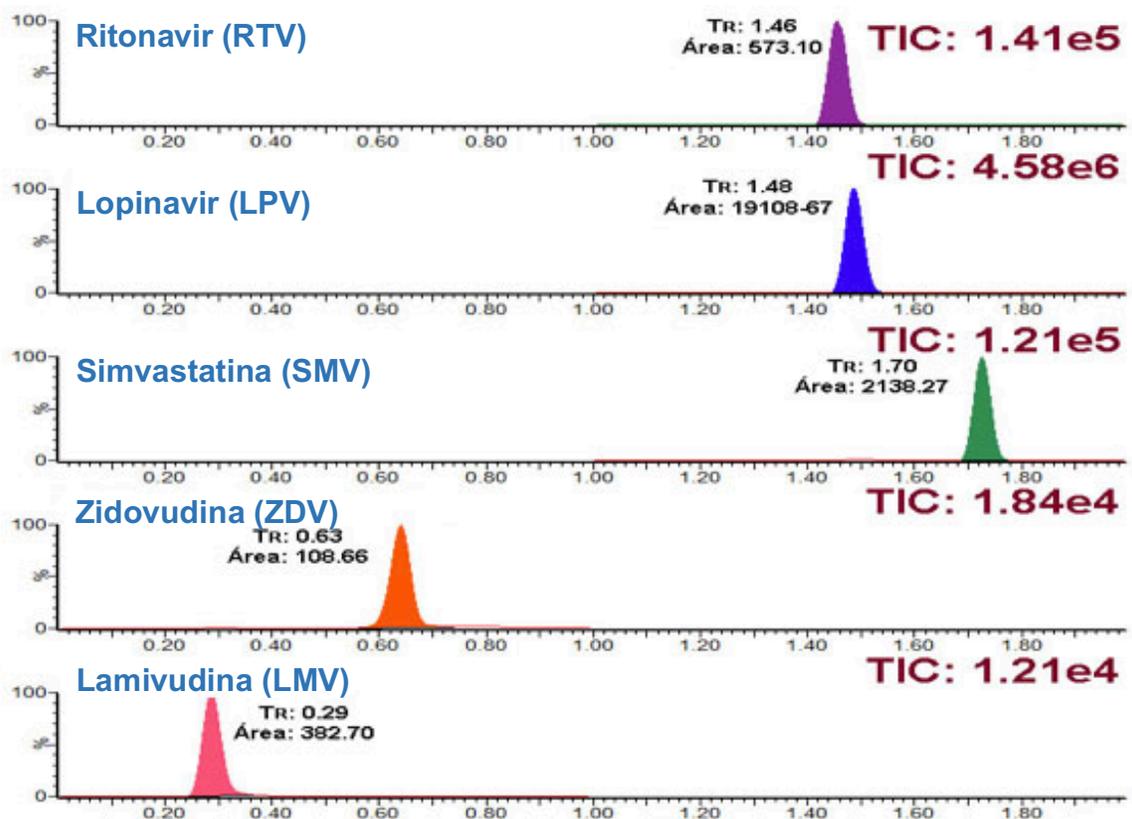


Figura 31d. Cromatogramas del LIC de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV.

7.1.4.3. Efecto Matriz

En la tabla 22 se observan los promedios obtenidos del Factor Matriz Normalizado (FMN) para los diferentes tipos de leche materna así como el % C.V. de dichos promedios. A diferencia del método reportado por Sánchez E., UNAM este parámetro cumple en su totalidad con el criterio de aceptación de la NOM-177-SSA1-2013 lo cual es importante ya que la cuantificación de la TARAA en leche materna de pacientes portadoras del VIH puede ser realizada en cualquier etapa en la que se encuentre.

Tabla 22. Efecto matriz en los diferentes tipos de leche materna

MATRIZ	Promedio de FMN (n=3)				
	Muestra control	LMV	ZDV	LPV	RTV
Muestra 1	MCB	0.34	0.95	0.85	0.86
	MCA	0.49	0.89	1.08	1.09
Muestra 2	MCB	0.42	0.74	0.70	0.70
	MCA	0.37	0.80	0.76	0.79
Muestra 3	MCB	0.35	0.79	0.71	0.71
	MCA	0.40	0.89	0.89	0.90
Muestra 4	MCB	0.31	0.85	0.79	0.81
	MCA	0.42	0.92	0.91	0.91
Muestra 5	MCB	0.31	0.88	0.77	0.78
	MCA	0.41	0.91	0.91	0.92
Muestra 6	MCB	0.45	0.85	0.74	0.73
	MCA	0.42	0.91	0.90	0.79
Muestra 7	MCB	0.37	0.72	0.66	0.71
	MCA	0.32	0.79	0.76	0.81
Muestra 8	MCB	0.42	0.77	0.70	0.73
	MCA	0.42	0.89	0.87	0.91
Muestra de transición	MCB	0.49	0.86	0.75	0.75
	MCA	0.35	0.84	0.79	0.84
Muestra de Calostro	MCB	0.37	0.82	0.79	0.74
	MCA	0.50	0.91	0.95	0.96
Promedio		0.40	0.85	0.81	0.82
Desviación Estándar		0.06	0.06	0.10	0.10
% C.V.		14.54	7.51	12.67	12.44

El efecto matriz afecta directamente a los analitos debido a la presencia de otros componentes ya sea en su disminución o elevación de la respuesta analítica (Boqué, R., *et. al.* 2001). Por tal motivo, es necesario que este parámetro sea aceptable bajo los criterios de la NOM-177-SSA1-2013, para poder así emitir resultados confiables en cualquier tipo de leche materna.

7.1.4.4. Efecto Acarreo

En la tabla 23 se reportan las áreas obtenidas en la muestra blanco después de la inyección del LSC. Esta evaluación denominada efecto acarreo cumplió con el criterio establecido por la NOM-177-SSA1-2013 por lo que el método brinda confiabilidad en la determinación de estos antirretrovirales entre muestras con concentraciones muy dispares, por ejemplo, entre una muestra de

concentraciones muy bajas seguida de la inyección de una muestra altamente concentrada, ambas con la misma confiabilidad en la determinación.

Al igual que en el método reportado por Sánchez E., 2016 entre inyecciones se empleo un lavado fuerte con la mezcla de los cuatro disolventes ACN:MeOH:H₂O:Isopropanol (1:2:3:4) acidificado con AF 0.1 % recomendado en la literatura como la mezcla altamente eficaz para evitar efecto acarreo y un lavado débil de ACN:H₂O (1:9) acidificado con AF 0.1 % cuya composición favorece altamente la solubilidad y limpieza de los cuatro analitos (Waters, 2017). Dichos lavados en conjunto disminuyeron el arrastre presentado por LPV y RTV principalmente, ya que aún cuando en los blancos se observó señal, esta no superó al 20 % del área del LIC (área promedio permitida).

Tabla 23. Efecto acarreo de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV (E.I.)

MUESTRA	Área				
	LMV	ZDV	LPV	RTV	SMV
Blanco	0	0	248.66	52.07	49.42
LSC	14766.12	3384.8	309234.47	14252.52	7215.15
Blanco	3.6	4.17	237.92	55.67	59.14
Blanco	0	7.81	329.17	42.51	72.56
LIC 1	200.39	189.5	6513.55	336.95	8087.1
LIC 2	197.19	192.81	7757.51	421.11	8248.88
Área permitida (20 % del LIC)	39.76	38.23	1427.11	75.81	408.40

En la tabla 23 se observa que el parámetro de efecto acarreo cumple con el criterio establecido por la NOM-177-SSA1-2013 por lo que el método brinda confiabilidad ya que no habrá interferencias entre inyecciones originadas por los mismos analitos. Al igual que el método reportado por Sánchez, E., 2016 se ocupó un lavado fuerte con ACN:MeOH:H₂O:Isopropanol acidificado con AF 0.1 % y un lavado débil de ACN:H₂O acidificado con AF 0.1 %, sin embargo las proporciones fueron diferentes (ver tabla 10, página 76). Dichos lavados se realizaron entre inyecciones lo que provocó que se haya disminuido el arrastre presentado por LPV y RTV.

7.1.4.5. Límite Inferior de la curva de calibración

Con los parámetros modificados para la obtención de los iones en el espectrómetro de masas y el eficiente proceso de extracción se alcanzó una mayor sensibilidad comparado con el método original. Esto permitió que se disminuyeran las concentraciones del LIC para cada antirretroviral y se tuviera una curva de calibración con un intervalo más amplio de niveles de concentración. Como se puede observar en la tabla 24, los porcentajes de desviación estándar absoluta (% DEA) para cada uno de los antirretrovirales para el nuevo LIC cumplen con el criterio de aceptación menor a 20 %. Del mismo modo, el criterio de aceptación para el % C.V. del LIC es de $\leq 20\%$, dichos datos serán presentados más adelante en la sección de precisión del método analítico.

Tabla 24. Límite inferior de la curva de calibración

ARV	LMV			ZDV		
	Concentración Nominal [ng/mL]	Concentración Experimental [ng/mL]	% DEA	Concentración Nominal [ng/mL]	Concentración Experimental [ng/mL]	% DEA
LIC 1	40	37.73	5.67	10	8.86	11.44
LIC 2		40.32	0.80		10.41	4.10
LIC 3		32.30	19.24		8.17	18.27
LIC 4		36.16	9.60		9.45	5.49
LIC 5		40.76	1.90		8.40	15.96
ARV	LPV			RTV		
LIC 1	160	180.70	13.56	8	8.12	1.56
LIC 2		165.56	3.48		8.33	4.12
LIC 3		153.33	4.16		8.41	5.09
LIC 4		158.06	1.21		8.52	6.51
LIC 5		175.20	9.50		7.06	11.72

7.1.4.6. Linealidad

Durante la evaluación de la linealidad, el modelo que mejor se ajustó a las curvas de calibración fue un modelo linealizado a la doble raíz cuadrada para los cuatro antirretrovirales (Tabla 25). Este tipo de linealización cumplió con todos y cada uno de las pruebas de validez del modelo (ver detalles en el Anexo E), además de que presenta una baja dispersión a bajos niveles de concentración para todos los casos.

Tabla 25. Modelo ajustado de LMV, ZDV, LPV y RTV

Analito	Modelo $Y = (b_0 + b_1 \cdot \sqrt{[\text{antirretroviral}]})^2$	Homoc*	ANOVA**	r^2
LMV	Área = $(6.17013 + 4.14539 \cdot \sqrt{[\text{Lamivudina}]})^2$	cumple	cumple	0.9985
ZDV	Área = $(0.970241 + 2.26287 \cdot \sqrt{[\text{Zidovudina}]})^2$	cumple	cumple	0.9973
LPV	Área = $(33.447 + 7.1832 \cdot \sqrt{[\text{Lopinavir}]})^2$	cumple	cumple	0.9978
RTV	Área = $(2.44327 + 6.32227 \cdot \sqrt{[\text{Ritonavir}]})^2$	cumple	cumple	0.9964

*Homocedasticidad, **ANOVA con falta de ajuste

Además, de que los intervalos de confianza de la pendiente [IC (b_1)] deben ser diferentes de cero, prueba que se resume en la Tabla 26.

Tabla 26. Intervalos de confianza de la pendiente de LMV, ZDV, LPV y RTV

Antirretroviral	IC (b_1) inferior*	IC (b_1) superior*	Ser $\neq 0$
LMV	4.0673	4.2235	cumple
ZDV	2.2061	2.3196	cumple
LPV	7.0215	7.3449	cumple
RTV	6.1408	6.5038	cumple

* IC (b_1) = $b_1 \pm t_{(0.975, n-2)} S_{b_1}$

Así mismo se demostró la precisión (% C.V.) y la exactitud (% DEA) de las curvas de calibración de cada antirretroviral en los diferentes niveles de concentración. En las Tablas 26-28 se muestra el % C.V. y el promedio del % DEA los cuales no sobrepasan el 15 % para todos los niveles de concentración a excepción del LIC que es del 20 % (NOM-177-SSA1-2013). Del mismo modo se observa en la figura 19 que para los cuatro curvas de calibración su coeficiente de determinación es mayor a 0.99.

Tabla 27. Precisión de la curva de calibración de LMV

Punto de la curva	Conc. Nominal [ng/mL]	Concentración experimental [ng/mL]			Desviación Estándar	% C.V.
		Curva 1	Curva 2	Curva 3		
1	40	34.00	32.94	37.61	2.45	7.03
2	500	545.73	543.81	508.40	21.02	3.95
3	1000	1043.04	983.33	949.23	47.48	4.79
4	1500	1434.16	1535.27	1523.22	55.23	3.69
5	2000	1993.68	2003.98	2031.81	19.73	0.98
6	2500	2484.95	2642.66	2458.78	99.47	3.93
7	3000	2954.04	2951.19	2937.20	9.01	0.31

Tabla 28. Exactitud de la curva de calibración de LMV

Conc. Nominal [ng/mL]	Curva 1		Curva 2		Curva 3	
	Conc. Experimental [ng/mL]	% DEA	Conc. Experimental [ng/mL]	% DEA	Conc. Experimental [ng/mL]	DEA
40	34.00	15.00	32.94	17.65	37.61	17.65
500	545.73	-9.15	543.81	8.76	508.40	8.76
1000	1043.04	-4.30	983.33	1.67	949.23	1.67
1500	1434.16	4.39	1535.27	2.35	1523.22	2.35
2000	1993.68	0.32	2003.98	0.20	2031.81	0.20
2500	2484.95	0.60	2642.66	5.71	2458.78	5.71
3000	2954.04	1.53	2951.19	1.63	2937.20	1.63

Tabla 29. Precisión de la curva de calibración de ZDV

Punto de la curva	Conc. Nominal [ng/mL]	Concentración experimental [ng/mL]			Desviación Estándar	% C.V.
		Curva 1	Curva 2	Curva 3		
1	10	11.90	11.20	11.90	0.61	5.40
2	125	125.36	116.52	125.36	4.65	3.82
3	250	238.50	232.80	238.50	19.10	7.75
4	375	382.99	364.65	382.99	17.30	4.73
5	500	496.47	508.93	496.47	8.22	1.63
6	625	678.19	604.64	678.19	38.46	6.06
7	750	767.19	764.69	767.19	26.73	3.56

Tabla 30. Exactitud de la curva de calibración de ZDV

Conc. Nominal [ng/mL]	Curva 1		Curva 2		Curva 3	
	Conc. Experimental [ng/mL]	% DEA	Conc. Experimental [ng/mL]	% DEA	Conc. Experimental [ng/mL]	% DEA
10	10.68	6.84	11.90	18.96	11.20	12.02
125	123.48	1.22	125.36	0.28	116.52	6.78
250	268.35	7.34	238.50	4.60	232.80	6.88
375	348.42	7.09	382.99	2.13	364.65	2.76
500	511.99	2.40	496.47	0.71	508.93	1.79
625	621.91	0.49	678.19	8.51	604.64	3.26
750	719.70	4.04	767.19	2.29	764.69	1.96

Tabla 31. Precisión de la curva de calibración de LPV

Punto de la curva	Conc. Nominal [ng/mL]	Concentración experimental [ng/mL]			Desviación Estándar	% C.V.
		Curva 1	Curva 2	Curva 3		
1	160	164.83	149.35	152.89	8.11	5.21
2	2000	2120.73	2126.50	1925.81	114.24	5.55
3	4000	4189.29	3926.38	3774.28	209.95	5.30
4	6000	5801.44	6033.47	6019.81	130.20	2.19
5	8000	7899.47	7980.71	8054.38	77.49	0.97
6	10000	9932.16	10774.19	9497.88	648.92	6.45
7	12000	11395.99	12295.48	12310.38	523.67	4.36

Tabla 32. Exactitud de la curva de calibración de LPV

Conc. Nominal [ng/mL]	Curva 1		Curva 2		Curva 3	
	Conc. Experimental [ng/mL]	% DEA	Conc. Experimental [ng/mL]	% DEA	Conc. Experimental [ng/mL]	% DEA
160	164.83	3.02	149.35	6.66	152.89	4.44
2000	2120.73	6.04	2126.50	6.33	1925.81	3.71
4000	4189.29	4.73	3926.38	1.84	3774.28	5.64
6000	5801.44	3.31	6033.47	0.56	6019.81	0.33
8000	7899.47	1.26	7980.71	0.24	8054.38	0.68
10000	9932.16	0.68	10774.19	7.74	9497.88	5.02
12000	11395.99	5.03	12295.48	2.46	12310.38	2.59

Tabla 33. Precisión de la curva de calibración de RTV

Punto de la curva	Conc. Nominal [ng/mL]	Concentración experimental [ng/mL]			Desviación Estándar	% C.V.
		Curva 1	Curva 2	Curva 3		
1	8	7.84	9.12	7.76	0.77	9.30
2	100	103.95	106.19	100.05	3.11	3.01
3	200	208.62	190.11	186.78	11.77	6.03
4	300	278.07	292.94	280.15	8.05	2.84
5	400	387.60	387.11	394.52	4.14	1.06
6	500	506.83	541.62	478.70	31.52	6.19
7	600	593.98	636.87	626.64	22.40	3.62

Tabla 34. Exactitud de la curva de calibración de RTV

Conc. Nominal [ng/mL]	Curva 1		Curva 2		Curva 3	
	Conc. Experimental [ng/mL]	% DEA	Conc. Experimental [ng/mL]	% DEA	Conc. Experimental [ng/mL]	% DEA
8	7.84	1.96	9.12	14.05	7.76	3.06
100	103.95	3.95	106.19	-6.19	100.05	0.05
200	208.62	4.31	190.11	4.94	186.78	6.61
300	278.07	7.31	292.94	2.35	280.15	6.62
400	387.60	3.10	387.11	3.22	394.52	1.37
500	506.83	1.37	541.62	8.32	478.70	4.26
600	593.98	1.00	636.87	6.14	626.64	4.44

7.1.4.7. Precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y exactitud

Como se puede observar en la tabla 35, la precisión (% C.V.) del método analítico a través del análisis de las muestras control cumplió con los criterios de aceptación de la NOM-177-SSA1-2013. Esto indica que la cuantificación de la TARA en leche materna de pacientes portadoras del VIH del INPer es confiable en un mismo día (repetibilidad) o en diferentes días de análisis (reproducibilidad).

Tabla 35. Precisión Intra-Día e Inter-Día para los fármacos antirretrovirales de la TARAA

Punto Control	ARV	Conc. Nominal	Precisión Intra-Día (Repetibilidad)				Precisión Inter-Día (Reproducibilidad)			
			Promedio de Conc. Exp. (n= 5)	DE	Precisión (% C.V.)	Exactitud (100 %- % DEA)	Promedio de Conc. Exp. (n= 5)	DE	Precisión (% C.V.)	Exactitud (100 %- % DEA)
LIC	LMV	40	34.42	0.76	2.19	86.04	35.67	0.88	2.45	89.58
MCB		180	179.30	7.02	3.91	99.61	166.26	6.02	3.62	92.37
MCM		1200	1150.62	31.43	2.73	95.89	1165.65	40.21	3.45	97.14
MCA		2400	2258.75	91.47	4.05	94.11	2231.20	80.59	3.61	92.97
MCD		1125	1100.67	25.97	2.36	97.84	1157.87	14.08	1.22	97.13
LIC	ZDV	10	10.30	0.52	5.07	96.95	10.79	0.77	7.12	92.12
MCB		45	45.07	2.07	4.60	99.84	47.02	1.62	3.46	95.52
MCM		300	290.48	9.47	3.43	96.83	309.08	7.08	2.29	96.97
MCA		600	596.66	25.90	4.34	99.44	612.66	6.81	1.11	97.89
MCD		281.25	280.20	12.22	4.36	99.63	282.56	7.40	2.62	99.54
LIC	LPV	160	167.09	4.21	2.52	95.57	159.59	4.81	3.01	99.74
MCB		720	735.96	44.12	5.99	97.78	726.60	50.22	6.91	99.08
MCM		4800	4482.74	362.60	8.09	93.39	4921.02	156.51	3.17	97.27
MCA		9600	9815.91	582.61	5.92	97.75	9577.43	407.95	4.26	99.76
MCD		4500	4451.88	229.29	5.15	98.93	4376.62	94.43	2.16	97.26
LIC	RTV	8	7.73	0.57	7.36	96.57	8.17	0.22	2.70	97.83
MCB		30	29.43	3.59	12.19	98.09	27.20	0.85	3.13	90.66
MCM		240	231.78	12.34	5.32	96.57	237.06	2.42	1.02	98.77
MCA		480	489.70	30.59	6.25	97.98	466.91	16.10	3.45	97.27
MCD		225	222.70	15.25	6.85	98.98	223.14	11.48	5.14	99.17

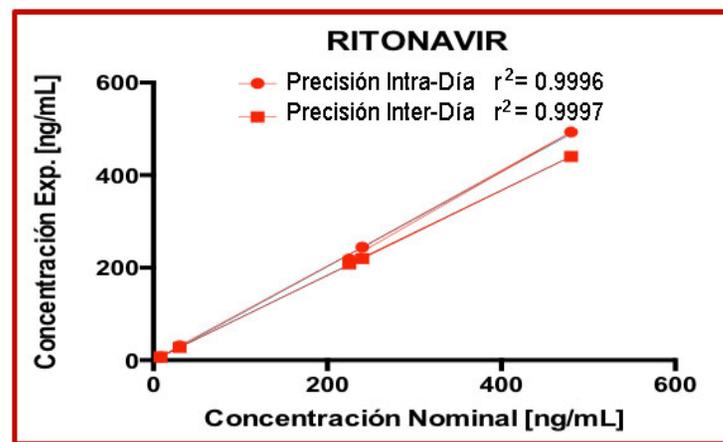
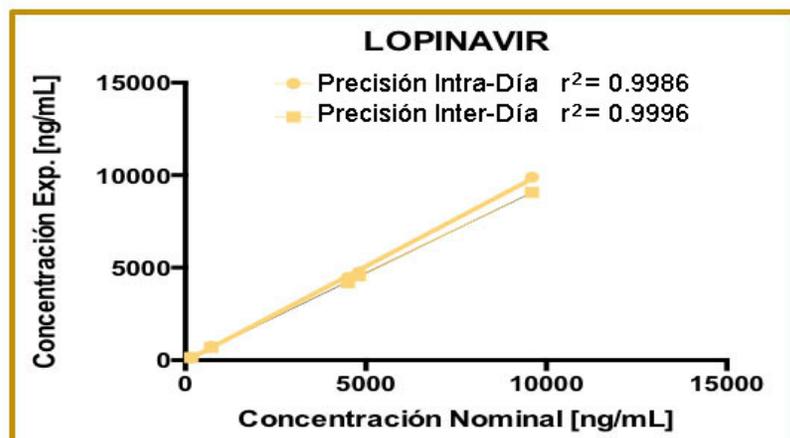
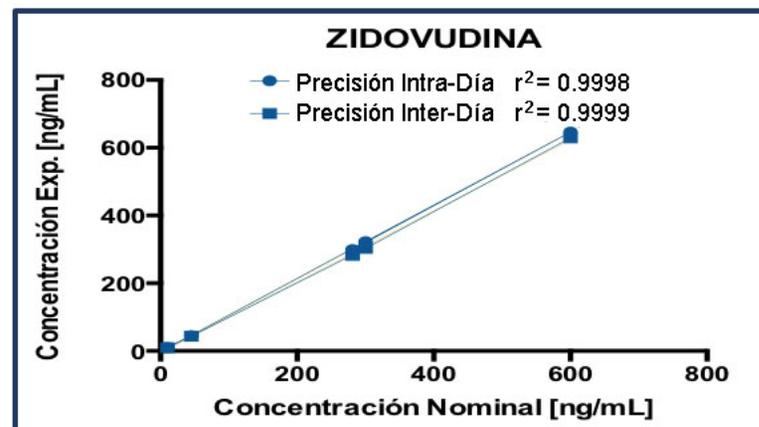
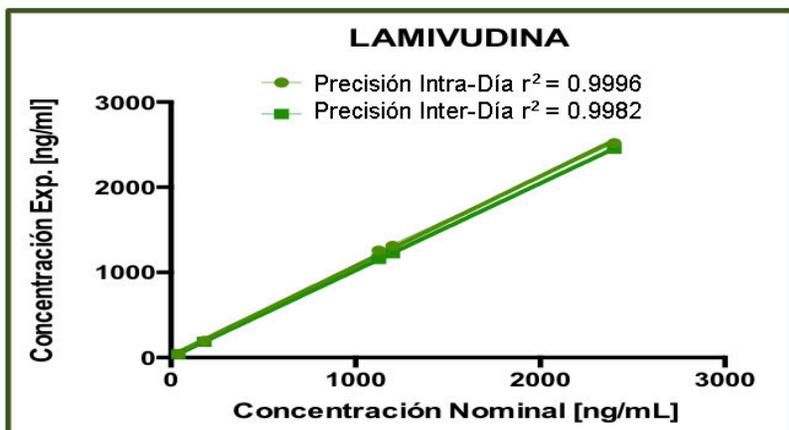


Figura 32. Correlación de la concentración nominal vs concentración experimental [ng/mL] para la precisión Intra-Día (n=3) e Inter-Día (n=3) para cada antirretroviral

Asimismo, cabe destacar que la optimización de este método permitió que la muestra control diluida cumpliera con el criterio de aceptación, a diferencia del método reportado por Sánchez E., 2016, brindando la opción de cuantificar muestras que se encuentren por arriba del LSC.

Con la finalidad de observar de forma gráfica la precisión y exactitud intra-día e inter-día del método, se muestra la correlación entre las concentraciones nominales vs concentraciones experimentales [ng/mL] utilizando la MCB, MCM y MCA para cada uno de los antirretrovirales de la TARAA (Figura 33).

7.1.4.8. Estabilidad

En la tabla 36 se muestra la estabilidad de las muestras procesadas después de 24 h a 23 °C y a 8 °C; muestras no procesadas después de 24 h a 23 °C y a 8 °C; muestras en el automuestreador a 5 °C, ciclos de congelación y descongelación (n=3) y estabilidad de corto y largo plazo (4 h y 2 semanas respectivamente)

Tabla 36. Estabilidad de los antirretrovirales en muestras procesadas y no procesadas a diferentes tiempos y a diferentes temperaturas

Estabilidad	Punto Control	LMV		ZDV		LPV		RTV	
		Precisión (% C.V.)	Exactitud (100 %- % DEA)	Precisión (% C.V.)	Exactitud (100 %- % DEA)	Precisión (% C.V.)	Exactitud (100 %- % DEA)	Precisión (% C.V.)	Exactitud (100 %- % DEA)
Muestra procesada (24 h a 23 °C)	MCB	3.14	91.71	0.29	89.49	4.30	94.73	6.25	93.33
	MCM	3.14	94.20	5.33	92.25	2.18	92.11	0.11	85.47
	MCA	3.46	97.49	4.08	96.71	2.99	92.06	8.42	94.29
Muestra procesada (24 h a 8 °C)	MCB	6.41	91.71	1.00	89.49	1.63	94.73	4.85	94.45
	MCM	4.42	94.20	6.56	92.25	8.80	92.11	3.66	89.40
	MCA	0.14	97.49	6.33	91.71	5.96	92.06	10.89	90.93
Muestra no procesada (24 h a 23 °C)	MCB	4.47	84.37	2.29	89.67	3.78	90.85	2.95	96.53
	MCM	2.61	85.82	2.30	96.95	6.30	85.78	1.74	86.65
	MCA	0.94	90.15	3.23	92.24	2.60	87.11	7.48	93.93
Muestra no procesada (24 h a 8 °C)	MCB	3.44	93.91	5.94	90.19	4.98	95.44	4.13	94.30
	MCM	5.01	89.70	2.54	94.95	5.55	87.47	2.61	90.21
	MCA	0.85	92.95	0.58	97.91	3.90	91.61	0.94	90.10
Automuestreador	MCB	4.76	88.94	1.58	87.83	5.46	93.49	5.66	93.70
	MCM	1.19	99.22	2.08	89.98	5.44	92.23	4.63	90.47
	MCA	11.85	91.97	2.33	98.45	7.68	94.72	6.33	91.25
Ciclos de congelación-descongelación	MCB	1.93	90.88	1.97	87.09	3.70	89.26	4.45	94.63
	MCM	3.00	93.68	8.89	91.90	4.40	92.77	3.07	88.52
	MCA	7.15	93.65	4.37	96.67	6.60	93.33	5.74	95.92
Corto plazo	MCB	9.17	93.40	2.53	97.04	6.11	92.67	3.26	96.53
	MCM	5.43	95.30	4.56	89.33	1.56	89.72	2.92	88.23
	MCA	2.79	97.80	6.42	94.35	1.73	98.21	5.74	95.95
Largo plazo	MCB	1.09	88.10	12.25	89.03	2.55	96.60	5.88	93.33
	MCM	9.39	91.05	5.12	89.14	1.09	90.98	4.63	90.47
	MCA	9.62	92.30	2.40	92.18	2.86	97.82	6.33	91.25

Como se puede observar en la tabla 36 solo la muestra no procesada en 24 h a 23 °C no cumplió con el criterio de aceptación de la NOM-177-SSA1-2013. Esto se atribuye a la estabilidad de la propia matriz a esta temperatura. Por tal motivo, sólo en esta condición no se puede cuantificar de manera confiable los antirretrovirales de la TARAA en leche materna de pacientes portadoras de VIH.

7.1.4.9. Recobro

En la tabla 37 se observa el % de recobro para las MCB, MCM y MCA de cada antirretroviral.

Tabla 37. Porcentaje de recobro de las muestras control (n=5) para LMV, ZDV, LPV y RTV

MUESTRA	% DE RECOBRO (n = 10)			
	LMV	ZDV	LPV	RTV
MCB	87	87	86	90
MCM	90	81	84	87
MCA	91	84	87	89
PROMEDIO	89.33	84.00	85.67	88.67
DE	2.08	3.00	1.53	1.53
% C.V.	2.33	3.57	1.78	1.72

Se puede observar que el % de recobro promedio para cada antirretroviral es mayor del 84 % siendo para zidovudina el porcentaje de recobro más bajo. Sin embargo, todos los analitos presentan un % C.V. menor al 15 %.

A continuación se muestra el resumen de la validación de este trabajo bajo los criterios de la NOM-177-SSA1-2013.

Tabla 38. Resumen de la validación

Parámetros	RESULTADOS				CRITERIO DE ACEPTACIÓN
	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
Efecto matriz	14.54	7.51	12.67	12.44	EI % CV del FMN <15 %.
Efecto 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 E.I.
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. % 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 %.
Repetibilidad	LIC: 2.19 MCB: 3.91 MCM: 2.73 MCA: 4.05 MCD: 2.36	LIC: 5.07 MCB: 4.60 MCM: 3.43 MCA: 4.34 MCD: 4.36	LIC: 2.52 MCB: 5.99 MCM: 8.09 MCA: 5.92 MCD: 5.15	LIC: 7.36 MCB: 12.19 MCM: 5.32 MCA: 6.25 MCD: 6.85	% CV < 15 % para las MC y <20 % para el LIC.
Reproducibilidad	LIC: 2.45 MCB: 3.62 MCM: 3.45 MCA: 3.61 MCD: 1.22	LIC: 7.12 MCB: 3.46 MCM: 2.29 MCA: 1.11 MCD: 2.62	LIC: 3.01 MCB: 6.91 MCM: 3.17 MCA: 4.26 MCD: 2.16	LIC: 2.70 MCB: 3.13 MCM: 1.02 MCA: 3.45 MCD: 5.14	% CV < 15 % para las MC y <20 % para el LIC.
Exactitud	LIC: 13.96 MCB: 0.39 MCM: 4.11 MCA: 5.89 MCD: 2.16	LIC: 3.05 MCB: 0.16 MCM: 3.17 MCA: 0.56 MCD: 0.37	LIC: 4.43 MCB: 2.22 MCM: 6.61 MCA: 2.25 MCD: 1.07	LIC: 3.43 MCB: 1.91 MCM: 3.43 MCA: 2.02 MCD: 1.02	El promedio de % DEA < 15 % en los datos obtenidos en reproducibilidad.
Recobro	Promedio: 89.33 % CV: 2.33	Promedio: 84.00 % CV: 3.00	Promedio: 85.67 % CV: 1.78	Promedio: 88.67 % CV: 1.72	No necesariamente debe ser el 100 %, pero debe ser reproducible.
Estabilidad	Las muestras no procesadas son estables a temperatura ambiente, refrigeración (8 °C), congelación (-84 °C) por 24 horas Las muestras procesadas son estables a temperatura ambiente, automuestreador (5 °C) por 24 h				La muestra se considera estable a las condiciones evaluadas si el % DEA < 15 % de la concentración nominal.

8. Cuantificación de LMV, ZDV, LPV y RTV en pacientes portadoras de VIH

Posterior a la validación del método analítico y demostrando su confiabilidad, se cuantificaron estos fármacos antirretrovirales de la TARAA en 24 muestras de leche materna (calostro) de pacientes portadoras del VIH que fueron atendidas en el Instituto Nacional de Perinatología, todas con el mismo régimen antirretroviral. En la tabla 39 se reportan los resultados de los parámetros que fueron evaluados el día del análisis de las muestras. Se puede observar que los 4 parámetros evaluados cumplen con el criterio de aceptación de la NOM-177-SSA1-2013 originando confiabilidad a la cuantificación realizada.

Tabla 39. Parámetros evaluados en la cuantificación de los antirretrovirales en leche materna

PARÁMETRO	RESULTADO				CRITERIO DE ACEPTACIÓN
	LMV	ZDV	LPV	RTV	
Adecuabilidad del sistema	3.70	4.47	4.85	2.40	Respuesta <6 %
Efecto de acarreo	No existen interferencias significativas en el tiempo de retención de los fármacos				Repuesta <20 % del LIC de cada antirretroviral y < 5 % para el EI
Linealidad	>0.99 en todas las curvas de calibración de los fármacos antirretrovirales de la TARAA. En todas las curvas de calibración se obtuvieron %DEA menor al 15 %.				% DEA <15 % para cada nivel de concentración y <20 % para los LIC
Precisión	MCB: 4.84 MBM: 1.81 MCA: 4.82	MCB: 12.69 MBM: 3.71 MCA: 2.44	MCB: 3.85 MBM: 4.71 MCA: 4.25	MCB: 3.94 MBM: 0.54 MCA: 0.98	El % C.V. debe de ser <15 para las MCB. MCM. MCA
Exactitud	MCB: 99.44 MBM: 98.30 MCA: 99.38	MCB: 98.26 MBM: 98.61 MCA: 99.14	MCB: 98.58 MBM: 98.76 MCA: 98.17	MCB: 99.55 MBM: 99.46 MCA: 99.02	El % DEA debe de ser <15 % para las MCB. MCM. MCA

En la tabla 40 se muestran las concentraciones de cada antirretroviral excretadas a través de la leche materna.

Tabla 40. Concentración de los antirretrovirales de la TARAA en leche materna de pacientes VIH+ del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”

MUESTRA	CONCENTRACIÓN CALCULADA [ng/mL]				ESQUEMA
	LMV	ZDV	LPV	RTV	
Muestra 1	ND	ND	540.30	ND	Kaletra® Combivir®
Muestra 2	438.88	ND	193.47	52.76	Kaletra® Combivir®
Muestra 3	409.83	ND	2116.51	30.19	Kaletra® Combivir®
Muestra 4	238.78	ND	1754.16	91.13	Kaletra® Combivir®
Muestra 5	318.81	ND	ND	ND	Kaletra® Combivir®
Muestra 6	49.12	ND	2138.50	144.83	Kaletra® Combivir®
Muestra 7	405.50	17.29	994.15	35.54	Kaletra® Combivir®
Muestra 8	295.72	10.03	ND	ND	Kaletra® Combivir®
Muestra 9	178.96	64.40	1266.17	159.67	Kaletra® Combivir®
Muestra 10	347.42	ND	1480.69	138.26	Kaletra® Combivir®
Muestra 11	383.57	ND	ND	10.50	Kaletra® Combivir®
Muestra 12	123.40	ND	465.26	79.55	Kaletra® Combivir®
Muestra 13	61.24	ND	1758.89	347.29	Kaletra® Combivir®
Muestra 14	496.46	46.81	560.31	53.29	Kaletra® Combivir®
Muestra 15	245.46	233.11	195.12	27.30	Kaletra® Combivir®
Muestra 16	355.90	226.09	ND	ND	Kaletra® Combivir®
Muestra 17	ND	ND	161.49	123.92	Kaletra® Combivir®
Muestra 18	75.43	34.62	ND	14.43	Kaletra® Combivir®
Muestra 19	726.66	ND	1451.53	56.27	Kaletra® Combivir®
Muestra 20	276.76	ND	594.69	22.00	Kaletra® Combivir®
Muestra 21	377.43	ND	1220.59	67.18	Kaletra® Combivir®
Muestra 22	348.11	ND	842.83	49.44	Kaletra® Combivir®
Muestra 23	225.15	106.12	814.18	86.51	Kaletra® Combivir®
Muestra 24	512.32	72.96	1121.05	84.19	Kaletra® Combivir®
PROMEDIO	313.2231818	90.16	1035.26	83.71	
D.E.	162.4911028	84.28	630.19	76.11	
% C.V.	51.87709986	93.48	60.87	90.92	

ND: No detectable

Como se puede observar existe una alta variabilidad interindividual en la excreción de estos antirretrovirales. Es notable observar alta excreción de fármacos inhibidores de la proteasa como LPV y RTV, cuya unión a proteínas es alta y de acuerdo a la literatura no son excretados o bien su excreción a través de la leche materna es baja. La figura 34a representa el cromatograma correspondiente a la Muestra 13. Dicha muestra presentó las concentraciones mas altas de LPV y RTV con respecto a las demás muestras analizadas y tuvo un TIC de $2.86e^7$ lo cual es razonable debido a la alta concentración de LPV. Del mismo modo, el espectro de masas obtenido en el momento de la cuantificación corresponde a la fragmentación de LPV (Figura 34b).

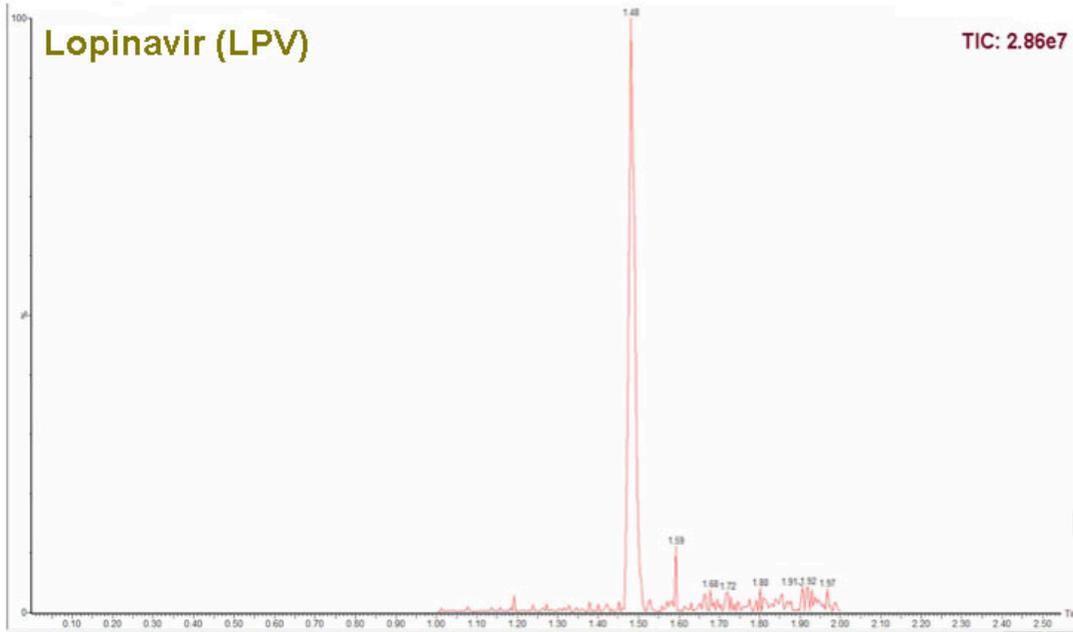


Figura 33a. Cromatograma de LPV de la Muestra 13

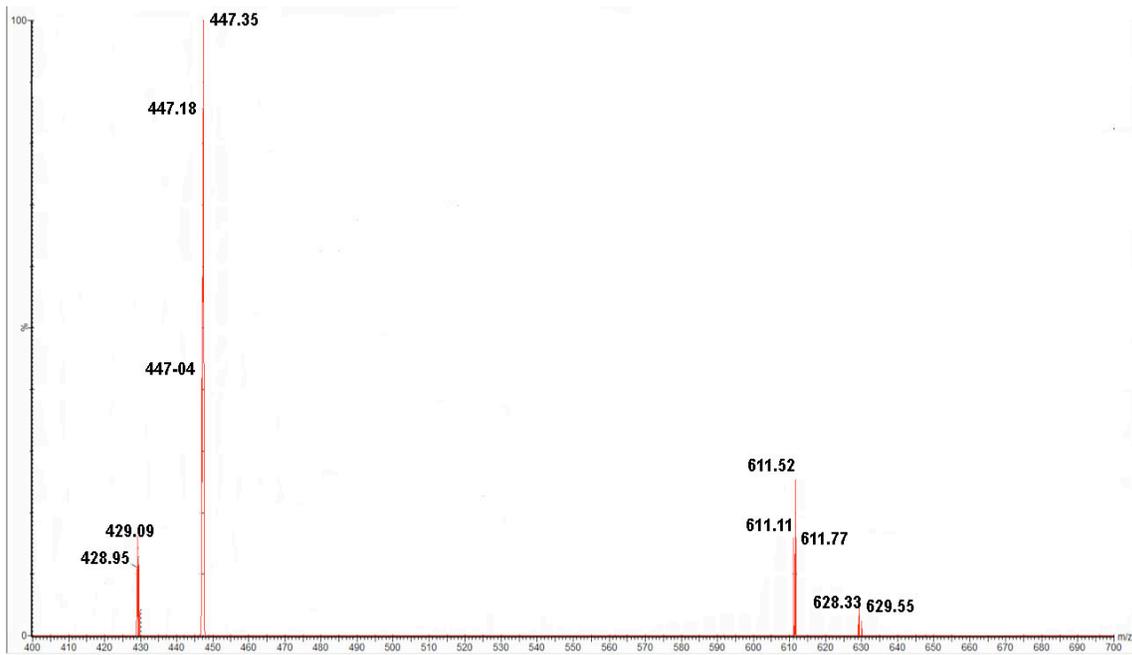


Figura 33b. Espectro de masas de LPV de la Muestra 13

9. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVA

- Se optimizó el método de detección por espectrometría de masas en tándem para la cuantificación de lamivudina, zidovudina, lopinavir y ritonavir, lo cual permitió alcanzar mayor sensibilidad para cada uno de los antirretrovirales.
- La modificación en el gradiente de elución para la separación cromatográfica de los fármacos antirretrovirales, logró reducir el tiempo de análisis, así como la cantidad de disolventes utilizados.
- La optimización del método de extracción mediante el aumento de la concentración de ácido fórmico como agente precipitante favoreció en la reproducibilidad del método analítico.
- La optimización de las diversas condiciones planteadas permitieron disminuir el volumen de muestra necesario para hacer la cuantificación de 200 μL a 100 μL , esta optimización fue muy favorable debido a la escasa cantidad de muestra obtenida para su análisis.
- El método cumplió con todos los criterios de aceptación de la NOM-177-SSA1-2013 demostrando selectividad, linealidad, precisión y exactitud para lamivudina, zidovudina, lopinavir y ritonavir. De igual manera, el método optimizado no mostró “Efecto matriz”, siendo este un problema para el método reportado por Sánchez, E., 2016.
- Al aplicar el método analítico final en la cuantificación de la TARAA muestras de leche materna de pacientes portadoras del VIH atendidas en el Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”, se observó de alta excreción de lopinavir y ritonavir en contraste con lo reportado en la literatura.

Perspectiva:

- Evaluar que tipo de correlación existe entre las concentraciones de lamivudina, zidovudina, lopinavir y ritonavir en plasma y leche materna .
- Realizar estudios sobre el uso de regímenes específicos y los efectos secundarios que estos tendrían en cuanto a la madre y al neonato en población mexicana, ya que la cuantificación de los fármacos antirretrovirales no es suficiente para afirmar que la lactancia materna en pacientes portadoras del VIH es segura.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anaya L. Espinosa F. Cruz R., (2001). Relaciones Químicas entre Organismos Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación. 186.
- Arendt V, Ndimubanzi P, Vyankandondera J, et al. AMATA study: effectiveness of antiretroviral therapy in breastfeeding mothers to prevent post-natal vertical transmission in Rwanda. Cross-track session: 4th IAS Conference on Pathogenesis, Treatment and Prevention. 2007 Jul 22-25; Sydney (NSW)
- Artabe A. (2016). Determinación de testosterona en muestras de orina mediante análisis por Dilución Isotópica y Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas en tándem
- Ballard O. (2014). Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. National Institutes of Health, 1, 24.
- Bedri A, Gudetta B, Isehak A, et. al. Extended-dose nevirapine to 6 weeks of age for infants to prevent HIV transmission via breastfeeding in Ethiopia, India, and Uganda: an analysis of three randomized controlled trials. Lancet 2008; 372: 300-13
- Boque R., Maroto A. Riu J. (2001) Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays.
- Borja M., Vázquez I. López M. Vargas F. (2010) Precipitación isoeléctrica de la Caseína de la Leche.
- C. M. Phechkrajang. (2009). Quantitative Determination of Lopinavir and Ritonavir in Syrup Preparation by Liquid Chromatography. Mahidol University Journal of Pharmaceutical Science, 1, 12.
- Cárdenas A., Hernández M. Sabogal A. Trilleras E. (2015). Cromatografía Líquida HPLC
- CENSIDA. Estudio: Causales Críticas asociadas a la TRANSMISIÓN VERTICAL del VIH y SÍFILIS CONGÉNITA. Consultado en Marzo 2018.
- Corbett A. (2014). Antiretroviral pharmacokinetics in mothers and breastfeeding infants from 6 to 24 weeks post partum: results of the BAN Study. National Institutes of Health, 1, 18.

- Cuadros, R. (2013). Glosario de términos analíticos. Grupo Regional Andaluz, Sociedad Española de Química Analítica. 10.
- Drugbank. Annert P. Stieger B. (2010) Interaction of HIV pretease inhibitors with OATP1B1, 1B3 AND 2B1. Xenobiotica Consultado en Noviembre 2017. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01601>
- Espectrometría de masas (s.f.). (Consultado Octubre 2017). <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8249/4/T5masas.pdf>
- FDA. (2018). Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry
- Fernández C., Vela M., Ibarra I., (2009). Espectrometría de masas en tándem: una nueva herramienta para el estudio de la metabolómica en pediatría.
- GAELTDA. Grupo alianza estrategica GAE LTDA. (2014). Consultado en Noviembre 2018. <https://www.gaeltda.com/cromatografia.html>
- Gallardo A., Afani A. (2011). Resistencia a la terapia antirretroviral en la infección por virus de inmunodeficiencia humana
- García F. (2014). El uso de distintas matrices de MALDI-MS para el análisis de proteínas intactas y su comparación con ESI-MS
- Gómez C. Ballesteros M. (2010). Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores.
- Ibarra O. (2002). Farmacología de los antirretrovirales. Hospital de Galdakao España
- InfoSIDA. El ciclo de vida del VIH. Consultado en Agosto 2017.
- IUPAC, (1989). Nomenclature for automated and mechanized analysis. Matriz effect. 1660. <https://goldbook.iupac.org/html/M/M03759.html>
- Johnson V., Brun-Vézinet F., Clotet B., (2010). Update of the drug resistance mutations in HIV-1.
- Kilewo C, Karisson K, Ngarina M, et al. Prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 through breastfeeding by treating mothers
- Kumwenda N, Hoover D, Mofenson L, (2008). Extended antiretroviral prophylaxis to reduce HIV-1 transmission.

- Martínez M. (2016). Desarrollo y validación de un método analítico por UPLC-MS/MS para la cuantificación de fármacos antirretrovirales en plasma humano.
- Masaba R, Ndivo R, (2008) Prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 among breastfeeding mothers using HAART: the Kisumu Breastfeeding Study, Kisumu, Kenya, 2003–2007.
- Masaba R, Ndivo R, *et. al.* Prevention of mother-to-child transmission of HIV-1 among breastfeeding mothers using HAART: the Kisumu Breastfeeding Study, Kisumu, Kenya, 2003-2007. 15th Conference on Retro- viruses and Opportunistic Infections; 2008 Feb 3-6; Boston (MA)
- Miotti P, Taha T, Kumwenda N, *et al.* HIV transmission from breastfeeding: a study in Malawi. JAMA 1999; 282: 744-9
- Mirochnick, M., 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.
- National Cancer Institute, (Consultado Octubre 2017).
- Norma Oficial Mexicana. NOM-177-SSA1-2013. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.
- Olagunju, A., Bolaji, O., Amara, A., Waitt, C., 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 Antmicrobial Chemotherapy, 1-7.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), (2016) transmisión del VIH de la madre al niño.
- Palombi L, Marazzi M, Voetberg A, *et al.* Treatment acceleration program experience of the DREAM program in prevention of mother-to-child transmission of HIV. AIDS 2007; 21 Suppl. 4: S65-71
- Pubchem Compound Database. National Center for Biotechnology Information.

(Consultado Septiembre 2017).

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/92727#section=Top>

- Rely K., Martínez S. (2013). Análisis de minimización de Costo e Impacto Presupuestario del Tratamiento ARV con Abacavir/Lamivudina para el VIH/SIDA en México.
- Rezk N., White N., Bridges A., (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.
- Sánchez E. (2016). Desarrollo y Validación de un Método Analítico por UPLC-MS/MS para la cuantificación de fármacos antirretrovirales en leche materna. Universidad Nacional Autónoma de México. 1,129.
- Shapiro L. (2015). Antiretroviral Concentrations in Breast-Feeding Infants of Women in Botswana Receiving Antiretroviral Treatment. Major Article, 1, 8.
- Skoog D., Holler J., Nieman T., (1997). Principios de Análisis instrumental. 785.
- Slater M, Stringer E., Stringer J. (2010). Breastfeeding in HIV-Positive Women What Can be Recommended?. *Pediatr Drugs*, 1, 9.
- Thior I, Lockman S, Smeaton L, et al. Breastfeeding plus infant zidovudine prophylaxis for 6 months versus formula feeding plus infant zidovudine for 1 month to reduce mother-to-child HIV transmission in Botswana: a randomized trial. *The Mashi Study. JAMA* 2006; 296: 794-805
- UNICEF, (1995). La leche humana, composición, beneficios y comparación la la leche de vaca. Chile.
- Waters. Consultado en Noviembre 2017. http://www.waters.com/waters/es_ES/Original-UPLC-UHPLC-system-with-sub-2-micron-particle-technology-for-separations/nav.htm?cid=514207&locale=es_ES
- Waters. Soluciones para preparación de muestras. Consultado en Noviembre 2017. <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720000848es.pdf>

7. ANEXOS

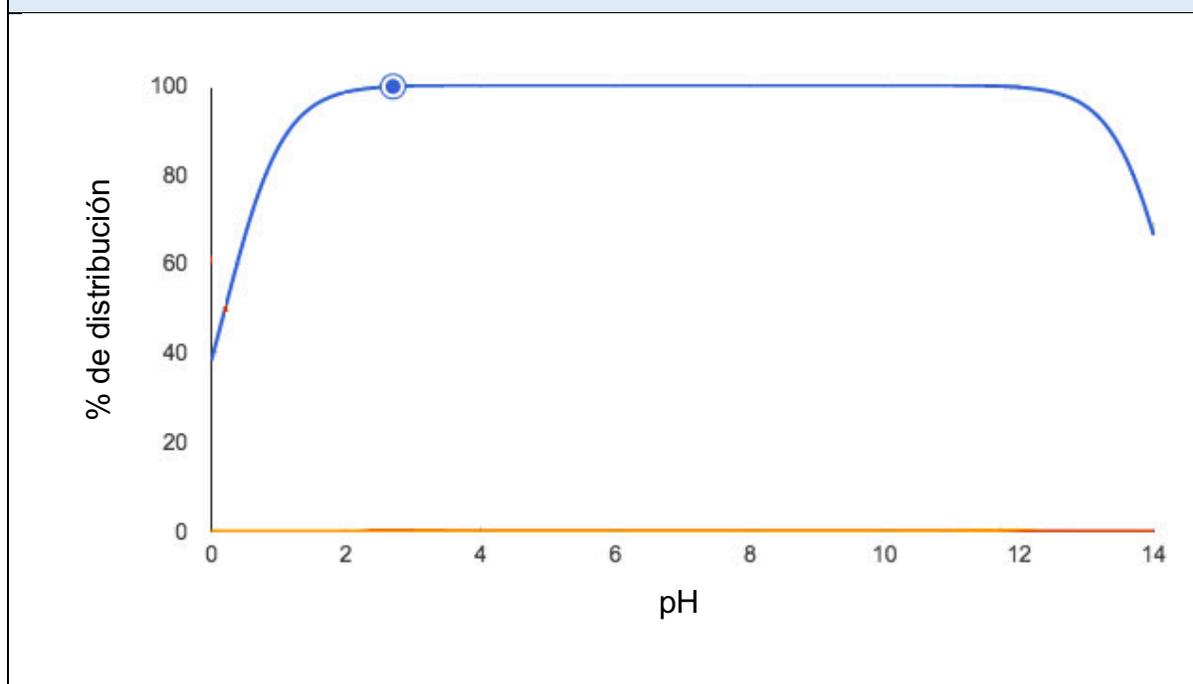
Anexo A

Propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de LMV

Tabla 41. Propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de LMV

Estructura	Fórmula	Peso Molecular	pKa
	$C_8H_{11}N_3O_3S$	229.2560 g/mol	14.29
Cmax	Solubilidad en agua	Unión a proteínas	Tiempo de vida media
2 000 ng/mL	70 mg/mL en agua	<36 %	5 – 7 horas

Diagrama de Distribución de la especie más predominante



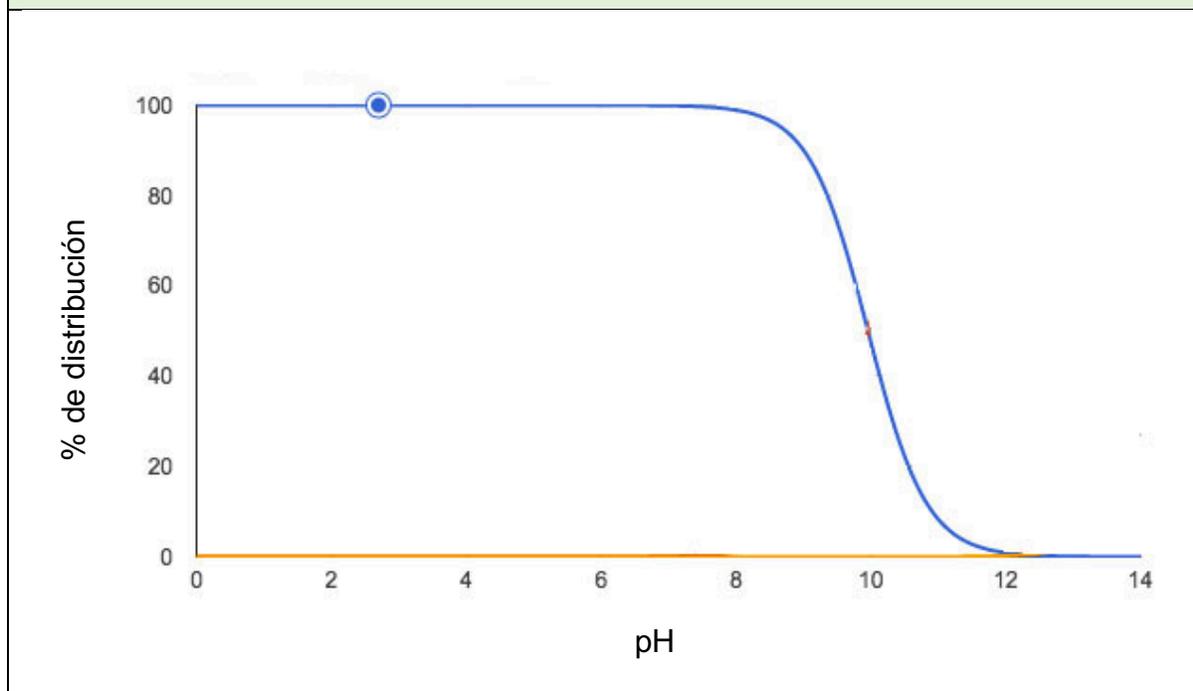
Anexo B

Propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de ZDV

Tabla 42. Propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de ZDV

Estructura	Fórmula	Peso Molecular	pKa
	$C_{10}H_{13}N_5O_4$	267.245 g/mol	9.96
Cmax	Solubilidad en agua	Unión a proteínas	Tiempo de vida media
500 ng/mL	16.3 mg/mL en agua	30-38 %	(1.1 h) 0.5 – 2.9 horas

Diagrama de Distribución de la especie más predominante



Anexo C

Propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de LPV

Tabla 43. Propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de LPV

Estructura	Fórmula	Peso Molecular	pKa
	$C_{37}H_{48}N_4O_5$	628.8008 g/mol	13.39
Cmax	Solubilidad en agua	Unión a proteínas	Tiempo de vida media
14 300 ng/mL	0.00192 mg/mL en agua	98-99 %	-----
Diagrama de Distribución de la especie más predominante			

Anexo D

Propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de RTV

Tabla 44. Propiedades químicas, físicas y farmacocinéticas de RTV

Estructura	Fórmula	Peso Molecular	pKa
	$C_{37}H_{48}N_6O_5S_2$	720.994 g/mol	13.68
Cmax	Solubilidad en agua	Unión a proteínas	Tiempo de vida media
600 ng/mL	0.00126 mg/mL en agua	98-99 %	3 – 5 horas
Diagrama de Distribución de la especie más predominante			

Anexo E

Pruebas de la validez de los modelos propuestos para las curvas de calibración de los antirretrovirales

- LAMIVUDINA

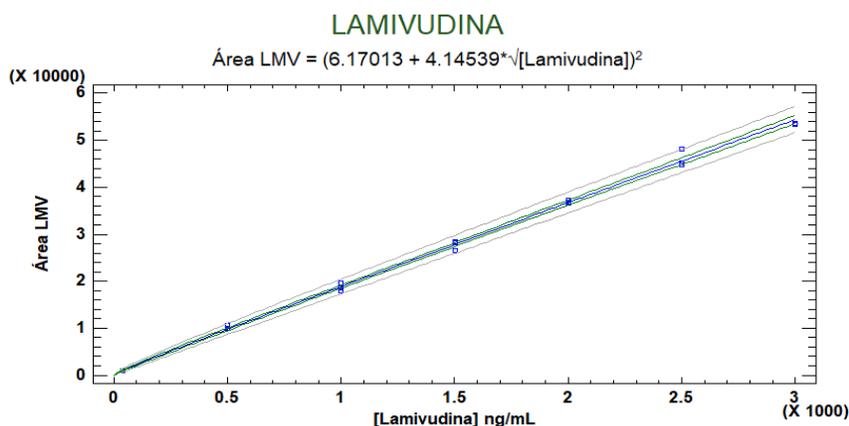


Figura 34a. Método ajustado para lamivudina

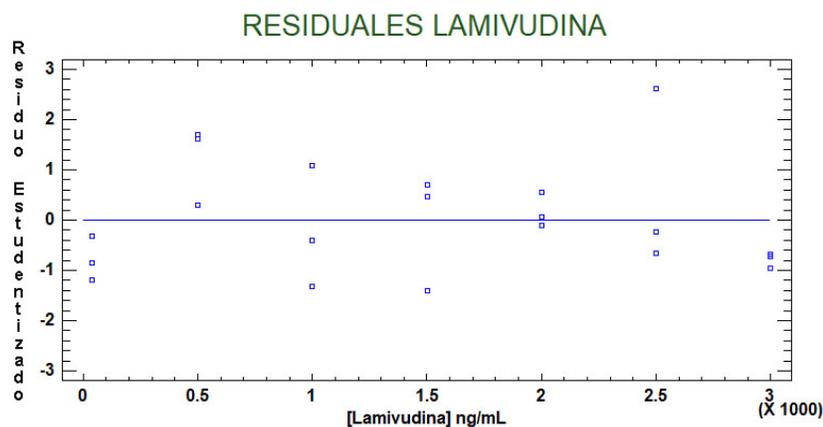


Figura 34b. Residuales de lamivudina

Los residuales se observan al azar (no tienen tendencia) por lo que los datos son homocedásticos, es decir sus varianzas se pueden considerar iguales, condición principal para poder decir que el modelo es válido.

La segunda prueba es el análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA) para el cual se plantea la siguiente prueba de hipótesis:

Prueba de Hipótesis
H₀: Hay ajuste al Modelo
H₁: Hay falta de ajuste al Modelo
Se acepta H₀ si $F_{exp} < F_{tab}$ ó si $P > 0.05$

Tabla 45. Analisis de Varianza con Falta de Ajuste de Lamivudina

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	Cociente-F	Valor-P
Modelo	88465.6	1	88465.6	12348.7	0
Residual	136.115	19	7.16396		
Falta de Ajuste	54.5878	5	10.9176	1.87	0.1628
Error puro	81.5274	14	5.82339		
Total (Corr.)	88601.7	20			

Como $0.1628 > 0.05$ se concluye que hay ajuste al modelo.

Finalmente la r^2 debe ser $>$ a 0.98, siendo que se obtuvo un valor de 0.9964 podemos afirmar que el modelo propuesto para LMV tiene una tendencia lineal

• ZIDOVUDINA

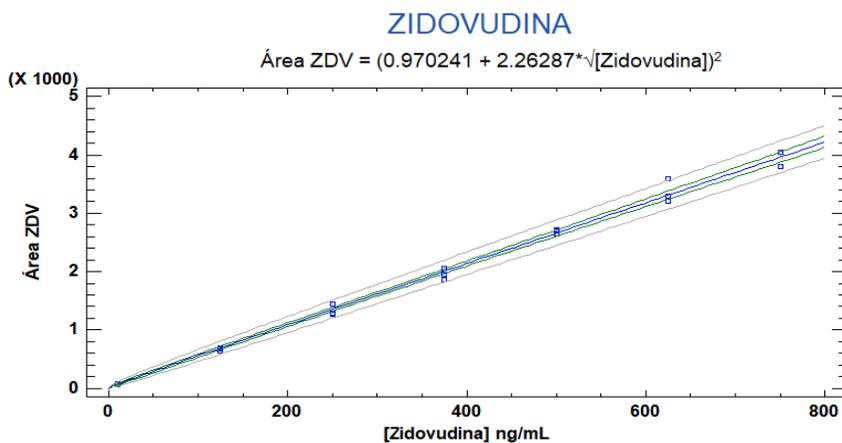


Figura 35a. Método ajustado para zidovudina

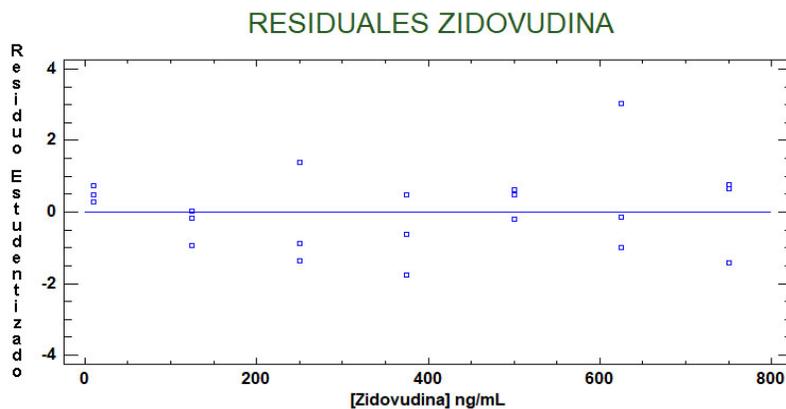


Figura 35b. Residuales de zidovudina

Los residuales se observan al azar (no tienen tendencia) por lo que los datos son homocedásticos, es decir sus varianzas se pueden considerar iguales, condición principal para poder decir que el modelo es válido.

La segunda prueba es el análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA) para el cual se plantea la siguiente prueba de hipótesis:

Prueba de Hipótesis
H₀: Hay ajuste al Modelo
H₁: Hay falta de ajuste al Modelo
Se acepta H₀ si $F_{exp} < F_{tab}$ ó si $P > 0.05$

Tabla 46. Analisis de Varianza con Falta de Ajuste de Zidovudina

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	Cociente-F	Valor-P
Modelo	6590.27	1	6590.27	6971.47	0
Residual	17.9611	19	0.94532		
Falta de Ajuste	2.91118	5	0.582235	0.54	0.742
Error puro	15.0499	14	1.07499		
Total (Corr.)	6608.23	20			

Como $0.7420 > 0.05$ se concluye que hay ajuste al modelo.

Finalmente la r^2 debe ser $>$ a 0.98, siendo que se obtuvo un valor de 0.9964 podemos afirmar que el modelo propuesto para ZDV tiene una tendencia lineal

- LOPINAVIR**

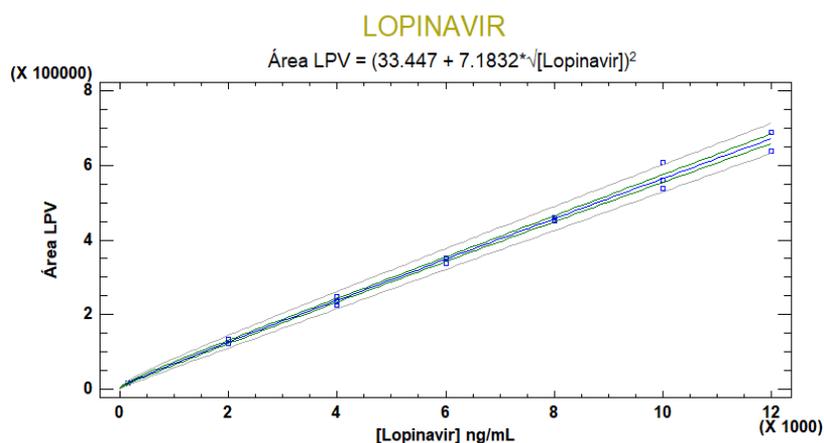


Figura 36a. Método ajustado para lopinavir

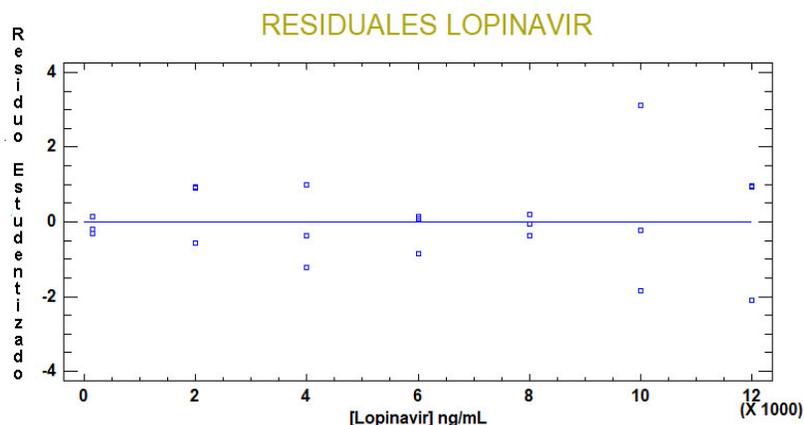


Figura 36b. Residuales de lopinavir

Los residuales se observan al azar (no tienen tendencia) por lo que los datos son homocedásticos, es decir sus varianzas se pueden considerar iguales, condición principal para poder decir que el modelo es válido.

La segunda prueba es el análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA) para el cual se plantea la siguiente prueba de hipótesis:

Prueba de Hipótesis
H₀: Hay ajuste al Modelo
H₁: Hay falta de ajuste al Modelo
Se acepta H₀ si F_{exp} < F_{tab} ó si P > 0.05

Tabla 47. Analisis de Varianza con Falta de Ajuste de Lopinavir

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	Cociente-F	Valor-P
Modelo	1.0e ⁶	1	1.06e ⁶	8644.37	0
Residual	2335.39	19	122.915		
Falta de Ajuste	112.55	5	22.51	0.14	0.9794
Error puro	2222.84	14	158.774		
Total (Corr.)	1.06e ⁶	20			

Como 0.9794 > 0.05 se concluye que hay ajuste al modelo.

Finalmente la r² debe ser > a 0.98, siendo que se obtuvo un valor de 0.9964 podemos afirmar que el modelo propuesto para LPV tiene una tendencia lineal

- RITONAVIR

RESIDUALES RITONAVIR

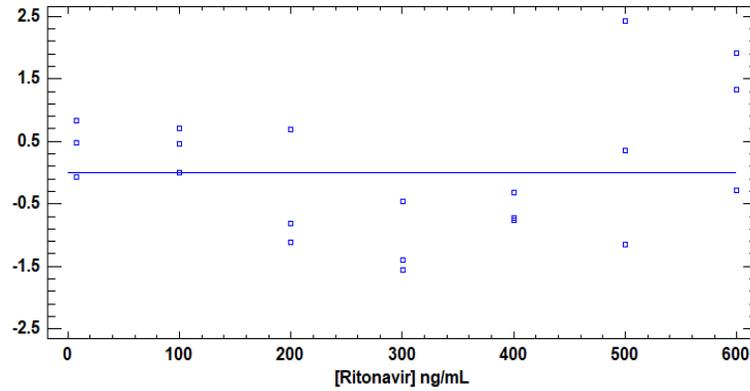


Figura 37a. Método ajustado para ritonavir

RESIDUALES RITONAVIR

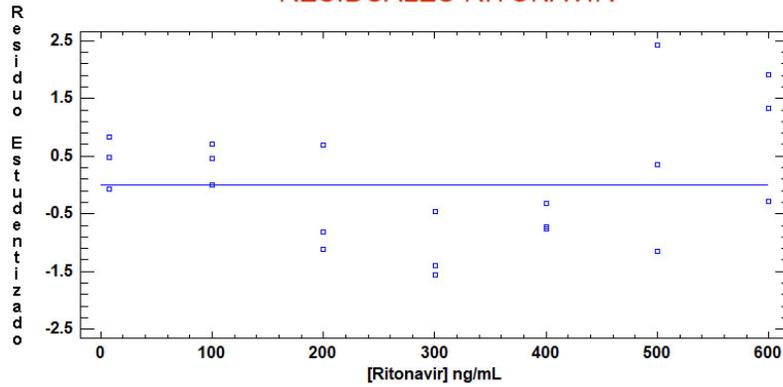


Figura 37b. Residuales de ritonavir

Los residuales se observan al azar (no tienen tendencia) por lo que los datos son homocedásticos, es decir sus varianzas se pueden considerar iguales, condición principal para poder decir que el modelo es válido.

La segunda prueba es el análisis de varianza con falta de ajuste (ANOVA) para el cual se plantea la siguiente prueba de hipótesis:

Prueba de Hipótesis
H₀: Hay ajuste al Modelo
H₁: Hay falta de ajuste al Modelo
Se acepta H₀ si $F_{exp} < F_{tab}$ ó si $P > 0.05$

Tabla 48. Analisis de Varianza con Falta de Ajuste de Ritonavir

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	Cociente-F	Valor-P
Modelo	41154.6	1	41154.6	5315.57	0.0000
Residual	147.103	19	7.74228		
Falta de Ajuste	68.0091	5	13.6018	2.41	0.0895
Error puro	79.0941	14	5.64958		
Total (Corr.)	41301.7	20			

Como $0.0895 > 0.05$ se concluye que hay ajuste al modelo.

Finalmente la r^2 debe ser $>$ a 0.98, siendo que se obtuvo un valor de 0.9964 podemos afirmar que el modelo propuesto para RTV tiene una tendencia lineal

Anexo F

Índice de figuras

	pág.
Figura 1. Estructura general del VIH (InfoSIDA, 2017)	15
Figura 2. Ciclo de replicación del VIH y blancos potenciales para los fármacos antirretrovirales (InfoSIDA, 2017)	17
Figura 3. Porcentaje de mortalidad infantil de hijos de madres portadoras de VIH alimentados con lactancia materna y alimentación de fórmula	20
Figura 4. Inactivación de la transcriptasa inversa (InfoSIDA, 2017)	22
Figura 5. Inactivación de la proteasa (InfoSIDA, 2017)	24
Figura 6. Componentes del cromatógrafo de líquidos	30
Figura 7. Componentes básicos de un espectrómetro de masas en tándem	32
Figura 8. Ionización por espectrometría de masas en tándem (modificado de Fernández C. <i>et. al.</i> 2009)	33
Figura 9. Ionización por Electrospray (modificado de García F. 2014)	34
Figura 10. Cuadrupolo (GAELTDA, 2014)	35
Figura 11. Triple cuadrupolo (Modificado de Artabe A. 2016)	35
Figura 12. Preparación de AF 0.1 % (v/v) en ACN	49
Figura 13. Preparación de AF 0.2 % (v/v) en ACN	50
Figura 14. Preparación de niveles de concentración de la curva en solución	52
Figura 15. Preparación de la MCA, MCM y MCB	53
Figura 16. Preparación de la solución de E.I.	54
Figura 17. Método de extracción propuesto para la extracción de antirretrovirales en leche materna por Sánchez E., 2016	56
Figura 18. Modificación en el volumen de hexano para la extracción líquido-líquido de lípidos	57
Figura 19. Extracción líquido-líquido de lípidos con hexano y con mezcla de hexano y n-hexano	58
Figura 20. Modificación en la concentración de ácido fórmico para la precipitación de proteínas	58
Figura 21. Modificación en el volumen de leche materna para la extracción de antirretrovirales	59
Figura 22. Procedimiento para efecto matriz	61
Figura 23. Ión padre de RTV	70
Figura 24a. Ión padre de RTV	71
Figura 24b. hijo de RTV	71
Figura 25a. Fragmento obtenido en el primer cuadrupolo	72
Figura 25b. Fragmento obtenido en el tercer cuadrupolo	72
Figura 25c. Comparación de fragmentos de ambos cuadrupolos	72
Figura 26. Espectro de masas de LMV	73
Figura 27. Espectro de masas de LPV	74
Figura 28a. Cromatograma obtenido con las condiciones de la fuente y	75

	de caracterización reportadas por Sánchez E., 2016	
Figura 28b.	Cromatograma obtenido con las condiciones de la fuente y de caracterización reportadas en este trabajo	75
Figura 29a.	Cromatograma obtenido con las condiciones cromatográficas reportadas por Sánchez E., 2016	78
Figura 29b.	Cromatograma obtenido con las condiciones cromatográficas reportadas en este trabajo	78
Figura 30.	Método seleccionado para la extracción de antirretrovirales en leche materna	92
Figura 31a.	Cromatograma de los blancos en leche de transición de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV	95
Figura 31b.	Cromatograma de los blancos en leche calostro de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV	96
Figura 31c.	Cromatograma de los blancos en leche madura de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV	96
Figura 31d.	Cromatograma del LIC de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV	97
Figura 32.	Correlación de la concentración nominal vs concentración experimental [ng/mL] para la precisión Intra-Día (n=3) e Inter-Día (n=3) para cada antirretroviral	105
Figura 33a.	Cromatograma de Muestra 13	112
Figura 33b.	Espectro de masas de ZDV de la Muestra 13	112
Figura 34a.	Método ajustado para lamivudina	123
Figura 34b.	Residuales de lamivudina	123
Figura 35^a.	Método ajustado para zidovudina	124
Figura 35b.	Residuales de zidovudina	124
Figura 36a.	Método ajustado para lopinavir	125
Figura 36b.	Residuales de lopinavir	126
Figura 37a.	Método ajustado para ritonavir	127
Figura 37b.	Residuales de ritonavir	127

Anexo G

Índice de tablas

	pág
Tabla 1. Propiedades químicas de LMV, ZDV, LPV y RTV	25
Tabla 2. Datos del porcentaje de transmisión vertical del VIH y tipo de régimen antirretroviral utilizado en la lactancia materna exclusiva	27
Tabla 3. Comparación entre HPLC y UPLC (Waters, 2017)	31
Tabla 4. Criterios de aceptación de la NOM-177-SSA1-2013, FDA, ICH y EMA	40
Tabla 5. Concentraciones de la curva de calibración en solución y las finales en leche materna	52
Tabla 6. Concentraciones de la MCA, MCM, MCB y MCD en solución y las finales en leche materna	53
Tabla 7. Gradiente propuesto por Sánchez E., 2016	56
Tabla 8. Parámetros de la fuente para la detección de LMV, ZDV, LPV y RTV	68
Tabla 9. Parámetros de la caracterización de LMV, ZDV, LPV y RTV	72
Tabla 10. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de LMV, ZDV, LPV y RTV	76
Tabla 11. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta analítica mediante el uso de 100 μ L de hexano para la extracción líquido-líquido de lípidos	80
Tabla 12. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta analítica mediante el uso de 200 μ L de hexano para la extracción líquido-líquido de lípidos	81
Tabla 13. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta analítica mediante el uso de 100 μ L de mezcla de hexano y n-hexano	83
Tabla 14. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta analítica mediante el uso de 100 μ L de hexano	84
Tabla 15. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta analítica mediante el método de precipitación de proteínas con ácido fórmico 0.1 %	86
Tabla 16. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta analítica mediante el método de precipitación de proteínas con ácido fórmico 0.2 %	87
Tabla 17. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta analítica mediante el uso de 50 μ L de leche materna	89
Tabla 18. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta analítica mediante el uso de 100 μ L de leche materna	90
Tabla 19. Datos de repetibilidad de los fármacos de la TARAA, el estándar interno y la respuesta analítica mediante el uso de 200 μ L de leche materna	91
Tabla 20. Adecuabilidad del sistema en el primer día de validación	93
Tabla 21. Selectividad de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV (E.I.) en leche materna	94
Tabla 22. Efecto matriz en los diferentes tipos de leche materna	98
Tabla 23. Efecto acarreo de LMV, ZDV, LPV, RTV y SMV (E.I.)	99
Tabla 24. Límite inferior de la curva de calibración	100
Tabla 25. Modelo ajustado de LMV, ZDV, LPV y RTV	101

Tabla 26.	Intervalos de confianza de la pendiente de LMV, ZDV, LPV y RTV	101
Tabla 27.	Precisión de la curva de calibración de LMV	101
Tabla 28.	Exactitud de la curva de calibración de LMV	102
Tabla 29.	Precisión de la curva de calibración de ZDV	102
Tabla 30.	Exactitud de la curva de calibración de ZDV	102
Tabla 31.	Precisión de la curva de calibración de LPV	102
Tabla 32.	Exactitud de la curva de calibración de LPV	103
Tabla 33.	Precisión de la curva de calibración de RTV	103
Tabla 34.	Exactitud de la curva de calibración de RTV	103
Tabla 35.	Precisión Intra-Día e Inter-Día para los fármacos antirretrovirales de la TARAA	104
Tabla 36.	Estabilidad de los antirretrovirales en muestras procesadas y no procesadas a diferentes tiempos y a diferentes temperaturas	107
Tabla 37.	Porcentaje de recobro de las muestras control (n=5) para LMV, ZDV, LPV y RTV	108
Tabla 38.	Resumen de la validación	109
Tabla 39.	Parámetros evaluados en la cuantificación de los antirretrovirales en leche materna	110
Tabla 40.	Concentración de los antirretrovirales de la TARAA en leche materna de pacientes VIH+ del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”	111
Tabla 41.	Propiedades químicas físicas y farmacocinéticas de LMV	119
Tabla 42.	Propiedades químicas físicas y farmacocinéticas de ZDV	120
Tabla 43.	Propiedades químicas físicas y farmacocinéticas de LPV	121
Tabla 44.	Propiedades químicas físicas y farmacocinéticas de RTV	122
Tabla 45.	Análisis de Varianza con Falta de Ajuste de Lamivudina	124
Tabla 46.	Análisis de Varianza con Falta de Ajuste de Zidovudina	125
Tabla 47.	Análisis de Varianza con Falta de Ajuste de Lopinavir	126
Tabla 48.	Análisis de Varianza con Falta de Ajuste de Ritonavir	128