



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA
CUANTIFICAR AMANTADINA EN PLASMA POR HPLC
ACOPLADO A FLUORESCENCIA.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
PRESENTA:**

OLGA MAGDALA MORALES RIOS

**ASESORES: Q.F.B. JOSÉ ANTONIO GARDUÑO ROSAS
DR. LUIS CAMILO RÍOS CASTAÑEDA**

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2005



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Morales Ríos
Olga Magdalena

FECHA: 10 marzo 05.

FIRMA: OR



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Validación de un método analítico para cuantificar amantadina en plasma
por HPLC acoplado a fluorescencia.

que presenta la pasante: Olga Magdala Morales Ríos
con número de cuenta: 9951222-2 para obtener el título de:
Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de enero de 2005.

PRESIDENTE	<u>MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u>	
VOCAL	<u>DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>	
SECRETARIO	<u>QFB. José Antonio Garduño Rosas</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Guadalupe Rebollar Barrera</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>Dra. Norma Laura Delgado Buenrostro</u>	



Este trabajo de investigación se realizó en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" en el Laboratorio de Neuroquímica bajo la dirección del Dr. Luis Camilo Ríos Castañeda y con apoyo de Psicofarma S.A. de C.V.

DEDICATORIA

A Dios por el maravilloso regalo de la Vida, por protegerme y guiarme siempre...

AGRADECIMIENTOS

A mis padres: Sra. Olga Ríos y Sr. Ignacio Morales, no encuentro palabras para agradecerles la forma en la que me han educado e inculcado valores, pero sobre todo por su amor y apoyo incondicional...

Esto es el inicio de algo que ustedes sembraron, tenemos un gran camino por recorrer juntos, nos separamos físicamente, pero todo el tiempo los llevo en mi mente y mi corazón, los valores que me han enseñado siempre van conmigo y quiero que sepan que mis ideales, logros y esfuerzos son para ustedes y por ustedes.

A mi hermana Moni, por tu amistad incondicional ... Aunque estemos separadas y yo tenga "mil cosas que hacer" , acuérdate que siempre puedes contar conmigo chiquita... estoy muy orgullosa de ti y lucha siempre por lo que quieres, las cosas no son fáciles, pero tienes la inteligencia y el corazón para lograrlo... sé que vas a ser una gran Antropóloga Física. T.Q.M.

A mi novio, Q.I. Jesús Edmundo Hernandez Rivera, por ser mi novio, amigo, cómplice, mi apoyo... por ser simplemente como eres y por lo que significas para mí ...

Aquí está el segundo tomo que se realizó en Neurología y no hubiera estado listo sin ti... Te amo.

A mis amigos de la FES-C: Mirsha, Carlos, Deisy, Eli y Aidee, tengo tantos recuerdos que compartimos juntos a lo largo de la carrera entre el trabajo de la escuela, bromas, tristezas y alegrías, que no olvidaré jamás, su amistad siempre irá en mi corazón y cuenten conmigo...

Esto sólo es la evidencia del buen equipo que somos... porque no lo hubiera hecho sin ustedes.

A mis amigas del Depto.: Mary, Gaby y Caty ... pasamos muchas cosas juntas que afortunadamente sembraron una bonita amistad entre nosotros ... aprendí mucho con ustedes y gracias por dejarme ser parte de la familia que formamos.

A mis amigos de Cuautla: Katya, Erika y Chabelo... porque conservar nuestra amistad no ha sido más que un gusto de compartir nuestras cosas... me da mucho gusto saber que nuestros sueños de la Prepa. sean ahora realidad.

Al Dr. Camilo Ríos, por dejarme ser parte de su equipo de trabajo, por abrirme las puertas del laboratorio, pero sobre todo por ser una persona de la que aprendí muchísimo, además por la confianza y el apoyo que me brindó para la realización de este trabajo.

A mi asesor, el Q.F.B. José Antonio Garduño Rosas, por sus consejos y críticas en la elaboración de este trabajo, pero sobre todo por el tiempo que me dedicó.

A mis amigos del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía del Depto. de Genética, Depto. de Neuropsicofarmacología y del Depto. de Neuroquímica, que no los menciono por temor a olvidar a alguno, porque sin conocerme me brindaron su amistad y apoyo. Gracias.

A mis sinodales, porque sus críticas me permitieron mejorar esta tesis.

A todos mis profesores, porque de alguna u otra forma han contribuido en mi formación, no solo académica sino también personal.

A la FESC-UNAM por permitirme ser parte de ella y por hacer un sueño realidad. Me voy con la promesa de algún día retribuir un poco de lo mucho que me dio.

A la Fundación Armstrong, por la beca otorgada en el tiempo de la realización de este trabajo.

A Psicofarma S.A. de C.V., por el apoyo para la presentación de este trabajo en el Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas 2004.

... A todos los que no menciono por mi falta de memoria, gracias.

***“Ipanomacehuahyotl ontlatoz in nonahualtzin “
“Por mi raza hablará el espíritu”***

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	1
RESUMEN	4
MARCO TEÓRICO	
I.- Clorhidrato de Amantadina	
I.1.- Historia	7
I.2.- Nombres químicos	7
I.3.- Fórmula condensada	7
I.4.- Estructura química	8
I.5.- Preparación	8
I.6.- Peso molecular	8
I.7.- Descripción	8
I.8.- Solubilidad	9
I.9.- Farmacodinamia	9
I.10.- Farmacocinética	10
I.11.- Dosis Terapéutica y Tóxica	10
I.12.- Interacción Farmacológica	11
I.13.- Aplicaciones Clínicas	11
I.14.- Reacciones Adversas	12
I.15.- Precauciones en relación con efectos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y sobre fertilidad.	12
II.- Validación de métodos analíticos.	
II.1.- Linealidad	14
II.2.- Precisión	14
II.3.- Repetibilidad	14
II.4.- Reproducibilidad intralaboratorio	14
II.5.- Exactitud	15
II.6.- Recuperación absoluta	15
II.7.- Límite de detección	15

II.8.- Límite de cuantificación	15
II.9.- Estabilidad de la muestra	16
II.10.- Selectividad	16
II.11.- Tolerancia	16
III.- Generalidades de Cromatografía	17
III.1.- Clasificación de la Cromatografía	19
III.2.- Cromatografía de líquidos de alta resolución	20
III.3.- Instrumentación en HPLC	20
IV.- Espectroscopia de Fluorescencia	28
V.- Derivatización para la cromatografía de líquidos de alta resolución	32
OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS	33
JUSTIFICACIÓN	34
DESARROLLO EXPERIMENTAL	
I.- Reactivos	36
II.- Preparación de soluciones	36
III.- Condiciones cromatográficas para analizar las muestras del ensayo de cuantificación	43
IV.- Esquema del ensayo de cuantificación	44
V.- Validación del sistema	
V.1.- Linealidad y precisión del sistema	45
VI.- Validación del método analítico	
VI.1.- Linealidad	46
VI.2.- Precisión	47
VI.3.- Exactitud	48
VI.4.- Recuperación absoluta	48
VI.5.- Límite de cuantificación y detección	49

VI.6.- Estabilidad de la muestra analítica	
VI.6.1.- Estabilidad a las condiciones de almacenamiento -72 °C	50
VI.6.2.- Estabilidad de la muestra extraída	50
VI.6.3.- Estabilidad de la muestra procesada	50
VI.6.4.- Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación descongelación	50
VII.- Selectividad del método analítico	51
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	
I.-Validación del sistema	53
I.1.- Linealidad y precisión del sistema	53
II.- Validación del método analítico	56
II.1.- Linealidad	56
II.2.- Precisión	59
II.3.- Exactitud	66
II.4.- Recuperación absoluta	68
II.5.- Límite de cuantificación y detección	70
II.6.- Estabilidad de la muestra analítica	
II.6.1.- Estabilidad a las condiciones de almacenamiento -72 °C	73
II.6.2.- Estabilidad de la muestra extraída	75
II.6.3.- Estabilidad de la muestra procesada	77
II.6.4.- Estabilidad de la muestra en ciclos de congelación Descongelación	79
III.- Selectividad del método analítico	81
CONCLUSIONES	86
BIBLIOGRAFÍA	88
GLOSARIO	94

RESUMEN

La Enfermedad de Parkinson (EP), descrita por primera vez por James Parkinson en 1817, es un desorden neurodegenerativo que puede ser asociado con una lesión neuropatológica cerebral. La severidad de los síntomas de la Enfermedad de Parkinson se correlacionan con la magnitud del déficit del neurotransmisor dopamina. La dopamina modula una variedad de procesos fisiológicos y conductuales, las alteraciones en su funcionamiento han sido implicadas en numerosas enfermedades psiquiátricas y neurológicas^(1,2).

El tratamiento de elección para la EP es la levodopa, sin embargo, esta no se utiliza sino hasta que han transcurrido de 3 a 5 años del padecimiento o cuando el paciente ha rebasado los 70 años de edad. Estos criterios son estrictos por los efectos secundarios que el fármaco provoca, como los síntomas de fin de dosis y las discinesias tardías en diferentes grados de afectación, llegando a ser totalmente incapacitantes para el paciente. Las discinesias tardías aparecen entre los primeros 5 a 7 años del inicio del tratamiento con Levodopa⁽³⁾.

Por otra parte, la Amantadina es un fármaco que por sus características terapéuticas está indicada para el tratamiento de la influenza y del Parkinson como tratamiento inicial, así como en combinación con el tratamiento convencional cuando se presentan discinesias tardías, siendo esta última indicación quizás la que produce una mejoría más contundente en los pacientes⁽²⁾.

La FDA ha aceptado el uso de la Amantadina para el tratamiento de la influenza y de la Enfermedad de Parkinson, sin embargo, en México no se cuenta con reportes de investigaciones acerca de los beneficios del tratamiento con Amantadina en EP, además de no contarse con una estrategia experimental bien

establecida en los laboratorios que permita la evaluación de los niveles de este fármaco en plasma de pacientes sometidos a un riguroso esquema terapéutico ⁽⁴⁾.

Es por eso que el presente trabajo, que está basado en lo reportado por Suckow, R.F. *et. al.*, 1999; valida un método analítico como lo indica la Norma Oficial Mexicana NOM – 177 – SSA – 1998, lo suficientemente sensible para la detección de Amantadina en plasma usando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección de fluorescencia. Se realizan extracciones líquido-líquido de 1 ml de plasma conteniendo el estándar interno (memantina), el extracto fue derivatizado 45 minutos en hielo con cloruro de dansilo y analizado con una columna de fase reversa C₁₈ y una fase móvil de búfer de fosfato y acetonitrilo. La amantadina y memantina dansilada eluyen a un tiempo de retención menor a 15 minutos sin interferencia de material endógeno.

MARCO TEÓRICO

I.- CLORHIDRATO DE AMANTADINA

I.1.- Historia

El clorhidrato de amantadina fue sintetizado en la década de 1960 en un programa destinado a identificar agentes antivirales efectivos contra virus respiratorios y otros virus.

En 1968, una mujer con enfermedad de Parkinson fue tratada con amantadina como protección contra el virus de la gripe y se observó una notable mejoría de los síntomas parkinsonianos. Esto llevó a la realización de pruebas clínicas en pacientes con la enfermedad de Parkinson, que a la poste resultaron exitosos ⁽⁵⁾.

I.2.- Nombres químicos ^(6,7)

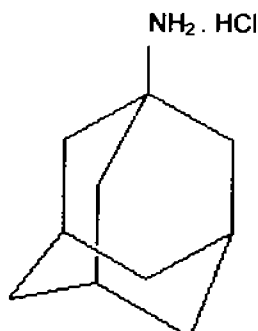
Clorhidrato de triciclo [3.3.1.1] decan-1-amina

Clorhidrato de 1-adamantanamina

I.3.- Fórmula condensada ^(6,7)

$C_{10}H_{17}NHCl$

1.4.- Estructura química ^(6,7)



1.5.- Preparación

El adamantano se broma y se obtiene el compuesto 1-bromo que reacciona con acetonitrilo en presencia de ácido sulfúrico para producir N-(1-adamantil) acetamida. Por hidrólisis alcalina se libera amantadina, la cual reacciona con cloruro de hidrógeno en un solvente adecuado para obtener la sal. ⁽⁷⁾

1.6.- Peso molecular: 187.71

1.7.- Descripción

Polvo cristalino, blanco o casi blanco, inodoro, con sabor amargo, estable a la luz, al calor y al aire, no funde hasta los 300° pero se sublima lentamente ^(6,7).

1.8.- Solubilidad

Un gramo en 2.5 ml de agua, 5.1 ml de alcohol, 18 ml de cloroformo o 700 ml de polietilenglicol 400⁽⁷⁾.

1.9.- Farmacodinamia

Los mecanismos de acción farmacológica de la amantadina no están totalmente definidos. Tiene una actividad selectiva frente al virus de la influenza de tipo A, en tanto que no es activa frente al tipo B ni frente a los parainfluenza. Al parecer no tiene efecto sobre la fijación del virus ni sobre su capacidad de penetración en la célula. Probablemente bloquee la descapsidación tras la entrada del virus en la célula; también parece inhibir la transcripción primaria del ARN. Su acción parece ocurrir temporalmente en el curso de la infección viral de las células de mamíferos sobre el desnudamiento y la fusión, así como el montaje de los viriones hijos^(6,7). Su mecanismo de acción antiparkinsoniano principal se ha relacionado con un incremento de la liberación de dopamina, pero también es un agonista dopaminérgico débil y un bloqueante de la recaptura de dopamina y noradrenalina⁽⁵⁾. La amantadina aumenta la disponibilidad de la dopamina en el cuerpo estriado y provoca su liberación en las terminaciones nerviosas dopaminérgicas que vienen de la sustancia negra. Se explica así el sinergismo entre la amantadina y la levodopa, ya que esta última se transforma en el organismo en dopamina y actúa como sustancia sustitutiva en la enfermedad de Parkinson, mientras que la amantadina aumenta la cantidad de dopamina en las neuronas estriadas⁽⁸⁾.

I.10.- Farmacocinética

La amantadina es absorbida completamente por la vía oral (aunque existen reportes que se absorbe por todas las vías) y la concentración sanguínea máxima se alcanza de 1 a 4 horas después de la ingestión, y que es de aproximadamente 0.3 µg/mL. Si la concentración excede de 1.0 µg/mL se considera un rango tóxico (4). Se distribuye por todos los órganos, especialmente en el pulmón y más del 90% se excreta en la orina (por filtración glomerular y secreción tubular) sin modificaciones, es decir la amantadina no es biotransformada (5)

La vida media de eliminación de amantadina es de 10 a 37 horas y depende del pH, de modo que aumenta cuando el pH urinario es más elevado y también en caso de una alteración renal. Atraviesa la placenta y también se excreta en la leche materna, sólo una fracción pequeña es eliminada por diálisis. Tiene una biodisponibilidad > 80 %. (5, 7, 8, 9)

I.11.- Dosis terapéutica y tóxica

Es administrada para la influenza A y como tratamiento del Parkinson en dosis de 200 mg por día, aunque se puede usar en dosis de 100 mg por día como profilaxis. Existen reportes de pacientes que recibieron 300 mg diarios de clorhidrato de amantadina por 3 semanas y tenían concentraciones en plasma de 0.68 a 1.01 µg/ml (9).

La Amantadina administrada en dosis de más de 2 g es potencialmente letal (9).

I.12.- Interacciones farmacológicas

El clorhidrato de amantadina interactúa con los fármacos anticolinérgicos produciendo efectos parecidos a atropina a menos que se disminuya la dosis del fármaco anticolinérgico. Pueden producirse alteraciones del estado mental si los pacientes también reciben estimulantes del sistema nervioso central. Se ha informado la menor excreción del fármaco con la administración concomitante de hidroclorotiazida y triamtireno. La profilaxis o el tratamiento con amantadina no interfieren en las respuestas inmunes a la vacunación antigripal administrada de forma concurrente ⁽⁵⁾. La interacción sinérgica de la amantadina con la levodopa puede emplearse en beneficio del paciente en quien se ha perdido (o nunca tuvo) el beneficio terapéutico de la amantadina sola. Los pacientes con temblor Parkinsónico exclusivo pueden beneficiarse con la acción sinérgica de la amantadina con un agente anticolinérgico ^(5, 10, 11).

I.13.- Aplicaciones clínicas

La amantadina está indicada para la profilaxis y el tratamiento de las infecciones por el virus de la influenza A. Las concentraciones bajas del fármaco, que se logran con su administración oral inhiben los patógenos aislados en la práctica médica de todos los tipos de virus influenza A, es decir, las cepas H₁N₁, H₂N₂ y H₃N₂. La amantadina se considera un adyuvante del manejo primario de los pacientes con riesgo de una infección severa por el virus influenza A, que consiste en la inmunización antigripal anual. La amantadina es útil para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson en los estadios tempranos de su curso. Los pacientes en los estadios III o IV de la enfermedad pueden desarrollar tolerancia a su efecto terapéutico en semanas o meses ^(2, 4, 5)

I.14.- Reacciones adversas

La amantadina es un fármaco poco tóxico y las reacciones adversas, no comunes, son neurológicas (insomnio, excitación psíquica, cefalea, mareos, desorientación y aun confusión mental y alucinaciones); digestivas (náuseas y cólicos abdominales); cutáneas, de probable origen alérgico (prurito, erupción morbiliforme y algunas veces edema). Todos estos trastornos ceden al disminuir la dosis o suprimir el medicamento ⁽⁵⁾.

I.15.- Precauciones en relación con efectos de carcinogénesis, mutagénesis, teratogénesis y sobre fertilidad.

Dosis elevadas de amantadina han demostrado en ciertas especies animales efectos teratogénicos y embriotóxicos, por lo que no se debe usar en el embarazo ⁽⁵⁾.

II.- VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

El uso de un método analítico se justifica sólo después de haber demostrado que es confiable, es decir que ha sido validado. Tanto la Food and Drug Administration (FDA) como la United States Pharmacopea (USP) tienen un interés vital en la validación de los métodos de ensayo formal para asegurarse de que dichos métodos son lo que pretenden ser ⁽⁷⁾.

La forma de validación de un método analítico dependerá de su futura aplicación, es decir, si éste va ser utilizado en control de calidad, en pruebas de estabilidad o en análisis de fluidos biológicos ⁽⁷⁾.

El método analítico empleado para la determinación cuantitativa de un fármaco y/o sus metabolitos en muestras biológicas, tiene un papel muy importante en la evaluación e interpretación de los datos en un estudio de biodisponibilidad, bioequivalencia o farmacocinética. Es de gran importancia que el método analítico esté validado con el fin de garantizar la veracidad y confiabilidad de los resultados derivados de dichos estudios ⁽¹²⁾.

La validación de un método analítico se define como el proceso por el cual queda establecido, por medio de estudios de laboratorio, que las características de comportamiento del método, cumple con el propósito para el que fue diseñado, estas características se expresan en términos de los parámetros de validación ⁽¹³⁾.

Los parámetros analíticos que se incluyen como mínimo en la validación de un método según la Norma Oficial Mexicana NOM - 177 - SSA - 1998, son los siguientes: linealidad, precisión (evaluada como repetibilidad y reproducibilidad), exactitud, recuperación absoluta, límite de detección, límite de cuantificación, estabilidad de la muestra analítica, selectividad, tolerancia ⁽¹³⁾.

A continuación se presenta la definición de cada uno de los parámetros de validación mencionados.

II.1.- LINEALIDAD

La linealidad es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra ⁽¹³⁾.

II.2.- PRECISIÓN

La precisión es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad ⁽¹³⁾.

II.3.- REPETIBILIDAD

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones ⁽¹³⁾.

II.4.- REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO

Es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas ⁽¹³⁾.

II.5.- EXACTITUD

La exactitud de un método analítico, es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia ⁽¹³⁾.

Se evalúa a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, determinando la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones de cada nivel de concentración, con respecto a la concentración nominal de la muestra.

Se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{ Desviación Absoluta} = \left[\frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración promedio experimental}}{\text{Concentración nominal}} \right] 100$$

II.6.- RECUPERACIÓN ABSOLUTA

La recuperación absoluta, es la eficacia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la matriz biológica ⁽¹³⁾.

II.7.- LÍMITE DE DETECCIÓN

Límite de detección es la mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas ⁽¹³⁾.

II.8.- LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de cuantificación de un método analítico, es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método ⁽¹³⁾.

II.9.- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA

La estabilidad de la muestra analítica, es la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis ⁽¹³⁾.

II.10.- SELECTIVIDAD

La selectividad es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra ⁽¹³⁾.

II.11.- TOLERANCIA

La tolerancia es la capacidad del método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal ⁽¹³⁾.

III.- GENERALIDADES DE CROMATOGRAFÍA

El término cromatografía se emplea en general para referirse a una separación de componentes de una muestra por distribución entre dos fases – una estacionaria y otra móvil –. Es un método analítico empleado ampliamente en la separación, identificación y determinación de los componentes químicos en mezclas complejas.

La cromatografía se divide en varias categorías en función del mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria, como se describe a continuación:

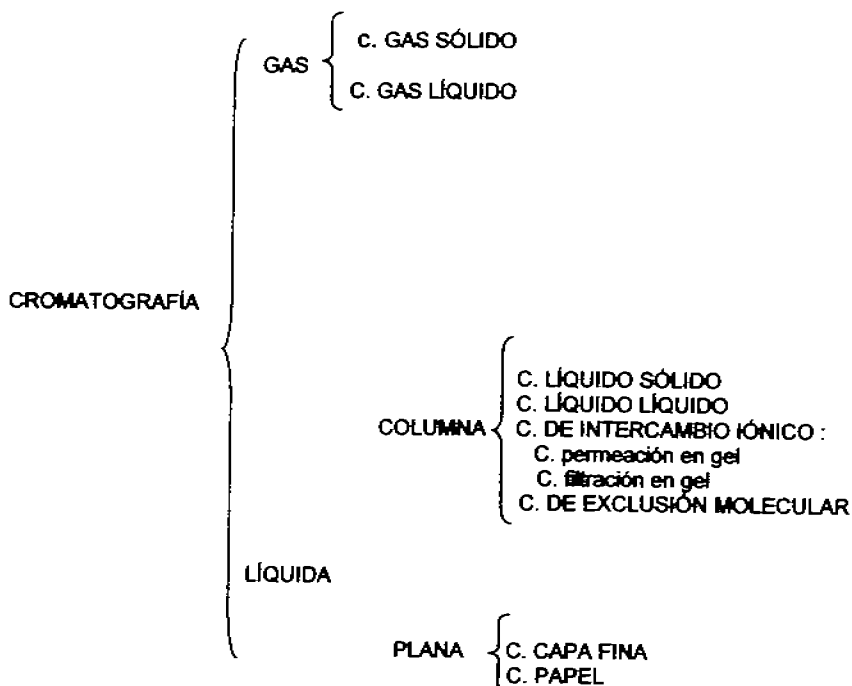
- 1.- **Cromatografía de adsorción.** Es la forma más antigua de la cromatografía, en la cual se utiliza una fase estacionaria sólida y una fase móvil líquida o gaseosa. El soluto puede adsorberse en la superficie de las partículas sólidas. El equilibrio entre el estado adsorbido y la solución es la causa de la separación de las moléculas de soluto. ^(14,16)
- 2.- **Cromatografía de reparto.** En esta técnica, una fase estacionaria forma una película delgada en la superficie de un soporte sólido. El soluto se equilibra entre este líquido estacionario y una fase móvil líquida o gaseosa. ^(14,16)
- 3.- **Cromatografía de intercambio iónico.** En este tipo de cromatografía, aniones (como $-\text{SO}_3^-$) o cationes (como $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$) se unen covalentemente a la fase estacionaria sólida, por lo común una resina. Los iones de soluto, de carga opuesta a los de la fase estacionaria, son atraídos por esta última mediante una fuerza electrostática. La fase móvil es un líquido. ^(14,16)
- 4.- **Cromatografía de exclusión molecular.** A diferencia de lo que ocurre en otras formas de cromatografía, en el caso ideal de cromatografía de exclusión molecular no existen interacciones por atracción entre la fase estacionaria y el soluto. Más bien, la fase móvil líquida o gaseosa pasa a través de un gel poroso. Los poros son suficientemente pequeños para excluir moléculas grandes de soluto

pero no las pequeñas. La corriente de moléculas grandes pasa sin penetrar en el gel. Las moléculas pequeñas requieren más tiempo para pasar a través de la columna porque entran en el gel y por tanto deben fluir a través de un volumen más grande antes de dejar la columna. (14,16)

5.- **Cromatografía por afinidad.** En esta clase de cromatografía se utilizan interacciones altamente específicas entre un tipo de moléculas de soluto y otras moléculas que se unen (inmovilizan) covalentemente a la fase estacionaria. (14,16)

III.1.- CLASIFICACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA

Los dos grandes campos en los que se clasifica actualmente a la cromatografía son: cromatografía de gases y cromatografía líquida, estos a su vez presentan una subclasificación, dependiendo de las características de las fases estacionarias y de las fases móviles, como se puede ver a continuación: (14, 15)



III.2.- CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía de líquidos es importante porque la mayoría de los compuestos no son lo suficientemente volátiles para que se les pueda aplicar la cromatografía de gases. Esta técnica se usa ampliamente en química preparativa y en bioquímica, para aislar cantidades del orden de miligramos a gramos de una sustancia.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) es una modalidad de la cromatografía de líquidos en la cual la fase estacionaria se encuentra empaquetada en una columna y la fase móvil, es un líquido que fluye a través de la primera. Utiliza una presión elevada para forzar el paso del disolvente por la columna que contiene partículas muy finas consiguiendo así separaciones de gran resolución.

III.3.- INSTRUMENTACIÓN EN HPLC

Todos los sistemas cromatográficos de HPLC consisten de los mismos componentes básicos:

- Eluyentes
- Bombas
- Inyector
- Columna
- Detector
- Registro de datos (computadora) e integrador

Eluyente (14, 15, 16)

La composición de la fase móvil en la cromatografía de líquidos proporciona una dimensión para la manipulación experimental que no tiene la cromatografía de gas. Es obvio que la fase móvil debe de proporcionar la clase de interacción adecuada para el proceso de distribución particular que se está tratando. Con frecuencia una mezcla de disolventes es una fase móvil más adecuada que un líquido puro para separar mezclas complejas y la optimización de la composición del disolvente por ensayo y error puede ser una tarea colosal y tediosa. Existen dos maneras de llevar a cabo el proceso de elución: isocrático y por gradiente. A continuación se presentan algunas características importantes para la elección del eluyente:

- Disponible comercialmente
- Precio
- Pureza y estabilidad (bajo contenido de impurezas)
- Disolver la muestra
- Miscible con otros solventes para formar mezclas útiles
- No degradar o disolver la fase estacionaria
- Tener baja viscosidad para reducir las caídas de presión
- Ser compatible con el detector utilizado

Bombas (14, 15, 16)

La función de una bomba es proporcionar una presión necesaria para mover el eluyente y las muestras sobre el sistema cromatográfico. Los requisitos o aspectos más importantes que debe de reunir una bomba o sistema de bombeo son:

- Mantener el flujo libre de pulsaciones
- Debe proporcionar presiones estables hasta 6000 psi

- Generar intervalos de caudales de flujo (0.1 a 10 mL/min)
- Control y reproducibilidad del flujo del solvente
- Los componentes de la bomba deberán ser resistentes a la corrosión

Válvulas de inyección (14, 15, 16)

El fin primordial de cualquier proceso de inyección es introducir la muestra en la columna.

Columnas (14, 15, 16)

En la columna ocurre el proceso de separación, se dice que es el corazón de un cromatógrafo. El éxito o fracaso de una separación dependerá no sólo del relleno sino también de los materiales de construcción de la columna misma. Los materiales con los cuales generalmente se puede elaborar las columnas son cobre, acero inoxidable, vidrio o teflón.

El relleno puede ser de sílica gel, alúmina, adsorbentes poliméricos (fases enlazadas químicamente) semejantes al poliestireno-divinilbenceno, entre otros. El relleno también puede ser un líquido recubriendo un sólido. Además de la superficie del empaque, el tamaño de la partícula y la forma de ésta, es importante para lograr una buena separación. Las fuentes de daño de una columna de HPLC son:

- Obstrucción por partículas pequeñas en los solventes o fase móvil
- Obstrucción por materiales no eluidos en las muestras

- Variación de las características de retención por incremento de materiales no eluidos.

Los parámetros cromatográficos que se utilizan más comúnmente para evaluar las columnas cromatográficas son los siguientes:

© **NÚMERO DE PLATOS TEÓRICOS (N)** (14, 15, 16)

Un plato teórico es el equilibrio de distribución de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Es una medida de la eficacia de separación de una columna, por lo tanto para lograr una eficiencia elevada, será necesario tener un alto número de platos teóricos, que dicho en otras palabras, cuanto mayor sea N, más eficiente será la columna. El número de platos teóricos puede obtenerse de un cromatograma, mediante la siguiente expresión:

$$N = 16 (t_R / w)^2$$

N = Número de platos teóricos de una columna con respecto a un compuesto en particular

t_R = Tiempo de retención (min.)

w = Ancho del pico (min.) , resultante de la triangulación del mismo con la línea base

© **ALTURA EQUIVALENTE A UN PLATO TEÓRICO (AEPT)** (14, 15, 16)

Es la longitud de una columna requerida para obtener un equilibrio de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Si el valor de AEPT es pequeño, esto se traduce en un mayor número de platos teóricos por unidad de

longitud y por tanto la columna será más eficiente. Se calcula de la siguiente manera:

$$AEPT = L/N$$

L = Longitud de la columna (m)

N = Número de platos teóricos

© FACTOR DE CAPACIDAD (14, 15, 16)

El factor de capacidad es un parámetro experimental importante, que se emplea ampliamente para describir las velocidades de migración de solutos en columnas. Cuando el factor de capacidad para un soluto es menor que la unidad, tiene lugar la elución tan rápidamente que la determinación de los tiempos de retención es difícil. Cuando el factor de capacidad quizá sea mayor que 20 a 3, los tiempos de elución se convierten en excepcionalmente largos. Idealmente, las separaciones se deben realizar bajo condiciones en las cuales los factores de capacidad para los analitos de una mezcla estén entre límites de 1 - 5. En la cromatografía líquida, los factores de capacidad se pueden manipular para dar mejores separaciones variando la composición de la fase móvil y de la fase estacionaria .

Se calcula de la siguiente manera:

$$K' = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$$

t_R = tiempo de retención del compuesto de interés

t_M = tiempo de retención de un solvente no retenido

© RESOLUCIÓN (R_s) (14, 15, 16)

La resolución de una columna proporciona una medición cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos. La resolución de cada columna se calcula como:

$$R_s = \frac{2 \left[(t_R)_B - (t_R)_A \right]}{W_A + W_B}$$

W = es el ancho de la base del pico resultante de la triangulación del mismo.

t_R = es el tiempo de retención de uno de los compuestos

© SELECTIVIDAD (α) (14, 15, 16,)

La selectividad está dada por la siguiente ecuación:

$$\alpha = k'_2 / k'_1$$

Donde:

k'_1 = factor de capacidad del componente 1

k'_2 = factor de capacidad del componente 2

Detectores (14, 15, 16)

El detector convierte un cambio en el efluente de la columna en una señal eléctrica que es recuperada. Ésta es amplificada, generalmente por un fotomultiplicador y finalmente es convertida en una señal analítica, la cual es transmitida hacia la computadora. Los detectores se clasifican como selectivos (electroquímicos y fluorescencia) o universales (UV e índice de refracción) dependiendo de la propiedad medida.

A continuación se mencionan algunos de los detectores más utilizados en cromatografía de líquidos de alta presión.

Detector de luz ultravioleta

Su funcionamiento se basa en la absorción de luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta.

Hay tres tipos de detectores de luz ultravioleta:

- a).- El de longitud de onda variable, que no solo es de aplicación más variada y sensible, sino también más costoso.
- b).- El fotómetro de luz ultravioleta, es relativamente insensible a los cambios de flujo y de temperatura, siempre y cuando el disolvente no absorba en grado apreciable en la longitud de onda que opera el fotómetro.

c).- El detector ultravioleta con arreglo de diodos. La diferencia de éste con el detector ultravioleta convencional, es que éste posee un fotomultiplicador o fotodiodo que consiste generalmente de 211 elementos o diodos, cada uno con 50 μm de amplitud que nos permite obtener un espectro completo desde 190 a 600 nm.

Detector de fluorescencia

Actualmente es el detector más sensible. En buenas condiciones es posible detectar con este instrumento cantidades del orden de picogramos (10 a 12 picogramos), lo cual es comparable a los detectores de captura de electrones en cromatografía de gases.

Hay dos diseños básicos de estos detectores de fluorescencia, los llamados fluorómetros de filtro para seleccionar la radiación de excitación y la emisión, y los espectrofluorómetros que emplean monocromadores.

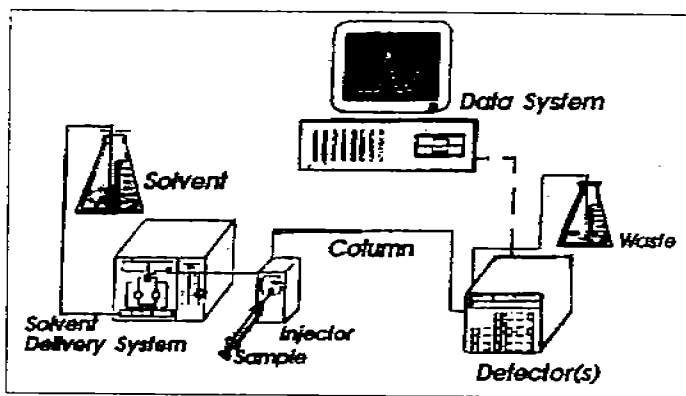


Fig. 1.- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución. La figura muestra los componentes de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

IV.- ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

El análisis por fluorescencia es un método analítico estrechamente relacionado con la espectrofotometría. Una molécula se puede excitar desde su estado electrónico fundamental hasta un estado electrónico excitado por absorción de energía en forma de luz visible o ultravioleta. Muchas moléculas son capaces de emitir esta energía como radiación, con lo cual vuelven al estado fundamental. La radiación emitida se conoce como fluorescencia.

Origen de la fluorescencia. En una molécula un electrón puede girar en dos posibles formas (spin $+1/2$ o $-1/2$). Los spins de todos los electrones de las capas internas están apareados; es decir, por cada electrón con spin de $+1/2$ hay uno con $-1/2$, por lo que se compensan sus componentes de spin. Se calcula el spin resultante, S , de una molécula sumando sus spins de todos los electrones situados fuera de las capas completas.

La multiplicidad de un estado de energía molecular es igual a $2S+1$ donde se toma el valor absoluto de S . La mayoría de las moléculas orgánicas contienen un número par de electrones; además, las transiciones electrónicas de interés espectroscópico suelen ser del estado fundamental hasta los estados excitados inferiores, y, por lo general, solo interviene un par de electrones. Éstos pueden ser los electrones de un orbital π o de un orbital η . El valor de S para tales moléculas es, por tanto, 0 o 1, y las multiplicidades correspondientes serán 1 y 3. El estado energético de multiplicidad 1 se conoce como estado singlete, y el estado de multiplicidad 3, como estado triplete. El estado electrónico fundamental acostumbra ser un singlete. El proceso de excitación muestra la transición de un electrón desde el orbital superior ocupado al orbital inferior sin ocupar.

En cuanto la molécula se ha situado en el estado singlete excitado por absorción de energía, es posible que pierda esta energía por diversos mecanismos (este retorno es el resultado de pérdida de energía, a través de procesos de colisión, por las moléculas circundantes) con lo cual vuelve al estado fundamental.

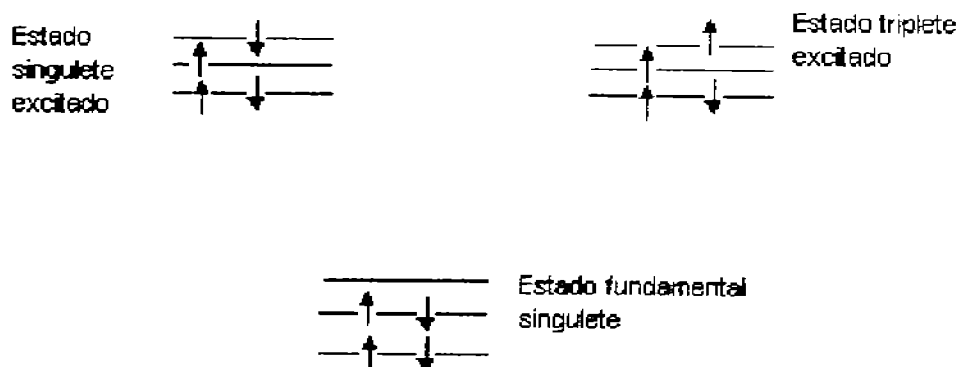


Fig. 2.- Representación esquemática de los estados electrónicos más bajos. Cada línea representa un orbital. Después de la absorción de energía, un electrón se excita al orbital sin ocupar

Una molécula en estado singlete, S, puede volver al singlete fundamental, G, por emisión de luz y realizando una transición radiactiva permitida. La luz emitida de una transición singlete-singlete es fluorescente. Dicho en otras palabras para que una molécula presente fluorescencia, la molécula excitada debe volver al estado fundamental mediante una transición radiactiva desde el singlete excitado. Esto significa que la fluorescencia cesa tan pronto como se separa la fuente de excitación. Si una molécula ha rebasado el estado triplete, está prohibida la transición al estado fundamental. No obstante, tal vez ocurra y la radiación emitida en este proceso es

fosforescente. La mayoría de las moléculas pierden menos energía por emisión que la que ganaron por absorción, por lo que el espectro de fluorescencia aparece a mayores longitudes de onda que el espectro de excitación.

La principal ventaja del análisis por fluorescencia es su sensibilidad. Aunque rara vez las cantidades de analitos presentes en las formas de dosificación son tan pequeñas como requiere la sensibilidad de este orden, las concentraciones de fármacos y metabolitos en la sangre, orina y otras muestras biológicas puede ser extremadamente baja, y el análisis por fluorescencia tiene amplia aplicación en estos casos.

COMPONENTES DE LOS EQUIPOS INSTRUMENTALES

El instrumento para medidas fluorimétricas comprende:

- Una fuente luminosa (F): la mayoría de las veces una lámpara de xenón (espectro de emisión continuo) y, más recientemente, una fuente láser.
- Un monocromador de excitación que seleccione una longitud de onda de excitación (ME).
- Un monocromador de fluorescencia (MF). Los monocromadores deben seleccionar muy exactamente las longitudes de ondas con el fin de evitar un traslape eventual de las longitudes de onda máximas de excitación y emisión.
- Una cuba con cuatro caras transparentes.
- Un fotomultiplicador (FM)

La característica fundamental de los instrumentos para medidas fluorimétricas reside en la incorporación de dos selectores de radiaciones situados antes y después de la cubeta portamuestras y dispuestos generalmente en ángulo de 90°. Si bien la disposición perpendicular (90°) es la más empleada (por ser máxima la sensibilidad) también existen la frontal (45°) y rectilínea (180°).

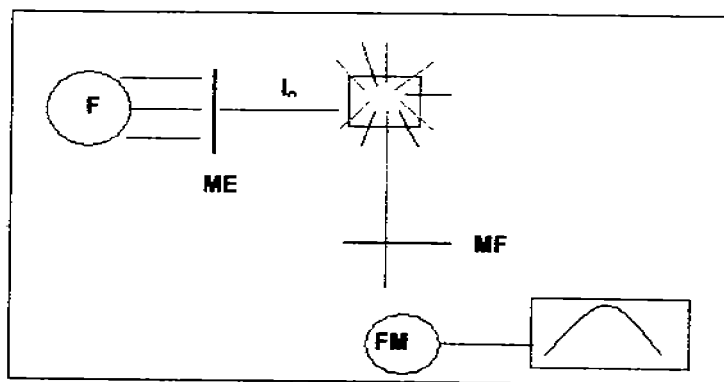


Fig. 3.- Esquema de un fluorímetro. La figura muestra los componentes de un fluorímetro

V.- DERIVATIZACIÓN PARA LA CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

La finalidad de esta operación es aumentar la sensibilidad de los solutos hacia el detector. Como los productos farmacéuticos pueden ser neutros, ácidos o anfóteros, se realizan mediante reacciones en las que se forman derivados que contienen un grupo cromóforo o fluoróforo que facilita la detección y aumenta la sensibilidad.

La derivatización se puede llevar a cabo por varios métodos aunque los más utilizados son los de ultravioleta visible y fluorescencia. Se obtienen por adadura de un cromóforo con un coeficiente de adsorción elevado, o en el caso que el derivatizante sea fluorescente, este debe tener una eficacia cuántica muy elevada.

Esta operación de derivatización puede realizarse antes (precolumna) o después de inyectar la muestra problema en el sistema cromatográfico (postcolumna). Para realizar la derivatización de forma exacta y reproducible se utilizan reactores, que pueden ser de diferentes tipos.

OBJETIVO GENERAL

Validar un método analítico para cuantificar amantadina en plasma por HPLC acoplado a fluorescencia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar el método analítico que está basado en lo reportado por Suckow, R.F. *et. al.*, 1999; para cuantificar amantadina en plasma siguiendo las especificaciones de la NOM – 177 – SSA – 1998.
- Validar un método analítico capaz de cuantificar concentraciones tóxicas de amantadina en plasma.
- Evaluar los siguientes parámetros de validación: linealidad, precisión (repetibilidad, reproducibilidad intralaboratorio), exactitud, recuperación absoluta, límite de cuantificación, límite de detección, estabilidad de la muestra analítica, selectividad del método.

JUSTIFICACIÓN

La Amantadina, una amina tricíclica, que tiene efecto fundamentalmente sobre receptores dopaminérgicos ha sido aprobada en los Estados Unidos para el tratamiento en contra del parkinsonismo⁽³⁸⁾. No obstante, en México no se cuenta con reportes de investigaciones acerca de los beneficios del tratamiento con Amantadina en pacientes con Enfermedad de Parkinson. Del mismo modo, no existen reportes del monitoreo terapéutico que revelen el análisis de los niveles del fármaco, además no se cuenta en los laboratorios analíticos con una estrategia experimental lo suficientemente sensible que permita evidenciar su presencia en plasma y así poder realizar ensayos clínicos controlados. Es por eso que este trabajo pretende la validación del método analítico por HPLC acoplado a fluorescencia, que permita cuantificar los niveles del fármaco en plasma de pacientes que forman parte del protocolo clínico titulado: "Ensayo clínico controlado doble ciego de la eficacia de la Amantadina en discinesias tardías en pacientes de Parkinson Ideopático en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México", que tiene como objetivo mejorar la calidad de vida del paciente e introducir la Amantadina en el mercado nacional a fin de obtener sus beneficios.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

I.- REACTIVOS

Se utilizó: Clorhidrato de amantadina, donado por Psicofarma S.A. de C.V. Lot. 74666, Clorhidrato de memantina de RBI; Alcohol isoamílico, n -heptano, dihidrógenofosfato de potasio (KH_2PO_4) de Merck grado analítico; hidróxido de sodio de Técnica Química grado analítico; ácido clorhídrico fumante 37% de Merck grado reactivo; carbonato de sodio anhidro 99 % (Na_2CO_3), Cloruro de dansilo, Imipramina de Sigma grado analítico; acetonitrilo de Mallinckrodt grado HPLC Clorhidrato de Fluoxetina donado Eli Lilly y Compañía de México S.A. de C.V. Lot. W02109L.

II.- PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

- 1 mL de cloruro de dansilo al 1%

Pesar 0.01 g de cloruro de dansilo en la Balanza analítica BP 110S Sartorius y disolverlos en 1 mL de acetonitrilo grado HPLC. Protegerlo de la luz, mantenerlo en hielo hasta su uso. Prepararlo 5 minutos antes de realizar la reacción de derivatización.

- 1 L de solución amortiguadora de dihidrógenofosfato de potasio 0.025 M pH 5.2

Pesar 3.4 g de dihidrógenofosfato de potasio, disolverlos en un volumen de agua, agregar 500 μL de ácido fosfórico y llevar a pH 5.2 con un Potenciómetro Metrohm Herisau Digital – pH – Meter E532. Aforar a 1L con agua desionizada.

● Preparación de la fase móvil

La fase móvil consiste en una mezcla de acetonitrilo grado HPLC con solución amortiguadora de fosfato 0.025 M pH 5.2 , en proporción 70/30.

Para preparar 1 L de fase, medir en una probeta 700 mL de acetonitrilo grado HPLC, filtrar el búfer de fosfato .025 M pH 5.2 con Membranas de nitrocelulosa .45 μm Millipore y medir 300 mL. Mezclar y degasificar la fase en un equipo de ultrasonido por 5 min.

- Preparación de las soluciones de clorhidrato de amantadina en plasma / agua desionizada.

Solución A



Pesar en la balanza analítica 4 mg de clorhidrato de amantadina y llevarlos a un volumen de 10 mL con agua desionizada o plasma en un matraz volumétrico.

Concentración final = 0.4 mg/mL

Solución B



De la solución A tomar 1 mL y aforarlo a 10 mL con agua desionizada o plasma en un matraz volumétrico.

Concentración final = .04 mg/mL

Solución C



De la solución B tomar 1 mL y aforarlo a 25 mL con agua desionizada o plasma en un matraz volumétrico.

Concentración final = 1600 ng/mL

Se preparó una solución C' para la realización de la curva de calibración de los límites de cuantificación y detección.

Solución C'



De la solución B tomar 250 μ l y aforarlo a 10 mL con agua desionizada o plasma en un matraz volumétrico.

Concentración final = 1000 ng/mL

- Preparación de la soluciones de clorhidrato de memantina (estándar interno) en agua desionizada.

Solución A



Pesar en la balanza analítica 4 mg de clorhidrato de memantina y llevarlos a un volumen de 10 mL con agua desionizada en un matraz volumétrico.

Concentración final = 0.4 mg/mL

Solución B



De la solución A tomar 1 mL y aforarlo a 10 mL con agua desionizada en un matraz volumétrico.

Concentración final = 0.04 mg/mL

Solución C

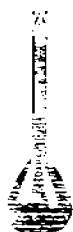


De la solución B tomar 1 mL y aforarlo a 10 mL con agua desionizada en un matraz volumétrico.

Concentración final = 0.004 mg/mL

- Preparación de las soluciones de imipramina y clorhidrato de fluoxetina en agua desionizada.

Solución A



Pesar en la balanza analítica .0020 gr = 2 mg de imipramina y llevarlos a un volumen de 5 mL con agua desionizada en un matraz volumétrico.

Concentración final = .4 mg/mL

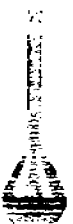
Solución B



De la solución A tomar 500 μ l y aforarlo a 5 mL con agua desionizada en un matraz volumétrico.

Concentración final = .04 mg/mL

Solución C



De la solución B tomar 200 μ l y aforarlo a 5 mL con agua desionizada en un matraz volumétrico.

Concentración final = 1600 ng/mL

Se repite el procedimiento anterior de la preparación de imipramina para preparar la solución de clorhidrato de fluoxetina.

⇨ **Preparación de la curva de calibración de clorhidrato de amantadina**

Adicionar los volúmenes correspondientes a cada tubo de ensayo para cada nivel de concentración de clorhidrato de amantadina como se indica en la Tabla No. 1.

Concentración de amantadina en plasma ng/mL	Volumen de la solución C de clorhidrato de amantadina (1600 ng/mL) μ l	Volumen de la solución C de clorhidrato de memantina (0.004 mg/mL) μ l	Plasma μ l
1200	750	125 = 500 ng/mL	250
1000	625	125	375
800	500	125	500
600	375	125	625
400	250	125	750
200	125	125	875

Tabla No. 1.- Preparación de la curva de calibración de clorhidrato de amantadina.

● **Preparación de la curva de calibración para los límites de detección y cuantificación.**

Adicionar los volúmenes correspondientes a cada tubo de ensayo para cada nivel de concentración de clorhidrato de amantadina como se indica en la Tabla No. 2

Concentración de amantadina en plasma ng/mL	Volumen de la solución C de clorhidrato de amantadina (1600 ng/mL) μ l	Volumen de la solución C de clorhidrato de memantina (.004 mg/mL) μ l	Plasma μ l
800	800	100 = 400 ng/ml	200
600	600	100	400
400	400	100	600
200	200	100	800
100	100	100	900
50	50	100	950

Tabla No. 2.- Preparación de la curva de calibración para los límites de detección y cuantificación.

⊗ **Preparación de las concentraciones baja, media y alta (300, 700 y 1100 ng/mL)**

Adicionar los volúmenes correspondientes a cada tubo de ensayo para cada nivel de concentración de clorhidrato de amantadina como se indica en la Tabla No. 3.

Concentración de amantadina en plasma ng/mL	Volumen de la solución C de clorhidrato de amantadina (1600 ng/mL) μ l	Volumen de la solución C de clorhidrato de memantina (.004 mg/mL) μ l	Plasma μ l
300	187.5	125	812.5
700	437.5	125	562.5
1100	687.5	125	312.5

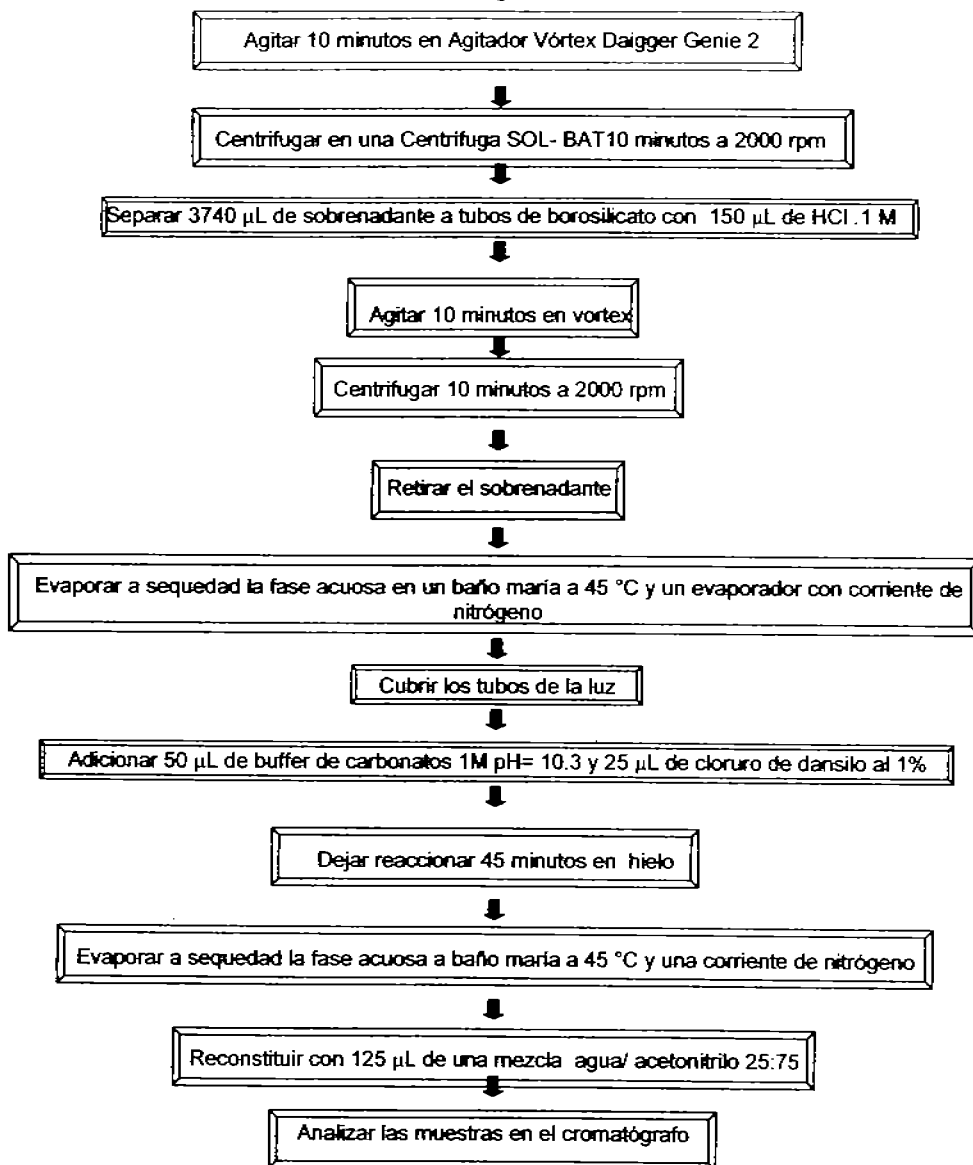
Tabla No. 3.- Preparación de las concentraciones de 300,700 y 1100 ng/mL

III.- CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA ANALIZAR LAS MUESTRAS DEL ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN.

- ❖ Bomba binaria Perkin Elmer Serie 200 LC, Detector de Fluorescencia Modelo 157 Beckman, Integrador HP 3396 Serie II.
- ❖ Columna Alltech Lichrosorb RP-18 (5 μ m 250 mm X 4.6 mm)
- ❖ Fase móvil: búfer de fosfatos 0.025 M (pH= 5.2)/ acetonitrilo 30/70, respectivamente.
- ❖ Velocidad de Flujo: 1.8 mL/min.

IV.- ESQUEMA DEL ENSAYO DE CUANTIFICACIÓN

1 mL de plasma + 125 μ L de std. interno + 1 mL de NaOH 1 M + 4 mL de n-heptano / alcohol isoamílico 1.5%



V.- VALIDACIÓN DEL SISTEMA

Con la finalidad de contar con un método analítico confiable, se procedió a su validación, iniciando con la validación del sistema, para lo cual se evaluaron los parámetros de linealidad y precisión.

V.1.- LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA

Para evaluar la linealidad y precisión del sistema, se preparó una curva de calibración de clorhidrato de amantadina en agua, en el rango de 200 a 1200 ng/mL (tabla No.1), las cuales fueron tratadas con el proceso descrito en el ensayo de cuantificación.

Para la curva de calibración, se determinó la relación de áreas bajo la curva (área de amantadina/ área de std. interno) y se graficó el cociente con respecto a la concentración de clorhidrato de amantadina. Por medio de un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados se determinó la ordenada al origen (b), la pendiente (m) y el coeficiente de correlación (r).

Se considera que es lineal si el coeficiente de correlación (r) es mayor o igual a .99.

Para evaluar la precisión del sistema, se emplearon los datos de linealidad, para los cuales el coeficiente de variación del factor de respuesta debe ser igual o menor al 15 %.

VI.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR CLORHIDRATO DE AMANTADINA EN PLASMA

Para comprobar que el método analítico es confiable para la cuantificación de clorhidrato de amantadina, éste se validó siguiendo las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana NOM – 177 – SSA – 1998, en el apartado que se refiere a la validación de métodos analíticos. Los parámetros evaluados fueron los que se describen a continuación:

VI.1.- LINEALIDAD DEL MÉTODO

La linealidad del método se evaluó preparando a partir de pesadas independientes, una curva de calibración de clorhidrato de amantadina en plasma, en el intervalo de concentraciones de 200 a 1200 ng/mL (tabla No. 1). Las muestras se procesaron de acuerdo al método descrito en el esquema de cuantificación. Para cada curva de calibración, se graficó la relación de áreas (área amantadina/ área std. Interno) con respecto a la concentración de clorhidrato de amantadina y por medio de un ajuste de mínimos cuadrados se determinó: ordenada al origen (b), pendiente (m), y coeficiente de correlación (r). El método se consideró lineal, si el coeficiente de correlación (r) fue mayor o igual a .99.

VI.2.- PRECISIÓN DEL MÉTODO

La precisión del método se evaluó con los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio, analizando tres concentraciones conocidas de clorhidrato de amantadina en plasma (tabla No. 3): alta, media y baja (300, 700, 1100 ng/mL) las cuales eran diferentes a las de la curva de calibración pero se encontraban dentro del intervalo de concentraciones.

REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

La repetibilidad del método se evaluó en un mismo día por quintuplicado con tres concentraciones conocidas de clorhidrato de amantadina en plasma (300, 700, 1100 ng/mL) bajo las mismas condiciones de equipo, laboratorio y analista. Las muestras se procesaron de acuerdo al procedimiento mencionado en el esquema de cuantificación.

Para cada nivel de concentración, se determinó el promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación.

El método es repetible, si el coeficiente de variación es menor al 15%.

REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO DEL MÉTODO

Para determinar este parámetro las tres concentraciones conocidas de clorhidrato de amantadina en plasma (300, 700, 1100 ng/mL) se analizaron por duplicado durante tres días, bajo las mismas condiciones de equipo, laboratorio y analista.

Para cada nivel de concentración, se determinó el promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación. También se realizó una prueba de ANOVA.

El método se consideró reproducible, si el coeficiente de variación es menor al 15%.

VI.3.- EXACTITUD DEL MÉTODO

La exactitud del método se evaluó, a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, al determinar la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones de cada nivel de concentración, con respecto a la concentración nominal de la muestra. Se realizó una prueba t de Student. El método se consideró exacto, si el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad se encuentran dentro del $\pm 15\%$ valor nominal de concentración.

VI.4.- RECUPERACIÓN ABSOLUTA

Se determinó preparando por triplicado en agua y plasma tres concentraciones conocidas de clorhidrato de amantadina: 300, 700 y 1100 ng/mL (tabla No. 3). Las muestras en agua se evaporaron a sequedad en baño maría a 45°C, bajo corriente de nitrógeno, el residuo se sometió a la reacción de derivatización de la técnica descrita en el esquema de cuantificación y las muestras plasmáticas siguieron todo el proceso de extracción.

Para determinar el porcentaje de clorhidrato de amantadina recuperado se comparó el área bajo la curva, obtenida en plasma con respecto al área bajo la curva obtenida en agua, considerando ésta como el 100% en cada caso, para cada nivel de concentración.

VI.5.- LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y LÍMITE DE DETECCIÓN

Para evaluar estos parámetros se prepararon 10 réplicas de una concentración de 50 ng/mL (tabla No. 2). Se calculó promedio, desviación estándar y % de desviación absoluta de la relación de áreas bajo la curva (área de amantadina/ área de memantina) para la concentración de 50 ng/mL. La desviación estándar fue extrapolada en una curva de calibración con los siguientes niveles: 50, 100, 200, 400, 600 ng/mL, para obtener su valor de concentración.

La concentración obtenida fue multiplicada por 2 para el límite de detección y por 10 para el límite de cuantificación.

VI.6.- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA

Para evaluar la estabilidad del clorhidrato de amantadina, se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo en las que ésta permaneció estable en plasma durante su manejo, almacenamiento y procesamiento. Se evaluó la respuesta de muestras preparadas por triplicado a tres niveles de concentración: 300, 700 y 1100 ng/mL, en las siguientes condiciones:

V.6.1).- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO -72 °C.

Se prepararon muestras (tabla No. 3) por triplicado a las concentraciones de 300,700, 1100 ng/mL, las cuales se prepararon, se procesaron y analizaron y otras muestras que se almacenaron por 41 días a -72°C para después analizarse.

V.6.2).- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EXTRAÍDA

Para evaluar esta estabilidad, se prepararon muestras (tabla No. 3) por triplicado a las concentraciones de 300,700 y 1100 ng/mL, las cuales se prepararon, se procesaron y analizaron y otras que solamente se extrajeron de la matriz biológica, se almacenaron a -20 °C y a las 48 horas se derivatizaron y analizaron.

V.6.3).- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA

Este parámetro se evaluó preparando por triplicado muestras de clorhidrato de amantadina (tabla No. 3) en plasma con concentraciones de 300,700 y 1100 ng/mL las cuales fueron analizadas, y otras que fueron procesadas y el residuo reconstituido almacenado 48 horas a -20 °C para su lectura.

V.6.4).- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DURANTE CICLOS DE CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN

Se prepararon por triplicado muestras de clorhidrato de amantadina (tabla No 3) de concentraciones de 300,700 y 1100 ng/mL en plasma, las cuales se mantuvieron en congelación a -20°C. El análisis de las muestras se realizó al

tiempo 0, 1 día, 3 días, 7 días, 15 días posteriores a su preparación, descongelando todas las replicas.

De acuerdo a las especificaciones el clorhidrato de amantadina es estable en el plasma en las condiciones de temperatura y tiempo evaluadas si los resultados obtenidos se encuentran dentro del $\pm 15 \%$ del valor nominal de concentración y el coeficiente de variación es menor al 15 %.

VII.- SELECTIVIDAD DEL MÉTODO

Para establecer la selectividad del método analítico, se analizó una muestra blanco de plasma y muestras de plasma a las cuales se les adicionó imipramina y clorhidrato de fluoxetina, a una concentración de 400 ng/mL.

Las muestras se procesaron de acuerdo al método de extracción mencionado en el esquema de cuantificación. Para que el método se considere selectivo no deben existir interferencias en la cuantificación del clorhidrato de amantadina.

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

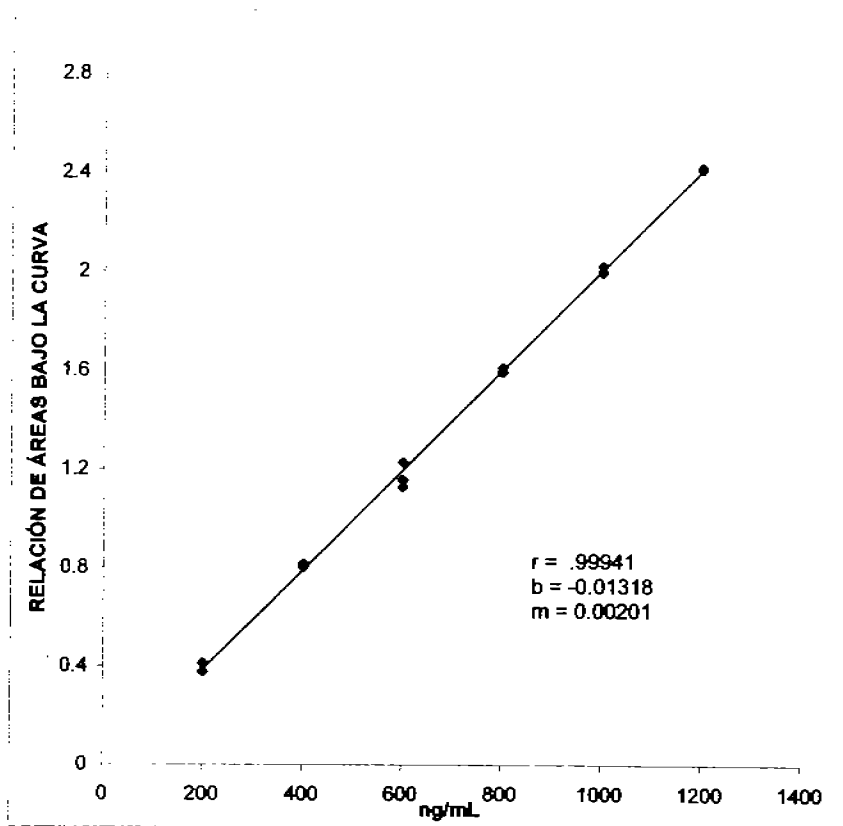
I.- VALIDACIÓN DEL SISTEMA

I.1.- LINEALIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA

En la tabla No.4 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la linealidad y precisión del sistema. Los resultados muestran que los coeficientes de variación están en el rango de 0.1590 – 5.1356 % y el valor del coeficiente de correlación (r) es de .9994, por lo que de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos podemos concluir que el sistema para la cuantificación de amantadina es lineal y preciso, en el intervalo de concentraciones de 200 a 1200 ng/mL .

CONCENTRACIÓN NOMINAL ng/mL	RELACIÓN DE ÁREAS BAJO LA CURVA			D.E.	C.V. (%)
200	0.3800	0.3801	0.4149	0.0201	5.1356
400	0.8165	0.8132	0.8044	0.0062	0.7702
600	1.2282	1.1281	1.1562	0.0516	4.4096
800	1.6109	1.5905	1.5935	0.0110	0.6891
1000	2.0185	1.9913	1.9969	0.0142	0.7070
1200	2.4165	2.4098	2.4164	0.0038	0.1590
b	-0.01318				
m	0.00201				
r	.9994				

Tabla No. 4.- Linealidad y precisión del sistema. La tabla nos muestra las desviaciones estándar y coeficientes de variación (%) de cada nivel de concentración por triplicado de la curva de calibración en agua, al igual que los parámetros de b, m y r.



Gráfica No. 1.- Linealidad del Sistema.

II.- VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE AMANTADINA EN PLASMA

II.1.- LINEALIDAD DEL MÉTODO

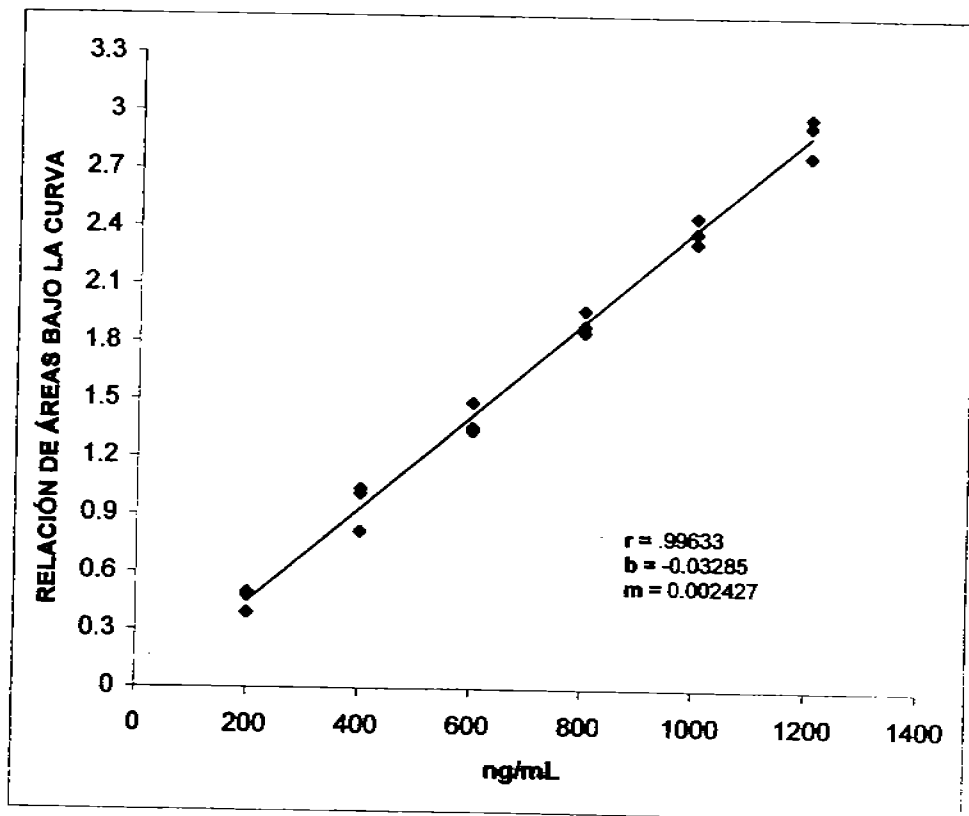
En la tabla 5 se presentan los resultados de la evaluación de la linealidad del método para cuantificar amantadina en plasma. En ella se muestran los datos de la relación de áreas (área de amantadina / área de memantina) de los picos de la curva de calibración por triplicado preparados en plasma, así como los valores de la ordenada al origen (b), pendiente (m) y coeficiente de correlación lineal (r), en donde se puede observar que éste último valor es mayor a .99 en todos los casos.

Por otra parte, el coeficiente de variación se encontró entre el 12.7 % y el 2.7 %, por lo de acuerdo a los criterios establecidos que indican que los coeficientes de variación no deben ser mayores al 15%, se demuestra que la relación matemática entre concentración y respuesta es reproducible en el intervalo de concentraciones de 200 a 1200 ng/mL.

Validación de un método analítico para cuantificar amantadina en plasma por HPLC acoplado a fluorescencia

CONCENTRACIÓN NOMINAL ng/mL	RELACIÓN DE ÁREAS BAJO LA CURVA			PROMEDIO	D.E.	C.V. (%)
200	0.4790	0.4984	0.3919	0.4564	0.0567	12.4255
400	1.0380	1.0140	0.8170	0.9563	0.1212	12.6826
600	1.4893	1.3609	1.3401	1.3968	0.0807	5.7839
800	1.9719	1.8921	1.8581	1.9074	0.0584	3.0638
1000	2.4577	2.3233	2.3761	2.3857	0.0677	2.8379
1200	2.9766	2.7761	2.9324	2.8950	0.10534	3.6388
r	0.99633					
b	-0.032852					
m	0.00242					

Tabla No. 5.- Linealidad del Método Analítico. La tabla muestra los promedios, desviaciones estándar y coeficientes de variación (%) de cada nivel de concentración de la curva en la matriz biológica por triplicado, así como los parámetros de r, b y m.



Gráfica No. 2.- Linealidad del Método Analítico.

II.2.- PRECISIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

REPETIBILIDAD DEL MÉTODO ANALÍTICO

En la tabla No. 6 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de la repetibilidad del método analítico al analizar en un mismo día, por quintuplicado, tres concentraciones conocidas de amantadina en plasma, bajo las mismas condiciones de equipo, laboratorio y analista.

Se puede observar que el coeficiente de variación en los tres niveles de concentración, está entre 12.97 % y 2.93 %, sin rebasar el límite máximo establecido del 15 %, por lo cual, el método analítico para cuantificar amantadina en plasma, se considera repetible en el intervalo de concentraciones de 200 a 1200 ng/mL.

CONCENTRACIÓN NOMINAL (ng/mL)	300	700	1100
RÉPLICA	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL (ng/mL)		
1	246.09	578.98	899.99
2	210.78	564.82	953.31
3	240.37	713.42	951.94
4	299.03	608.63	899.60
5	266.62	607.68	941.74
PROMEDIO	252.58	614.71	929.32
D.E.	32.762	58.299	27.31
C.V. (%)	12.97	9.48	2.93
t_{cal}	1.447	1.462	6.249
t_{tab}	2.776	2.776	2.776

Tabla No. 6.- Repetibilidad del Método Analítico. La tabla muestra promedio, desviación estándar, coeficiente de variación (%), t_{cal} y t_{tab} para cada nivel de concentración evaluados cada uno por quintuplicado bajo las mismas condiciones de equipo, laboratorio y analista.

PRUEBA DE HIPOTESIS:

H_0 : $x = \mu$ El método es exacto.

H_a : $x \neq \mu$ El método no es exacto.

TOMA DE DECISIÓN

Se acepta H_0 si $t_{cal} < t_{tab}$, al 95 % con n-1 grados de libertad.

REPRODUCIBILIDAD INTRALABORATORIO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Los resultados obtenidos para la evaluación de la reproducibilidad intralaboratorio del método analítico se presentan en la tabla No. 7. Los coeficientes de variación obtenidos para las concentraciones evaluadas: 300, 700 y 1100 ng/mL durante los tres días, bajo las mismas condiciones de analista y laboratorio fueron: 9.23, 8.32 y 7.32 %, respectivamente. Es evidente que en la cuantificación de la concentración menor de amantadina, se presentó un mayor coeficiente de variación en los resultados.

Considerando que el criterio de aceptación establecido, indica que los coeficientes de variación no deben ser mayores al 15 %, los resultados obtenidos demuestran que el método analítico es reproducible bajo las condiciones de análisis establecidas en diferentes días de trabajo.

Para la complementación del análisis estadístico de la reproducibilidad, se realizó un análisis de ANOVA, considerando un efecto anidado. De los resultados se obtuvo que $F_{cal} < F_{tab}$ en los tres niveles de concentración, por lo tanto podemos concluir que el analista y el día anidado en el analista, no presentan efecto sobre la valoración, dicho en otras palabras el análisis lo puede hacer cualquiera de los analistas en cualquier día.

Los resultados de repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio, demuestran que el método analítico para cuantificar amantadina en plasma es preciso, ya que cumple con los criterios establecidos que indican que los coeficientes de variación no deben ser mayores al 15 %.

Validación de un método analítico para cuantificar amantadina en plasma por HPLC acoplado a fluorescencia

CONCENTRACIÓN NOMINAL (ng/mL)	300	700	1100
DIA-REPLICA	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL (ng/mL)		
1-1	246.09	578.98	953.31
1-2	240.37	564.82	951.94
2-1	296.26	675.79	1091.85
2-2	297.33	660.28	1054.44
3-1	286.14	650.84	1132.17
3-2	286.07	694.27	1094.3
PROMEDIO	275.376	637.496	1046.335
D.E.	25.422	53.090	76.641
C.V.(%)	9.23	8.32	7.32

Tabla No. 7.- Reproducibilidad Intralaboratorio del Método Analítico. La tabla muestra el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de cada nivel de concentración analizado por duplicado durante 3 días, bajo las mismas condiciones de analista, equipo y laboratorio.

		ANALISTA	
		1	2
DÍA	1	220.332	301.733
		222.558	290.267
		223.785	309.273
2		221.099	292.187
		215.142	299.382
		242.474	263.083

Tabla No.8 .- Reproducibilidad del método para amantadina a una concentración de 300 ng / mL. La tabla muestra los valores obtenidos de la concentración de 300 ng/mL con analistas y días diferentes.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMIA DE CUADRADOS	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS	F CALCULADA	F CRÍTICA
ANALISTA	1	14044.791	14044.791	1.946	18.51
DÍA	2	14431.330	7215.665	3.6	4.46
ERROR	8	15772.5271	1971.565		
TOTAL	11				

Tabla No. 9 .- Tabla de análisis de la variancia.

REGLA DE DECISIÓN.-

PARA LA FUENTE DE VARIACIÓN ANALISTA

Si $F_{cal} < F_{tab}$ al 95 %, indica que no hay efecto del analista sobre la valoración.

PARA LA FUENTE DE VARIACIÓN DÍA

Si $F_{cal} < F_{tab}$ al 95 %, indica que no hay efecto del día sobre la valoración.

		ANALISTA	
		1	2
DÍA	1	600.578 613.799 597.146	663.216 678.076 676.068
	2	707.752 598.628 597.645	650.949 626.095 727.685

Tabla No.10.- Reproducibilidad del método para amantadina concentración de 700 ng/mL. La tabla muestra los valores obtenidos de la concentración de 700 ng/mL con analistas y días diferentes.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS	F CALCULADA	F CRÍTICA
ANALISTA	1	7830.321	7830.321	10.779	18.51
DÍA	2	1452.757	726.378	.4179	4.46
ERROR	8	13903.462	1737.932		
TOTAL	11				

Tabla No. 11 .- Tabla de análisis de la variancia.

REGLA DE DECISIÓN.-

PARA LA FUENTE DE VARIACIÓN ANALISTA

Si $F_{cal} < F_{tab}$ al 95 %, indica que no hay efecto del analista sobre la valoración.

PARA LA FUENTE DE VARIACIÓN DÍA

Si $F_{cal} < F_{tab}$ al 95 %, indica que no hay efecto del día sobre la valoración.

		ANALISTA	
		1	2
DÍA	1	1018.613	964.308
		981.018	1105.105
		979.750	1177.274
2	1	957.567	1010.213
		956.132	1059.292
		945.518	1038.299

Tabla No.12.- Reproducibilidad del método para amantadina concentración de 1100 ng/mL. La tabla muestra los valores obtenidos de la concentración de 1100 ng/mL con analistas y días diferentes.

FUENTE DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	PROMEDIO DE LOS CUADRADOS	F CALCULADA	F CRÍTICA
ANALISTA	1	22177.38	22177.38	7.888	18.51
DÍA	2	5622.7	2811.35	.8738	4.46
ERROR	8	25736.7	3217.08		
TOTAL	11				

Tabla No.13.- Tabla de análisis de la variancia.

REGLA DE DECISIÓN.-

PARA LA FUENTE DE VARIACIÓN ANALISTA

Si $F_{cal} < F_{tab}$ al 95 %, indica que no hay efecto del analista sobre la valoración.

PARA LA FUENTE DE VARIACIÓN DÍA

Si $F_{cal} < F_{tab}$ al 95 %, indica que no hay efecto del día sobre la valoración.

II.3.- EXACTITUD

En la tabla No. 14 se presentan los datos de la concentración experimental en los niveles de concentración evaluados a partir de la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad del método analítico, así como el promedio de estas concentraciones para apreciar la variación de dicha respuesta con respecto a la concentración nominal expresada como porcentaje de desviación absoluta. De los datos presentados en la tabla, se deduce que el valor máximo encontrado para el porcentaje de desviación absoluta fue del 12 %, sin rebasar el límite establecido del 15 %.

Por lo anteriormente mencionado, el método analítico es exacto para cuantificar amantadina en plasma ya que cumple con la especificación establecida que indica que el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deben estar dentro del 15 % del valor nominal de concentración.

Este parámetro de validación fue complementado con una prueba estadística *t* de Student, la t_{cal} y la t_{tab} , se muestran en la tabla No. 6. Según esta prueba estadística el método es exacto para los niveles de concentraciones de 300 y 700 ng/mL, en el que la $t_{cal} < t_{tab}$. Para la concentración de 1100 ng/mL se obtuvo una $t_{cal} > t_{tab}$, lo que nos indica que no es exacto para este nivel de concentración; pero se puede afirmar que tiene exactitud porque para este nivel tenemos un % de desviación absoluta de 10.19 % (ver tabla No. 14) que cumple con lo que solicitan las autoridades correspondientes (NOM- 177-SSA1-1998).

Validación de un método analítico para cuantificar amantadina en plasma por HPLC acoplado a fluorescencia

CONCENTRACIÓN NOMINAL (ng/mL)	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL (ng/mL)		CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL PROMEDIO (ng/mL)	% DESVIACIÓN ABSOLUTA
	REPETIBILIDAD	REPRODUCIBILIDAD		
300	252.58	275.376	263.978	12.00
700	614.71	637.496	626.103	10.55
1100	929.32	1046.335	987.8275	10.19

Tabla No. 14.- Exactitud del Método Analítico. La tabla muestra los valores de la concentración experimental promedio de repetibilidad y reproducibilidad para cada nivel de concentración, así como el % de desviación absoluta.

II.4.- RECUPERACIÓN ABSOLUTA

En la tabla No. 15 se muestra el porcentaje de recobro para amantadina en plasma a las concentraciones de 300, 700 y 1100 ng/mL evaluadas por triplicado. En dicha tabla se observa que el promedio del porcentaje de recobro es de 75.76 %, con un coeficiente de variación de 7.55 %.

De acuerdo con el criterio de aceptación establecido, que indica que el porcentaje de recobro no necesariamente debe ser del 100 %, pero si reproducible (demostrándose esto con el coeficiente de variación). El método de extracción empleado se considera adecuado para este fin, al cumplir satisfactoriamente con el criterio de aceptación.

Validación de un método analítico para cuantificar amantadina en plasma por HPLC acoplado a fluorescencia

CONCENTRACIÓN NOMINAL ng/mL	300	700	1100	300	700	1100
REPLICA	ÁREA BAJO LA CURVA DE AMANTADINA EN:					
	MUESTRAS ACUOSAS SIN EXTRACCIÓN			MUESTRAS PLASMÁTICAS CON EXTRACCIÓN		
1	3961174	9030522	10673832	2576042	6453933	7815168
2	3807504	6931251	11891776	2572766	5807514	9705203
3	3310182	7869306	13380880	2517334	6434202	11111352
PROMEDIO	3692953.333	7943693	11982162.7	2555380.67	6231883	9543907.67
% DE RECOBRO DE AMANTADINA				69.1961267	78.450703	79.6509606
			PROMEDIO DE LOS % DE RECOBRO	75.76		
			D.E.	5.72		
			C.V.(%)	7.55		

Tabla No. 15.- Porcentaje de Recobro de Amantadina en Plasma. La tabla muestra el área bajo la curva de réplicas acuosas sin extracción y muestras plasmáticas con extracción para cada nivel de concentración, así como el promedio del porcentaje de recobro, su desviación estándar y coeficiente de variación (%).

II.5.- LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN Y DETECCIÓN

El límite de cuantificación se determinó mediante dos métodos distintos. El primer método, es un método estadístico reportado por Liteanu C. *et. al.* 1980, con el cual se encontró un límite de cuantificación de 100 ng/ mL. El segundo método es el reportado en la NOM - 177 - SSA1 - 1998, al analizar 10 réplicas de la concentración de 50 ng/mL, se obtuvo el coeficiente de variación y el % de desviación absoluta; los cuales cumplieron con la especificación reportada que dice que estos parámetros deben ser menores al 20 %, por lo que se considera que esta concentración es el límite de cuantificación.

Con ambos métodos se tiene un límite de cuantificación bastante sensible y capaz de cuantificar la concentración tóxica reportada (> 1µg/mL).

El límite de detección se determinó con el método estadístico reportado por Liteanu C. *et. al.* 1980 y se encontró que tiene un valor de 20 ng/mL.

Validación de un método analítico para cuantificar amantadina en plasma por HPLC acoplado a fluorescencia

CONCENTRACIÓN NOMINAL ng/mL	50	50
RÉPLICAS	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL ng/mL	RELACIÓN DE ÁREAS BAJO LA CURVA
1	53.69095374	0.15299584
2	51.51952015	0.14613939
3	50.99766275	0.14449159
4	55.88831648	0.15993415
5	51.34075122	0.14557492
6	64.36649644	0.18670456
7	54.45155756	0.15539749
8	53.31812753	0.15181861
9	47.25476071	0.13267313
10	59.08746818	0.17003569
PROMEDIO	54.19156148	0.15457654
D.E.	4.773147021	0.01507153
C.V.(%)	8.81	
% DESVIACIÓN ABSOLUTA	8.38	

Tabla No.16.- Réplicas para determinar límites de detección y cuantificación. La tabla muestra el promedio, desviación estándar, coeficiente de variación (%) y % de desviación absoluta de las diez réplicas de la concentración de 50 ng/mL, así como el promedio y desviación estándar de la relación de áreas bajo la curva.

CONCENTRACIÓN NOMINAL ng/mL	RELACIÓN DE ÁREAS BAJO LA CURVA
50	0.15250314
100	0.29656004
200	0.61496073
400	1.22247481
600	1.89353054
b	-0.01653
m	0.00315
r	0.9997

Tabla No.17 .- Curva de calibración para la determinación de límites de cuantificación y detección.

Método I.-

Extrapolando la desviación estándar de la relación de áreas bajo la curva: **0.01507153** resulta una concentración de **10.01 ng/mL**

LÍMITE DE DETECCIÓN: $10.01 \text{ ng/ml} \times 2 = 20.02 \text{ ng/ml}$

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN: $10.01 \text{ ng/ml} \times 10 = 100.10 \text{ ng/ml}$

II.6.- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA ANALÍTICA

II.6.1).- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA A LAS CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO -72°C .

En la tabla No. 18 se presentan los resultados del análisis de muestras plasmáticas conteniendo amantadina las cuales fueron almacenadas a -72°C durante 41 días y los resultados de las muestras de tiempo cero.

Se realizó el análisis estadístico para estas replicas y se encontró que el coeficiente de variación está en un rango de 4 - 5.8 % y que el porcentaje de desviación absoluta está entre .9043 - 7.8 % con respecto a la concentración inicial. Estos parámetros nos indican que la amantadina es estable en la muestra plasmática a -72°C durante un periodo de 41 días.

CONCENTRACIÓN NOMINAL ng/mL	300	700	1100
DÍA-REPLICA	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL (ng/mL)		
0-1	260.260285	650.841814	1132.17062
0-2	286.074611	694.277133	1094.30169
0-3	286.144768	629.120485	1225.9258
1-1	274.689618	725.459892	1069.13318
1-2	266.309748	658.254526	1045.57358
1-3	285.201584	717.374373	1092.58147
PROMEDIO	276.44	679.221371	1109.94772
D.E.	11.23	38.9241185	63.7197229
C.V.(%)	4.06	5.73	5.74
% DE DESVIACIÓN ABSOLUTA	7.8	2.96	9.043

Tabla No. 18.- Evaluación de las Condiciones de Almacenamiento -72°C . La tabla muestra los valores de promedio, desviación estándar, coeficiente de variación (%) y porcentaje de desviación absoluta de las réplicas de cada nivel de concentración experimental a tiempo 0 y 41 días de almacenamiento a -72°C .

II.6.2).- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EXTRAÍDA

La tabla No. 19 nos muestra los resultados de muestras plasmáticas a tiempo cero y muestras a las cuales no se les sometió a la reacción de derivatización, almacenándolas 48 horas para su posterior análisis.

Los parámetros evaluados fueron coeficiente de variación y porcentaje de desviación absoluta. Los resultados del coeficiente de variación están en un rango de 10.10 y 10.8 % con respecto a la concentración inicial. El porcentaje de desviación absoluta tiene valores de .37,.049 y 11.5 %. Ambos parámetros cumplen satisfactoriamente con el criterio de aceptación establecido.

Esta prueba se realizó por la necesidad que surge de dejar en ocasiones el proceso de análisis en la etapa de la extracción, y por lo anteriormente analizado podemos decir que la amantadina extraída de la matriz biológica es estable durante 48 horas si se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

CONCENTRACIÓN NOMINAL	300	700	1100
0-1	260.2602	650.8418	1132.1706
0-2	286.0746	694.2771	1094.3016
0-3	286.1447	629.1204	1225.9258
1-1	349.9517	1391.1916
1-2	319.3096	762.0753	1412.9522
1-3	305.024	765.4053	1224.4632
PROMEDIO	301.1274	700.3439	1225.8578
D.E..	31.1473	55.8637	131.8244
C.V. (%)	10.3435	7.9766	10.7536
% DESVIACIÓN ABSOLUTA	.3758	.0491	11.441

Tabla No. 19.- Estabilidad de la Muestra Extraída y Almacenada 48 hrs. a -20°C. La tabla muestra los valores de promedio, desviación estándar, coeficiente de variación (%) y porcentaje de desviación absoluta de las réplicas de cada nivel de concentración experimental a tiempo 0 y muestras que se extrajeron de la matriz biológica, se almacenaron a -20°C y a las 48 hrs. se derivatizaron y analizaron.

II.6.3).- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA PROCESADA Y ALMACENADA A -20°C 48 HRS.

La tabla No. 20 muestra los resultados de la evaluación de la estabilidad de la muestra reconstituida y almacenada a -20°C durante 48 horas y los resultados de tiempo cero. En la tabla se puede observar que los parámetros estadísticos evaluados son coeficiente de variación y porcentaje de desviación absoluta. Los valores obtenidos para el coeficiente de variación están en el intervalo 5.52 – 9.53 % y para el porcentaje de desviación absoluta tenemos que el intervalo es de 4.9 – 7.1 %, por lo que según el criterio de aceptación establecido, podemos decir que la amantadina reconstituida es estable en un periodo de almacenamiento de 48 horas a -20°C .

Esta prueba demuestra la estabilidad del producto dansilado durante el análisis y además garantiza la confiabilidad del resultado, si es que por alguna circunstancia el analista no puede continuar el mismo día con el análisis de las muestras.

CONCENTRACIÓN NOMINAL	300	700	1100
0-1	260.2602	650.8418	1132.1706
0-2	286.0746	694.2771	1094.3016
0-3	286.1447	629.1204	1225.9258
1-1	289.571	777.9925	1165.2338
1-2	304.0343	747.2017	1253.7927
1-3	794.4401	1275.8998
PROMEDIO	285.2169	715.6456	1178.1891
D.E..	15.7915	68.1678108	71.8968
C.V. (%)	5.5366	9.5253	6.1023
% DESVIACIÓN ABSOLUTA	4.927	2.235	7.108

Tabla No. 20.- Estabilidad de la muestra procesada y almacenada a -20°C 48 hrs. La tabla muestra los valores de promedio, desviación estándar, coeficiente de variación (%) y porcentaje de desviación absoluta de las réplicas de cada nivel de concentración experimental a tiempo 0 y muestras que se derivatizaron, el residuo almacenado 48 horas a -20 °C y analizadas.

II.6.4).- ESTABILIDAD DE LA MUESTRA DURANTE CUATRO CICLOS DE CONGELACIÓN - DESCONGELACIÓN -20 °C

En la tabla No. 21 se muestran los resultados correspondientes a la estabilidad de amantadina en plasma mantenido a -20 °C. El análisis se realizó al tiempo cero, 1 día, 3 días, 7 días y 15 días posteriores a su preparación. En ella se observa, que el coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta de las réplicas con respecto a la concentración inicial en cada nivel de concentración, son inferiores al 15 %.

Por lo anterior se concluye, que la amantadina es estable en plasma mantenida a - 20 °C durante 15 días y después de 4 ciclos de congelación descongelación.

CONCENTRACIÓN NOMINAL ng/mL	300	700	1100
DÍA -REPLICA	CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL		
0-1	260.260285	650.841814	1132.17062
0-2	286.074611	694.277133	1094.30169
0-3	286.144768	629.120485	1225.9258
1-1	320.427581	658.090051	850.129577
1-2	313.330466	633.940486	950.041649
1-3	301.545926	679.242128	920.786444
2-1	288.368183	688.176992	1170.42385
2-2	276.668051	658.521946	1123.79035
2-3	271.085686	647.531853	1040.56251
3-1	256.576131	602.000326	1092.32328
3-2	248.777894	600.15214	1032.46552
3-3	252.832999	—————	987.990088
4-1	206.943302	582.828245	825.639195
4-2	225.24581	501.035146	834.115351
4-3	204.609295	—————	902.936345
PROMEDIO	266.59	632.75	1012.24
D.E.	35.27	52.22	128.02
C.V. (%)	13.23	8.25	12.64
% DE DESVIACIÓN ABSOLUTA	11.13	9.60	7.97

Tabla No. 21.- Evaluación de los Ciclos de Congelación y Descongelación a -20 °C. La tabla muestra los valores de promedio, desviación estándar, coeficiente de variación (%) y porcentaje de desviación absoluta de las réplicas de cada nivel de concentración experimental a tiempo 0, 1 día, 3 días, 7 días, 15 días posteriores a su preparación, congelando (-20 °C) y descongelando todas las réplicas.

III.- SELECTIVIDAD DEL MÉTODO

No se observaron señales del plasma y de los fármacos adicionados (imipramina y fluoxetina) que interfieran con la respuesta cromatográfica de la amantadina y de la memantina (estándar interno).

En la tabla No. No. 22 se muestran los tiempos de retención y resolución de los fármacos añadidos. En las figuras 4,5,6 y 7 se presenta el cromatograma respectivo.

FÁRMACO	CONCENTRACIÓN (ng/mL)	Tiempo de retención (min.)	Resolución
imipramina	400	No presenta	No presenta
Fluoxetina	400	13.678	4.026*
Amantadina	200	7.850	—
Memantina	500	12.207	—

Tabla No. 22 .- Selectividad del método analítico.

- Resolución calculada con respecto al estándar interno

En la figura No.4 que corresponde a una muestra blanco de plasma, podemos observar que hay picos que parece que eluyen a los mismos tiempos de retención de los analitos de interés, pero estos picos no se pueden considerar como interferentes porque suponiendo que eluyan junto con los analitos, tienen un área bajo la curva despreciable comparado con la concentración mínima de amantadina (200 ng/mL) y la concentración de memantina utilizada durante el análisis.

Validación de un método analítico para cuantificar amantadina en plasma por HPLC acoplado a fluorescencia

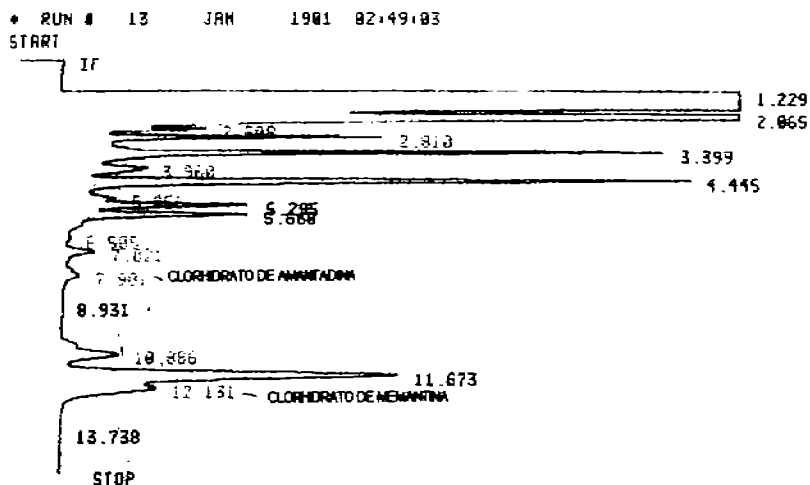


Fig. 4.- Cromatograma de una muestra blanco de plasma, en las condiciones cromatográficas del método analítico. La figura muestra que a los tiempos de retención que corresponden a la amantadina y a la memantina, no hay material endógeno interferente.

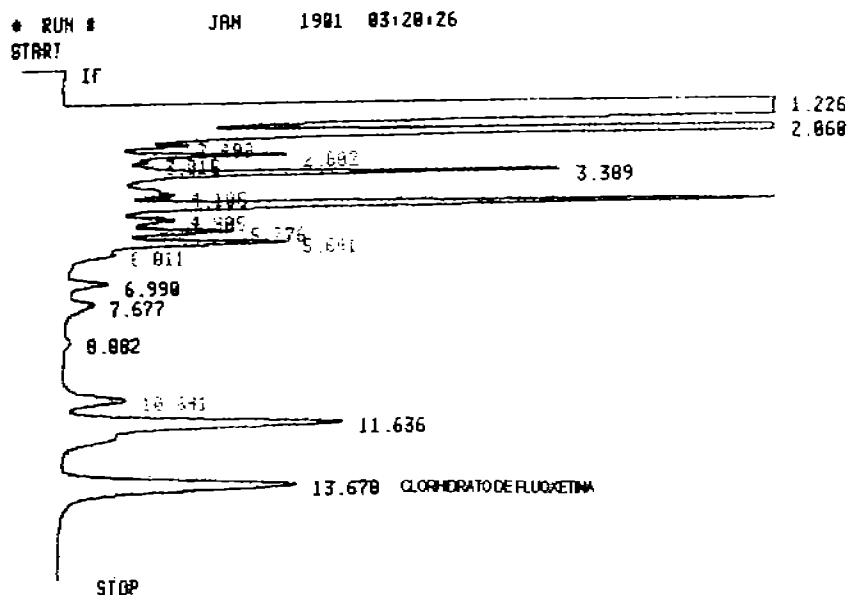


Fig. 5.- Cromatógrama de una muestra de plasma con 400 ng/mL de clorhidrato de fluoxetina. La figura muestra un pico del clorhidrato de fluoxetina al tiempo de retención de 13.678 min., el cual tiene una buena resolución del estándar interno.

Validación de un método analítico para cuantificar amantadina en plasma por HPLC acoplado a fluorescencia

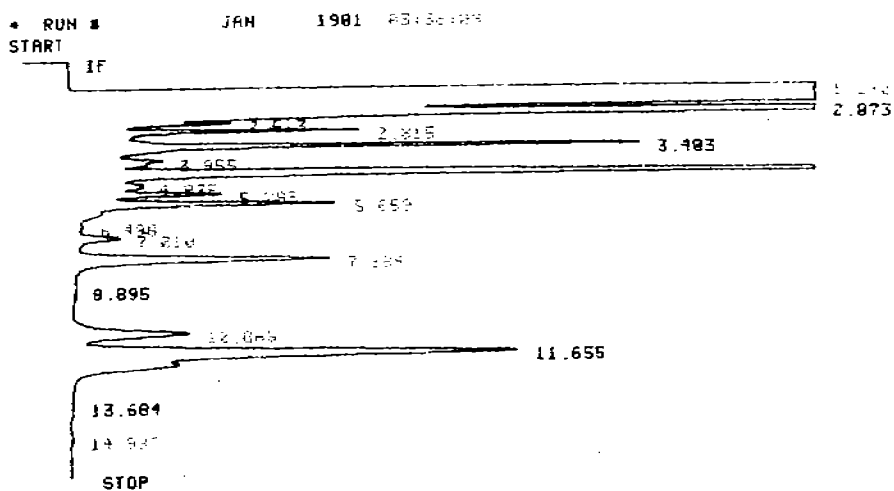


Fig. 6.- Cromatograma de una muestra de plasma con 400 ng/mL de imipramina. El cromatograma muestra que la imipramina no puede ser detectada con este método analítico.

Validación de un método analítico para cuantificar amantadina en plasma por HPLC acoplado a fluorescencia

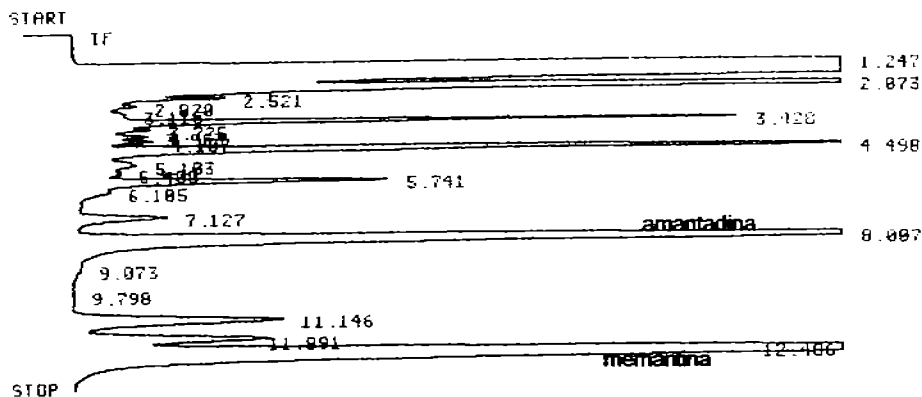


Fig. 7.- Cromatograma de una muestra de plasma con 300 ng/mL de amantadina y 500 ng/mL de memantina. El cromatograma muestra los tiempos de retención del analito (8.007) y del std. Interno (12.486).

CONCLUSIONES

- Se validó el método analítico para la cuantificación de amantadina en plasma según la Norma Oficial Mexicana NOM- 177-SSA1-1998 y resultó ser:
- Lineal, preciso y exacto en el intervalo de concentraciones de 200 a 1200 ng/mL.
- Sensible, ya que la concentración mínima que puede ser cuantificada con exactitud y precisión es de 50 ng/mL y la concentración mínima detectada es de 20 ng/mL.
- Selectivo y específico, ya que fármacos de uso común (imipramina y fluoxetina) y la matriz biológica, no interfieren en la cuantificación de amantadina.
- Estable, en las condiciones de almacenamiento $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, de la muestra extraída, de la muestra procesada, de la muestra durante ciclos de congelación-descongelación.
- El método analítico es confiable y puede ser utilizado para cuantificar amantadina en plasma en estudios de monitoreos terapéuticos, ya que el rango de cuantificación contempla la concentración tóxica.
- El método validado cumple las requisiciones que estipulan las autoridades de salud correspondientes (NOM- 177-SSA1-1998).

BIBLIOGRAFÍA

1. **Gómez D.**, Frecuencia del genotipo metabolizador lento del tipo CYP2D6 y su posible efecto como factor de susceptibilidad en la enfermedad de Parkinson. UAM. México, 2003.
2. **Otero E.** Parkinson. Enfoque al futuro. Ed. Fondo Cultural Económico. México, 1996.
3. **Goodman & Gilman.** Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9th ed., Ed. McGraw-Hill. EEUU, 1996.
4. **Rodríguez U., Ríos C., Boll C.** Protocolo Clínico: Ensayo Clínico controlado doble ciego de la eficacia de amantadina en discinesias tardías en pacientes de Parkinson Idiopático en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México.
5. **Smith C., Reynard A.** Farmacología. Ed. Médica Panamericana. México, 1997.
6. **Kirshbaum J.**, Amantadine . Analytical Profiles of Drug substances. Volume 12.
7. **Gennaro A.** Remington Farmacia. 19th ed., Ed. Médica Panamericana. EEUU, 1998.
8. **Litter M.**, Compendio de Farmacología. 4th ed., Ed. Ateneo. Argentina, 1992.
9. **Ellenhorn M.J.** Ellenhorn's Medical Toxicology, Ed. Williams and Wilkins, USA. 1997.
10. **Djalalati R., Treves T., Sroka H., Malamed E.** Effect of late initiation of levodopa treatment in patients with long – standing Parkinson's Disease. Clinical Neuropharmacology 26 (1): 24-27. 2003.
11. **Floris M., Lejeune J., Deberdt W.**, Effect of amantadine on weight gain during olanzapine treatment. European Neuropsychopharmacology B 11: 181,182..2001
12. **Miller J. et al.** Workshop on Bioanalytical Methods Validation for Macromolecules: Summary Report. 18(9):1373-1383.2001.

13. **Norma Oficial Mexicana NOM- 177-SSA1-1998.** Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Diario Oficial de la Federación, Primera sección, Viernes 7 de mayo de 1999.
14. **Harris D.,** *Análisis Químico Cuantitativo*, 2th ed., Ed. Reverté. Barcelona. 1999.
15. **Gary D.C.** *Química Analítica*. 2th ed., Ed. Limusa, México, 1990.
16. **Skoog D., West D., Holler F.** *Química Analítica*. 6th ed., Ed. McGraw-Hill. Colombia 2000.
17. **Raymond F., Ming F., Collins E.,** Sensitive and selective liquid chromatographic assay of memantine in plasma with fluorescence detection after pre-column derivatization. *Journal of Chromatography B*. 729: 217-224. 1999.
18. **Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.** *Métodos Analíticos. Guía de Validación*. Edición 2002.
19. **Daniel W.** *Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*, 4th ed., Ed. Limusa Wiley. México, 2002.
20. **Fauci A., Braunwald E., Isselbacher K., Wilson J., Harrison.** *Principios de Medicina Interna*. 14th ed., Ed. Mac Graw Hill. México, 1998.
21. **Flórez J., Mediavilla A.** *Farmacología Humana*. 2th ed., Ed. Salvat. Pamplona, 1992.
22. *Dictionary of Pharmacological Agents*. Volume 1 A-G. 1997.
23. **Biandrante P., Tognoni G., Belvedere G., Frigerio A., Rizzo M., Morselli.** A gas Chromatographic Method for the Determination: Amantadine in Human Plasma. *Journal of Chromatography*. 74: 31-34. 1972.
24. **ACS Committee on Environmental Improvement Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry.** *Analytical Chemistry*, 52: 2242-2249. 1980.
25. **Bahena-Trujillo R., Flores G., Arias J.,** Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Revista Biomédica*. 11(1): 39-60, 2000.

26. **Bélenger P., Gréch-Bélenger O.** Gas-liquid chromatographic determination of plasma and urinary levels of amantadine in man. *Journal of Chromatography* . 228: 327-332.1982.
27. **Food and Drug Administration.Center for Drug Evaluation and Research Center for Veterinary Medicine.** Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation U.S. Department of Health and Human Services. May 2001.
28. **Hideyuki Y., Ryuji N., Takashi M., Nitoshi N.** 4-(6,7-Dihydro-5,8 dioxothiazolo (4,5-g) phthalazin-2-yl) benzoic acid N- hydroxysuccinimide ester as a highly sensitive chemiluminescence derivatization reagent for amines in liquid chromatography. *Journal Chromatography B.* 907: 39-46. 2001.
29. **Higashi Y., Fujii Y.,** Liquid chromatographic determination of 1-adamantanamine and 2-adamantanamine in human plasma after pre-column derivatization with o-phthalaldehyde and 1-thio- β -D-glucose. *Journal of chromatography B.* 799:349-354.2004.
30. **Katzung B.** Farmacología. Autoevaluación y repaso. 2th ed., Ed. Manual Moderno. México,2000.
31. **Lingeman H., Underberg M., Takadate A., Hulshoff A.,** Fluorescence detection in high performance . *Liquid Chromatography.* *Journal of Liquid Chromatography B.*8: 789-874. 1985.
32. **Litėanu C., Rĩcã I.** Statistical theory and methodology of trace analysis. Ed. Ellis Horwood Limited, Great Britain. 1980.p.p. 255-310.
33. **McDowall R.D.** Sample preparation for biomedical analysis. *Journal of Chromatography.* 492: 3-58.1989.
34. **Minocha R., Long S.** Simultaneous separation and quantitation of amino acids and polyamines of forest tree tissues and cell cultures within a single high- performance liquid chromatography run using dansyl derivatization. *1035(1):*63-73.2004.

35. **Molins-Legua C., Camping-Falcó and Sevillano Cabeza.** Off-line dansylation of amines using C₁₈ solid-phase packings: study of the fluorescence and chemiluminescence detection by post-column derivatization with oxalic acid bis (2,4,6 - trichloro phenyl ester)/ H₂O₂ in liquid chromatography. Determination of amphetamines in urine samples. *Analytica Chimica Acta.* 378 (1- 3): 83-93. 1999.
36. **Morrison R., Boyd R.** *Química Orgánica*, 5th ed., Ed. Pearson Educación. México. 1990.
37. **Olsen E.** *Métodos ópticos de análisis.* Ed. Reverté, España, 1986.
38. **Raymond F., Ming f., Thomas B.,** Sensitive and Selective Liquid-Chromatographic Assay of Fluoxetine and Norfluoxetine in Plasma with Deteccion after Precolumn Derivatization. *CLIN. CHEM. B* 38/9: 1756-1761. 1992.
39. **Riley M. C., Ault M. J.,** Chromatographic methods for bioanalysis of antiviral agent. *Journal Chromatography B.* 531: 295-368. 1990.
40. **Saunders B., Trapp R.** *Bioestadística médica,* Ed. Manual Moderno. México. 1997.
41. **Sioufi A., Pommeir F.** Gas Chromatographic determination of amantadine Hydrochloride (symmetrel) in Human Plasma and Urine. *Journal of Chromatography B.* 183: 33-39. 1980.
42. **USP 24. NF 19. 2000.** Printed by National Publishing, Philadelphia. 1999.
43. **Van Der Horst A.L., Teeuwsen J.,** High- performance liquid chromatographic determination of amantadine in urine after micelle-mediated pre-column derivatization with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analytic.* 8 (8-12): 799-804. 1990.
44. **Zhou F., Krull I.** Direct determination of adamantanamine in plasma and urine with automated solid phase derivatization. *Journal of Chromatography.* 619: 93-101. 1993.
45. **Raymond F.,** Separation methods for tricyclic antiviral drugs. *Journal of Chromatography B.* 764: 313-325. 2001.

46. **Stiver G.** The treatment of influenza with antiviral drugs. *Canadian Medical Association or its licensors.* 168(1): 49-57.2003.
47. **Tsay-Hui D., Hsin-Lung W., Hwang-Shang K., Chi-Yu L.,** (2-Naphthoxy) acetyl chloride, a simple fluorescent reagent. *Journal of Chromatography A.* 987: 205- 209. 2003.
48. **Turnell D., Cooper.** Automation of Liquid Chromatographic Techniques for Biomedical analysis. *Journal of Chromatography.* 492:59-83.1989.
49. www.ssa.gob.mx

G L O S A R I O

ACINESIA: Falta, pérdida o cesación del movimiento.

CEFALEA: Dolor de cabeza

DENUDAMIENTO: Etapa de la replicación viral, en la que se produce la desintegración del virus, dejando libre al ácido nucleico, que comanda su propia replicación y la de las proteínas necesarias para integrar nuevas partículas.

DESCAPSIDACIÓN : Es un proceso secuencial programado que termina con la liberación del genoma viral sólo o unido a determinados enzimas virales en el sitio adecuado. La descapsidación comienza con la pérdida de la cubierta del virus.

DIÁLISIS: Separación en moléculas pequeñas a partir de otras más grandes por medio de una fusión selectiva a través de una membrana semipermeable.

DISCINESIAS TARDÍAS: Variaciones en la respuesta al medicamento que comprende la distonia de la mañana y discinesias de pico.

EDEMA: Hinchazón blanda de una parte del cuerpo, que cede a la presión y es ocasionada por la serosidad infiltrada en el tejido celular.

ERUPCIÓN MORBILIFORME: Enrojecimiento y prominencia de la piel.

FLUCTUACIONES CLÍNICAS: Variaciones en la respuesta al medicamento que comprenden: periodo de fin de dosis y fenómeno de encendido y apagado.

FUSIÓN: Es otro tipo de penetración que se da por fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática. En este caso el virus es completamente incorporado al citoplasma.

PERIODO DE FIN DE DOSIS: Fluctuación clínica en la cual el paciente presenta respuesta al medicamento solo durante 2 a 4 horas después de la toma, posteriormente los datos clínicos de la enfermedad regresan y hasta que toma la siguiente dosis vuelve a mejorar.

PROFILAXIS: Toda medida preventiva destinada a evitar una enfermedad, por ejemplo la vacunación.