



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**MODIFICACIÓN DE LA SOLUBILIDAD ACUOSA Y PERMEACIÓN EN  
MEMBRANAS ARTIFICIALES DE UN COMPUESTO ANTIPARASITARIO**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. YARELI ROJAS AGUIRRE



TUTOR: DR. FRANCISCO HERNÁNDEZ LUIS

AÑO: 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente	Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros
Vocal	Dra. Lilián Yépez Mulia
Vocal	Dra. Flora Adriana Ganem Rondero
Vocal	Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero
Secretario	Dra. Helgi Jung Cook

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA**

Departamento de Farmacia, Laboratorio 122, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

### **ASESOR:**

Dr. Francisco Hernández Luis

### **SUSTENTANTE:**

Q.F.B. Yareli Rojas Aguirre

## Agradecimientos

- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el período de Agosto del 2007-Agosto del 2009 y por el apoyo económico brindado a través del proyecto 80093.
- ❖ Al proyecto PAPIIT-UNAM IN210809 por el apoyo en la compra de suministros para la realización de este proyecto.
- ❖ A la Q. Margarita Portilla, la Q. Elvia Reynoso, la Q. Marisela Gutiérrez y a la Q.I. Cecilia Salcedo de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química por los estudios realizados.
- ❖ A la Dra. Lilián Yépez por la dirección de los ensayos de actividad biológica contra *T. spiralis*.
- ❖ A los miembros del jurado por la disposición, las observaciones y aportes que permitieron dar forma a esta tesis.
- ❖ Especial agradecimiento merece el D. Francisco Hernández Luis, tutor de esta tesis, por brindarme nuevamente la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo y de realizar un proyecto bajo su dirección, por sus aportaciones, apoyo y por sus valiosos comentarios tanto personales como académicos que contribuyeron a este trabajo.
- ❖ Al Dr. Rafael Castillo y a la M. en C. Alicia Hernández por sus valiosas observaciones y apoyo durante estos estudios.
- ❖ A todos los compañeros del laboratorio 122, en especial a quienes sintetizaron el compuesto utilizado en este estudio.

- ❖ Mi más sincero agradecimiento a todos los, amigos y compañeros que con su presencia, apoyo académico, apoyo moral, y por los momentos de esparcimiento son parte esencial de este proyecto.

A mis padres...!

## ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN.....	1
2	ANTECEDENTES.....	3
2.1	El nematodo <i>Trichinella spiralis</i> .....	3
2.1.1	Mecanismo de infección y patogenia.....	4
2.1.2	Manifestaciones clínicas .....	5
2.1.3	Tratamiento.....	5
2.2	El derivado bencimidazólico RCB-20 .....	6
2.3	La solubilidad acuosa y los complejos de inclusión .....	8
2.3.1	Métodos para estudiar la formación de complejos de inclusión .....	10
2.3.1.1	Caracterización .....	11
2.4	Permeabilidad celular.....	12
2.4.1	Ruta transcelular.....	13
2.4.2	Métodos para la evaluación de la permeabilidad intestinal.....	14
2.4.3	PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay).....	14
2.5	La validación de métodos.....	17
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	20
4	HIPOTESIS .....	20
5	OBJETIVOS .....	21
5.1	Objetivos particulares.....	21
6	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	22
6.1	Optimización de las condiciones instrumentales para la cuantificación de los marcadores y del RCB-20.....	22
6.1.1	Evaluación de los parámetros de validación.....	22
6.1.1.1	Linealidad.....	22
6.1.1.2	Precisión .....	22
6.1.1.3	Repetibilidad .....	23
6.1.1.4	Reproducibilidad intralaboratorio.....	23
6.1.1.5	Exactitud .....	23
6.1.1.6	Límite de detección y límite de cuantificación.....	23
6.2	Formación de complejos de inclusión.....	24
6.2.1	Solubilidad intrínseca del RCB-20.....	25
6.2.2	Estudio de solubilidad de fases .....	25
6.2.3	Caracterización .....	26

6.3	PAMPA .....	26
6.3.1	Evaluación de la integridad de la membrana.....	28
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
7.1	Optimización de las condiciones instrumentales .....	29
7.1.1	Cimetidina .....	29
7.1.2	Propranolol.....	30
7.1.3	Verapamil.....	30
7.1.4	RCB-20 .....	31
7.2	Evaluación de los parámetros de validación.....	32
7.2.1	Cimetidina .....	32
7.2.1.1	Linealidad.....	32
7.2.1.2	Precisión .....	33
7.2.1.3	Exactitud .....	35
7.2.1.4	Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).....	36
7.2.2	Propranolol.....	36
7.2.2.1	Linealidad.....	36
7.2.2.2	Precisión .....	37
7.2.2.3	Exactitud .....	38
7.2.2.4	Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).....	39
7.2.3	Verapamil.....	39
7.2.3.1	Linealidad.....	39
7.2.3.2	Precisión .....	40
7.2.3.3	Exactitud .....	42
7.2.3.4	Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).....	42
7.2.4	RCB-20 .....	43
7.2.4.1	Linealidad.....	43
7.2.4.2	Precisión .....	44
7.2.4.3	Exactitud .....	45
7.2.4.4	Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ).....	46
7.3	Complejos de inclusión .....	47
7.4	Ensayos de permeabilidad .....	54
7.4.1	Cimetidina .....	54
7.4.2	Propranolol.....	55

7.4.3	Verapamil.....	56
7.4.4	RCB-20.....	58
7.4.5	RCB-20-CD-CI.....	59
7.5	Pruebas Biológicas.....	63
8	CONCLUSIONES.....	65
9	BIBLIOGRAFÍA.....	66
Apéndice 1	.....	70
Apéndice 2	.....	71
Apéndice 3	.....	108
Apéndice 4	.....	110

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de la larva infecciosa de <i>T. spiralis</i> .....	4
Figura 2.	Ciclo biológico de <i>T. spiralis</i> .....	4
Figura 3.	El albendazol y su metabolito activo.....	6
Figura 4.	Estructura, algunas propiedades y nombre químico de RCB-20.....	7
Figura 5.	Dimensión y conformación de las CDs.....	9
Figura 6.	Diagrama de solubilidad de fases.....	11
Figura 7.	Diferentes mecanismos de transporte celular.....	14
Figura 8.	Sistema PAMPA.....	15
Figura 9.	Fundamento de PAMPA según Faller.....	16
Figura 10.	Preparación del sistema PAMPA.....	27
Figura 11.	Condiciones instrumentales para cimetidina.....	29
Figura 12.	Condiciones instrumentales para propranolol.....	30
Figura 13.	Condiciones instrumentales para verapamil.....	31
Figura 14.	Condiciones instrumentales para RCB-20.....	32
Figura 15.	Curvas de calibración de cimetidina.....	33
Figura 16.	Curvas de calibración de propranolol.....	36
Figura 17.	Curvas de calibración de verapamil.....	40
Figura 18.	Curvas de calibración de RCB-20.....	43
Figura 19.	Estudio de solubilidad de fases de HPBCD y RCB-20 en agua.....	47
Figura 20.	Curvas obtenidas por DSC.....	49
Figura 21.	Estudio de solubilidad de fases de HPBCD y RCB-20 en metanol-agua.....	51
Figura 22.	Difracción de rayos-X de polvos.....	52
Figura 23.	Espectros IR.....	53
Figura 24.	PAMPA. Cromatogramas de cimetidina.....	55
Figura 25.	PAMPA. Cromatogramas de propranolol.....	56

Figura 26. PAMPA. Cromatogramas de verapamil .....	57
Figura 27. PAMPA. Cromatogramas de RCB-20 .....	59
Figura 28. PAMPA. Cromatogramas de RCB-20-CD-Cl.....	60
Figura 29. Preparación de la curva de calibración de cimetidina. ....	71
Figura 30. Preparación de la curva de calibración de propranolol .....	72
Figura 31. Preparación de la curva de calibración de verapamil.....	73
Figura 32. Preparación de la curva de calibración de RCB-20 .....	74
Figura 33. LOD y LOQ de cimetidina. ....	80
Figura 34. Cromatograma de cimetidina 10µM .....	81
Figura 35. Cromatograma de cimetidina 50µM .....	81
Figura 36. Cromatograma de cimetidina 100µM .....	82
Figura 37. Cromatograma de cimetidina 150µM .....	82
Figura 38. Cromatograma de cimetidina 200µM .....	83
Figura 39. Cromatograma de cimetidina 250µM .....	83
Figura 40. Cromatograma del blanco (solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5-DMSO al 5%) del método analítico para el análisis de propranolol.....	87
Figura 41. LOD y LOQ de propranolol. ....	88
Figura 42. Cromatograma de propranolol 10µM .....	89
Figura 43. Cromatograma de propranolol 50µM .....	89
Figura 44. Cromatograma de propranolol 100µM .....	90
Figura 45. Cromatograma de propranolol 150µM .....	90
Figura 46. Cromatograma de propranolol 200µM.....	91
Figura 47. Cromatograma de propranolol 250µM.....	91
Figura 48. LOD y LOQ de verapamil. ....	97
Figura 49. Cromatograma de verapamil 10µM .....	97
Figura 50. Cromatograma de verapamil 50µM.....	98
Figura 51. Cromatograma de verapamil 100µM.....	98
Figura 52. Cromatograma de verapamil 150µM.....	99
Figura 53. Cromatograma de verapamil 200µM.....	99
Figura 54. Cromatograma de verapamil 250µM.....	100
Figura 55. LOD y LOQ de RCB-20.....	104
Figura 56. Cromatograma de RCB-20 10µM .....	105
Figura 57. Cromatograma de RCB-20 50µM .....	105
Figura 58. Cromatograma de RCB-20 100µM.....	106
Figura 59. Cromatograma de RCB-20 150µM.....	106
Figura 60. Cromatograma de RCB-20 200µM.....	107

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad antiparasitaria in vitro de RCB-20, albendazol y metronidazol.....	7
Tabla 2. Porcentaje de reducción de <i>T. spiralis</i> en fase adulto y larva muscular en ratones infectados.....	7

Tabla 3. Parámetros de validación, definición y criterios de aceptación según la NOM –177 – SSAI –1998. ....	19
Tabla 4. Solubilidad de fases.....	26
Tabla 5. Valores de regresión lineal y EER de las curvas de calibración de cimetidina.....	33
Tabla 6. Repetibilidad del método. ....	34
Tabla 7. Variabilidad interdía del método analítico. ....	34
Tabla 8. Variabilidad intradía del método analítico ....	35
Tabla 9. Exactitud del método analítico ....	35
Tabla 10. Valores de regresión lineal y EER de las curvas de calibración de propranolol. ....	37
Tabla 11. Repetibilidad del método ....	37
Tabla 12. Variabilidad interdía del método analítico ....	38
Tabla 13. Variabilidad intradía del método analítico ....	38
Tabla 14. Exactitud del método analítico ....	39
Tabla 15. Valores de regresión lineal y EER de las curvas de calibración de verapamil. ....	40
Tabla 16. Repetibilidad del método. ....	41
Tabla 17. Variabilidad interdía del método analítico. ....	41
Tabla 18. Variabilidad intradía del método analítico ....	42
Tabla 19. Exactitud del método analítico ....	42
Tabla 20. Valores de regresión lineal y EER de las curvas de calibración de RCB-20. ....	43
Tabla 21. Repetibilidad del método ....	44
Tabla 22. Variabilidad interdía del método analítico ....	44
Tabla 23. Variabilidad intradía del método analítico ....	45
Tabla 24. Exactitud del método analítico ....	45
Tabla 25. Resultados del estudio de solubilidad de fases de HPBCD y RCB-20 en agua. ....	47
Tabla 26. Resultados del estudio de solubilidad de fases de HPBCD y RCB-20 en metanol-agua.....	51
Tabla 27. Resultados de PAMPA para cimetidina ....	54
Tabla 28. Resultados de PAMPA para propranolol ....	55
Tabla 29. Resultados de PAMPA para verapamil.....	57
Tabla 30. Resultados de PAMPA para RCB-20.....	58
Tabla 31. Resultados de PAMPA para RCB-20-CD-CI.....	60
Tabla 32. Porcentaje de reducción de <i>T. spiralis</i> en fase adulto y larva muscular en ratones infectados.....	64
Tabla 33. Áreas y valores de regresión lineal de la curva de calibración de cimetidina.....	76
Tabla 34. Cálculo del EER.....	76
Tabla 35. Concentraciones experimentales obtenidas a partir de la curva de calibración, desviación estándar ( $\sigma$ ), coeficiente de variación (CV) y desviación estándar relativa (DER)...	77
Tabla 36. Curvas de calibración de cimetidina para determinar la variabilidad intradía.....	77
Tabla 37. Variabilidad intradía del método analítico para el análisis de cimetidina.....	77
Tabla 38. Curvas de calibración para determinar la variabilidad interdía.....	78
Tabla 39. Variabilidad interdía del método analítico para el análisis de cimetidina.....	78
Tabla 40. Curva de calibración promedio.....	78

Tabla 41. Señal ruido del blanco en la cuantificación de cimetidina.....	79
Tabla 42. Determinación del límite de detección y de cuantificación para el análisis de cimetidina por CLAR. ....	79
Tabla 43. Áreas y valores de regresión lineal de la curva de calibración de propranolol .....	84
Tabla 44. Cálculo del EER.....	84
Tabla 45. Concentraciones experimentales obtenidas a partir de la curva patrón, desviación estándar ( $\sigma$ ), coeficiente de variación (CV) y desviación estándar relativa ( DER).....	85
Tabla 46. Curva de calibración de propranolol para determinar la variabilidad intradía .....	85
Tabla 47. Variabilidad intradía del método analítico para el análisis de propranolol.....	85
Tabla 48. Curvas de calibración para determinar la variabilidad interdía.....	86
Tabla 49. Variabilidad interdía del método analítico para el análisis de propranolol.....	86
Tabla 50. Curva de calibración promedio .....	86
Tabla 51. Señal ruido 1 del blanco en la cuantificación de propranolol.....	87
Tabla 52. Determinación del límite de detección y de cuantificación para el análisis de propranolol por CLAR. ....	88
Tabla 53. Áreas y valores de regresión lineal de la curva de calibración de verapamil.....	92
Tabla 54. Cálculo del EER.....	92
Tabla 55. Concentraciones experimentales obtenidas a partir de la curva patrón, desviación estándar ( $\sigma$ ), coeficiente de variación (CV) y desviación estándar relativa ( DER).....	93
Tabla 56. Curva de calibración de verapamil para determinar la variabilidad intradía.....	93
Tabla 57. Variabilidad intradía del método analítico para el análisis de verapamil .....	93
Tabla 58. Curvas de calibración para determinar la variabilidad interdía.....	94
Tabla 59. Variabilidad interdía del método analítico para el análisis de verapamil .....	94
Tabla 60. Curva de calibración promedio .....	94
Tabla 61. Señal ruido del blanco en la cuantificación de verapamil.....	95
Tabla 62. Determinación del límite de detección y de cuantificación para el análisis de verapamil por CLAR.....	95
Tabla 63. Áreas y valores de regresión lineal de la curva de calibración de RCB-20.....	100
Tabla 64. Cálculo del EER.....	100
Tabla 65. Concentraciones experimentales obtenidas a partir de la curva patrón, desviación estándar ( $\sigma$ ), coeficiente de variación (CV) y desviación estándar relativa ( DER).....	101
Tabla 66. Curva de calibración de RCB-20 para determinar la variabilidad intradía.....	101
Tabla 67. Variabilidad intradía del método analítico para el análisis de RCB-20 .....	101
Tabla 68. Curvas de calibración para determinar la variabilidad interdía.....	102
Tabla 69. Variabilidad interdía del método analítico para el análisis de RCB-20 .....	102
Tabla 70. Curva de calibración promedio .....	102
Tabla 71. Señal ruido del blanco en la cuantificación de RCB-20.....	103
Tabla 72. Determinación del límite de detección y de cuantificación para el análisis de RCB-20 por CLAR. ....	103
Tabla 73. Solubilidad intrínseca de RCB-20 en agua.....	108
Tabla 74. Solubilidad de fases de RCB-20 en agua. Datos experimentales y resultados. ....	108
Tabla 75. Solubilidad intrínseca de RCB-20 en metanol-agua. ....	109

Tabla 76. Solubilidad de fases de RCB-20 en metanol-agua. Datos experimentales y resultados.....	109
Tabla 77. Resultados de PAMPA para cimetidina .....	110
Tabla 78. Resultados de PAMPA para propranolol .....	111
Tabla 79. Resultados de PAMPA para verapamil .....	111
Tabla 80. Resultados de PAMPA para RCB-20 .....	111
Tabla 81. Resultados de PAMPA para RCB-20-CD-Cl.....	112
Tabla 82. Parámetros estadísticos de los ensayos de RCB-20.....	113

Filename: FINALTESISTESIS\_MAESTRIA-25junio-fomatos  
Directory: C:\Users\HP Pavilion dv6500\Documents  
Template: C:\Users\HP Pavilion  
dv6500\AppData\Roaming\Microsoft\Templates\Normal.dotm  
Title: Modificación de la solubilidad acuosa y permeación en  
membranas artificiales de un compuesto antiparasitario  
Subject:  
Author: WinuE  
Keywords:  
Comments:  
Creation Date: 25/06/2009 11:49:00 a.m.  
Change Number: 2  
Last Saved On: 25/06/2009 11:49:00 a.m.  
Last Saved By: HP Pavilion dv6500  
Total Editing Time: 4 Minutes  
Last Printed On: 29/06/2009 10:01:00 a.m.  
As of Last Complete Printing  
Number of Pages: 126 (approx.)  
Number of Words: 27,494 (approx.)  
Number of Characters: 151,218 (approx.)

## 1 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias constituyen uno de los problemas cruciales de salud pública en los países en vías de desarrollo. En la República Mexicana, estas infecciones son causas severas de mortalidad y morbilidad en la población infantil ya que cerca del 45% de los niños tienen parásitos. En varios de estos padecimientos los tratamientos con medicamentos disponibles no son totalmente satisfactorios ya que presentan diversos efectos secundarios, y en muchos, casos no son totalmente efectivos.

Dentro de las enfermedades parasitarias, resalta el caso de la triquinosis, una enfermedad causada por el nematodo *Trichinella spiralis*, que se adquiere al consumir carne de cerdo con larvas del parásito. Esta enfermedad es endémica de México y evoluciona con brotes epidémicos esporádicos.

*Trichinella spiralis* se presenta en dos estadios que influyen en las dificultades del tratamiento. La primera es la fase adulta en donde el parásito se encuentra en el intestino y la segunda es la fase larvaria en donde el parásito se localiza en el músculo. Aunque es difícil el diagnóstico de la triquinosis en su fase intestinal, cuando éste llega a realizarse, se recomienda el uso de albendazol o de mebendazol. No hay un tratamiento específico para la triquinosis una vez que las larvas han invadido los músculos, así que lo único que se administra son analgésicos para aliviar el dolor muscular.

La utilización de estos fármacos para combatir las enfermedades parasitarias ha sido de gran apoyo, sin embargo, ambos compuestos fueron introducidos al mercado hace más de 20 años. Por lo tanto, es primordial el desarrollo de nuevos fármacos para tratar este padecimiento.

En este contexto, nuestro grupo de investigación sintetizó un gran número de derivados bencimidazólicos. Entre ellos, resalta el caso de RCB-20 que presentó actividad contra *T. spiralis*, en sus dos fases. Sin embargo, este compuesto es insoluble en agua, situación que limita su buena biodisponibilidad y eficacia en estudios de evaluación antiparasitaria in vivo.

Por ello, en este proyecto se utilizó el recurso de la formación de complejos de inclusión binarios de RCB-20 con 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, para incrementar la solubilidad acuosa del derivado bencimidazólico. Los complejos se caracterizaron utilizando espectroscopia de infrarrojo, análisis térmico y difracción de rayos X de polvos. Adicionalmente, se evaluó la "permeación" de RCB-20, solo y en complejo, a través de la técnica PAMPA (Parallel Artificial Membrane Assay).

Finalmente se realizó la evaluación biológica del complejo de inclusión obtenido en un modelo murino de trichinellosis con la intención de conocer si la actividad antiparasitaria de RCB-20 se incrementaba.

## 2 ANTECEDENTES

En este apartado se encuentra la información referencial del presente trabajo de tesis. La información está dividida en cinco secciones principales: la primera contiene los aspectos relevantes del parásito *Trichinella spiralis*; la segunda trata sobre el derivado bencimidazólico denominado RCB-20 como agente antiparasitario; la tercera abarca lo relacionado a los problemas de solubilidad y solución de los mismos mediante la formación de complejos de inclusión; la cuarta describe aspectos sobre la importancia de la permeabilidad celular en los estudios de búsqueda de principios activos; la última indica la importancia de la validación de procedimientos.

### 2.1 El nematodo *Trichinella spiralis*

*Trichinella spiralis* es un nematodo pequeño y filiforme que provoca la enfermedad denominada trichinellosis o triquinosis. Es un organismo sexuado donde el macho mide de 1.2 a 1.6 micrómetros y la hembra 2.2 a 3.5 micrómetros de longitud; ambos infectan la porción intestinal del tracto digestivo. El macho después de fecundar a la hembra permanece en el intestino por 3 a 5 días. Posteriormente es excretado con la materia fecal. La hembra también es eliminada junto con la materia fecal después de depositar sus larvas. Las larvas depositadas (1,500 en total por cada hembra) atraviesan la mucosa intestinal y alcanzan los vasos sanguíneos o linfáticos para pasar a la circulación arterial y dirigirse fundamentalmente a músculos como el diafragma, los intercostales, bíceps y cuádriceps; también pueden invadir el encéfalo, miocardio, pleura, pulmones, globos oculares e incluso líquido cefalorraquídeo, donde se les encuentra a partir del séptimo día de la infección provocando reacción inflamatoria y proliferación de sarcolema. Después de seis a ocho semanas la larva se enrolla para enquistarse y permanecer por un mayor tiempo como agente viable infeccioso [1,2] (Figura 1).

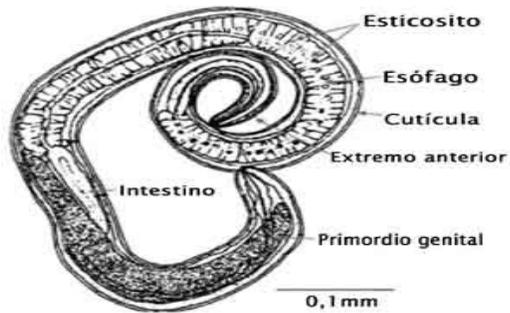


Figura 1. Esquema de la larva infecciosa de *T. spiralis*.

### 2.1.1 Mecanismo de infección y patogenia

Se considera a la triquinosis como una zoonosis que se mantiene en carnívoros silvestres. Sin embargo, el cerdo adquiere esta parasitosis por el tipo de alimentación que recibe (desperdicios) o al ingerir ratas infectadas cuando no es criado adecuadamente, de tal manera que el hombre al comer carne mal cocida procedente de estos animales adquiere la infección [3,4] (Figura 2).

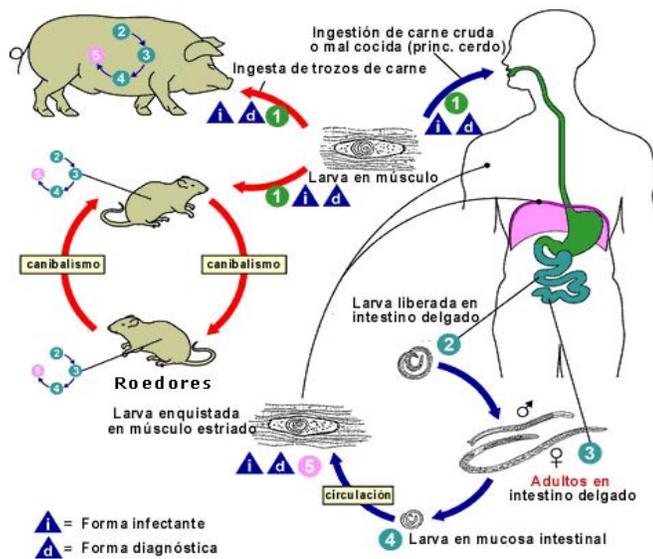


Figura 2. Ciclo biológico de *T. spiralis*.

### 2.1.2 Manifestaciones clínicas

La triquinosis puede manifestarse clínicamente en tres fases o periodos de la infección cuya severidad dependerá del número de parásitos ingeridos.

- Fase intestinal. Se inicia después de las 24 horas de la infección y es causada por la fijación de las hembras y la penetración y el movimiento de las larvas en la mucosa intestinal, originando dolor abdominal de tipo cólico localizado en mesogastrio, náusea, vómito, cefalea, diaforesis y malestar general, cuadro que semeja el de una intoxicación alimentaria aguda.
- Fase de migración o invasión a músculos. Se caracteriza por la presencia de edema (que es más notable en cara y párpados), fiebre, fotofobia, conjuntivitis, dolor muscular (que se intensifica con el ejercicio impidiendo en ocasiones la movilidad de la región afectada) e infarto ganglionar doloroso. En ocasiones, pueden presentarse miocarditis y alteraciones de tipo meníngeo y cerebral, cefalea, insomnio, irritabilidad, convulsiones, vértigo, decaimiento generalizado y pérdida de peso con complicaciones como insuficiencia cardíaca o incluso, neumonía.
- Fase de estado. Se presenta cuando las larvas ya se han establecido y formado el quiste en los músculos. El síntoma dominante es el dolor; que aumenta con el ejercicio, sobre todo cuando los parásitos mueren debido a la reacción inflamatoria causada por la liberación de los componentes somáticos del mismo [5,6].

Por estas características, *T. spiralis* constituye un modelo adecuado para estudiar el comportamiento de un agente antiparasitarios que tenga su ámbito de acción a nivel intestinal y sistémico.

### 2.1.3 Tratamiento

Aunque es difícil el diagnóstico de la triquinosis en su fase intestinal, cuando éste llega a realizarse, se recomienda el uso de albendazol (ABZ) o de mebendazol que puede actuar sobre las formas intestinales. No hay un tratamiento específico para la triquinosis una vez que las larvas han invadido los músculos, así que lo único que se administra son analgésicos para aliviar el dolor muscular [7,8].

## 2.2 El derivado bencimidazólico RCB-20

Los derivados del bencimidazol, en especial los derivados del carbendazim (1*H*-bencimidazol-2-carbamato de metilo) son los fármacos ampliamente usados para el tratamiento de infecciones intestinales causadas por helmintos[9]. Uno de estos compuestos es el ABZ (Figura 3) el cual además de tener acción a nivel intestinal presenta actividad contra algunos helmintos de acción sistémicas como *T. spiralis* y *T. solium*; actividad atribuida al metabolito principal del albendazol conocido como ricobendazol (sulfóxido de albendazol).

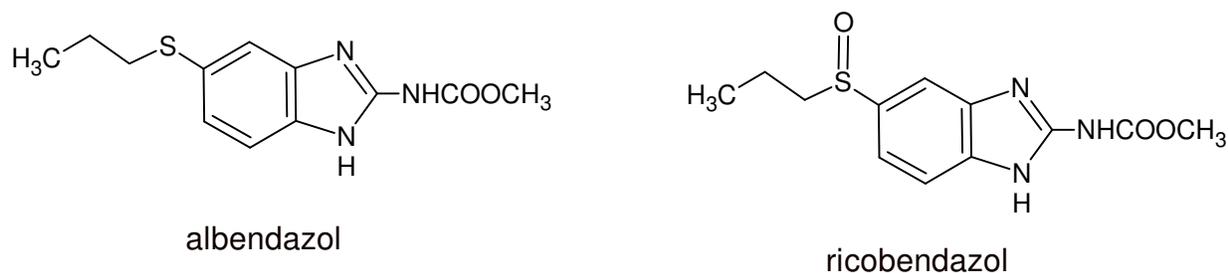
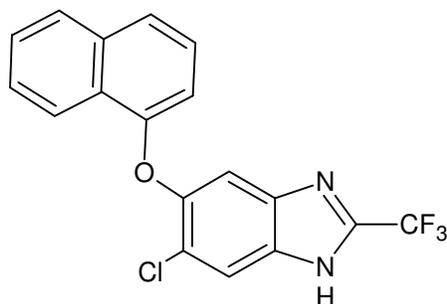


Figura 3. El albendazol y su metabolito activo

A pesar del uso generalizado del ABZ para el tratamiento de afecciones intestinales, su eficacia a nivel sistémico se ve limitada debido a problemas de biodisponibilidad ocasionados por su baja solubilidad en agua y extenso metabolismo de primer paso. En consecuencia, las concentraciones plasmáticas son mínimas y la accesibilidad en tejidos es pobre [10]. Varios intentos se han realizado para rebasar estos problemas con cierto éxito [9,11,12]. Sin embargo, es preciso iniciar la búsqueda de otros compuestos que pudiesen ser activos en las infecciones parasitarias sistémicas ocasionadas por helmintos o por protozoarios.

En este contexto, nuestro grupo de investigación sintetizó y evaluó como posibles agentes antiparasitarios un gran número de derivados bencimidazólicos. Producto de este esfuerzo es el compuesto denominado RCB-20 (Figura 4), el cual presentó un buen potencial antiparasitario contra varios protozoarios y el nematodo *T. spiralis* (Tabla 1,2).



RCB-20

6-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-(trifluorometil)-1H-benzimidazol

Figura 4. Estructura, algunas propiedades y nombre químico de RCB-20

 $pK_{a1} = 2.5$  $pK_{a2} = 8.8$  $\log P = 6.14$ 

Peso molecular = 362.733

Tabla 1. Actividad antiparasitaria in vitro de RCB-20, albendazol y metronidazol.

Compuesto	<i>G. intestinalis</i> (IC <sub>50</sub> , $\mu$ M)	<i>E. histolytica</i> (IC <sub>50</sub> , $\mu$ M)	<i>T. vaginalis</i> (IC <sub>50</sub> , $\mu$ M)	<i>L. mexicana</i> (IC <sub>50</sub> , $\mu$ M)	<i>T. spiralis</i> (% de reducción, 0.18 $\mu$ M)	<i>T. spiralis</i> (% de reducción, 0.18 $\mu$ M)	<i>T. spiralis</i> (% de reducción, 0.18 $\mu$ M)
RCB-20	0,005	0,019	0,086	13,78	43	50	65
ABZ	0,037	56,6	1,592	NE	58,6	61,9	67
MTZ	1,228	0,35	0,216	NE	NE	NE	NE

NE: no efecto; ABZ: albendazol; MTZ: metronidazol

Tabla 2. Porcentaje de reducción de *T. spiralis* en fase adulto y larva muscular en ratones infectados.

Compuesto	Adultos		Larva muscular
	50 mg/kg	75 mg/kg	75 mg/kg
RCB-20	69	80	40
ABZ	62	73	63
TBZ	41	7	25
Control	0	0	0

TBZ: triclabendazol

Para los estudios in vivo contra *T. spiralis*, RCB-20 presentó un buen comportamiento contra la fase intestinal de este nematodo a las dos dosis probadas; sin embargo, contra la fase muscular manifestó menor actividad que el albendazol. Esto podría deberse a su baja solubilidad en agua, y no a su liposolubilidad ( $\log P$ ); inconveniente que ocasionaría una pobre biodisponibilidad y eficacia en estos estudios. Es por esto que surge el interés de incrementar la solubilidad acuosa de este compuesto para optimizar su actividad antiparasitaria.

### 2.3 La solubilidad acuosa y los complejos de inclusión

Para que un compuesto pueda trasladarse a través de las diversas membranas biológicas mediante difusión simple, se requiere que esté disuelto en el medio acuoso que rodea a las células y ser lo suficientemente lipofílico para atravesarlas. Por eso es muy importante considerar la solubilidad acuosa y la liposolubilidad de los compuestos recién descubiertos como principios activos, dado que en la mayor parte de los casos los sitios de acción están distantes de los sitios de administración. Un entendimiento completo de estas propiedades es esencial para el desarrollo de una preformulación robusta y fácil de escalar [13]. Para los compuestos considerados como poco solubles (0.1 – 1 mg/mL) la preformulación debe resolver este problema antes de continuar el desarrollo de los mismos como futuros fármacos [13,14].

Existen varias estrategias para modificar la solubilidad acuosa de un compuesto. Entre ellas se encuentran: la formación de sales, el uso de co-solventes o tensoactivos, la preparación de profármacos y la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas (CD), siendo este último, el considerado para este trabajo de tesis.

Un complejo de inclusión puede definirse como la asociación de un compuesto (ligando o sustrato) con una molécula de ciclodextrina (CD) [15]. La nueva especie presenta una estequiometría definida, misma que depende de la capacidad de la CD para albergar a un cierto número de moléculas del ligando. Sus propiedades fisicoquímicas pueden ser diferentes a las de los compuestos que lo constituyen. La formación del complejo depende de la compatibilidad del tamaño del ligando con relación a la cavidad de la CD. La estabilidad del complejo está dada por el carácter hidrofóbico de los sustituyentes del ligando; un grupo metilo o etilo incrementa su estabilidad y un grupo hidroxilo la disminuye. Algunas veces las CD no forman complejos de inclusión, sino agregados que también incrementan la solubilidad del principio activo al adsorberlos en la parte externa de su molécula [16].

La aprobación de complejos de inclusión en formulaciones farmacéuticas en los últimos años ha provocado un aumento en el uso de este recurso. Ahora, las CD son utilizadas para incrementar la solubilidad acuosa, estabilidad y biodisponibilidad de nuevas moléculas [13,14,16].

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos compuestos de varias unidades de D-glucosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4. Las tres ciclodextrinas más comunes, conocidas como  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD y  $\gamma$ -CD, constan de seis, siete y ocho unidades de D-glucosa, respectivamente [15,17,18] (Figura 5).

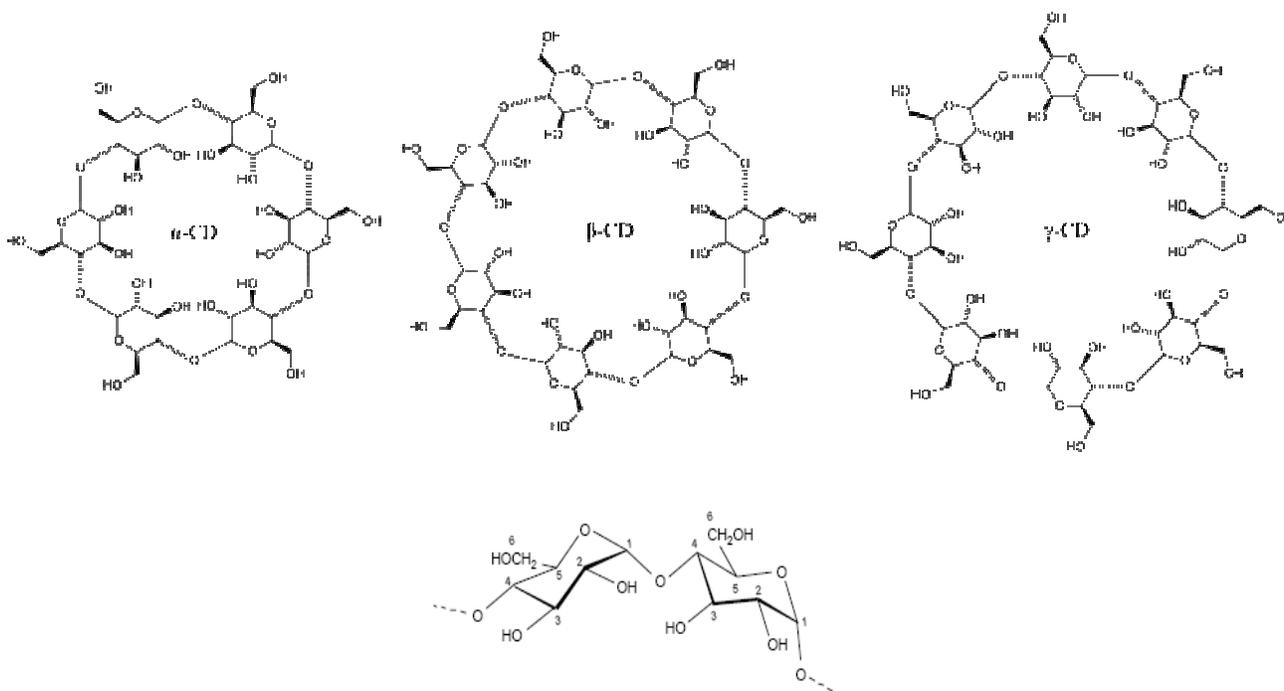


Figura 5. Dimensión y conformación de las CDs.

Debido a la falta de rotación de los enlaces glicosídicos que unen a las unidades de glucopiranosas, estos compuestos no presentan una forma cilíndrica perfecta sino una estructura de cono truncado con una superficie hidrofílica externa y una cavidad hidrofóbica interna, adecuada para albergar una molécula poco polar [18]. El tamaño de las CD resulta muy importante ya que si ésta es muy pequeña, como la  $\alpha$ -CD, algunas moléculas no podrían ser incluidas. El caso contrario es que al ser muy grande la cavidad, podría albergar a más de una molécula, haciendo difícil la estabilidad del complejo [16,17].

La solubilidad de las ciclodextrinas se debe a la presencia de grupos OH en los carbonos C2, C3 y C6 de las unidades de glucopiranosas que forman la CD; esos grupos OH forman enlaces de hidrógeno con el agua. Sin embargo, estos mismos grupos presentes en C2 son propensos a enlazarse con los grupos OH en C3 de la unidad de glucopiranosas adyacente, formando un cinturón de enlaces de hidrógeno intermolecular. Debido a que la  $\beta$ -CD está formada de siete unidades de glucopiranosas, es menos simétrica que la  $\alpha$ -CD y la  $\gamma$ -CD por lo que la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares dan lugar a una estructura compacta y rígida que no tienen buena interacción con los puentes de hidrógeno del agua, lo que la hace menos soluble que las otras CDs. Para resolver este inconveniente, se han desarrollado derivados de este compuesto. Uno de estos derivados es la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (HPBCD) que presenta una mayor

solubilidad acuosa y en disolventes orgánicos. Es bien tolerado por los humanos tanto por administración oral como intravenosa y no presenta toxicidad renal como la  $\gamma$ -CD [13,15-18].

El uso de cosolventes en combinación con la formación de complejos de inclusión ha sido ampliamente estudiado, sin embargo sigue siendo controversial. Por un lado, se han publicado trabajos en donde se señalan efectos sinérgicos entre la formación de complejos y el uso de cosolventes para incrementar la solubilidad de una molécula [19]. Por otro lado, se informa que el etanol reduce la capacidad de incrementar la solubilidad de testosterona por las CD [20]. En este mismo sentido se observó que la solubilidad de fluasterona en complejo de inclusión con HPBCD disminuye en presencia de cantidades bajas de etanol (20%) pero aumenta en cantidades altas de este disolvente (75%) [21].

### 2.3.1 Métodos para estudiar la formación de complejos de inclusión

El grado en que la solubilidad de un compuesto se modifique está directamente relacionado con la afinidad de unión del mismo con la CD. Por ello es necesario evaluar las constantes de equilibrio a partir de los datos de solubilidad. Para evaluar la solubilidad se prepara una serie de tubos con una cantidad fija del ligando a los cuales se les adicionan soluciones de CD de concentraciones diferentes. El volumen del disolvente se mantiene constante para todas las suspensiones. Después de agitar por un tiempo determinado y cuantificar la concentración del ligando en la solución resultante, se construye un diagrama de solubilidad de fases graficando la concentración molar total del ligando (L) en solución, contra la concentración total de CD. De acuerdo al diagrama de solubilidad del complejo formado, éste se puede clasificar en diferentes tipos (Figura 6).

Los diagramas tipo A muestran la formación de complejos solubles. El diagrama  $A_L$  indica que el complejo formado es de primer orden con respecto a la CD y de primer orden con respecto al principio activo (relación 1:1 molar). Una desviación positiva de la linealidad,  $A_P$ , indica formación de complejos que son de primer orden respecto al principio activo pero de segundo orden con respecto a la CD (relación molar  $>1$ ). Una desviación negativa de la linealidad  $A_N$  es difícil explicarla. Puede ser que exista una alteración del disolvente debido a las grandes concentraciones de CD o puede ser que haya formación de agregados entre el principio activo y la CD que también sean solubles en agua.

Los diagramas tipo B indican la formación de complejos de baja solubilidad. En el caso de  $B_S$ , desde  $L_0$  hasta  $a$  se observa un comportamiento similar al de los diagramas tipo A, es decir, la solubilidad del ligando se incrementa debido a la formación del complejo soluble. En el punto  $a$ , se llega a un límite de solubilidad y la adición de más CD produce una precipitación del complejo. La

curva  $B_1$  se puede interpretar de la misma manera que  $B_S$  con la diferencia de que el complejo formado es tan insoluble que el aumento inicial en la concentración de CD no provoca ningún aumento en la solubilidad del ligando [22].

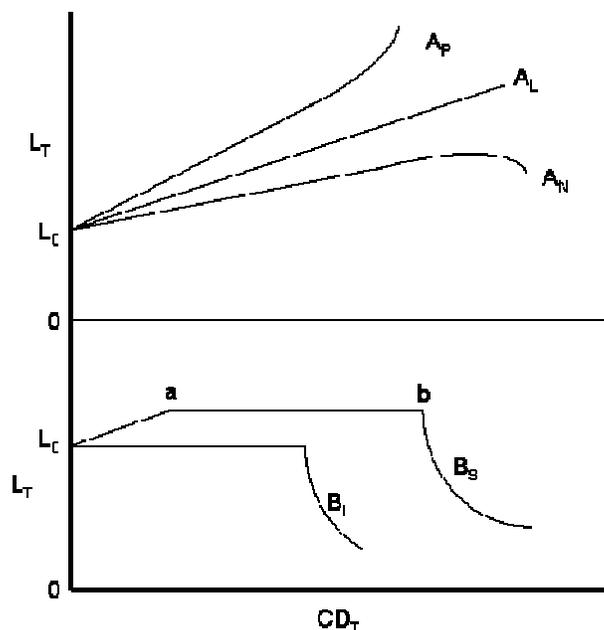


Figura 6. Diagrama de solubilidad de fases.

### 2.3.1.1 Caracterización

Para determinar si se ha formado el complejo de inclusión es necesario realizar algunos estudios de caracterización. Dado que la inclusión de una molécula induce un cambio en la CD, varios métodos se han usado para caracterizar los complejos de inclusión en estado sólido. Entre los métodos más comunes están la calorimetría diferencial de barrido (DSC), la difracción de rayos-X de polvos, espectroscopia de infrarrojo y la resonancia magnética nuclear.

En la calorimetría diferencial de barrido (DSC) la endoterma de fusión del ligando cambiará de posición o desaparecerá como resultado de la formación del complejo. El complejo formado puede tener un punto de fusión diferente o no presentar esta endoterma debido a su naturaleza amorfa. La mezcla física en la mayoría de los casos mantendrá las endotermas del ligando y la CD. La difracción de rayos-X constituye una herramienta para caracterizar un complejo de inclusión. El complejo debe presentar un patrón diferente de rayos-X comparado con la mezcla física. Si el complejo formado es cristalino, es posible obtener un solo patrón de rayos x para elucidar la

estructura del complejo. En cuanto a la espectroscopia de infrarrojo las observaciones incluyen cambios en los picos característicos de los grupos funcionales o de los complejos formados, en comparación con las materias primas por separado [15].

## 2.4 Permeabilidad celular

El traslado de principios activos dentro del organismo esta determinada por la solubilidad acuosa y por la habilidad de moverse a través de las bicapas lipídicas de las células epiteliales y endoteliales; esto último directamente influido por la liposolubilidad del compuesto. El proceso de paso de un compuesto a través de la membrana celular recibe el nombre de “permeación” y puede estar o no mediado por el uso de energía [23].

El paso de moléculas a través de una membrana debido a una diferencia de concentración en dos compartimentos, se denomina difusión simple. En este caso el desplazamiento de las moléculas va en dirección del gradiente de concentración (zona de mayor a menor concentración). En general, existen dos rutas por las cuales las moléculas pueden atravesar una monocapa celular: a través de las células (transcelular) o entre las células (paracelular) (Figura 7).

El proceso de difusión simple se estudia a través de la ley de Fick [24]. Esta ley establece que la velocidad de difusión a través de una membrana ( $dC/dt$ ) es proporcional al gradiente de concentración, representado por la diferencia en la concentración del fármaco en cada lado de la membrana ( $\Delta C$ ):

$$dC/dt = k \Delta C = k (C_1 - C_2) \quad \text{Ecuación (1)}$$

Donde  $C_1$  y  $C_2$  son las concentraciones del fármaco en cada lado de la membrana y  $k$  es una constante de proporcionalidad. Se asume que  $C_1 > C_2$  y que hay transporte neto del fármaco desde la región 1 a la región 2. La constante de proporcionalidad incorpora el coeficiente de difusión del fármaco, el grosor y área de la membrana biológica y la permeabilidad de la membrana para el fármaco específico por lo que resulta conveniente agrupar todos estos factores en un solo parámetro: el coeficiente de permeabilidad  $P_m$ .

$$P_m = \frac{D_m K_d}{h} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde  $D_m$  es el coeficiente de difusión de la membrana,  $K_d$  es el coeficiente de partición del fármaco y  $h$  es el grosor de la membrana de absorción.

Por lo tanto, la ecuación 1 se convierte en la ecuación 3:

$$dC/dt = P (C_1 - C_2) \quad \text{Ecuación (3)}$$

La absorción gastrointestinal de un fármaco desde una solución acuosa requiere de difusión del lumen hacia la pared intestinal y penetración de la barrera epitelial al los capilares de la circulación sistémica. Una vez que emerge en la sangre, el fármaco se distribuye rápidamente dentro de un volumen aparente que es considerablemente más grande que el volumen de la sangre. Por lo tanto, durante la absorción, la concentración del fármaco en la sangre será mucho menor que en el sitio de absorción. En consecuencia, el gradiente de concentración es aproximadamente igual a  $C_1$  y la ecuación 3 puede ser escrita como una expresión de primer orden [24]:

$$dC/dt \cong P C_1 \quad \text{Ecuación (4)}$$

#### 2.4.1 Ruta transcelular

Las moléculas que utilizan esta vía pueden ser transportadas pasivamente o activamente (con ayuda de transportadores). El primero es que mayoritariamente utilizan los principios activos. La composición de la membrana y las propiedades fisicoquímicas del fármaco son aspectos relevantes a considerar para su absorción por esta ruta [25].

Los requerimientos estructurales de la ruta transcelular pueden ser simplificados con el uso de las propiedades fisicoquímicas de un compuesto como  $\log P$ ,  $\log D$  y el peso molecular, así como también otras propiedades como la superficie polar o la capacidad de formar puentes de hidrogeno [16]. El modelo de predicción más simple para esta ruta es la regla de los 5, que dice que para que un compuesto se pueda considerar como candidato a fármaco, debe cumplir con las siguientes características [27]:

- Peso molecular < 500 Daltons
- $\log P < 5$
- Donadores de puente hidrógeno (OH + NH)  $\leq 5$
- Aceptores de puente hidrógeno (O + N)  $\leq 10$

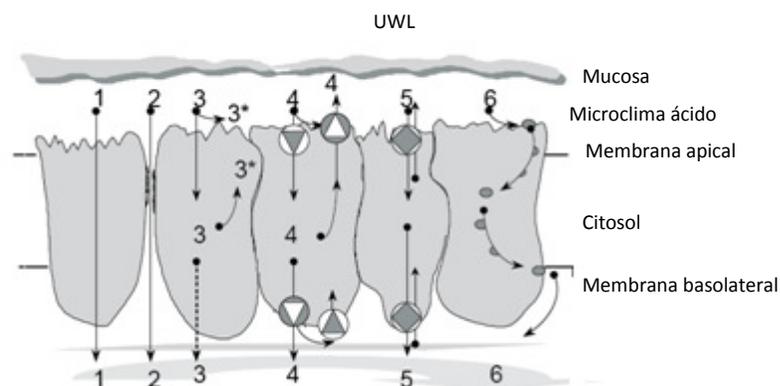


Figura 7. Diferentes mecanismos de transporte celular.

- 1) Transporte transcelular pasivo.
- 2) Transporte paracelular pasivo.
- 3) Transporte transcelular pasivo afectado por metabolismo intracelular o extracelular (3\*).
- 4) Transporte transcelular pasivo modificado por un transportador apical y/o basolateral de influx o efflux.
- 5) Transporte transcelular pasivo modificado por cotransporte apical o basolateral.
- 6) Endocitosis

#### 2.4.2 Métodos para la evaluación de la permeabilidad intestinal

Existen varios métodos que se utilizan hoy en día para evaluar la permeabilidad celular durante el proceso de descubrimiento y optimización de principios activos. Entre ellos encontramos métodos *in vivo*, perfusión intestinal, intestino invertido y líneas celulares (Caco-2) [28-31]; recientemente se están utilizando los llamados métodos no biológicos. Cada una de estas metodologías tiene sus propias características y presenta sus propias ventajas y desventajas, por lo que la mejor opción será la que se ajuste a las necesidades de la investigación. Es muy recomendable, para un escrutinio preliminar, el uso de los métodos no biológicos por su bajo costo, capacidad de evaluación en cuanto a números de sustancias y cantidades de las mismas. Uno de estos métodos es el denominado PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay) el cual presentamos a continuación.

#### 2.4.3 PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay)

PAMPA es un método que predice el transporte transcelular pasivo por medio de la evaluación de la capacidad del fármaco de atravesar una membrana artificial. Este método ha mostrado muy

buena reproducibilidad y correlación con la permeabilidad intestinal en humanos, además de que no es costoso y permite la evaluación de una gran cantidad de compuestos en poco tiempo.

El uso de membranas artificiales inmovilizadas (construidas con bicapas de fosfolípidos sobre un microfiltro poroso) como modelo para evaluar la permeabilidad se remonta a la década de los 60's. En 1962, Mueller y colaboradores, observaron que cuando una pequeña cantidad de fosfolípido (2% p/v en un alcano) se colocaba cuidadosamente en una superficie delgada de teflón, se formaba una capa delgada en el centro de la superficie. Este grupo de investigación lo consideró un buen sistema para estudiar la permeabilidad. Sin embargo, al empezar a utilizar estos modelos se vio que las membranas que se formaban eran extremadamente frágiles y difíciles de preparar y manejar por lo que su uso fue limitado [32,33].

Kansy y colaboradores de Hoffman-La Roche publicaron un estudio amplio y detallado acerca de la permeación de compuestos a través de filtros recubiertos con una capa de fosfolípidos. Estos estudios se dieron a conocer en el mejor momento, justo cuando comenzaba a tomar gran importancia el estudio y exploración de la solubilidad y la permeabilidad como dos parámetros biofarmacéuticos importantes desde las primeras etapas del descubrimiento de un nuevo fármaco, antes que el uso de animales para estos estudios [34-36].

En esta técnica se mide la habilidad de un compuesto para difundir desde un donador a un receptor. Para ello, el ensayo se realiza en placas de 96 pozos, cada uno con un soporte de PVDF de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro impregnado con una solución de lecitina de huevo en dodecano. Inmediatamente después de la preparación de la membrana artificial sobre el soporte de PVDF, la placa donadora se llena con una solución amortiguadora conteniendo el compuesto a estudiar. Después el donador se coloca sobre una placa aceptora conteniendo una cantidad de solución amortiguadora tal que el líquido entre en contacto con la membrana (Figura 8).

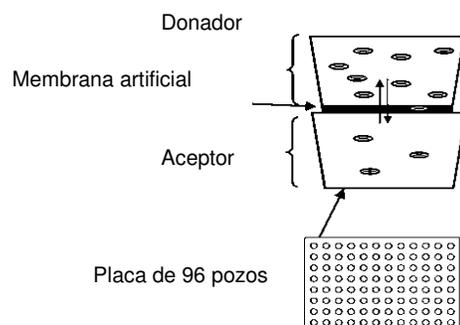


Figura 8. Sistema PAMPA.

Este sistema se incubó durante 12-16 h y después de este tiempo, se separan las placas y se determina la concentración del compuesto en la placa aceptora. Ese método se ha usado para predecir la permeabilidad con una muy buena correlación con los valores de permeabilidad de los mismos compuestos en humanos. Como estas membranas artificiales no presentan transportadores ni enzimas, solo se puede estudiar la difusión pasiva de los compuestos [36].

A partir de aquí se han realizado varias modificaciones a este sistema para optimizar el tiempo de incubación, la reproducibilidad y la correlación con la absorción. Por ejemplo, Avdeef y colaboradores introdujeron el uso de 1,2-dioleoil-glicer-3-fosfolina (DOPC) al 2% en dodecano y lograron la automatización completa de esta técnica [32].

Sugano y colaboradores estudiaron el efecto de las diferentes composiciones de lípidos de la membrana artificial en la permeación de los compuestos. En su estudio, una mezcla de diferentes fosfolípidos se usó con el objetivo de acercarse a la mezcla de lípidos que se encuentran en el borde de cepillo. También investigaron los efectos de la carga negativa en la membrana y la longitud de la cadena del solvente orgánico usado en la preparación de la membrana. La adición de una carga negativa en la membrana incrementó la permeación de los compuestos básicos y se encontró una mejor correlación con la absorción intestinal [37].

Faller y colaboradores, propusieron una alternativa a las técnicas anteriormente descritas. En esta técnica, el objetivo era reducir el tiempo del ensayo y evitar la variabilidad generada por el tipo y la calidad de los fosfolípidos. Faller cambia el soporte de PVDF de 120 µm de espesor por un soporte de policarbonato de 10 µm de espesor y una solución de hexadecano al 5% en hexano,

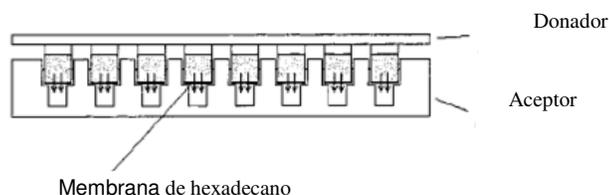


Figura 9. Fundamento de PAMPA según Faller.

constituye la membrana artificial. Utilizando este sistema, el tiempo de incubación se puede reducir a 5 horas y la variabilidad en la membrana artificial es mínima. Este método también se puede realizar a diferentes pH para estudiar la influencia de este factor [38].

Al realizar el cálculo del  $\log Pe$  (siempre en el rango de pH de 4-8) se observó una muy buena correlación con la absorción intestinal (Figura 9).

El hecho de que los alcanos se puedan usar para estudiar la difusión pasiva transcelular no es sorprendente ya que se ha demostrado que el interior de la bicapa lipídica está bien representado por alcanos de cadena larga. Además, numerosos estudios han reportado una buena correlación entre el coeficiente de distribución alcano/agua y la permeación a través de bicapas de fosfolípidos [34-38]. Faller y colaboradores, reportan la siguiente ecuación (ecuación 5) para el cálculo del  $\log Pe$ :

$$\log Pe = \log \left\{ C - \ln \left( 1 - \frac{[fármaco]_{acceptor}}{[fármaco]_{equilibrio}} \right) \right\} \quad \text{Ecuación (5)}$$

En donde  $C = \left( \frac{V_D \cdot V_A}{(V_D + V_A) \text{Área} \cdot \text{tiempo}} \right)$  Ecuación (6)

Donde  $V_D$  = volumen del donador

$V_A$  = volumen del aceptor

Área = área efectiva. Área efectiva = área multiplicada por el grado de porosidad del soporte de policarbonato.

En este trabajo se utilizó este último método (PAMPA con una membrana de hexadecano en hexano al 5%) para determinar la permeación del compuesto experimental.

## 2.5 La validación de métodos

En muchas situaciones, cuando se tiene interés en medir un componente en una muestra, es necesario contar con una metodología de medición (método analítico). En el campo farmacéutico, estas metodologías pueden ser farmacopéicas o bien, se puede dedicar tiempo para su desarrollo, partiendo del hecho de que deben cumplir con el atributo de confiabilidad y que para alcanzarlo es necesario llevar a cabo estudios experimentales que permitan demostrar la confiabilidad de lo que se está midiendo. Un proceso que permite cumplir este fin es la validación.

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos, materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra [39].

La validación de un método analítico es el proceso por el cual se demuestra, a través de trabajo experimental, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica

deseada; es decir, cumple con su propósito. En otras palabras, la validación de un método analítico es la evidencia experimental documentada de que un método analítico cumple con el propósito para el que fue diseñado. Por lo tanto, la validación proporciona confiabilidad para quien aplica la metodología [40].

Se requiere de una validación siempre que se realice un nuevo método ya que esta considera siempre un sistema analítico en particular. Por lo tanto, se necesitará de una revalidación cuando cualquier componente del sistema analítico cambie o si existe alguna indicación del que el método analítico ya no está arrojando los resultados adecuados.

En general, la validación para un nuevo método analítico se realiza a dos niveles: la pre validación, en donde se determina si el método satisface las necesidades del laboratorio en donde se desarrolló y la segunda es la validación total o completa en donde ya se llevan a cabo los estudios interlaboratorio. El objetivo de la validación total, involucrando un número pequeño de laboratorios, es demostrar que el método se comporta tal y como fue establecido en la pre validación [41].

La validación de los métodos analíticos se fundamenta en la determinación de diversos parámetros, sin embargo, no existe un modelo único para realizarla pues las necesidades de cada método pueden variar de un caso a otro, por lo tanto, los parámetros que se evalúan cambian de acuerdo a las necesidades de cada método analítico.

Existen diferentes guías y protocolos en donde se establecen los requisitos mínimos que es necesario satisfacer con la validación, pero estos no limitan de ninguna manera el interés que pudiera tener el analista para profundizar o modificar alguno de los temas involucrados. Dentro de estos documentos, se encuentra la Norma Oficial Mexicana 177 (NOM –177 –SSAI –1998) que establece los criterios y requisitos que deben observarse en la realización de las pruebas para demostrar la intercambiabilidad de los medicamentos genéricos, así como los requisitos a que se deberán sujetar los establecimientos que lleven a cabo dichas pruebas [42]. En la Tabla 3 se muestran las definiciones de los parámetros de validación de un método analítico, los criterios de aceptación y la manera en que se llevan a cabo, de acuerdo a la norma antes mencionada.

En este trabajo se presenta el desarrollo de sencillos métodos analíticos para cuantificar los marcadores de las pruebas de permeabilidad (cimetidina, propanolol y verapamil) así como nuestro compuesto experimental (RCB-20) y se demuestra la confiabilidad de cada uno de ellos para determinar la permeación de los compuestos a través de la técnica PAMPA. El propósito de estos métodos es únicamente la cuantificación de un analito, por lo que, con la evaluación de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación podemos concluir a cerca de la confiabilidad de dichos métodos.

Tabla 3. Parámetros de validación, definición y criterios de aceptación según la NOM –177 –SSAI –1998.

PARÁMETRO	DEFINICIÓN	CRITERIOS	REALIZACIÓN
<b>Linealidad</b>	Capacidad de un método analítico para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra en un intervalo de trabajo determinado.	El método debe demostrar una linealidad con al menos 5 puntos (que incluya los puntos extremos excepto el cero) por triplicado, con un coeficiente de correlación mayor o igual que 0.99 y un error relativo debido a la regresión no mayor que el 3.0%	Preparar 3 curvas de calibración del analito y calcular el coeficiente de correlación (r), la pendiente (m), el intercepto (b) y el error relativo a la regresión (EER).
<b>Precisión</b>	Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea; se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad		
<b>Repetibilidad</b>	Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones	El coeficiente de variación del porcentaje de recuperación de los datos de linealidad no debe ser mayor que el 3%.	De los datos obtenidos de las 3 curvas de linealidad obtener media (x), desviación estándar ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV%) para cada una de las concentraciones de la curva
<b>Reproducibilidad intralaboratorio (precisión intermedia)</b>	Precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis: diferentes días, equipo, columnas o analistas	El coeficiente de variación global no debe ser mayor que el 3%	Evaluar el efecto de los eventos aleatorios en la precisión del método analítico, tales como los días, los analistas o los equipos. Analizar una muestra homogénea al menos por triplicado para probar cada condición
<b>Exactitud</b>	Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia	El valor de desviación estándar relativa (DER) debe ser menor del 3%	El promedio del porcentaje de la recuperación de los datos de linealidad no debe variar con respecto a la cantidad nominal en más de 3% en cada punto.
<b>Límite de detección</b>	La mínima concentración de un compuesto en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas	3 veces la señal ruido	Determinar la concentración a la cual el analito genere una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de 3 a 1.
<b>Límite de cuantificación</b>	La concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método	10 veces la señal ruido <a href="http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf">http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA417.pdf</a>	Determinar la concentración a la cual el analito genere una respuesta con respecto a la muestra blanco en una proporción de 10 a 1.

Filename: A4  
Directory: C:\Users\HP Pavilion dv6500\Desktop\DOC  
Template: C:\Users\HP Pavilion  
dv6500\AppData\Roaming\Microsoft\Templates\Normal.dotm  
Title:  
Subject:  
Author: WinuE  
Keywords:  
Comments:  
Creation Date: 26/06/2009 10:40:00 a.m.  
Change Number: 3  
Last Saved On: 26/06/2009 11:38:00 a.m.  
Last Saved By: HP Pavilion dv6500  
Total Editing Time: 0 Minutes  
Last Printed On: 26/06/2009 06:33:00 p.m.  
As of Last Complete Printing  
Number of Pages: 17  
Number of Words: 5,334 (approx.)  
Number of Characters: 29,342 (approx.)

### 3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dado que el compuesto denominado RCB-20 presenta un buen perfil de actividad antiparasitaria contra algunos protozoarios y el nematodo *T. spiralis* y al mismo tiempo manifiesta una baja solubilidad acuosa que limitaría su buena eficacia en estudios in vivo, ¿existe algún recurso dentro del campo de la química farmacéutica que nos permita rebasar el inconveniente de la insolubilidad acuosa de este compuesto y favorecer su traslado por membranas biológicas para alcanzar un mejor comportamiento antiparasitario?

### 4 HIPOTESIS

Mediante la formación de complejos de inclusión binarios se modificará la solubilidad acuosa y la permeación de RCB-20 provocando con ello un mejor comportamiento antiparasitario in vivo.

## 5 OBJETIVOS

Modificar la solubilidad y permeación del compuesto RCB-20 a través de la formación de complejos de inclusión con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina para incrementar su actividad in vivo contra *T. spiralis*.

### 5.1 Objetivos particulares

- Desarrollar e implementar un método analítico para cuantificar al compuesto RCB-20 por CLAR (cromatografía de líquidos de alta resolución).
- Desarrollar e implementar un método analítico para cuantificar cimetidina, propranolol y verapamil (compuestos controles de ensayos de permeabilidad).
- Evaluar la confiabilidad de los métodos desarrollados.
- Llevar a cabo la preparación de los complejos de inclusión de RCB-20 con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina.
- Evaluar el efecto de un cosolvente sobre la formación y solubilidad del complejo de inclusión.
- Caracterizar el complejo de inclusión.
- Determinar la permeación de RCB-20 por medio de la técnica PAMPA.
- Determinar la permeación de RCB-20 como complejo de inclusión en hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina por medio de la técnica PAMPA
- Determinar la actividad biológica in vivo contra *Trichinella spiralis* del complejo de inclusión.

## 6 DESARROLLO EXPERIMENTAL

6.1 Optimización de las condiciones instrumentales para la cuantificación de los marcadores y del RCB-20.

Se prepararon soluciones de cimetidina, propranolol, verapamil y RCB-20 a una concentración de 1 mg/mL en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 (20 mM) con DMSO al 5% (matriz analítica para la técnica PAMPA). Estas soluciones se inyectaron en el equipo de CLAR para seleccionar la columna, obtener los espectros UV, determinar el tiempo de retención y establecer la fase móvil para cada compuesto.

### 6.1.1 Evaluación de los parámetros de validación

Para evaluar los parámetros de validación, se prepararon tres curvas de calibración por triplicado para cada compuesto. Para la cimetidina, el propranolol y el verapamil el rango de concentraciones de las curvas fue de 10 a 250  $\mu\text{M}$  y para el RCB-20 el rango de trabajo fue de 10 a 200  $\mu\text{M}$ .

#### 6.1.1.1 Linealidad

Para evaluar la linealidad de cada método se prepararon 3 curvas de calibración para cada compuesto y se analizaron en el equipo de CLAR. Con los datos obtenidos se calculó el coeficiente de correlación ( $r$ ), la pendiente ( $m$ ), el intercepto ( $b$ ) y el error relativo a la regresión (EER).

#### 6.1.1.2 Precisión

La precisión se evaluó como repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio (precisión intermedia).

#### 6.1.1.3 Repetibilidad

Para la repetibilidad, se calculó la media ( $\bar{x}$ ), la desviación estándar ( $\sigma$ ) y coeficiente de variación (CV%) para cada una de las concentraciones de cada una de las curvas que se prepararon para evaluar la linealidad del método.

#### 6.1.1.4 Reproducibilidad intralaboratorio

La finalidad de esta parte fue determinar la variabilidad interdía e intradía de nuestros métodos analíticos comparando curvas de calibración hechas en diferente horario (mañana y tarde) y en diferente día (día 1 y día 2).

Para todos los casos, las curvas para evaluar la linealidad, se prepararon por la mañana, considerándose este como “Día 1”.

Para determinar la variabilidad intradía, se preparó otra curva de calibración, también por triplicado, el “Día 1” por la tarde y se hizo la comparación de estas curvas contra las curvas preparadas ese mismo día por la mañana.

Para determinar la variabilidad interdía se compararon las curvas del “Día” 1 por la mañana contra tres curvas hechas al siguiente día (“Día 2), también por la mañana y bajo las mismas condiciones.

#### 6.1.1.5 Exactitud

Para evaluar la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor nominal se calculó la desviación estándar relativa utilizando el promedio de la concentración experimental de los datos de linealidad

#### 6.1.1.6 Límite de detección y límite de cuantificación

Existen varias maneras de determinar el límite de detección y de cuantificación. Una de las técnicas más utilizadas para ello es la que se basa en la señal ruido. Esta se aplica para los métodos que utilizan instrumentos para medir la respuesta analítica y que presenta una señal ruido basal. En este trabajo se hizo la determinación mediante el análisis de muestras de concentraciones conocidas del analito estableciendo el nivel mínimo del analito que puede detectarse y cuantificarse confiablemente con base en la señal ruido.

Primeramente se inyectó por triplicado el blanco (solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5-DMSO al 5%) y se promediaron las alturas de la señal ruido de la línea base.

Posteriormente se prepararon soluciones de cada compuesto a diferentes concentraciones hasta encontrar aquella concentración que generara una altura 3 veces mayor que la altura de la señal ruido del blanco para estimar el límite de detección. Lo mismo se hizo para el límite de cuantificación en donde se buscó la concentración que generara una respuesta 10 veces mayor de la señal ruido con respecto al blanco.

## 6.2 Formación de complejos de inclusión

A continuación se describen tres técnicas utilizadas para la formación del complejo de inclusión RCB-20-CD-Cl. En las tres técnicas se utilizó una relación molar 2:1 de CD con respecto a RCB-20. En todos los casos se utilizó agua grado HPLC.

### Técnica I

- a) Se pesaron 1.38 g de CD y se disolvieron en 50 mL de agua.
- b) Se adicionó una cantidad de 0.18 g de RCB-20 a la solución anterior.
- c) Se tapó el matraz con papel filtro y se cubrió con papel aluminio para evitar el paso de la luz.
- d) El matraz permaneció en agitación durante 7 días a 400 rpm a temperatura ambiente.
- e) Al término del período de agitación, la solución se sometió a un proceso de liofilización para eliminar el agua.
- f) El polvo seco que se obtuvo se colectó en un frasco y se almacenó para su caracterización.

### Técnica II

- a) Se pesaron 1.38 g de HPBCD y se disolvieron en 37.5 mL de agua (solución A).
- b) Se pesaron 0.18 g de RCB-20 y se disolvieron en 12.5 mL de etanol (solución B).
- c) En un matraz de bola se mezclaron las dos soluciones adicionando la solución B a la solución A para obtener la solución C.
- d) Se tapó el matraz con papel filtro y se cubrió con papel aluminio para evitar el paso de la luz.
- e) El matraz permaneció en agitación durante 7 días a 400 rpm a temperatura ambiente.

- f) Al término de los 7 días, la solución C se colocó en un rotaevaporador para eliminar el agua y el etanol. La evaporación se realizó hasta sequedad.
- g) El producto sólido obtenido se colectó, y se tamizó en malla 200. Posteriormente se almacenó para posteriormente realizar sus pruebas de caracterización.

### Técnica III

- a) Se pesaron 1.38 g de HPBCD y se disolvieron en 12.5 mL de agua (solución A).
- b) Se pesaron 0.18 g de RCB-20 y se disolvieron en 37.5 mL de etanol (solución B).
- c) En un matraz bola se mezclaron las dos soluciones adicionando la solución B a la solución A para obtener la solución C.
- d) Se tapó el matraz con papel filtro y se cubrió con papel aluminio para evitar el paso de la luz.
- e) El matraz permaneció en agitación durante 7 días a 400 rpm a temperatura ambiente.
- f) Al término de los 7 días, la solución C se colocó en un rotaevaporador para eliminar el agua y el etanol. La evaporación se realizó hasta sequedad.
- g) El producto sólido obtenido se colectó, y se tamizó en malla 200. Posteriormente se almacenó para sus pruebas de caracterización.

#### 6.2.1 Solubilidad intrínseca del RCB-20

- a) Para determinar la solubilidad intrínseca del RCB-20 se prepararon 10 mL de una solución a una concentración de 5mg/mL del compuesto (ya sea en agua o en una mezcla de etanol agua 75:25).
- b) La solución anterior se agitó durante 7 días, protegida de la luz y a temperatura ambiente.
- c) Al término del período de agitación se tomó una muestra, se filtró (con un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ ) y se analizó por CLAR para determinar la concentración del compuesto disuelto.

#### 6.2.2 Estudio de solubilidad de fases

- a) Se prepararon 5 soluciones (ya sea en agua o en una mezcla de etanol-agua 75:25) de CD a diferentes concentraciones y se mezclaron con una cantidad fija de RCB-20 correspondiente a un exceso 3 veces mayor a la máxima concentración de CD utilizada (Tabla 4).

Tabla 4. Solubilidad de fases

Tubo	Concentración CD (mM)	Concentración RCB-20 (mM)	Volumen (mL)
1	1.0	9.0	5.0
2	1.5	9.0	5.0
3	2.0	9.0	5.0
4	2.5	9.0	5.0
5	3.0	9.0	5.0

- b) Estos tubos permanecieron en agitación a 400 rpm durante 7 días a temperatura ambiente y protegidos de la luz.
- c) Al término del período de agitación, se tomó una muestra de cada tubo. Esta muestra se pasó a través de un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  y se analizó por CLAR para obtener la concentración.
- d) Posteriormente se construyó un diagrama de solubilidad de fases graficando la concentración molar total del ligando en solución, contra la concentración total de la CD.
- e) El estudio se llevó a cabo por triplicado.

### 6.2.3 Caracterización

Las herramientas utilizadas para caracterizar el complejo de inclusión en estado sólido fueron: análisis térmico, espectroscopia de infrarrojo y difracción de rayos-X.

El análisis térmico se llevó a cabo por calorimetría diferencial de barrido en un quipo Metler Toledo DSC 821<sup>e</sup>, en un rango de temperatura de 50-300°C, con una velocidad de calentamiento de 5°C/min bajo un flujo de N<sub>2</sub>.

La espectroscopia de infrarrojo se llevó a cabo en un Espectrofotometro de FT-IR, Spectrum RXI, Perkin-Elmer. utilizando pastillas de KBr.

La difracción de rayos-X de polvos se realizó en un difractómetro de rayos-X usando Cu  $\text{K}\alpha$  ( $\lambda=1.5406$  armstrongs) con 30 mA, 35 kV y con una velocidad de barrido de 1°C/min.

### 6.3 PAMPA

Se siguió la metodología descrita por Faller y colaboradores [38] para evaluar la permeación de RCB-20 solo y en complejo de inclusión, así como de cimetidina, propranolol y verapamil, tres fármacos representativos de baja, media y alta permeabilidad respectivamente. El procedimiento fue el siguiente:

- 1) Se preparó una solución de hexadecano en hexano al 5%.
- 2) Se tomaron 15  $\mu\text{L}$  de la solución anterior y se colocaron en el soporte de policarbonato de cada pozo de la placa donadora.
- 3) Se dejó esta placa en reposo a temperatura ambiente durante 45 minutos para asegurar la completa evaporación del hexano.
- 4) Se adicionaron 250  $\mu\text{L}$  de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 con DMSO al 5% en la placa aceptora.
- 5) Se colocó la placa donadora sobre la placa aceptora (cuidando siempre que el lado inferior de la membrana del donador estuviera en contacto con la solución amortiguadora del aceptor (Figura 10).

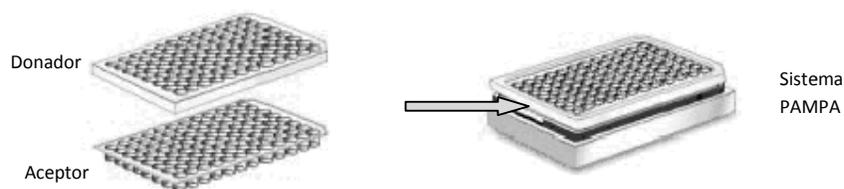


Figura 10. Preparación del sistema PAMPA.

- 6) Se prepararon soluciones de RCB-20, de cimetidina, propranolol y verapamil a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  en solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 con DMSO 5%.
- 7) Se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de las soluciones del punto 6 a los pozos de la placa donadora.
- 8) Este sistema se incubó a temperatura ambiente por 5 horas.
- 9) Después de tiempo de incubación se analizó la solución del aceptor por medio de CLAR para determinar su concentración.
- 10) Se prepararon soluciones de los compuestos al equilibrio (es decir, si la solución del donador y la del aceptor se combinaran simplemente)
- 11) Se determinó la concentración de las soluciones al equilibrio.
- 12) Se determinó el coeficiente e permeabilidad efectiva ( $P_e$ ) de los compuestos a través de una membrana de hexadecano en hexano por medio de la ecuación 5.
- 13) Se calculó el % de flujo por medio de la relación:

$$\%Flujo = \frac{[Aceptor]}{[Referencia]} * 100 \quad \text{Ecuación (7)}$$

El ensayo de permeabilidad se hizo por triplicado para cada compuesto.

### 6.3.1 Evaluación de la integridad de la membrana

Para saber si el paso de los compuestos a través de la membrana artificial no fue el resultado de un rompimiento de la membrana ni fugas en ella, se verificó la integridad de la membrana. Los pasos a seguir fueron:

- 1) Se preparó una solución de Lucifer Yellow (color amarillo intenso) a una concentración de 0.1 mg/mL
- 2) Una vez finalizado el ensayo de PAMPA, se tomaron las placas y se removió el líquido que quedó en ellas por simple agitación e inversión de dichas placas.
- 3) Se vertieron 250  $\mu$ L de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 con DMSO al 5% a cada pozo del aceptor.
- 4) Se colocaron 150  $\mu$ L de solución de Lucifer Yellow en los pozos donadores. Se ensamblaron las placas y se incubó el sistema durante 5 horas.
- 5) Después de la incubación se realizó una inspección visual de la placa aceptora para determinar la presencia de un color amarillo

Una membrana integra rechaza el paso de Lucifer Yellow (color amarillo) por lo que los pozos de la placa aceptora permanecerán si cambio alguno.

Filename: A6  
Directory: C:\Users\HP Pavilion dv6500\Documents  
Template: C:\Users\HP Pavilion  
dv6500\AppData\Roaming\Microsoft\Templates\Normal.dotm  
Title:  
Subject:  
Author: WinuE  
Keywords:  
Comments:  
Creation Date: 26/06/2009 10:41:00 a.m.  
Change Number: 4  
Last Saved On: 26/06/2009 01:53:00 p.m.  
Last Saved By: HP Pavilion dv6500  
Total Editing Time: 3 Minutes  
Last Printed On: 26/06/2009 06:36:00 p.m.  
As of Last Complete Printing  
Number of Pages: 7  
Number of Words: 1,744 (approx.)  
Number of Characters: 9,593 (approx.)

## 7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Optimización de las condiciones instrumentales

#### 7.1.1 Cimetidina

En la Figura 11 se muestra el cromatograma obtenido de la inyección de la solución de cimetidina (1.0 mg/mL) con las condiciones óptimas que fueron las siguientes:

Columna: Symmetry Shield RP18 5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm.

Fase móvil: Acetonitrilo-agua +ácido acético al 0.5% en una proporción 30:70

Flujo: 0.6 mL/min

Presión: 824 psi

$\lambda$  de máxima absorción: 254 nm

Tiempo de retención: 2.2 min

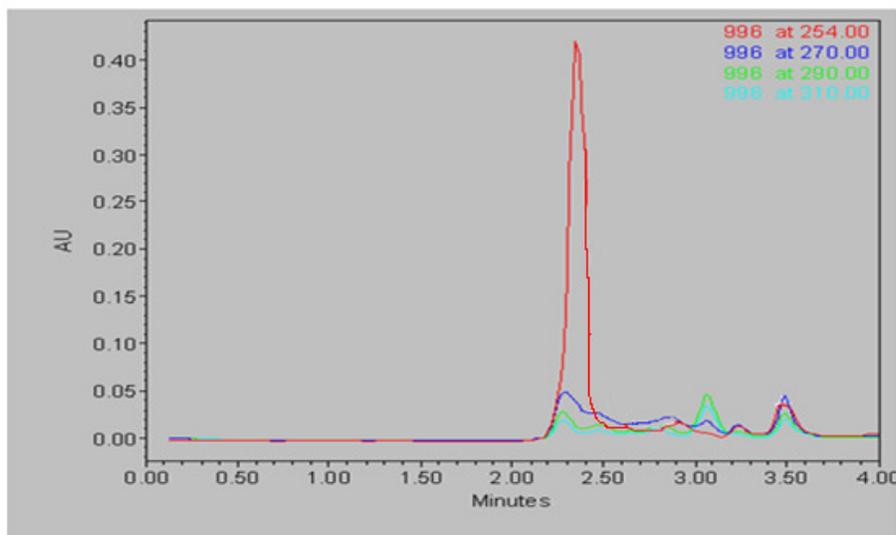


Figura 11. Condiciones instrumentales para cimetidina.

Columna Symmetry Shield RP18 5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm; acetonitrilo-agua +ácido acético 0.5% 30:70; flujo 0.6 mL/min.

### 7.1.2 Propranolol

En la Figura 12 se muestra el cromatograma obtenido de la inyección de la solución de propranolol (1.0 mg/mL) con las condiciones óptimas que fueron las siguientes:

Columna: Symmetry Shield RP18, 5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm.

Fase móvil: Metanol-agua +ácido acético al 1.0% en una proporción 60:40

Flujo: 0.6 mL/min

Presión: 1424 psi

$\lambda$  de máxima absorción: 290 nm

Tiempo de retención: 2.8 min

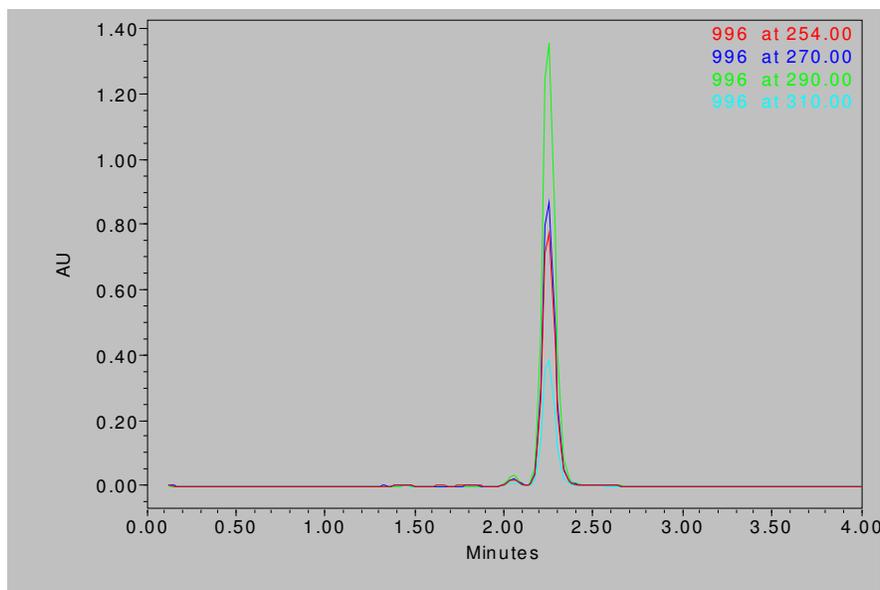


Figura 12. Condiciones instrumentales para propranolol.

Columna Symmetry Shield RP18 5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm; metanol-agua +ácido acético 1.0% 60:40; flujo 0.6 mL/min

### 7.1.3 Verapamil

En la Figura 13 se muestra el cromatograma obtenido de la inyección de la solución de verapamil (1.0 mg/mL) con las condiciones óptimas que fueron las siguientes:

Columna: Symmetry Shield RP18 5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm.

Fase móvil: acetonitrilo-agua +ácido acético al 1.0% en una proporción 65:35

Flujo: 0.6 mL/min

Presión: 941 psi

$\lambda$  de máxima absorción: 270 nm

Tiempo de retención: 3.1 min

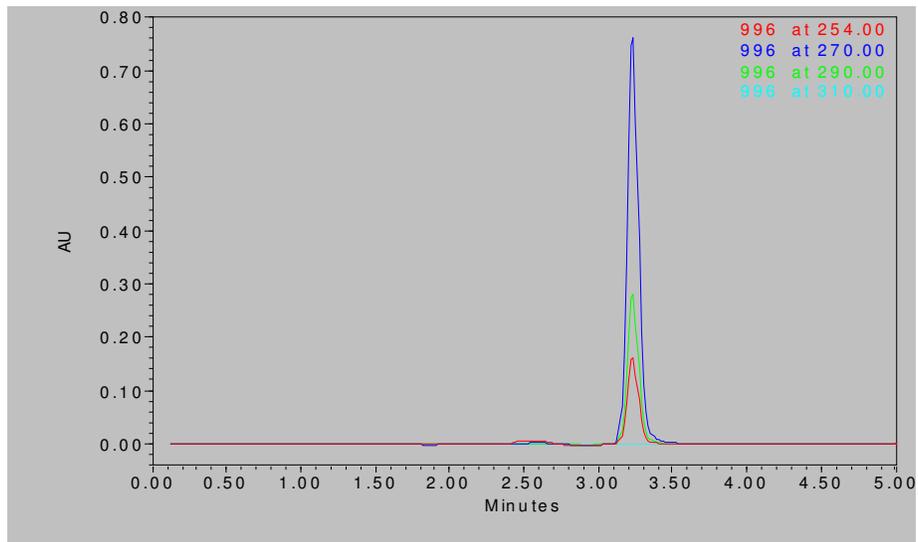


Figura 13. Condiciones instrumentales para verapamil.

Columna Symmetry Shield RP18 5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm; acetonitrilo-agua +ácido acético 1.0%  
65:35;flujo 0.6 mL/min.

#### 7.1.4 RCB-20

En la Figura 14 se muestra el cromatograma obtenido de la inyección de la solución de RCB-20 (1.0 mg/mL) con las condiciones óptimas que fueron las siguientes:

Columna: Atlantis RP18 5  $\mu$ m, 3.9 x 150 mm.

Fase móvil: acetonitrilo-agua +ácido acético al 0.5% en una proporción 90:10

Flujo: 1.0 mL/min

Presión: 1500 psi

$\lambda$  de máxima absorción: 290 nm

Tiempo de retención: 2.3 min

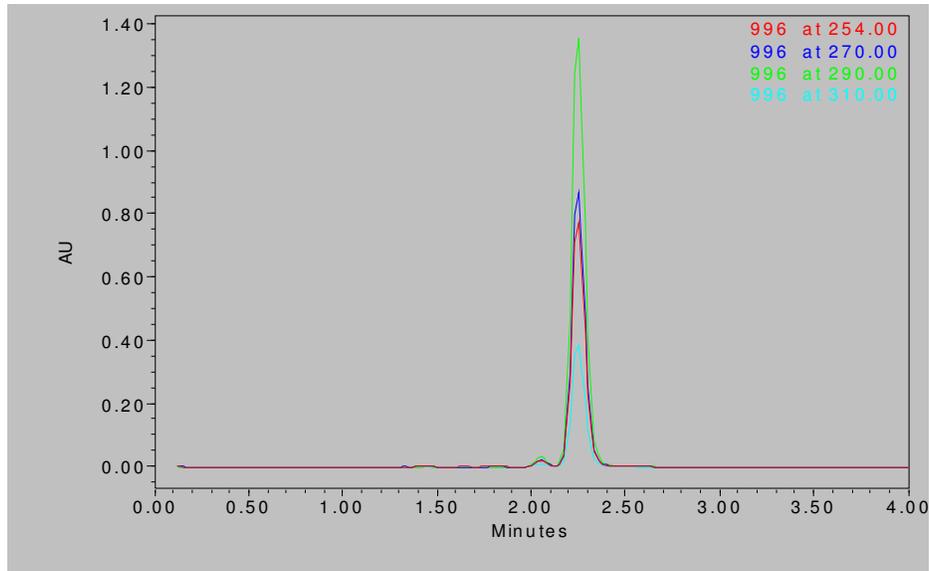


Figura 14. Condiciones instrumentales para RCB-20.

Columna Atlantis RP18 5  $\mu\text{m}$ , 3.9 x 150 mm ; acetonitrilo-agua +ácido acético 0.5% 90:10;flujo 1.0 mL/min

## 7.2 Evaluación de los parámetros de validación

### 7.2.1 Cimetidina

#### 7.2.1.1 Linealidad

Se realizaron las tres curvas de calibración de cimetidina y se analizaron a través de CLAR. En la Figura 15 se observa el comportamiento lineal que presentan las tres curvas de calibración. En la Tabla 5 se muestran los resultados de los parámetros para linealidad.

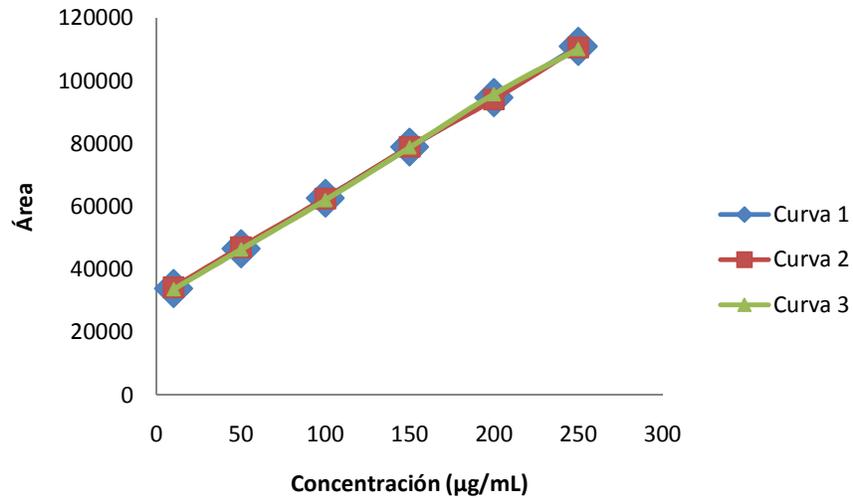


Figura 15. Curvas de calibración de cimetidina.

Tabla 5. Valores de regresión lineal y EER de las curvas de calibración de cimetidina.

Réplica	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de correlación $r$	EER %
1	321,357	30606,642	0,99999	0.2
2	317,312	31119,842	0,99995	0.5
3	321,798	30398,245	0,99978	1.0

**Especificación:** Coeficiente de correlación mayor o igual que 0.99; error relativo a la regresión

no mayor que el 3.0%

**Dictamen:** Cumple

#### 7.2.1.2 Precisión

En la Tabla 6 se muestran los resultados de repetibilidad del método. En esta parte se presentan también los resultados de la precisión intermedia de este método analítico. En las Tablas 7 y 8 se muestran los resultados de la variabilidad intradía y la variabilidad interdía respectivamente.

Tabla 6. Repetibilidad del método.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Concentración Promedio n=3 ( $\mu\text{M}$ )	$\sigma$	CV (%)
10	10,2	0,1	1,2
50	49,9	0,4	0,8
100	99,2	0,6	0,6
150	150,7	0,3	0,2
200	200,5	2,4	1,2
250	249,6	1,6	0,6

**Especificación:** El coeficiente de variación de la concentración experimental de los datos de linealidad no debe ser mayor que el 3.0%.

**Dictamen:** Cumple

Tabla 7. Variabilidad interdía del método analítico.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Promedio concentración experimental n=3 ( $\mu\text{M}$ ) Día 1 por la mañana	Promedio concentración experimental n=3 ( $\mu\text{M}$ ) Día 1 por la tarde	Promedio global concentración experimental n=3 ( $\mu\text{M}$ )	$\sigma$	CV (%)
10	10,2	9,9	10,0	0,2	2,3
50	49,9	50,9	50,4	0,7	1,4
100	99,2	99,5	99,3	0,9	0,9
150	150,7	150,3	150,5	1,0	0,7
200	200,5	198,1	199,3	2,1	1,1
250	249,6	251,4	250,5	1,7	0,7

Tabla 8. Variabilidad intradía del método analítico

Concentración (µM)	Promedio concentración experimental n=3 (µM) Día 1 por la mañana	Promedio concentración experimental n=3 (µM) Día 2 por la mañana	Promedio global concentración experimental n=3 (µM)	σ	CV (%)
10	10,2	10,1	10,0	0,3	2,7
50	49,9	50,0	50,3	0,6	1,3
100	99,2	99,6	98,9	0,5	0,5
150	150,7	150,3	151,0	0,6	0,4
200	200,5	200,2	200,3	1,8	0,9
250	249,6	249,8	249,5	1,4	0,6

**Especificación:** El coeficiente de variación global no debe ser mayor que el 3%.

**Dictamen:** Cumple

### 7.2.1.3 Exactitud

En la Tabla 9 se muestran los valores de DER, indicativos de la exactitud del método analítico.

Tabla 9. Exactitud del método analítico

Concentración nominal (µM)	Concentración experimental promedio n=3 (µM)	DER %
10	10,2	2,0
50	49,9	0,1
100	99,2	0,8
150	150,7	0,4
200	200,5	0,2
250	249,6	0,2

**Especificación:** El promedio de la concentración experimental de los datos de linealidad no debe variar con respecto a la cantidad nominal en más de 3% en cada punto.

**Dictamen:** Cumple.

7.2.1.4 Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

LOD: 2.5  $\mu\text{M}$

LOQ: 10  $\mu\text{M}$

7.2.2 Propranolol

7.2.2.1 Linealidad

Se realizaron las tres curvas de calibración de propranolol y se analizaron a través de CLAR. En la Figura 16 se observa el comportamiento lineal que presentan estas tres curvas de calibración. En la Tabla 10 se muestran los resultados de los parámetros para linealidad.

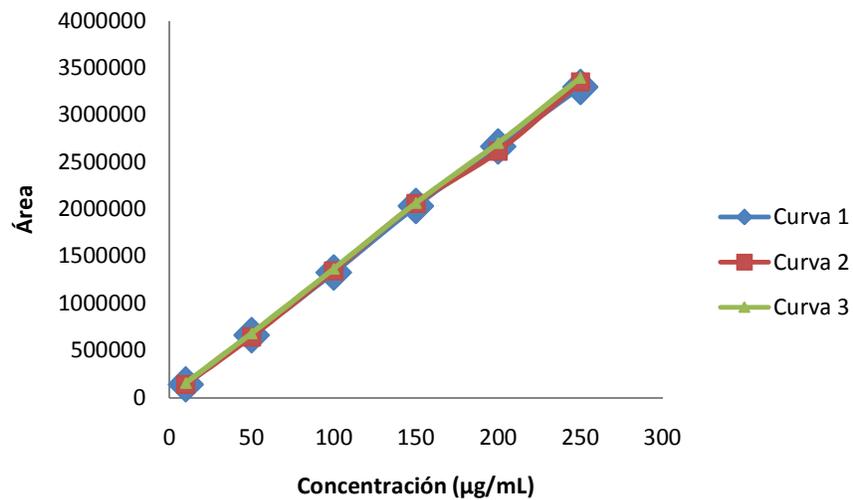


Figura 16. Curvas de calibración de propranolol.

Tabla 10. Valores de regresión lineal y EER de las curvas de calibración de propranolol.

Réplica	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de correlación $r$	EER %
1	13228.553	9881.132	0.99986	1.4
2	13334.893	2839.576	0.99952	2.5
3	13501.356	16555.860	0.99994	0.9

**Especificación:** Coeficiente de correlación mayor o igual que 0.99; error relativo a la regresión no mayor que el 3.0%

**Dictamen:** Cumple

#### 7.2.2.2 Precisión

En la Tabla 11 se muestran los resultados de repetibilidad del método. En esta parte se presentan también los resultados de la precisión intermedia de este método analítico. En las Tablas 12 y 13 se muestran los resultados de la variabilidad intradía y la variabilidad interdía respectivamente.

Tabla 11. Repetibilidad del método

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Concentración Promedio $n=3$ ( $\mu\text{M}$ )	Concentración Promedio	
		$\sigma$	CV (%)
10	10.1	0.3	2.9
50	48.8	0.6	1.3
100	100.0	0.6	0.6
150	152.9	1.2	0.8
200	198.4	2.4	1.2
250	249.8	1.3	0.5

**Especificación:** El coeficiente de variación de la concentración experimental de los datos de linealidad no debe ser mayor que el 3.0%.

**Dictamen:** Cumple

Tabla 12. Variabilidad interdía del método analítico

Concentración (µM)	Promedio concentración experimental n=3 (µM) Día 1 por la mañana	Promedio concentración experimental n=3 (µM) Día 1 por la tarde	Promedio global concentración experimental n=3 (µM)	σ	CV (%)
10	10.1	10.1	10.1	0.3	2.5
50	48.8	49.5	49.2	0.7	1.3
100	100.0	99.3	99.6	0.8	0.8
150	152.9	152.0	152.4	1.0	0.7
200	198.4	199.6	199.0	2.3	1.2
250	249.8	249.5	249.6	1.6	0.6

Tabla 13. Variabilidad intradía del método analítico

Concentración (µM)	Promedio concentración experimental n=3 (µM) Día 1 por la mañana	Promedio concentración experimental n=3 (µM) Día 2 por la mañana	Promedio global concentración experimental n=3 (µM)	σ	CV (%)
10	10.1	9.8	10.0	0.3	2.7
50	48.8	48.7	48.8	0.5	0.9
100	100.0	101.7	100.9	1.3	1.3
150	152.9	150.3	151.6	2.2	1.4
200	198.4	200.1	199.2	2.1	1.1
250	249.8	249.3	249.5	1.5	0.6

**Especificación:** El coeficiente de variación global no debe ser mayor que el 3%.

**Dictamen:** Cumple

#### 7.2.2.3 Exactitud

En la Tabla 14 se muestran los valores de DER, indicativos de la exactitud del método analítico.

Tabla 14. Exactitud del método analítico

Concentración nominal (µg/mL)	Concentración experimental promedio n=3 (µg/mL)	DER (%)
10	10.1	0.9
50	48.8	2.3
100	100.0	0.0
150	152.9	1.9
200	198.4	0.8
250	249.8	0.1

**Especificación:** El promedio de la concentración experimental de los datos de linealidad no debe variar con respecto a la cantidad nominal en más de 3% en cada punto.

**Dictamen:** Cumple.

#### 7.2.2.4 Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

LOD: 2.5 µM

LOQ: 10 µM

#### 7.2.3 Verapamil

##### 7.2.3.1 Linealidad

Se realizaron las tres curvas de calibración de verapamil y se analizaron a través de CLAR. En la Figura 17 se observa el comportamiento lineal que presentan estas tres curvas de calibración. En la Tabla 15 se muestran los resultados de los parámetros para linealidad.

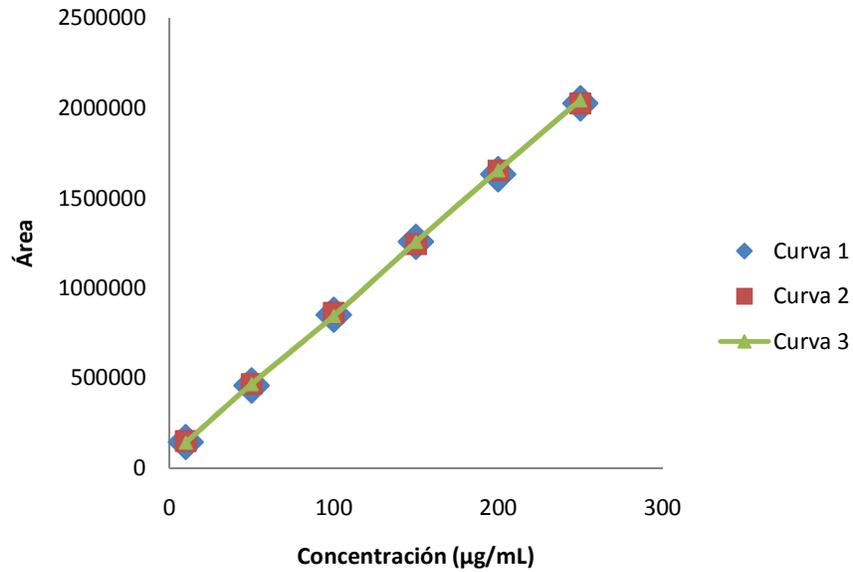


Figura 17. Curvas de calibración de verapamil.

Tabla 1. Valores de regresión lineal y EER de las curvas de calibración de verapamil.

Réplica	Pendiente	Ordenada al origen	Coefficiente de correlación $r$	EER %
1	7839.728	69117.758	0.99996	0.6
2	7832.213	74976.250	0.99995	0.8
3	7936.022	62458.837	0.99996	0.7

**Especificación:** Coeficiente de correlación mayor o igual que 0.99; error relativo a la regresión no mayor que el 3.0%

**Dictamen:** Cumple

### 7.2.3.2 Precisión

En la Tabla 16 se muestran los resultados de repetibilidad del método. En esta parte se presentan también los resultados de la precisión intermedia de este método analítico. En las Tablas 17 y 18 se muestran los resultados de la variabilidad intradía y la variabilidad interdía respectivamente.

Tabla 26. Repetibilidad del método.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Concentración Promedio n=3 ( $\mu\text{M}$ )	$\sigma$	CV (%)
10	9.7	0.1	1.5
50	50.3	0.6	1.1
100	99.7	1.0	1.0
150	150.3	1.2	0.8
200	200.5	1.0	0.5
250	249.5	0.3	0.1

**Especificación:** El coeficiente de variación de la concentración experimental de los datos de linealidad no debe ser mayor que el 3.0%.

**Dictamen:** Cumple

Tabla 37. Variabilidad interdía del método analítico.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Promedio concentración experimental n=3 ( $\mu\text{M}$ ) Día 1 por la mañana	Promedio concentración experimental n=3 ( $\mu\text{M}$ ) Día 1 por la tarde	Promedio global concentración experimental n=3 ( $\mu\text{M}$ )	$\sigma$	CV (%)
10	9.7	9.8	9.8	0.2	2.0
50	50.3	51.4	50.9	1.0	2.0
100	99.7	97.3	98.5	2.0	2.0
150	150.3	151.6	151.0	1.1	0.7
200	200.5	200.2	200.4	1.1	0.6
250	249.5	249.7	249.6	0.4	0.2

Tabla 18. Variabilidad intradía del método analítico

Concentración (µM)	Promedio concentración experimental n=3 (µM) Día 1 por la mañana	Promedio concentración experimental n=3 (µM) Día 2 por la mañana	Promedio global concentración experimental n=3 (µM)	$\sigma$	CV (%)
10	9.7	9.8	9.7	0.2	1.7
50	50.3	51.5	50.9	1.1	2.1
100	99.7	98.2	98.9	1.3	1.3
150	150.3	151.0	150.7	0.9	0.6
200	200.5	198.5	199.5	1.4	0.7
250	249.5	251.0	250.2	1.1	0.5

**Especificación:** El coeficiente de variación global no debe ser mayor que el 3%.

**Dictamen:** Cumple

#### 7.2.3.3 Exactitud

En la Tabla 19 se muestran los valores de DER, indicativos de la exactitud del método analítico.

Tabla 49. Exactitud del método analítico

Concentración nominal (µM)	Concentración experimental promedio n=3 (µM)	DER %
10	9.7	2.9
50	50.3	0.5
100	99.7	0.3
150	150.3	0.2
200	200.5	0.3
250	249.5	0.2

**Especificación:** El promedio de la concentración experimental de los datos de linealidad no debe variar con respecto a la cantidad nominal en más de 3% en cada punto.

**Dictamen:** Cumple

#### 7.2.3.4 Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

LOD: 5 µM

LOQ: 10 µM

7.2.4 RCB-20

7.2.4.1 Linealidad

Se realizaron las tres curvas de calibración de RCB-20 y se analizaron a través de CLAR. En la Figura 18 se observa el comportamiento lineal que presentan las tres curvas de calibración. En la Tabla 20 se muestran los resultados de los parámetros para linealidad.

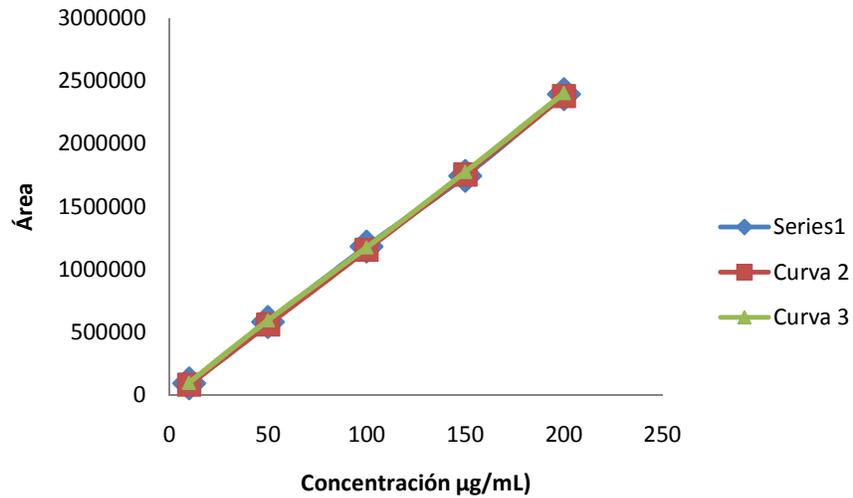


Figura 18. Curvas de calibración de RCB-20.

**Especificación:** Coeficiente de correlación mayor o igual que 0.99; error relativo a la regresión no mayor que el 3.0%

**Dictamen:** Cumple

Tabla 50. Valores de regresión lineal y EER de las curvas de calibración de RCB-20.

Réplica	Pendiente	Ordenada al origen	Coeficiente de correlación $r$	EER %
1	12005,908	-25511,169	0,99979	1.8
2	12071,149	-44508,412	0,99996	0.8
3	12079,389	-22650,522	0,99991	1.1

**Especificación:** Coeficiente de correlación mayor o igual que 0.99; error relativo a la regresión no mayor que el 3.0%

**Dictamen:** Cumple

7.2.4.2 Precisión

En la Tabla 21 se muestran los resultados de repetibilidad del método. En esta parte se presentan también los resultados de la precisión intermedia de este método analítico. En las Tablas 22 Y 23 se muestran los resultados de la variabilidad intradía y la variabilidad interdía respectivamente.

Tabla 61. Repetibilidad del método

Concentración (µM)	Concentración Promedio n=3 (µM)	σ	CV (%)
10	10,1	0,3	2,8
50	50,6	0,5	0,9
100	99,7	0,7	0,7
150	148,5	1,0	0,7
200	201,1	0,4	0,2

**Especificación:** El coeficiente de variación de la concentración experimental de los datos de linealidad no debe ser mayor que el 3.0%.

**Dictamen:** Cumple

Tabla 227. Variabilidad interdía del método analítico

Concentración (µM)	Promedio concentración experimental n=3 (µM) Día 1 por la mañana	Promedio concentración experimental n=3 (µM) Día 1 por la tarde	Promedio global concentración experimental n=3 (µM)	σ	CV (%)
10	10,1	10,1	10,1	0,3	2,5
50	50,6	49,2	49,9	0,9	1,7
100	99,7	101,3	100,5	1,3	1,3
150	148,5	149,3	148,9	2,1	1,4
200	201,1	200,1	200,6	1,2	0,6

**Especificación:** El coeficiente de variación global no debe ser mayor que el 3%.

**Dictamen:** Cumple

Tabla 238. Variabilidad intradía del método analítico

Concentración (µg/mL)	Promedio concentración experimental n=3 (µg/mL) Día 1 por la mañana	Promedio concentración experimental n=3 (µg/mL) Día 2 por la mañana	Promedio global concentración experimental n=3 (µg/mL)	$\sigma$	CV (%)
10	10,1	10,0	10,1	0,2	2,2
50	50,6	50,3	50,0	0,8	1,6
100	99,7	99,8	100,9	1,5	1,4
150	148,5	149,3	147,8	1,2	0,8
200	201,1	200,6	201,2	0,5	0,3

**Especificación:** El coeficiente de variación global no debe ser mayor que el 3%.

**Dictamen:** Cumple

#### 7.2.4.3 Exactitud

En la Tabla 24 se muestran los valores de DER, indicativos de la exactitud del método analítico.

Tabla 24. Exactitud del método analítico

Concentración nominal (µg/mL)	Concentración experimental promedio n=3 (µg/mL)	DER %
10	10,1	0,9
50	50,6	1,2
100	99,7	0,3
150	148,5	1,0
200	201,1	0,6

**Especificación:** El promedio de la concentración experimental de los datos de linealidad no debe variar con respecto a la cantidad nominal en más de 3% en cada punto.

**Dictamen:** Cumple

#### 7.2.4.4 Límite de detección (LOD) y cuantificación (LOQ)

LOD: 5  $\mu\text{M}$

LOQ: 10  $\mu\text{M}$

Todos los métodos son lineales. Los resultados de regresión lineal muestran en todos los casos que la respuesta analítica es directamente proporcional a la concentración en el intervalo de trabajo. El coeficientes de correlación,  $r$ , es la manera de medir la intensidad de la relación que existe de una variable con respecto a la otra. En todos los métodos se obtuvieron valores mayores a 0.99, lo que indica que existe una estrecha relación entre el área de un pico obtenida por CLAR y la concentración.

Por otro lado, el EER, mide la dispersión de los valores observados alrededor de la recta de regresión. En todos los casos se observan valores pequeños, por lo que podemos decir que la ecuación de regresión describe con precisión la relación entre las dos variables.

La variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones así como la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes días y horarios se evaluaron a través del coeficiente de variación, el cual en todos los casos fue menor al 3%, por lo que el método es preciso bajo las condiciones ya mencionadas.

Los valores de desviación estándar relativa fueron menores al 3%, por lo tanto, podemos considerar a los 4 métodos como exactos.

Los límites de detección se encuentran alrededor de 2.5  $\mu\text{M}$  y los límites de cuantificación entre alrededor de 10  $\mu\text{M}$ . En todos los casos, los límites de cuantificación corresponden al primer punto de las curvas de calibración, y de este modo garantizamos que esta concentración, aunque sea la mas baja que se puede cuantificar con los métodos desarrollados, cumple con la precisión y exactitud requeridas.

En el Apéndice 2 se describe detalladamente la manera en que se llevó a cabo cada etapa de la validación, así como los datos experimentales y su tratamiento, además de los cromatogramas de las curvas de calibración.

### 7.3 Complejos de inclusión

Como se mencionó en la sección 6.2 se trabajaron tres distintas técnicas para preparar un complejo de inclusión de RCB-20 con HPBCD. Después se determinó cuál de estas técnicas era la más conveniente para la preparación del complejo.

La Técnica I fue la primera que se utilizó para formar un complejo de inclusión de HPBCD con RCB-20. Esta técnica constituye el método clásico para formar complejos de inclusión, si embargo, al ser el RCB-20 tan insoluble en agua, resultó muy difícil lograr la incorporación del sólido a la solución acuosa conteniendo HPBCD. A pesar de aplicar por ciertos periodos de tiempo agitación muy intensa durante los 7 días, nunca se logró la incorporación del sólido a la solución.

En cuanto a la determinación de la solubilidad intrínseca en agua, el valor obtenido fue de 0,00428 mM (Ver Apéndice 3).

Se realizó el diagrama de solubilidad de fases por triplicado para el RCB-20 y la HPCD en agua (Apéndice 3). El resultado promedio se muestra en la Tabla 25 y la Figura 19.

Tabla 95. Resultados del estudio de solubilidad de fases de HPBCD y RCB-20 en agua.

Concentración HPBCD (Mm)	Concentración RCB-20 (mM)
1	0,0550
1,5	0,0803
2	0,1218
2,5	0,1474
3	0,1936

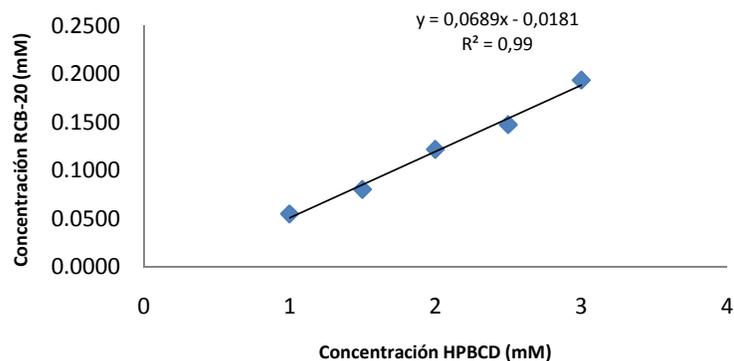


Figura 19. Estudio de solubilidad de fases de HPBCD y RCB-20 en agua.

Con los datos de la gráfica que se presenta en la Figura, se puede calcular la constante de estabilidad del complejo (Ecuación 8) [22].

$$k = \frac{m}{S_o(1-m)} \quad \text{Ecuación (8)}$$

En donde  $m$  es la pendiente de la recta y  $S_o$  es la solubilidad intrínseca.

De esta manera se obtiene una  $K_{1:1} = 17.29 \text{ mM}^{-1} = 0.017 \text{ M}^{-1}$

Como se puede observar, el diagrama de solubilidad de fases es del tipo  $A_L$ , lo que quiere decir se está formando un complejo en proporción 1:1 soluble en agua. Sin embargo, la constante de estabilidad es muy pequeña.

El rango de las constantes de estabilidad puede variar de 0 a 100 000 [45]. El valor determinado es muy pequeño, lo que indica que no existe una asociación estrecha entre el RCB-20 y la HPBCD. Es muy probable que esto se deba a lo mencionado anteriormente sobre el hecho de que al ser tan insoluble el compuesto, ni siquiera se pudo incorporar a la solución y en el séptimo día de agitación la mayor parte del sólido permanencia en la superficie del líquido. Con los resultados anteriores se procedió a buscar otras estrategias que nos permitieran incrementar la estabilidad del complejo formado y lograr la incorporación del compuesto a la solución acuosa de HPBCD.

Como se mencionó en la Sección 2.4.3 en algunos casos se ha hecho uso de cosolventes para poder solucionar problemas como el que presenta RCB-20. También se indicó que los resultados que se obtienen con el uso de estas sustancias es controversial; si embargo, con lo reportado por Yalkowski [30] se decidió utilizar etanol para la resolución de nuestro problema. Este autor, reporta el estudio de la influencia de concentraciones diferentes de etanol en la formación del complejo de inclusión con fluasterona. Partiendo de esta información, en nuestro trabajo se hizo la preparación del complejo de inclusión con dos concentraciones diferentes de etanol. En la Técnica II se utilizó un 25% de etanol para disolver el RCB-20 y un 75% de agua para disolver la HPBCD; en la Técnica III se usó un 75% de etanol y un 25% de agua (ver Sección 6.2). Posteriormente, se realizó un análisis de DSC para caracterizar los complejos de inclusión formados bajo las condiciones antes mencionadas.

Las curvas de DSC obtenidas para el RCB-20, la HPBCD, la mezcla física y los complejos de inclusión se presentan en la Figura 20.

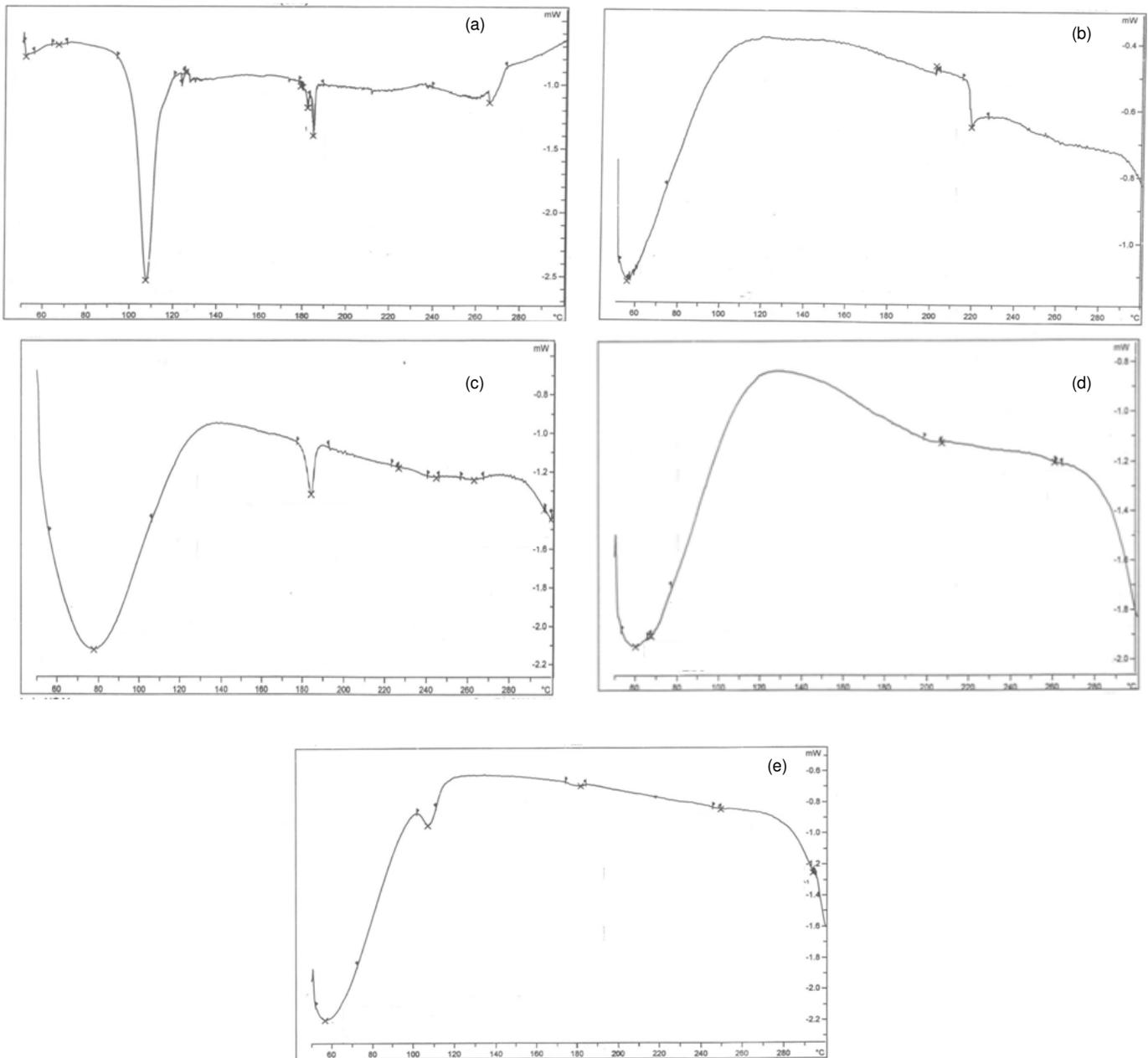


Figura 2010. Curvas obtenidas por DSC.

a) RCB-20; b)HPBCD; (c), Complejo de inclusión, Técnica II; (d)Complejo de inclusión, Técnica III; (e) Mezcla física.

La amplia endoterma observada para HPBCD, entre 50°C y 80°C, es la que corresponde a la evaporación de agua. El segundo pico corresponde a la endoterma de fusión de la CD (218°C). Para RCB-20 se presentó un endoterma de fusión a 107° y un segundo endoterma a 184 °C que corresponde a la descomposición del compuesto. En el termograma del complejo de inclusión preparado con la Técnica II se conservan dos picos endotérmicos, el primero corresponde al pico característicos de la CD que representan la pérdida de agua y el segundo representa la endodterma de descomposición de RCB-20.

En contraste, el termograma que corresponde al complejo de inclusión formado por la Técnica III, se observa solo un pico ancho entre 50°C y 80°C, que corresponde a la evaporación el agua. La ausencia de la endoterma de fusión del RCB-20 sugiere la inclusión de éste en la cavidad de la HPCD.

Finalmente, en la mezcla física, se alcanza a observar el patrón que el RCB-20 presentó como compuesto libre, con las endotermas de 107°C y la endoterma de descomposición que se alcanza a ver ligeramente. Esto sugiere la presencia de los dos sólidos separados.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el utilizar un 75% de etanol para la preparación del complejo, genera los mejores resultados.

Basándose en los resultados anteriores, se utilizó la Técnica III para preparar mayor cantidad del complejo RCB-20-CD-CI y proceder a realizar el diagrama de solubilidad de fases, pruebas de permeación y de actividad biológica. Adicionalmente, se realizaron estudios de difracción de rayos-X de polvos y de espectroscopia IR para confirmar nuevamente la presencia del complejo formado.

Se realizó el estudio de solubilidad de fases de RCB-20-CD-CI. Para ello, primeramente se calculó la solubilidad intrínseca del RCB-20 como se indica en la Sección 6.2.1, disolviendo el compuesto en una mezcla etanol-agua 75:25.

El Valor de solubilidad intrínseca obtenido fue de 0,00933 mM (Ver Apéndice 3).

Se realizó el diagrama de solubilidad de fases por triplicado para el RCB-20 y la HPCD en mezcla etanol-agua 75:25 (Apéndice 3). Los resultados se muestran en la Tabla 26 y en la Figura 21.

Tabla 26. Resultados del estudio de solubilidad de fases de HPBCD y RCB-20 en metanol-agua.

Concentración HPBCD (mM)	Concentración RCB-20 (mM)
1	0,2118
1,5	0,3809
2	0,5433
2,5	0,6412
3	0,8062

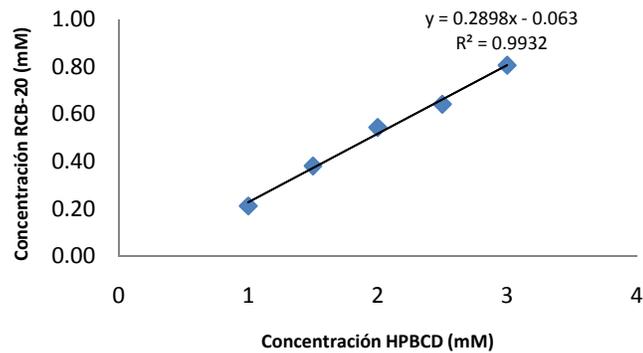


Figura 11. Estudio de solubilidad de fases de HPBCD y RCB-20 en metanol-agua.

La constante de estabilidad (Ecuación 8) calculada es  $K_{1:1} = 43.88 \text{ mM}$ .

El comportamiento del diagrama se mantiene por lo que sigue siendo  $A_L$ , que indica que se forma un complejo de inclusión soluble.

Es evidente que la solubilidad aumenta cuando se utiliza etanol. En la gráfica se observa un aumento en la pendiente de casi 5 veces mayor a la pendiente de RCB-20 en agua. Por consiguiente la constante de estabilidad es mayor, lo que indica que bajo estas condiciones la formación del complejo está más favorecido y además es más estable en solución.

El complejo RCB-20-CD-CI fue sometido a un análisis de difracción de rayos  $-X$  de polvos (Figura 22).

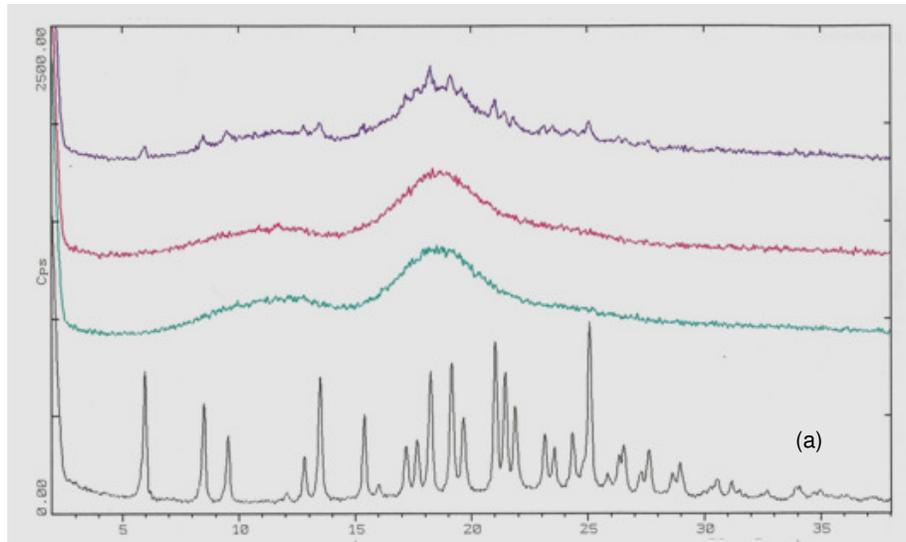


Figura 12. Difracción de rayos-X de polvos  
 (a) RCB-20; (b) HPBCD; (c) RCB-20-CD-CI; (d) Mezcla física.

En contraste con el carácter amorfo de la de la HPBCD, el RCB-20 es un sólido cristalino. El comportamiento que se observa en la mezcla física confirma que se tienen a los dos sólidos aislados ya que se distinguen los picos del sólido cristalino además del halo amorfo de la HPBCD, por lo tanto no se puede decir que exista una interacción entre ellos. En cuanto al complejo de inclusión se observa una pérdida total del patrón de difracción de RCB-20 libre ya que se presenta una estructura amorfa que le confiere la HPBCD y la ausencia de partículas cristalinas de RCB-20, lo que indica que existe interacción entre la HPBCD y nuestro compuesto experimental.

También se realizó un análisis espectroscópico de IR. Los resultados se presentan en la Figura 23.

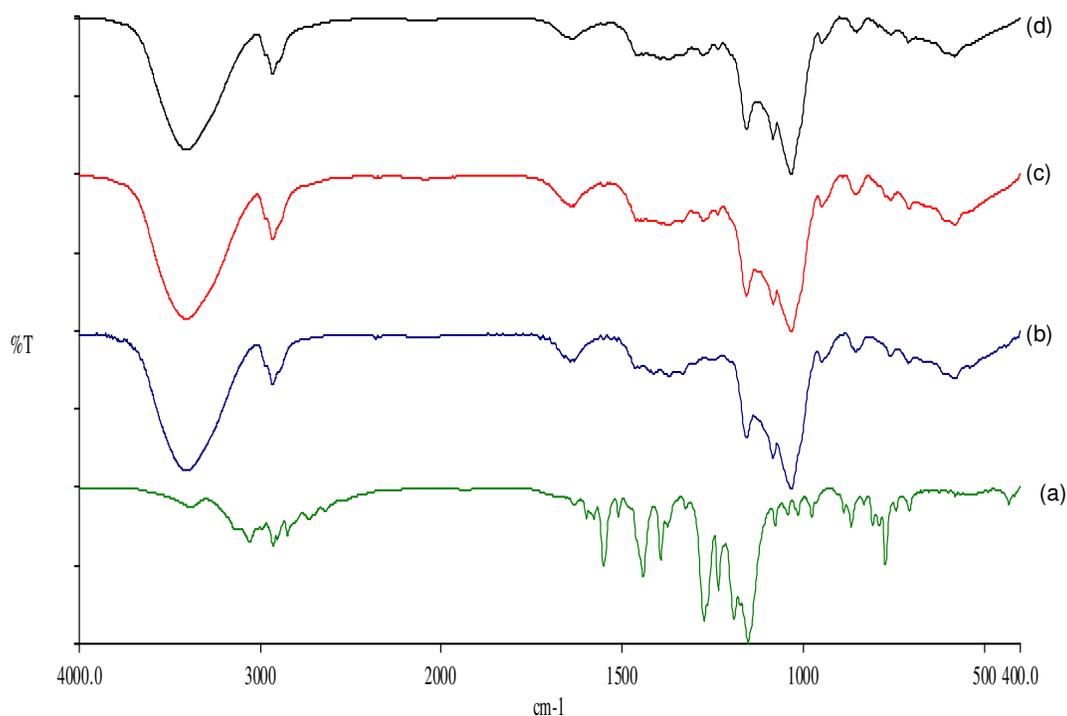


Figura 13. Espectros IR  
(a) RCB-20; (b) HPBCD; (c) RCB-20-CD-Cl; (d) Mezcla física

El espectro del RCB-20 muestra las bandas características de los compuestos aromáticos por debajo de  $1000\text{ cm}^{-1}$ , resaltando un pico no muy intenso a aproximadamente  $770\text{ cm}^{-1}$  que indica la presencia de  $\text{CF}_3$ . En  $1150\text{ cm}^{-1}$  se puede apreciar la señal que corresponde al estiramiento del C-O aromático. Le sigue otra señal intensa a  $1270\text{ cm}^{-1}$  que representa el enlace C-N. De  $1400$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$  se tiene el patrón de un compuesto aromático al igual que  $3050\text{ cm}^{-1}$ . Finalmente en  $1385\text{ cm}^{-1}$  se tiene la señal correspondiente al grupo N-H del imidazol. El espectro de IR de la HPBCD muestra la banda característica de los grupos OH entre  $3100$  y  $3800\text{ cm}^{-1}$ . De  $1000$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$  se observan las vibraciones características de los enlaces C-O.

Al observar los espectros IR se encuentra que tanto el espectro de la mezcla física como el del complejo de inclusión son muy similares. En este sentido, la contribución fuerte de los grupos OH de la HPBCD está enmascarando las señales del RCB-20 en la mezcla física en donde no se observa el patrón característico del bencimidazol. Lo mismo sucede en el

espectro del complejo de inclusión aunque por los resultados anteriores, el patrón que aparece aquí es el esperado puesto que el espectro está representando al de la HPBCD.

Con todo lo anterior podemos decir que bajo las condiciones experimentales propuestas, se forma un complejo de inclusión RCB-20-HPBCD.

#### 7.4 Ensayos de permeabilidad

A continuación se presentan los valores promedio de Pe obtenidos para cada compuesto.

##### 7.4.1 Cimetidina

No se encontró concentración alguna de la cimetidina en el aceptor (Tabla 27, Figura 24).

Tabla 107. Resultados de PAMPA para cimetidina

<b>Compartimento</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
Donador	93,10
Aceptor	0,00
Equilibrio	38,20

Por lo tanto, Pe ( $\times 10^{-6}$  cm/s) de cimetidina: 0.0

$$\% \text{Flujo} = 0.0$$

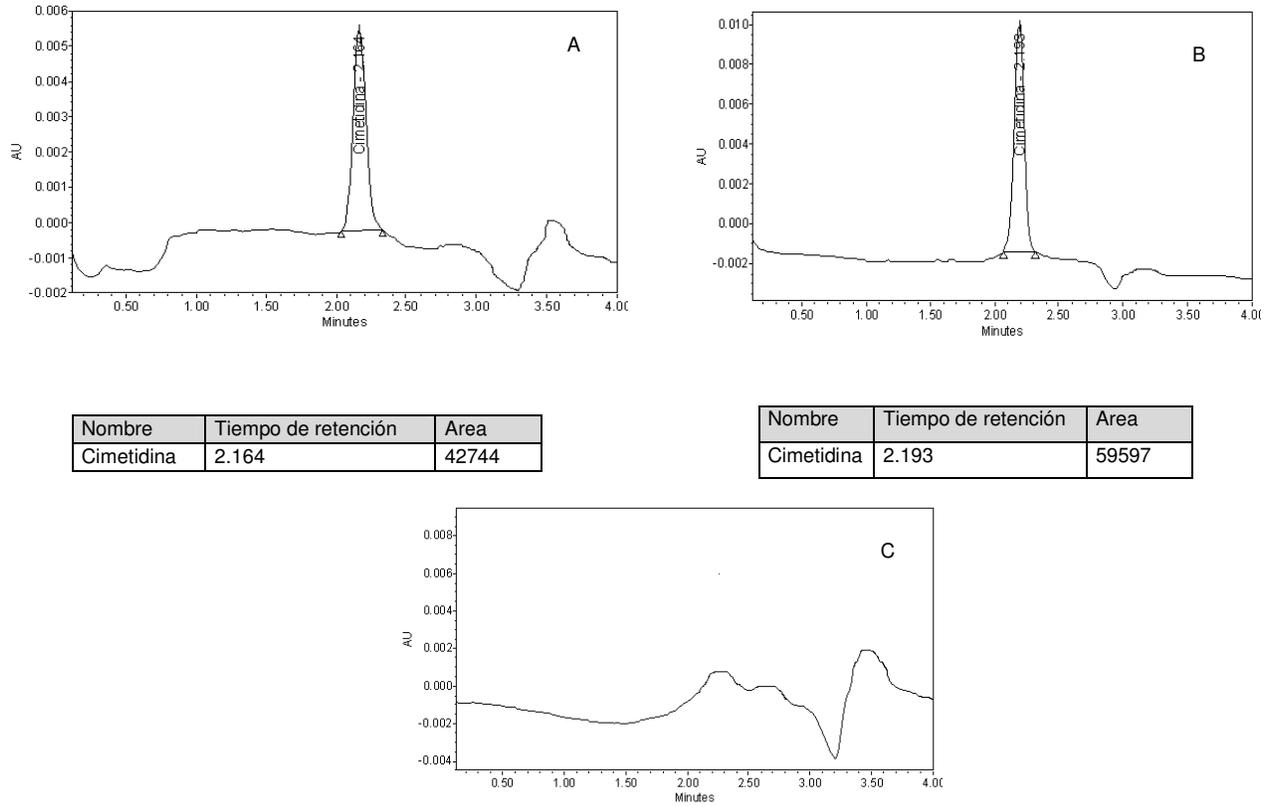


Figura 14. PAMPA. Cromatogramas de cimetidina.

Muestras recolectadas de la solución al equilibrio (A), del pozo donador (B) y del pozo aceptor (C).

#### 7.4.2 Propranolol

En la Tabla 28 y en la Figura 25 se muestran las concentraciones registradas al analizar el aceptor, el donador y la solución al equilibrio.

Tabla 118. Resultados de PAMPA para propranolol

Compartimento	Concentración (µM)
Donador	62,85
Aceptor	28,69
Equilibrio	36,55

Con los datos anteriores y utilizando la ecuación se obtiene que

Log Pe: -4.78

Pe (x 10<sup>-6</sup> cm/s): 16.72

%Flujo:78.50

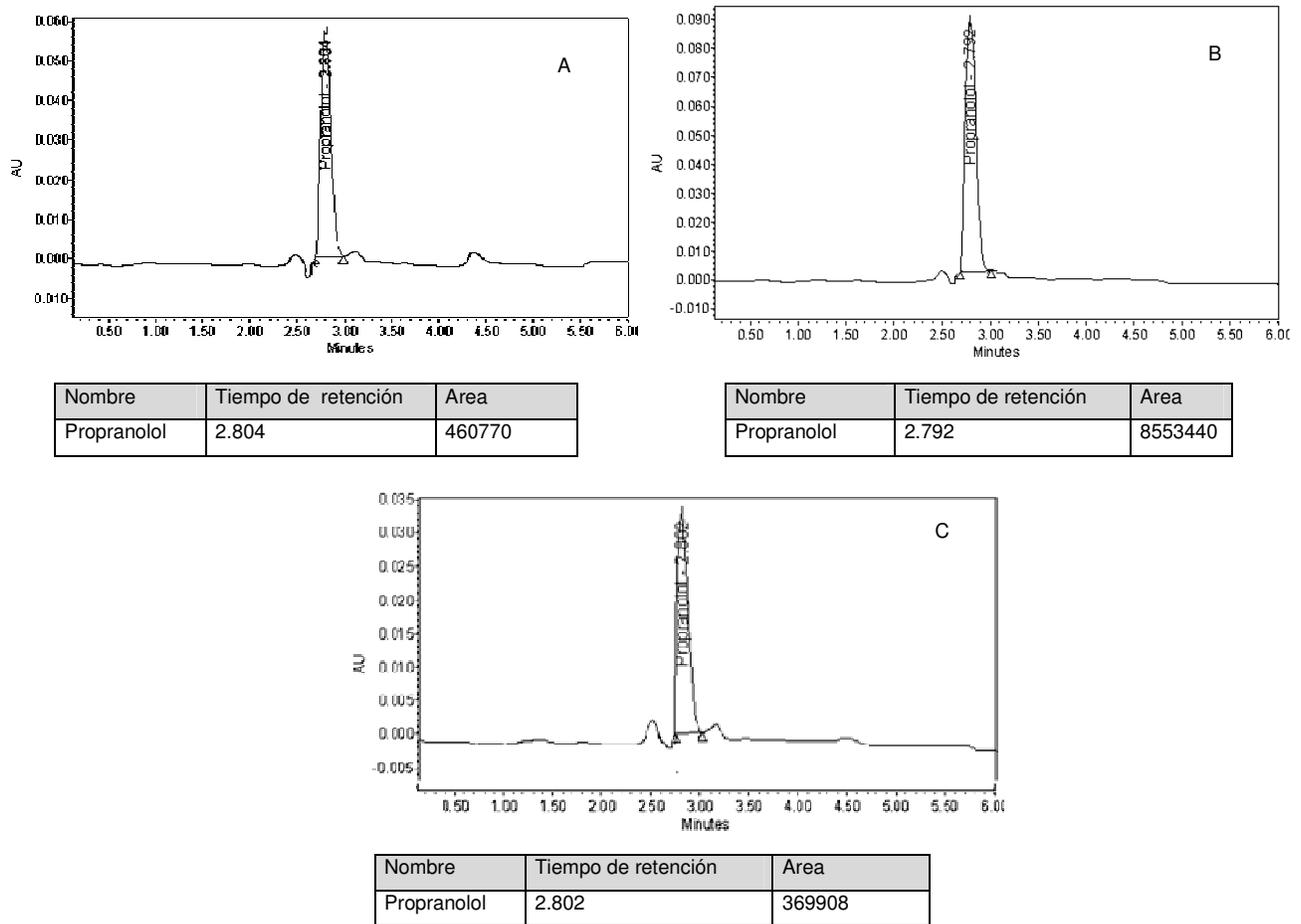


Figura 15. PAMPA. Cromatogramas de propranolol.

Muestras recolectadas de la solución al equilibrio (A), del pozo donador (B) y del pozo aceptor (C).

#### 7.4.3 Verapamil

En la Tabla 29 y en la Figura 26 se muestran las concentraciones registradas al analizar el aceptor, el donador y la solución al equilibrio.

Tabla 129. Resultados de PAMPA para verapamil

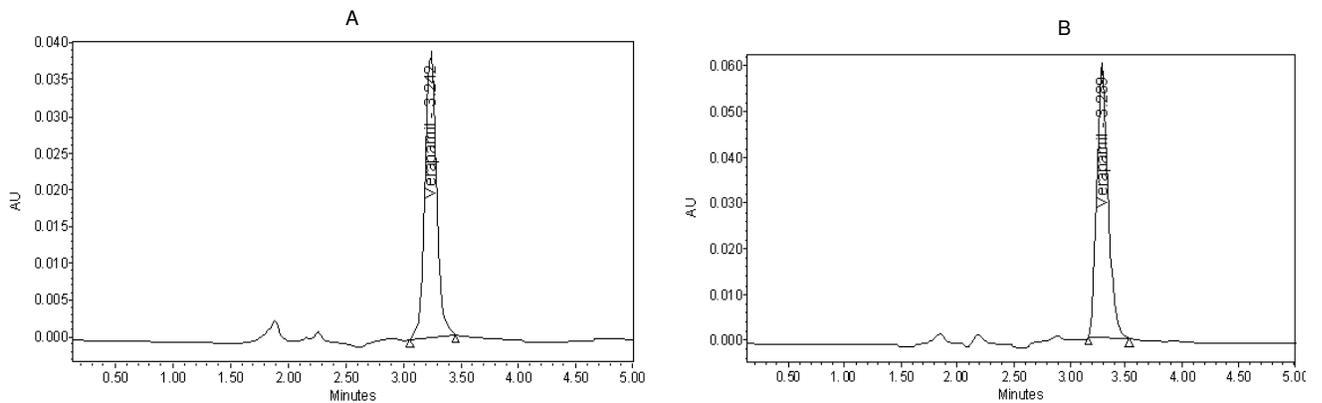
Compartimento	Concentración ( $\mu\text{M}$ )
Donador	53,58
Aceptor	36,10
Equilibrio	38,69

Con los datos anteriores y utilizando la ecuación se obtiene que

Log Pe: -4.53

Pe ( $\times 10^{-6}$  cm/s): 29.42

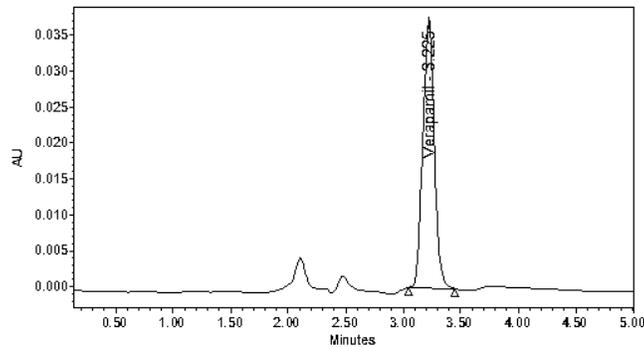
%Flujo: 93.30



Nombre	Tiempo de retención	Area
Verapamil	3.242	362901

Nombre	Tiempo de retención	Area
Verapamil	3.289	498935

C



Nombre	Tiempo de retención	Area
Verapamil	3.225	337890

Figura 16. PAMPA. Cromatogramas de verapamil  
Muestras recolectadas de la solución al equilibrio (A), del pozo donador (B) y del pozo aceptor (C).

7.4.4 RCB-20

En la Tabla 30 y en la Figura 27 se muestran las concentraciones registradas al analizar el aceptor, el donador y la solución al equilibrio.

Tabla 13. Resultados de PAMPA para RCB-20

Compartimento	Concentración ( $\mu\text{M}$ )
Donador	86,39
Aceptor	11,91
Equilibrio	36,81

Con los datos anteriores y utilizando la ecuación se obtiene que

$$\text{Log Pe: } -5.37$$

$$\text{Pe (x } 10^{-6} \text{ cm/s): } 4.25$$

$$\% \text{Flujo: } 32.35$$

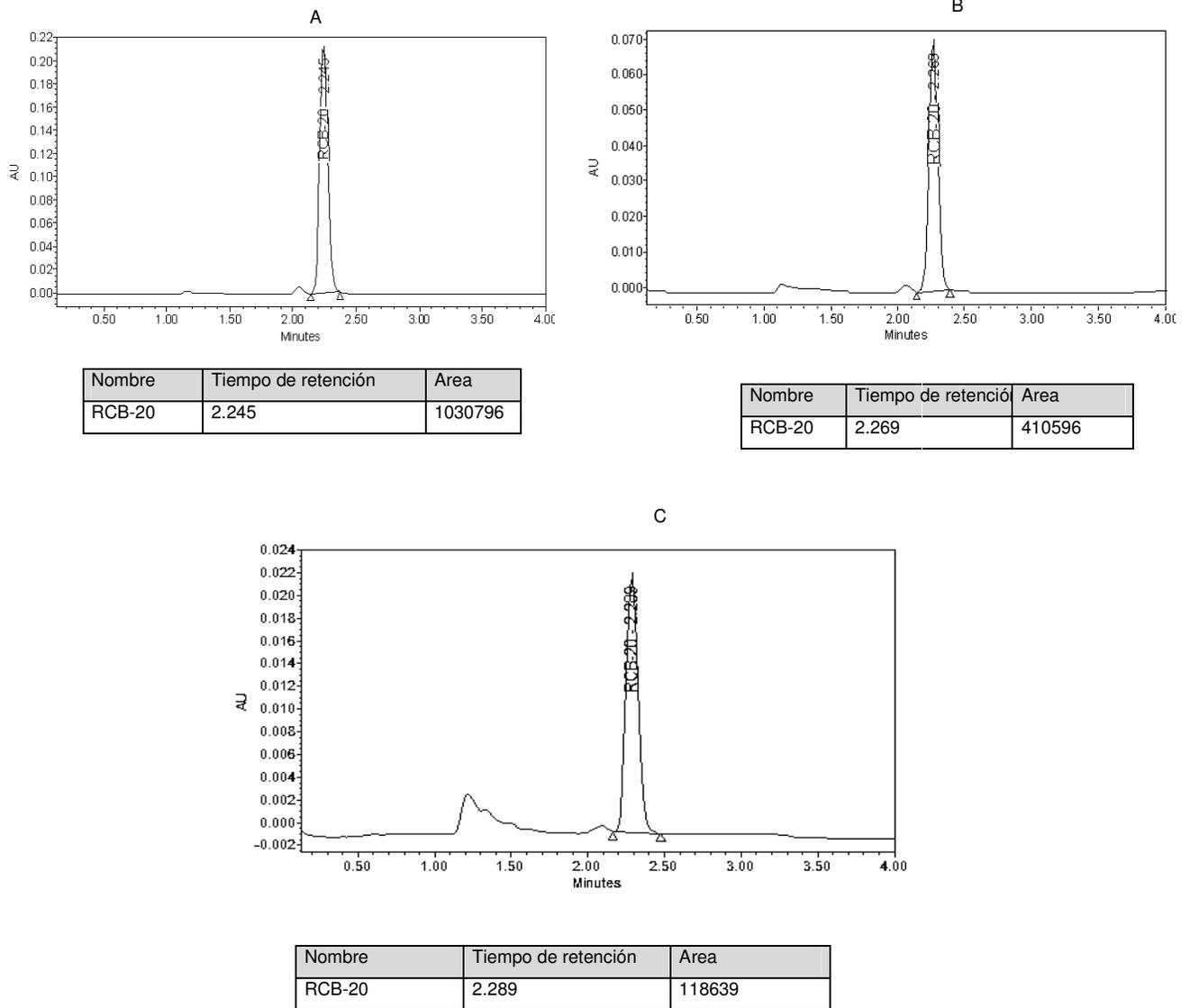


Figura 17. PAMPA. Cromatogramas de RCB-20  
Muestras recolectadas de la solución al equilibrio (A), del pozo donador (B) y del pozo aceptor (C).

#### 7.4.5 RCB-20-CD-CI

En la Tabla 31 y en la Figura 28 se muestran las concentraciones registradas al analizar el aceptor, el donador y la solución al equilibrio.

Tabla 31. Resultados de PAMPA para RCB-20-CD-CI

Compartimento	Concentración (μM)
Donador	60,94
Aceptor	15,30
Equilibrio	36,47

Con los datos anteriores y utilizando la ecuación se obtiene que

Log Pe: -5.23

Pe (x 10<sup>-6</sup> cm/s): 5.92

%Flujo: 41.95

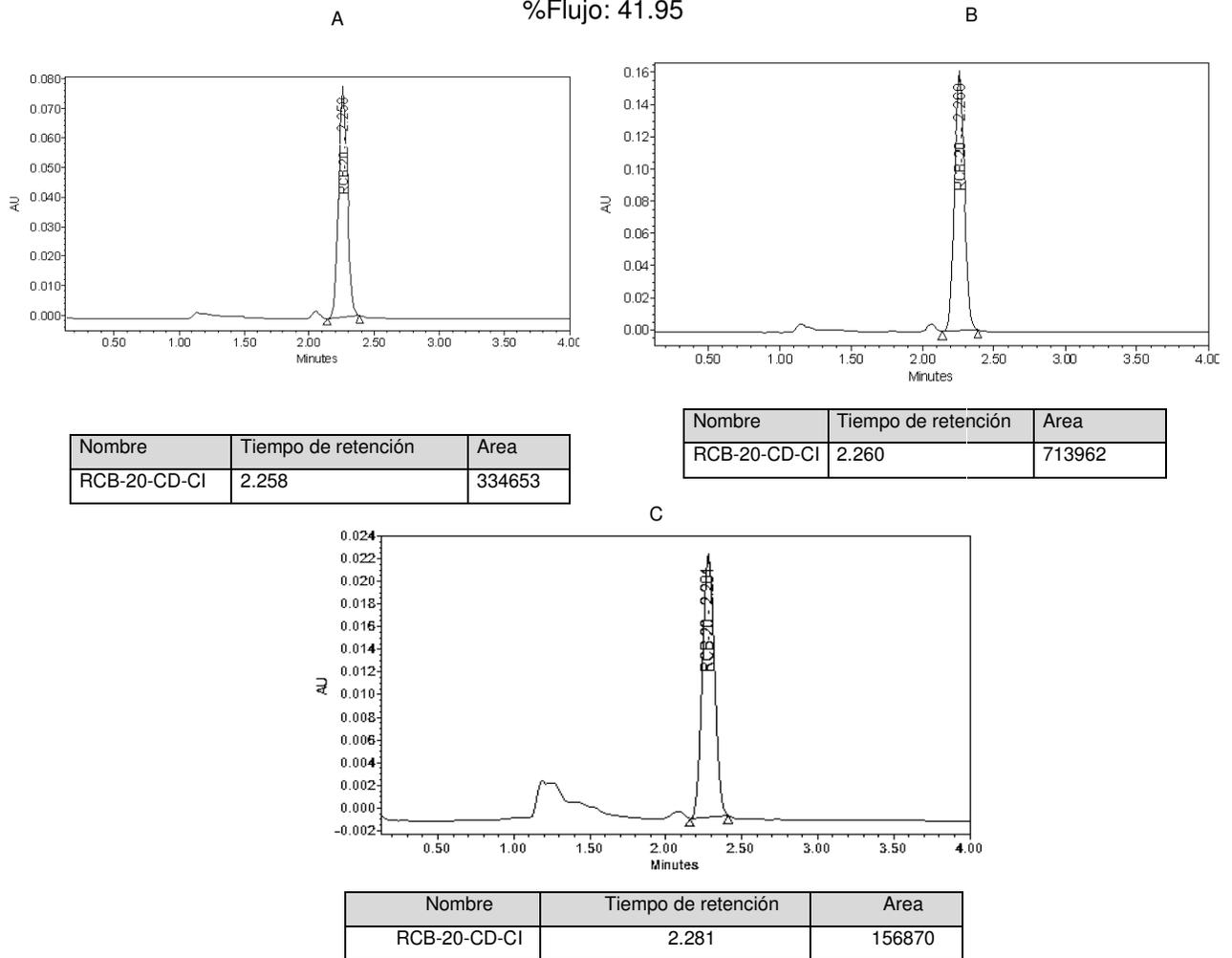


Figura 18. PAMPA. Cromatogramas de RCB-20-CD-CI

Muestras recolectadas de la solución al equilibrio (A), del pozo donador (B) y del pozo aceptor (C).

Con el objetivo de verificar la integridad de las membranas y garantizar que los coeficientes de permeabilidad obtenidos no estuvieran afectados por la ruptura de la capa

lipídica, al término de los experimentos se realizó la prueba cualitativa con el colorante Lucifer Yellow (Sección 6.3.1). Debido a que este compuesto no tiene la capacidad de ser transportado a través de una membrana lipídica, su presencia en los pozos aceptores, estaría indicando una ruptura de la membrana.

No se observó la presencia de color amarillo (indicativo del paso del Lucifer Yellow a través de la membrana) en ningún pozo aceptor, con lo cual quedó comprobada la integridad de la membrana. Esto significa que los resultados de los ensayos se deben única y exclusivamente a la capacidad de los compuestos para ser trasladados a través de una membrana lipídica.

Tras la realización de los ensayos los coeficientes de permeabilidad de los controles son semejantes a los reportados en la literatura. La cimetidina, un compuesto de nula o baja permeación, no presentó traslado a través de la membrana. Para el verapamil se obtuvo un  $\log P_e$  de  $-4.53$  y para propranolol el valor de  $\log P_e$  fue de  $-4.78$ . Estos valores concuerdan con los encontrados por Faller [38] quien reporta valores de  $\log P_e$  de  $-4.40$  y  $-4.70$  para verapamil y propranolol respectivamente. En general, los resultados anteriores son similares no solamente a los reportados por Faller, si no también a los reportados por otros grupos de investigación que estudian el transporte de fármacos a través de membranas artificiales [34-38].

Kansy [36], quien dio a conocer la primera publicación de PAMPA, estableció una clasificación de la permeación y absorción de un compuesto en función del % de flujo: compuestos con un % de flujo de 35–100, serán considerados de alta permeabilidad y bien absorbidos; compuestos con un % de flujo de 5–35 serán los de permeación intermedia y mediana absorción; compuestos con % de flujo  $< 5$  serán considerados de baja permeación y pobre absorción. De acuerdo a esta clasificación, los controles quedan clasificados correctamente en este sistema.

De acuerdo a esta escala, el compuesto experimental RCB-20 presenta un coeficiente de permeabilidad mas bajo que el propranolol y que el verapamil, pero presenta una capacidad de transporte del 32%, por lo tanto, queda clasificado como un compuesto de permeación intermedia. Estos resultados sugieren que el compuesto tendrá un grado medio de transporte utilizando la ruta transcelular y que no presentará problemas importantes al atravesar la membrana, por lo que el paso limitante para su absorción será la solubilidad. Además, es poco probable que el compuesto tenga un mecanismo de transporte vía paracelular debido a que su peso molecular es mayor a 200.

El RCB-20 es una base débil, con dos  $pK_a$ 's, el primero de 2.55 y el segundo de 8.82 (calculados por el programa ACD Lab 8.0). En el pH al cual se realizó el ensayo, el compuesto estará parcialmente no ionizado. De acuerdo a la teoría de partición, solo la forma no ionizada es la que penetra la membrana, por lo que se esperaría que a pH

mayores aumentara el transporte a través de membrana. Sin embargo, las determinaciones se hicieron a pH intestinal de 6.5, pH del sitio en donde se llevará a cabo la absorción.

Se ha reportado que la difusión pasiva es el principal mecanismo de entrada de los derivados del carbendazim en los helmintos, especialmente cestodos, nematodos y trematodos. Sin embargo, el gradiente de concentración, la liposolubilidad, las características del medio de incubación y la composición de la superficie externa del helminto son críticos para la penetración del compuesto.

Los nematodos excretan algunos ácidos grasos volátiles y ácidos orgánicos no volátiles como producto del metabolismo de carbohidratos vía transcelular en cantidad suficiente como para formar un microclima ácido (pH de 5 aproximadamente) [43]. A este pH el compuesto estará predominantemente neutro, por lo que in vitro presenta una buena actividad ya que no tendrá mucho problema para atravesar la membrana lipídica.

Al ser el RCB-20 un compuesto totalmente insoluble en agua, resultaba muy difícil realizar el ensayo de permeabilidad ya que los resultados no eran reproducibles por no encontrarse el compuesto disuelto en la solución amortiguadora de fosfatos. Así que se decidió llevar a cabo el ensayo preparando tanto la solución stock, como la primera y segunda dilución utilizando acetonitrilo al 100% (ver Apéndice 2); la solución final de 100  $\mu$ M tenía un 35% de disolvente orgánico. En este caso, PAMPA representa una gran ventaja con respecto a la determinación del coeficiente de permeabilidad con cultivos celulares ya que a través de este ensayo se pudo determinar la permeación con facilidad y sin pensar en la toxicidad que el disolvente orgánico pudiera tener.

Resulta muy interesante observar que por medio de la técnica PAMPA se pudo observar el efecto de las ciclodextrinas sobre la permeación del compuesto experimental. A simple vista se observa un incremento del coeficiente de permeabilidad cuando el compuesto se encuentra bajo la forma de complejo de inclusión. A través de una prueba estadística (ver Apéndice 4) se pudo saber que sí existe una diferencia significativa entre los coeficientes de permeabilidad del RCB-20 y el RCB-20-CD-CI.

El uso de las ciclodextrinas representan una ventaja en la manipulación del compuesto ya que en este caso, aunque la solución stock se preparó con un 75% de etanol, la solución 100  $\mu$ M utilizada para el ensayo ya solo tenía 0.26 % de este disolvente (además de que el etanol está aprobado para su uso en sistemas de preformulación).

Se han reportado algunos trabajos en donde se demuestra que las ciclodextrinas modifican la permeación de un compuesto a través de membranas, aunque el mecanismo no ha sido totalmente comprendido [44-46]. Sin embargo, una razón para explicar lo anterior puede ser que las ciclodextrinas alteran la fluidez de la membrana con lo cual, esta ya no constituiría una barrera para el paso de compuestos [47]. Las ciclodextrinas

tienen la capacidad de extraer y formar complejos con los componentes lipídicos de la membrana, por ejemplo el colesterol. También pueden formar complejos con alcanos de cadena larga en interfases acuosas, como el hexadecano utilizado en el sistema PAMPA, razón por la cual se presenta un aumento en el traslado de RCB-20-CD-CI a través de la membrana lipídica.

Por otro lado, no se debe olvidar la importancia de la UWL como etapa limitante para compuestos de media y alta permeación. En el ensayo PAMPA reportado por Faller [39], el grosor de la UWL en el método que él propone, es de 300  $\mu\text{m}$  (que es la técnica que se siguió en este trabajo). Loftsson y colaboradores [48] reportan que cuando la UWL es mayor a 100  $\mu\text{m}$ , la permeación de un compuesto aumenta cuando se encuentra en forma de complejo con las CD. Esto puede estar pasando en este caso, ya que al estar utilizando una CD hidrofílica, como lo es la HPBCD, esta funciona como un acarreador del compuesto a través de la UWL, entonces el compuesto puede llegar sin problemas a la membrana lipídica e iniciar el proceso de transporte, y por lo tanto, se observa un aumento en el coeficiente de permeabilidad.

## 7.5 Pruebas Biológicas

Buscando reducir la dosis sin que se modificara la eficacia, se administraron 11 mg/kg. En la Tabla 32 se muestran los resultados correspondientes a dosis de 11 mg/kg de albendazol y al equivalente a esta dosis de RCB-20-CD-CI. A esta dosis se presentó un % de reducción menor que cuando se administran 50 y 75 mg/kg, sin embargo, aunque la reducción es menor, es evidente que hubo un incremento en la actividad biológica del complejo de inclusión con respecto a ABZ en el ensayo biológico de *T. spiralis* en la fase adulto ya que se observa que el % de reducción es 1.5 veces mayor cuando se administra el complejo de inclusión que cuando se administra el ABZ, Estos resultados son congruentes si se considera que el complejo de inclusión resultó ser más soluble en agua además de que, de acuerdo a los ensayos PAMPA, se encontró un aumento en la capacidad de transporte a través de membranas lipídicas.

Tabla 314. Porcentaje de reducción de *T. spiralis* en fase adulto y larva muscular en ratones infectados.

Compuesto	Adulto	Larva muscular
	11 mg/kg	11 mg/kg
RCB-20-CD-CI	35	25
ABZ	23	43
HPBCD	0	0
Control	0	0

Esto no sucede en larva muscular, precisamente el estadio del parásito mas difícil de atacar ya que nuestro complejo de inclusión presentó una menor actividad con respecto al ABZ, a pesar de que la solubilidad y permeabilidad de este complejo son mayores.

La idea de evaluar la actividad de un complejo de inclusión de RCB-20, esperando un incremento en esta, se debe a que los complejos de inclusión con CD pueden modificar la biodisponibilidad del compuesto debido a que la CD está funcionando como un sistema acarreador que permite que llegue más cantidad del compuesto al sitio de absorción [45]. Esto se comprueba al observar que la actividad biológica se incrementó cuando se trata de eliminar al parásito en etapa adulta en el intestino. Sin embargo, aunque hubo más compuesto disponible para absorberse, debieron jugar un papel importante otros factores que impidieran su llegada a músculo. Es posible que, al tener una constante de asociación baja, hubieran otras moléculas en el sitio de absorción que alteraran el equilibrio de complejación por estar compitiendo, en cuanto a afinidad, con la CD. Por otro lado, valdría la pena estudiar otros factores como unión a proteínas o metabolismo que pudieran afectar la llegada del compuesto al blanco.

Filename: A7  
Directory: C:\Users\HP Pavilion dv6500\Desktop\DOC  
Template: C:\Users\HP Pavilion  
dv6500\AppData\Roaming\Microsoft\Templates\Normal.dotm  
Title:  
Subject:  
Author: WinuE  
Keywords:  
Comments:  
Creation Date: 26/06/2009 02:37:00 p.m.  
Change Number: 4  
Last Saved On: 26/06/2009 02:53:00 p.m.  
Last Saved By: HP Pavilion dv6500  
Total Editing Time: 11 Minutes  
Last Printed On: 26/06/2009 06:38:00 p.m.  
As of Last Complete Printing  
Number of Pages: 36  
Number of Words: 6,254 (approx.)  
Number of Characters: 34,399 (approx.)

## 8 CONCLUSIONES

- Se desarrollaron, implementaron y validaron los métodos analíticos por CLAR para la cuantificación de los compuesto control para los ensayos de permeabilidad así como para el compuesto experimental RCB-20.
- Se prepararon complejos de inclusión de RCB-20 con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a través de diferentes métodos. Se encontró que, debido a las características de RCB-20, la utilización de un cosolvente como el etanol, favoreció la formación, estabilidad y solubilidad del complejo de inclusión.
- La técnica PAMPA fue de gran utilidad para determinar la permeación del RCB-20. En este ensayo se encontró que el compuesto en forma libre presenta una permeación de nivel medio.
- Cuando se evaluó el transporte a través de membranas lipídicas del complejo de inclusión, se encontró un aumento significativo en la permeación con respecto al RCB-20 en su forma libre.
- La modificación de la solubilidad y de la permeación del RCB-20 dio como resultado que la actividad biológica fuera mayor que la del albendazol en los estudios contra *T. spiralis* en la fase intestinal.
- No se obtuvieron los mismos resultados para la fase larvaria del parásito, en donde la actividad fue menor que la del albendazol, por lo que el sistema de preformulación de nuestro compuesto no es el más adecuado para que el compuesto ejerza su actividad en el tejido muscular.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Mehlhorn, H. Encyclopedia of Parasitology. Ed. Springer, Third Edition, **2008**, New York.
- [2] Guiliano, D.; Oksov, Y.; Lustigman, S.; Gounaris, K.; Selkirk, M. Characterisation of novel protein families secreted by muscle stage larvae of *Trichinella spiralis* *International Journal for Parasitology* **2009**, 39, 515-524.
- [3] Tay, J.; Lara, A.; Velasco, C.; Gutiérrez, M. Parasitología Médica. Méndez Editores, México. 6a Edición 1996.
- [4] <http://www.who.int/en/>
- [5] [http://www.who.int/zoonoses/diseases/foodborne\\_zoonoses/en/](http://www.who.int/zoonoses/diseases/foodborne_zoonoses/en/)
- [6] Centers for Diseases Control: Página web: [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)
- [7] Pozio, E.; Murrell, K. Systematics and Epidemiology of *Trichinella*. *Advances in Parasitology* **2006**, 63, 367-43.
- [8] Gajadhar, A.; Pozio, E.; Gamble, H.; Nöckler, K.; Maddox-Hyttel, C.; Forbes, L.; Vallée, I.; Rossi, P.; Marinculic, A.; Boireau, P. *Trichinella* diagnostics and control: Mandatory and best practices for ensuring food safety *Veterinary Parasitology* **2009**, 159, 197-205.
- [9] Sharma, S. Design new drugs for helminthic diseases: Lead optimization in benzimidazoles. *Advances in Drug Research* 1994, 25, 105-163.
- [10] Jung, H.; Medina, L.; García, L.; Fuentes, I.; Moreno, R. Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolite albendazole sulfoxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **1998**, 50, 43-48.
- [11] Navarrete Vázquez G. Diseño, síntesis y actividad antiparasitaria de derivados del 2-(trifluorometil)bencimidazol. Tesis doctoral. Facultad de Química, UNAM, México D.F. 2004.
- [12] Sharma, S. Approaches to design and synthesis of antiparasitic drugs. *Pharmacochemistry Library*, Vol. 25, Elsevier Science, Holanda, 1997.
- [13] Liu, Rong. Water-Insoluble Drug Formulation. 2nd edition. Ed. CRC Press. USA, 2008.
- [14] Touitou, E.; Barry, B. Enhancement in Drug Delivery. 1st edition. Ed. CRC Press. USA, 2007.
- [15] Dodziuk. Cyclodextrins and their complexes. 1st edition. Ed. Wiley-VCH. Germany, 2006.
- [16] Loftsson, T.; Hreinsdóttir, D.; Másson, M. Evaluation of cyclodextrin solubilization of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **2005**, 302, 18-28.
- [17] Saenger, G.; Steiner, T.; Kearley, R.; Lechner, E. Dynamics of hydrogen bonding disorder in  $\beta$ -cyclodextrin undecahydrate. *Physica B: Condensed Matter* **1989**, 156, 336-338
- [18] Zhengyu, J.; Chao, Y.; Xuehong, L. Evaluation of complex forming ability of hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrins. *Food Chemistry* **2008**, 106, 50-55.
- [19] Loftsson, T.; Matthíasson, K.; Másson, M. The effects of organic salts on the cyclodextrin solubilization of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* **2003**, 262, 101-107.
- [20] Pitha, J.; Hoshino, T. Effects of ethanol on formation of inclusion complexes of hydroxypropylcyclodextrins with testosterone or with methyl orange. *International Journal of Pharmaceutics* **1992**, 80, 243-251.

- [21] Yalkowsky, S.; Zhao, L.; Li, P. Combined effects of cosolvent and cyclodextrin on solubilization of nonpolar drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1999**, *88*, 1107-1111.
- [22] Higuchi, T.; Connors, K. Phase solubility techniques. *Advances in Analytical Chemistry and Instrumentation* **1965**, *4*, 117-212.
- [23] Atkinson et al. Principles of clinical pharmacology. 2nd edition. Academic Press, Elsevier, USA, 2007.
- [24] Amidon, G. Transport Processes in Pharmaceutical Systems. Ed. Marcel Dekker. 1st edition, 2000, USA.
- [25] Artursson, P.; Lennernäs, H.; Palm, K.; Fagerholm, U; Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *International Journal of Pharmaceutics* **1996**, *127*, 103-107
- [26] Waterbeemd, H.; Lennernäs, H.; Artursson, P. Drug Bioavailability. Estimation of solubility, permeability, absorption and bioavailability. 1st edition. Editorial Wiley-VCH, 2003, Germany.
- [27] Lipinski, C. Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today* **2004**, *1*, 337-341
- [28] Balimane, P.; Chong, S.; Morrison, R. Current methodologies used for evaluation of intestinal permeability and absorption. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, **2000**, *44*, 301-312.
- [29] Artursson, P.; Karlsson, J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1991**, *175*, 880-885.
- [30] Cho, M.; Thompson, D.; Cramer, C.; Vidmar, T. The Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cell monolayer as a model cellular transport barrier. *Pharmaceutical Research* **1989**, *6*, 71-77.
- [31] Fisher, J.M., S.A. Wrighton, J.C. Calamia, D.D. Shen, K.L. Kunze and K.E. Thummel. Midazolam metabolism by modified Caco-2 monolayers: effects of extracellular protein binding. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1999**, *289*, 1143-1150.
- [32] Avdeef, Alex. Absorption and drug development solubility, permeability and charge state. 1<sup>st</sup> edition, Ed. Wiley-Interscience. USA, 2003.
- [33] Testa, B.; Krämer, S.; Folkers, G. Pharmacokinetic Profiling in Drug Research. Ed. Wiley. 1st edition, 2006, Germany.
- [34] Mälkiä, A.; Murtomäki, L.; Urtili, A.; Kontturi, K. Drug permeation in biomembranes. In vitro and in silico prediction and influence of physicochemical properties. *European journal of pharmaceutical sciences* **2004**, *23*, 13-47.
- [35] Lennernäs, H. Human intestinal permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1998**, *87*, 403-410
- [36] Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *Journal of Medicinal Chemistry* **1998**, *41*, 1007-1010.

- [37] Sugano, K.; Hamada, H.; Machida, M.; Ushio, H.; Saitoh, K.; Terada, K. Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay. *International Journal of Pharmaceutics* **2001**, *228*, 181-188.
- [38] Faller, B.; Wohnsland, F. High-Throughput permeability pH profile and high-throughput alcane/water log P with artificial membranes. *Journal of Medicinal Chemistry* **2001**, *44*, 923-930.
- [39] USP 29-NF 24. United States Pharmacopeia Convention : United States Pharmacopeia. 29ed. Webcom Limited Printing. 2006. 3328-3331
- [40] Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos farmacobiólogos. México. A.C. 1ª edición. Mayo 2002.
- [41] Bockstaele, E.; De Loose, M.; Taverniers, I. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry* **2004**, *23*, 535-552.
- [42] Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable.
- [43] Mottier, L.; Álvarez, L.; Ceballos, L.; C. Lanusse. Drug transport mechanisms in helminthic parasites: Passive diffusion of benzimidazole anthelmintics. *Experimental Parasitology* **2006**, *113*, 49-57.
- [44] Másson, M.; Loftsson, T.; Másson, G.; Stefánsson, E. Cyclodextrins as permeation enhancers: some theoretical evaluations and in vitro testing. *Journal of Control Release* **1999**, *59*, 107-118.
- [45] Stella, V.; Venkatramana, M.; Rao, E.; Zannou, A.; Mechanisms of drug release from cyclodextrin complexes. *Advanced Drug Delivery Reviews* **1999**, *36*, 3-16.
- [46] Carrara, S.; Reali, V.; Misiano, P.; Dondio, G.; Bigogno, C. Evaluation of in vitro brain penetration: Optimized PAMPA and MDCKII-MDR 1 assay comparison. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *345*, 125-133.
- [47] Ventura, A.; Giannone, I.; Musumeci, T.; Pignatello, R.; Ragni, L.; Landolfi, C.; Milanese, C.; Paolino, D.; Puglisi, G. Physicochemical characterization of disoxaril-dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex and in vitro permeation studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *41*, 233-240.
- [48] Loftsson, T.; Brewster, M.; Noppe, M.; Peeters, J. Effect of the unstirred water layer on permeability enhancement by hydrophilic cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* **2007**, *342*, 250-253.

## APÉNDICES

# Apéndice 1

## Equipos, materiales y reactivos

### Equipos y materiales

- Cromatógrafo de líquidos: Bombas binarias Waters 1525; detector de arreglo de fotodiodos Waters 996; software Millennium.
- Columna Symmetry Shield, RP18, 5  $\mu\text{m}$ , 4.6 x 150 mm, Waters.
- Columna Atlantis, RP18, 5  $\mu\text{m}$ , 3.9 x 150 mm, Waters.
- Sonificador Branson 2510
- Balanza analítica Sartorius Analytic.
- Micropipeta 500-1000, Brand 704180.
- Micropipeta 20-200, Brand 704178.
- Placas para PAMPA, Multiscreen Millipore, 96 pozos, soporte de policarbonato, 0.4  $\mu\text{m}$ .
- Agitador Eppendorf Thermomixer R.
- Rotavaporador Büchi, R-1144; Baño Büchi, B-480; Bomba CVC2.
- Mallas paratamizar # 200, Mont Inox.
- Difractómetro de rayos-X Siemens.
- Espectrofotómetro de FT-IR, Spectrum RXI, Perkin-Elmer.
- Calorímetro DSC 821<sup>e</sup>, Metler Toledo.
- Agitador magnético Reobasic, IKA.
- Microfiltros 0.2  $\mu\text{m}$ , Supelco.

### Reactivos

- Agua MilliQ grado HPLC.
- Acetonitrilo grado HPLC, J.T. Baker, México.
- Metanol grado HPLC, J.T. Baker, México.
- Ácido acético glacial grado HPLC, México.
- Cimetidina Sigma-Aldrich, México.
- Propranolol Sigma-Aldrich, México.
- Verapamil Sigma-Aldrich, México.
- Hexadecano Aldrich, USA.
- Hexano Fermont, México.
- Dimetilsulfóxido, grado espectroscópico, Mallinckrodt, México.
- Fosfato monobásico de sodio Mallinckrodt, México.
- Fosfato dibásico de sodio, Merk, México.
- Hidroxipropil-  $\beta$ - ciclodextrina, PM 1380, grado de sustitución 0.6. Sigma-Aldrich, USA.
- Alcohol etílico absoluto Analytika, México.
- Lucifer Yellow Sigma, México.

## Apéndice 2

### Validación del método analítico

#### Cimetidina

El rango de concentraciones de la curva de calibración fue de 10, 50, 100, 150, 200 y 250  $\mu\text{M}$ . Para llegar a estas concentraciones se partió de una solución stock de 10 mg/mL. Para preparar esta solución, se pesaron 10 mg de cimetidina en una balanza analítica y se disolvieron en 1 mL de una mezcla acetonitrilo-agua 50:50. A partir de esta solución se hicieron las diluciones correspondientes para llegar a las concentraciones antes mencionadas con solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5-DMSO 5% (Figura 29).

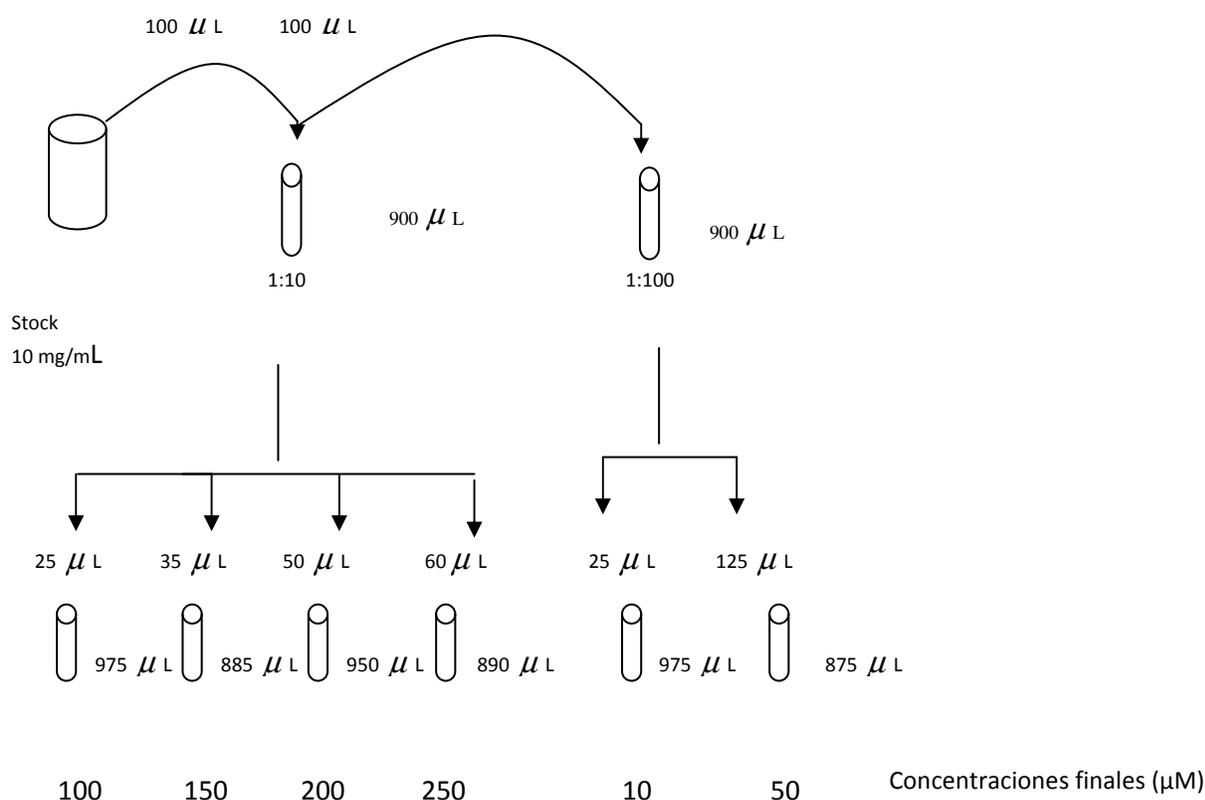


Figura 1. Preparación de la curva de calibración de cimetidina.

#### Propranolol

El rango de concentraciones de la curva de calibración fue de 10, 50, 100, 150, 200 y 250  $\mu\text{M}$ . Para llegar a estas concentraciones se partió de una solución stock de 10 mg/mL. Para preparar esta solución, se pesaron 10 mg de propranolol en una balanza analítica y se disolvieron en 1 mL de una mezcla metanol-agua 50:50. A partir de esta solución se hicieron las diluciones

correspondientes para llegar a las concentraciones antes mencionadas con solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5-DMSO 5% (Figura 30).

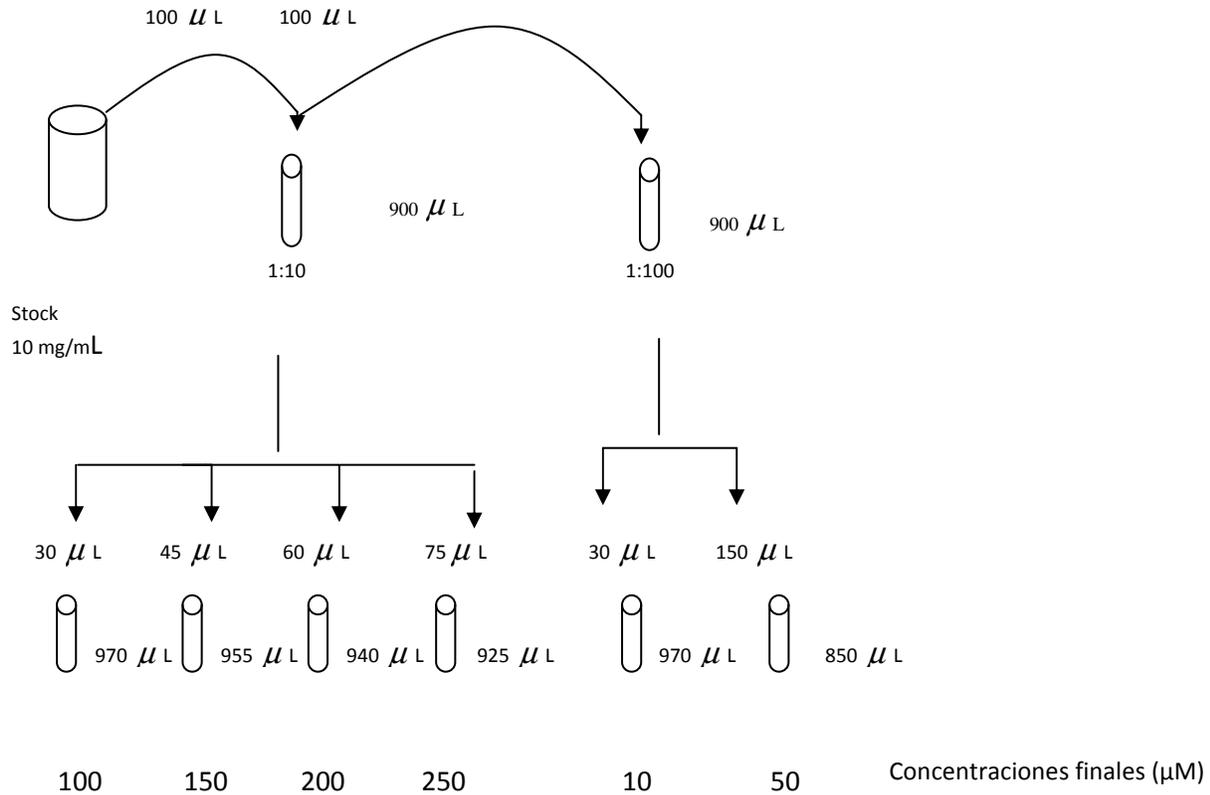


Figura 2. Preparación de la curva de calibración de propranolol

### Verapamil

El rango de concentraciones de la curva de calibración fue de 10, 50, 100, 150, 200 y 250  $\mu$ M. Para llegar a estas concentraciones se partió de una solución stock de 10 mg/mL. Para preparar esta solución, se pesaron 10 mg de cimetidina en una balanza analítica y se disolvieron en 1 mL de una mezcla acetonitrilo-agua 50:50. A partir de esta solución se hicieron las diluciones correspondientes para llegar a las concentraciones antes mencionadas con solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5-DMSO 5% (Figura, 31).

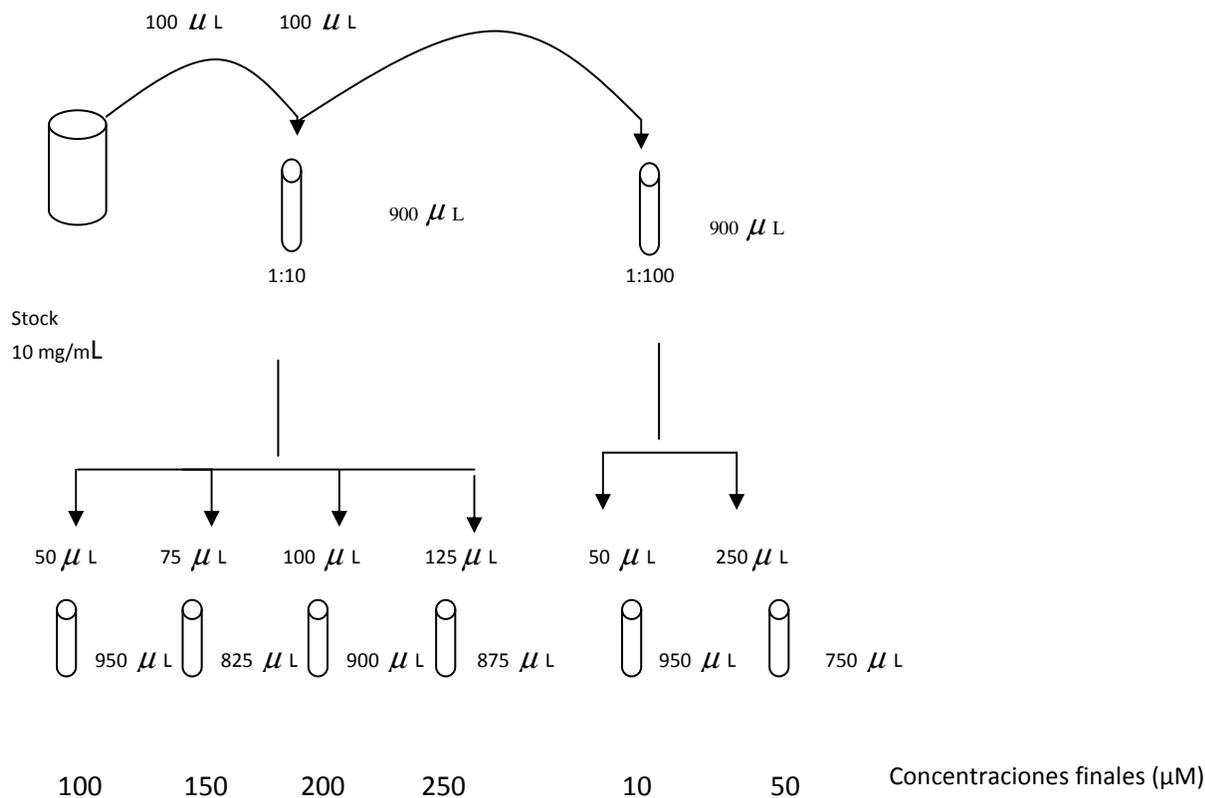


Figura 3. Preparación de la curva de calibración de verapamil

### RCB-20

El rango de concentraciones de la curva de calibración fue de 10, 50, 100, 150 y 200 μM. Para llegar a estas concentraciones se partió de una solución stock de 10 mg/mL. Para preparar esta solución, se pesaron 10 mg de **RCB-20** en una balanza analítica y se disolvieron en 1 mL de acetonitrilo. Las diluciones 1:10 y 1:100 se realizaron de igual manera en acetonitrilo. Las diluciones siguientes para preparar la curva se hicieron con solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5-DMSO 5% (Figura, 32).

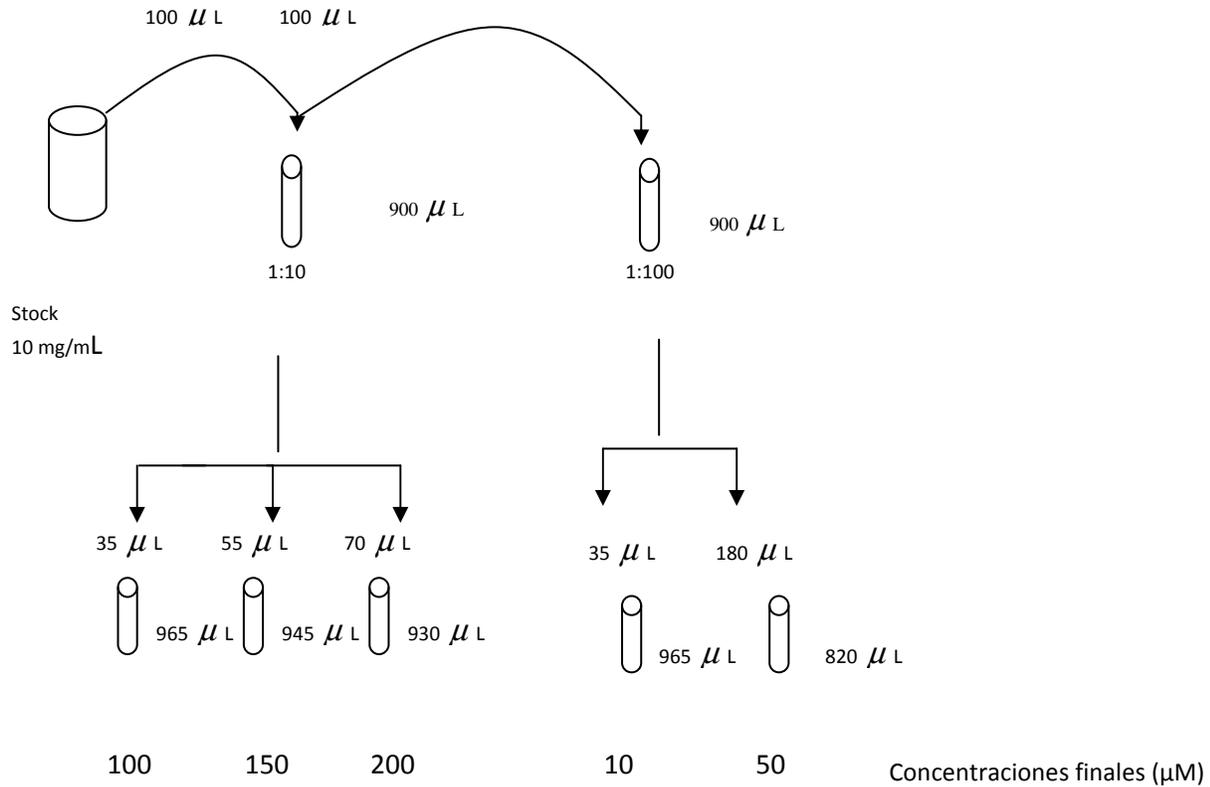


Figura 4. Preparación de la curva de calibración de RCB-20

### Cálculo de los parámetros de validación de los métodos analíticos

#### Linealidad

La pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación se calcularon utilizando el software Excel, Office 2007. Sin embargo se presentan las ecuaciones con las que se obtienen estos estadísticos.

Para calcular la pendiente de una recta, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación se utilizan las ecuaciones 9, 10 y 11 respectivamente.

$$m = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sum(x - \bar{x})^2} \quad \text{Ecuación (9)}$$

$$b = \bar{y} - m \bar{x} \quad \text{Ecuación (10)}$$

$$r = \frac{\Sigma(xi-\bar{x})(yi-\bar{y})}{\{\Sigma(xi-\bar{x})^2\}[\Sigma(yi-\bar{y})^2]}^{\frac{1}{2}}$$
 Ecuación (11)

Para calcular el error relativo a la regresión se utiliza la Ecuación 13 para obtener  $S_{\frac{y}{x}}$ . Después con la ecuación 14 se obtiene el EER%.

$$S_{\frac{y}{x}} = \sqrt{\frac{\Sigma y^2 - (m \cdot \Sigma yx) - (b \cdot \Sigma y)}{N-2}}$$
 Ecuación (12)

$$EER\% = \frac{S_{\frac{y}{x}}}{\bar{y}} * 100$$
 Ecuación (13)

Para todas las ecuaciones anteriores se tiene que:

X=variable independiente (concentración)

Y=variable dependiente (área)

$\bar{x}$ = media aritmética de la variable independiente

$\bar{y}$ = media aritmética de la variable dependiente

N= número de réplicas

### Precisión y exactitud

Por medio de la ecuación de la recta (ecuación 14) se calcularon las concentraciones experimentales a partir de las áreas obtenidas para cada uno de los puntos de las tres curvas de calibración con sus respectivos valores de m y b (Tabla).

$$y = mx + b$$
 Ecuación (14)

Donde:

y=área

x=concentración

m=pendiente

b=ordenada al origen

La desviación estándar, s, se calculó utilizando el software Excel, Office 2007, pero también se presenta la ecuación para calcular dicho parámetro.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2}{N}}$$
 Ecuación (15)

Para el coeficiente de variación se utilizó la ecuación 16:

$$CV\% = \frac{s}{\bar{y}} * 100$$
 Ecuación (16)

Para la desviación estándar relativa se usó la ecuación 17:

$$DER\% = \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración experimental}}{\text{Concentración nominal}} * 100$$
 Ecuación (17)

## Validación del método analítico para cimetidina

En este apartado se presentan los datos experimentales obtenidos al realizar la validación del método analítico para el análisis de cimetidina, y su tratamiento para obtener los resultados de los parámetros de validación.

En la Tabla 33 se muestran las áreas obtenidas a partir del análisis de las curvas de calibración, así como la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación. Esta curva se realizó el día 1 por la mañana.

Tabla 1. Áreas y valores de regresión lineal de la curva de calibración de cimetidina

Concentración( $\mu\text{M}$ )	Área		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
10	33914	34313	33698
50	46580	47110	46400
100	62671	62587	62099
150	78962	79030	78848
200	94716	94153	95795
250	111028	110683	110116
<b>r</b>	<b>0,99999</b>	<b>0,99995</b>	<b>0,99978</b>
<b>m</b>	321,3568	317,3118	321,7981
<b>b</b>	30606,6419	31119,8419	30398,2452

En la Tabla 34 se presentan los valores de las variables de las ecuaciones 13 y 14 para calcular el EER de cada una de las curvas de calibración.

Tabla 2. Cálculo del EER.

Curva	$\bar{y}$	$\Sigma y$	$\Sigma y^2$	N	$\Sigma Xy$	$Sy/x$	%Error
1	71311,83333	427871	3,4781E+10	6	67479740	140,4098	0,1969
2	71312,667	427876	3,468E+10	6	67313180	325,3366	0,4562
3	71159,333	426956	3,466E+10	6	67382080	686,9319	0,9653

## Precisión y exactitud

Por medio de la ecuación se calcularon las concentraciones experimentales a partir de las curvas de calibración (Tabla 35). Una vez calculadas las concentraciones, se realizó el cálculo del CV y de DER.

Tabla 3. Concentraciones experimentales obtenidas a partir de la curva de calibración, desviación estándar ( $\sigma$ ), coeficiente de variación (CV) y desviación estándar relativa (DER).

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Concentración experimental ( $\mu\text{M}$ )			Promedio	$\sigma$	C.V.	%DER
	Curva 1	Curva 2	Curva 3				
10	10,2919	10,0632	10,2541	10,2030	0,1226	1,2017	2,0304
50	49,7060	50,3926	49,7261	49,9415	0,3907	0,7824	0,1169
100	99,7781	99,1679	98,5113	99,1524	0,6335	0,6389	0,8476
150	150,4725	150,9876	150,5595	150,6732	0,2758	0,1830	0,4488
200	199,4959	198,6474	203,2230	200,4554	2,4340	1,2142	0,2277
250	250,2557	250,7413	247,7260	249,5743	1,6190	0,6487	0,1703

A continuación se muestran las áreas y sus correspondientes concentraciones obtenidas para los ensayos a diferentes horas y diferentes días.

En la Tabla 36 se presentan los datos experimentales obtenidos de la curva de calibración de cimetidina realizada el día 1 por la tarde. Para la variabilidad intradía, se compararon las curvas realizadas el día 1 por la mañana con otras tres curvas realizadas el mismo día pero por la tarde (Tabla 37).

Tabla 4. Curvas de calibración de cimetidina para determinar la variabilidad intradía

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Área		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
10	33781	34123	33432
50	46849	47007	46975
100	61979	62798	62855
150	79029	79191	78354
200	94130	94516	94009
250	110826	111039	112143

Tabla 5. Variabilidad intradía del método analítico para el análisis de cimetidina.

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Concentración experimental ( $\mu\text{M}$ )						Promedio	$\sigma$	C.V.
	Curva 1*	Curva 2*	Curva 3*	Curva 1**	Curva 2**	Curva 3**			
10	10,2919	10,0632	10,2541	10,0753	9,9239	9,6604	10,0448	0,2317	2,3068
50	49,7060	50,3926	49,7261	50,9032	50,2242	51,5121	50,4107	0,7009	1,3903
100	99,7781	99,1679	98,5113	98,1734	99,6174	100,5857	99,3056	0,8822	0,8883
150	150,4725	150,9876	150,5595	151,4421	150,8935	148,4820	150,4729	1,0347	0,6876
200	199,4959	198,6474	203,2230	198,6217	198,8291	196,8603	199,2795	2,1206	1,0641
250	250,2557	250,7413	247,7260	250,7844	250,5119	252,8994	250,4865	1,6523	0,6596

\*Día 1 por la mañana

\*\*Día 1 por la tarde

En la Tabla 38 se presentan los datos experimentales obtenidos de la curva de calibración realizada el día 2 por la mañana. Para la variabilidad interdía se compararon las tres curvas que se realizaron el primer día de la validación del método para cimetidina por la mañana contra otras tres curvas que se realizaron un segundo día a la misma hora (Tabla 39).

Tabla 6. Curvas de calibración para determinar la variabilidad interdía

Concentración (µM)	Área		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
10	33773	34264	33131
50	47094	47108	46572
100	62418	62771	61998
150	79230	79876	79271
200	94848	95837	94983
250	111558	110585	111249

Tabla 7. Variabilidad interdía del método analítico para el análisis de cimetidina

Concentración (µM)	Concentración experimental (µM)						Promedio	σ	C.V.
	Curva 1*	Curva 2*	Curva 3*	Curva 1**	Curva 2**	Curva 3**			
10	10,2919	10,0632	10,2541	9,8808	9,7393	9,6457	9,9792	0,2679	2,6846
50	49,7060	50,3926	49,7261	51,1310	49,8131	50,9615	50,2884	0,6411	1,2749
100	99,7781	99,1679	98,5113	98,5838	98,6824	98,3789	98,8504	0,5288	0,5349
150	150,4725	150,9876	150,5595	150,6444	152,0508	151,4738	151,0314	0,6200	0,4105
200	199,4959	198,6474	203,2230	199,0076	201,8499	199,7703	200,3323	1,8038	0,9004
250	250,2557	250,7413	247,7260	250,7523	247,8644	249,7698	249,5182	1,3837	0,5545

\*Día 1 por la mañana

\*\*Día 2 por la mañana

Finalmente, se calculó el área promedio de todas las curvas: las realizadas en los diferentes días junto con las realizadas a diferentes horas (n=9) (Tabla 40):

Tabla 8. Curva de calibración promedio

Curva promedio	
Concentración(µM)	Área
10	33825,4444
50	46855,0000
100	62464,0000
150	79087,8889
200	94776,3333
250	111025,2222
<b>m</b>	321,4000
<b>b</b>	30628,3125
<b>r</b>	0,99997

## Determinación del límite de detección y límite de cuantificación

En este trabajo se determinaron los límites de cuantificación y de detección con base en la señal ruido del blanco.

Primeramente se realizaron por triplicado inyecciones del blanco (solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5-DMSO al 5%) para determinar la altura correspondiente a la señal ruido y se obtuvo un promedio de estas (Tabla 41).

Posteriormente, a partir de una solución de cimetidina 10  $\mu\text{M}$ , se hicieron varias diluciones que se inyectaron en el equipo de CLAR hasta encontrar aquellas concentraciones que generaran una respuesta, con respecto al blanco, mayor a 3 ó 10 veces la señal ruido.

Tabla 9. Señal ruido del blanco en la cuantificación de cimetidina.

Determinación	Altura señal ruido
1	3217
2	3523
3	4044
Promedio	3594

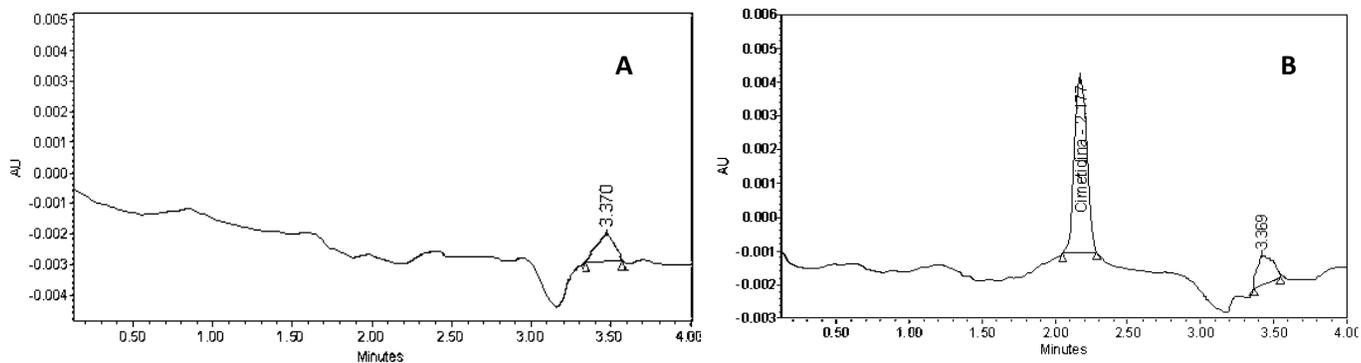
Al inyectar una solución 10  $\mu\text{M}$  se encontró que esta fue la concentración del analito cuya señal resultó ser inmediatamente posterior a 10 veces la señal ruido con respecto al blanco, por lo tanto, el límite de cuantificación se estima en 10.0  $\mu\text{M}$ .

Después se inyectaron las otras soluciones (realizadas a partir de la solución de cimetidina 10  $\mu\text{M}$ ) y se encontró que el límite de detección fue de 2.5  $\mu\text{M}$ , que es la concentración del analito cuya señal resultó ser inmediatamente posterior a 3 veces la señal ruido con respecto al blanco (Tabla 42, Figura 33).

Tabla 10. Determinación del límite de detección y de cuantificación para el análisis de cimetidina por CLAR.

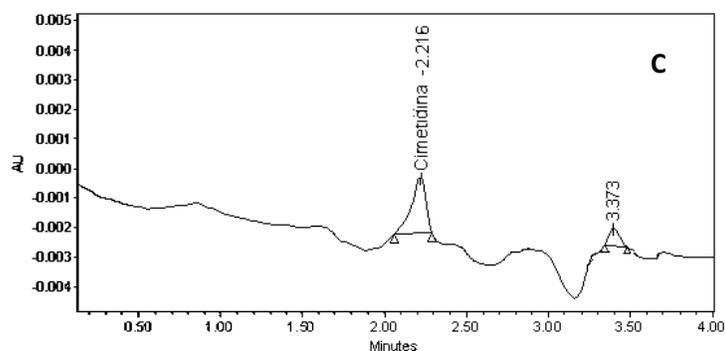
Muestra	Áltura
Blanco	3594
3 * ruido	10784
10 * ruido	35946
Analito	
2.5	ND
5.0	12914
7.0	18236
10.0	33914

ND: No detectado.



Nombre	Tiempo de retención	Altura
Señal Ruido	3.370	3040

	Nombre	Tiempo de retención	Altura
1	Cimetidina	2.177	35524
2	Ruido	3.369	3195

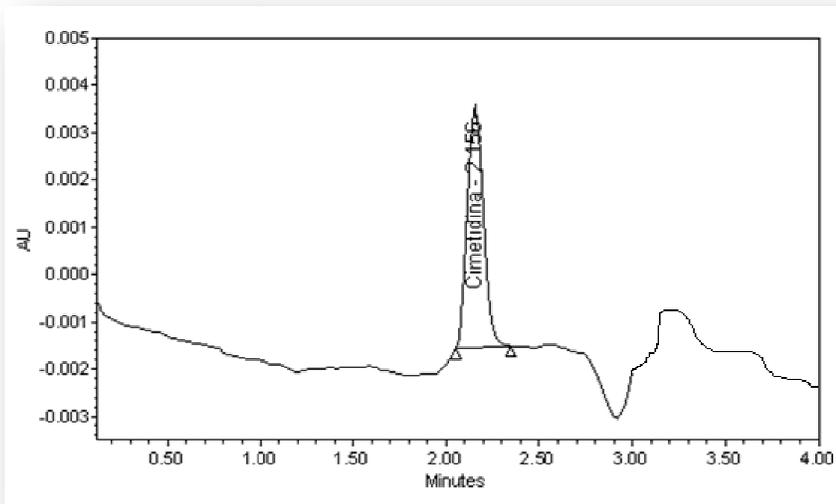


	Nombre	Tiempo de retención	Altura
1	Cimetidina	2.216	12914
2	Ruido	3.373	4044

Figura 5. LOD y LOQ de cimetidina.

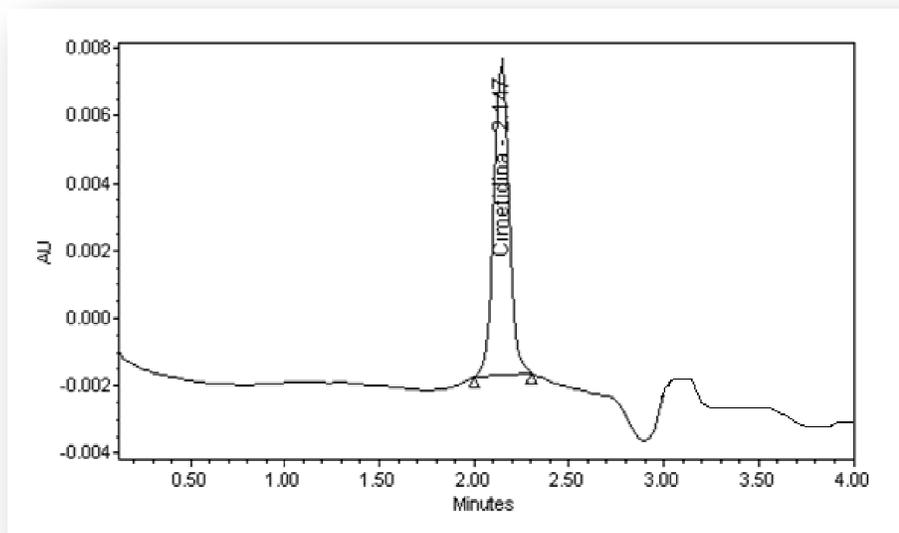
Cromatogramas del blanco (A), del límite de cuantificación (B) y del límite de detección (C) en el método analítico para el análisis de cimetidina

A continuación se presentan los cromatogramas de cada una de las concentraciones de la curva de calibración (día 1 por la mañana) de cimetidina.



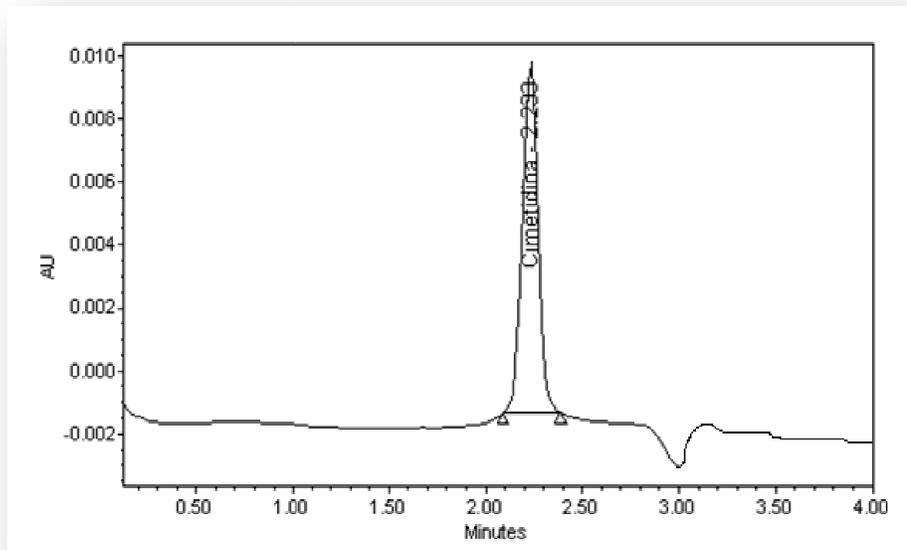
Nombre	Tiempo de retención	Área
Cimetidina	2.156	33914

Figura 6. Cromatograma de cimetidina 10 $\mu$ M



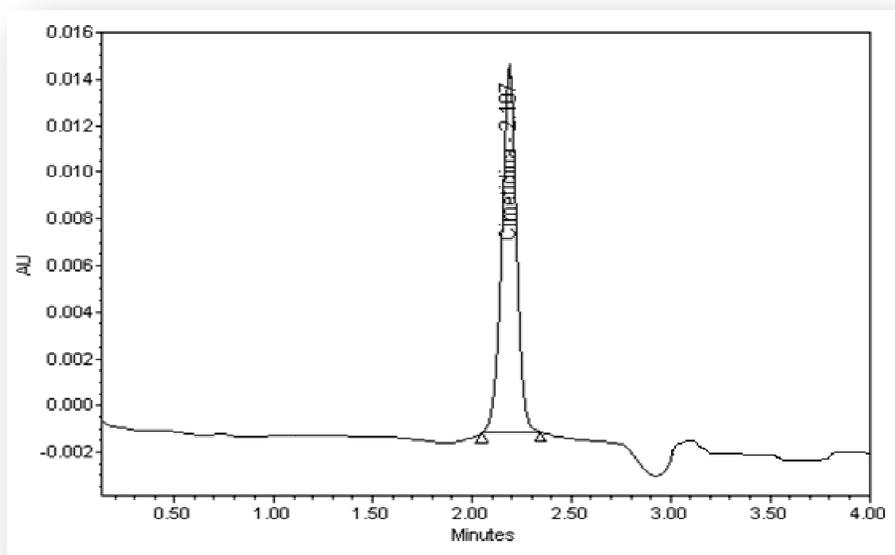
Nombre	Tiempo de retención	Área
Cimetidina	2.147	46580

Figura 7. Cromatograma de cimetidina 50 $\mu$ M



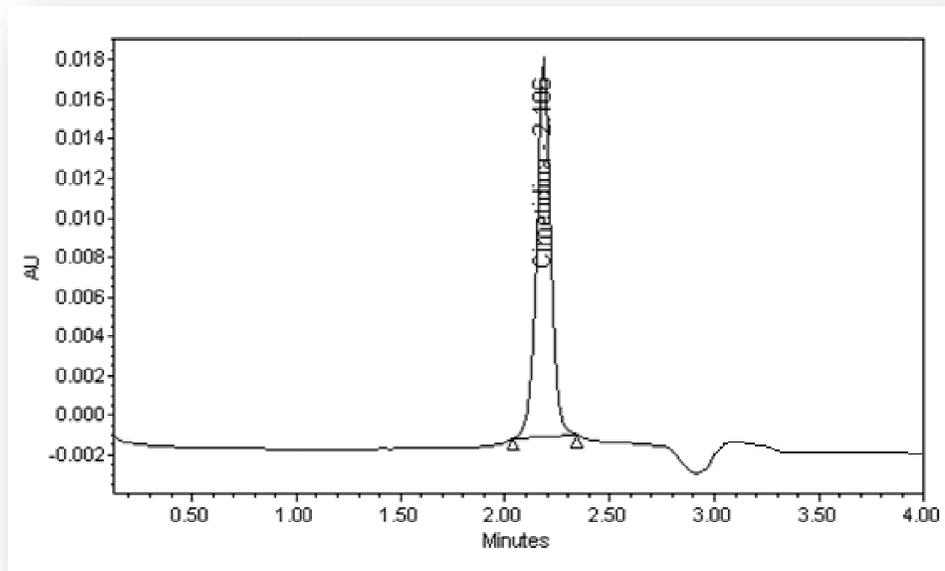
Nombre	Tiempo de retención	Área
Cimetidina	2.233	62671

Figura 8.Cromatograma de cimetidina 100µM



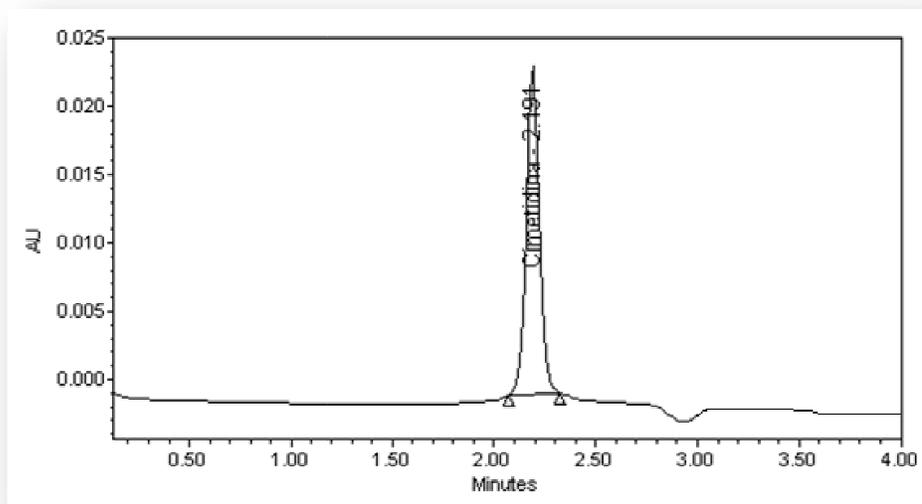
Nombre	Tiempo de retención	Área
Cimetidina	2.187	78962

Figura 9.Cromatograma de cimetidina 150µM



Nombre	Tiempo de retención	Área
Cimetidina	2.186	94716

Figura 10. Cromatograma de cimetidina 200µM



Nombre	Tiempo de retención	Area
Cimetidina	2.191	111028

Figura 11. Cromatograma de cimetidina 250µM

## Validación del método analítico para propranolol

En este apartado se presentan los datos experimentales obtenidos al realizar la validación del método analítico para el análisis de propranolol y su tratamiento para obtener los resultados de los parámetros de validación.

En la Tabla 43 se muestran las áreas obtenidas a partir del análisis de las curvas de calibración, así como la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación. Esta curva se realizó el día 1 por la mañana.

Tabla 11. Áreas y valores de regresión lineal de la curva de calibración de propranolol

Concentración( $\mu\text{M}$ )	Área		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
10	138949	140173	154389
50	660686	644483	681186
100	1325174	1344789	1365788
150	2031042	2058868	2065000
200	2662459	2614128	2701273
250	3294677	3349115	3392730
r=	0.99988	0.99917	0.99989
m=	13228.5529	13334.8928	13501.3564
b=	9881.1323	2839.5758	16555.8597
EER %	1.3551	2.4883	0.8689

En la Tabla 44 se presentan los valores de las variables de las ecuaciones 13 Y 14 para calcular el EER de cada una de las curvas de calibración.

Tabla 12. Cálculo del EER.

Curva	$\hat{y}$	$\Sigma y$	$\Sigma y^2$	N	$\Sigma Xy$	$Sy/x$	%Error
1	1685497,8333	10112987	2,4281E+13	6	1827758540	22840,2576	1,3551
2	1691926,0000	10151556	2,453E+13	6	1837039330	42099,5770	2,4883
3	1726727,6667	10360366	2,542E+13	6	1870369090	15003,9099	0,8689

## Precisión y exactitud

Por medio de la ecuación 15 se calcularon las concentraciones experimentales a partir de las curvas de calibración (Tabla 45). Una vez calculadas las concentraciones, se realizó el cálculo del CV y de DER.

Tabla 13. Concentraciones experimentales obtenidas a partir de la curva patrón, desviación estándar ( $\sigma$ ), coeficiente de variación (CV) y desviación estándar relativa (DER).

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Concentración experimental ( $\mu\text{g/mL}$ )			Promedio	$\sigma$	C.V.	%DER
	Curva 1	Curva 2	Curva 3				
10	9,7568	10,2988	10,2088	10,0881	0,2905	2,8794	0,8813
50	49,1970	48,1176	49,2269	48,8472	0,6320	1,2938	2,3056
100	99,4283	100,6344	99,9331	99,9986	0,6057	0,6057	0,0014
150	152,7878	154,1841	151,7214	152,8977	1,2350	0,8078	1,9318
200	200,5191	195,8237	198,8480	198,3969	2,3800	1,1996	0,8015
250	248,3111	250,9413	250,0618	249,7714	1,3390	0,5361	0,0914

A continuación se muestran las áreas y sus correspondientes concentraciones obtenidas para los ensayos a diferentes horas y diferentes días.

En la Tabla 46 se presentan los datos experimentales obtenidos de la curva de calibración de propranolol realizada el día 1 por la tarde. Para la variabilidad intradía, se compararon las curvas realizadas el día 1 por la mañana con otras tres curvas realizadas el mismo día pero por la tarde (Tabla 47).

Tabla 14. Curva de calibración de propranolol para determinar la variabilidad intradía

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Área		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
10	148311	131027	146997
50	659715	663160	668360
100	1337089	1326478	1307505
150	2017521	2028585	2020342
200	2667036	2636004	2659038
250	3297607	3379273	3270934

Tabla 15. Variabilidad intradía del método analítico para el análisis de propranolol

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Concentración experimental ( $\mu\text{M}$ )						Promedio	$\sigma$	C.V.
	Curva 1*	Curva 2*	Curva 3*	Curva 1**	Curva 2**	Curva 3**			
10	9,7568	10,2988	10,2088	10,0810	10,4504	9,9090	10,1175	0,2557	2,5274
50	49,1970	48,1176	49,2269	48,8077	50,0154	49,6469	49,1686	0,6610	1,3444
100	99,4283	100,6344	99,9331	100,1026	99,3342	98,3621	99,6325	0,7823	0,7852
150	152,7878	154,1841	151,7214	151,6291	151,5371	152,6940	152,4256	1,0213	0,6700
200	200,5191	195,8237	198,8480	200,8144	196,6998	201,3749	199,0133	2,3083	1,1599
250	248,3111	250,9413	250,0618	248,5652	251,9631	248,0131	249,6426	1,6023	0,6418

\*Día 1 por la mañana

\*\*Día 1 por la tarde

En la Tabla 48 se presentan los datos experimentales obtenidos de la curva de calibración de propranolol realizada el día 2 por la mañana. Para la variabilidad interdía se compararon las

tres curvas que se realizaron el primer día de la validación del método para propranolol por la mañana contra otras tres curvas que se realizaron un segundo día a la misma hora (Tabla 49).

Tabla 16. Curvas de calibración para determinar la variabilidad interdía

Concentración(μM)	Área		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
10	148657	133998	132692
50	659043	664809	652836
100	1346121	1391019	1370224
150	2041166	2019244	1997247
200	2675194	2730649	2650697
250	3291828	3378445	3364516

Tabla 17. Variabilidad interdía del método analítico para el análisis de propranolol

Concentración (μM)	Concentración experimental (μM)						Promedio	σ	C.V.
	Curva 1*	Curva 2*	Curva 3*	Curva 1**	Curva 2**	Curva 3**			
10	9,7568	10,2988	10,2088	9,7133	9,6987	10,1001	9,9628	0,2708	2,7182
50	49,1970	48,1176	49,2269	48,3482	48,8537	48,9164	48,7766	0,4523	0,9272
100	99,4283	100,6344	99,9331	100,3582	102,4222	102,4522	100,8714	1,2795	1,2685
150	152,7878	154,1841	151,7214	152,9713	148,7628	149,2444	151,6120	2,1717	1,4324
200	200,5191	195,8237	198,8480	200,9656	201,2392	198,0088	199,2341	2,0953	1,0517
250	248,3111	250,9413	250,0618	247,6432	249,0234	251,2782	249,5432	1,4582	0,5844

\*Día 1 por la mañana

\*\*Día 2 por la mañana

Finalmente, se calculó el área promedio de todas las curvas: las realizadas en los diferentes días junto con las realizadas a diferentes horas (n=9) (Tabla 50).

Tabla 18. Curva de calibración promedio

Curva promedio	
Concentración (μM)	Área
10	141688,1111
50	661586,4444
100	1346020,778
150	2031001,667
200	2666275,333
250	3335458,333
<b>m</b>	13334,1362
<b>b</b>	8014,5246
<b>r</b>	0,999943

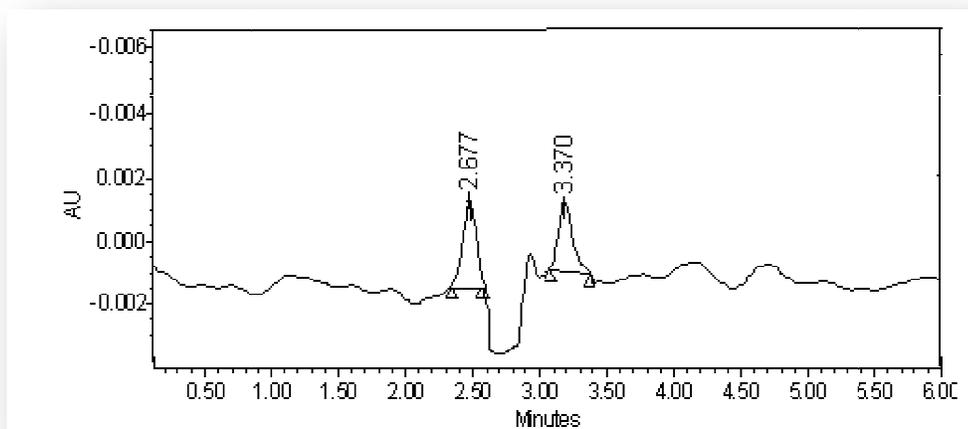
## Determinación del límite de detección y límite de cuantificación

En este trabajo se determinaron los límites de cuantificación y de detección con base en la señal ruido del blanco.

Primeramente se realizaron por triplicado inyecciones del blanco (solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5-DMSO al 5%) para determinar la altura correspondiente a la señal ruido y se obtuvo un promedio de estas. Cabe mencionar que en el cromatograma del blanco, se observan dos picos (señal ruido 1 y señal ruido 2). Estos picos tienen aproximadamente la misma altura, por lo tanto, el promedio de la señal ruido del blanco se hace considerando los 2 picos de cada cromatograma, es decir, con un  $n=6$  (Tabla 51, Figura 40).

Tabla 19. Señal ruido 1 del blanco en la cuantificación de propranolol.

Determinación	Áltura	
	señal ruido 1	señal ruido 2
1	1968	1832
2	2314	2298
3	1827	1956
Promedio	2033	



	Nombre	Tiempo de retención	Altura
1	Señal ruido 1	2.677	1968
3	Señal ruido 2	3.370	1832

Figura 12. Cromatograma del blanco (solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5-DMSO al 5%) del método analítico para el análisis de propranolol

Posteriormente, a partir de una solución de propranolol 10  $\mu\text{M}$ , se hicieron varias diluciones que se inyectaron en el equipo de CLAR hasta encontrar aquellas concentraciones que generaran una respuesta, con respecto al blanco, mayor a 3 ó 10 veces la señal ruido.

Al inyectar una solución 10 µM se encontró que esta fue la concentración del analito cuya señal resultó ser inmediatamente posterior a 10 veces la señal ruido con respecto al blanco, por lo tanto, el límite de cuantificación se estima en 10.0 µM.

Después se inyectaron las otras soluciones (realizadas a partir de la solución de cimetidina 10 µM) y se encontró que el límite de detección fue de 2.5 µM, que es la concentración del analito cuya señal resultó ser inmediatamente posterior a 3 veces la señal ruido con respecto al blanco (Tabla 52, Figura 41).

Tabla 20. Determinación del límite de detección y de cuantificación para el análisis de propranolol por CLAR.

Muestra	Áltura
Blanco	2033
3 * ruido	6099
10 * ruido	20330
Analito	
1.0	ND
2.5	6434
5.0	9883
7.0	14900
10.0	27399

ND: No detectado.

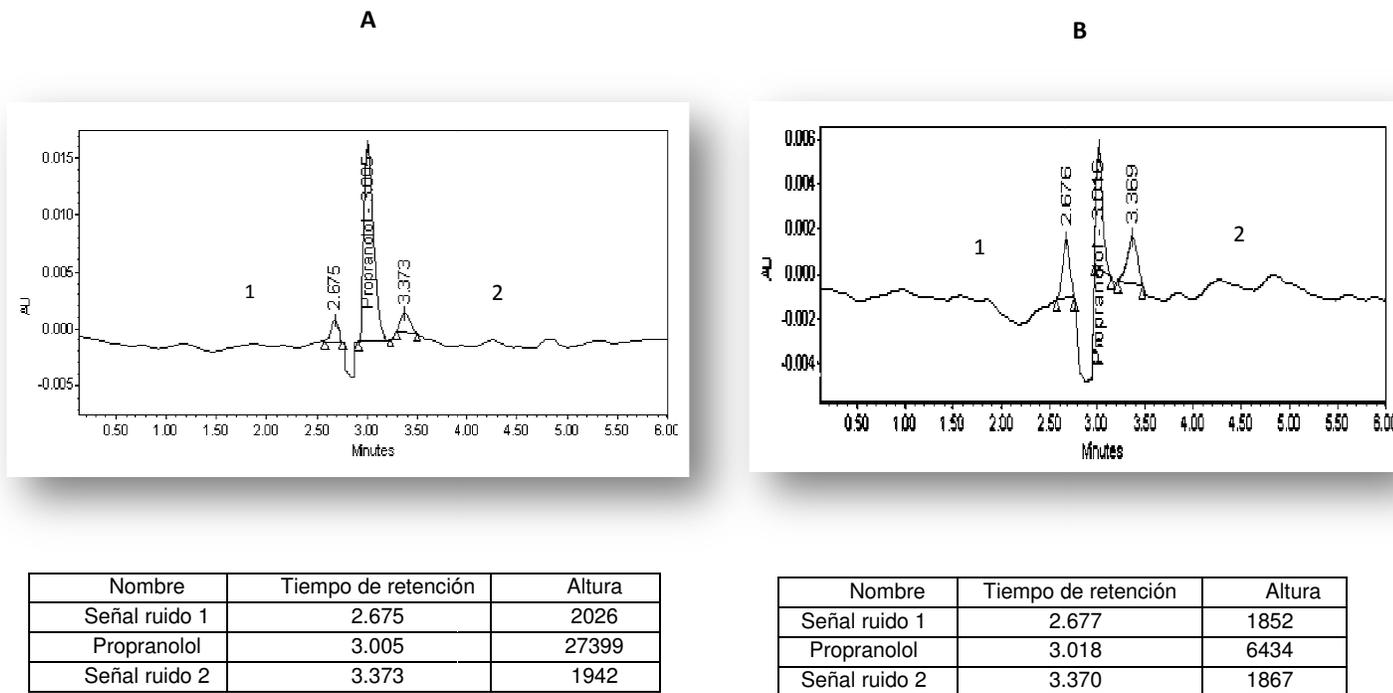
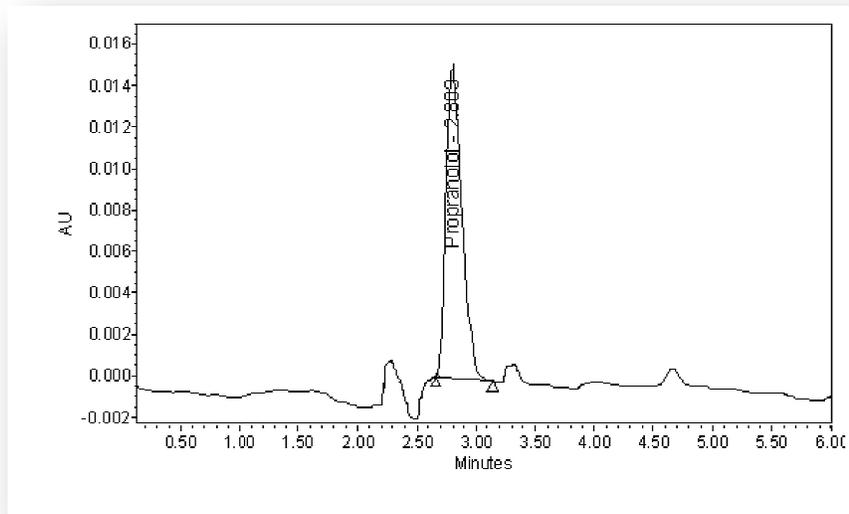


Figura 13. LOD y LOQ de propranolol.

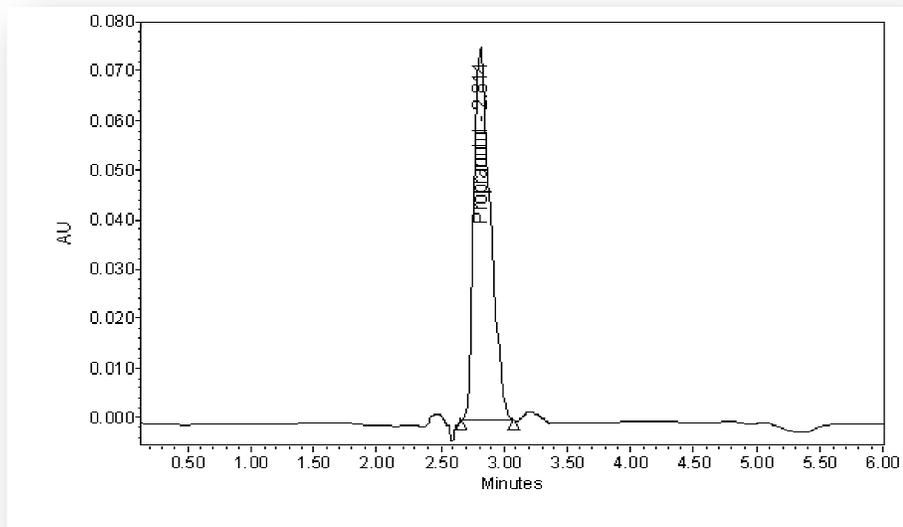
Cromatogramas del límite de cuantificación (A) y del límite de detección (B) en el método analítico para el análisis de cimetidina

A continuación se presentan los cromatogramas de cada una de las concentraciones de la curva de calibración (día 1 por la mañana) de propranolol.



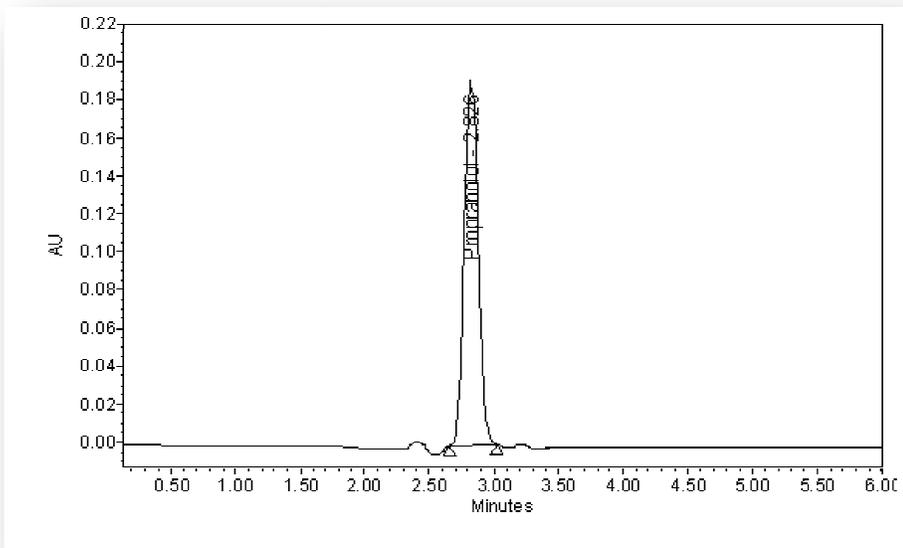
Nombre	Tiempo de retención	Area
Propranolol	2.803	138949

Figura 14. Cromatograma de propranolol 10µM



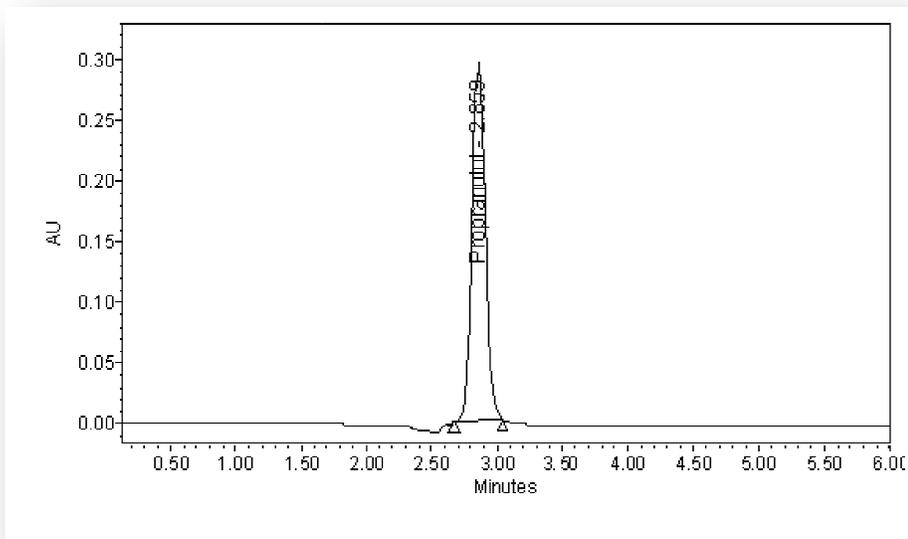
Nombre	Tiempo de retención	Area
Propranolol	2.814	660686

Figura 15. Cromatograma de propranolol 50µM



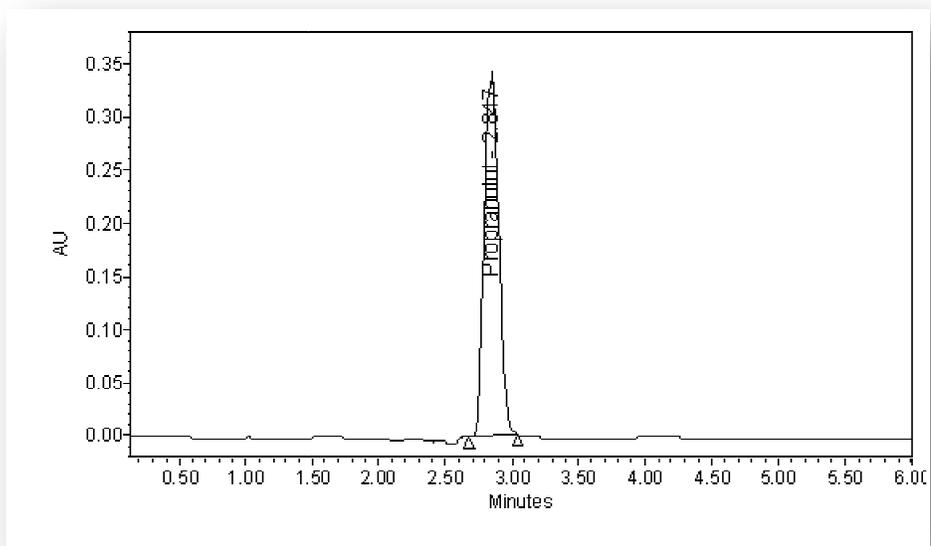
Nombre	Tiempo de retención	Area
Propranolol	2.826	1325174

Figura 16. Cromatograma de propranolol 100µM



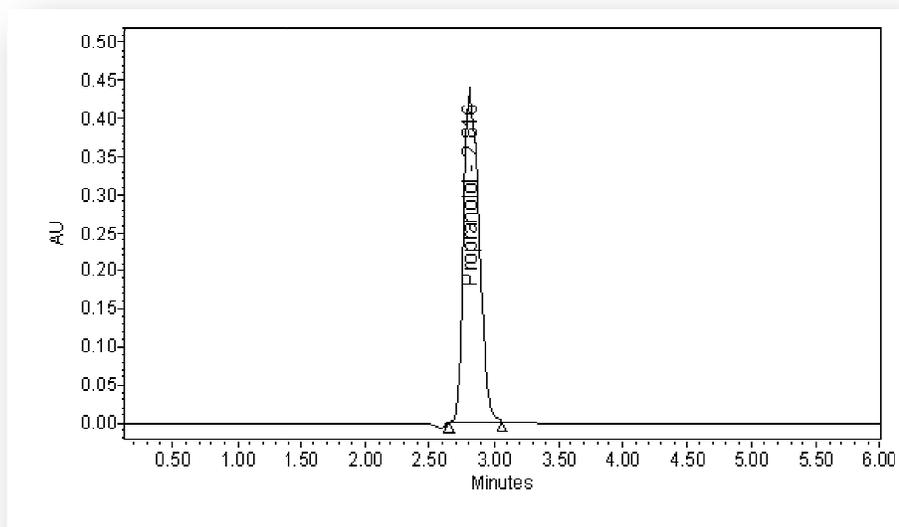
Nombre	Tiempo de retención	Area
Propranolol	2.859	2031042

Figura 17. Cromatograma de propranolol 150µM



Nombre	Tiempo de retención	Area
Propranolol	2.847	2662459

Figura 18. Cromatograma de propranolol 200µM



Nombre	Tiempo de retención	Area
Propranolol	2.816	3294677

Figura 19. Cromatograma de propranolol 250µM

## Validación del método analítico para verapamil

En este apartado se presentan los datos experimentales obtenidos al realizar la validación del método analítico para el análisis de verapamil y su tratamiento para obtener los resultados de los parámetros de validación.

En la Tabla 53 se muestran las áreas obtenidas a partir del análisis de las curvas de calibración, así como la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación. Esta curva se realizó el día 1 por la mañana.

Tabla 21. Áreas y valores de regresión lineal de la curva de calibración de verapamil

Concentración( $\mu\text{M}$ )	Área		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
10	145450	149789	140569
50	459311	467797	466323
100	852130	863026	845007
150	1257131	1242783	1256057
200	1632922	1652988	1654184
250	2025956	2025956	2043990
<b>r=</b>	<b>0.99996</b>	<b>0.99995</b>	<b>0.99996</b>
<b>m=</b>	7839.7282	7832.2125	7936.0223
<b>b=</b>	69117.7581	74976.2500	62458.8371
EER %	0.6323	0.7704	0.6793

En la Tabla 54 se presentan los valores de las variables de las ecuaciones 13 Y 14 para calcular el EER de cada una de las curvas de calibración.

Tabla 22. Cálculo del EER.

Curva	$\hat{y}$	$\Sigma y$	$\Sigma y^2$	N	$\Sigma Xy$	$Sy/x$	%Error
1	1062150	6372900	9,30956E+12	6	1131276100	6716,1109	0,6323
2	1067057	6402339	9,36746E+12	6	1134694390	8220,8133	0,7704
3	1067688	6406130	9,44315E+12	6	1139465390	7252,7241	0,6793

### Precisión y exactitud

Por medio de la ecuación 15 se calcularon las concentraciones experimentales a partir de las curvas de calibración (Tabla 55). Una vez calculadas las concentraciones, se realizó el cálculo del CV y de DER.

Tabla 23. Concentraciones experimentales obtenidas a partir de la curva patrón, desviación estándar ( $\sigma$ ), coeficiente de variación (CV) y desviación estándar relativa (DER).

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Concentración experimental ( $\mu\text{M}$ )			Promedio	$\sigma$	C.V.	%DEA
	Curva 1	Curva 2	Curva 3				
10	9.7366	9.5519	9.8425	9.7103	0.1470	1.5143	2.8966
50	49.7713	50.1545	50.8900	50.2719	0.5685	1.1309	0.5439
100	99.8775	100.6165	98.6071	99.7004	1.0163	1.0194	0.2996
150	151.5376	149.1030	150.4026	150.3477	1.2182	0.8102	0.2318
200	199.4717	201.4771	200.5696	200.5062	1.0042	0.5008	0.2531
250	249.6054	249.0969	249.6882	249.4635	0.3202	0.1283	0.2146

A continuación se muestran las áreas y sus correspondientes concentraciones obtenidas para los ensayos a diferentes horas y diferentes días.

En la Tabla 56 se presentan los datos experimentales obtenidos de la curva de calibración de verapamil realizada el día 1 por la tarde. Para la variabilidad intradía, se compararon las curvas realizadas el día 1 por la mañana con otras tres curvas realizadas el mismo día pero por la tarde (Tabla 57).

Tabla 24. Curva de calibración de verapamil para determinar la variabilidad intradía

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Área		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
10	90982	83003	87855
50	462802	464961	473275
100	916784	870917	868488
150	1394828	1367507	1379847
200	1827384	1833181	1813181
250	2291009	2264621	2273146

Tabla 25. Variabilidad intradía del método analítico para el análisis de verapamil

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Concentración experimental ( $\mu\text{M}$ )						Promedio	$\sigma$	C.V.
	Curva 1*	Curva 2*	Curva 3*	Curva 1**	Curva 2**	Curva 3**			
10	9.7366	9.5519	9.8425	9.5149	10.0005	9.9285	9.7625	0.1985	2.0328
50	49.7713	50.1545	50.8900	50.1114	51.8674	52.3172	50.8520	1.0375	2.0403
100	99.8775	100.6165	98.6071	99.6786	96.3648	95.7829	98.4879	1.9859	2.0163
150	151.5376	149.1030	150.4026	151.8731	150.7967	152.0225	150.9559	1.1029	0.7306
200	199.4717	201.4771	200.5696	199.1010	201.8399	199.6808	200.3567	1.1240	0.5610
250	249.6054	249.0969	249.6882	249.7211	249.1306	250.2681	249.5850	0.4338	0.1738

\*Día 1 por la mañana

\*\*Día 1 por la tarde

En la Tabla 58 se presentan los datos experimentales obtenidos de la curva de calibración de verapamil realizada el día 2 por la mañana. Para la variabilidad interdía se compararon las tres

curvas que se realizaron el primer día de la validación del método para verapamil por la mañana contra otras tres curvas que se realizaron un segundo día a la misma hora (Tabla 59).

Tabla 26. Curvas de calibración para determinar la variabilidad interdía

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Área		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
10	89109	83532	81057
50	455868	466707	444195
100	886087	855409	868692
150	1354899	1338787	1326399
200	1786156	1750086	1749373
250	2234083	2232355	2220132

Tabla 27. Variabilidad interdía del método analítico para el análisis de verapamil

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Concentración experimental ( $\mu\text{g/mL}$ )						Promedio	$\sigma$	C.V.
	Curva 1*	Curva 2*	Curva 3*	Curva 1**	Curva 2**	Curva 3**			
10	9,7366	9,5519	9,8425	9,6337	9,6667	10,0236	9,7425	0,1691	1,7353
50	49,7713	50,1545	50,8900	50,6981	52,8730	50,9916	50,8964	1,0744	2,1110
100	99,8775	100,6165	98,6071	98,8679	96,7025	98,8819	98,9256	1,3277	1,3421
150	151,5376	149,1030	150,4026	151,3587	151,2076	150,5188	150,6880	0,9015	0,5983
200	199,4717	201,4771	200,5696	199,6446	197,5851	198,2374	199,4976	1,4378	0,7207
250	249,6054	249,0969	249,6882	249,7970	251,9651	251,3468	250,2499	1,1323	0,4525

\*Día 1 por la mañana

\*\*Día 2 por la mañana

Finalmente, se calculó el área promedio de todas las curvas: las realizadas en los diferentes días junto con las realizadas a diferentes horas ( $n=9$ ) (Tabla 60).

Tabla 28. Curva de calibración promedio

Curva promedio	
Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Área
10	105705,1111
50	462359,8889
100	869615,5556
150	1324248,667
200	1744383,889
250	2179027,556
<b>m</b>	8627,3649
<b>b</b>	21423,8880
<b>r</b>	0,99994

## Determinación del límite de detección y límite de cuantificación

Primeramente se realizaron por triplicado inyecciones del blanco (solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5-DMSO al 5%) para determinar el área correspondiente a la señal ruido y se obtuvo un promedio de estas (Tabla 61).

Posteriormente, a partir de una solución de verapamil 10  $\mu\text{M}$ , se hicieron varias diluciones que se inyectaron en el equipo de CLAR hasta encontrar aquellas concentraciones que generaran una respuesta, con respecto al blanco, mayor a 3 ó 10 veces la señal ruido (Tabla 62, Figura 48).

Tabla 29. Señal ruido del blanco en la cuantificación de verapamil.

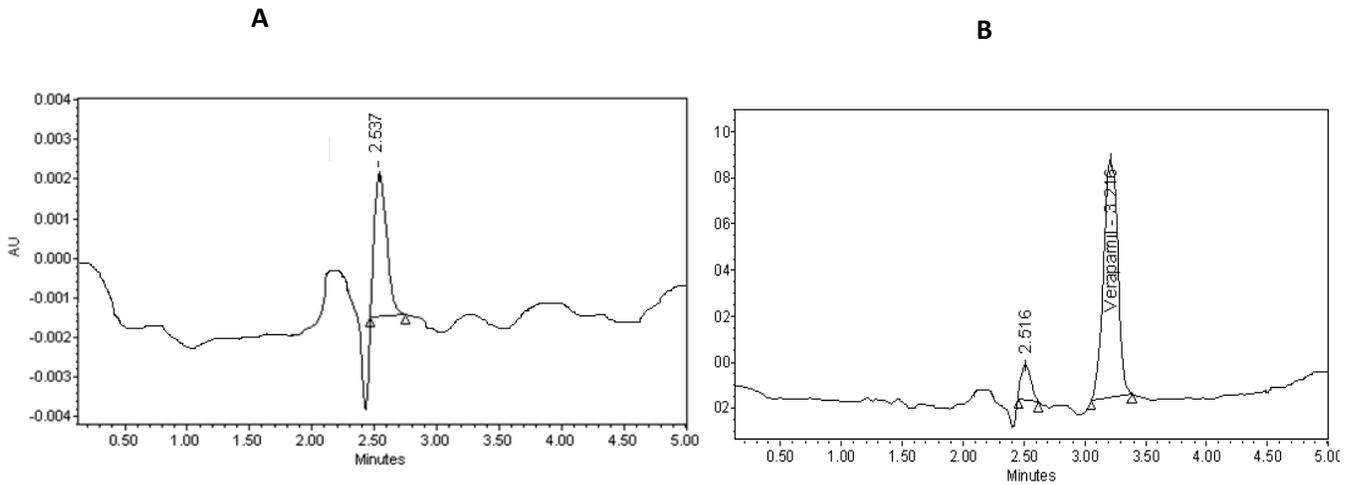
Determinación	Área Señal ruido
1	1165
2	1032
3	1303
Promedio	1166

Al inyectar una solución 10  $\mu\text{M}$  se encontró que esta fue la concentración del analito cuya señal resultó ser inmediatamente posterior a 10 veces la señal ruido con respecto al blanco, por lo tanto, el límite de cuantificación se estima en 10.0  $\mu\text{M}$ .

Después se inyectaron las otras soluciones (realizadas a partir de la solución de verapamil 10  $\mu\text{M}$ ) y se encontró que el límite de detección fue de 5.0  $\mu\text{M}$ , que es la concentración del analito cuya señal resultó ser inmediatamente posterior a 3 veces la señal ruido con respecto al blanco.

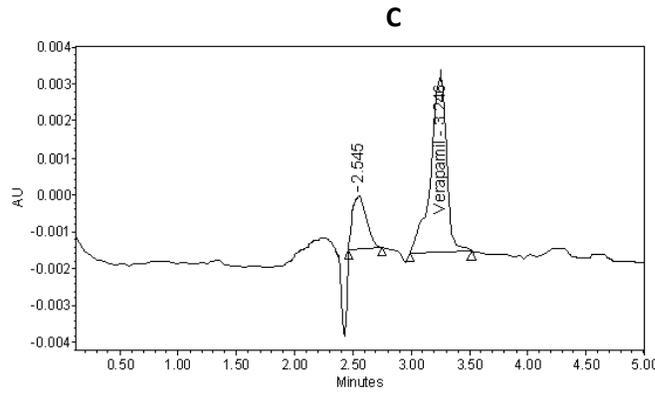
Tabla 30. Determinación del límite de detección y de cuantificación para el análisis de verapamil por CLAR.

Muestra	Área
Blanco	1166
3 * ruido	3498
10 * ruido	11660
Analito	
2.5	2062
5.0	5114
10.0	15573



Nombre	Tiempo de retención	Altura
Señal ruido	2.537	1191

Nombre	Tiempo de retención	Altura
Señal ruido	2.516	1086
Verapamil	3.216	15753

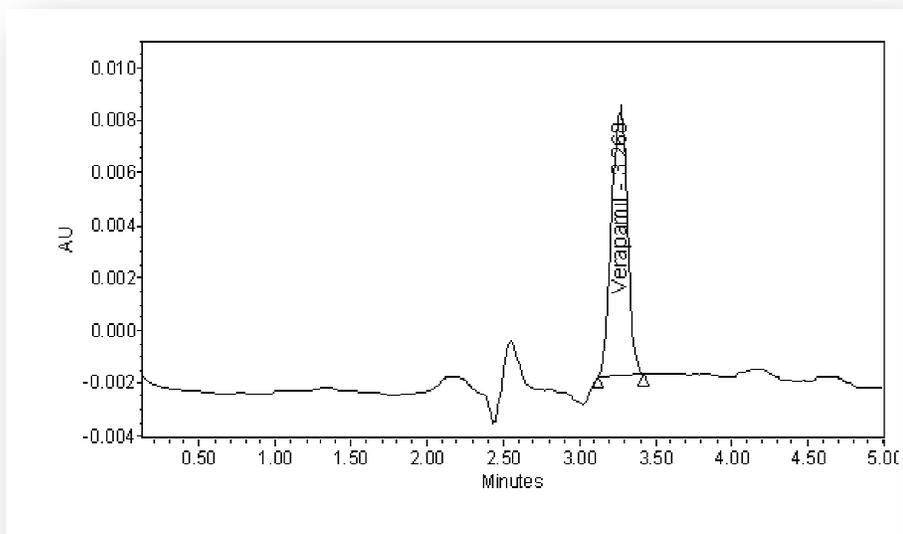


Nombre	Tiempo de retención	Altura
Señal ruido	2.545	1233
Verapamil	3.246	5114

Figura 20. LOD y LOQ de verapamil.

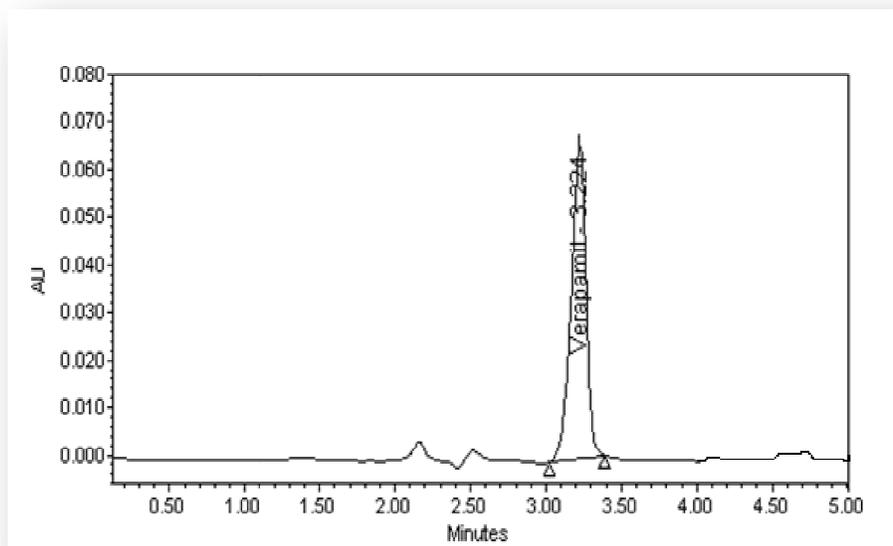
Cromatogramas del blanco (A), del límite de cuantificación (B) y del límite de detección (C) en el método analítico para el análisis de verapamil

A continuación se presentan los cromatogramas de cada una de las concentraciones de la curva de calibración (día 1 por la mañana) de verapamil.



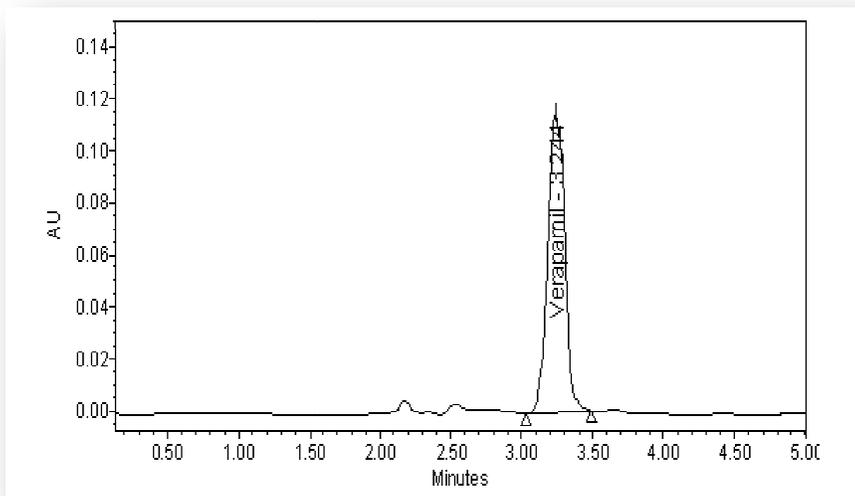
Nombre	Tiempo de retención	Area
Verapamil	3.268	149789

Figura 21 Cromatograma de verapamil 10Mm.



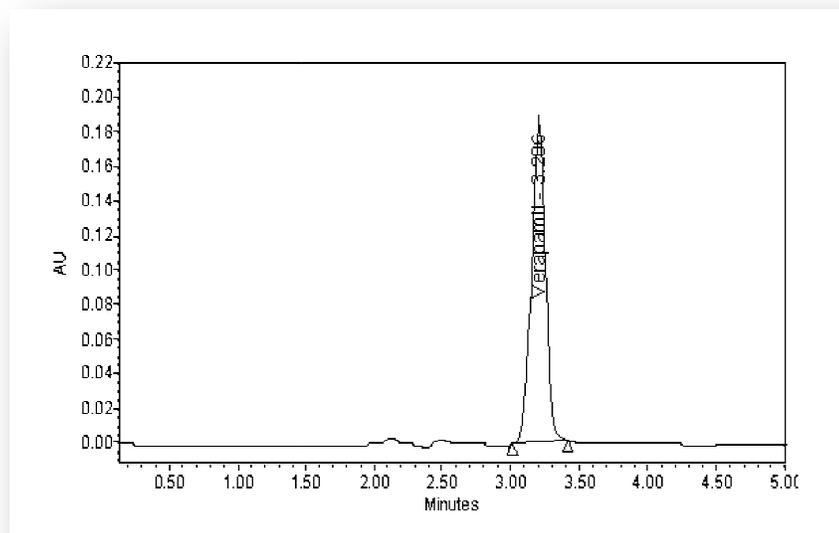
Nombre	Tiempo de retención	Area
Verapamil	3.224	459311

Figura 22. Cromatograma de verapamil 50µM



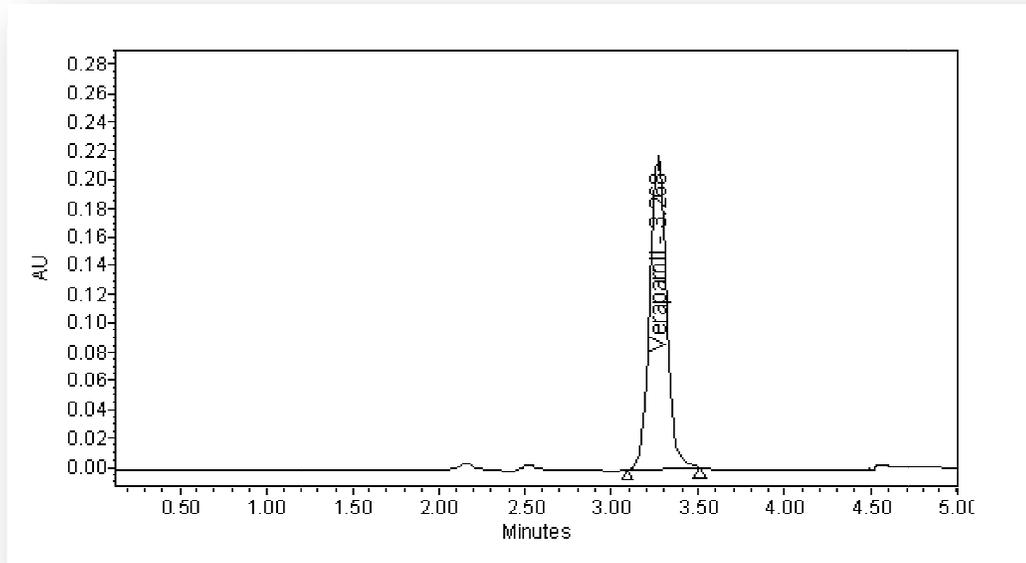
Nombre	Tiempo de retención	Area
Verapamil	3.244	852130

Figura 23. Cromatograma de verapamil 100µM



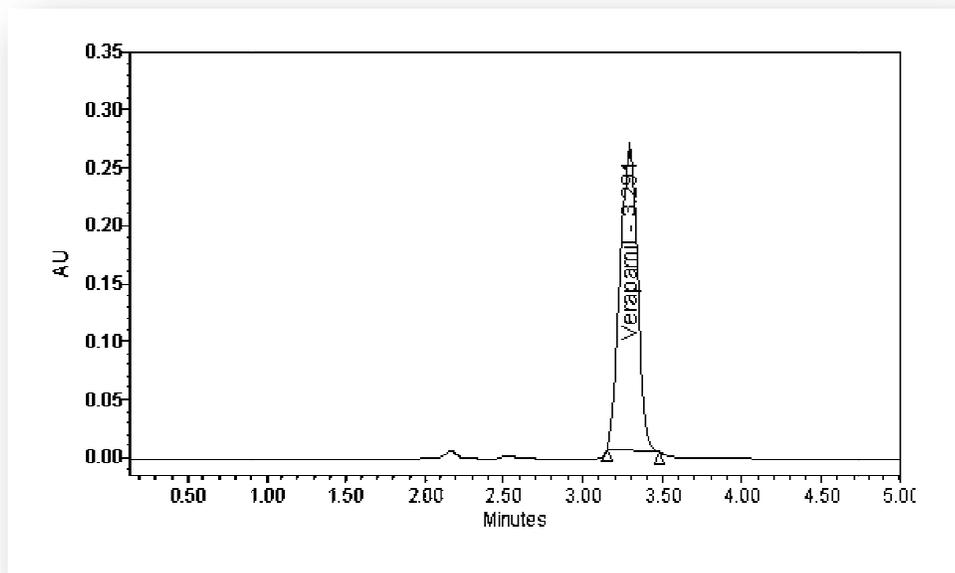
Nombre	Tiempo de retención	Area
Verapamil	3.206	1257131

Figura 24. Cromatograma de verapamil 150µM



Nombre	Tiempo de retención	Area
Verapamil	3.268	1632922

Figura 25. Cromatograma de verapamil 200µM



Nombre	Tiempo de retención	Area
Verapamil	3.291	2025956

Figura 26. Cromatograma de verapamil 250µM

## Validación del método analítico para RCB-20

En este apartado se presentan los datos experimentales obtenidos al realizar la validación del método analítico para el análisis de RCB-20 y su tratamiento para obtener los resultados de los parámetros de validación.

En la Tabla 63 se muestran las áreas obtenidas a partir del análisis de las curvas de calibración, así como la pendiente, la ordenada al origen y el coeficiente de correlación. Esta curva se realizó el día 1 por la mañana.

Tabla 31. Áreas y valores de regresión lineal de la curva de calibración de RCB-20

Concentración( $\mu\text{M}$ )	Área		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
10	94081	81271	96893
50	581625	560866	594193
100	1181301	1155053	1174699
150	1744184	1756562	1776566
200	2394266	2379992	2404885
r=	0,99979	0,99996	0,99991
m=	12005,9075	12071,1491	12079,3894
b=	-25511,1690	-44508,4116	-22650,5217
EER %	1,8044	0,8195	1,1461

En la Tabla 64 se presentan los valores de las variables de las ecuaciones 12 y 13 para calcular el EER de cada una de las curvas de calibración.

Tabla 32. Cálculo del EER.

Curva	$\hat{y}$	$\Sigma y$	$\Sigma y^2$	N	$\Sigma Xy$	$Sy/x$	%Error
1	1199091,4	5995457	1,05173E+13	6	888632960	21636,3518	1,8044
2	1186748,8	5933744	1,04052E+13	6	883844010	9724,9344	0,8195
3	1209447,2	6047236	1,0682E+13	6	895610380	13861,5182	1,1461

## Precisión y exactitud

Por medio de la ecuación 15 se calcularon las concentraciones experimentales a partir de las curvas de calibración (Tabla 65). Una vez calculadas las concentraciones, se realizó el cálculo del CV y de DER.

Tabla 33. Concentraciones experimentales obtenidas a partir de la curva patrón, desviación estándar ( $\sigma$ ), coeficiente de variación (CV) y desviación estándar relativa (DER).

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Concentración experimental ( $\mu\text{M}$ )			Promedio	$\sigma$	C.V.	%DEA
	Curva 1	Curva 2	Curva 3				
10	9,9611	10,4198	9,8965	10,0925	0,2853	2,8272	0,9248
50	50,5698	50,1505	51,0658	50,5954	0,4582	0,9056	1,1907
100	100,5182	99,3743	99,1233	99,6719	0,7435	0,7460	0,3281
150	147,4020	149,2046	148,9493	148,5186	0,9754	0,6567	0,9876
200	201,5489	200,8508	200,9651	201,1216	0,3744	0,1862	0,5608

A continuación se muestran las áreas y sus correspondientes concentraciones obtenidas para los ensayos a diferentes horas y diferentes días.

En la Tabla 66 se presentan los datos experimentales obtenidos de la curva de calibración de RCB-20 realizada el día 1 por la tarde. Para la variabilidad intradía, se compararon las curvas realizadas el día 1 por la mañana con otras tres curvas realizadas el mismo día pero por la tarde (Tabla 67).

Tabla 34. Curva de calibración de RCB-20 para determinar la variabilidad intradía

Concentración ( $\mu\text{g}/\text{M}$ )	Área		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
10	92228	84117	91902
50	576548	570145	584489
100	1232286	1216057	1232781
150	1795507	1888924	1796588
200	2464226	2462559	2455115

Tabla 35. Variabilidad intradía del método analítico para el análisis de RCB-20

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Concentración experimental ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )						Promedio	$\sigma$	C.V.
	Curva 1*	Curva 2*	Curva 3*	Curva 1**	Curva 2**	Curva 3**			
10	9,9611	10,4198	9,8965	10,2485	10,3498	9,8272	10,1172	0,2530	2,5009
50	50,5698	50,1505	51,0658	49,2307	48,7422	49,6450	49,9007	0,8630	1,7294
100	100,5182	99,3743	99,1233	102,0102	99,7643	102,0490	100,4732	1,2946	1,2885
150	147,4020	149,2046	148,9493	147,3431	152,9155	147,6237	148,9064	2,1221	1,4251
200	201,5489	200,8508	200,9651	201,1674	198,2282	200,8551	200,6026	1,1924	0,5944

\*Día 1 por la mañana

\*\*Día 1 por la tarde

En la Tabla 68 se presentan los datos experimentales obtenidos de la curva de calibración de RCB-20 realizada el día 2 por la mañana. Para la variabilidad interdía se compararon las tres curvas que se realizaron el primer día de la validación del método para RCB-20 por la mañana contra otras tres curvas que se realizaron un segundo día a la misma hora (Tabla 69).

Tabla 36. Curvas de calibración para determinar la variabilidad interdía

Concentración( $\mu\text{M}$ )	Área		
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
10	96945	101258	102231
50	586575	596810	579298
100	1231492	1244700	1244591
150	1793456	1782918	1816613
200	2464730	2472648	2461654

Tabla 37. Variabilidad interdía del método analítico para el análisis de RCB-20

Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Concentración experimental ( $\mu\text{M}$ )						Promedio	$\sigma$	C.V.
	Curva 1*	Curva 2*	Curva 3*	Curva 1**	Curva 2**	Curva 3**			
10	9,9611	10,4198	9,8965	10,1071	9,8284	10,2473	10,0767	0,2260	2,2423
50	50,5698	50,1505	51,0658	49,6551	49,9509	48,6896	50,0136	0,8149	1,6294
100	100,5182	99,3743	99,1233	101,7458	102,4075	102,2992	100,9114	1,4543	1,4412
150	147,4020	149,2046	148,9493	147,1362	145,9845	148,3931	147,8450	1,2270	0,8300
200	201,5489	200,8508	200,9651	201,3558	201,8287	200,3708	201,1534	0,5278	0,2624

\*Día 1 por la mañana

\*\*Día 2 por la mañana

Finalmente, se calculó el área promedio de todas las curvas: las realizadas en los diferentes días junto con las realizadas a diferentes horas ( $n=9$ ) (Tabla 70).

Tabla 38. Curva de calibración promedio

Curva promedio	
Concentración ( $\mu\text{M}$ )	Área
10	93436,22222
50	581172,1111
100	1212551,111
150	1794590,889
200	2440008,333
m	12305,849
b	-30844,8645
r	0,999901595

## Determinación del límite de detección y límite de cuantificación

Primeramente se realizaron por triplicado inyecciones del blanco (solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5-DMSO al 5%) para determinar el área correspondiente a la señal ruido y se obtuvo un promedio de estas (Tabla 75).

Posteriormente, a partir de una solución de verapamil 10  $\mu\text{M}$ , se hicieron varias diluciones que se inyectaron en el equipo de CLAR hasta encontrar aquellas concentraciones que generaran una respuesta, con respecto al blanco, mayor a 3 ó 10 veces la señal ruido (Tabla 71, 72. Figura 55).

Tabla 39. Señal ruido del blanco en la cuantificación de RCB-20

Determinación	Altura Señal ruido
1	2219
2	1879
3	1983
Promedio	2027

Al inyectar una solución 10  $\mu\text{M}$  se encontró que esta fue la concentración del analito cuya señal resultó ser inmediatamente posterior a 10 veces la señal ruido con respecto al blanco, por lo tanto, el límite de cuantificación se estima en 10  $\mu\text{M}$ .

Después se inyectaron las otras soluciones (realizadas a partir de la solución de verapamil 10  $\mu\text{M}$ ) y se encontró que el límite de detección fue de 2.5  $\mu\text{M}$ , que es la concentración del analito cuya señal resultó ser inmediatamente posterior a 3 veces la señal ruido con respecto al blanco

Tabla 40. Determinación del límite de detección y de cuantificación para el análisis de RCB-20 por CLAR.

Muestra	Área
Blanco	2027
3 * ruido	6081
10 * ruido	20270
Analito	
1.0	4047
2.5	4982
5.0	9963
10.0	20960

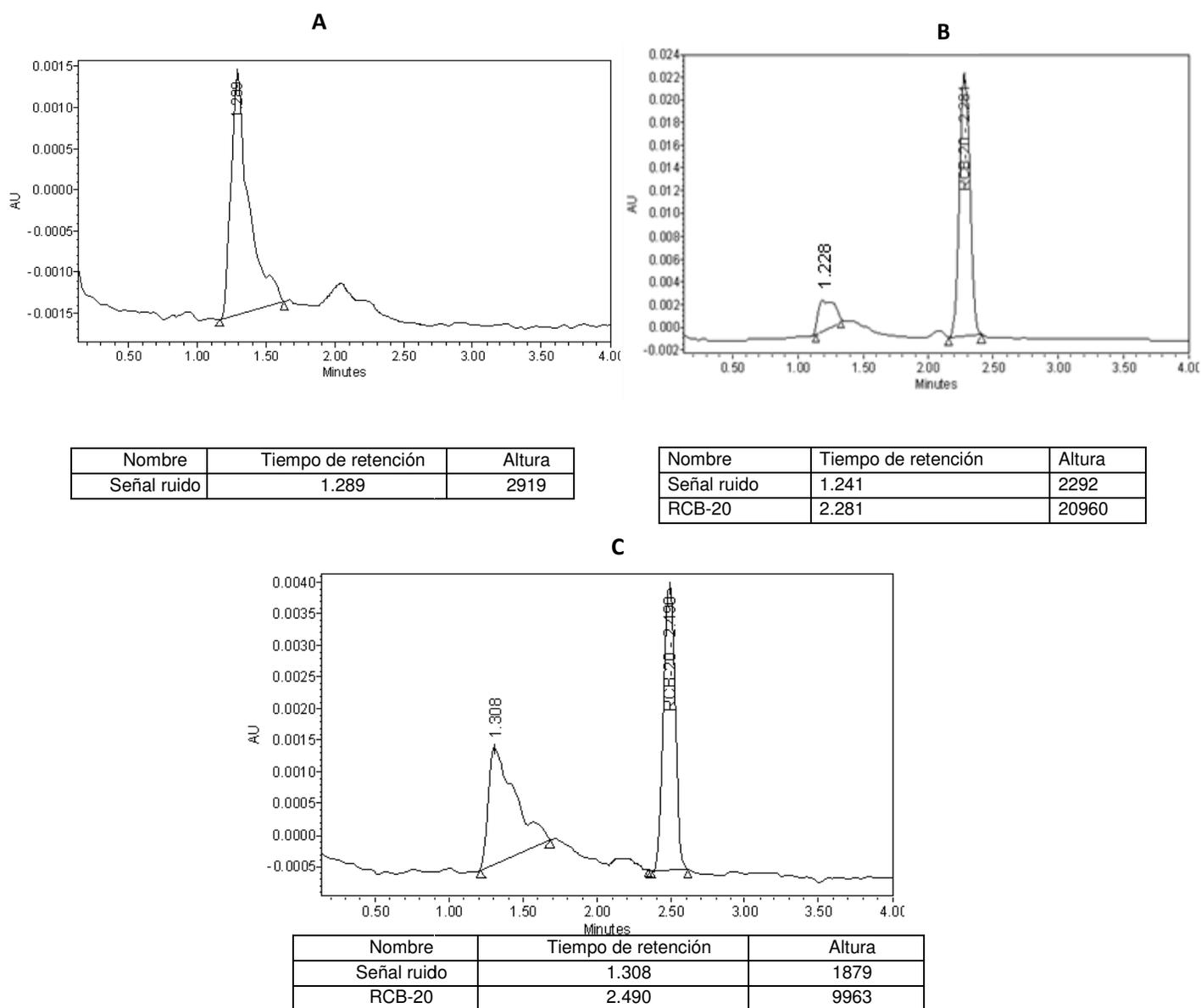
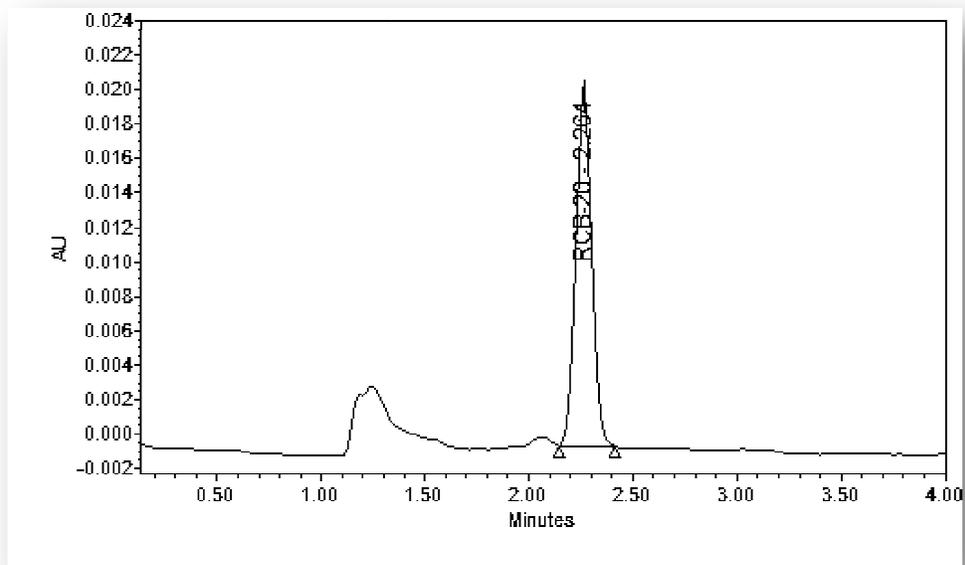


Figura 27. LOD y LOQ de RCB-20.

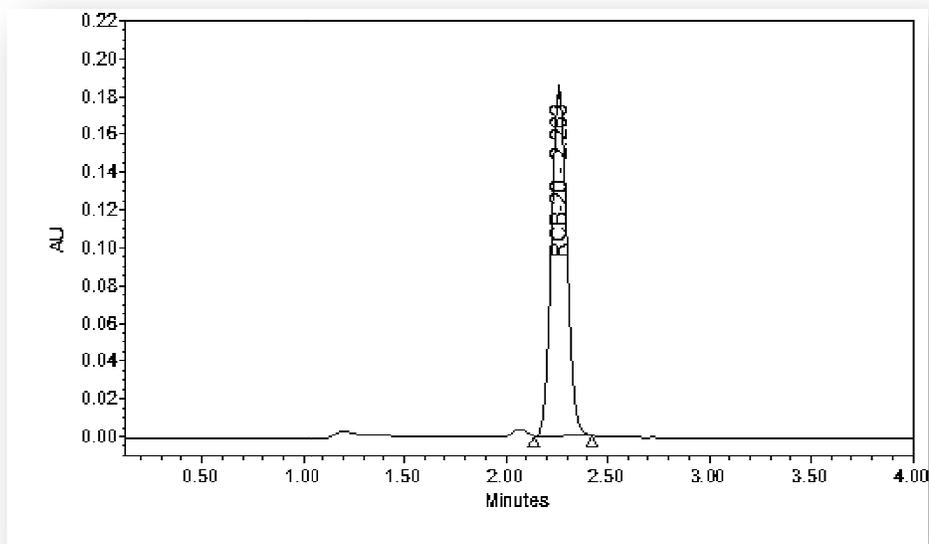
Cromatogramas del blanco (A), del límite de cuantificación (B) y del límite de detección (C) en el método analítico para el análisis de RCB-20

A continuación se presentan los cromatogramas de cada una de las concentraciones de la curva de calibración (día 1 por la mañana) de RCB-20.



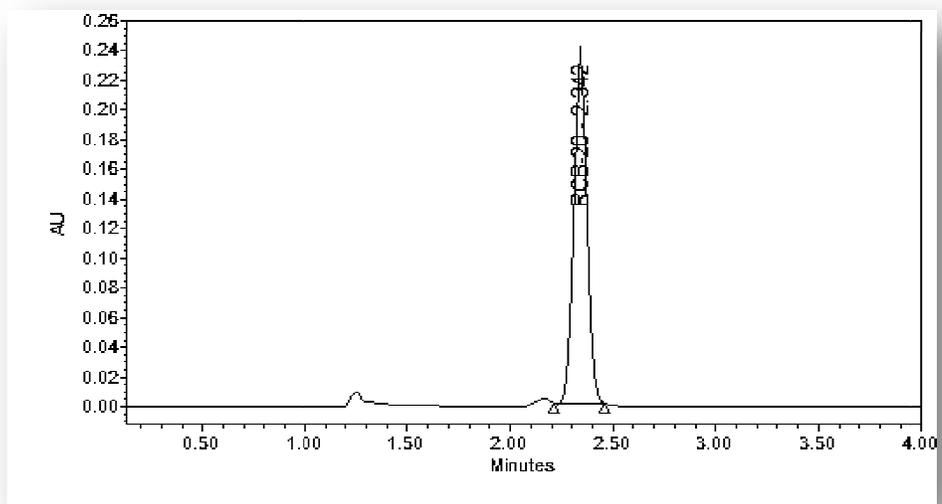
Nombre	Tiempo de retención	Area
RCB-20	2.264	94081

Figura 28. Cromatograma de RCB-20 10 $\mu$ M



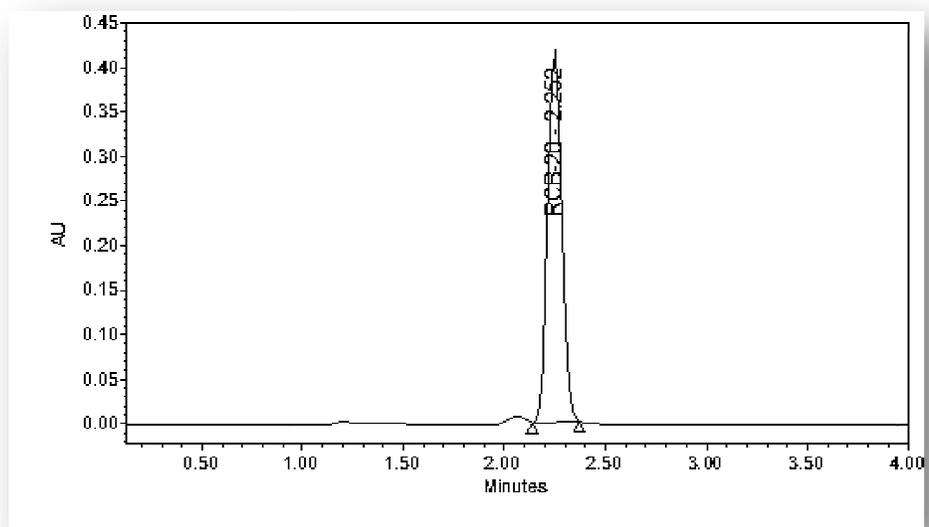
Nombre	Tiempo de retención	Area
RCB-20	2.263	581625

Figura 29. Cromatograma de RCB-20 50 $\mu$ M



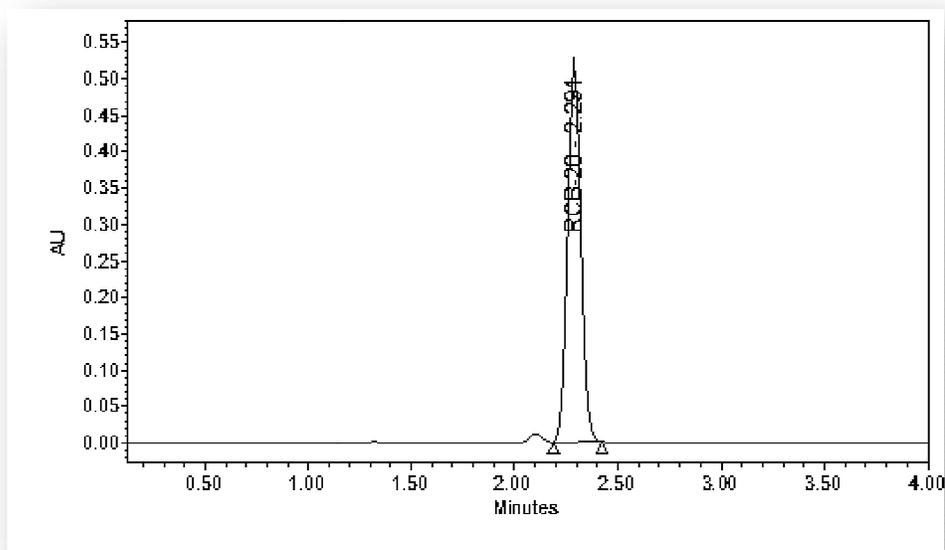
Nombre	Tiempo de retención	Area
RCB-20	2.342	1181301

Figura 30. Cromatograma de RCB-20 100 $\mu$ M



Nombre	Tiempo de retención	Area
RCB-20	2.252	1744184

Figura 31. Cromatograma de RCB-20 150 $\mu$ M



Nombre	Tiempo de retención	Area
RCB-20	2.291	2394266

Figura 32. Cromatograma de RCB-20 200 $\mu$ M

## Apéndice 3

### Estudio de los complejos de inclusión

#### Solubilidad intrínseca

Primeramente se calculó la solubilidad intrínseca en agua de RCB-20. El procedimiento se hizo por triplicado. En la Tabla 73 se muestran los datos experimentales y resultados. Las concentraciones se obtuvieron a partir de la curva patrón reportada en la Tabla 70.

Tabla 41. Solubilidad intrínseca de RCB-20 en agua.

Área RCB-20	Concentración (Mm)
21832	0,00428
23136	0,00439
20487	0,00417
<b>Promedio</b>	0,00428

#### Diagrama de solubilidad de fases

En la Tabla 74 se muestran los datos experimentales y las concentraciones obtenidas tras la realización del diagrama de solubilidad de fases.

Tabla 42. Solubilidad de fases de RCB-20 en agua. Datos experimentales y resultados.

Concentración HPBCD (mM)	Área			Concentración RCB-20 (Mm)		
	Diagrama 1	Diagrama 2	Diagrama 3	Diagrama 1	Diagrama 2	Diagrama 3
1	629220	674061	634166	0,0536	0,0573	0,0540
1,5	925434	951087	996801	0,0777	0,0798	0,0835
2	1476647	1430518	1498063	0,1225	0,1188	0,1242
2,5	1696244	1732509	1764500	0,1403	0,1586	0,1433
3	2348778	2408068	2298520	0,1934	0,1982	0,1893

En las Tablas 75 y 76 se muestran los datos experimentales y los resultados para la solubilidad intrínseca del RCB-20 en una mezcla etanol-agua 75:25 y los datos experimentales y resultados del estudio de solubilidad de fases en etanol-agua 75:25 respectivamente.

Tabla 43. Solubilidad intrínseca de RCB-20 en metanol-agua.

Área RCB-20	Concentración mM
89321	0,00976
86469	0,00953
75974	0,00868
<b>Promedio</b>	0,00933

Tabla 44. Solubilidad de fases de RCB-20 en metanol-agua. Datos experimentales y resultados.

Concentración HPBCD (mM)	Área			Concentración RCB-20 (Mm)		
	Diagrama 1	Diagrama 2	Diagrama 3	Diagrama 1	Diagrama 2	Diagrama 3
1	2516880	2593274	2614711	0,2070	0,2132	0,2150
1,5	4601569	4669227	4697689	0,3764	0,3819	0,3843
2	6503264	6752441	6710536	0,5310	0,5512	0,5478
2,5	7983215	7613654	7982472	0,6512	0,6212	0,6512
3	9913286	9825672	9931421	0,8081	0,8010	0,8096

## Apéndice 4

### Ensayos de permeabilidad

Las soluciones que se utilizaron para los ensayos de permeabilidad a la concentración de 100  $\mu\text{M}$  se prepararon como se indica en la Apéndice 2.

Para preparara la solución stock de RCB-20-CD-CI, en un tubo eppendorff de 2.0 mL se pesó el equivalente a 10 mg de RCB-20, que se disolvió en una mezcla de metanol-solución amortiguadora de fosfatos pH 6.5 con DMSO al 5% en una proporción 75:25. A partir de esta solución se realizaron las diluciones correspondientes para llegar a una concentración 100  $\mu\text{M}$  (ver Apéndice 2).

Al término del período de incubación indicado en la técnica PAMPA (Sección 6.3), se cuantificaron los compuestos por medio de CLAR, en el aceptor, donador y en la solución al equilibrio utilizando los métodos analíticos desarrollados. Para la cuantificación se inyectó un volumen de 10  $\mu\text{L}$  en el equipo, se registró el área obtenida y con esta, se calculó la concentración por medio de la curva patrón promedio que se obtuvo durante la validación (Tablas 74). Las condiciones cromatográficas con las que se analizó cada compuesto fueron las que se establecieron durante el desarrollo del método analítico de cada uno de los compuestos. Después se calculó la permeabilidad efectiva (Ecuación 8) para cada caso.

A continuación se muestran las áreas y sus respectivas concentraciones así como la permeabilidad calculada para los controles, para el RCB-20 y para el RCB-20-CD-CI (Tabla 77).

Tabla 45. Resultados de PAMPA para cimetidina

Compartimento	Área			Concentración ( $\mu\text{M}$ )		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Donador	59597	61589	60467	90,1328	96,3307	92,8397
Aceptor	29963	25361	20583	0,0000	0,0000	0,0000
Equilibrio	42744	43115	42857	37,6966	38,8509	38,0482

En este caso, las áreas registradas para el aceptor, en los tres ensayos, es menor al límite de cuantificación establecido para el método de analítico para el análisis de cimetidina. Por lo tanto, no es posible realizar la cuantificación de este compuesto en el aceptor.

Por lo tanto,  $P_e$  ( $\times 10^{-6}$  cm/s) de cimetidina: 0.0

Tabla 46. Resultados de PAMPA para propranolol

Compartimento	Área			Concentración (µM)		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Donador	8553440	877933	804920	63,5531	65,2400	59,7643
Aceptor	369908	412359	389571	27,1404	30,3240	28,6150
Equilibrio	460770	530378	495003	33,9546	39,1749	36,5219
logPe				-4,7588	-4,7921	-4,7798
Pe (x 10 <sup>-6</sup> cm/s)				17.4263	16.1406	16.6035

Por lo tanto, Pe (x 10<sup>-6</sup> cm/s) promedio de propranolol: 16.72

Tabla 47. Resultados de PAMPA para verapamil

Compartimento	Área			Concentración (µM)		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Donador	498935	491341	460661	55,3484	54,4682	50,9121
Aceptor	337890	321108	339656	36,6817	34,7365	36,8864
Equilibrio	362901	339956	362759	39,5807	36,9211	39,5642
log Pe				-4,5472	-4,5132	-4,5343
Pe (x 10 <sup>-6</sup> cm/s)				28.3633	30.6783	29.2199

Por lo tanto, Pe (x 10<sup>-6</sup> cm/s) promedio de verapamil: 29.4205

Tabla 48. Resultados de PAMPA para RCB-20

Compartimento	Área			Concentración (µM)		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Donador	1030796	1048285	1017675	86.2712	87.6924	85.2050
Aceptor	118639	111273	117271	12.1474	11.5488	12.0362
Equilibrio	410596	421329	434526	35.8724	36.7446	37.8170
log Pe				-5,3481	-5,3878	-5,3812
Pe (x 10 <sup>-6</sup> cm/s)				4,4861	4,0941	4,1572

Por lo tanto, Pe (x 10<sup>-6</sup> cm/s) promedio de RCB-20: 4.2458

Tabla 49. Resultados de PAMPA para RCB-20-CD-CI

Compartimento	Área			Concentración (µM)		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Donador	713962	704125	739206	60.5246	59.7252	62.57600
Aceptor	156870	153361	161985	15.2541	14.9689	15.6697
Equilibrio	334653	293748	255766	35.1401	38.3124	35.9689
log Pe				-5,2092	-5,2695	-5,2071
Pe (x 10 <sup>-6</sup> cm/s)				6,1776	5,3761	6,2074

Por lo tanto, Pe (x 10<sup>-6</sup> cm/s) promedio de RCB-20-CD-CI: 5.92

### Comparación de medias experimentales de la permeación de RCB-20 Y RCB-20-CD-CI

Para determinar si existe diferencia significativa entre la permeación del RCB-20 con respecto al RCB-20 en complejo de inclusión, se realizó la comparación de las dos medias experimentales (Tabla 82).

En este caso tenemos dos medias muestrales:

$$\bar{x}_1 \text{ para RCB-20-CD-CI}$$

$$\bar{x}_2 \text{ para RCB-20}$$

Tomando como hipótesis nula que las dos muestras presenten el mismo resultado de permeación  $H_0: \mu_1 = \mu_2$  se necesita probar si  $(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)$  difiere significativamente de cero. Si las dos muestras tienen desviaciones estándar que no sean significativamente diferentes, se puede calcular una estimación conjunta de la desviación estándar  $s$ , a partir de las desviaciones estándar individuales  $s_1$  y  $s_2$  (ecuación 18):

$$s^2 = \frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{(n_1+n_2-2)} \quad \text{Ecuación (18)}$$

Para decidir si la diferencia entre las medias muestrales es significativa, se calcula el estadístico  $t$  (Ecuación 19).

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad \text{Ecuación (19)}$$

Tabla 50. Parámetros estadísticos de los ensayos de RCB-20

RCB-20-CD-CI			RCB-20		
$\bar{x}_1$	$s_1$	$S_1^2$	$\bar{x}_2$	$s_2$	$S_2^2$
$5,92 \times 10^{-6}$	$4,72 \times 10^{-7}$	$2,22 \times 10^{-13}$	$4,25 \times 10^{-06}$	$2,10 \times 10^{-07}$	$4,43 \times 10^{-14}$

Al calcular los estadísticos  $s$  y  $t$  como se mencionó anteriormente (ecuaciones 18 y 19) se obtiene que:

$$t_{\text{calculada}} = 5.62$$

$$t_{4 (\alpha 0.05)} = 2.78$$

Como  $t_{\text{calculada}}$  es mayor que  $t_{4 (\alpha 0.05)}$ , se rechaza  $H_0$ , por lo tanto, existe diferencia significativa entre la permeación de RCB-20-CD-CI y la de RCB-20.

Filename: A9  
Directory: C:\Users\HP Pavilion dv6500\Desktop\DOC  
Template: C:\Users\HP Pavilion  
dv6500\AppData\Roaming\Microsoft\Templates\Normal.dotm  
Title:  
Subject:  
Author: WinuE  
Keywords:  
Comments:  
Creation Date: 26/06/2009 05:24:00 p.m.  
Change Number: 2  
Last Saved On: 26/06/2009 05:24:00 p.m.  
Last Saved By: HP Pavilion dv6500  
Total Editing Time: 0 Minutes  
Last Printed On: 26/06/2009 06:16:00 p.m.  
As of Last Complete Printing  
Number of Pages: 45  
Number of Words: 8,005 (approx.)  
Number of Characters: 44,029 (approx.)