



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO POR CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE
ALTA RESOLUCIÓN PARA CUANTIFICAR MEBENDAZOL
EN PLASMA HUMANO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

WILLIAMS DAVID HERNÁNDEZ GARCÍA



Ciudad Universitaria, CDMX

Junio 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Helgi Helene Jung Cook.
VOCAL: M. en C. Lauro Misael del Rivero Ramírez.
SECRETARIO: Dra. Nelly Norma Castro Torres.
1er. SUPLENTE: M. en C. Araceli Salazar Pereyra.
2° SUPLENTE: M. en C. María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 112 DEL EDIFICIO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA DEL CONJUNTO "E" DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Helgi Helene Jung Cook

SUPERVISOR TÉCNICO:

María de Lourdes Beatriz Mayet Cruz

SUSTENTANTE:

Williams David Hernández García



Lista de abreviaturas.

° C	Grados Celsius.
%	Porcentaje o por ciento.
% m/m	Por ciento de masa en masa.
% m/v	Por ciento de masa en volumen.
% v/v	Por ciento de volumen en volumen
λ	Longitud de onda.
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda máxima.
$\mu\text{g/mL}$	Microgramo por mililitro.
μg	Microgramo.
μL	Microlitro.
\bar{X}	Promedio.
<	Menor que.
\leq	Menor o igual que.
ABZ	Albendazol.
Ac.	Acuoso o fase acuosa.
ACN	Acetonitrilo.
b	Intercepto (ordenada al origen).
BCS	Del inglés <i>Biopharmaceutic Classification System</i> : Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.
BHE	Barrera hematoencefálica.
CH_2Cl_2	Diclorometano.
CHCl_3	Cloroformo.
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
$C_{\text{máx}}$	Concentración plasmática máxima.
CV%	Por ciento de coeficiente de variación.
D.E.	Desviación Estándar.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
E.I.	Estándar Interno.
FDA	Del inglés <i>Food and Drug Administration</i> .



F.E.	Fase estacionaria.
F.M.	Fase móvil.
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.
g	Gramo(s).
G.I.	Gastrointestinal.
g/mol	Gramo por mol.
h	Hora(s).
H ₂ O	Agua.
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico.
HPLC	Del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i> : ver CLAR.
ICH	Del inglés <i>International Conference of Harmonization</i> : Conferencia Internacional de Armonización.
K ₂ HPO ₄	Fosfato dibásico de potasio.
k _d	Constante de distribución.
KH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de potasio.
KOH	Hidróxido de potasio.
L/Kg	Litros por kilogramo de peso.
LIC	Límite inferior de cuantificación.
Log P	Coeficiente de partición.
LSC	Límite superior de cuantificación.
m	Pendiente de la recta.
MBZ	Mebendazol.
MCA	Muestra control alta.
MCB	Muestra control baja.
MCD	Muestra control diluida.
MCM	Muestra control media.
MeOH	Metanol.
mg	Miligramo(s).
mg/L	Miligramo por litro.
mg/mL	Miligramo por mililitro.



min	Minuto(s).
mL	Mililitro(s).
mL/min	Mililitro por minuto.
mmHg	Milímetros de mercurio.
N	Concentración normal (Normalidad).
N ₂	Nitrógeno molecular.
NaOH	Hidróxido de sodio.
nm	Nanómetros.
ng/mL	Nanogramos por mililitro.
NOM	Norma Oficial Mexicana.
org	Orgánico o fase orgánica.
p.e.	Punto de ebullición.
p.f.	Punto de fusión.
pH	Potencial de Hidrógeno.
pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida.
PZQ	Praziquantel.
r	Coefficiente de correlación.
rpm	Revoluciones por minuto.
s	Segundos.
s.f.	Sin fecha.
SNC	Sistema Nervioso Central.
Sol. C.	Solución de carga.
t _{1/2}	Tiempo de vida media.
t _m	Tiempo muerto.
t _R	Tiempo de retención.
t _R '	Tiempo de retención corregido.
UV	Ultravioleta / Espectro ultravioleta.



Índice General

Lista de abreviaturas.....	I
Índice de tablas.....	VII
Índice de figuras.....	VIII
Índice de Esquemas.....	IX
1. Introducción.....	1
2. Marco Teórico.....	2
2.1 Reposicionamiento de fármacos.....	2
2.2 Mebendazol.....	4
2.2.1 Descripción general.....	4
2.2.2 Propiedades físicas y químicas.....	4
2.2.3 Propiedades farmacocinéticas.....	5
2.2.4 Farmacodinamia.....	6
2.3 Aspectos generales de la Cromatografía.....	7
2.3.1 Cromatografía de líquidos.....	8
2.3.2 Tipos de cromatografía líquida.....	10
2.4 Preparación de muestras.....	11
2.4.1 Técnicas de extracción.....	12
2.5 Validación de métodos analíticos para muestras biológicas.....	15
3. Objetivos.....	22
3.1 Objetivo General.....	22
3.2 Objetivos Particulares.....	22
4. Metodología experimental.....	23
4.1 Reactivos, materiales, equipos e instrumentos.....	23
4.1.1 Reactivos.....	23
4.1.2 Materiales.....	23
4.1.3 Equipos e instrumentos.....	24
4.2 Preparación de soluciones.....	25
4.2.1 Fase Móvil (F.M.). Solución de Metanol:Agua (0.1% Ácido Fórmico), pH 5.00 (60:40).....	25
4.2.2 Solución amortiguadora de fosfatos pH 5.00.....	25



4.2.3	Solución amortiguadora de fosfatos pH 5.50.....	25
4.2.5	Mezcla de disolventes para extracción líquido-líquido	26
4.2.6	Solución de Hidróxido de Potasio al 45% m/v.	26
4.2.7	Solución de Hidróxido de Sodio 2 N.....	26
4.2.8	Solución MeOH:H₂O (20:80).....	26
4.2.9	Solución de Ácido Fosfórico 1:3.....	26
4.2.10	Soluciones de MBZ.....	26
4.2.10.1	Solución patrón “a”	26
4.2.10.2	Soluciones stock “b – d”.....	27
4.2.10.3	Soluciones de carga (Sol. C).....	27
4.2.11	Soluciones de Referencia para calcular el recobro de MBZ.....	28
4.2.12	Soluciones de ABZ.....	28
4.2.12.1	Solución patrón “e”.....	28
4.2.12.2	Soluciones de trabajo “f – g”.....	29
4.2.13	Solución para evaluar el desempeño del sistema.	29
4.2.14	Mezcla de Matriz Biológica.	29
4.2.15	Preparación de las muestras de MBZ en plasma.....	29
4.2	Desarrollo de la Metodología.	30
4.3.1	Condiciones analíticas de trabajo.....	30
4.3.1.1	Selección de Longitud de Onda (λ) de Análisis.....	30
4.3.1.2	Selección de Columna cromatográfica.....	31
4.3.1.3	Selección de Fase Móvil (F.M).....	31
4.3.1.4	Selección de volumen de inyección.	31
4.3.1.5	Selección de velocidad de flujo.....	32
4.3.2	Condiciones de extracción de la muestra.	32
4.3.2.1	Extracción líquido-líquido.....	32
4.3.2.1.1	Selección del disolvente de extracción.	32
4.3.2.1.2	Selección del volumen de disolvente.	32
4.3.2.1.3	Selección de la velocidad de agitación.	33
4.3.2.1.4	Selección de agente precipitante de proteínas.	33
4.3.2.2	Extracción en fase sólida.	33



4.4	Evaluación del desempeño del método.	34
4.4.1	Selectividad.	34
4.4.2	Curva de Calibración.	35
4.4.3	Precisión.	35
4.4.3.1	<i>Repetibilidad.</i>	36
4.4.3.2	<i>Reproducibilidad (repetibilidad intermedia).</i>	36
4.4.4	Exactitud.	36
4.4.5	Estabilidad a corto plazo.	37
4.4.6	Límite inferior de cuantificación.	37
5.	Resultados y Discusión.	38
5.1	Desarrollo del método.	38
5.1.1	Condiciones analíticas.	38
5.1.1.1	<i>Selección de Longitud de Onda de Análisis.</i>	38
5.1.1.2	<i>Selección de Columna Cromatográfica.</i>	38
5.1.1.3	<i>Selección de la Fase Móvil.</i>	39
5.1.1.4	<i>Selección del volumen de inyección.</i>	40
5.1.1.5	<i>Selección de la velocidad de flujo.</i>	40
5.1.2	Condiciones de extracción.	41
5.1.2.1	<i>Extracción líquido-líquido.</i>	41
5.1.2.2	<i>Extracción en Fase Sólida.</i>	44
5.2	Evaluación del desempeño del método.	50
5.2.1	Selectividad.	50
5.2.2	Curva de Calibración.	51
5.2.3	Precisión	53
5.2.3.1	<i>Repetibilidad.</i>	53
5.2.3.2	<i>Reproducibilidad (precisión intermedia).</i>	53
5.2.4	Exactitud.	55
5.2.5	Estabilidad a corto plazo.	55
5.2.6	Límite inferior de cuantificación.	56
6.	Conclusiones.	57
7.	Perspectivas.	58
8.	Referencias bibliográficas.	59



Índice de tablas.

Tabla 1. Comparación de parámetros para la Validación de Métodos Analíticos con muestras biológicas.....	16
Tabla 2. Preparación de las Sol. C. de MBZ en metanol.....	27
Tabla 3. Preparación de las muestras para las curvas de calibración y para las muestras control.....	30
Tabla 4. Composición de Fases Móviles evaluadas en el Desarrollo del método.	31
Tabla 5. Condiciones evaluadas para la extracción en fase sólida.	34
Tabla 6. Condiciones analíticas para la cuantificación de MBZ en muestras plasmáticas.	40
Tabla 7. Condiciones de extracción por la técnica Líquido-Líquido.....	41
Tabla 8. Condiciones de extracción en Fase Sólida.....	44
Tabla 9. Comparación de diferentes métodos para la cuantificación de MBZ en plasma humano.....	48
Tabla 10. Porcentaje de respuesta de las muestras blanco de plasma para señales cercanas a los t_R del MBZ y E.I.	50
Tabla 11. Parámetros de regresión lineal para las tres curvas de calibración.	52
Tabla 12. Porcentaje de desviación de la concentración recuperada de cada nivel respecto a la concentración nominal.....	53
Tabla 13. Datos de concentración recuperada para evaluar la Repetibilidad del método.	54
Tabla 14. Datos de Concentración recuperada de dos corridas analíticas diferentes para evaluar Reproducibilidad.....	54
Tabla 15. Datos de % desviación para evaluar la exactitud del método.	55
Tabla 16. Estabilidad a corto plazo de las muestras de plasma.....	55
Tabla 17. Evaluación de precisión y exactitud para el LIC.	56



Índice de figuras.

Figura 1. Estructura química del mebendazol	4
Figura 2. Estructura química del MBZ y sus metabolitos	6
Figura 3. Estructura de la Tubulina	7
Figura 4. Diagrama esquemático de un cromatógrafo de líquidos	9
Figura 5. Equipo de extracción en fase sólida.....	13
Figura 6. Proceso de extracción en fase sólida.....	14
Figura 7. Espectro de absorción del MBZ en solución en el rango UV.	38
Figura 8. Cromatograma correspondiente a una muestra de MBZ en solución, utilizando la Columna Gemini – Phenomenex.....	39
Figura 9. Cromatograma correspondiente a una muestra de MBZ en solución, utilizando la Columna Zorbax Eclipse XDB – Agilent.	39
Figura 10. Cromatograma correspondiente a una muestra blanco de plasma tratada bajo las condiciones de extracción líquido-líquido.	43
Figura 11. Cromatograma correspondiente a una muestra del LSC en plasma tratada bajo las condiciones de extracción líquido-líquido.	43
Figura 12. Cromatograma correspondiente a una muestra del LIC en plasma tratada bajo las condiciones de extracción líquido-líquido.	43
Figura 13. Cromatograma típico de una muestra blanco de plasma tratada bajo las condiciones de Extracción en Fase Sólida.....	47
Figura 14. Cromatograma típico de una muestra correspondiente al LSC en plasma tratada bajo las condiciones de Extracción en Fase Sólida.	47
Figura 15. Cromatograma típico de una muestra correspondiente al LIC en plasma tratada bajo las condiciones de Extracción en Fase Sólida.	47
Figura 16. Cromatograma correspondiente a una muestra blanco de pool de plasma para evaluar la Selectividad del método.	51
Figura 17. Cromatograma correspondiente a una muestra LIC en plasma para evaluar la Selectividad del método.....	51
Figura 18. Curva de calibración de respuesta promedio en función de la concentración (n=3).....	52



Índice de Esquemas.

Esquema 1. Proceso de extracción de MBZ de las muestras de plasma con la técnica Líquido-Líquido.	42
Esquema 2. Proceso de extracción de MBZ de las muestras de plasma con la técnica en Fase Sólida.	46



1. Introducción.

El mebendazol (MBZ) es un compuesto de la familia de los benzimidazoles empleado en la clínica como agente antiparasitario de amplio espectro. A su vez, a esta molécula se le ha descrito actividad anticancerígena al ser evaluada en diferentes líneas celulares como las de pulmón, de ovario, de colon y gliales, siendo estas últimas las que presentan resultados más relevantes.

Entre las propiedades fisicoquímicas del MBZ se encuentran sus dos pK_a : 8.44 y 3.39, un LogP de 2.83, punto de fusión de 288.5 °C y se caracteriza por tener baja solubilidad en agua y alta permeabilidad, siendo considerado como fármaco *Clase II* del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.

Dado que el MBZ presenta baja solubilidad acuosa, presenta también baja biodisponibilidad, por lo que es importante determinar los niveles plasmáticos tanto de los productos existentes en el mercado nacional como de las nuevas formulaciones. Para ello se necesita contar con métodos analíticos sensibles y confiables para la cuantificación del MBZ en plasma. Sin embargo, la información publicada para llevar a cabo su cuantificación es escasa.

Por lo anterior, se consideró importante desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en Fase Reversa, con detección UV para la cuantificación de MBZ en plasma humano.



2. Marco Teórico.

Las infestaciones en humanos representan uno de los problemas de salud más importantes en el mundo (Gomes & Nagaraju, 2001), con un alto impacto económico. Entre las especies de parásitos responsables de estas infestaciones se encuentran los nematodos (localizados en intestino o tejidos), y los platelmintos o lombrices como los cestodos o las tenias (Edwards & Breckenridge, 1988), siendo la equinococosis una de las principales infecciones causadas por cestodos. (Eckert & Deplazes, 2004; Liu et al., 2014). Para el tratamiento de estos padecimientos se utilizan fármacos antiparasitarios, siendo de los más utilizados el mebendazol (MBZ), el albendazol (ABZ) y el praziquantel (PZQ) (Edwards & Breckenridge, 1988). Todos ellos presentan un amplio espectro de acción, lo cual indica que existen blancos moleculares comunes entre las especies para que estos fármacos ejerzan su actividad.

2.1 Reposicionamiento de fármacos

El descubrimiento de las bases moleculares de una enfermedad provee oportunidades sin precedentes para trasladar los hallazgos de la investigación farmacológica hacia nuevos tratamientos a utilizar en la clínica.

El desarrollo de nuevas moléculas con actividad biológica requiere mucho tiempo, costo y esfuerzo, debido al número de estudios preclínicos y clínicos necesarios para asegurar su seguridad y eficacia, por lo que una molécula tarda aproximadamente 14 años en ser aprobada. El *reposicionamiento de fármacos* es una estrategia que se utiliza para disminuir el tiempo y costo de inversión en la investigación clínica para nuevos tratamientos de enfermedades bien caracterizadas: La ventaja es que estas moléculas ya han sido estudiadas en humanos y se tiene información suficiente sobre su farmacología, toxicidad y potencia. De este modo, el fármaco candidato para reposicionamiento está disponible para llevar a cabo un estudio clínico de manera rápida, por lo cual su aprobación sanitaria para la integración al sistema de salud se da igualmente en corto tiempo (National Center for Advancing Translational Sciences, 2016).



El cáncer es un síndrome contra el cual se ha buscado ampliamente reposicionar fármacos con la finalidad de tener terapias más accesibles y con baja tasa de efectos adversos respecto a los antineoplásicos utilizados en clínica. Se buscan tratamientos con los cuales se pueda atacar a las células malignas sin daño a células sanas.

El diseño de moduladores de la tubulina es una estrategia utilizada para el desarrollo de fármacos en química medicinal con aplicación no sólo a cáncer, sino leishmaniasis, infecciones fúngicas y microbianas. Es por ello que los microtúbulos actualmente son un blanco molecular contra los cuales se busca especializar la terapia (Jordan & Wilson, 2004; Pasquier & Kavallaris, 2008). Algunos compuestos con propiedades antimitóticas (que evitan o detienen la división celular), como el caso de los benzimidazoles, se han señalado como candidatos en terapias anticancerígenas (Pantziarka, Bouche, Meheus, Sukhatme, & Sukhatme, 2014) por el alto grado de especificidad de acción sobre las subunidades de la tubulina. (Torres et al., 2015).

Una aplicación que se ha buscado es tener compuestos con actividad anticancerígena que sean capaces de atravesar barrera hematoencefálica (BHE) para el tratamiento de cáncer en el sistema nervioso central (SNC) (Bai et al., 2015). Sin embargo, se sabe que sólo aproximadamente 2% de los fármacos conocidos tiene dicha característica (Chico, Van Eldik, & Watterson, 2009), siendo una limitante para su uso en la clínica.

Como tal, el MBZ ha sido estudiado como agente anticancerígeno, siendo el principal blanco molecular los microtúbulos de las células dañadas. El MBZ ha sido efectivo en líneas celulares de cáncer de colon (Nygren, Fryknäs, Ågerup, & Larsson, 2013), de pulmón (Mukhopadhyay, Sasaki, Ramesh, & Roth, 2002), en carcinoma adrenocortical (Martarelli, Pompei, Baldi, & Mazzoni, 2008), en melanomas (Doudican, Rodriguez, Osman, & Orlow, 2008) y en glioblastoma (Bai et al., 2015; Bai, Staedtke, Aprhys, Gallia, & Riggins, 2011; Bai, Staedtke, & Riggins, 2011) de manera dosis y tiempo dependientes.

Algunos mecanismos de acción que se han señalado para el MBZ como agente antineoplásico son la interacción con los microtúbulos y por tanto las subunidades



de tubulina, principalmente la β , la interacción con proteincinasas (BCR-ABL y BRAF) y arrojando el ciclo celular en las fases G₂-M e induciendo apoptosis (Mukhopadhyay et al., 2002; Nygren et al., 2013).

2.2 Mebendazol.

2.2.1 Descripción general.

El mebendazol (metil 5-benzoil-1H-benzimidazol-2-il carbamato) (figura 1) es un benzimidazol de fórmula molecular C₁₆H₁₃N₃O₃, con masa molecular de 295.30 g/mol. Es comúnmente utilizado en la clínica en tabletas de 100 mg como agente antiparasitario contra diversas infecciones intestinales múltiples (PubChem, 2017). Se encuentra enlistado en el *grupo 6* (enfermedades infecciosas y parasitarias) del cuadro básico de medicamentos.

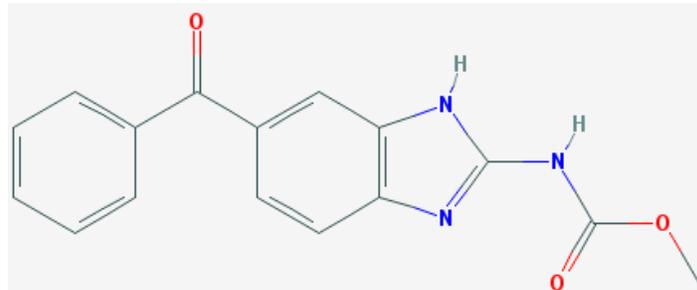


Figura 1. Estructura química del mebendazol

2.2.2 Propiedades físicas y químicas.

- *Apariencia*: Polvo blanco o ligeramente amarillo (PubChem, 2017).
- *Punto de Fusión (p.f.)*: 288.5 °C (PubChem, 2017).
- *Constante de disociación ácida (pKa)*: 8.44 y 3.93. Valores predichos mediante ChemAxon (DrugBank, 2016).
- *Coefficiente de partición (log P)*: 2.83, reportado experimentalmente por Sangster en 1994 (DrugBank, 2016).
- *Solubilidad*: 71.3 mg/L en agua a 25 °C, reportado por Yalkowsky, Sh & Dannenfelser, Rm (1992) (DrugBank, 2016). Es soluble en ácido fórmico y prácticamente insoluble en etanol, éter etílico y cloroformo (PubChem, 2017).
- *Presión de vapor*: 5.3×10^{-11} mmHg a 25 °C (PubChem, 2017).



2.2.3 Propiedades farmacocinéticas.

El MBZ presenta dos propiedades muy características, las cuales son una baja solubilidad en agua y una alta permeabilidad, por lo que se considera en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (BCS) como un fármaco de *Clase II* (TRSL Inc, s.f). Al tener baja solubilidad acuosa, el MBZ presenta dificultades en la absorción en todas las especies que se ha estudiado, reportándose una biodisponibilidad entre 5-10%, la cual se ve incrementada al ingerirse con alimentos grasos. (Dayan, 2003; DrugBank, 2016).

Una vez absorbido, el fármaco se une extensamente a proteínas plasmáticas, siendo alrededor de 90-95% (DrugBank, 2016). El volumen de distribución es de aproximadamente 1.0 L/Kg (Dayan, 2003). La molécula tiene una elevada tasa de metabolismo hepático e intestinal, generándose el principal metabolito *2-amino-5-benzoilbenzimidazol*, pero también se producen los hidroxí- e hidroxiamino-metabolitos (Figura 2) (DrugBank, 2016). Todos los metabolitos carecen de actividad antiparasitaria. El MBZ presenta un tiempo de vida media de eliminación en el rango de 2.8 a 9 horas (Dayan, 2003). La principal vía de eliminación es por heces de forma inalterada y una parte pequeña como metabolito. Únicamente alrededor del 2% de la dosis administrada es eliminada vía renal (DrugBank, 2016). A pesar de su baja absorción en el tracto gastrointestinal (G.I.) y su elevada tasa de metabolismo, la fracción que llega a torrente sanguíneo es activa contra infecciones sistémicas causadas por helmintos (Edwards & Breckenridge, 1988).

Entre las estrategias que se han implementado para incrementar la solubilidad del MBZ y por tanto la biodisponibilidad, se encuentran la reducción del tamaño de partícula (formación de sistemas de micropartículas y nanopartículas) (de la Torre-Iglesias et al., 2014; Qi, 2008), así como cargar el fármaco en formulaciones oleosas de tipo emulsiones o microemulsiones (Liu et al., 2014; Parakh, Patil, Dashputre, & Kshirsagar, 2016).

Se encontró reportado en diversos estudios de farmacocinética en rata y en humano presentan un poco de variabilidad en cuanto a $C_{m\acute{a}x}$. En rata Wistar, al administrar una dosis de 40 mg/Kg, se observó un $C_{m\acute{a}x}$ de 400 ng/mL 4 h después de la



administración oral. En cambio, en humanos, al administrar 200 mg de MBZ por día, durante tres días, por vía oral, la $C_{\text{máx}}$ no fue mayor de 30 ng/mL (Garattini & Schnitzer, 1982).

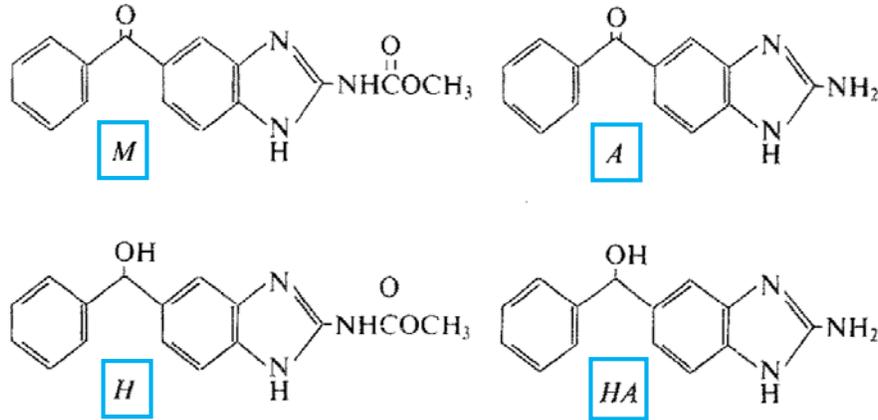


Figura 2. Estructura química del MBZ y sus metabolitos. M-MBZ; A-amino metabolito; H-hidroxi metabolito; HA-hidroxi-amino metabolito. Modificado de Braithwaite, Roberts, Allan, & Watson, 1982.

2.2.4 Farmacodinamia.

Se ha encontrado que el MBZ, como toda la familia de los derivados del benzimidazol, posee la propiedad de unirse selectivamente a la subunidad β de la tubulina (Figura 3). Al llevar a cabo esto, se da la pérdida de microtúbulos citoplasmáticos de células tegumentarias e intestinales de los parásitos (cestodos, nematodos); subsecuentemente hay pérdida de vesículas de transporte, un decremento de la captura de glucosa y aumento de la utilización del glucógeno endógeno (Martin, 1997).

Diversos grupos de investigación desarrollaron estudios para determinar el mecanismo por el cual los benzimidazoles tienen efecto en células de los parásitos y no se presenta toxicidad en los hospederos. La principal conclusión a la que se llegó es que la afinidad de estos compuestos a la β -tubulina del parásito es mayor que la afinidad a la proteína presente en células de mamíferos (Köhler, 2001; Lacey, 1990).



Es importante hacer mención que existen casos de resistencia a los agentes antihelmínticos, por lo que se requiere entonces de moléculas con alta potencia y alta selectividad en la clínica. La resistencia a los antihelmínticos se define como *la pérdida de la sensibilidad, transmitida genéticamente, en poblaciones de parásitos que previamente eran sensibles al mismo fármaco*. Se cree que la transmisión de la resistencia es vía parental. (Köhler, 2001). El mecanismo de resistencia mayormente descrito es la reducción progresiva del número de alelos del isotipo I y una pérdida total del isotipo II (de la β -tubulina, se codifican en genes separados) en poblaciones de nematodos (Martin, 1997).

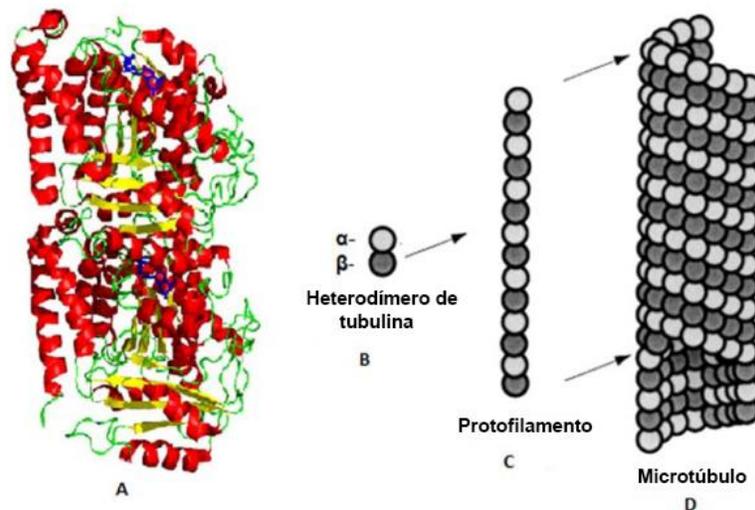


Figura 3. Estructura de la Tubulina. A) Estructura tridimensional de la tubulina (heterodímero). La subunidad α abajo y la β arriba. B) Esquema de las subunidades α y β de la tubulina. C) Protofilamento de tubulina formado por las subunidades α y β . D) Microtúbulo. Modificado de Torres et al., 2015.

2.3 Aspectos generales de la Cromatografía.

En la mayoría de los métodos analíticos se requiere llevar a cabo una separación para identificar y medir cuantitativamente uno o más componentes de una mezcla compleja (Harris, 2007). La cromatografía es una técnica analítica basada en el principio de reparto de un soluto entre dos fases, con la particularidad de que una fase se mantiene fija (Fase Estacionaria, F.E.) y otra que se mueve a través de ésta (Fase Móvil, F.M.). La F.E. es normalmente un enlace químico a las paredes interiores de un tubo capilar o a la superficie de las partículas sólidas



empaquetadas dentro de la columna. Alternativamente, las partículas sólidas pueden ser la F.E. Por otro lado, la F.M. es generalmente un líquido o un gas que atraviesa la columna cromatográfica, siendo un proceso de *elución* el que se va dando. (Harris, 2007). La velocidad con que la F.M. atraviesa la columna cromatográfica se puede expresar como *caudal* o *velocidad lineal de flujo* (Harris, 2007).

El *cromatograma* es la representación gráfica de la respuesta de un detector en función del tiempo de elución. En éste se puede observar el *tiempo de retención* (t_R) de los componentes de las muestras, que es el tiempo que transcurre desde la inyección de las mismas en la columna hasta que cada uno llega al detector. Existe un concepto denominado *tiempo de retención ajustado* (t_R'), que indica una corrección del tiempo en que un soluto atraviesa la columna después de que la F.M. lo hace, siendo esto último un tiempo muerto (t_m).

Si en la muestra inyectada hay dos o más componentes, la retención relativa " α " es el cociente de los t_R' de dos picos consecutivos, siendo una relación $t_{R'2}/t_{R'1}$, con lo cual su valor siempre es mayor a 1. Este parámetro también se conoce como selectividad

El *factor de capacidad* (k') es el cociente entre el t_R'/t_m el cual indica la capacidad que tiene la columna cromatográfica de retener los componentes de la matriz inyectada.

La *resolución* es un concepto aplicado en cromatografía que indica la separación que existe entre dos picos consecutivos en un cromatograma. Generalmente se determina haciendo un cálculo que implica el ancho de los picos y una diferencia de los t_R .

2.3.1 Cromatografía de líquidos.

Actualmente en la industria farmacéutica, la *Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución* (CLAR) es la principal técnica analítica aplicada a la evaluación de una amplia variedad de muestras. Es el método de elección para analizar la pureza de las sustancias, monitorear cambios en los procesos de producción y escalamiento,



evaluar nuevas formulaciones, así como para la cuantificación de fármacos en fluidos biológicos (Ahuja & Rasmussen, 2007). Desde el desarrollo de esta técnica, las F.E. comúnmente fueron sólidos de carácter polar y se utilizaba una F.M. de carácter no polar. Sin embargo, en 1964 se introdujo la modificación de las moléculas de la superficie de la F.E. donde los grupos polares se recubrieron con grafito y posteriormente se unían cadenas de alquilo y se utilizó una F.M. polar. (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

El soporte más común para las columnas de CLAR consiste en partículas microporosas esféricas de sílice permeables al disolvente. La superficie de la sílice contiene grupos silanoles, donde se pueden unir covalentemente grupos polares o cadenas alquílicas para de este modo tener dos variantes de la cromatografía de líquidos: CLAR en Fase Normal y CLAR en Fase Reversa (Harris, 2007). La primera es aquella donde la F.E. es de carácter polar y la F.M. no polar. La segunda es en sentido contrario.

Un equipo de CLAR (Figura 4) consta básicamente de un sistema para el suministro de disolventes, una válvula de inyección de muestras, una columna de alta presión, un detector y un ordenador para controlar el equipo y visualizar los resultados. Además, se puede incluir un horno para control de la temperatura de la columna (Harris, 2007).

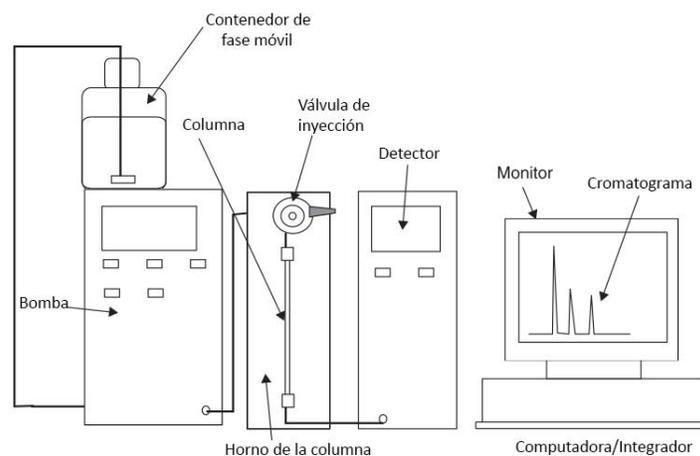


Figura 4. Diagrama esquemático de un cromatógrafo de líquidos. Modificado de Dean, 2009.



2.3.2 Tipos de cromatografía líquida.

La cromatografía se divide en varias categorías en función del mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria. (Harris, 2007).

- *Cromatografía de adsorción.* Es aquella que usa una F.E. sólida y una F.M. líquida o gaseosa. El soluto se adsorbe en la superficie de las partículas sólidas y cuanto más fuerte sea la interacción, mayor será el tiempo en que recorra la columna.
- *Cromatografía de reparto.* Es aquella donde se utiliza una F.E. líquida en forma de una fina película de alto punto de ebullición (p.e.) sobre la superficie de un soporte sólido. El soluto está en equilibrio entre el líquido estacionario y la F.M.
- *Cromatografía de intercambio iónico.* En este tipo de cromatografía existen aniones o cationes covalentemente unidos a la F.E. sólida que es una resina. Aquí, los iones en disolución de carga opuesta son atraídos a la F.E. por fuerzas electrostáticas. La fase móvil es líquida.
- *Cromatografía de exclusión molecular.* Esta técnica separa las moléculas por su tamaño. Aquellas de mayor tamaño pasan más rápido que las pequeñas. Aquí no hay interacción “atractiva” entre la F.E. y el soluto en un caso ideal. La F.M. líquida o gaseosa acarrea los solutos a través del gel poroso, permitiendo que los solutos pequeños entren a los poros y se retengan más que los grandes.
- *Cromatografía de afinidad.* Esta forma de cromatografía, que es la más selectiva, emplea interacciones específicas entre una clase de moléculas de soluto y una segunda molécula que está unida covalentemente a la F.E. El ejemplo más típico es la separación de una mezcla de proteínas mediante el uso de anticuerpos y variación de pH o fuerza iónica para eluir la corrida.



2.4 Preparación de muestras.

La preparación de muestras es la serie de pasos necesarios para obtener una muestra de una forma adecuada para el análisis. Esto comprende la disolución de la muestra, la extracción del analito a partir de una matriz compleja, la concentración de un analito diluido hasta concentraciones que puedan ser medidas, la conversión química del analito en una forma detectable y la eliminación o enmascaramiento de especies interferentes (Harris, 2007).

En las ocasiones en que la concentración de los analitos en las muestras es muy baja se requiere reducir el volumen inicial para obtener un efecto de pre-concentración de la muestra. El método de evaporación, que es de los más utilizados para realizar este proceso, conlleva riesgo de contaminar la muestra por los disolventes, los gases o el material utilizado en la técnica. La mayoría de las veces, los extractos de las muestras se llevan a sequedad y se reconstituyen en un volumen pequeño de disolvente, utilizando una agitación por vórtex para homogeneizar el reconstituido. Una técnica comúnmente aplicada para la evaporación es el uso de una corriente de nitrógeno (contenidas en tubos de ensayo) mientras se calientan en un baño de agua a temperatura media (Dean, 2009).

A su vez, en muchas ocasiones el uso de un Estándar Interno (E.I.) es requerido, de tal modo que se asegure la reproducibilidad de los resultados, ya que éste ayuda a minimizar la variabilidad de los resultados. Algunas características que debe cumplir una molécula para ser utilizada como estándar interno son: alta pureza, tener estructura molecular similar a la del analito, que brinde una señal cercana pero diferente a la del analito, tener peso molecular similar al del analito, propiedades fisicoquímicas semejantes a las del analito (Harris, 2007).



2.4.1 Técnicas de extracción.

La extracción es el proceso de pasar un soluto de una fase a otra. Esta técnica es útil para aislar o separar un analito de otra especie que interferiría en su análisis (Harris, 2007).

Para llevar a cabo la extracción de una matriz acuosa, la técnica más utilizada es la de *extracción líquido-líquido*, donde la muestra se reparte o distribuye entre dos líquidos inmiscibles o matrices donde el analito tiene diferentes valores de solubilidad. Generalmente una de las fases es acuosa y de alta densidad, mientras que la otra es orgánica con baja densidad. El principio de este proceso de extracción es que los compuestos hidrofílicos tiene mayor afinidad por la fase acuosa (o polar) y los compuestos no polares hidrofóbicos son afines a los disolventes orgánicos (Dean, 2009). De este modo se define el coeficiente de distribución, el cual representa el valor de la constante de equilibrio que existe en el reparto entre ambas fases, a una temperatura dada:

$$X_{ac} \rightarrow X_{org}$$
$$K_d = [X_{org}]/[X_{ac}]$$

En esta técnica es de vital relevancia la correcta selección de los disolventes orgánicos, lo cual se basa en:

- Baja solubilidad en la fase acuosa (< 10%).
- Alta volatilidad para una fácil evaporación en un proceso de concentración.
- Alta pureza, para no contaminar la muestra.
- Compatibilidad con la técnica analítica seleccionada.
- Polaridad y propiedades de enlaces de hidrógeno para mejorar el recobro de los analitos (aumentar el valor de K_d).

Con la finalidad de favorecer el contacto entre ambas fases y que los analitos se repartan, se utilizan camas de agitación. Sin embargo, un problema que puede ocurrir en este tipo de extracciones es la formación de emulsiones, particularmente si la muestra contiene surfactantes o compuestos de naturaleza lipídica (Dean, 2009).



La *extracción en fase sólida* es una técnica común de preparación de muestras utilizada para el aislamiento, enriquecimiento y/o limpieza de algún componente de interés presente en una matriz acuosa. Esta técnica implica que la muestra acuosa tenga contacto con una fase sólida donde los componentes de interés son preferentemente retenidos en la superficie de la fase sólida para su posterior elución. La fase sólida generalmente está empacada en cartuchos sometidos a presiones de vacío para hacer pasar las fases líquidas a través de las partículas sólidas (Dean, 2009). La extracción elimina gran parte de los componentes de la matriz en la que está contenida el analito, simplificando el análisis y reduciendo costos por un menor uso de disolventes que en la extracción líquido-líquido (Harris, 2007). Al seleccionar el adsorbente adecuado, los compuestos de interés se mantendrán retenidos en la fase sólida mientras que las impurezas o compuestos interferentes se eliminan al realizar procesos de lavado de los cartuchos. Posteriormente, al seleccionar un disolvente de elución adecuado, el analito puede ser desorbido de la fase sólida para su posterior análisis, pudiendo ser necesario un paso de pre-concentración (Dean, 2009). Al igual que en cromatografía, las fases sólidas pueden ser normales, reversas o de intercambio iónico. En la figura 5 se puede apreciar un esquema representativo de un equipo para extracción en fase sólida.

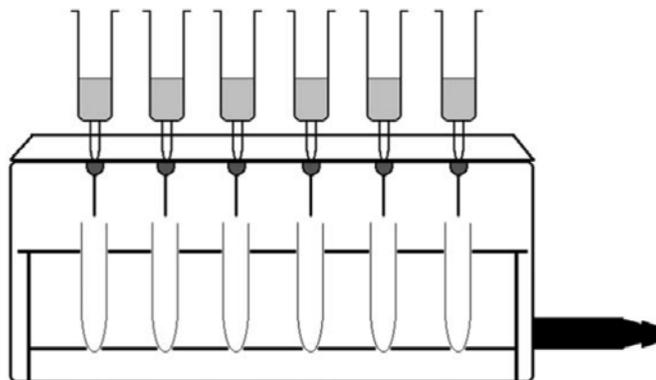


Figura 5. Equipo de extracción en fase sólida con conexión a vacío y con cartuchos empacados (Dean, 2009).



Los pasos generales para llevar a cabo una extracción en fase sólida son:

- Acondicionamiento del cartucho.
- Equilibrio del cartucho.
- Cargado de la muestra sobre la fase sólida.
- Lavado de la muestra o elución de compuestos de no interés,
- Elución del analito.

En la siguiente figura se muestra de manera esquemática el proceso de extracción.

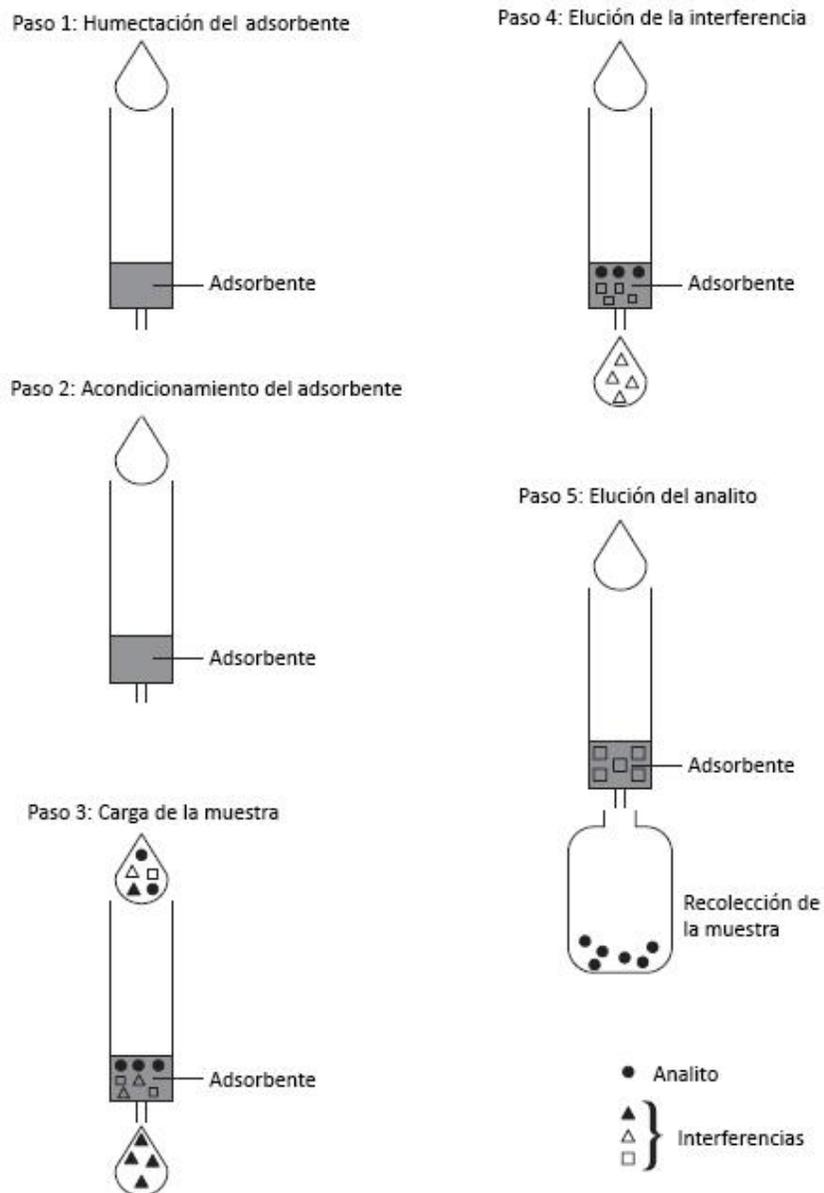


Figura 6. Proceso de extracción en fase sólida. Modificado de Dean, 2009.



Así mismo, existe el método de *precipitación de proteínas*, el cual se utiliza comúnmente para la limpieza de muestras biológicas y una interrupción de las interacciones fármaco–proteína. En muchas ocasiones que se desea cuantificar algún fármaco en muestras de plasma, es necesario romper la unión fármaco–proteína de tal modo que se pueda extraer la mayor cantidad de fármaco para desempeñar el análisis químico. Existen diferentes técnicas de precipitación de proteínas, las cuales incluyen el uso de disolventes orgánicos, ácidos, sales o iones metálicos. El método no es solamente simple y rápido, sino que puede ser utilizado como paso previo a algún otro método de extracción (Polson, Sarkar, Incledon, Raguvaran, & Grant, 2003).

2.5 Validación de métodos analíticos para muestras biológicas.

La validación de métodos es un proceso por el cual se confirma que las metodologías a ocupar son adecuadas para el propósito que se diseñaron. En este proceso se debe recolectar evidencia documental que demuestre, entre otras cosas, la exactitud, precisión, linealidad, selectividad y robustez de dicha metodología para generar resultados consistentes y confiables (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

En México, la Secretaría de Salud, mediante la Norma Oficial Mexicana “*NOM-177-SSA1-2013, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados que realicen las pruebas de intercambiabilidad. Requisitos para realizar los estudios de biocomparabilidad. Requisitos a que deben sujetarse los Terceros Autorizados, Centros de Investigación o Instituciones Hospitalarias que realicen las pruebas de biocomparabilidad*”, establece los parámetros a evaluar para la validación de una metodología que implique el uso de muestras biológicas aplicable a estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y/o bioequivalencia (Secretaría de Salud, 2013).



La Norma mencionada anteriormente comparte parámetros descriptores para la validación de metodologías analíticas de muestras biológicas con el borrador de la Guía de Validación de Métodos bioanalíticos de la FDA (FDA, 2013). A continuación se muestra la comparación de ambas normativas aplicables al presente trabajo, aunque el trabajo realizado fue hecho bajo los estatutos de la normatividad mexicana.

Tabla 1. Comparación de parámetros para la Validación de Métodos Analíticos con muestras biológicas.

Parámetro	NOM-177-SSA1-2013	Guía FDA
Selectividad	Demostrar la no interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica, mediante la evaluación individual de al menos 6 unidades de ésta analizando una muestra normal, una lipémica y una hemolizada. La respuesta analítica de las interferencias próximas al tiempo de retención debe ser menor al 20% para el límite inferior de cuantificación del analito y del 5% para el E.I.	Demostrar la capacidad del método para diferenciar y cuantificar el analito en la presencia de los componentes de la muestra. Se deben analizar muestras blanco de la matriz biológica obtenida de al menos 6 fuentes diferentes y cada una se debe analizar por separado para evaluar interferencias. Se debe hacer una comparación con la respuesta del Límite Inferior de Cuantificación.
Límite Inferior de Cuantificación (LIC)	Se debe determinar con base en el 5% del $C_{m\acute{a}x}$ reportado para el analito de interés.	Evaluar la respuesta del analito, la cual debe ser 5 veces mayor que la respuesta dada por un blanco. Se debe de cuantificar con una precisión cuyo CV% sea menor al 20% y la concentración debe estar dentro del 20% de la nominal.
Límite Superior de Cuantificación (LSC)	No incluido	La respuesta del analito debe ser reproducible y la concentración calculada debe tener una precisión menor al 15% de CV%, encontrándose dentro del 15% del valor nominal. Representa la concentración más alta de la curva de calibración.



Curva de Calibración	<p>Se deben caracterizar al menos 6 concentraciones sin incluir la muestra blanco ni cero, definiendo un modelo matemático que describa la relación entre la respuesta analítica y la concentración de las soluciones. Son necesarias por lo menos tres curvas de calibración e incluir concentración recuperada y porcentaje de desviación.</p> <p>La concentración recuperada debe estar dentro del 15% de la concentración nominal en cada nivel de concentración, pudiendo el LIC ser $\leq 20\%$. Al menos 75% de las concentraciones de las curvas de calibración con mínimo de 6 puntos deben cumplirlo. Del total de curvas evaluadas, al menos el 50% de cada nivel de concentración debe cumplir el criterio de aceptación.</p>	<p>Se debe preparar la curva de calibración en la misma matriz biológica que las muestras añadiendo cantidades conocidas del analito. Los niveles de concentración deben elegirse de acuerdo al rango de concentraciones esperadas por el estudio. Se deben evaluar una muestra blanco, una muestra cero y al menos 6 niveles de concentración e incluir el LIC.</p> <p>Las concentraciones deben estar dentro del 15% del valor nominal, pudiendo ser del 20% para el LIC. Al menos el 75% de los niveles de concentración deben cumplir ese criterio.</p>
----------------------	--	---



<p>Precisión</p>	<p>Repetibilidad. Analizar en un mismo día al menos por quintuplicado las el LIC y las MCB, MCM, MCA y MCD. Calcular la concentración obtenida para cada nivel interpolando su respuesta analítica en la curva de calibración. El CV% del valor promedio no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.</p> <p>Reproducibilidad. Analizar por quintuplicado (mínimo), en tres corridas analíticas diferentes y en al menos 2 días, el LIC y las MCB, MCM y MCA. El CV% del valor promedio de la concentración recuperada no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.</p>	<p>Utilizar un mínimo de 5 determinaciones por nivel de concentración, evaluando 3 concentraciones diferentes. La precisión en cada nivel de concentración no debe exceder un 15% en el CV%, permitiendo 20% para el LIC.</p> <p>Se debe realizar la evaluación intra-corrída (en una misma corrida analítica) e inter-corrída (estudio a lo largo del tiempo, o factores como diferentes analistas, equipos, reactivos y laboratorios).</p>
<p>Exactitud</p>	<p>De los datos de repetibilidad y reproducibilidad calcular la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal. El valor promedio del % de desviación no debe ser mayor que el 15%, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual debe ser menor o igual que 20%.</p>	<p>Se determina mediante análisis replicados de muestras que contengan cantidades conocidas de analito, haciendo la determinación con al menos 5 muestras de la misma concentración, evaluando al menos tres niveles de concentración. Los valores deben estar dentro del 15% del valor nominal, pudiendo ser 20% para el LIC.</p>



<p>Recobro</p>	<p>No incluido</p>	<p>Comparar la respuesta obtenida por las muestras de matriz biológica extraídas, contra la respuesta que brinda una solución de la misma concentración, la cual representa el 100%. Se deben evaluar tres niveles de concentración.</p>
<p>Sensibilidad</p>	<p>No incluido</p>	<p>Está definida como la mínima concentración de analito que puede ser medida con precisión y exactitud</p>
<p>Estabilidad de la muestra</p>	<p>Evaluar por triplicado la respuesta del analito a las concentraciones de las MCB y MCA, analizadas inmediatamente después de su preparación y después de ser sometidas a las condiciones del ensayo evaluadas. La concentración promedio de cada nivel debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.</p>	<p>Todas las determinaciones de estabilidad deben utilizar muestras de matriz biológica frescas, cargadas con el analito. Se debe realizar a comparación de las muestras de estabilidad contra una curva de calibración o con concentraciones de control de calidad, evaluando al menos tres réplicas del nivel menor y mayor de concentración. En todos los casos, la concentración debe estar dentro del 15% del valor nominal.</p>
<p>Estabilidad a corto plazo</p>	<p>Evaluar la estabilidad del (os) analito(s) en la matriz biológica a la temperatura y tiempo de procesamiento de la muestra.</p>	<p>Evaluar la estabilidad de las muestras durante el tiempo de trabajo requerido en el laboratorio para procesar un lote de muestras.</p>
<p>Estabilidad a largo plazo</p>	<p>Evaluar la estabilidad del (os) analito(s) en la matriz biológica, bajo las condiciones de almacenamiento en las que se mantendrán las muestras, por un periodo de tiempo por lo menos equivalente al que transcurre desde la obtención de la muestra hasta su análisis.</p>	<p>Evaluar la estabilidad de las muestras de matriz biológica por un periodo que abarque un tiempo igual o mayor al tiempo entre la primera toma de muestra y el último día de análisis.</p>



<p>Estabilidad de la muestra procesada</p>	<p>Evaluar la estabilidad del (os) analito(s) en la muestra procesada a temperatura ambiente o bajo las condiciones de almacenamiento a ser usadas durante el estudio</p>	<p>Determinar la estabilidad de las muestras procesadas durante el tiempo máximo que estarán en el automuestreador</p>
<p>Estabilidad en el automuestreador</p>	<p>Evaluar la estabilidad del (os) analito(s) en la muestra procesada a la temperatura del inyector o automuestreador.</p>	
<p>Estabilidad en ciclos de congelación-descongelación</p>	<p>Evaluar la estabilidad del(os) analito(s) en la matriz biológica, almacenadas a la temperatura de congelación en que estarán las muestras reales por al menos 12 h, descongelarlas completamente a temperatura ambiente y volver a congelar por al menos 12 h bajo las mismas condiciones. El número de ciclos de congelación-descongelación debe ser al menos de 3 ciclos.</p>	<p>Evaluar la estabilidad de los analitos en al menos tres ciclos de congelación-descongelación.</p>
<p>Estabilidad en Solución</p>	<p>Demostrar la estabilidad del (os) analito(s) y E.I., en al menos una muestra inyectada por triplicado de una solución de referencia principal (de mayor concentración) y de una solución de trabajo (de menor concentración) por triplicado por un tiempo igual o mayor al periodo de uso o almacenamiento que será utilizado durante el análisis de las muestras.</p> <p>Las soluciones serán consideradas estables si la desviación de la respuesta analítica promedio con respecto a la obtenida con muestras recién preparadas, no es mayor que 10%.</p>	<p>Evaluar la estabilidad de las soluciones del analito y del Estándar Interno, de tal manera que se asegure la duración de los stocks en las condiciones de almacenamiento.</p>



Las muestras control (MC) se deben preparar de la siguiente forma, de acuerdo a la definición descrita en la NOM-177-SSA1-2013:

- La *muestra control baja* (MCB) es una muestra de la matriz adicionada con el analito en concentración equivalente hasta 3 veces el LIC.
- La *muestra control media* (MCM) es una muestra de la matriz adicionada con el analito en una concentración intermedia entre la MCB y MCA.
- La *muestra control alta* (MCA) es una muestra de la matriz adicionada con el analito en una concentración entre el 75–85% de la concentración del *límite superior de cuantificación* (LSC).
- La *muestra control diluida* (MCD) es una muestra de la matriz adicionada con el analito en una concentración mayor al LSC, que se diluye con matriz exenta de analito a una concentración dentro del intervalo de la curva de calibración.

En la NOM-177-SSA1-2013 (Secretaría de Salud, 2013) se establece que todos los métodos analíticos empleados para la cuantificación de muestras biológicas deben ser validados en el sitio de análisis y alcanzar el propósito para el que han sido desarrollados, independientemente si son metodologías desarrolladas por alguna unidad analítica o se adquieren comercialmente, como es el caso de los métodos basados en técnicas inmunológicas u otras. A su vez, al preparar las soluciones patrón del fármaco en la matriz biológica, el porcentaje del disolvente utilizado no debe ser mayor al 5% del volumen final preparado.

Dado que se están desarrollando formulaciones nasales que contienen MBZ y es necesario conocer las concentraciones plasmáticas de la molécula al administrarse en estos nuevos sistemas en modelos *in vivo*, el presente trabajo se realizó para contar con un método analítico sensible y confiable para cuantificar MBZ en plasma humano.



3. Objetivos.

3.1 Objetivo General.

- Desarrollar y evaluar el desempeño un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) en Fase Reversa, con detección UV para la cuantificación de MBZ en plasma humano.

3.2 Objetivos Particulares.

- Establecer las condiciones cromatográficas para obtener una adecuada separación del MBZ de los componentes endógenos del plasma y la cuantificación del mismo.
- Determinar las condiciones de extracción del MBZ de muestras plasmáticas que brinden un recobro adecuado de manera confiable y repetible.
- Evaluar el desempeño de la metodología desarrollada de acuerdo a los parámetros establecidos en la NOM 177 para garantizar la confiabilidad de los resultados obtenidos.



4. Metodología experimental.

4.1 Reactivos, materiales, equipos e instrumentos.

4.1.1. Reactivos.

- Estándar analítico de MBZ, 100% pureza (Sigma-Aldrich).
- Estándar analítico de ABZ, 99% pureza (Sigma-Aldrich).
- Metanol (MeOH), CH₃OH, grado HPLC (J. T. Baker).
- Acetonitrilo (ACN), CH₃CN, grado HPLC (J. T. Baker).
- Cloroformo, CHCl₃, grado reactivo (J. T. Baker).
- Diclorometano, CH₂Cl₂, grado reactivo (J. T. Baker).
- Éter etílico, (C₂H₅)₂O, grado reactivo (J. T. Baker).
- Metil terbutil éter, C₅H₁₂O, grado reactivo (J. T. Baker).
- Agua destilada (Elix-3, Millipore).
- Agua desionizada grado HPLC (Milli-Q, Millipore).
- Ácido fórmico, CH₂O₂, ≥ 98% pureza (Sigma-Aldrich).
- Ácido fosfórico, H₃PO₄, 85-87% pureza (J. T. Baker).
- Dimetil sulfóxido (DMSO), > 99.9% pureza (Química Barsa, S. de R.L.).
- Hidróxido de potasio, KOH (J. T. Baker).
- Hidróxido de sodio, NaOH (J. T. Baker).
- Fosfato monobásico de potasio, KH₂PO₄, 99.20% pureza (J. T. Baker).
- Fosfato dibásico de potasio, K₂HPO₄, 99.86% pureza (J. T. Baker).
- Nitrógeno gas, N₂, grado industrial (INFRA, S.A. de C.V.).
- Plasma humano (Banco de Sangre del Hospital Médica Sur).

4.1.2. Materiales.

- Matraces volumétricos de 10.0 mL, 50.0 mL, 100.0 mL, 200.0 mL.
- Matraces Erlenmeyer 200 mL, 250 mL, 1000 mL.
- Vasos de precipitados 50 mL, 100 mL, 150 mL, 250 mL.
- Probetas 100.0 mL, 250.0 mL, 500.0 mL.
- Embudo de filtración rápida.
- Papel filtro Whatman 42, Ashless.



- Puntas para Micropipeta 100-1000 μL , 500-5000 μL , 1-10 mL (Eppendorf).
- Tubos de ensaye 13 x 100 mm.
- Tubos de ensaye con tapón de rosca.
- Tubos para centrífuga de 50 mL (NEST Biotechnology).
- Columna cromatográfica Zorbax Eclipse XDB-C18, dimensiones 4.6 x 150 mm y 5.0 μm de tamaño de partícula (Agilent Technologies).
- Columna cromatográfica Gemini C18, 4.6 x 150 mm y 5 μm de tamaño de partícula (Phenomenex).
- Cartuchos Sep-Pack Vac 3cc C18 (Waters).

4.1.3. Equipos e instrumentos.

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu modelo LC10AT con detector UV-Visible Shimadzu modelo SPD-10AV; Software LCsolution versión 1.25 Shimadzu Corporation.
- Balanza analítica Sartorius.
- Espectrofotómetro UV-Visible 1601 Shimadzu.
- Potenciómetro Thermo Orion Star A211.
- Agitador vórtex MX-S de Science MED Finland Technology.
- Agitador Lab-Line 3520 Orbital Platform Shaker.
- Centrífuga Eppendorf 5416.
- Baño de agua Lab-Line 18005.
- Baño de ultrasonido Fischer Scientific FS60.
- Equipo de filtración Millipore.
- Repipeteador Eppendorf Plus 50 mL.
- Micropipeta Eppendorf 100-1000 μL .
- Micropipeta Eppendorf 500-5000 μL .
- Micropipeta Eppendorf 1-10 mL.
- Manifold Waters para extracción en fase sólida.
- Congelador Lab-Line, modelo 3552 a -22 $^{\circ}\text{C}$.
- Bomba de vacío Gast.



4.2 Preparación de soluciones

4.2.1 Fase Móvil (F.M.). Solución de Metanol:Agua (0.1% Ácido Fórmico), pH 5.00 (60:40).

Para preparar 1000.0 mL de F.M. se mezclaron 400.0 mL de agua desionizada grado HPLC con 600.0 mL de metanol absoluto grado HPLC filtrado en sistema Millipore a través de una membrana de 0.45 μm de tamaño de poro. A esta mezcla se le añadieron 408 μL de ácido fórmico y se agitó manualmente. Posteriormente, se ajustó el pH a 5.00 ± 0.05 con una solución de KOH 45% m/v. Finalmente la solución obtenida se degasificó mediante agitación en baño de ultrasonido durante 20 min.

4.2.2 Solución amortiguadora de fosfatos pH 5.00.

Tomando como referencia el método de preparación de la FEUM 11^a edición (Secretaría de Salud, 2014), se preparó la solución amortiguadora pesando el equivalente a 0.68 g de KH_2PO_4 y transfiriéndolo a un matraz volumétrico de 100.0 mL, disolviendo con aproximadamente 20 mL de agua destilada y llevando a volumen con el mismo disolvente. El pH se ajustó a 5.0 ± 0.1 con una solución de KOH 45% m/v y ácido fosfórico.

4.2.3 Solución amortiguadora de fosfatos pH 5.50.

Adecuando la metodología descrita en la FEUM 11^a edición (Secretaría de Salud, 2014), se prepararon 100.0 mL de solución disolviendo el equivalente a 1.361 g de KH_2PO_4 y 3.581 g de K_2HPO_4 en aproximadamente 20 mL de agua destilada, completando posteriormente el volumen con el mismo disolvente.

4.2.4 Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.40.

De acuerdo a la metodología descrita en la FEUM 11^a edición (Secretaría de Salud, 2014), se prepararon 200.0 mL de solución amortiguadora, disolviendo el equivalente a 0.262 g de KH_2PO_4 y 1.150 g de K_2HPO_4 en aproximadamente 50 mL de agua destilada y llevando a volumen con el mismo disolvente.



4.2.5 Mezcla de disolventes para extracción líquido-líquido (éter etílico:diclorometano:cloroformo, 60:30:10).

Para preparar 100.0 mL de la mezcla, se midieron y mezclaron 60.0 mL de éter etílico, 30.0 mL de CH_2Cl_2 y 10.0 mL de CHCl_3 .

4.2.6 Solución de Hidróxido de Potasio al 45% m/v.

Se pesaron con precisión 4.5 g de KOH y se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10.0 mL. El sólido se disolvió con aproximadamente 8 mL de agua destilada y cuando la solución se enfrió a temperatura ambiente, se llevó a volumen con el mismo disolvente.

4.2.7 Solución de Hidróxido de Sodio 2 N.

Se pesaron con precisión 4.0 g de NaOH y se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50.0 mL. El sólido se disolvió con aproximadamente 20 mL de agua destilada y cuando la solución se enfrió hasta temperatura ambiente, se llevó a volumen con el mismo disolvente.

4.2.8 Solución MeOH:H₂O (20:80)

Se tomaron 2.0 mL de MeOH y se transfirieron a un tubo de ensaye 13 x 100 mm y posteriormente se le añadieron 8.0 mL de agua destilada. La mezcla se agitó manualmente previo su uso.

4.2.9 Solución de Ácido Fosfórico 1:3

Se tomó una alícuota de 3.34 mL de ácido fosfórico concentrado y se transfirió a un tubo de ensaye que contenía 6.66 mL de agua destilada. Esta solución se agitó manualmente previo a su uso.

4.2.10 Soluciones de MBZ.

4.2.10.1 Solución patrón "a"

Se pesaron con precisión el equivalente a 10.0 mg del estándar analítico de MBZ, los cuales fueron transferidos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10.0 mL, disolviendo el sólido en 1.5 mL de ácido fórmico y llevando a la marca de aforo con metanol. La concentración final de esta solución es de 1000.0 $\mu\text{g/mL}$.



4.2.10.2 Soluciones stock “b – d”.

A partir de la solución patrón “a” se preparó la solución stock “b” tomando 5.0 mL de ésta, transfiriéndolos a un matraz volumétrico de 10.0 mL. El volumen se completó con metanol. La concentración final de esta solución es de 500.0 µg/mL.

A partir de la solución “b” se prepararon las soluciones “c” y “d”, de la siguiente manera: La solución “c” se preparó transfiriendo 2.0 mL de la solución “b” a un matraz volumétrico de 10.0 mL, llevando a volumen con metanol. La concentración final de esta solución es de 100.0 µg/mL.

La solución “d” se preparó transfiriendo 1.0 mL de la solución “b” a un matraz volumétrico de 10.0 mL, llevando a volumen con metanol. La concentración final de esta solución es de 50.0 µg/mL.

4.2.10.3 Soluciones de carga (Sol. C).

A partir de las soluciones stock se prepararon las soluciones de carga (tabla 2), con las cuales se prepararon posteriormente las soluciones de mebendazol en plasma. Las soluciones 1-6 se emplearon para preparar las curvas de calibración, mientras que las soluciones 7-9 se emplearon para preparar las muestras control baja, media y alta respectivamente.

Tabla 2. Preparación de las Sol. C. de MBZ en metanol.

Sol. C.	Solución stock de MBZ	Volumen stock (µL)	Volumen MeOH (µL)	Volumen final (µL)	Concentración MBZ (µg/mL)
1	d	200	800	1000	10.0
2	c	200	800	1000	20.0
3	d	1000	0	1000	50.0
4	c	1000	0	1000	100.0
5	b	300	700	1000	150.0
6	b	400	600	1000	200.0
7	c	300	700	1000	30.0
8	b	240	760	1000	120.0
9	b	340	660	1000	170.0



4.2.11 Soluciones de Referencia para calcular el recobro absoluto de MBZ

Se prepararon las soluciones descritas a continuación, cuya concentración equivale a la esperada tras el proceso de evaporación de las muestras. En todos los casos se añadió el E.I. a una concentración de 40.0 $\mu\text{g/mL}$.

- Para el LIC se tomaron 500 μL de la solución “d” de MBZ y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10.0 mL. El volumen se completó con F.M. La concentración final de MBZ es 2.5 $\mu\text{g/mL}$.
- Para la MCB se tomaron 750 μL de la solución “c” de MBZ y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10.0 mL. El volumen se completó con F.M. La concentración final de MBZ es 7.5 $\mu\text{g/mL}$.
- Para la MCM se tomaron 600 μL de la solución “b” de MBZ y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10.0 mL. El volumen se completó con F.M. La concentración final de MBZ es 30.0 $\mu\text{g/mL}$.
- Para la MCA se tomaron 850 μL de la solución “b” de MBZ y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10.0 mL. El volumen se completó con F.M. La concentración final de MBZ es 42.5 $\mu\text{g/mL}$.
- Para el LSC se tomaron 500 μL de la solución “a” de MBZ y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10.0 mL. El volumen se completó con F.M. La concentración final de MBZ es 50.0 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.12 Soluciones de ABZ.

4.2.12.1 Solución patrón “e”.

Se pesaron con precisión el equivalente a 10.0 mg del estándar analítico de ABZ, los cuales fueron transferidos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10.0 mL, disolviendo el sólido con 1.5 mL de DMSO y llevando a la marca de aforo con metanol. La concentración final de esta solución es de 1000.0 $\mu\text{g/mL}$.



4.2.12.2 Soluciones de trabajo “f – g”.

A partir de la solución “e” de ABZ se prepararon las soluciones requeridas para adicionar las muestras plasmáticas con el E.I.

Se transfirieron 800 μL de la solución “e” a un matraz volumétrico de 10.0 mL, llevando a volumen con metanol. La concentración final de esta solución “f” es de 80.0 $\mu\text{g/mL}$.

Se transfirieron 400 μL de la solución “e” a un matraz volumétrico de 10.0 mL, llevando a volumen con metanol. La concentración final de esta solución “g” es de 40.0 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.13 Solución para evaluar el desempeño del sistema.

Se tomaron 400 μL de la solución “b” de MBZ y se llevaron a un volumen de 10.0 mL con F.M. después de haber agregado 400 μL de la solución “e” del E.I. La concentración final del MBZ es de 20.0 $\mu\text{g/mL}$ y del E.I 40.0 $\mu\text{g/mL}$

4.2.14 Mezcla de Matriz Biológica.

A partir de 6 unidades de plasma fresco congelado proporcionados por el Banco de Sangre del Hospital Médica Sur de la Ciudad de México, se tomaron 160.0 mL de plasma de cada una y se mezclaron. La solución final se fraccionó en muestras de aproximadamente 50 mL y se almacenaron a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante el tiempo total de trabajo. El remanente de cada paquete de plasma se almacenó bajo las mismas condiciones.

4.2.15 Preparación de las muestras de MBZ en plasma.

Utilizando las soluciones de carga de MBZ, se prepararon las soluciones correspondientes a los diferentes niveles de concentración para preparar las curvas de calibración y las muestras control. En la tabla 3 se presenta la metodología resumida. Las soluciones 1 – 6 corresponden a las soluciones de carga 1 – 6 y las muestras control a las soluciones de carga 7 – 9.



Tabla 3. Preparación de las muestras para las curvas de calibración y para las muestras control.

Solución	Vol. Sol. C. (μL)	Vol. plasma (μL)	Vol. final (μL)	Concentración de MBZ (μg/mL)
Blanco	0	1000	1000	0
Cero	0	1000	1000	0
1	50	950	1000	0.5
2	50	950	1000	1.0
3	50	950	1000	2.5
4	50	950	1000	5.0
5	50	950	1000	7.5
6	50	950	1000	10.0
MCB	50	950	1000	1.5
MCM	50	950	1000	6.0
MCA	50	950	1000	8.5

4.2 Desarrollo de la Metodología.

4.3.1 Condiciones analíticas de trabajo.

La técnica analítica para realizar la cuantificación del fármaco en plasma elegida fue la *Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución* con detección *UV* debido a la estructura química que presenta el fármaco, ya que cuenta con un núcleo bicíclico con enlaces dobles conjugados, permitiendo la absorción de luz en el intervalo correspondiente al espectro ultravioleta.

De manera objetiva, se consultó la bibliografía científica internacional con el fin de tener un primer acercamiento a las condiciones analíticas utilizadas para cuantificar el MBZ mediante CLAR–UV (Bai et al., 2015; de la Torre-Iglesias et al., 2014; Gomes & Nagaraju, 2001; Kang et al., 2014; Liu et al., 2014; Xu, Gong, Dong, Yang, & Ai, 2016).

Los parámetros a evaluar fueron los siguientes:

4.3.1.1 Selección de Longitud de Onda (λ) de Análisis.

Se preparó una solución de MBZ a concentración de 7.0 μg/mL en F.M. y se realizó un barrido espectrofotométrico en el en el rango de luz ultravioleta de 190 – 400 nm.



4.3.1.2 Selección de Columna cromatográfica.

A partir de la bibliografía consultada se estableció que el análisis se debía realizar en pH ligeramente ácido, por lo cual se evaluaron dos columnas utilizadas por otros autores para el análisis de benzimidazoles antihelmínticos, las cuales fueron: Zorbax Eclipse XDB-C18 de Agilent Technologies, dimensiones 4.6 x 150 mm y 5.0 μm de tamaño de partícula; y Gemini C18 de Phenomenex, dimensiones 4.6 x 150 mm y 5 μm de tamaño de partícula.

4.3.1.3 Selección de Fase Móvil (F.M).

Se evaluaron diferentes composiciones de F.M. modificando los disolventes orgánicos y la proporción de las fases. En la tabla 4 se resumen las diferentes F.M. evaluadas.

Tabla 4. Composición de Fases Móviles evaluadas en el Desarrollo del método.

Composición	Proporción
ACN:H ₂ O (0.1% ácido fórmico)	20:80
ACN:H ₂ O (0.1% ácido fórmico)	35:65
MeOH:Fosfatos pH 7.00	60:40
MeOH:Fosfatos pH 5.50	60:40
MeOH:H ₂ O (0.1% ácido fórmico)	60:40
MeOH:H ₂ O (0.1% ácido fórmico) pH 5.5	60:40
MeOH:H ₂ O (0.1% ácido fórmico) pH 5.0	60:40

4.3.1.4 Selección de volumen de inyección.

Para la determinación de este parámetro, se evaluaron inyecciones repetidas de diferentes volúmenes de muestra y se eligió el que brindó la mejor respuesta analítica. Los volúmenes evaluados fueron:

- 40 μL
- 50 μL



4.3.1.5 Selección de velocidad de flujo.

Se evaluaron diferentes velocidades de flujo, y se determinó el tiempo de retención (t_R). Las velocidades fueron:

- 0.8 mL/min
- 1.0 mL/min

4.3.2 Condiciones de extracción de la muestra.

En esta fase experimental, se evaluó la metodología más adecuada para llevar a cabo la extracción del MBZ y del E.I. a partir de las muestras plasmáticas. Tomando como referencia el método de Palomares Alonso (2009), se evaluó una extracción líquido-líquido. A su vez, se evaluó una extracción en fase sólida, usando como referencia los métodos de Hurtado, *et. al.* (1989) y Ramírez Arguedas, (2007), empleados para otros benzimidazoles

4.3.2.1 Extracción líquido-líquido.

Las pruebas se llevaron a cabo utilizando 500 μ L de muestra de plasma adicionadas con 100 μ L de solución “g” de E.I. (40 μ g/mL).

4.3.2.1.1 Selección del disolvente de extracción.

Dada la naturaleza del MBZ y del E.I., se seleccionaron disolventes no polares. Los disolventes evaluados fueron:

- Metil terbutil éter
- Éter etílico
- Mezcla Éter etílico:Diclorometano:Cloroformo (60:30:10)

4.3.2.1.2 Selección del volumen de disolvente.

Se evaluó la intensidad de la respuesta analítica empleando los siguientes volúmenes del disolvente para la extracción:

- 4.0 mL
- 4.5 mL



4.3.2.1.3 Selección de la velocidad de agitación.

Las muestras se agitaron de forma orbital (horizontal) durante 10 minutos. Las velocidades de agitación evaluadas fueron:

- 250 rpm
- 350 rpm

4.3.2.1.4 Selección de agente precipitante de proteínas.

Se evaluó el efecto de un agente precipitante de proteínas, utilizando 100 μL de una solución de NaOH 2 N.

4.3.2.2 Extracción en fase sólida.

Las pruebas se llevaron a cabo utilizando 1000 μL de plasma cargado con MBZ, a los cuales se le agregaron 100 μL de solución "f" de E.I. (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

De acuerdo al *Manual de Cuidados y Uso* de los cartuchos para extracción de fase sólida (Waters, s.f.), y considerando las condiciones analíticas de detección del MBZ, la metodología de extracción depende de la adecuada selección de los disolventes para acondicionar y equilibrar los cartuchos, el disolvente para el lavado de la muestra y el disolvente para la elución. En la tabla 5 se muestran las condiciones evaluadas para llevar a cabo la extracción en fase sólida.

En cada etapa se evaluó un disolvente diferente con la finalidad de mantener las muestras en las condiciones óptimas para la extracción. Es por ello que se trabajó a diferentes valores de pH: solución amortiguadora de fosfatos, agua y ácido fórmico al 0.1% v/v en las etapas de equilibrio de los cartuchos y en el lavado de las muestras.

Se llevó a cabo una prueba de acidificación de la muestra para mejorar la eficiencia de extracción, por lo cual a cada muestra se le añadieron 300 μL de una solución de ácido fosfórico 1:3.



Tabla 5. Condiciones evaluadas para la extracción en fase sólida.

Etapa	Disolvente	Volumen
Acondicionamiento	MeOH	5.0 mL
Equilibrio	H ₂ O H ₂ O (0.1% ácido fórmico) Fosfatos pH 5.5 F.M.	4.0 mL
	Fosfatos pH 7.4	5.0 mL
Lavado	H ₂ O (0.1% ácido fórmico)	5.0 mL
	Fosfatos pH 7.4 + MeOH:H ₂ O (20:80)	5.0 + 1.0 mL
	Fosfatos pH 5.0 + MeOH:H ₂ O (20:80)	5.0 + 0.5 mL
Elución	MeOH	3.0 mL
		3.5 mL
		5.0 mL
Reacondicionamiento	MeOH + H ₂ O	5.0 + 4.0 mL

4.4 Evaluación del desempeño del método.

Se llevó a cabo la evaluación del desempeño de la metodología desarrollada, tomando como referencia la NOM-177-SSA1-2013. La descripción de cada uno de los parámetros se presenta en la Tabla 1. Los parámetros seleccionados fueron: selectividad, curva de calibración, límite inferior de cuantificación, precisión, exactitud, y estabilidad de la muestra a corto plazo. La prueba de estabilidad en solución no se realizó debido a que después del tercer día de preparación se observa un precipitado en la solución de MBZ de 1000 µg/mL, por lo cual fue necesario preparar las soluciones cada tres días de trabajo.

4.4.1 Selectividad.

Se determinó comprobando la no interferencia de compuestos endógenos de la matriz evaluando las siguientes muestras:

- Muestra blanco de cada unidad de plasma.
- Muestra blanco del pool de plasma.
- Muestra de pool de plasma adicionada de MBZ a la concentración del LIC (0.5 µg/mL) y con E.I. a 40 µg/mL.
- Muestra cero, que corresponde a una muestra de pool de plasma adicionada con E.I. a una concentración de 40 µg/mL, sin MBZ.



En cada caso se determinó la selectividad al determinar el cociente entre la respuesta observada por la muestra blanco con la señal observada en las muestras adicionadas de fármaco.

El método es *Selectivo* si la respuesta analítica de las interferencias cercanas al LIC es menor al 20% y las cercanas al E.I. menor al 5% de sus respuestas respectivas.

4.4.2 Curva de Calibración.

Para determinar la linealidad del intervalo de trabajo, se preparó por triplicado la curva de calibración en el intervalo de 0.5 a 10.0 $\mu\text{g/mL}$ de MBZ. En cada curva se evaluó una muestra blanco y una muestra cero. Este intervalo se definió después de haber revisado los valores de $C_{\text{máx}}$ de MBZ reportados para humanos, rata y ratón. Además, se pretende aplicar este método en el estudio de una nueva formulación de MBZ en microemulsiones de administración nasal, por lo que se esperan concentraciones altas.

La linealidad se determinó aplicando la prueba de regresión lineal por mínimos cuadrados (pendiente [m], ordenada al origen [b] y coeficiente de correlación [r]), al evaluar el cociente de la altura de los picos MBZ/E.I. en función de la concentración nominal de MBZ de cada muestra. Se decidió realizar la cuantificación con la altura del pico cromatográfico considerando que se pudiera presentar algún caso extraordinario donde algún componente de la matriz biológica interfiriera con la cuantificación del MBZ al usar el área del pico, por ensanchamiento del mismo.

La concentración recuperada para cada nivel de concentración debe estar dentro del 15% de la concentración nominal, pudiendo ser del 20% para el LIC. Este cálculo se realizó interpolando la respuesta analítica de cada muestra en la misma curva de calibración.

4.4.3 Precisión.

La precisión del método se evaluó al determinar la repetibilidad y la reproducibilidad del mismo, de la manera en que se describe a continuación.



4.4.3.1 *Repetibilidad.*

Se analizaron en un mismo día y por quintuplicado, las muestras control MCB, MCM, MCA y LIC (1.5 µg/mL, 6.0 µg/mL, 8.5 µg/mL y 0.5 µg/mL respectivamente). No se evaluó el efecto de la dilución debido a la amplitud del intervalo de la curva de calibración, con el cual no se espera que haya muestras por arriba del LSC. La respuesta analítica de cada muestra se interpoló en una curva de calibración preparada el mismo día la respuesta analítica de cada muestra para determinar su concentración.

El CV% del valor promedio de la concentración obtenida no debe ser mayor que el 15%, pudiendo ser $\leq 20\%$ para el LIC.

4.4.3.2 *Reproducibilidad (repetibilidad intermedia).*

Se analizaron por quintuplicado en dos días diferentes, para garantizar corridas analíticas diferentes, las muestras control MCB, MCM, MCA y LIC (1.5 µg/mL, 6.0 µg/mL, 8.5 µg/mL y 0.5 µg/mL respectivamente). La respuesta analítica obtenida se interpoló en una curva de calibración preparada cada día para determinar la concentración de cada muestra.

El CV% del valor promedio de la concentración obtenida no debe ser mayor que el 15%, pudiendo ser $\leq 20\%$ para el LIC.

4.4.4 *Exactitud.*

Con los datos obtenidos en la prueba de precisión, se calculó la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal de cada muestra mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ desviación} = \left| \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración nominal}} \right| * 100$$

El método muestra exactitud si el valor promedio del % *desviación* es menor del 15% para cada nivel de concentración, pudiendo ser $\leq 20\%$ para el LIC.



4.4.5 Estabilidad a corto plazo.

Se determinó al analizar y comparar por triplicado una serie de las muestras control MCB y MCA (1.5 $\mu\text{g/mL}$ y 8.5 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) extraídas inmediatamente después de su preparación y una serie que se mantuvo a temperatura ambiente en la mesa de trabajo analizada 6 h después de su preparación. Las respuestas analíticas de todas las muestras se interpolaron en una curva de calibración preparada el día de análisis y se determinó la concentración de cada una.

La concentración promedio de cada nivel de concentración debe estar dentro del 15% de la concentración nominal.

4.4.6 Límite inferior de cuantificación.

En esta prueba se estudió por quintuplicado la respuesta de muestras del LIC (0.5 $\mu\text{g/mL}$), comparándola contra muestras blanco, debiendo ser la respuesta del fármaco 5 veces mayor que la del blanco. Además, se interpoló la respuesta en una curva de calibración preparada el mismo día determinando la concentración recuperada de cada muestra.

Para aceptar este nivel de concentración como LIC, el promedio de las concentraciones recuperadas no debe tener un CV% mayor al 20% y el % *desviación* debe ser $\leq 20\%$.



5. Resultados y Discusión.

5.1 Desarrollo del método.

5.1.1 Condiciones analíticas.

5.1.1.1 Selección de Longitud de Onda de Análisis.

En la figura 7 se muestra el espectro de absorción del MBZ a una concentración de 7.0 $\mu\text{g/mL}$ en el rango UV. Con base en estos resultados, se seleccionó la longitud de onda de 246 nm para cuantificar las muestras.

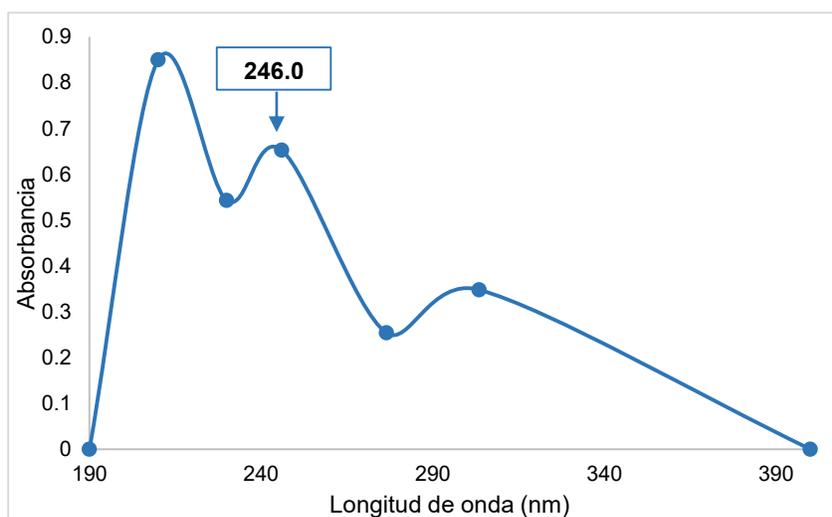


Figura 7. Espectro de absorción del MBZ en una solución MeOH:H₂O (0.1% ácido fórmico) (60:40) en el rango UV.

5.1.1.2 Selección de Columna Cromatográfica.

De las dos columnas cromatográficas evaluadas, se seleccionó la Zorbax Eclipse XDB-C18 de Agilent Technologies, debido a que brindó las mejores características de los picos, al evaluar el ancho del pico, la altura y la simetría. Las figuras 8 y 9 muestran los cromatogramas correspondientes a muestras de MBZ 50.0 $\mu\text{g/mL}$ y E.I. 40 $\mu\text{g/mL}$ en solución (la concentración del MBZ es la indicada en la FEUM como solución de referencia para realizar la valoración de tabletas conteniendo MBZ), analizadas con las columnas Gemini y Zorbax respectivamente. En dichas figuras se observa claramente que los picos obtenidos con la columna Gemini tienen poca simetría debido a que presentan cabeceo, y además, el t_R para ambos analitos



se observa recorrido aproximadamente 1.5 min. respecto a los mostrados en el análisis con la otra columna.

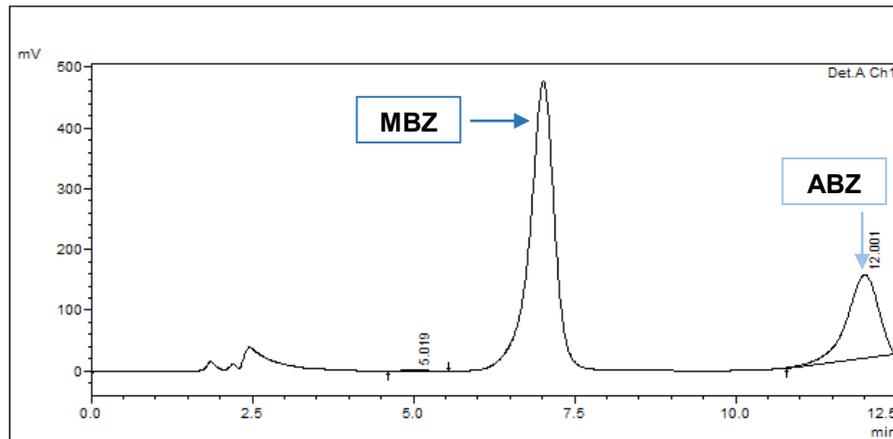


Figura 8. Cromatograma correspondiente a una muestra de MBZ (50.0 $\mu\text{g/mL}$) y E.I. (40 $\mu\text{g/mL}$) en solución, utilizando la Columna Gemini – Phenomenex.

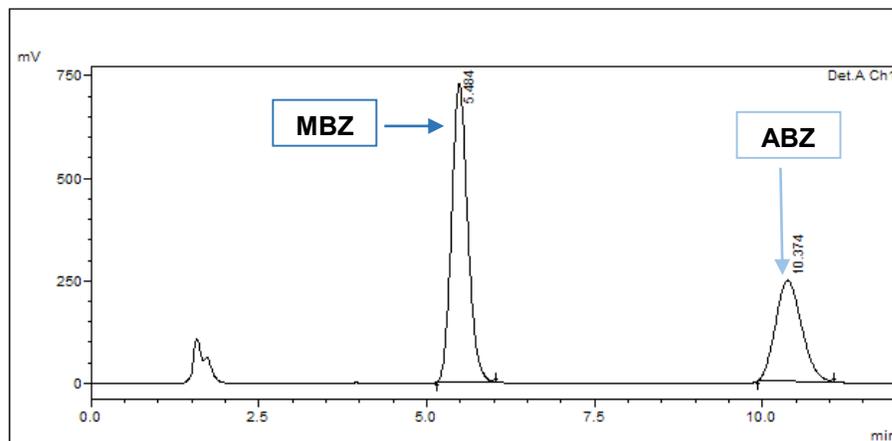


Figura 9. Cromatograma correspondiente a una muestra de MBZ (50.0 $\mu\text{g/mL}$) y E.I. (40 $\mu\text{g/mL}$) en solución, utilizando la Columna Zorbax Eclipse XDB – Agilent.

5.1.1.3 Selección de la Fase Móvil.

En esta etapa se seleccionó la F.M. que brindó una mejor resolución entre el MBZ y el E.I., así como mayor intensidad de la respuesta analítica (altura y área de pico). La fase móvil elegida fue *MeOH:H₂O* (0.1% ácido fórmico) (60:40) pH 5.00. Esta fase móvil es sencilla y adecuada para llevar a cabo un buen análisis, puesto que es recomendable que contenga ácido fórmico en baja concentración (hasta 0.5% v/v en agua) y un pH controlado entre 4.0 y 6.0. El contenido de ácido fórmico



ayuda a la solubilidad del fármaco en la fase móvil, por lo cual es más eficiente la elución, además que se impone fuerza iónica en el medio, lo cual en ocasiones ayuda a definir los picos cromatográficos. Respecto al pH, experimentalmente se observó que, si no había control dentro del intervalo sugerido, los picos presentaban poca resolución o t_R muy elevado.

5.1.1.4 Selección del volumen de inyección.

Para esta prueba se realizaron ensayos inyectando 40 μL y 50 μL de solución de MBZ. Como era de esperarse, se obtuvo una mejor respuesta (más intensa) al inyectar un volumen alto. La respuesta se evaluó como altura del pico y el área obtenida para el mismo.

5.1.1.5 Selección de la velocidad de flujo.

Esta prueba se realizó con el fin de obtener un buen tiempo de corrida con t_R adecuados (corridas cortas con t_R a partir de los 5.00 min preferentemente) para la separación del MBZ, el E.I., y los componentes endógenos del plasma.

Los resultados mostraron que, al emplear una velocidad baja (0.8 mL/min) se presentaba buena separación pero la corrida analítica era muy larga y los picos tendían a ensancharse. En cambio, con la velocidad alta (1.0 mL/min) se obtuvo un buen patrón de retención para ambas moléculas y con poca interferencia de los componentes endógenos del plasma. El tiempo final de la corrida fue de 12.0 min.

Después de evaluar estos parámetros, se definieron las mejores condiciones analíticas para la cuantificación de MBZ, las cuales se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones analíticas para la cuantificación de MBZ en muestras plasmáticas.

Parámetro	Condición
Columna cromatográfica	Zorbax Eclipse XDB-C18, 4.6x150 mm, 5 μm .
Fase Móvil	MeOH:H ₂ O (0.1% ácido fórmico) (60:40) pH 5.00
Velocidad de flujo (mL/min)	1.0
Volumen de inyección (μL)	50
Longitud de onda (nm)	246
Tiempo final de corrida (min)	12.0
Temperatura de análisis	Ambiente



5.1.2 Condiciones de extracción.

Los resultados obtenidos con los dos métodos de extracción fueron los siguientes:

5.1.2.1 Extracción líquido-líquido.

Las condiciones de extracción se seleccionaron de acuerdo a la respuesta analítica obtenida (altura del pico cromatográfico). En todos los casos de análisis se mantuvo constante el proceso de centrifugación y congelación, así como el tiempo de agitación de las muestras

Las mejores condiciones para la extracción líquido-líquido se seleccionaron de acuerdo a la respuesta cromatográfica observada. Estas condiciones se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones de extracción por la técnica Líquido-Líquido.

Parámetro	Condición
Disolvente	Mezcla Éter:CH ₂ Cl ₂ :CHCl ₃ (60:30:10)
Volumen de disolvente	4.5 mL
Velocidad de agitación	350 rpm
Tiempo de agitación	10 min
Uso de agente precipitante de proteínas	No
Centrifugación	3000 rpm / 15 min.
Congelación	2.0 h a -22 °C

Particularmente, se observó que:

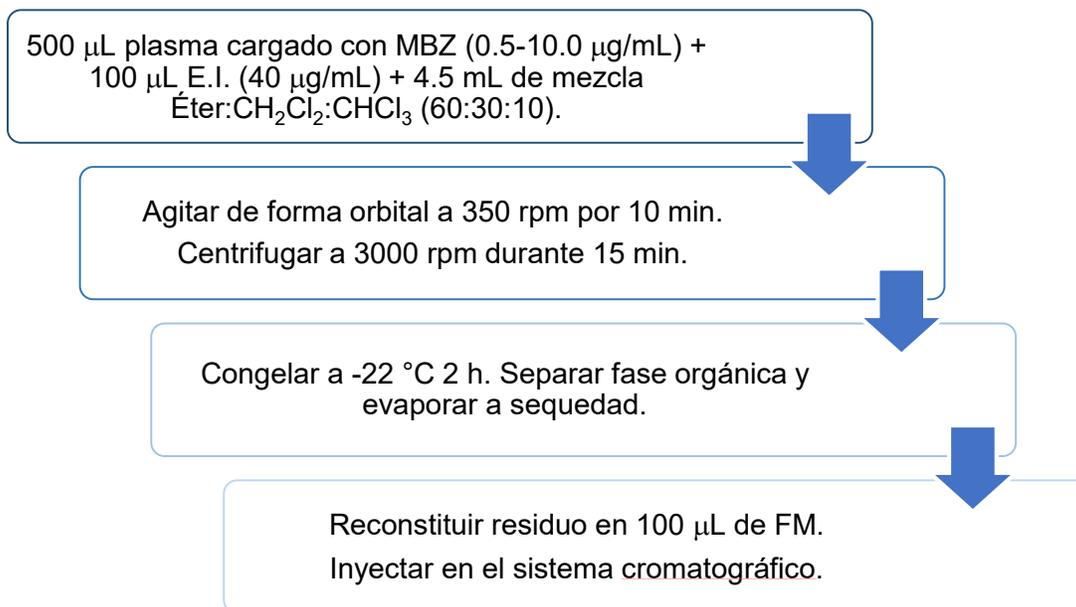
- La mezcla de disolventes seleccionada presentó la menor interferencia de componentes endógenos, así como mayor intensidad de la respuesta analítica.
- Al emplear disolventes puros, se presentó un pico de baja intensidad cerca del t_R del MBZ del cual no hubo resolución, presentándose aparentemente *cabeceo del pico*.
- Al utilizar una baja velocidad de agitación, la respuesta fue de baja intensidad y se presentaban interferencias cercanas al t_R del MBZ. Al



emplear la velocidad de agitación de 350 rpm se presentó un mejor reparto del MBZ en las fases, debido al mayor contacto entre las fases por el aumento del área superficial del contacto.

- El uso del NaOH como agente precipitante de proteínas se descartó debido a que al alcalinizar la muestra, la molécula se ioniza y por tanto ya no se extrae de la fase acuosa. La respuesta analítica obtenida con este agente fue muy baja, pues el nivel alto de concentración presentaba respuestas menores que el nivel bajo de concentración sin el uso de la base.

En el siguiente esquema se presenta la metodología seguida para el proceso de extracción líquido-líquido.



Esquema 1. Proceso de extracción de MBZ de las muestras de plasma con la técnica Líquido-Líquido.

A continuación se presentan los cromatogramas típicos correspondientes a una muestra blanco, al LIC y al LSC (Figuras 10, 11 y 12 respectivamente), tratadas bajo las condiciones de extracción mencionadas anteriormente. El recobro promedio obtenido ($n = 3$) por este método para el MBZ fue de 67.0 ± 16.1 % para el LIC y de 68.0 ± 20.9 % para el LSC ($\bar{X} \pm D.E.$).

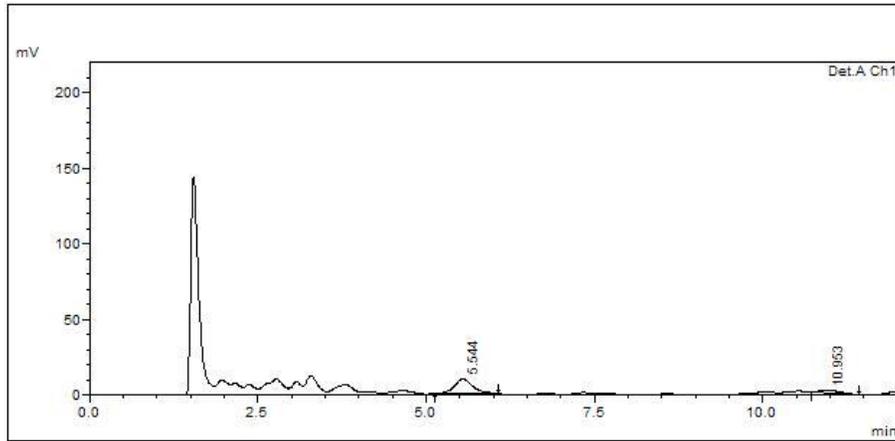


Figura 10. Cromatograma correspondiente a una muestra blanco de plasma tratada bajo las condiciones de extracción líquido-líquido.

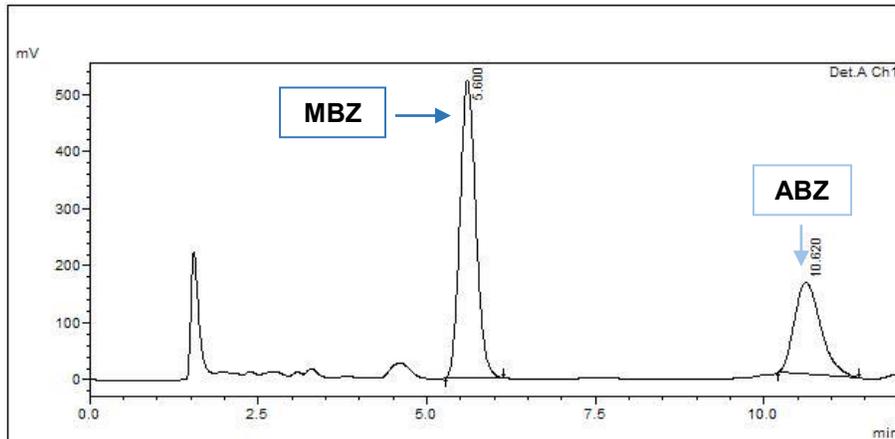


Figura 11. Cromatograma correspondiente a una muestra del LSC (10.0 $\mu\text{g/mL}$) y E.I. (40 $\mu\text{g/mL}$) en plasma tratada bajo las condiciones de extracción líquido-líquido.

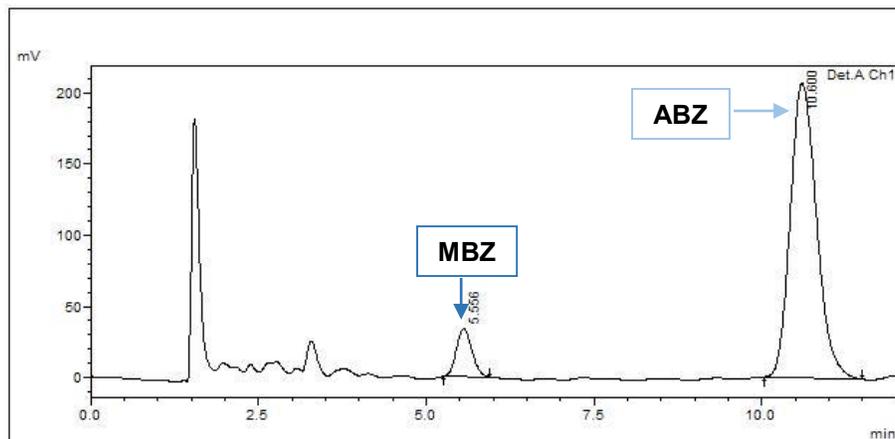


Figura 12. Cromatograma correspondiente a una muestra del LIC (0.5 $\mu\text{g/mL}$) y E.I. (40 $\mu\text{g/mL}$) en plasma tratada bajo las condiciones de extracción líquido-líquido.



5.1.2.2 Extracción en Fase Sólida.

Las mejores condiciones para la extracción en fase sólida se seleccionaron de acuerdo a la respuesta cromatográfica observada. En la Tabla 8 se resumen los valores elegidos para cada parámetro. Estas condiciones de extracción se determinaron mediante la comparación cualitativa de los cromatogramas obtenidos en las diversas pruebas.

Tabla 8. Condiciones de extracción en Fase Sólida.

Etapa	Disolvente	Volumen
Acondicionamiento	MeOH	5.0 mL
Equilibrio	F.M.	4.0 mL
Lavado	Fosfatos pH 5.0 + MeOH:H ₂ O (20:80)	5.0 + 0.5 mL
Elución	MeOH	3.5 mL
Reacondicionamiento	MeOH + H ₂ O	5.0 + 4.0 mL

Nota: El reacondicionamiento se refiere al proceso aplicado para lavar el cartucho de tal forma que se elimine cualquier especie química que haya podido haberse quedado retenida. La finalidad de este procedimiento era optimizar el uso del cartucho. Sin embargo, los cartuchos se utilizaron sólo una vez, porque se observó que se tapaban al intentar un segundo uso.

Como se sugiere en el *Manual de Cuidados y Uso* de los cartuchos para extracción de fase sólida (Waters, s.f.), primero se deben activar los cartuchos con un disolvente *fuerte*, que en este caso deben ser solventes orgánicos como MeOH, ACN, isopropanol o alguna mezcla que contenga alta proporción de alguno de estos. Dado que la F.M contiene el metanol, se decidió utilizar este disolvente de manera constante en la primera etapa para la técnica. Con este paso se asegura reproducibilidad en los resultados, ya que si no se realiza, cualquier muestra o disolvente de naturaleza acuosa no penetra la superficie hidrofílica del adsorbente y por tanto no eluye a través del cartucho.

Después del paso de acondicionamiento, los cartuchos deben adecuarse de modo que el empaque presente buena humectación y los grupos activos estén expuestos para interactuar con la muestra. Esta etapa debe realizarse con disolventes *débiles* como agua o soluciones amortiguadoras. Es importante que los cartuchos



no se sequen antes de cargar la muestra, por lo que estos pasos deben realizarse de forma rápida. Esta etapa es el equilibrio del cartucho.

Se observó que con el agua y el ácido fórmico, la respuesta analítica fue baja respecto a la muestra en la solución amortiguadora de fosfatos. Además, la muestra tratada con agua presentó picos anchos. Las muestras tratadas con la solución de fosfatos presentaron buena intensidad de la señal pero se veían algunas interferencias cercanas a los t_R de los analitos. Por tal efecto, se decidió probar la F.M. como disolvente de acondicionamiento. El cromatograma obtenido al usar esta mezcla de disolventes presentó señales más limpia que el obtenido con la solución de fosfatos.

Para el proceso de lavado, dado que la naturaleza de la muestra es acuosa y los analitos son poco hidrofílicos, se eligieron disolventes acuosos. Los resultados mostraron que al utilizar agua y el ácido fórmico se presentaron interferencias de los compuestos endógenos y las señales de los analitos fueron de baja intensidad, además que los picos tendían a ensancharse. Al emplear soluciones de fosfatos, se mejoró la limpieza de la muestra, pero debido a las propiedades ácido-base de los analitos, fue importante mantener un pH en el cual las moléculas permanecieran unidas al empaque del cartucho y no se eluyeran con el disolvente. Por esto, y como la F.M. tiene un pH, de 5.0, se evaluó la solución amortiguadora de fosfatos a pH 5.0. Los cromatogramas fueron limpios y las señales tuvieron una intensidad adecuada para llevar a cabo el análisis.

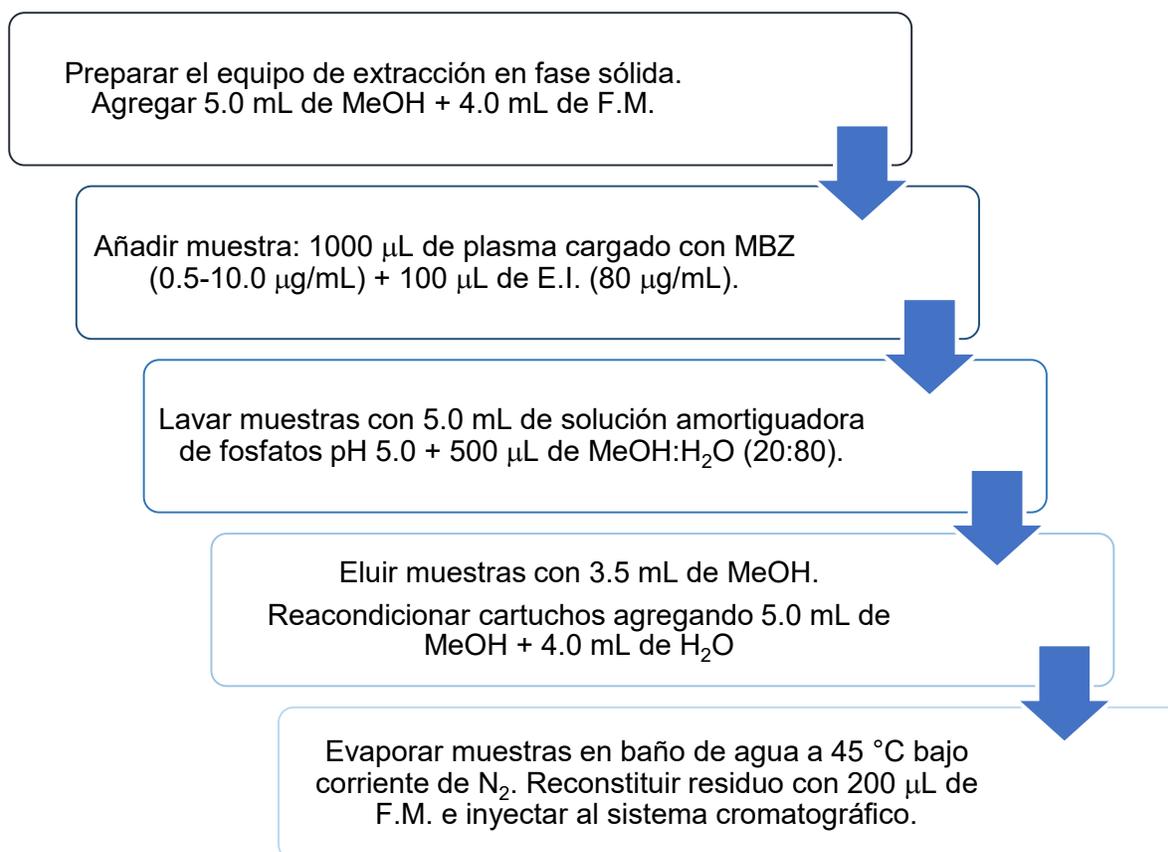
Respecto al volumen de MeOH para la elución de los analitos, se observó que al emplear un volumen de disolvente de 5.0 mL, la respuesta cromatográfica era semejante a la obtenida con un volumen de 3.5 mL, por lo que se decidió utilizar este último, considerando que ello permitiría tener un menor volumen de desecho.

Una vez elegido el método, se realizó la prueba de acidificación de la muestra y precipitación de proteínas con ácido fosfórico con el fin de mejorar la eficiencia de extracción, ya que el analito tiene un alto porcentaje de unión a proteínas plasmáticas. Al hacer este procedimiento se observó que la respuesta para el MBZ



y para el E.I. presentaba mayor intensidad, indicando, en efecto, una mejora en la extracción de los compuestos. Sin embargo, se observó que en las muestras blanco había señales de compuestos endógenos que interferirían en la cuantificación del MBZ, por lo cual se descartó el utilizar este procedimiento y se decidió utilizar el método sin la adición del agente acidificante.

En el esquema 2, se presenta la metodología seleccionada para la extracción en fase sólida.



Esquema 2. . Proceso de extracción de MBZ de las muestras de plasma con la técnica en Fase Sólida.

En las figuras 13, 14 y 15 se presentan los cromatogramas típicos obtenidos tras el proceso de extracción anteriormente descrito, correspondientes a una muestra blanco, el LSC y el LIC respectivamente. El recobro promedio ($n = 5$) obtenido fue de $67.2 \pm 3.0 \%$ en el intervalo de la curva de calibración ($\bar{X} \pm D.E.$).

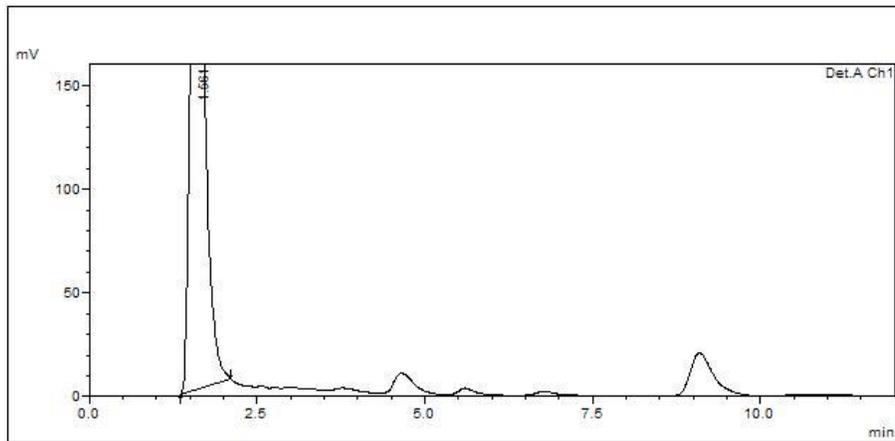


Figura 13. Cromatograma típico de una muestra blanco de plasma tratada bajo las condiciones de Extracción en Fase Sólida.

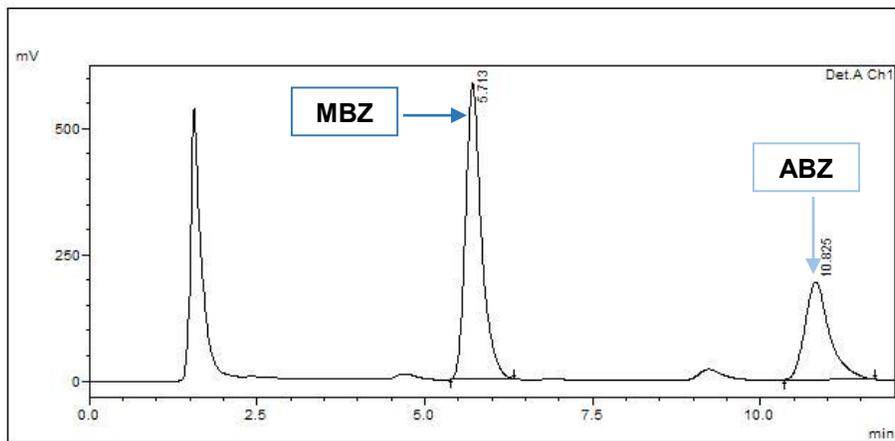


Figura 14. Cromatograma típico de una muestra correspondiente al LSC (10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y E.I. (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en plasma tratada bajo las condiciones de Extracción en Fase Sólida.

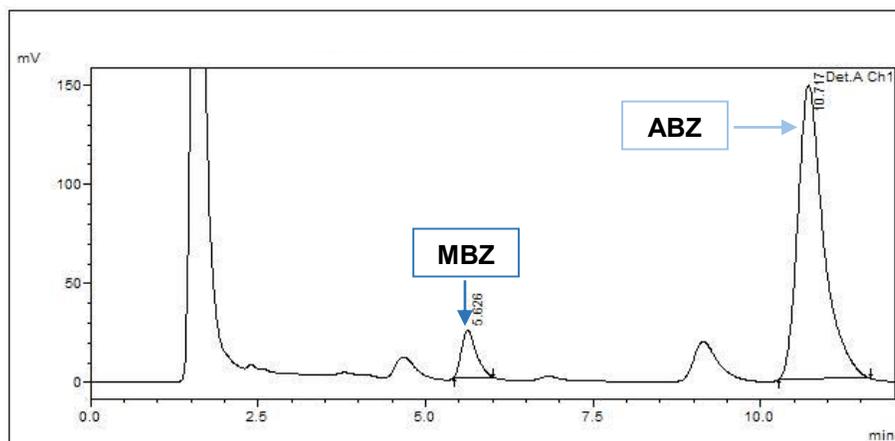


Figura 15. Cromatograma típico de una muestra correspondiente al LIC (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y E.I. (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en plasma tratada bajo las condiciones de Extracción en Fase Sólida.



Si bien, el recobro absoluto fue muy similar con ambos métodos de extracción, los resultados fueron menos variables al emplear la extracción en fase sólida, por lo cual es el método seleccionado para validarlo y aplicarlo en la cuantificación de muestras plasmáticas que contengan MBZ. Este método presenta ventajas de desempeño contra otros dos métodos reportados en literatura internacional. A continuación en la tabla 9 se comparan las tres metodologías y posteriormente se discuten.

Tabla 9. Comparación de diferentes métodos para la cuantificación de MBZ en plasma humano.

Parámetro	Método desarrollado	Método B (Allan, Goodman, & Watson, 1980)	Método C (Altonn, Patrick, & McGuire, 1979)
Columna	Zorbax Eclipse XDB-C18, 4.6x150 mm, 5 μ m	LiChrosorb RP-8, 4.6x250 mm, 10 μ m	Columna de fase reversa, 300x3.0 mm
Precolumna	No se ocupó	Corasil C18, 35x3.2 mm	Acero inoxidable, 3x0.32 cm
Fase móvil	MeOH:H ₂ O (0.1% ácido fórmico) (60:40) pH 5.00	^A MeOH:H ₂ O (55:45) ^B MeOH:Fosfatos 0.05 M, pH 5.5 <i>Mezcla A:B (67:33)</i>	Buffer KH ₂ PO ₄ /NaOH (0.05 M):ACN (73:27 v/v)
Volumen de inyección (μL)	50	20	20
Velocidad de flujo (mL/min)	1.0	1.7	2.5
Volumen de muestra (mL)	1.0	5.0	2.0
Técnica de extracción	Sólido-líquido: Sep-Pak C18	Sólido-líquido: Sep-Pak C18	Líquido-líquido: acetato de etilo
Recobro absoluto (%)	67.2 \pm 3.0	71.2	75.9 \pm 3.8
t_R MBZ(min)	5.65	7.89	10.03



En la tabla 9 se pueden ver algunas diferencias entre algunos métodos reportados para cuantificar MBZ en plasma humano. Sin embargo, no se presenta descrita toda la metodología. Es importante hacer énfasis en algunos parámetros, con los cuales es que se argumenta que el método desarrollado es más eficiente que los existentes: el volumen de muestra de plasma es sustancialmente menor que el de los otros dos, así como la velocidad de flujo y el tR del MBZ. Todo esto tiene una injerencia directa en la cuantificación, puesto que a mayor tR, los picos tienden a ensancharse, pudiendo presentar poca simetría. Algo visible es que la longitud de las columnas en los otros métodos es elevada, siendo hasta del doble de la que se ocupa en el método presentado en este trabajo, situación que justifica el hecho de que los tR y la velocidad de flujo sean mayores. A su vez, se observa que en los tres casos, el pH de la fase móvil juega un papel vital para la cuantificación de las muestras. Esto se debe, como se comentó anteriormente, a que el MBZ presenta propiedades ácido-base al tener en su estructura nitrógenos con pares electrónicos libres.

Otra cosa que impacta, es ver que el método recién desarrollado presenta el menor porcentaje de recobro absoluto de entre los tres. Sin embargo, se encontraron diferencias entre las metodologías, siendo la principal, el volumen de disolventes utilizado. En el caso de la extracción sólido-líquido, utilizaron más de 20 mL de agua para el lavado de cada muestra y hasta 10 mL de MeOH para el lavado de los cartuchos. En el caso de la extracción líquido-líquido, utilizaron al menos 14 mL de acetato de etilo, 2 mL de ácido clorhídrico diluido, 2 mL de NaOH diluido y 6 mL de éter de petróleo para realizar extraer cada muestra, involucrando una gran número de pasos, lo cual complica la técnica y disminuye su robustez.

Es entonces, por estas razones, que el método desarrollado presenta ventajas de análisis respecto a los demás, al tener un bajo tiempo de corrida, poco gasto de disolventes y condiciones sencillas para el procesamiento de las numerosas muestras que se lleguen a obtener al realizar algún estudio que involucre la cuantificación de MBZ en plasma humano.



5.2 Evaluación del desempeño del método.

5.2.1 Selectividad.

En la tabla 10 se presentan los porcentajes de respuesta correspondientes a las señales de los compuestos endógenos que eluyen en t_R cercanos al LIC y al E.I., analizadas el mismo día. Se observa que en todos los casos las respuestas son menores del 20.0% para el MBZ y menores al 5.0% para el E.I.

Tabla 10. Porcentaje de respuesta de las muestras blanco de plasma para señales cercanas a los t_R del MBZ y E.I.

Muestra	MBZ		E.I.	
	t_R (min)	% Respuesta	t_R (min)	% Respuesta
Unidad 1	5.452	2.8	10.804	0.2
Unidad 2	5.449	2.6	10.822	0.3
Unidad 3	5.619	3.2	10.656	0.4
Unidad 4	5.522	3.2	10.93	0.5
Mezcla	5.460	5.1	10.819	0.5
Promedio	5.500	3.4	10.806	0.4

Nota: en el promedio se incluyeron las muestras que corresponde a 4 unidades de plasma y a la mezcla del plasma de 6. Las muestras de las unidades 5 y 6 presentaron señales características de las moléculas, lo cual se atribuye a una contaminación de las mismas.

En las figuras 16 y 17 se muestran los cromatogramas correspondientes a un blanco de la mezcla de 6 unidades de plasma y uno del LIC en la mezcla, respectivamente. En la figura 16 se puede observar que las señales interferentes en los t_R del MBZ o del E.I. son menores al 5.0% en la mayoría los casos, lo cual indica que el método es selectivo.

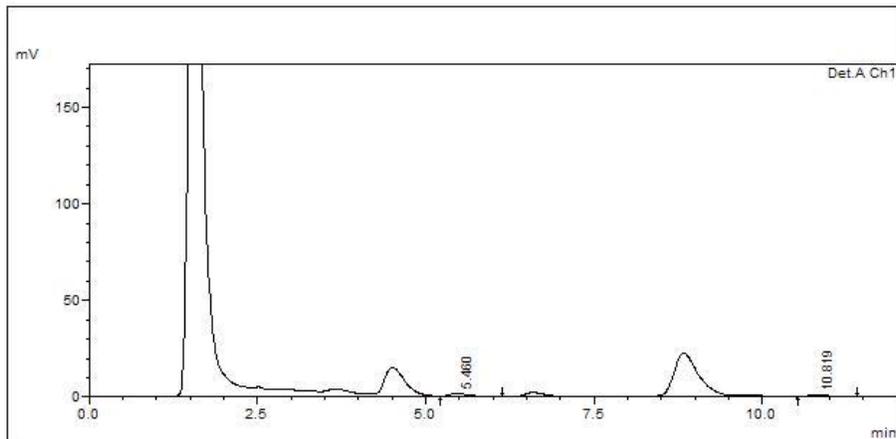


Figura 16. Cromatograma correspondiente a una muestra blanco de pool de plasma para evaluar la Selectividad del método.

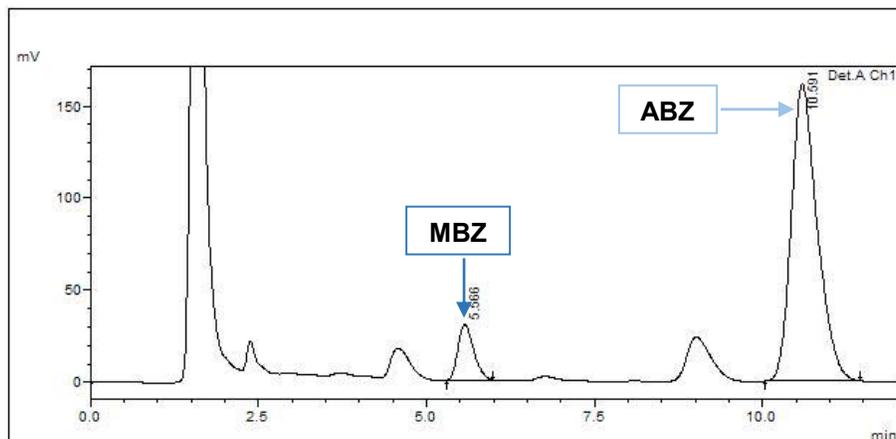


Figura 17. Cromatograma correspondiente a una muestra LIC (0.5 $\mu\text{g/mL}$) en plasma para evaluar la Selectividad del método.

5.2.2 Curva de Calibración.

El intervalo de concentraciones evaluado fue de 0.5–10.0 $\mu\text{g/mL}$ de MBZ. En la figura 18 se muestra la curva de calibración, correspondiente al promedio de las respuestas de tres curvas diferentes (Promedio de relación de alturas MBZ/E.I. en función de la concentración nominal de cada nivel), en la que se puede observar que existe proporcionalidad entre ambos parámetros.

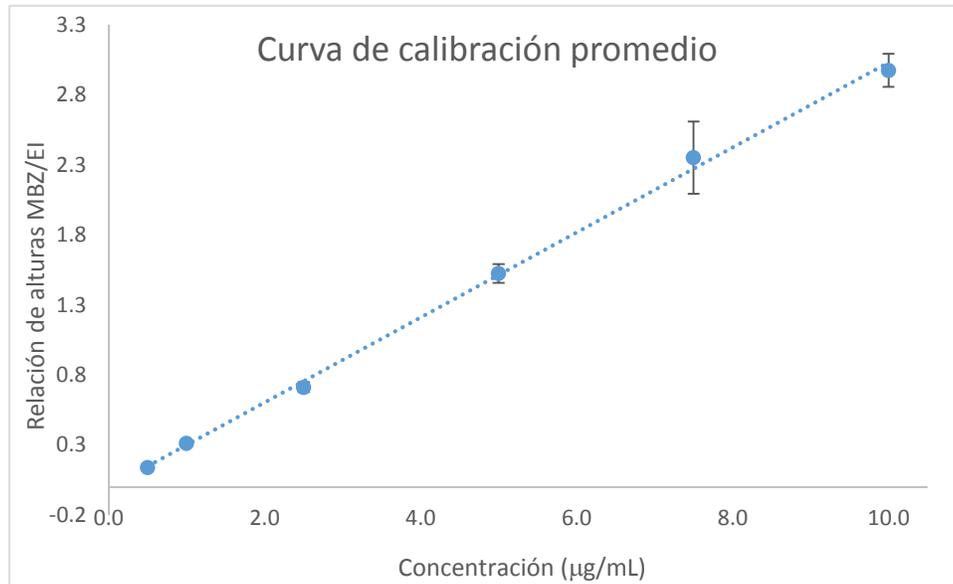


Figura 18. Curva de calibración de respuesta promedio en función de la concentración (n=3).

Para cada curva de calibración se graficó la relación de alturas MBZ/EI en función de la concentración y se determinaron los parámetros de regresión lineal. La tabla 11 muestra los datos de regresión lineal obtenidos para cada curva de calibración.

Tabla 11. Parámetros de regresión lineal para las tres curvas de calibración.

Curva	Pendiente (m)	Ordenada al origen (b)	Coeficiente de correlación (r)	Intervalo de confianza			
				Pendiente		Intercepto	
				Inferior	Superior	Inferior	Superior
1	0.31517454	-0.0356076	0.9969336	0.2632	0.3685	-0.3642	0.2825
2	0.31276711	0.0080724	0.9973905	0.2638	0.3601	-0.2818	0.3097
3	0.28234367	0.0166182	0.9974790	0.2382	0.3229	-0.2299	0.2897
Promedio	0.30342844	-0.0036390	0.9972677	0.2551	0.3505	-0.2920	0.2940

La ecuación de la recta por ajuste de mínimos cuadrados, para la curva de calibración promedio es: $\frac{\text{Altura MBZ}}{\text{Altura E.I.}} = (0.303428)(C_{MBZ}) - 0.003639$

A partir de estos datos se observa que el modelo de ajuste por regresión lineal describe adecuadamente los datos, pues el coeficiente de correlación obtenido en cada serie de datos es mayor a 0.99.



Para la evaluación de la curva de calibración, la NOM-177-SSA1-2013 pide calcular el % *desviación* de cada nivel de concentración. En la tabla 12 se muestran los datos individuales y promedio de cada curva analizada. Se observa que en todos los casos, el % desviación es < 15.0% (< 20.0% en el caso del LIC), por lo cual el método demuestra linealidad y es apto para la cuantificación de las muestras.

Tabla 12. Porcentaje de desviación de la concentración recuperada de cada nivel respecto a la concentración nominal.

Concentración nominal (µg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio
	% desviación de la concentración recuperada			
0.5	5.1	5.7	14.3	8.4
1.0	13.9	2.1	3.9	6.6
2.5	7.0	4.7	4.5	5.4
5.0	5.8	1.2	10.3	5.8
7.5	6.8	6.7	3.8	5.8
10.0	2.1	3.2	0.1	1.8

5.1.1 Precisión

5.2.3.1 Repetibilidad.

En la tabla 13 se muestran los datos de la repetibilidad del método. En ella se puede observar que el CV% de cada nivel de concentración fue menor al 15.0%, por lo cual el método es repetible.

5.2.3.2 Reproducibilidad (precisión intermedia).

En la tabla 14 se presentan los datos de dos corridas analíticas, reportando la concentración recuperada para cada nivel de concentración. Se puede observar que el método es reproducible, puesto que en todos los casos, los CV% fueron menores al 15.0%.



Tabla 13. Datos de concentración recuperada para evaluar la Repetibilidad del método.

Muestra	LIC	MCB	MCM	MCA
Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	0.5	1.5	6.0	8.5
Muestra	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)			
1	0.486	1.563	5.452	8.950
2	0.518	1.679	6.033	8.184
3	0.501	2.049*	6.048	8.258
4	0.502	1.566	6.160	8.322
5	0.546	1.643	6.171	8.542
Concentración recuperada promedio ($\mu\text{g/mL}$)	0.511	1.700	5.973	8.451
D.E.	0.023	0.202	0.298	0.309
CV%	4.4	11.9	5.0	3.7

(*) Concentración recuperada fuera de los límites especificados.

Tabla 14. Datos de Concentración recuperada de dos corridas analíticas diferentes para evaluar Reproducibilidad.

Muestra	LIC	MCB	MCM	MCA				
Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	0.5	1.5	6.0	8.5				
Muestra	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)							
1	0.486	0.593	1.563	1.693	5.452	5.903	8.950	8.322
2	0.518	0.590	1.679	1.652	6.033	5.819	8.184	8.542
3	0.501	0.537	2.049*	1.724	6.048	5.825	8.258	8.346
4	0.502	0.611*	1.566	1.696	6.160	5.802	8.322	8.080
5	0.546	0.572	1.643	1.950*	6.171	5.793	8.542	8.111
Concentración recuperada promedio ($\mu\text{g/mL}$)	0.546		1.652		5.901		8.366	
D.E.	0.044		0.060		0.215		0.258	
CV%	8.1		3.6		3.6		3.1	

(*) Concentración recuperada fuera de los límites especificados.



5.2.3 Exactitud.

La exactitud se evaluó calculando el % *desviación* de la concentración obtenida de MBZ al interpolar los datos en una curva de calibración y el valor de la concentración nominal de cada nivel. En la tabla 15 se presentan los datos de % *desviación* de cada nivel de concentración en un día de análisis. Se observa que en todos los casos, el promedio de % *desviación* de cada nivel de concentración cumple con la especificación (< 15.0%, pudiendo ser \leq 20.0% para el LIC).

Tabla 15. Datos de % *desviación* para evaluar la exactitud del método.

Muestra	LIC	MCB	MCM	MCA
Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	0.5	1.5	6.0	8.5
Muestra	% <i>desviación</i>			
1	2.7	4.2	9.1	5.3
2	3.6	11.9	0.6	3.7
3	0.2	36.6*	0.8	2.8
4	0.4	4.4	2.7	2.1
5	9.2	9.5	2.9	0.5
% <i>desviación</i> (n=5)	3.2	13.3	3.4	2.9

(*) Fuera de los límites especificados.

5.2.4 Estabilidad a corto plazo.

El análisis se realizó al procesar por triplicado las muestras de MCB y MCA a las 6 h después de su preparación. Los resultados que se presentan en la tabla 16 muestran que las muestras de MBZ en plasma (MCB y MCA), fueron estables hasta 6 h después de su preparación, a temperatura ambiente, ya que el valor promedio de la concentración recuperada de MBZ fue menor al 15.0%.

Tabla 16. Estabilidad a corto plazo de las muestras de plasma.

Réplica	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	
	MCB	MCA
1	1.628	8.315
2	1.656	8.998
3	1.652	9.045
Promedio	1.645	8.786
D.E.	0.015	0.409
CV%	0.9	4.7
% <i>desviación</i>	9.7	3.4



5.2.5 Límite inferior de cuantificación.

La respuesta obtenida por las señales de las diferentes muestras del LIC fueron, en promedio, 29.8 veces mayores que la respuesta de la señal del blanco de plasma (determinado según los datos de selectividad). En la tabla 17 se muestran los datos de % desviación y CV% para evaluar que la concentración selecciona, Se observa que el CV% del promedio de la concentración recuperada fue menor al 20.0%, por lo que el método es preciso para cuantificar la concentración de 0.5 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 17. Evaluación de precisión y exactitud para el LIC.

Muestra LIC	Concentración recuperada ($\mu\text{g/mL}$)	% desviación
1	0.486	2.7
2	0.518	3.6
3	0.501	0.2
4	0.502	0.4
5	0.546	9.2
Promedio	0.511	
D.E.	0.023	
CV%	4.4	

Estos resultados demuestran que el método es selectivo, lineal, y repetible en el rango de concentración de MBZ de 0.5 a 10.0 $\mu\text{g/mL}$ de MBZ en plasma humano. Además, con los datos que se tiene se observa una tendencia a que el método es a su vez reproducible y exacto. Sin embargo, para determinar estos parámetros hace falta probar más corridas analíticas donde se analicen las muestras control (MCB, MCM, MCA y LIC).



6. Conclusiones.

- Se desarrolló un método analítico para la cuantificación de MBZ en plasma, encontrándose que
 - La columna más adecuada para llevar a cabo el análisis fue la *Zorbax Eclipse XDB-C18*, de *Agilent Technologies*.
 - La fase móvil que permitió la mejor separación y cuantificación de las muestras fue *MeOH:H₂O (0.1% ácido fórmico) (60:40) pH 5.00*.
 - El volumen de inyección de muestra elegido fue de 50 μ L.
 - La velocidad de flujo que brindó el mejor análisis fue de 1.0 mL/min, con un volumen de inyección de 50 μ L.
- El método de extracción que presentó menor variabilidad en el recobro fue el método de extracción sólido-líquido.
- El método desarrollado demostró ser selectivo, lineal y repetible.
- Las muestras de plasma conteniendo MBZ son estables al menos por un periodo de 6 h a temperatura ambiente.



7. Perspectivas.

- Validar la metodología según lo requerido por la NOM-177-SSA1-2013 para garantizar la reproducibilidad y exactitud del método, así como la confiabilidad de la cuantificación de las muestras plasmáticas.
- Utilizar la metodología analítica desarrollada en estudios de farmacocinética de nuevos productos que contengan MBZ. Ajustar el intervalo de trabajo según las necesidades del estudio de farmacocinética antes mencionado.



8. Referencias bibliográficas.

- Ahuja, S., & Rasmussen, H. (2007). *HPLC method development for pharmaceuticals*. Italia.
- Allan, R. J., Goodman, H. T., & Watson, T. R. (1980). Two High Performance Liquid Chromatographic Determinations for Mebendazole and its metabolites in human plasma using Sep-Pak C18 extraction. *Journal of Chromatography*, *183*, 311–319.
- Altonn, K. B., Patrick, J. E., & McGuire, J. L. (1979). High-performance liquid chromatographic assay for the Anthelmintic Agente Mebendazole in Human Plasma. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *68*, 880–882.
- Bai, R. Y., Staedtke, V., Aprhys, C. M., Gallia, G. L., & Riggins, G. J. (2011). Antiparasitic mebendazole shows survival benefit in 2 preclinical models of glioblastoma multiforme. *Neuro-Oncology*, *13*(9), 974–982. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nor077>
- Bai, R. Y., Staedtke, V., & Riggins, G. J. (2011). Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends in Molecular Medicine*, *17*(6), 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.01.011>
- Bai, R. Y., Staedtke, V., Wanjiku, T., Rudek, M. A., Joshi, A., Gallia, G. L., & Riggins, G. J. (2015). Brain penetration and efficacy of different mebendazole polymorphs in a mouse brain tumor model. *Clinical Cancer Research*, *21*(15), 3462–3470. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2681>
- Braithwaite, P. A., Roberts, M. S., Allan, R. J., & Watson, T. R. (1982). Clinical pharmacokinetics of high dose mebendazole in patients treated for cystic hydatid disease. *European Journal of Clinical Pharmacology*, *22*(2), 161–169. <https://doi.org/10.1007/BF00542462>
- Chico, L. K., Van Eldik, L. J., & Watterson, D. M. (2009). Targeting protein kinases in central nervous system disorders. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *8*(11), 892–909. <https://doi.org/10.1038/nrd2999>
- Consejo de Salubridad General. (2016). Cuadro básico y catálogo de medicamentos. México
- Dayan, A. D. (2003). Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, *86*(2–3), 141–159. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(03\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(03)00031-7)
- de la Torre-Iglesias, P. M., García-Rodríguez, J. J., Torrado, G., Torrado, S., Torrado-Santiago, S., & Bolás-Fernández, F. (2014). Enhanced bioavailability and anthelmintic efficacy of mebendazole in redispersible microparticles with low-substituted hydroxypropylcellulose. *Drug Design, Development and Therapy*, *8*, 1467–1479. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S65561>



- Dean, J. R. (2009). *Extraction Techniques in Analytical Sciences*. Great Britain: Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470682494>
- Doudican, N., Rodriguez, A., Osman, I., & Orlow, S. J. (2008). Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. *Molecular Cancer Research: MCR*, 6(8), 1308–15. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2159>
- DrugBank. (2016). Mebendazol. Última consulta el 15 de febrero de 2017, en <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00643>
- Eckert, J., & Deplazes, P. (2004). Biological, Epidemiological, and Clinical Aspects of Echinococcosis, a Zoonosis of Increasing Concern -- Eckert and Deplazes 17 (1) 107 -- Clinical Microbiology Reviews. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1), 107–135. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.107-135.2004>
- Edwards, G., & Breckenridge, A. M. (1988). Clinical Pharmacokinetics of Anthelmintic Drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, 15(2), 67–93. <https://doi.org/10.2165/00003088-198815020-00001>
- FDA, F. and D. A., & Food and Drug Administration. (2013). *Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services*. <https://doi.org/http://www.labcompliance.de/documents/FDA/FDA-Others/Laboratory/f-507-bioanalytical-4252fnl.pdf>
- Garattini, S., & Schnitzer, R. J. (1982). *Advances in pharmacology and chemotherapy. Volume 19*. Academic Press.
- Gomes, A. R., & Nagaraju, V. (2001). High-performance liquid chromatographic separation and determination of the process related impurities of mebendazole, fenbendazole and albendazole in bulk drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26(5–6), 919–927. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(01\)00446-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(01)00446-0)
- Harris, D. C. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo*. (W. H. Freeman and Company, Ed.) (3a edición). Barcelona, España: Reverté.
- Hurtado, M., Medina, M., Sotelo, J., & Jung, H. (1989). Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for albendazole and its main metabolite albendazole sulphoxide in plasma and cerebrospinal fluid. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 494, 403–407.
- Jordan, M. A., & Wilson, L. (2004). Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews. Cancer*, 4(4), 253–265. <https://doi.org/10.1038/nr1317>
- Kang, Y. P., Yu, J., Huh, Y., Oh, J. H., Kwon, C. H., Lee, S. J., ... Kwon, S. W. (2014). Development of high performance liquid chromatography-ultraviolet detection method for screening mebendazole, clorsulon, diaveridine, and tolfenamic acid in animal-based food samples. *Drug Testing and Analysis*, 6(3), 246–256. <https://doi.org/10.1002/dta.1467>



- Kazakevich, Y., & Lobrutto, R. (2007). *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Estados Unidos de América: Wiley.
- Köhler, P. (2001). The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*, 31(4), 336–345. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00131-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00131-X)
- Lacey, E. (1990). Mode of action of benzimidazoles. *Parasitology Today*, 6(4), 112–115. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(90\)90227-U](https://doi.org/10.1016/0169-4758(90)90227-U)
- Liu, C.-S., Zhang, H.-B., Lei, W., Zhang, C.-W., Jiang, B., Zheng, Q., ... Han, X.-M. (2014). An alternative mebendazole formulation for cystic echinococcosis: the treatment efficacy, pharmacokinetics and safety in mice. *Parasites & Vectors*, 7, 589. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0589-0>
- Martarelli, D., Pompei, P., Baldi, C., & Mazzoni, G. (2008). Mebendazole inhibits growth of human adrenocortical carcinoma cell lines implanted in nude mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 61(5), 809–817. <https://doi.org/10.1007/s00280-007-0538-0>
- Martin, R. J. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. *Veterinary Journal*, 154(1), 11–34. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(05\)80005-X](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(05)80005-X)
- Mukhopadhyay, T., Sasaki, J., Ramesh, R., & Roth, J. A. (2002). Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 8(9), 2963–9. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(96\)80044-5](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(96)80044-5)
- National Center for Advancing Translational Sciences. (2016). Repurposing Drugs. Última consulta el 01 de marzo de 2017, en <https://ncats.nih.gov/preclinical/repurpose#learn-more>
- Nygren, P., Fryknäs, M., Ågerup, B., & Larsson, R. (2013). Repositioning of the anthelmintic drug mebendazole for the treatment for colon cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(12), 2133–2140. <https://doi.org/10.1007/s00432-013-1539-5>
- Palomares Alonso, F. (2009). *Evaluación Farmacodinámica y Farmacocinética de Nuevas Formulaciones y Análogos de Albendazol con posible Efecto Cisticida*. UNAM.
- Pantziarka, P., Bouche, G., Meheus, L., Sukhatme, V., & Sukhatme, V. P. (2014). Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-mebendazole as an anti-cancer agent. *Ecancermedicalscience*, 8, 443. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2014.443>
- Parakh, D. R., Patil, M. P., Dashputre, N. L., & Kshirsagar, S. J. (2016). Development of self-microemulsifying drug delivery system of mebendazole by spray drying technology: Characterization, in vitro and in vivo evaluation. *Drying Technology*, 34(9), 1023–1042. <https://doi.org/10.1080/07373937.2015.1090447>



- Pasquier, E., & Kavallaris, M. (2008). Microtubules: A dynamic target in cancer therapy. *IUBMB Life*, 60(3), 165–170. <https://doi.org/10.1002/iub.25>
- Polson, C., Sarkar, P., Incledon, B., Raguvaran, V., & Grant, R. (2003). Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 785(2), 263–275. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00914-5](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00914-5)
- PubChem. (2017). Mebendazol. Última consulta el 15 de febrero de 2017, en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4030#section=Top>
- Qi, Y. (2008). Impacts of Size on Pharmacokinetics and Biodistributions of Mebendazole Nanoformulations in Mice and Rats Impacts of Size on Pharmacokinetics and Biodistributions of Mebendazole Nanoformulations in Mice and Rats.
- Ramírez Arguedas, N. A. (2007). *Estudio biofarmaceuticos del [alfa]-BIOF10, un nuevo agente fasciolicida*. UNAM.
- Secretaría de Salud. NOM-177-SSA1-2013. Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable... (2013). México.
- Secretaría de Salud. (2014). *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos* (11^a ed.). México.
- Torres, F. C., García-Rubiño, M. E., Lozano-López, C., Kawano, D. F., Eifler-Lima, V. L., von Poser, G. L., & Campos, J. M. (2015). Imidazoles and benzimidazoles as tubulin-modulators for anti-cancer therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 22(11), 1312–23. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150114164032>
- TRSL Inc. (s.f.). BCS DataBase Search. Última consulta el 21 de febrero de 2017, en <http://www.tsrlinc.net/results.cfm>
- Waters. (s.f.). Care and Use Manual, 1–6.
- Xu, N., Gong, B., Dong, J., Yang, Y., & Ai, X. (2016). Single Intravascular and Oral Dose Pharmacokinetics of Mebendazole in Blunt Snout Bream, *Megalobrama amblycephala*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 47(5), 685–690. <https://doi.org/10.1111/jwas.12319>



POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU.